

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**ESTUDO SOBRE A BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA TRIFLURALINA POR
BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLO AGRÍCOLA E PROPOSTA
METODOLÓGICA PARA O ENSINO DE BIODEGRADAÇÃO**

Maria De Lourdes Bellinaso

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da UFRGS
como requisito para a obtenção do
grau de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. João A . P. Henriques

Porto Alegre

2002

Guardar

Guardar uma coisa não é escondê-la ou trancá-la.

Em cofre não se guarda coisa alguma.

Em cofre perde-se a coisa à vista.

Guardar uma coisa é olhá-la, fitá-la, mirá-la por admirá-la, isto é, iluminá-la, ou ser por ela iluminado.

Guardar uma coisa é vigiá-la, isto é, fazer vigília por ela, isto é, velar por ela, isto é, estar acordado por ela, isto é, estar por ela ou ser por ela.

Por isso melhor se guarda o vôo de um pássaro

Do que um pássaro sem vôos.

Por isso se escreve, por isso se diz, por isso se publica.

(.....)

Antônio Cícero

*À minha mãe, hoje uma estrela, tão simples,
e tão grande no seu amor para comigo.*

*A meu pai que me ensinou a sonhar, a
realizar e a amar a vida.*

*Ao Luiz Fernando, pelo seu amor para comigo e
pelo tanto que vivemos e aprendemos juntos.*

Aos meus irmãos, por me quererem bem e me incentivarem a seguir meu caminho profissional: Beatriz, in memoriam, Leônidas, Joana, Tarcísio, Zélia, Edeno, João Alberto, José Humberto e Roque.

AGRADECIMENTOS

Este é um momento de agradecimentos às pessoas e instituições que me deram suporte intelectual, técnico e afetivo para realização deste trabalho. Não se está sozinho em qualquer construção; muito menos eu estive nesta.

Agradeço:

- A quem rege estas esplendorosas transformações metabólicas das espécies que, através da reciclagem, tornam todos molecularmente conectados; obrigado por estar vivendo-as e vendo-as.
- Ao Henriques que me deu a oportunidade de realizar este trabalho. Foi um trabalho difícil; em alguns momentos me parecia sem saída, mas em nenhum deles me senti só, pois Henriques estava presente. Obrigada.
- À Christine, minha co-orientadora. Não existe dentro de mim uma palavra que consiga expressar minha gratidão por toda a sua solicitude e amizade; esteve presente em todos os tempos de realização desta tese, dando sua valiosa contribuição nas reflexões, tomadas de decisões e no registro escrito. Obrigada, muito obrigada, obrigada.
- Ao Charles, no Canadá, que foi inesquecível em sua compreensão e dedicação, durante a realização deste trabalho. Obrigada também toda sua equipe de trabalho e à Mariane, à Cíntia e ao Carlos, meus amigos brasileiros no Canadá.
- Ao professor João Rui Jardim Freire do Departamento de Agronomia por ter concedido o espaço do Laboratório de Microbiologia, onde realizei parte deste trabalho.
- Aos alunos de Agronomia da UNIJUÍ, com os quais trabalhei a proposta de ensino.
- À todos os pesquisadores que contribuíram com estes trabalho, através de suas publicações sobre biodegradação.
- Aos membros da banca por se disporem a aceitar e analisar este trabalho, refletir e opinar sobre ele.
- A UNIJUI que me concedeu o afastamento e a bolsa para a realização deste trabalho.
- Aos meus colegas de trabalho da UNIJUÍ, especialmente aos do Departamento de Biologia e Química, que acreditaram e apostaram em meu projeto de doutorado.
- Ao departamento de Bioquímica por ter sempre me dado bom acolhimento; antes no mestrado e agora no doutorado.
- Aos professores Diogo de Souza, Jorge Guimarães, Luiz Olinto Monteja e Giancarlos Pasquali por terem opinado sobre o artigo “ Biodegradation as a biotechnological model for the teaching of biochemistry “, desta tese.

- À Graziela, bolsista de iniciação científica, Maria do Carmo, Anagilda, Ivanice e ao Silvio, por me auxiliarem nas análises. À Nói e à Mara, pelo trabalho de revisão, e ao Peter pelas suas colaborações.
- Ao Daniel, Matias, Fernando e Rafael por me auxiliarem na montagem das estruturas químicas, e ao Alberto por me auxiliar na elaboração final da apresentação.
- Às secretárias do Centro de Biotecnologia, Márcia e Miriam; da Agronomia, Antônia e de Bioquímica, Cléia.
- A todos os colegas de doutorado e mestrado, em especial à Jane que se tornou, também, minha colega de trabalho na UNIJUÍ, à Jenifer e à Cleidy, por terem contribuído na leitura desta tese, e à Denise minha amiga e colega de doutorado.
- Às minhas amigas e colegas Marlí e Eva por terem sido compreensivas, neste momento final de conclusão da tese.
- Ao Arthur, à Elenice e à Solange por terem tão bem nos acolhido, quando chegamos em Porto Alegre.
- À Miriam, minha querida amiga paulista, pela companheirismo e ajuda na elaboração final desta tese. Estávamos juntas no mestrado, e o destino nos coloca juntas, novamente, no doutorado.
- Ao trio Leonir, Paulo e Luísa por tantas alegrias e aventuras juntos, e à Maris e à Sandra pela grande amizade.
- À Felícia e ao Amaro pela energia que me trouxeram, e por me acharem uma "boadrasta".
- À Jane, minha terapeuta, tão *acreditadora* no ser humano; foste importante.
- À professora e aos colegas de dança com as quais tive muitas horas de descontração, e à Aidé pelo seu maravilhoso trabalho revitalizador.
- A todos os meus queridos amigos que, indiretamente, contribuíram com a realização deste trabalho.
- A todos os 23 sobrinhos e 16 sobrinhos netos que amo tanto e me enchem de alegria, e às cunhadas e aos cunhados pelo carinho.
- A tia Bepina, *in memoriam*, e meu nono Cristóforo, *in memoriam*, meus ancestrais que me deixaram um legado intelectual.
- À D^a Nezi que tão carinhosamente freqüenta nossa casa.
- Aos meus santos Francisco de Assis, Bárbara e nossa Senhora de Lurdes que estão ao meu lado, do lado espiritual.

Este trabalho, que visa a estudar o processo de biodegradação da trifluralina por isolados bacterianos e propor uma metodologia de ensino sobre biodegradação, está estruturado da seguinte maneira:

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Contextualiza a biodegradação de xenobióticos, dando ênfase ao metabolismo da biodegradação de nitrocompostos aromáticos e, mais especificamente, ao nitrocomposto trifluralina, relacionando os objetivos propostos.

CAPÍTULOS I, II, e III

Trata de metodologias utilizadas para alcançar os objetivos propostos, assim como os resultados, as discussões e as conclusões que são apresentados sob forma de três publicações:

1) BIODEGRADATION OF THE HERBICIDE TRIFLURALIN BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL (CAPÍTULO I) – Compreende o isolamento e a identificação das bactérias, e a biodegradação da trifluralina por estas bactérias.

2) GENES SIMILAR TO NAPHTHALENE DIOXYGENASE GENES IN TRIFLURALIN-DEGRADING BACTERIA (CAPÍTULO II) – Relata a investigação de genes catabólicos nas bactérias degradadoras da trifluralina.

3) BIODEGRADATION AS A BIOTECHNOLOGICAL MODEL FOR THE TEACHING OF BIOCHEMISTRY (CAPÍTULO III) – Descreve a implementação de uma proposta pedagógica para o ensino de biodegradação no curso de agronomia.

DISCUSSÃO, CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Analisa e compara os dados obtidos, conclui sobre o trabalho e propõe metas de continuidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Relaciona a literatura referendada na introdução e discussão.

EXECUÇÃO E FINANCIAMENTO

LABORATÓRIOS DE REALIZAÇÃO DO TRABALHO

Microbiologia/Faculdade de Agronomia - UFRGS.

Radiobiologia Molecular/Centro de Biotecnologia - UFRGS

Química Analítica /Instituto de Química - UFRGS

Agrotóxico /Departamento de Biologia e Química - UNIJUÍ

Biodegradation - Biotechnology Research Institute of Canada

ÓRGÃOS FINANCIADORES DO PROJETO

UNIJUÍ - Universidade Regional do Noroeste do Estado do RS

PICD - Programa Institucional de Capacitação de Docentes/CAPES

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

PROPESQ - Pró-reitoria de pesquisa da UFRGS

GENOTOX- Laboratório de Genotoxicidade do Centro de Biotecnologia/
UFRGS.

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
Capítulo I	
Tabela 1 - Identification of the bacterial isolates based on biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis (RDP analyses)	43
Capítulo II	
Tabela 1 – Oligonucleotide primers used for amplifying catabolic genes	66
Tabela 2 – Results of PCR using specific primers encoding the enzymes naphthalene dioxygenase (<i>ndoB</i>), toluene dioxygenase (<i>todC1</i>), toluate 1,2-dioxygenase (<i>xyIX</i>), catechol-2,3-dioxygenase (<i>xyIE</i>), catechol-1,2-dioxygenase (<i>catA</i>) and hybridization with the <i>ndoB</i> gene probe	67
Capítulo III	
Tabela 1 – Parameters monitored during the composting process	94

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO	
Fig. 1 Vendas de agrotóxicos no Brasil, década de 90	4
Fig. 2 Comercialização de herbicidas na Região de Ijuí, em 1994	6
Fig. 3 Esquema do catabolismo aeróbico de xenobióticos aromáticos	16
Fig. 4 Esquema do catabolismo aeróbico do 2,4-DNT e nitrobenzeno pelas bactérias <i>Burkholderia sp.</i> e <i>Pseudomonas pseudoalcaligenas</i> .	20
Fig. 5 Estrutura molecular da trifluralina	21
Fig. 6 Rota metabólica da trifluralina, sugerida por GOLAB et al., 1979	25
CAPÍTULO I	
Fig. 1 Molecular structure of trifluralin	35
Fig. 2 Growth of isolates on medium containing TFL crystals.	45
Fig. 3 Reduction of trifluralin after 30 days of incubation at 28° and 120 rpm in medium 5	47
Fig. 4 HPLC chromatograph showing TFL levels after 30 days incubation at 28° and 120 rpm in medium 5	48
CAPÍTULO II	
Fig. 1 Aerobic catabolism of aromatic compounds via the catechol route	60
Fig. 2 Detection of <i>ndoB</i> by PCR and hybridization analysis in total bacterial DNA	68
Fig. 3 Initial steps in TFL catabolism, as suggested by Golab et al. 1979	70
Fig. 4 Agarose gel electrophoresis showing the presence of large .plasmids	73

CAPÍTULO III

Fig. 1 Composting container 87

Fig. 2 Percentage composition of the waste collected by the students
over 5 days 89

Fig. 3 Simplified scheme of digestion of macromolecules in the waste 91

Fig. 4 Change in pH during composting 93

Fig. 5 Change in temperature during composting 93

DISCUSSÃO

Fig. 6 Proposta de rota catabólica da TFL, com participação de
dioxigenases. 109

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	1
1. Xenobióticos no ambiente	2
1.1 Cenário	2
1.2 Xenobióticos agrícolas – Agrotóxicos/Pesticidas	3
2. Biodegradação de xenobióticos persistentes	7
2.1 Fatores que determinam a biodegradação	8
2.1.1 Fatores de natureza biológica	8
2.1.2 Fatores de natureza físico – química	12
2.2 Metabolismo dos compostos xenobióticos aromáticos	13
2.2.1 Metabolismo dos compostos nitroaromáticos	17
3. Trifluralina	21
3. 1 Biodegradação da trifluralina	23
4. Proposta de modelo pedagógico para o ensino da biodegradação	26
OBJETIVOS	28
1. Geral	29
2. Específicos	29

CAPÍTULO I	31
CAPÍTULO II	55
CAPÍTULO III	78
DISCUSSÃO	99
CONCLUSÃO	110
1. Geral	111
2. Específica	111
PERSPECTIVAS	112
RESUMO E ABSTRACT	115
1. Resumo	116
2. Abstract	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

INTRODUÇÃO

1 – XENOBIÓTICOS NO AMBIENTE

1.1 – Cenário

A partir do início do século XX, o homem passa a sintetizar em escala industrial, utilizando como matéria prima o petróleo, vários tipos de cadeias carbônicas combinadas com os elementos químicos fósforo, enxofre, nitrogênio e halogênios. Após aproximadamente um século, mais de 100 mil compostos químicos sintéticos são encontrados no mercado (SWOBODA-COLBERG, 1995).

Estas novas moléculas orgânicas introduzidas pela cultura tecnológica, não fazem parte do metabolismo dos organismos vivos que compõem a terra, por esta razão foram denominadas xenobióticos (xénos do grego = estrangeiro, estranho) (ALEXANDER, 1999). Muitos destes xenobióticos persistem no ambiente, fazendo com que todos os organismos vivos sejam expostos à sua possível toxicidade.

Uma das primeiras reflexões públicas sobre as conseqüências dos xenobióticos no ambiente ocorreu aproximadamente meio século após seu surgimento, com a publicação de *Primavera Silenciosa* (CARSON, 1962). Neste livro, a autora - uma bióloga -, relata sobre a ausência do canto dos pássaros nas primaveras do norte dos EUA, e correlaciona a morte destes pássaros com o uso de pesticidas agrícolas. Suas observações, inicialmente contestadas, uma vez que careciam de fundamentação científica mais contundentes, foram confirmadas mais tarde com o advento da química analítica ambiental (NEILSON, 1994). Agora, comprovadamente, sabe-se que muitos dos xenobióticos e/ou seus produtos de degradação resultam em efeitos citotóxicos e mutagênicos na espécie humana e nas outras espécies vivas, podendo levar à eliminação seletiva

de indivíduos, portanto a modificações na estrutura ecológica das comunidades (GALLO e LAWRIK, 1990; REBELLO-GAY et al., 1991).

Hoje é preocupação crescente, tanto dos órgãos governamentais - jurídicos, saúde e meio ambiente - como das indústrias, desenvolver conhecimentos sobre a toxicidade, o comportamento, o destino e tecnologias de descontaminação dos xenobióticos.

As tecnologias de descontaminação de ambiente contaminados por xenobióticos persistentes - de difícil degradação - são na perspectiva de degradar estes compostos, empregando processos físicos, químicos e/ou biológicos. O processo biológico, o mais eficaz, utiliza microrganismos indígenas e modificados que degradam estas moléculas, transformando-as em moléculas mais simples que fazem parte do ciclo biogeoquímico da terra: CO_2 , H_2O , NH_3 , SO_4^{--} , PO_4^{--} .

Implementar tecnologias de tratamento de áreas contaminadas por xenobióticos, utilizando microrganismos indígenas e/ou modificados, é uma tendência tecnológica de consenso em todo mundo e requer conhecimentos de várias áreas do saber: microbiologia, bioquímica, biologia molecular, química orgânica e analítica, engenharia.

1 . 2 – Xenobióticos agrícolas - Agrotóxicos/Pesticidas.

Na agricultura moderna, o uso de xenobióticos tem sido o principal método de controle de organismos indesejáveis. Os xenobióticos utilizados para fins agrícolas são denominados, pela literatura mundial, de pesticidas; e no Brasil, a partir de 1990 (BRASIL, 1990), de agrotóxicos.

Há no mercado uma grande variedade e quantidade de agrotóxicos que se destinam ao controle de plantas, insetos, e fungos. Cerca de 300 princípios ativos autorizados compõem as formulações comerciais agrícolas e estima-se que as vendas mundiais de agrotóxicos estejam próximas a US\$ 31 bilhões. O Brasil é o terceiro consumidor mundial de agrotóxicos e os valores das vendas têm-se mostrado crescentes. Na década de 90 as vendas de agrotóxicos passaram de US\$ 1,08 bilhões em 1990 para US\$ 2,33 bilhões em 1999 (fig. 1) (EMATER/ Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural, 2000).

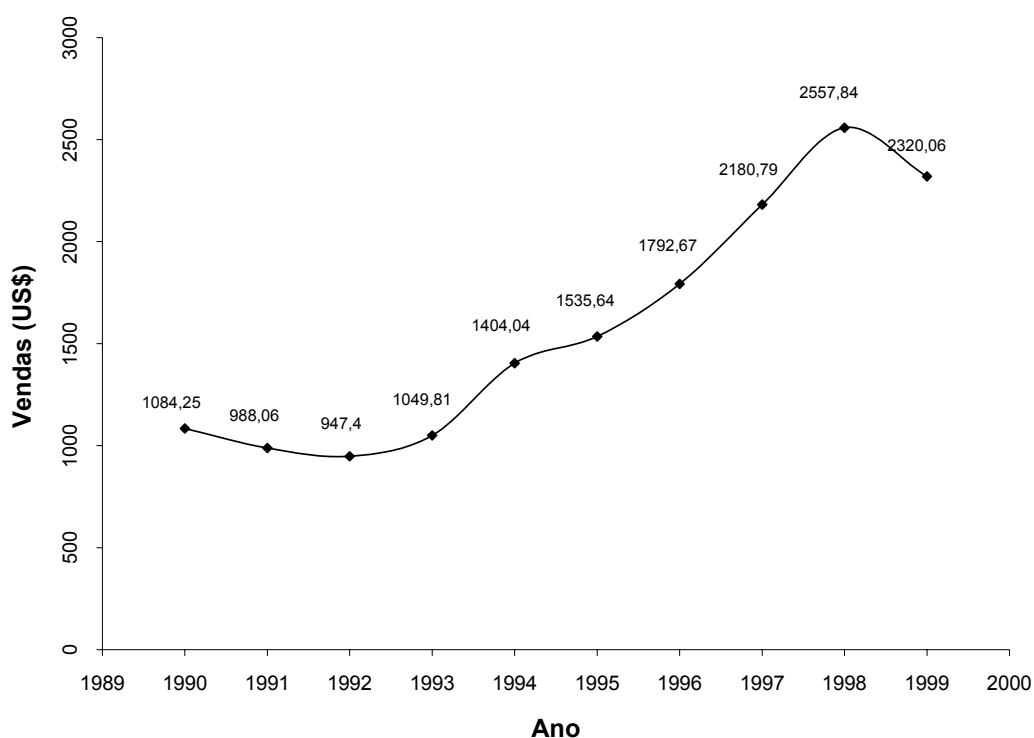


Fig. 1 – Vendas de agrotóxicos no Brasil, na década de 90. Dados de EMATER (2000).

Estes agrotóxicos, lançados no ambiente pelas práticas agrícolas e pelos efluentes industriais, se deslocam na biosfera através da água, do ar e da cadeia trófica alimentar, contaminando espaços e organismos. Em todas as partes do mundo, as águas subterrâneas e superficiais estão contaminadas por agrotóxicos. A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) constatou a presença de 46 diferentes pesticidas nas águas subterrâneas de 26 estados dos EUA (MELO e AZEVEDO, 1997a). Os agrotóxicos afetam a dinâmica das populações de organismos vivos do solo, interferindo na degradação da matéria orgânica, na respiração e na ciclagem de nutrientes (DORAN et al., 1996). A extensão do impacto dos agrotóxicos sobre a atmosfera é, ainda, uma incógnita; mas uma série de estudos já comprovam que somente 50% dos agrotóxicos aplicados atingem a área alvo; isto é, metade da quantidade aplicada é dispersada na atmosfera, sem que se saiba ainda as reais conseqüências disto (WARE, 1980; DAVIS e WILLIAMS, 1990). As aves que se alimentam de grãos contaminados por agrotóxicos sofrem drástica redução em suas populações (HARDY, 1990) e a comunidade aquática é seriamente atingida pela lixiviação agrícola e pelos efluentes industriais (SCHMITT et al., 1981).

O estado do Rio Grande do Sul é uma das regiões brasileiras que mais utiliza agrotóxicos. Por exemplo a região de Ijuí, que compreende cinquenta municípios (20 000 Km²), destina 75% de sua área geográfica para fins agrícolas, sendo que o controle de proteção de lavouras tem sido realizado, basicamente, desde 1960, pela aplicação de diferentes tipos de agrotóxicos. Nesta região, em 1994 foram comercializados, aproximadamente, 2.600 toneladas de agrotóxicos (15 tipos de herbicidas, 8 tipos de inseticidas e 5 tipos de fungicidas), sendo que os herbicidas foram os mais empregados (2.132 toneladas). A trifluralina, um tipo

de herbicida, foi o agrotóxico mais vendido em 1994 (886 toneladas); esta molécula tem sido o agrotóxico mais usado nesta região durante as quatro últimas décadas, no plantio de soja (EMATER, 1994) (fig. 2).

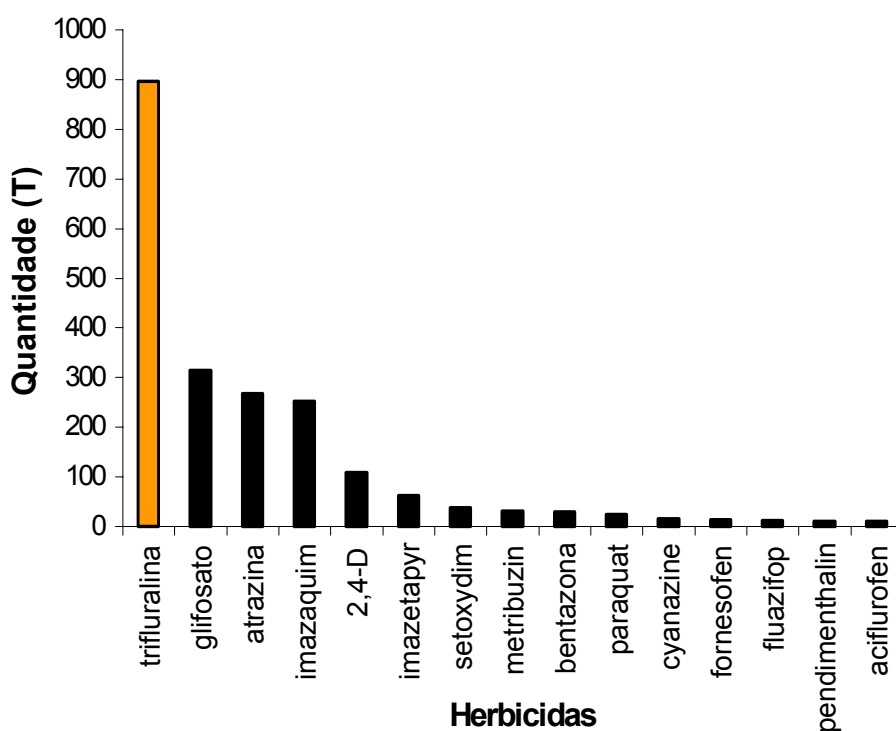


Fig. 2 – Comercialização de herbicidas na Região de Ijuí/RS, em 1994. Dados obtidos de EMATER (1994).

Esta intensa utilização de agrotóxicos, que vem ocorrendo por quatro décadas nesta região do estado, não tem sido monitorada por estudos científicos. Os meios de comunicação da Região Noroeste denunciam casos de intoxicação e malformações congênitas humanas, contaminação de águas, morte de peixes,

perda de lavouras e sítios contaminados por embalagens. No entanto um dos motivos pelos quais as discussões científicas e mudanças de condutas se esvaziam é devido a falta de comprovações destes relatos.

O estado do Rio Grande do Sul também abriga indústrias produtoras de agrotóxicos e outros xenobióticos. A FEPAM (Fundação Estadual de Proteção e Amparo ao Meio Ambiente) tem trabalhado junto às mesmas, no sentido de conscientizá-las sobre a sua responsabilidade social em não impactar o meio, exigindo a descontaminação de seus efluentes.

Este cenário de uso intensivo e de produção de agrotóxicos no estado do Rio Grande do Sul, por várias décadas, deixa evidente a importância da pesquisa que se propõe estudar os vários tipos de impactos causados por estas moléculas no ambiente. No entanto, até o presente momento, conhecimentos referentes à degradação de agrotóxicos e de outras moléculas persistentes utilizando isolados bacterianos, no sentido de otimizar tecnologias de biorremediação, tem sido pouco investigados. TONDO (1995) isolou, de efluente industrial, uma bactéria, *Bacillus sp*, capaz de degradar o 4,5,6 Tricloroguaiacol, um resíduo de indústria de papel de celulose, e MATTOS (1996) isolou, de solo agrícola contaminado, uma bactéria, *Pseudomonas sp.*, degradadora do herbicida Clomazone.

2 - BIODEGRADAÇÃO DE XENOBIÓTICOS PERSISTENTES

Segundo ALEXANDER (1999) biodegradação é a degradação de moléculas naturais ou xenobióticas de difícil degradação, por um sistema biológico. Quando o sistema biológico biodegradar a molécula aos níveis máximos de oxidação

metabólica, produzindo CO_2 , H_2O , NO_3^- , SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , a degradação é, também, denominada de mineralização.

O sistema metabólico que tem-se mostrado mais apto para biodegradar as moléculas persistentes são os microbianos, uma vez que principalmente a eles compete reciclar as moléculas na biosfera. Esta capacidade recicladora dos microrganismos, que mantém a vida na terra, não é devido apenas ao seu potencial genético individual em si, mas também, devido ao metabolismo integrado da comunidade microbiana: produtos de um organismo podem ser o substrato para outros, e o material genético pode ser trocado. Este sinergismo metabólico entre as espécies, ausente nos organismos mais complexos, é de fundamental importância na biodegradação de xenobióticos.

2. 1 – FATORES QUE DETERMINAM A BIODEGRADAÇÃO.

Muitos são os fatores de natureza biológica e físico-químicas, que determinam o potencial de um meio em biodegradar uma determinada molécula xenobiótica.

2. 1 .1- Fatores de natureza biológica

Não existem, na biosfera atual, rotas enzimáticas catabólicas capazes de degradar todos os compostos novos que a cultura humana sintetizou durante os últimos 100 anos. Embora tenhamos um cenário de 3,5 bilhões de anos de evolução bioquímica e, segundo estimativas recentes, entre sete a vinte milhões de espécies vivas, o tipo de moléculas e as rotas metabólicas destas espécies

são semelhantes entre si (LÉVÊQUE, 1997). O metabolismo atual da biosfera não difere drasticamente do metabolismo da biosfera de milhões de anos atrás (NELSON e COX, 2000); é de se esperar, portanto, que estas moléculas novas que vêm sendo produzidas pela cultura humana, podem ser tóxicas e/ou persistentes ao ambiente

Hoje se sabe, no entanto, que alguns xenobióticos podem ser biodegradados por uma população e por isolados microbianos. Esta biodegradação, comumente, é mais provável quando a estrutura química do xenobiótico é semelhante à estrutura das moléculas naturais (ALEXANDER, 1999).

Existem muitas moléculas naturais com estrutura complexa tais como a lignina, os esteróides, os terpenos, e compostos halogenados naturais (GRIBBLE, 1995); e o anel benzênico é a estrutura molecular natural mais abundante na biosfera depois da glicose (GLAZER e NIKAIDO, 1995). As enzimas que catabolizam a degradação destes compostos naturais, algumas vezes, apresentam baixa especificidade pelo seu substrato, possibilitando que xenobióticos com estrutura química semelhantes aos compostos naturais, também sejam catabolizados. Realmente, vários trabalhos relatam a biodegradação até CO_2 e H_2O de xenobióticos derivados do benzeno (ATLAS e BARTHA, 1998; AMBRAMOWICZ, 1990; NARRO et al., 1992; WHYTE et al., 1997).

Quando o xenobiótico percorre todos os passos catalíticos de uma determinada rota catabólica, provavelmente ele se transforma em um produto capaz de entrar no metabolismo intermediário, tornando-se assim - o xenobiótico -, uma possibilidade nutritiva a mais para a sobrevivência do microrganismo. Porém, muitas vezes, o xenobiótico somente é transformado por uma

determinada enzima de uma rota catabólica e o produto resultante não contribui para a sobrevivência do microrganismo. Neste caso o xenobiótico é parcialmente degradado e esta transformação metabólica é denominada de co-metabolismo (ALEXANDER, 1999). O produto do co-metabolismo, muitas vezes, pode servir de substratos para transformações enzimáticas de outras espécies microbianas, possibilitando a biodegradação do xenobiótico. Aparentemente uma transformação fútil, o co-metabolismo, tem mostrado papel importante nas biotecnologias de remediação de sítios contaminados.

A estrutura química dos xenobióticos influencia, pronunciadamente, a catálise enzimática. Os grupos químicos halogênios, $-\text{NO}_2$, $-\text{SO}_3\text{H}$, CN , $-\text{CH}_3$, $-\text{CF}_3$, NH_2 , $-\text{OCH}_3$, e certos arranjos da cadeia carbonada, dificultam a catálise enzimática, conferindo à molécula uma maior recalcitrância (ALEXANDER, 1999). Muitos relatos sobre o aumento da recalcitrância, devido à estrutura química do xenobiótico, são encontrados na literatura (MIKESELL e BOYD, 1985; HADERLEIN e SCHWARZENBACH, 1995). Por exemplo, os detergentes sintéticos alquilbenzeno sulfonados, comercializado nos anos 60-70, provocaram sérios impactos ambientais decorrentes de elevado grau de persistência no ambiente; espessas camadas de espumas foram acumuladas nos rios, matando por asfixia milhares de peixes. Pesquisas feitas mais tarde mostraram que a sua alta persistência no ambiente estava relacionada com a presença de três grupos metilas na cadeia alquila e só com a retirada dos grupos metilas aumentou a sua biodegradabilidade, diminuindo o impacto ambiental (ALEXANDER, 1999).

Mutações que ocorrem em meios contaminados por xenobióticos podem viabilizar seqüências genômicas que codifiquem enzimas capazes de catabolizá-los. Estes indivíduos mutantes trazem uma vantagem perante os outros

indivíduos do meio contaminado, uma vez que a molécula contaminante deixa de ser tóxica e passa a ser nutritiva (HENRIQUES e QUEROL, 1986).

A possibilidade de trocas genéticas, que ocorre entre a população microbiana é um outro fator que contribui para o potencial enzimático biodegradador de uma população microbiana. Estudos feitos a esse respeito mostram que muitas rotas catabólicas de compostos com estrutura complexa estão localizadas no genoma plasmidial de alto massa molecular. Plasmídeos podem ser trocados entre bactérias da mesma espécie e espécies diferentes, favorecendo o metabolismo catabólico de uma molécula recalcitrante (MELO e AZEVEDO, 1997b).

Um ponto importante a ser considerado é a biodisponibilidade da molécula. Muitos dos xenobióticos têm caráter apolar, o que muitas vezes não é compatível com os sítios de entrada da membrana celular, indisponibilizando-o, desta maneira, para o metabolismo intracelular. Alguns microrganismo produzem surfactantes, possibilitando, portanto, a entrada destas moléculas apolares para o meio intracelular (GRIMBERG e AITKEN, 1995).

Outros fatores bióticos devem ser considerados, como o mecanismo de indução da síntese de enzimas degradadoras (JOHRI et al., 1999), a toxicidade excessiva do composto parental ou de seus produtos metabólicos (GLAIZER e NIKAIDO, 1995; FELSOT e PEDERSEN, 1991).

Contudo, mesmo que todos estes fatores bióticos estejam contemplados pela comunidade microbiana, a biodegradação pode não ocorrer caso fatores físico-químicos do meios não sejam favoráveis.

2. 1 .2- Fatores de natureza físico-química do meio.

O meio externo e o compartimento interno celular microbiano estão estritamente relacionados. Mesmo que um sistema microbiano porte todos os requisitos bioquímicos e genéticos necessários para degradar um xenobiótico, se as características físico-químicas do meio não condizem com as necessidades metabólicas do microrganismo, a biodegradação não ocorrerá.

Os principais parâmetros físicos que interferem na biodegradabilidade são o pH, a temperatura, a luz e o potencial redox. Por exemplo, as baixas temperaturas predominantes nas regiões subtropicais, geralmente, dificultam a degradação de compostos persistentes (WHYTE et al., 1999). O meio também deve conter as necessidades nutricionais do microrganismo: fontes de carbono, que poderá ser o próprio xenobiótico, receptores de elétrons (O_2 , nitrato, sulfato, CO_2 , íon férrico, compostos orgânicos), sais minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais (ANDERSON, 1990).

A toxicidade do meio é um outro fator que interfere na biodegradabilidade. Por exemplo, a presença de metais pesados pode inibir, ou mesmo inviabilizar a biodegradação de um xenobiótico (ELSAS et al., 1997).

Ambientes complexos, tais como o solo, têm propriedade de adsorver moléculas; esta propriedade pode reduzir a capacidade biodegradadora do meio, uma vez que a molécula pode ser adsorvida; portanto indisponibilizando-a para o metabolismo microbiano (DIGRAZIO et al., 1990).

Muitos são os fatores que podem ativar ou inibir a biodegradação, já que cada molécula tem um comportamento particular em meios diferentes. Portanto,

predizer a biodegradabilidade de uma molécula é uma tarefa complexa que requer uma análise ampla de dados bióticos e abióticos do meio.

2. 2 – METABOLISMO DOS COMPOSTOS XENOBIÓTICOS AROMÁTICOS.

Estudos comprovam que muitos compostos aromáticos xenobióticos podem ser degradados por fungos e bactérias sob condições aeróbicas e anaeróbicas (AMBRAMOWICZ 1990; BARBIERI, 1994). Os modelos metabólicos bioquímicos destes xenobióticos aromáticos foram construídos, basicamente, utilizando dados de isolados bacterianos, e eles mostram que as estratégias metabólicas da biodegradação dos xenobióticos aromáticos seguem as mesmas bases do metabolismo degradativo dos compostos aromáticos naturais. Embora haja uma grande variedade de estruturas xenobióticas aromáticas, o catabolismo destas moléculas tem se mostrado convergente. A principal rota catabólica de ruptura deste anel, o passo limitante da degradação dos aromáticos, sob condições aeróbica, segue os seguintes etapas:

- ativação do anel aromático através de sua hidroxilação;
- rompimento do anel aromático formando metabólitos acíclicos que seguem para as vias oxidativas do metabolismo intermediário.

Quando o xenobiótico apresenta em sua estrutura grupos substituintes no anel, como N-alquila, O-alquila, carboxilas e alifáticos, estes podem ser catabolizados antes ou após o rompimento do anel aromático (PÈRES e JUÁRES, 1997; ELSAS, et al., 1997; MELO e AZEVEDO, 1997c).

O catabolismo aeróbico dos compostos aromáticos em bactérias tem sido o mais bem elucidado até o presente momento e tem-se mostrado eficiente na biodegradação de xenobióticos aromáticos. No catabolismo aeróbico a ativação do anel, a primeira etapa do catabolismo, ocorre, dependendo da estrutura molecular, através de passos oxidativos e/ou redutivos. Portanto, embora haja várias rotas de ativação do anel aromático, o catabolismo destes compostos é sempre convergente. Os três produtos mais notáveis deste catabolismo inicial são os dihidrodióis: catecol, protocatecol e gentisato, sendo o catecol, um dihidrodiol vicinal, o principal deles (fig. 3) (CHUDHRY e CHAPALAMADUGU, 1991; PARÉS e JUÁREZ, 1997).

A ativação do anel via oxidativa ocorre sob condições aeróbicas e é realizada, de maneira geral, por monooxigenases, que adicionam um átomo de oxigênio da molécula de oxigênio no anel, ou por dioxigenases que adicionam dois átomos de oxigênio da molécula de oxigênio no anel. São as dioxigenases que parecem ter a principal tarefa de hidroxilação do anel aromáticos em xenobióticos. As dioxigenases adicionam os dois átomos de oxigênio no anel aromático, ocasionando uma desaromatização do anel e formando um dihidroxiciclohexadieno, o qual será rearomatizado via enzimática. No caso do carbono conter grupos substituídos como o $-SO_3$, $-OH$, $-Cl$, $-NO_2$, esta rearomatização do anel é espontânea e leva à liberação destes grupos em forma de ânions (fig. 3) (SPAIN et al., 1994).

Após a formação do catecol correspondente tem-se a ruptura do anel catecólico, que também, ocorre por dioxigenases. Esta ruptura pode ocorrer nas posições orto ou meta em relação às hidroxilas vicinais. Os produtos acíclicos

produzidos podem ser oxidados via metabolismo intermediário até CO_2 e H_2O (fig. 3).

Esta estratégia catabólica de compostos aromáticos é uma sinopse da degradação de estruturas aromáticas menos complexas, ou mais semelhantes aos compostos naturais, como benzeno, tolueno, benzoato, naftaleno, fenol (fig. 3). Entretanto, à medida que a biodegradação de outros aromáticos mais recalcitrantes vem sendo estudada, estratégias metabólicas mais complexas têm sido reveladas: passos oxidativos e redutivos se mesclam no objetivo de fazer do xenobiótico um nutriente. Esta complexidade pode ser melhor evidenciada nas rotas biodegradativas de compostos nitroaromáticos que serão discutidas a seguir.

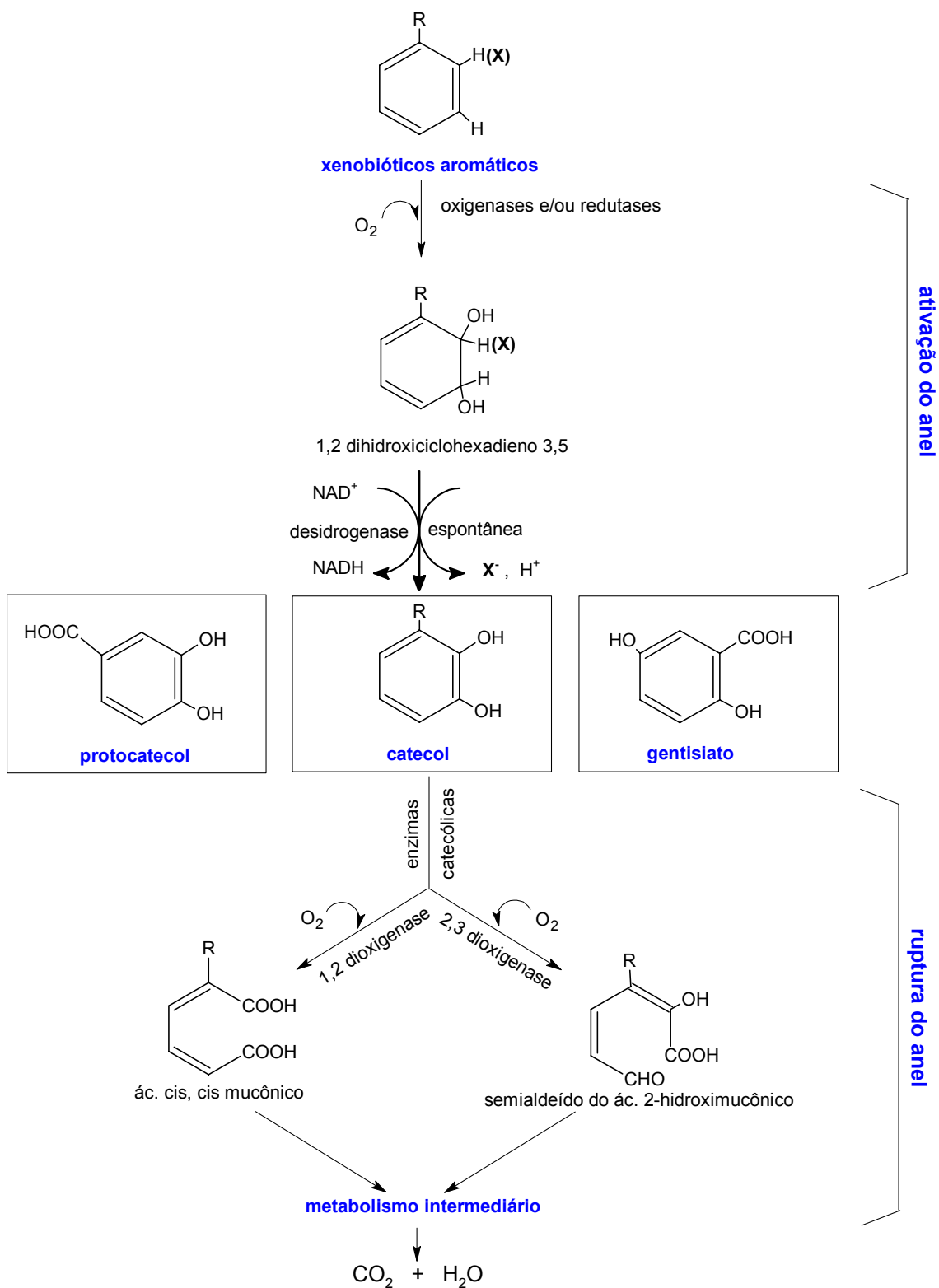


Fig. 3 – Esquema do catabolismo aeróbico de xenobióticos aromáticos.

$X = -SO_3H, -OH, -Cl, -NO_2$

2. 2. 1 - Metabolismo dos compostos nitroaromáticos.

Compostos nitroaromáticos são largamente utilizados nas tecnologias de produção de explosivos (2,4,6-trinitrotolueno/TNT, hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine/RDX, octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine/HMX), pesticidas (**trifluralina**, lactofen, oryzalin, pendimethalin), produtos farmacêuticos, conservantes de couro, corantes e também como matéria prima na síntese de muitos compostos tais como anilina e polímeros (HARTTER, 1985). Eles constituem uma das maiores classes de xenobióticos que contaminam o meio ambiente e alguns nitroaromático são comprovadamente mutagênicos e/ou carcinogênicos (PARRIS, 1986; TOKIWA e OHNISHI, 1986; ANDERSON et al. , 1997). Nitroaromáticos naturais são raros e a produção destes nitroaromáticos sintéticos é um evento relativamente recente na biosfera; contudo, estudos desenvolvidos a partir da década de noventa, comprovam a biodegradação de alguns nitroaromáticos sintéticos por fungos e bactérias aeróbicas e anaeróbicas (SPAIN et al., 2000).

A recalcitrância dos nitroaromáticos no meio ambiente tem sido atribuída à alta eletronegatividade do nitrogrupo. O nitrogrupo drena os elétrons π do anel aromático deixando o carbono em estado elevado de oxidação, dificultando o ataque inicial das oxigenases. Esta carência eletrônica do carbono, que dificulta o ataque eletrofilico das oxigenases, é contornada por alguns microrganismo através da redução catalítica do nitrogrupo para hidroxilamina ou amino. O ataque redutivo do nitrogrupo pode ocorrer aerobicamente e anaerobicamente, mas condições anaeróbicas podem favorecê-lo. Por esta razão, tecnologias de biorremediação de ambientes contaminados com moléculas recalcitrantes são

realizadas sob condições aeróbicas e anaeróbicas, amplificando, desta maneira, a expressão do potencial catabólico microbiano do meio (SPAIN et al., 2000).

Um exemplo no qual pode-se observar o ataque oxidativo inicial na ativação do anel aromático é na degradação aeróbica do 2,4-DNT (2,4-dinitrotolueno). A bactéria *Burkholderia sp.*, isolada de sítios contaminados com dinitrotoluenos, crescem aerobicamente tendo como única fonte de carbono e nitrogênio o 2,4-DNT (SPANGGORD et al., 1991; HAIGLER et al., 1999). Uma dioxigenase seguida do ataque de uma monooxigenase libera o nitrito do 2,4-DNT, formando catecol, o qual é clivado por uma metadioxigenase, gerando um composto possível de ser oxidado a CO_2 e H_2O (fig. 4).

Em outro exemplo, pode-se observar a atuação de uma redutase na ativação do anel aromático. A degradação do nitrobenzeno pela bactéria *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (NISHINO e SPAIN, 1993; HE e SPAIN, 1997) é iniciada por uma redutase que reduz o grupo nitro para uma hidroxilamino, o qual, através de uma mutase, transforma-se em um aminofenol. A seguir o anel aminofenólico é rompido por uma dioxigenase, formando um composto possível de ser oxidado a CO_2 e H_2O (fig. 4). Esta dioxigenase é atípica, uma vez que rompe um anel fenólico, e não um anel catecólico, que é seu substrato mais comum.

Os mais recentes estudos realizados sobre a biodegradação dos nitrocompostos 2-NT (2-nitrotolueno), 2,4-DNT, nitrobenzeno, pelas bactérias *Pseudomonas sp.* JS42, *Burkholderia sp.* e *Camamonas sp.* JS765, respectivamente, mostram que o passo inicial da rota catabólica destes compostos é catalisado por dioxigenases. Estas dioxigenases, 2-NT dioxigenase, 2,4-DNT dioxigenase e nitrobenzeno dioxigenase, são proteínas contendo

subunidades, de maneira semelhante à bem estudada enzima naftaleno dioxigenase (NISHINO e SPAIN, 1995; HIGLER et al., 1994; SPANGGORD et al., 1991, SUEN et al., 1996). São formadas por uma flavoproteína redutase e uma ferro-enxofre ferredoxina que transportam elétrons do NAD(P)H para uma oxigenase. Esta oxigenase é responsável pela catálise da reação e contém duas subunidades diferentes: a subunidade alfa que é grande e a beta subunidade que é menor (KAUPPI et al., 1998). A alfa subunidade é a região mais conservada da enzima e, por esta razão, é utilizada para sondar a presença de dioxigenase em genomas bacterianos

A 2,4-DNT dioxigenase de *Burkholderia sp.* é a enzima catabólica dos nitrocompostos mais bem caracterizada. Esta enzima apresenta similaridades genética com a naftaleno dioxigenase. Em ambas enzimas as seqüências genômicas estão localizada em um plasmídeo e suas alfa subunidades apresentam 80% de identidade. Ambas enzimas catalisam, também, reações de dessaturação e monooxigenação de outros substratos (SUEN et al., 1996).

A medida que microrganismos biodegradadores de compostos nitroaromáticos são isolados, outras vias catabólicas aeróbicas são descobertas. Porém, nem sempre o percentual degradativo e a velocidade destas vias são apropriados para estudos bioquímicos e genéticos.

Apesar dos intensos esforços dos pesquisadores, ainda não foram isoladas bactérias capazes de mineralizar muitos nitroaromáticos produzidos pelo homem, como, por exemplo, o TNT e os herbicidas **trifluralina** e orizalin (HAWARI et al., 1999). Os três compostos citados apresentam três nitro grupos no anel aromático que, provavelmente, dificultam a sua mineralização por um único microrganismo.

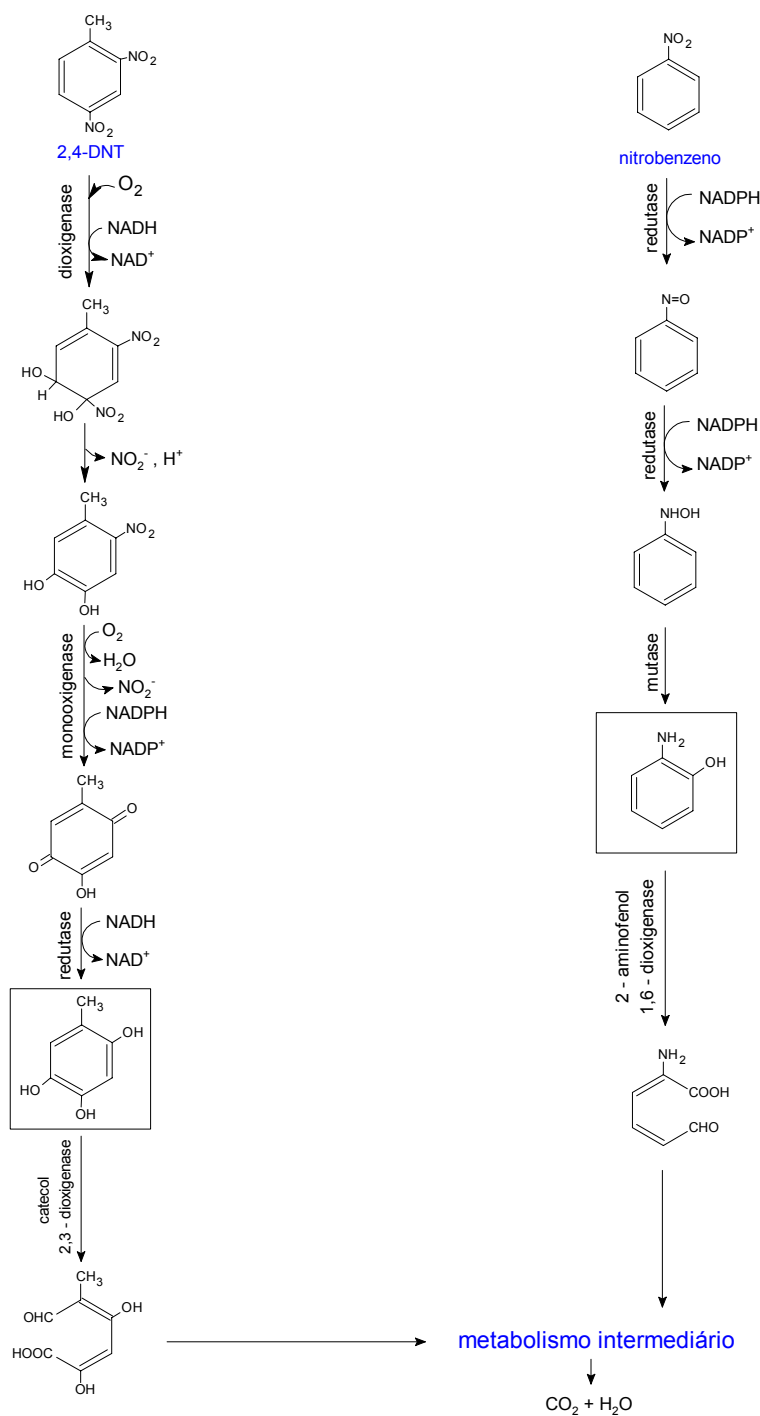


Fig. 4 – Esquema do catabolismo aeróbico do 2, 4 -DNT e nitrobenzeno pelas bactérias *Burkholderia sp.* e *P. pseudoalcaligenes*, respectivamente. Os quadros indicam os compostos atacados por dioxigenases que rompem o anel aromático. Adaptado de SPAIN et al., 2000.

3 – TRIFLURALINA.

A trifluralina/TFL (α, α, α trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-tolueno) (fig. 5) é um herbicida usado antes do plantio e incorporado ao solo, que tem sido usado desde o início da década de sessenta para controlar o crescimento de gramíneas e algumas espécies de folha larga em várias culturas agrícolas. Este herbicida inibe a mitose celular nas raízes, impedindo o desenvolvimento da espécie alvo (GROVER et al., 1997).

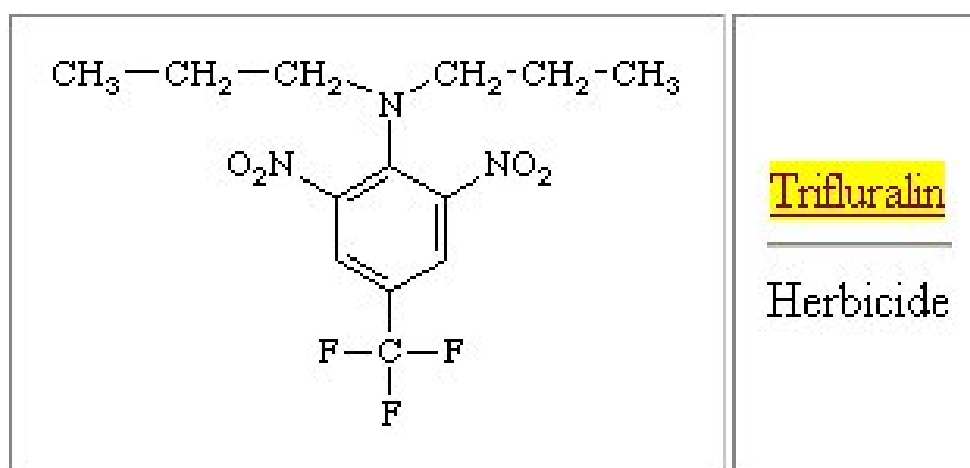


Fig. 5 – Estrutura molecular da trifluralina.

Os maiores consumidores de trifluralina são E. U. A., Brasil, Argentina e China. No Brasil, o uso da trifluralina se destaca, principalmente, no cultivo de soja, e, segundo classificação do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente), ela apresenta persistência moderada nos solos brasileiros, meia vida de 90-180 dias (MONTEIRO et al., 1992).

A TFL é uma molécula do grupo das dinitroanilinas; pouco solúvel em água (0,6 mg/L a 25 °C) e altamente solúvel em solventes apolares; moderadamente

volátil (0.032 Pa); degradada pela luz e por atividade biológica (GROVER et al., 1997).

Testes agudos de toxicidade realizados em ratos, camundongos e coelhos demonstram que a trifluralina tem toxicidade moderada por inalação, e baixa para moderada por exposição oral e dermal. Testes crônicos em cães, utilizando trifluralina na dieta, demonstram mudanças nos parâmetros hematológicos e aumento no peso do fígado e a Dose de Ingestão Diária para esta espécie foi estimada em 0,0075 mg/Kg/d (EBERT, et al., 1992). Não existem informações disponíveis sobre os efeitos da trifluralina na reprodução e sobre a exposição crônica e aguda em humanos; no entanto ela é classificada como “possivelmente carcinogênica” (EPA/Environmental Protection Agency, 1993). A Legislação Ambiental Brasileira (EMATER, 2000) classifica a TFL como moderadamente tóxica para humanos. Peixes e aves são as espécies mais atingidas pela toxicidade da TFL (EPA, 1993).

Os efeitos da TFL sobre a microflora do solo são pouco conhecidos. WANG et al. (1995) observaram que a TFL inibe o crescimento das amebas flageladas *Naegleria fowleri* e *Naegleria gruberi*. No entanto, BOYETTE et al. (1988) estudaram o efeito da TFL e doze de seus metabólitos sobre a mineralização da glicose, celulose e proteínas no solo e concluíram que não houve um efeito considerável da TFL e seus produtos sobre o processo de decomposição microbiana do solo.

3 . 1 – BIODEGRADAÇÃO DA TRIFLURALINA

O trabalho mais extensivo e consistente sobre a biodegradação da TFL em solo foi realizado por GOLAB e seus colaboradores (1979). Usando TFL radiomarcada no anel aromático, observaram que, após um ano, 69% da radioatividade ^{14}C aplicada estava presente numa faixa de 0-15 cm de profundidade do solo: 14% como TFL, 12% como produtos da transformação da TFL extraíveis e 43% de resíduos não extraíveis. Neste experimento, utilizando vários tipos de técnicas de extrações e analíticas, identificaram 28 produtos de degradação e observaram que estes produtos são praticamente idênticos nos processos aeróbicos e anaeróbicos. CAMPER et al. (1980), sob condições aeróbicas e anaeróbicas, e MONTEIRO et al. (1992), sob condições aeróbicas, verificaram que a degradação da TFL é altamente dependente do tipo de solo. MONTEIRO et al. (1992) também mostraram a mineralização da TFL, através da evolução de CO_2 [TFL/anel- ^{14}C].

Poucos estudos consistentes relatam sobre a degradação da TFL por isolados microbianos. HAMDÍ e TEWFIK (1969) e CARTER e CAMPER (1975) isolaram *Pseudomonas* que degradam TFL em meio líquido sob condições aeróbicas, contendo uma fonte de carbono suplementar. ZEYER e KEARNEY (1983) também - usando um meio complexo sob condições aeróbicas-, demonstraram a degradação da TFL, pela evolução do CO_2 [TFL/propil- ^{14}C] por uma espécie de *Candida* isolada do solo. SATO (1992) isolou, sob condições aeróbicas, duas bactérias de solo agrícola contaminado, *Alcaligenes sp.* e *Moraxella sp.*, que degradaram 20% e 95% de TFL, respectivamente, após 28

dias de incubação e detectou três dos produtos de degradação detectados por GOLAB et al. (1979).

GOLAB et al. (1979) sugeriram uma rota degradativa para a TFL, fundamentada nos produtos identificados em seus experimentos (fig. 5). Nesta rota catabólica, as reações degradativas iniciais da TFL são: N-dealquilação dos grupos propil, redução do nitro grupo à hidroxilamina ou amina, oxidação do anel aromático para hidroxila, oxidação do grupo propila para hidroxila e acetona. Os produtos hidroxiaminados, TR(trifluralina)-10 e TR-39, podem formar benzimidazóis e azocompostos, os quais dificultam a continuidade da degradação (HAWARI et al., 1999). O α,α,α -trifluoro-toluenetriamino-3,4,5-triamine (TR-9) é sugerido como o produto convergente que daria continuidade à rota degradativa da TFL.

Não foram detectados por GOLAB et al. (1979) e SATO (1992) produtos acíclicos, resultantes da ruptura do anel aromático, que poderiam entrar no metabolismo intermediário e mineralizar a TFL. Como já discutido, a ruptura do anel aromático da TFL é dificultada pela presença dos grupos $-CF_3$ e $-NO_3$ que drenam elétrons π , trazendo impedimentos ao ataque enzimático oxidativo.

Na bibliografia consultada, não foram encontrados trabalhos sobre a bioquímica e a genética de enzimas que possam estar atuando nesta rota catabólica da TFL sugerida por GOLAB et al. (1979).

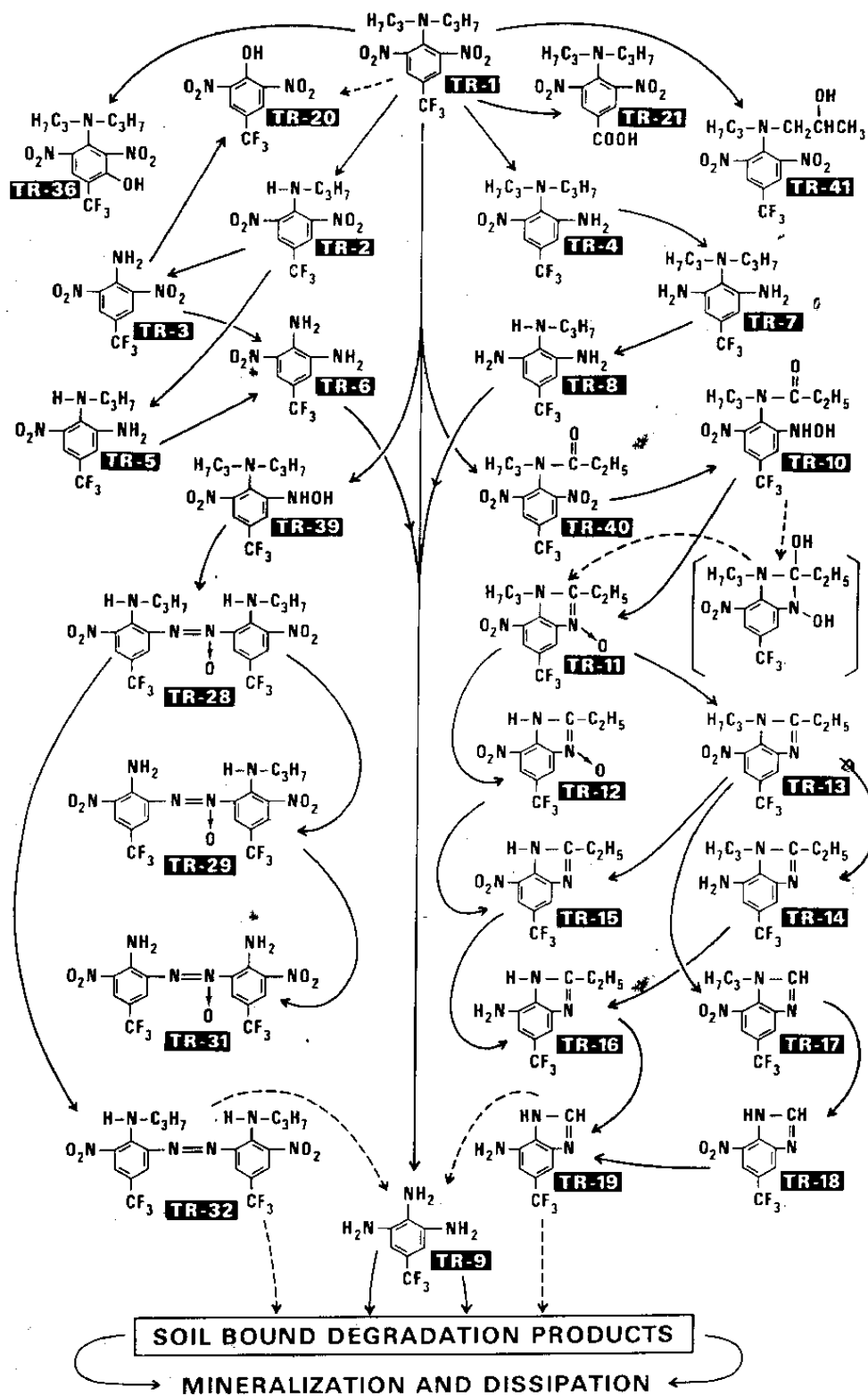


Fig. 5 - Rota metabólica da TFL, sugerida por GOLAB et al., 1979.

4 – PROPOSTA DE MODELO PEDAGÓGICO PARA O ENSINO DA BIODEGRADAÇÃO

O modelo de desenvolvimento tecnológico e a explosão demográfica ocorridos na sociedade moderna têm causado uma série de impactos no meio físico e biológico da terra ameaçando a sobrevivência das espécies. Esta ameaça à vida da biosfera levou a sociedade a repensar o estilo de desenvolvimento projetando um novo paradigma que concebe o desenvolvimento atrelado à sustentabilidade. Um dos grandes desafios deste novo paradigma que se estabelece é o tratamento das grandes quantidades de resíduos, compostos por moléculas naturais e xenobióticas. Este cenário aponta para um novo campo de atuação profissional: a pesquisa e a implantação de biotecnologias de tratamento de resíduos e biorremediação.

Estas biotecnologias requerem conhecimentos de várias áreas do saber: bioquímica e biologia molecular da biodegradação microbiana, ecologia microbiana, química analítica ambiental, engenharia. Sendo assim, este campo de trabalho requer profissionais que tenham uma postura interdisciplinar e de troca frente à comunidade científica (NEILSON, 1994).

Cabe à Universidade a tarefa de formar profissionais para as exigências deste novo mercado de trabalho que se estabelece. Os graduados em agronomia, química, biologia, engenharias ambiental, química e de alimento têm em suas atribuições profissionais a tarefa de tratamento de resíduos. Faz-se necessário, portanto, adequar o programa de disciplinas destes cursos de graduação a este novo campo de atuação profissional.

O conhecimento bioquímico é fundamental para o entendimento do metabolismo da biodegradação microbiana destes resíduos. Contudo, de uma maneira geral, os conteúdos programáticos e as bibliografias indicadas (NELSON e COX, 1995; STRYER, 1995; VOET et al., 2000), nestes cursos de graduação, direcionam o ensino de bioquímica para o metabolismo de mamíferos. Constatase, então, a necessidade de redirecionamento dos conteúdos e práticas do ensino de bioquímica, de maneira que sejam contemplados aspectos sobre o metabolismo da biodegradação microbiana e suas interrelações como o meio.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. GERAL

Este trabalho se propõe a estudar aspectos biológicos envolvidos na biodegradação da trifluralina, com o objetivo de adquirir conhecimentos sobre os processos de biodegradação desta molécula, com vistas a serem utilizados na otimização de biotecnologias de tratamento de resíduos, bem como na proposição de metodologias de ensino de biodegradação.

2. ESPECÍFICOS

- Isolar bactérias resistentes ao herbicida trifluralina.
- Identificar estas bactérias, utilizando os métodos bioquímico e seqüenciamento do rDNA 16S.
- Verificar a capacidade destas bactérias de biodegradar trifluralina sob condições aeróbicas, utilizando vários tipos de meios.
- Investigar a presença e a localização de genes biodegradadores no genoma das bactérias capazes de biodegradar a trifluralina.

- Propor um método de ensino de biodegradação, dentro da disciplina de bioquímica, para os cursos de graduação que formam os profissionais que atuam nos processos biotecnológicos de tratamentos de resíduos.

CAPÍTULO I

BIODEGRADATION OF THE HERBICIDE TRIFLURALIN BY BACTERIA ISOLATED FROM SOIL

(Submetido à FEMS Microbiology Ecology)

**BIODEGRADATION OF THE HERBICIDE TRIFLURALIN BY BACTERIA
ISOLATED FROM SOIL**

**Bellinaso, M.L.^{1,5}, Greer, C.W.², Peralba, M.C.⁴, Henriques, J.A.P.³ &
Gaylarde, C.C.^{3#}.**

¹Dept. of Biology and Chemistry, UNIJUI, RS, Brazil; ²Biotechnology Research Inst., National Research Council of Canada, Montreal, Quebec, Canada; ³Dept. Biophysics/Biotechnology Center, UFRGS, Porto Alegre, Brazil; ⁴Institute of Chemistry, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil; ⁵Dept. Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author:

Christine Gaylarde

Dept. Biophysics/Biotechnology Center, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500 - Campus do Vale, 91.501-970, Porto Alegre, Brazil

Telefone: (051) 3316-6084

FAX: (051) 3319-1079

e-mail: cgaylarde@yahoo.com

ABSTRACT

Trifluralin (α,α,α , trifluoro-2,6- dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine) (TFL) is a preemergence, soil-incorporated herbicide that has been in agricultural use since the early 1960s and is moderately persistent in various Brazilian soils. The purpose of this study was to isolate and characterize TFL-resistant bacteria from a soil in which this pesticide has been used for the last 4 decades and determine their ability to degrade TFL using HPLC. Eight bacteria were isolated by repeated subculture in liquid medium with TFL as sole carbon source and identified by biochemical tests and 16S rDNA sequencing as *Klebsiella oxytoca*, *Herbaspirillum seropedicae*, 3 strains of *Bacillus simplex*, 2 of *Pseudomonas montellii* and another *Pseudomonas* sp. A third, unidentified bacterium (isolate #9) was obtained following growth on crystals of TFL on a solid mineral medium, a new technique that could be usefully employed for other poorly soluble substrates. In a mineral salts medium with 0.1% succinate and 0.1% yeast extract and 50mg.L⁻¹ TFL, reductions in the level of pesticide of 24.6% for *Klebsiella oxytoca*; 16.4% for *Herbaspirillum seropedicae*; 25.0% for *Bacillus simplex* 2; 16.0% for *Bacillus simplex* 3 and 21.0% for unidentified isolate #9 were obtained after 30 days. These were similar to the level obtained using a known TFL-degrading bacterium, *Brevundimonas diminuta* (NCIMB 10329). The isolates can be used to study the biochemical and molecular biology of TFL biodegradation to optimize the degradative ability of one or more of the isolates for future use in bioremediation processes. Key words: biodegradation, bioremediation, pesticides, trifluralin, soil bacteria.

INTRODUCTION

The contamination of soil by pesticides and other pollutants is one of the greatest problems associated with economic development. Studies on the biodegradation of pesticides are of fundamental importance for the protection and remediation of our soil resources.

Trifluralin (TFL) (Fig. 1) is a preemergence, soil-incorporated herbicide that has been in agricultural use since the early 1960s. It is widely used in soybean production in Brazil and, according to IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente; Brazilian Institute for the Environment), shows moderate persistence in various Brazilian soils (20). TFL is only slightly soluble in water (0.6 mg/L at 25⁰C (29), is moderately volatile (0.032 Pa (31) and is degraded by photolysis (23) and biological activity. The majority of work on TFL biodegradation has studied soil systems. Golab et al. 1979 (10), in an extensive field study using radiolabeled TFL, found that after 1 year, 69% of the applied ¹⁴C was present in the top 0-15 cm of soil, 14% as TFL, 12% as extractable transformation products and 43% as nonextractable soil-bound residues. They also identified 28 degradation products and suggested a degradation pathway for the molecule. Camper et al. 1980 (7) studied TFL degradation in various types of agricultural soil under aerobic and anaerobic conditions and found that breakdown was highly dependent on soil type. In a soil used for the disposal of various pesticides (diuron, trifluralin, carbofuran), TFL remained unchanged for many years (15).

Although there has been considerable research on the degradation of TFL in soil (13), few studies have reported degradation by isolated microorganisms, a

necessary prerequisite if the microbial enzymes and pathways involved are to be discovered. Hamdi and Tewfik (14) and Carter (8) isolated a species of *Pseudomonas* that decomposed TFL in liquid medium containing a supplementary carbon source. Zeyer and Kearney (32) also used complex media and demonstrated degradation of TFL by a species of *Candida* isolated from soil. Sato (26) isolated two bacteria from agricultural soil contaminated with TFL. The isolates degraded the molecule and three of the degradation products cited by Golab (10) were detected.

The objectives of this study were: 1) to isolate TFL-resistant bacteria from a soil in which this pesticide has been used for 4 decades, 2) to characterize the resistant isolates, and 3) to determine their ability to degrade TFL.

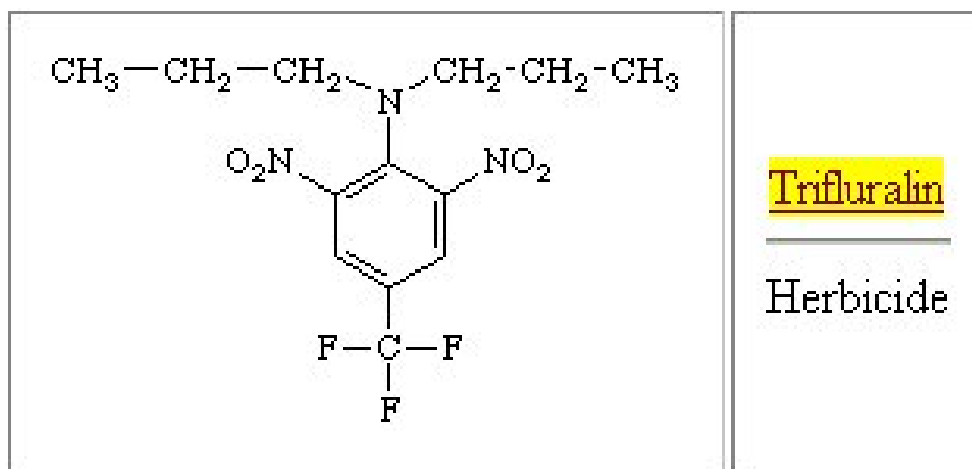


Fig. 1 Molecular structure of TFL (α,α,α , trifluoro-2,6- dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine).

MATERIALS AND METHODS

Soil samples

The soil was a silty clay agricultural soil, typical of Northeastern Rio Grande do Sul. It had been used for the cultivation of soya and wheat over approximately four decades and TFL had been employed on the land throughout this time. Three soil samples from a depth of 10-15 cm were taken from the agricultural field. Samples were taken just before herbicide treatment, prior to the planting of soya. The soil was dried at room temperature, mixed thoroughly, sieved in a 2 mm sieve to remove stones and plant material and quartered. One part was used for the analyses.

Chemicals

Trifluralin (α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine), pure grade (98%), and Trifluralin Emulsion (445 g/L) were donated by MILENIA AGROCIÊNCIAS S.A. (Taquari, Rio Grande do Sul, Brazil). The composition of the emulsion was not supplied.

Isolation of microorganisms resistant to TFL

Subculture method: The microorganisms were isolated in two types of mineral medium containing 50 and 100 mg.L⁻¹ TFL (pure grade). The basal medium was Bushnell-Haas mineral salts medium (6). One variant contained inorganic nitrogen, as present in Bushnell-Haas medium (0.1% ammonium nitrate) and used TFL as sole carbon source; the other contained no inorganic nitrogen

and used TFL as sole source of both carbon and nitrogen. TFL was added to the flasks as a solution in methanol and the solvent was allowed to evaporate for 30 minutes before adding the sterile mineral medium.

Ten g soil was added to 20ml medium in a 125ml flask containing various concentrations of TFL. These were incubated at 28⁰C in a rotary shaker (120 rpm), with flasks carefully protected from the light to avoid photodegradation of TFL (23). An aliquot of 1ml was subcultured to fresh medium every six days for 36 days. After each subculture, growth was monitored by plating on the same media solidified with agar, and on Thornton's agar medium (24) containing 50 mg.L⁻¹ TFL.

Representative colonies from the various solid media were picked and streaked onto Thornton's medium with 50mg.L⁻¹ TFL and incubated at 28⁰C. The colonies that grew best were taken as being more resistant to TFL. The bacterial isolates were stored at 0⁰C on Thornton's agar containing 50mgL⁻¹ TFL and subcultured every month.

Growth around TFL crystals: One ml of TFL (2.5g/L in ethanol) was spread on the surface of each plate of Thornton's agar and the solvent was allowed to evaporate for 24h. As the solvent evaporated, TFL crystallized on the surface of the solid medium in a random manner. One mL of a soil suspension (1g soil in 10ml of 0.1% sodium pyrophosphate, diluted 40 times in pyrophosphate), was spread over the surface of the plate.

Characterization of isolates

The isolates were identified by biochemical tests and by 16S rDNA sequencing.

Biochemical methods: The isolates were identified by Gram staining, the GNI card (Vitek Systems, Hazelwood, Mo.) and the API 20NE identification system (bioMérieux, France).

16S rDNA sequencing: Genomic DNA was extracted from cell lysates. One or more colonies of each isolate were suspended in 100 μ l of sterile distilled water, heated to 100 $^{\circ}$ C for 10min and centrifuged at 14 000g for 1min. The supernatants were used as templates. They were tested immediately or frozen at -20 $^{\circ}$ C until required.

16S rDNA (1,534 Kb) was amplified by the PCR reaction, adapted from Martin-Kearley et al. (17). The PCR primers used were R13 (5'-AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC-3'; reverse primer, located at position 1525-1544 relative to *Escherichia coli* 16S rDNA) and F1 (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TAC G-3'; forward primer, located at position 11-19 relative to *Escherichia coli* 16S rDNA). The reaction mixture contained: 2 μ l of MgCl₂ 25 mM; 8 μ l of deoxyribonucleoside triphosphates (200mM each of dATP, dGTP, dCTP, dTTP; Pharmacia Biotech); 1 μ l of each primer (R13 and F1; Pharmacia Biotech); 5 μ l of template; 0.25 μ l (1.25 units) of *Taq* DNA polymerase/10X buffer mixture (Pharmacia Biotech); and sterile distilled water to bring the volume to 50 μ l. The reaction mixture, without enzyme, was overlaid with 100 μ l of sterile mineral oil to prevent evaporation during incubation and heated to 96 $^{\circ}$ C for 5 min in the Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer Cetus). *Taq* DNA polymerase was added when the mixture had cooled to 86 $^{\circ}$ C. The negative control contained the same mixture as above except that the template was replaced with sterile water. The samples were then subjected to 30

cycles of 1min denaturation at 94⁰C, 1min annealing at 65⁰C and 1min extension at 72⁰C in the Thermal Cycler 480. After amplification, a 5 μ l portion was withdrawn, mixed with 1 μ l of loading buffer and subjected to electrophoresis at 90V for 60min in 1.2% (w/v) TAE agarose gel stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml). The bands were visualized using a uv transilluminator at a wavelength of 254nm. The bands corresponding to 1.5 Kb were removed and purified with "QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit" (QIAGEN Inc., USA). The concentration of DNA was estimated at A₂₆₀, where 1 absorbance unit equals 50 μ l/ml of double stranded DNA.

The purified PCR fragments were prepared for sequencing with the "ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" (Perkin Elmer). The primers used were F1 and F1c (5'-AAA CTC AAA TGA ATT GAC GG-3'; forward primer, located at position 907-926 relative to *Escherichia coli* 16S rDNA) (Pharmacia Biotech). The reaction mixture contained: 1 μ l of primer F1 or F1c 16 pmol/ μ l, 50ng of double-stranded PCR fragment 16S DNA, 4 μ l of Terminator Ready Reaction mix (*Taq* DNA polymerase, dRhodamine, dNTPs, MgCl₂, Tris-HCl buffer pH 9.0) and sterile distilled water to bring the volume to 10 μ l. The reaction mixture was overlaid with 50 μ l of sterile mineral oil. The samples were then subjected to 25 cycles of 10sec denaturation at 96⁰C, 5sec annealing at 50⁰C and 4min extension at 60⁰C in a GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer). The reaction products were purified using the CENTRI-SEP Columns kit (Princeton Separations, USA). Nucleotide sequences were obtained in an ABI Prism 373 automatic sequencer. The sequence of the PCR fragment was compared to the

GeneBank nucleotide sequence database using the Ribosomal Database Project (RDP) (16) search program.

Microcosms for degradation of Trifluralin (TFL)

Microcosm studies were performed to monitor TFL degradation by the isolates. The biodegradation tests were carried out in 30ml glass bottles containing 5ml of various media. Two concentrations of pure TFL or TFL emulsion and 100 μ l of each isolate (0.1 absorbance unit) were added. The bottles were hermetically sealed to prevent leakage of liquids and of TFL, which is moderately volatile (31) and placed in the dark. The incubation was at 28⁰C, 120 rpm, for 30 days

The two concentrations of TFL used were 100 mg.L⁻¹ and 50 mg.L⁻¹. The five media tested were based on Greer et al, (11). The basic medium contained 13mM K₂HPO₄, 6.4mM NaH₂PO₄, 8.33mM (NH₄)₂SO₄, 0.395mM MgSO₄, 1 μ M AlK(SO₄)₂, 10 μ M FeSO₄, 10 μ M ZnSO₄, 10 μ M MnSO₄, 1 μ M CuSO₄, 1 μ M Co(NO₃)₂, 10 μ M Ca(NO₃)₂, 2 μ M NaMoO₄. Various alterations were made to this:

- Medium 1- without inorganic nitrogen source, with TFL (100 mg.L⁻¹)
- Medium 2- with TFL (100 mg.L⁻¹)
- Medium 3 - without inorganic nitrogen source, with 0.1% succinate and 100mg.L⁻¹ TFL
- Medium 4 - with 0.1 % succinate and 100 mg.L⁻¹ TFL
- Medium 5- with 0.1 % succinate, 0.1 % yeast extract and 50 mg.L⁻¹ TFL.

Two controls were used:- a chemical control, without microorganisms (used for all media), and a metabolic control without TFL to check for the presence of any metabolites produced in this richer medium in the absence of TFL (only for medium

5). Isolates 1 to 8 were incubated in all the media. Isolate 9 and the positive control (see next section) were incubated only in medium 5.

Positive control

Brevundimonas diminuta (NCIMB 10329), a known TFL degrading bacterium (14), was tested in the same microcosm assay, with Medium 5, as a positive control for the assay and for comparison with the activity of the isolates.

Trifluralin Quantification

TFL was quantified by HPLC (Varian 5000, Cds-111L microprocessor and UV-50 detector). Eight ml of methanol was added to the microcosms after 30 days incubation. The bottles were hermetically sealed, sonicated for 5 minutes and centrifuged at 5 000rpm for 5min. The supernatant was filtered with a Millipore filter (0.22 μ m) and 50 μ l injected directly into the HPLC.

The mobile phase consisted of an isocratic ratio of 75% acetonitrile/25% water at a flow rate of 1ml/min. The HPLC system was equipped with a C18 column (25cm, 4.6mm, 5 μ m) and the uv detector was operated at a wavelength of 275 nm.

For calibration, a stock solution of 1000mg.L⁻¹ TFL in methanol was used. From this, a 100mg.L⁻¹ working standard was prepared in methanol and analytical standards of 10, 30, 40 and 50 mg.L⁻¹ were produced. Peak areas and retention times were compared to these reference standards. Duplicate samples were each analyzed twice.

Calculation of reduction in TFL levels

The percentage reduction in TFL was calculated from the peak area of the chromatogram, attributing 100% to the value of the chemical control peak.

RESULTS AND DISCUSSION

The two isolation methods both produced TFL-resistant cultures. In the repeated subculture method, bacterial growth occurred in all the media types within 36 days. The extent of growth decreased with increasing numbers of subculturings. Bacteria which degrade nitroaromatic compounds have previously been isolated from contaminated soils, while non-contaminated soils are a poor source of such microorganisms (22, 28).

From these subcultures 8 microorganisms were isolated that were most representative of the growth on the solid media and which continued to grow well on these media after numerous subcultures in Thornton's medium containing 50 mg.L⁻¹ TFL. These 8 microorganisms were identified by biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis (Table 1).

Table 1. Identification of the bacterial isolates based on biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis (RDP analyses).

Biochemical tests		16S rDNA
Isolate	Identification	Identification (Primer / % homology)
1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i> (F1 / 70%)
2	No id	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (F1 / 80%)
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas montellii</i> 1 (F1C/98%)
4	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus simplex</i> 1 (F1/90%)
5	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus simplex</i> 2 (F1/90%)
6	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Bacillus simplex</i> 3 (F1/90%)
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. (F1C/98%)
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas montellii</i> 2 (F1C/98%)

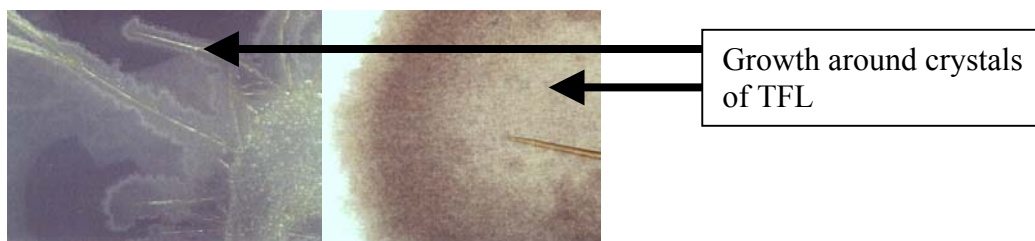
On the whole, both methods gave comparable results in terms of genus. All the genera isolated, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella* and *Herbaspirillum*, are representative of the degradative microflora of the soil (9) and the first three have been cited as biodegraders of xenobiotics (28, 19).

The bacterial strains 1, 3, 4, 5, 6, 7 and 8 were isolated from the medium with a supplementary source of inorganic nitrogen. Isolate 1 was isolated from medium containing 50mg.L⁻¹ TFL, in addition to inorganic nitrogen, while the others originated from media with 100mg.L⁻¹ TFL. Strain 2 was isolated from the medium in which TFL (50mg.L⁻¹) was the sole nitrogen source. Recalcitrant compounds can be used as sources of carbon and also of nitrogen, phosphorus and sulfur for microbial growth (1), depending on their chemical composition. Several bacterial strains with the ability to use nitrated aromatic compounds as sole carbon or nitrogen sources have been isolated and compounds such as TFL can typically serve as both carbon and nitrogen sources (2, 5, 21). In our case, growth of the isolates was generally better in media supplemented with an inorganic nitrogen source than in media in which TFL was the sole source of nitrogen.

Isolate #9 was obtained on plates containing TFL crystals. Fig. 2a shows the growth around TFL crystals, compared with an isolate that did not show this attribute (Fig. 2b). This methodology a modification of the “clear zone” technique (12), in which microscopic crystals form a homogeneous layer on the surface of the medium, leading to a hazy appearance. In our method, the crystallization is non-homogeneous and randomly dispersed large crystals are formed. This is the first time that growth on such crystals has been employed to isolate resistant microorganisms. It is a simple technique for compounds that readily produce large

crystals and could be a good strategy, since it is visual, easier to perform and more rapid than repeated subculture.

a) X8 and X100



b) X8

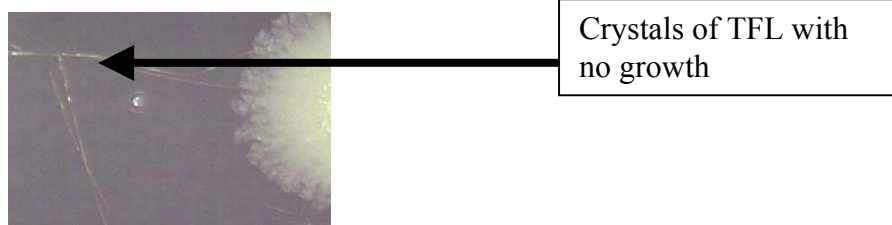


Fig. 2 Growth of isolates on medium containing TFL crystals. a) isolate growing on the crystal surface; b) isolate not growing on TFL crystals

Of the 5 different media used in the biodegradation tests, media 1 and 2 tested the ability of the bacteria to use TFL (100 mg.L^{-1}) as sole sources of carbon and nitrogen (medium 1) or carbon (medium 2). Media 3 and 4, with succinate, offered a supplementary carbon source to stimulate growth and TFL degradation. It has been shown that the biodegradation of xenobiotics can be facilitated in this way.

Succinate, acetate, lactate, glycerol and pyruvate have previously been shown to increase biodegradation (30) and McFarland (18) demonstrated that TFL was rapidly degraded by the soil microflora in the presence of sodium acetate.

Medium 5, with yeast extract, contained more complex nutrients, including vitamins, not present in the other media. The lowest concentration of TFL (50 mg.L^{-1}) was used in this medium to avoid any possible toxic effect of the compound or its breakdown products (3) and was added to the medium in its emulsified form to increase its bioavailability, since pure TFL is poorly soluble in water (31). The addition of an emulsifying agent is a strategy which has been used extensively to increase the aqueous concentrations of poorly soluble xenobiotics (22, 29).

There was no significant difference in the amount of TFL in the chemical controls after 30 days incubation, indicating that volatilization and chemical degradation were not important mechanisms of loss in these experiments (Fig. 3). Apart from the controls described, a chemical control with heat-killed bacteria (autoclaved at 121°C for 20 min) incubated with TFL was also tested. After 30 days, TFL concentrations, measured by gas chromatography, were not significantly different from the chemical control with no microorganisms. Isolates 1 to 8 also showed no significant reduction in TFL concentrations in media containing 100 mg.L^{-1} TFL. In medium 5, nutritionally richer and with only 50 mg.L^{-1} TFL in emulsified form, the isolates showed the following increases in disappearance of TFL over the chemical control: 24.6% for *Klebsiella oxytoca*; 16.4% for *Herbaspirillum seropedicae*; 25.0% for *Bacillus simplex* 2; 16.0% for *Bacillus simplex* 3; 21% for unidentified isolate 9 (Fig. 3). Isolates 3, 4, 7 and 8 had an increased disappearance of less than 5%. Species of the genus *Pseudomonas*

have been reported in the literature as degraders of TFL, dinitroaniline and other nitroaromatic compounds (27). However, in our experiments isolates 3, 7 and 8, which were identified as *Pseudomonas*, did not appear to degrade TFL.

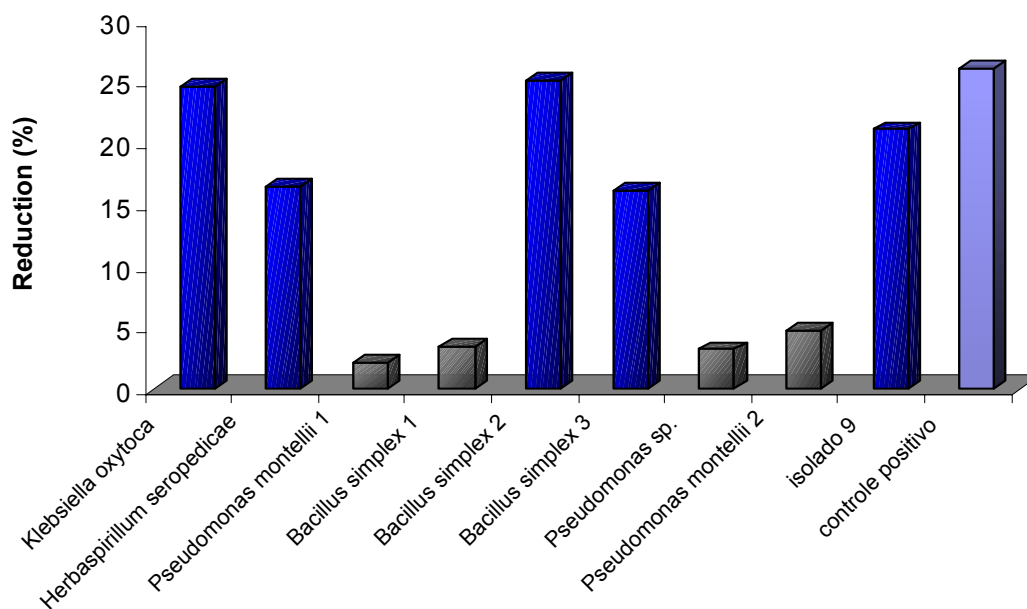


Fig. 3 Reduction of trifluralin after 30 days of incubation in medium 5.

The chromatograms of the chemical control, the metabolic control and *Bacillus simplex 2* after 30 days of incubation in medium 5 were superimposed for analysis (Fig. 4). The lack of the TFL peak at 10min retention time in the metabolic control and its reduction in *Bacillus simplex 2* shows that TFL has indeed been

degraded by this microorganism. The chromatogram for *Bacillus simplex* 2 shows additional peaks at shorter retention times, which are putative degradation products of TFL. A more detailed analysis of these peaks by mass spectroscopy and comparison to appropriate reference compounds would be necessary to identify these products as TFL metabolites (26).

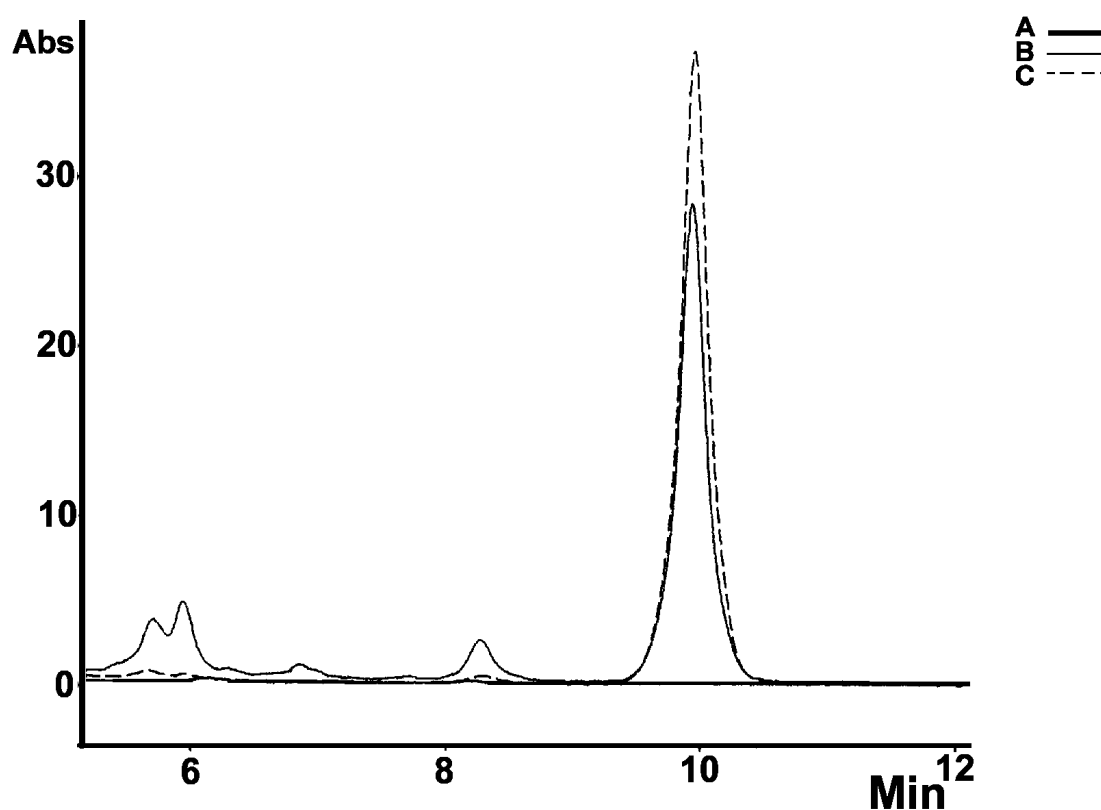


Fig. 4 HPLC chromatograph showing TFL levels after 30 days incubation at 28°C and 120rpm in medium 5. A – metabolic control (no TFL); B – *Bacillus simplex* 2; C – chemical control (no inoculum)

The percentage disappearance for the positive metabolic control, *Brevundimonas diminuta*, was 26%, similar to the levels attained by the TFL-degrading isolates. The degradation rate of TFL by this organism has not previously been recorded in the literature.

The principal reactions in the catabolism of TFL are dealkylation, reduction of the nitro groups, dimerization and cyclisation, forming a great variety of products which converge to give the main product, α,α,α -trifluoro-N-propyltoluene-3,4,5-triamine, a molecule in which the aromatic ring is still intact (10). This is similar to the transformation of TNT, where the triamine metabolite is produced under strong reducing conditions. None of the published mechanisms suggest the formation of catechols, which are the substrates most commonly used by the enzymes responsible for breaking aromatic rings (9).

TFL is difficult for organisms to degrade because of its low water solubility and its chemical structure. The fluorine and nitro substituents drain electrons from the aromatic nucleus, impeding electrophilic attack by oxygenases that characteristically initiate the transformation of the aromatic ring to catechols. The substituted groups can also sterically hinder enzymatic attack (27). A further factor in the recalcitrance of TFL to biodegradation is the condensation of amines to form azo dimers that are known to be recalcitrant under aerobic conditions (4).

The degradation of TFL in medium 5 may have been aided in three ways: 1) increased bioavailability due to the use of the emulsified form of TFL, which has been shown to be more readily degraded in some soils (22); 2) increased nutrients provided by the yeast extract; 3) reduced toxicity of TFL or its products because of

the lower concentration used (3). Zeyer & Kearney (32) showed no effect of changing TFL concentration on the degradation level in complex media after 21 days. However, Carter and Camper (8) demonstrated that two soil isolates capable of degrading TFL grew optimally at 50mg.L^{-1} TFL; they suggested that 100mg.L^{-1} could be inhibitory both to growth and to biodegradation. Sato (26) isolated two TFL degrading bacteria from polluted soil using mineral medium containing 5mg.L^{-1} TFL. One of the isolates produced a reduction of approximately 90% in TFL levels, but the other produced only a 20% reduction.

The results show that bacteria isolated from Brazilian soils in which TFL was used, were able to degrade TFL to an extent that was comparable to the only TFL degrader found in a commercial culture collection. Three of the 9 isolates degraded approximately 20% of the TFL, similar to the positive control. This activity was seen in only one of the 5 media used, confirming that the medium can have a strong influence on biodegradation and that it is important to use various media when testing for biodegradation ability. The isolates can be used to study the biochemical and molecular biology of the degradation of TFL, leading to the possibility of optimizing the degradative ability of one or more of the isolates for future use in bioremediation processes.

REFERENCES

1. Alexander M. Biodegradation and Bioremediation, (2⁰ ed). Academic Press, London, pg. 9-11, 1999.

2. Boopathy R., Kulpa C.F., Nitroaromatic compounds serve as nitrogen source for *Desulfovibrio sp* (B strain). *Canadian journal of microbiology*. 39, 4: 430-433, 1993.
3. Boyette, K.D., Moorman T.B., Koskinen, W.C. Effects of trifluralin and metabolites on decomposition of selected substrates by soil microorganisms. *Biol. Fertil Soils*. 6: 100-105. 1988.
4. Brown, D.; Hamburger, B. The degradation of dyestuffs: part III. Investigation of their ultimate degradability. *Chemosphere*. 16: 1539-1553, 1987.
5. Bruhn, C.; Lenke, H.; Knackmuss H.J. Nitrosubstituted aromatic compounds as nitrogen source for bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:208-210, 1987.
6. Bushnell, C.D.; Haas, H.F. The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of Bacteriology*. 41(2): 653-673, 1941.
7. Camper N.D., Stralka, K.; Skipper H.D. Aerobic and anaerobic degradation of profluralin and trifluralin. *J. environ. Sci. Health*. B15(5): 457-473, 1980.
8. Carter, G.E. and Camper, N.D. Soil enrichment studies with trifluralin. *Weed Sci.* 23: 71-74, 1975
9. van Elsas, J.D.; Trevors, J.T.; Wellington, E.M.H. Modern soil microbiology. In Topp, E.; Vallaey, T.; Soulas, G. (ed) *Pesticides: Microbial Degradation and Effects on Microorganisms*. Marcel Dekker, Inc. New York, 1997, p. 547-575.

10. Golab, T.; Althaus W.A. ; Wooten H.L. Fate of (14-C) Trifluralin in soil. *J. Agric. Food Chem.* 27(1): 163-179, 1979.
11. Greer, C. W.; Hawari, J.; Samson, R. Influence of environmental factors on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation by *Pseudomonas cepacia* isolated from peat. *Arch. Microbiol.* 154:317-322, 1990.
12. Greer, C.W.; Masson, L.; Comeau, Y.; Broudeau, R.; Samson, R. Application of molecular biology techniques for isolating and monitoring pollutant degrading bacteria. *Water Pollut. Res. J. Can.* 28: 275-287, 1993.
13. Grover, R.; Wolt, J.D. Cessna A.J.; Schiefer H. B. Environmental fate of trifluralin. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*153: 1-64, 1997.
14. Hamdi, Y.A.; Tewfik M.S. Decomposition of the herbicide trifluralin by a *Pseudomonas*. *Acta Microbiologic Polonica Ser. B* 1(18), No 2:83-84, 1969.
15. Johnston, W.H.; Camper, N.D. Microbial degradative activity in pesticide pretreated soil. *J. Environ. Sc. Health.* B26(1): 1-14, 1991.
16. Larsen, N.; Olsen, G.J.; Maidak,B.L.; McCaughey, M.J.; Overbeek, R.; Macke, T.J.; Marsh, T.L.; Woese, C.R. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* 21: 3021-3023, 1993.
17. Martin-Kearley, J.; Gow, J.A.; Péloquin, M.; Greer, C.W. Numerical analysis and the amplification of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction to the differentiation of *Vibrio* strains from a seasonally cold ocean. *Can. J. Microbiol.* 40:446-455, 1994.

18. McFarland M.J.; Beck M.; Harper S.; Deshmuck, K. Anoxic treatment of trifluralin-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 50:129-141, 1996.
19. Melo, I.S.; Azevedo, J.L. *Microbiologia Ambiental*. EMBRAPA-CNPA. Brazil, 1997, 217-218.
20. Monteiro, R.T.R.; Delvechio, R.C.; Silva, P.M. Degradação de (14-C) trifluralina em solos da região amazônica. Congresso Geral de Energia Nuclear 4. Rio de Janeiro. Anais, Rio de Janeiro, 1992, vol. 2, pp 809-810.
21. Nadeau, L.J.; Spain, J.C. Bacterial degradation of m-nitrobenzoic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:840-843, 1995.
22. Nikolova, P.; Ward, O.P. Whole cell biocatalysis in nonconventional media. *J. Ind. Microbiol.* 12:76-86, 1993.
23. Nishino, S.F.; Spain J.C. Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS765. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2308-2313, 1995.
24. Parkinson, D.; Gray, T.R.G; Williams, S.T. *Methods for Studying the Ecology of Soil Microorganisms*. Adlard, Oxford, 1971.
25. Reeves, G.L. Calculation of the photochemical quantum yield for trifluralin. Environmental Chemistry Laboratory, DowElanco, Letcombe, UK, 1997.
26. Sato, Y. Degradation of trifluralin by bacteria isolated from soil. *Weed Research. Japan.* 37(3): 213-219, 1992.

27. Spain, J.C. Biodegradation of Nitroaromatic Compounds. Plenum Press, New York. 1995, pp. 19-35.
28. Spangord, R.J.; Spain, S.F.; Nishino S.F.; Mortelmans K.E. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3200-3205, 1991.
29. Tiehm, A . Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:258-263, 1994.
30. Timmis, K.N.; Steffan, R.J.; Unterman, R. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. *Annu. Rev. Microbiol.* 60: 258-263, 1994.
31. Wauchope, R.D.; Buttler T.M.; Hornsby A.G.; Augustine-Beckers P.W.M.; Burt J.P. The SCS/ARS/CES pesticide properties data base for environmental decision making. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 123:1-155, 1992.
32. Zeyer, J.; Kearney, P.C. Microbial dealkylation of trifluralin in pure culture. *Pesticide Biochem. Physiol.* 20: 10-18, 1983.

Acknowledgements

The gas chromatography was performed by the Pesticide Analysis Laboratory of UNIJUÍ (Universidade da Região Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul. We also wish to thank the Hospital de Clinicas de Porto Alegre for performing the biochemical tests and the Dept. of Microbiology of UFRGS for helping to confirm the identifications with other standard methods. MLB was supported by a CAPES doctoral grant and by research grants from FAPERGS and the Genotoxicity Laboratory, Biotechnology Center/UFRGS.

CAPÍTULO II

GENES SIMILAR TO NAPHTHALENE DIOXYGENASE GENES IN TRIFLURALIN-DEGRADING BACTERIA

(a ser submetido à publicação)

**GENES SIMILAR TO NAPHTHALENE DIOXYGENASE GENES IN
TRIFLURALIN-DEGRADING BACTERIA**

Bellinaso, M. L.^{1,3}; Henriques, J. A. P.^{2,3*}; Gaylarde, C. C.² & Greer, C. W.⁴

¹Dept. of Biology and Chemistry, UNIJUI, RS, Brazil; ²Dept. Biophysics/Biotechnology center, UFRGS, Porto Alegre, Brazil; ³Dept. Biochemistry, UFRGS, Porto Alegre, Brazil; ⁴Biotechnology Research Inst., National Research Council of Canada, Montreal, Quebec, Canada.

*Corresponding Author

João A. P. Henriques

Dept. Biophysics/Biotechnology Center, UFRGS. Av. Bento Gonçalves, 9500 -
Campus do Vale, 91.501-970 - Porto Alegre, Brazil.

Telefone: (051) 3316-6084

FAX: (051) 3319-1079

e-mail: pegas@dna.cbiot.ufrgs.br

ABSTRACT

Trifluralin (α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine) (TFL) is a dinitroaniline compound which was first produced in the 1960s and has been used extensively as an agricultural herbicide. There are a few publications on the biodegradation of this xenobiotic compound, but to our knowledge nothing has been documented on the genetic aspects of its catabolism. In this article, we report the analysis of DNA isolated from bacteria previously shown to degrade TFL, using as probes the catabolic genes *ndoB*, *todC*, *xyiX*, *catA* and *xyiE* which encode the enzymes naphthalene 1,2-dioxygenase, toluene dioxygenase, toluate 1,2-dioxygenase, catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase, respectively.

Using PCR and hybridization analysis, the strong hybridization of the *ndoB* gene with extracted DNA from four TFL-degrading isolates was demonstrated, in spite of the fact that none of them were able to degrade naphthalene, as indicated by the "clear zone" test. The results indicated the presence in these bacteria of a dioxygenase gene, whose product could act on TFL as its principal substrate, or fortuitously, by cometabolism. This is the first publication on genes in TFL degrading bacteria.

Keywords: *ndoB* gene, trifluralin, bacteria, biodegradation

INTRODUCTION

The microbial biodegradation of xenobiotic compounds, including many pesticides, occurs through a variety of oxidative and reductive metabolic strategies. In aerobic bacteria, the first steps in the catabolism of aromatic compounds frequently involve their oxidation by dioxygenases, which catalyse the incorporation into the aromatic ring of the two oxygen atoms of molecular oxygen. The dihydrodiols so formed may spontaneously react, in the case of some substituted compounds, or be acted upon by dehydrogenases to produce catechols (Spain, 1995). The aromatic ring is then cleaved at the ortho or meta position by catechol dioxygenases, producing products which can enter central metabolic routes (Fig. 1). This aerobic type of degradative metabolism, in which catechols are produced before ring cleavage, allows microorganisms to utilise various aromatic compounds such as naphthalene, toluene, toluate, benzene and other, more recalcitrant compounds such as nitrated aromatics (Alexander, 1999; Spain et al., 2000). The nucleotide sequences of dioxygenases and other catechol-degrading enzymes are frequently extremely similar, suggesting a close evolutionary relationship between them (Neidle et al., 1991, Eltis and Bolin, 1996). This similarity between the genes has led to their use as probes for the detection of homologous sequences in microorganisms that grow at the expense of different aromatic compounds (Sayler and Layton, 1990; Whyte et. al., 1996).

Trifluralin (α,α,α -trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine) (TFL) is a dinitroaniline compound which was first produced in the 1960s and has been used extensively as an agricultural herbicide. There is little information on the

biodegradation of this compound by pure bacterial isolates (Hamdi and Tewfik, 1969; Carter and Camper, 1975; Sato, 1992, Bellinaso, 2001), and to our knowledge no work has been done on the genetic aspects of the catabolism of this molecule. In this article, we report the analysis of DNA isolated from bacteria shown to degrade TFL, using as probes the catabolic genes *ndoB*, *todC1* and *xyIX*, which encode the enzymes naphthalene 1,2-dioxygenase, toluene dioxygenase and toluate 1,2-dioxygenase, respectively (enzymes that prepare the aromatic ring for the cleavage step), in addition to the genes *catA* and *xyIE*, which encode catechol 1,2- dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase (the ring-cleaving enzymes), respectively (Fig. 1).

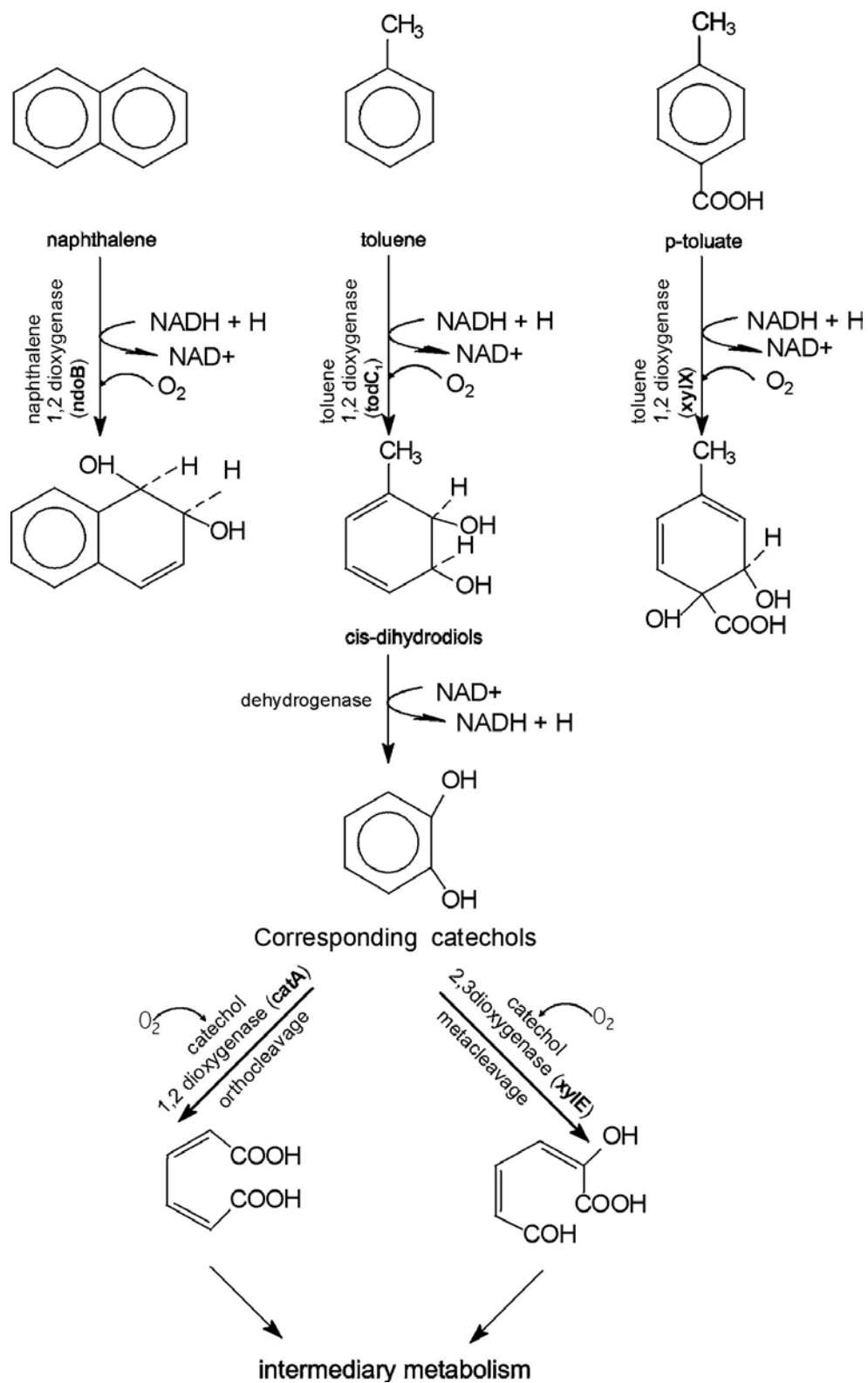


Figure 1 Aerobic catabolism of aromatic compounds via the catechol route.

MATERIALS AND METHODS

Trifluralin resistant bacteria

Trifluralin resistant bacteria were isolated from contaminated soil by repeated subculture in liquid medium with 100ppm of TFL as sole carbon source and identified by 16S rDNA sequencing as *Klebsiella oxytoca*, *Herbaspirillum seropedicae* and two strains of *Bacillus simplex*. The reductions in TFL concentrations obtained in a mineral medium containing 0.1% succinate, 0.1% yeast extract and 50mg.L⁻¹ TFL after 30 days incubation with these isolates (16.0 to 25.0%) were comparable to those obtained using a known TFL-degrading bacterium, *Brevundimonas diminuta* (NCIMB 10329) in the same medium (Bellinaso et al. 2001).

Detection of naphthalene degradation

The “clear zone” technique of Greer et al. (1993) was used to detect naphthalene degrading activity of the isolates. Solid mineral salts medium with or without yeast extract, tryptone and starch (50mg/l each) were spread with 0.5ml of naphthalene (2.5g/l in acetone). Acetone was allowed to evaporate overnight and the plates were then streaked with the isolates. Naphthalene degrading colonies produce a clear zone around the colonies.

Plasmid DNA extraction

The protocol for the extraction of plasmid DNA was adapted from Hayman and Farrand (1990), which was designed to isolate large plasmids, in the range of 50-200 kbp, from *Agrobacterium*. The bacteria were grown in trypticase soy broth (TSB), with shaking at 27°C, to the mid log phase. The culture (1.5ml) was centrifuged in an Eppendorf tube for 2min at 15,800 x g at room temperature. The

pellet was resuspended with 750 μ l of wash buffer (500mM NaCl, 25mM Tris pH 8.0, 20mM EDTA, 0.05% sarcosyl), mixed gently by vortex and recentrifuged for 2 minutes. The cells were resuspended quickly with a sterile toothpick in 200 μ l of lysis buffer (50mM glucose, 25mM Tris pH 8.0, 20mM EDTA, 5mg/ml lysozyme) and incubated at room temperature for 5 min. Then 400 μ l of lysis solution (0.2N NaOH, 1% SDS) was added, the tube contents were gently mixed by inversion 5 times and incubated at room temperature for 10 min. One hundred μ l of 0.2M Tris pH 7 was added, mixed by inversion and incubated at room temperature for 5 minutes. After this, 100 μ l of 5M NaCl was added to precipitate proteins, the contents were mixed by inversion and centrifuged at room temperature. The supernatant was removed and 1 volume of phenol equilibrated with 3% NaCl added, the contents were mixed by inversion and centrifuged for 5 minutes at room temperature. The aqueous phase was transferred to a fresh tube, 1 volume of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) was added, mixed by inversion until emulsified and centrifuged for 5 minutes at room temperature. The aqueous phase from this tube was transferred to a new sterile tube and the DNA was precipitated with 1 volume of ice cold isopropanol (incubated at -20°C), mixed thoroughly, left to stand for 15 minutes and centrifuged at high speed for 20 minutes at 4°C . The DNA pellet was rinsed with ice cold 70% ethanol and air dried. The DNA was resuspended in 20 μ l of 0.1X TE pH 8.0. To 10 μ l of this preparation was added 0.5 μ l of DNAase-free RNase (1mg/ml, Sigma Chemicals) and the sample was then loaded onto a 0.5% agarose gel in 1X modified TBE together with λ *Hind* III DNA ladder (Life Technologies) and run at 3 v/cm for 5 hr. The DNA was visualized with a UV

transilluminator at 254 nm and ethidium bromide staining. The gel was photographed using type 57 Polaroid film.

Genomic DNA extraction

The protocol for extraction of genomic DNA was adapted from Ausebel et al. (1990). The bacterial cultures (30ml) were centrifuged at 2,880g for 30 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in 5.67ml of Tris-EDTA solution pH 8.0. A pre-lysis treatment was performed to help the disruption of the cell wall by adding 50µl of lysozyme (20mg/ml; Sigma Chemicals) and incubating for 45 minutes at 37°C. The lysis treatment was then initiated by adding 300µl SDS 10%; 25µl of 20mg/ml proteinase K (Sigma Chemicals) and the tube incubated for 1 hour at 37°C. Following the addition of 1.2ml of 5M NaCl and mixing, 800µl CTAB/NaCl solution (10% CTAB and 0.7M NaCl) was added and the tube incubated for 10 minutes at 65°C. One volume of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1) was added, mixed and centrifuged at 2,880g at 4°C for 15 minutes. The aqueous phase was transferred to a new sterile tube and the DNA was precipitated by the addition of 0.6 volume of ice cold isopropanol, left to stand overnight at -20°C and centrifuged for 20min at 12,000 x g at 4°C. The DNA pellet was rinsed with ice cold 70% ethanol and then lyophilized. The DNA was resuspended in 100µl of 0.1X TE pH 8.0 and stored at -20°C. DNA quality was verified by agarose gel electrophoresis and the DNA concentration was estimated at A_{260} , where 1 absorbance unit equals 50µl/ml of double stranded DNA.

Catabolic genes used in the PCR

The following catabolic genes involved in known bacterial biodegradation pathways for aromatic compounds were used as probes for genes which could be related to TFL degradation. The *todC1* gene codes for one of the three components of toluene dioxygenase, the first enzyme in the toluene degradation pathway of *Pseudomonas putida* F1; it is located on the bacterial chromosome (Zylstra and Gibson, 1989). The *ndoB* gene is one of three genes that encode naphthalene dioxygenase, which is the first enzyme in the degradation of naphthalene, in *Pseudomonas putida* NCIB 9816 (Kurkela et al 1998). The *xyIX* gene encodes toluate 1,2 dioxygenase, involved in the degradation of aromatic compounds such as toluene and xylene, in *Pseudomonas putida* carrying the Tol plasmid (Gallegos et al, 1997). The *xyIE* gene encodes catechol 2,3-dioxygenase, which is responsible for the meta cleavage of catechols and is a key enzyme in the degradation of aromatic compounds such as toluene and xylene; the gene is found in *Pseudomonas putida* mt-2 ATCC 33015 carrying the Tol plasmid (Nakai et al 1983). The *catA* gene encodes catechol 1,2 dioxygenase, which is responsible for ortho cleavage of catechols; it is located on the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosome (Shanley et al, 1994).

Amplification of catabolic genes by PCR: The PCR amplification protocol was adapted from Martin-Kearley et al. (1994) and was similar to that described in Bellinaso et al. (2001). The reaction mixture contained: 100ng of bacterial genomic DNA, 2 μ l of MgCl₂ 25mM; 8 μ l of a 200mM mixture of each deoxyribonucleoside triphosphate (ATP, GTP, CTP and TTP) (Pharmacia Biotech), 2 μ l of each primer

(Pharmacia Biotech)(Table 1); 1.25 units of Taq DNA polymerase (Pharmacia Biotech). Amplification was carried out using the following PCR parameters: 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C and a final extension of 3 min at 72°C. In the negative control the genomic DNA was replaced with sterile water. Positive controls were from reference microorganisms that were known to contain the respective catabolic genes (Table 1). The mixture was loaded onto a 0.5% agarose gel in 1X modified TBE and run at 3v/cm for 5h. GeneRuler™ 100bp DNA Ladder was used for the bp markers (MBI/Fermentas). The DNA was visualized in a UV transilluminator at 254nm following ethidium bromide staining. The gel was photographed using type 57 Polaroid film.

Hybridization analysis: The PCR products produced with *ndoB*, which were the most similar in size to the positive control, were selected to assess their homology with the respective reference catabolic genes.

Blotting of agarose gels was performed under low vacuum in a Pharmacia LKB Biotechnology VacuGene XL system as described in the manufacturer's protocol. The PCR fragments were depurinated (HCl 0.2N); denatured (NaOH, 0.5M; NaCl, 0.5M); neutralized (Tris 1M; NaCl. 1.5M; pH 7.5) and transferred (NaCl, 3M; sodium citrate, 0.2M; pH 7.0) from the agarose gel to a Zeta probe nylon membrane (Bio-Rad Laboratories). The DNA was cross-linked to the wet membrane using the UV Stratalinker 1800 (Stratagen, CA, USA) and the membrane was air dried and stored at -20°C until probed.

Gene probe preparation: The gene probe was prepared by PCR using *ndoB* oligonucleotide primers as described above. The corresponding PCR fragments

were purified with the "QIAEX II Gel Extraction Kit" (Amersham) and labelled with [³²P]dATP using the Multiprime DNA labelling system (Amersham).

Hybridization: Hybridization of the *ndoB* PCR fragments was performed according to the Zeta probe protocol (Bio-Rad Laboratories). The membranes were incubated for 1.5h at 65°C in prehybridization solution (1mM EDTA, 0.5M NaH₂PO₄, 7%; SDS, pH 7.2). Hybridization was carried out overnight at 65°C in fresh prehybridization solution containing the radioactively labelled probe. The membranes were then washed twice with Wash 1 solution (1 mM EDTA, 40mM NaH₂PO₄, 5%; SDS; pH 7.2) for 30min at 65°C and once with Wash 2 solution (1mM EDTA, 40mM NaH₂PO₄ pH 7.2, 1% SDS) for 30min at 65°C. Membranes were exposed to x-ray film (Kodak X-Omat) at room temperature for 10 min to 24h.

Table 1. Oligonucleotide primers used for amplifying catabolic genes

Catabolic gene	Primer sequence/position	PCR fragment size
Toluene dioxygenase (todC1)	F: 5'-CGGGTGGGCTTACGACACCGCCGCAATCT-3'/976-1005 R: 5'-TCGAGCCGCGCTCCACGCTACCCAGACGTT-3'/1506-1535	560 bp
Naphthalene dioxygenase (ndoB)	F: 5'-CACTCATGATAGCCTGATTCTGCCCCGGCG-3'/622-653 R: 5'-GGGTCCACAACACACCCATGCCGCTGCCG-3'/1234-1263	642 bp
Toluene-1,2-dioxygenase (xyiX)	F: 5'-CCGCTGCAAGCGCGAGATGTTACCGACCC-3' R: 5'-AGAAACCGCGCCATCCCCGCCCCAGCTAC-3'	707 bp
Catechol-2,3-dioxygenase (xyiE)	F: 5'-GTGCAGCTGCGTGTACTGGACATGAGCAAG-3'/31-60 R: 5'-GCCAGCTGGTCGGTGGTCCAGGTCACCGG-3'/835-864	834 bp
Catechol-1,2-dioxygenase (catA)	F: 5'-GAAGGACCGCTATATGTTGCAGGTGC-3' R: 5'-TAGTGAATATGCGCAGGGCG-3'	364 bp

RESULTS AND DISCUSSION

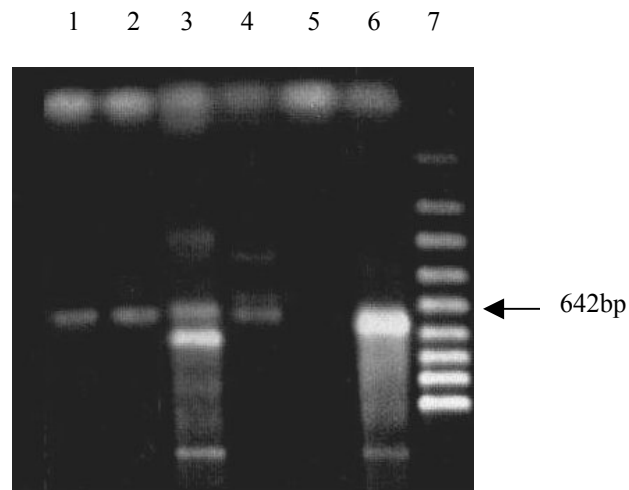
Table 2 shows the PCR products and hybridization results obtained from the DNA extracted from the 4 bacterial isolates. The *ndoB* primer produced fragments of the expected size, as shown by the positive control, for all the isolates (Fig. 2); *todC1* and *xyIX* did not produce products of the expected size with the TFL-degrading bacteria.

Table 2. Results of PCR using specific primers encoding the enzymes naphthalene dioxygenase (*ndoB*), toluene dioxygenase (*todC1*), toluate 1,2 dioxygenase (*xyIX*), catechol-2,3-dioxygenase (*xyIE*), catechol-1,2-dioxygenase (*catA*) and hybridization with the *ndoB* gene probe.

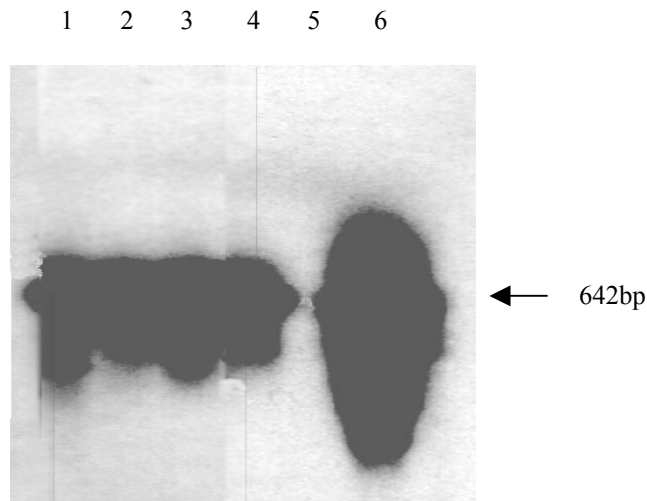
Strain	TFL						Hybridization to <i>ndoB</i> probe
	reduction	<i>ndoB</i>	<i>todC1</i>	<i>xyIX</i>	<i>xyIE</i>	<i>CatA</i>	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	24.6%	+	-	-	-	-	+
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	16.4%	+	-	-	-	-	+
<i>Bacillus simplex-2</i>	25.0%	+	-	-	-	-	+
<i>Bacillus simplex-3</i>	16.0%	+	-	-	-	-	+

+ : PCR fragment of expected size present

- : no PCR fragments of expected size



(a)



(b)

Figure 2 – Detection of *ndoB* by PCR and hybridization analysis in total bacterial DNA. **(a)** Agarose gel electrophoresis showing the 642bp fragment amplified using *ndoB* oligonucleotide primer. **(b)** Southern hybridization analysis of *ndoB* PCR fragment shown in (a) probed with *ndoB* gene. Lanes: 1 *Klebsiella oxytoca*; 2 *Herbaspirillum seropedicae*; 3 *Bacillus simplex*-2; 4 *Bacillus simplex*-3 ; 5 negative control; 6 positive control; 7 100 bp ladder.

The amplified *ndoB* DNA was analysed by hybridization using PCR generated probes specific for the gene of interest. There was strong hybridization between the two DNA fragments, indicating homology between this gene in all four bacterial isolates and the *ndoB* gene of *P. putida*, which encodes the α -subunit of naphthalene 1,2-dioxygenase (Fig. 3). The results suggest the presence of a dioxygenase in the genome of the four isolates. Dioxygenases are often responsible for the initial oxidation of xenobiotics, including nitroaromatic compounds; they are multicomponent enzyme systems. These enzyme systems consist of a component that transfers electrons from NAD(P)H to the oxygenase, which is the catalytic unit. The oxygenase consists of small (beta) subunits and large (alfa) subunits; the gene for the latter being the most conserved (Suen et al., 1996; Spain, 2000). Comparison of the nucleotide sequences of the alfa subunit of dioxygenases shows their similarity, indicating that they are evolutionarily related (Neidle et al., 1991).

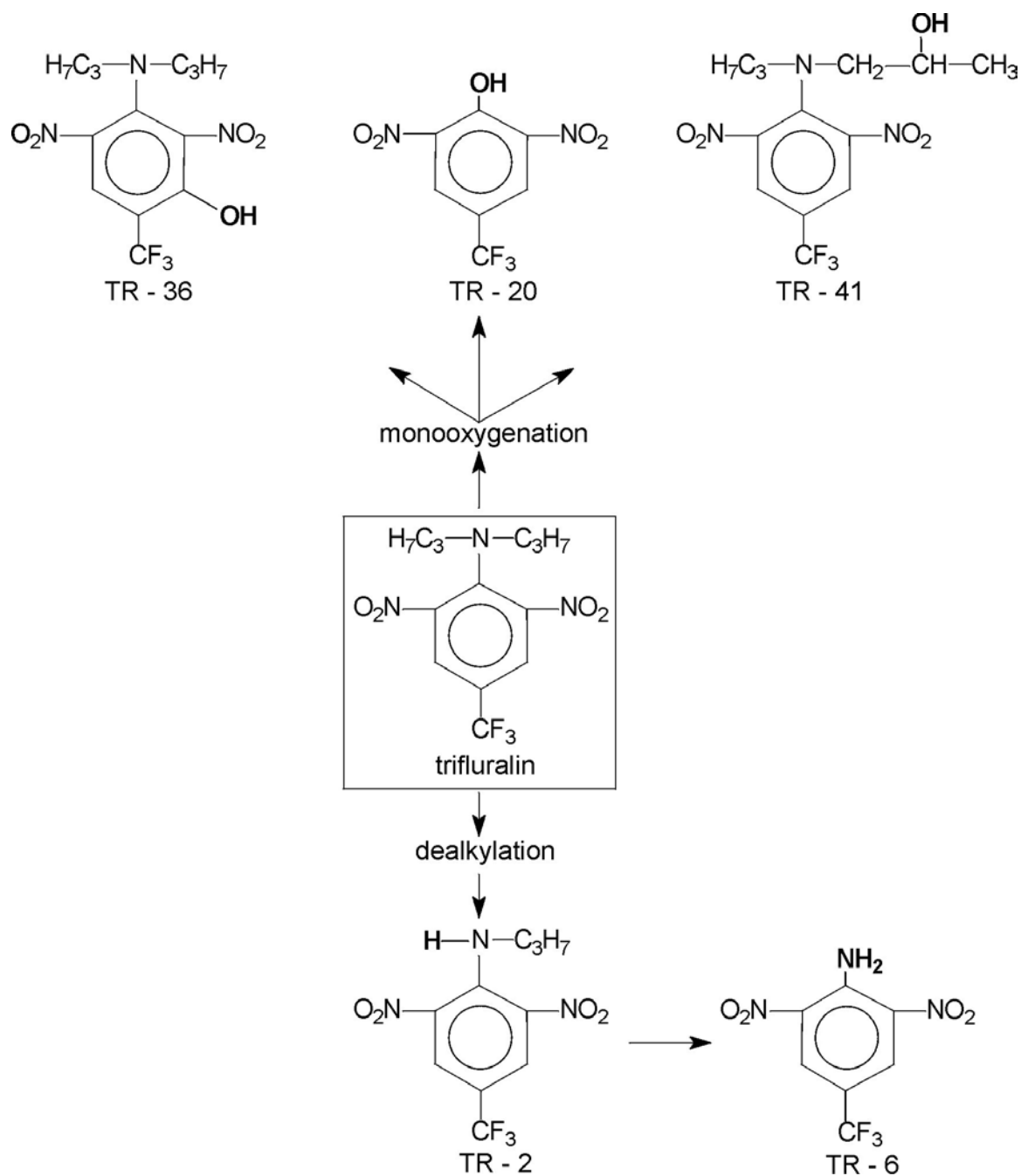


Figure 3 Initial steps in TFL catabolism, as suggested by Golab et al., 1979. (TR = trifluralin)

In the last decade, bacteria capable of mineralizing some nitroarene compounds (nitrobenzene, 2-nitrotoluene and 2,4-dinitrotoluene/2,4-DNT) have been isolated and characterized. The degradation pathways are initiated by dioxygenase systems that are very similar to that of naphthalene dioxygenase and closely related to it. For example, genes that encode 2,4-DNT dioxygenase from *Burkholderia sp.* show a high degree of sequence similarity with those of the naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas putida*: the alpha subunit has 80% identity. These dioxygenases share another similarity: both catalyse desaturation and monohydroxylation of other substrates (Sue et al., 1996; Spain et al., 2000). This lack of specificity for their substrates is a characteristic of dioxygenases (Resnick et al., 1996).

The isolates were tested for naphthalene degradation by the clear zone technique. None formed clear zones, indicating that they do not have the capacity for naphthalene degradation, even though they possess a dioxygenase similar to naphthalene dioxygenase.

All the strains degraded trifluralin. There are few publications on the products of trifluralin biodegradation. Golab et al. (1979) noted a low level of mineralization of TFL in the field; he identified the intermediate products of degradation under these conditions and suggested a scheme for the catabolism of TFL. A few other publications described the growth of bacterial isolates in media containing TFL under aerobic conditions and identified some of the degradation products cited by Golab et al. (Hamdi and Tewfik, 1969; Carter and Camper, 1965; Sato, 1992; Bellinaso et al., 2001). The initial reactions suggested by Golab et al. (1979) are N-dealkylation of the propyl group producing TR (trifluralin)-2,

replacement of the substituted amino group by a hydroxyl, forming TR-20, monohydroxylation of the aromatic ring and of the propyl group producing TR-36 and TR-41, respectively, and reduction of the nitrogroup to an amine, forming TR-4 (Fig. 3). No dihydroxylated product, the main product of dioxygenase action, was identified.

The action of dioxygenases has been shown to be hindered by the presence of groups that drain pi-electrons from the aromatic ring, such as the nitro groups present in TFL, 2,4,5-trinitrotoluene (TNT), 2,4-DNT and 2,6-dinitrotoluene (2,6-DNT). In spite of extensive research, no initial dioxygenase has been found for TNT, although such enzymes have been detected for the related compounds 2,4-DNT and 2,6-DNT (Spain, 2000). TFL has a similar chemical structure to these compounds. Because of the lack of chemical studies on the biodegradation of TFL, it is not possible to conclude whether it is a principal substrate for dioxygenases; these enzymes catalyse other types of transformations. For example, naphthalene dioxygenase is one of the nitroarene dioxygenases that carries out desaturation and monooxygenation. In addition, it can catalyse N-dealkylation. These fortuitous reactions, known as cometabolism, are very important in the biodegradation of recalcitrant molecules in the environment.

The hybridization of the *ndoB* gene with extracted DNA from all our four TFL-degrading isolates indicates the probable presence of a dioxygenase gene. Phylogenetic analysis has shown that the genes for dioxygenases acting on nitroarenes are in the same cluster as those for naphthalene (Parales, 2000); TFL is also a nitroarene. The enzyme coded by this gene could act on TFL transforming it into dihydroxylates or catechols, or it could produce monohydroxylates (TR36,

TR20 and TR41 in Fig. 3) and dealkylates (TR2 and TR6 in Fig. 3), intermediates detected by various authors (Zeyer and Kearney, 1983; Golab et al. 1979; Sato, 1992), by cometabolism.

Genes encoding catabolic enzymes for xenobiotic substances are frequently localised on high molecular weight plasmids (Gallegos et al., 1997). A number of plasmids were detected in all the isolates (Fig. 4), but there was no hybridization with the *ndoB* probe (not shown). This preliminary observation indicates that the *ndoB*-like gene in these bacteria is probably not located on a plasmid.

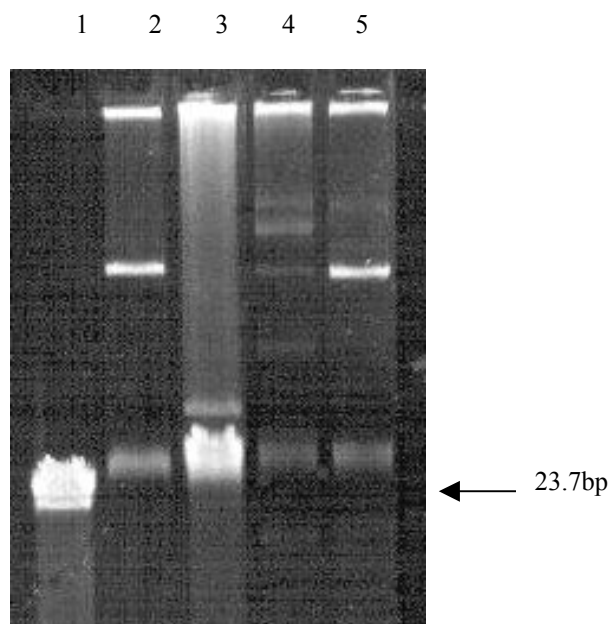


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis showing the presence of large plasmids. Lane: 1 lambda (*Hind*III) marker; 2 *Klebsiella oxytoca*; 3 *Herbaspirillum seropedicae*; 4 *Bacillus simplex-2*; 5 *Bacillus simplex-3*.

This is the first publication on genes in bacteria that degrade TFL and it supports the previously published suggestions on TFL catabolism. For further confirmation, gene sequencing and more studies on the biochemistry of TFL biodegradation are necessary.

REFERENCES

Alexander M. *Biodegradation and Bioremediation*, 1999 (2nd. ed.). Academic Press, London, pp. 325-353.

Ausebel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. G., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1990. *Current protocols in molecular biology*, vol. 1. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School.

Bellinaso, M. L., Greer, C. W., Peralba, M. C., Henriques, J. A . P., Gaylarde, C. C. 2001. Biodegradation of the herbicide trifluralin by bacteria isolated from soil. Submitted to *FEMS Microbiol. Ecol.*.

Carter, N. D.; Camper, N. D. 1975 Soil enrichment studies with trifluralin. *Weed Sci.* 23: 71-74.

Eltis, L. D.; Bolin, J. D. 1996. Evolutionary relationships among extradiol dioxygenases. *J. Bacteriol.* 178;5930-5937.

Gallegos, M. T., Williams, P. A . Ramos G. L. 1997. Transcriptional control of the multiple catabolic pathways on the pww53 plasmid of *Pseudomonas putida* MT53. *J. Bacteriol.* 179: 5024-5029.

Gibson, D. T., Resnick, S. M.; Lee, K.; Brand, J. M.; Torok, D. S.; Wackett, L. P.; Schoken, M. J.; Haigler, B. E. 1993. Desaturation, dioxygenation, and monooxygenation reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. Strain 9816-4. *J. Bacteriol.* 177:2615-2621.

Golab, T.; Althus, W. A. ; Wooten H. L. Fate of (14-C) Trifluralin in soil. 1979 *J. Agric. Food Chem.* 27(1);163-179.

Greer, C.; Masson L.; Comeau, Y.; Brousseau R.; Samson, R. 1993. Application of Molecular Biology Techniques for Isolation and Monitoring Pollutant-Degrading Bacteria. *Water Poll. Res. J. Canada.* 28: 275-287.

Hamdi, Y. A.; Tewfik, M. S. 1969. Decomposition of the herbicide trifluralin by a *Pseudomonas*. *Acta Microbiologic Polinica Ser. B* 1 (18), No 2:83-83.

Hayman, G. T.; Farrand, S. K. 1990. *Agrobacterium* plasmids encode structurally and functionally different loci for catabolism of agrocinopine-type opines. *Mol. Gen. Gent.* 223:465-473.

Kurkela, S. Lehvaslaiho, H., Palva, E. T., Teeri, T. H. 1988. Cloning, nucleotide sequence and characterization of genes encoding naphthalene dioxygenase of *Pseudomonas putida* strain NCIB9816. *Gene*, 73: 355-362.

Martin-Kearley, J.; Gow, J. A.; Péloquin, M.; Greer, C. W. 1994. Numerical analysis and the amplification of random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction for the differentiation of *Vibrio* strains from a seasonally cold ocean. *Can. J. Microbiol.* 40:446-455.

Nakai, C., Kagamiyama, H., Nazald, M., Nakazawa, T., Inouye, S., Ebina, Y., Nakazawa, A. 1983. Complete nucleotide sequence of the metapyrocatechase gene on the TOL plasmid of *Pseudomonas putida* mt-2. *J. Biol. Chem.* 258: 2923-2928.

Neidle, E. L., Hartnett, C.; Ornston, L. N.; Bairoch, A ., Rejik, M.; Harayama, S. 1991. Nuclotide sequence of the *Acinetobacter calcoaceticus* benACB genes for benzoate 1,2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among oxygenases. *J. Bacteriol.* 173:5385-5395.

Resnick, S. M.; Gibson, D. T. 1996. Region and stereospecific oxidation of 9,10-dihydroanthracene and 9,10-dihydrophenanthrene by naphthalene dioxygenase: structure and absolute stereochemistry of metabolites. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3355-3359.

Sato, Y. 1992 Degradation of trifluralin by bacteria isolated from soil. *Weed Research. Japan.* 37(3):213-219.

Sayler, G. S.; Layton A. C. 1990. Environmental application of nucleic acid hybridization. *Ann. Rev. Microbiol.* 44:625-648.

Shanley, M. S, Harrison, A., Parales, R.E., Kowalchuk, G., Mitchell, D. J., Ornston, L. N. 1994. Unusual G+C content and codon usage in *catIJF*, a segment of the bem-cat supra-operonic cluster in the *Acinetobacter calcoaceticus* chromosome. *Gene* 138: 59-65.

Spain, J. C.; Hughes, J. B.; Knackmuss, H. J. 2000 Biodegradation of Nitroaromatic Compounds and Explosives. In *Perspectives of Bioelimination of Polynitroaromatic Compounds* Lenke, H.; Achtnich, C.; Knackmuss, H. J. , Lewis Publishers, Boca Raton, 2000, pp. 91-126.

Spain, J.C. 1995. Bacterial degradation of nitroaromatic compounds under aerobic conditions. In *Biodegradation of Nitroaromatic Compounds* Spain, J.C. , Plenum Press, New York, 1995, pp. 19-35.

Spanggord, R. J.; Spain, J. C.; Nishino, S. F.; Mortelmans K. E. 1991. Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3200-3205.

Suen, W-C.; Haigler, B. E.; Spain, J. C. 1996. 2,4-Dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia* sp. Strain DNT: similarity to Naphthalene Dioxygenase. *J. Bacteriology.* 178:4926-4934.

Whyte, L. G., Greer, C. W., Inniss, W. E. 1996. Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. *Can. J. Microbiol.* 42:99-106.

Zeyer, J.; Kearney, P. C. 1983. Microbial dealkylation of trifluralin in pure culture. *Pesticide Biochem. Physiol.* 20: 10-18.

Zylastra, G. J. Gibson, D. T. 1989. Toluene degradation by *Pseudomonas putida* F1. *J. Biol. Chem.* 264: 14940-14946.

CAPÍTULO III

BIODEGRADATION AS A BIOTECHNOLOGICAL MODEL FOR THE TEACHING OF BIOCHEMISTRY

(Aceito para publicação na revista World Journal of Microbiology & Biotechnology)

BIODEGRADATION AS A BIOTECHNOLOGICAL MODEL FOR THE TEACHING OF BIOCHEMISTRY

**Maria De Lourdes Bellinaso^{1,2}, João Antônio Pêgas Henriques^{2,3}, Christine
Claire Gaylarde^{3,4}**

¹ Dep. Biologia e Química, UNIJUÍ, Ijuí-RS, Brazil; ² Dep. Bioquímica; ³ Dep. Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, CEP 91501-970, Porto Alegre-RS, Brasil.; ⁴ MIRCEN, Fac. Agronomia/UFRGS, C.P. 776, Porto Alegre, CEP 90001-970, Brasil.

Short title: Biodegradation in biochemistry teaching

Corresponding author:

Christine Gaylarde

Dept. Biophysics/Biotechnology Center, UFRGS

Av. Bento Gonçalves, 9500 - Campus do Vale, 91.501-970, Porto Alegre, Brazil

Telefone: (051) 3316-6084

FAX: (051) 3319-1079 e-mail:gaylarde@yahoo.com

Summary

Biodegradation as a biotechnological model for the teaching of biochemistry. A knowledge of waste treatment and the biodegradation processes involved is necessary for undergraduates in agriculture, chemistry, biology, food technology, etc. Courses in these subjects must make adequate provision for such instruction. In this article, we suggest a theoretical and practical study of composting, which stimulates the interest of the students in metabolic pathways involved in this, and other, biotechnological processes.

Key words: Biochemistry, Biodegradation, Composting, Education

Introduction

The rapid growth of human populations linked with increased per capita output of material wealth since the middle of the 18th century has led to a rapid increase in environmental pollution. This population explosion, fuelled by technological developments in health and agriculture, has led to an increased demand for material goods. The manufacturing capacity required to supply this demand results in the production of a huge quantity and variety of wastes by modern society. Many of these wastes include molecules not previously found in the biosphere, substances known as xenobiotics, which are the result of new manufacturing technologies such as production of paints, plastics and biocides. Many of these molecules are toxic to living organisms and have a high half-life in the environment because of the lack of biodegradative enzymes in the indigenous organisms (Vargas et al., 1995; Topp et al., 1997).

If the human population is to be maintained at current levels, a new paradigm must be developed on a worldwide scale, placing the environment and its sustainability in a position of fundamental importance. This requires the minimisation of waste generation and the maximisation of recycling processes in a new “environmental economy” and this, in itself, necessitates an increased understanding of the physical, chemical and biological phenomena which rule waste treatment technologies such as composting and land-farming.

The sustainability of the Earth’s resources is maintained by recycling of the basic materials of life, both organic and inorganic. Information about these processes should be included not only in all technology-based courses, but any whose graduates may eventually be employed in waste-producing industries.

Universities other institutes of higher or extended education, whose remit it is to produce managers and qualified technical staff for the manufacturing industries, should consider this.

Biodegradation in the teaching of biochemistry

Knowledge of waste treatment is necessary for undergraduates in agriculture, chemistry, biology, food technology, etc. Courses in these subjects must make adequate provision for such instruction.

A Biochemistry course aims to instil an understanding of the molecules which compose living organisms and their transformations and interactions during vital processes (Nelson & Cox, 1995). This biochemical knowledge is fundamental for the understanding of microbial metabolism and biotechnological processes. Currently, however, the majority of undergraduate courses which include biochemistry (agriculture, chemistry, biology, etc.) scarcely consider microbial metabolism and its interaction with the environment, rather emphasising mammalian processes. The biochemical content of such courses must be replanned, in order to give students the necessary to understand the environmental problems and biotechnology of waste disposal. Aspects of microbial biodegradations which could be included, both at graduate and at post-graduate levels, are:

- the importance of microbial metabolic pathways - digestion, glycolysis, the tricarboxylic acid cycle, respiratory chain, etc. - in biomass degradation, to allow the continued functioning of the biological cycles of carbon, nitrogen, sulfur and phosphorus, which maintain life on Earth;

- the great enzymatic potential of microorganisms to degrade complex structures not normally used by other living organisms, and which allows these cells to adapt to newly evolved environments;
- the abilities and limitations of microbial metabolism when faced with some new molecules produced by modern technology (xenobiotics);
- the complexity and efficiency of the total metabolic capacity of a microbial community and its importance for the production and maintenance of waste treatment technologies.
- the influence of habitat on the metabolic capacity of the microbial population and the way in which Man can use these capabilities to produce industrially important enzymes for treatment of recalcitrant wastes.
- the possibility of genetic manipulation to enhance the degradative abilities of the microbial population;

Many teaching proposals can be made based on these reflexions about the need for informed professionals capable of dealing with the modern problems of waste disposal. In this article, we suggest a theoretical and practical study of composting, which stimulates the interest of the students in metabolic pathways involved in this and other biotechnological processes.

Teaching proposal - the composting process as a biotechnological example of biodegradation

Composting is the technique of degrading solid wastes by harnessing the activities of endogenous microorganisms (fungi and bacteria, including actinomycetes), present in the environment. The product of this process - humus, a

complex polymer with a long half-life - is employed in agriculture for the improvement of the physical, chemical and biological properties of soil (He et al. 1992; Atlas & Bartha, 1986). Composting is a biodegradative process which is used worldwide for the disposal of domestic and industrial wastes because of its efficient yet simple technology (Kiehl, 1985; Glazer & Nikaido, 1995; Beaudin et al., 1996). The duration of the process is a function of the types of residues present, the microbial population and the environmental temperature. Tropical and subtropical countries, such as Brazil, have favourable climates for the employment of composting.

This biotechnological process can be used on a small scale as a teaching model, offering a rich source of theoretical and practical material for the discussion of biodegradative metabolism, as described below.

During composting, intense changes in physico-chemical and biological parameters occur and these may be monitored to show the efficiency of the process and indicate the progress of composting and the associated metabolic activities. Simple measurements which can be made include pH, temperature, moisture content, evolution of CO₂, nitrate, ammonia, population of microorganisms and higher organisms which participate in the process (both numbers and diversity), ash content, C/N ratio, xenobiotics when present, enzymatic activity, toxicity and molecular biology analyses. The data obtained from these measurements can be discussed and interpreted from the viewpoint of degradative metabolism, providing a wealth of material for understanding the biochemistry of biotechnological processes and discussing relationships between metabolism and environment.

Microorganisms that degrade xenobiotics can be isolated from the compost in the laboratory and the pathways involved in the breakdown of a given xenobiotic material can be studied by biochemical investigations and some molecular biology methods, such as detection of high molecular weight plasmids, on which genes coding for enzymes involved in degradation of complex molecules are usually located. Various types of waste can be studied with the aim of isolating microorganisms with specific degradative abilities, as sources of industrially important enzymes. For example, domestic wastes are a good source of microorganisms degrading modified polyethylene (Hosni & Gaylarde, 1995); keratinases can be sought in microorganisms from wastes containing high quantities of feathers, hair and skin, such as might be found in chicken-processing factories (Thomas et al., 1995); paper mill effluents can be used as a source of enzymes degrading lignin and other xenobiotics (Tondo et al., 1998).

A complete understanding of biotechnological processes can only be gained by interdisciplinary studies. Biochemistry, molecular biology, microbiology, ecology, zoology, process engineering and chemistry are all involved and the results of the simple measurements can be discussed with students attending these disciplines, indicating to them the importance of interaction between different knowledge groups. The method allows the student to construct biochemical pathways using direct investigation of a biotechnological process employed in the treatment of wastes. Without doubt, this use of an investigative method linked to the solution of important practical problems of modern society will lead to personnel better qualified to deal with the problems of the real world.

Results and discussions of students can be integrated into future classes, hence instilling an understanding of how knowledge grows through the cumulative observations and thoughts of Humankind.

An experimental theoretical and practical course was run based on this model, involving 90 hours of teaching with 25 undergraduate students of the Biochemistry unit of the Agriculture degree of the Regional University of the Northwest of the State of Rio Grande do Sul (UNIJUÍ). The course was very well accepted and appreciated by the students and the staff members involved considered that a knowledge and understanding of subject was acquired at a good level.

Teaching methodology

On the first day of the course, the importance of waste biodegradation in agriculture was considered, emphasising post-harvest wastes, pesticides in the soil, animal wastes and the production of organic compost. Composting of domestic and garden wastes was introduced as a model for the study of biodegradative metabolism.

1. Characterization of domestic waste and setting up of the composting

process: The waste materials were those produced in the students' homes over 5 days together with garden waste from the University. The domestic waste was separated into plastics, paper, metal and organic litter and the relative percentage composition determined by weighing.

The mixed wastes were placed in a composting container made of pierced tiles (1m³ with 1m sides) (Fig. 1) and aerated by turning every day in the first week and once a week thereafter.

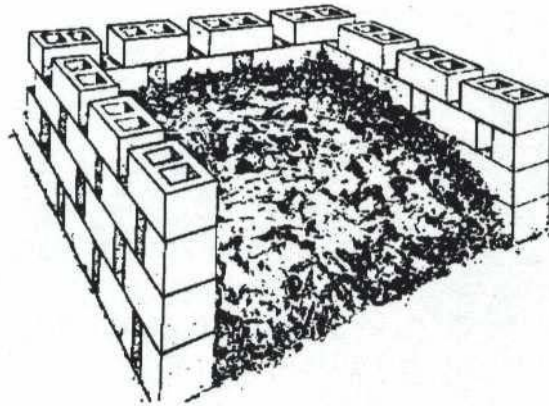


Fig. 1- Composting container

2. Construction of metabolic pathways: Using their biochemical knowledge from classes and textbooks, the students constructed metabolic pathways relating to the materials being degraded.

3. Parameters utilised to monitor the composting process: The choice of these was based on the ease of execution in the University laboratories and the academic and technical abilities of the students.

Samples were collected at various times from three regions of the compost, homogenised and samples taken for the analyses. Measurements were made in triplicate and the results averaged. If conditions permit, more replicates can be

carried out and a statistical analysis performed, offering additional important training. The following parameters were analysed:

- pH of the compost in water (Kiehl, 1985);
- bacterial colony forming units (cfu), using the spread plate method on Thornton's medium (Parkinson et al., 1971);
- temperature (the mean of 4 points inside the compost);
- CO₂ production: 10g waste were placed in a tightly closed flask and the amount of CO₂ released estimated by the turbidity produced in Ca(OH)₂ (Crossono et al, 1996);
- Presence of starch (Lossin, 1970).

The students were divided into groups and each group was responsible for monitoring one parameter throughout the semester. The results were combined and shared with the whole class.

4. Interdisciplinary studies: Those disciplines running in the same semester contributed to the practical and theoretical classes. Students of the Chemistry unit helped in the monitoring of pH and the Professor of Zoology assisted in the identification of the microfauna which is seen during the evolution of the composting process. Students of the Introduction to Agriculture unit joined in the discussions on composition of food wastes.

5. Visit to an industrial scale composting plant: At the end of the semester the students visited a site where the domestic waste from Panambí, a nearby town of some 20,000 inhabitants, was being composted.

Class results and discussion

1. Characterisation of domestic waste

The students calculated the percentage composition of the waste (Fig.2) and the average production of waste over the five days of collection. The average quantity of waste produced per student per day was 0.6 kg.

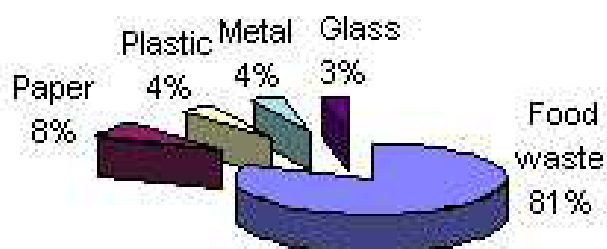


Fig. 2 - Percentage composition of the waste collected by the students over 5 days.

The wastes consisted of plant, animal and plastic residues. Students of the Biochemistry unit produced a list of various types of molecules present in the waste (carbohydrates, lipids, proteins, nucleotides, vitamins, mineral salts) and the classification, chemical structures and properties of these molecules were studied (Nelson & Cox, 1995; Stryer, 1995)

Data on the type and quantity of pesticides used in the region were obtained from the local authorities so as to facilitate discussion on the possible presence of xenobiotics in the compost. The total amount of pesticides used in 1996 was 26,000,000 litres and the main types were trifluralin, glyphosate, 2,4-D and atrazine (EMATER, 1996). A literature search yielded the structural formulae of the pesticides quoted by EMATER and their persistence in the environment (Rodrigues & Almeida, 1988).

2. Construction of metabolic pathways

The students produced a metabolic map of the catabolic and anabolic routes for the substances they had listed. In addition, they constructed degradative schemes for the macromolecules found in the waste and this is shown in Fig. 3. This exercise pinpointed the following facts:

- the need to transform polymers into monomers prior to absorption and incorporation into metabolic pathways;
- the huge metabolic capacity of microbial populations, based on their collective possession of a vast library of degradative genes, compared with the limited digestive capacity of animals such as mammals;
- the lack of degradation of the polymer polyethylene (plastic bags) in the composting process, owing to the absence of the genomic information required for the breakdown of this xenobiotic material;
- the importance of the catabolism of macromolecules for the cycling of biological materials on Earth.

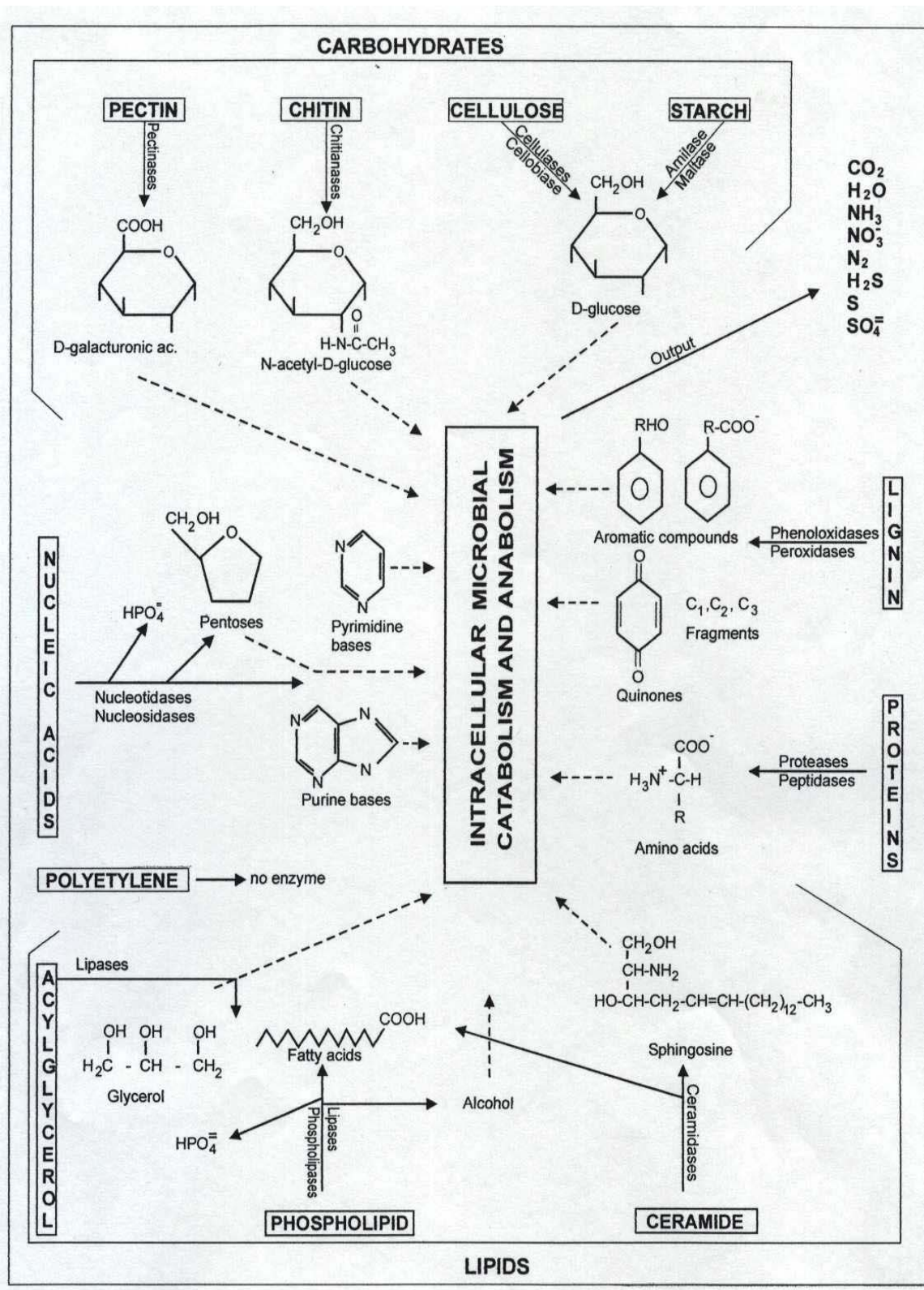


Fig. 3 - Simplified scheme of digestion of macromolecules in the waste

A literature search revealed possible metabolic pathways for the degradation of the pesticides seen to be of greater importance in the immediate geographic region (Topp et al., 1997; Aizawa, 1989). The potential for non-specific degradation, or co-metabolism, was discussed, along with the evolution of catabolic enzymes and gene transfer.

3. Physico-chemical and microbiological changes during composting- Interpretation

The measured parameters, pH, temperature, bacterial counts, presence of starch and production of CO₂ (Figures 4 & 5 and Table 1) were discussed. The data obtained by measurement and from the literature were analysed in the class and some of the discussions are reported below.

- The increase in temperature during the first few days of composting is caused by the intense metabolic activity of the microorganisms utilizing the simpler molecules (starch, disaccharides), which are readily degraded. This is accompanied by an increase in the microbial population, as a result of the biosynthesis of cellular components (lipids, proteins, nucleic acids). Part of the chemical energy present in the substrates is used as cellular energy, some is released as heat, causing an increase in temperature, and some is used to increase the entropy in the system (indicated by CO₂ evolution).
- The velocity and heat output of anaerobic metabolism are considerably different and may have both advantages and disadvantages for biotechnological process.

- The central aerobic degradative pathways for the production of energy in microorganisms, plants and animals are notably similar and result in CO₂ production.
- Microbial catabolism of nitrogenous organic compounds results in the release of ammonia, raising the pH.

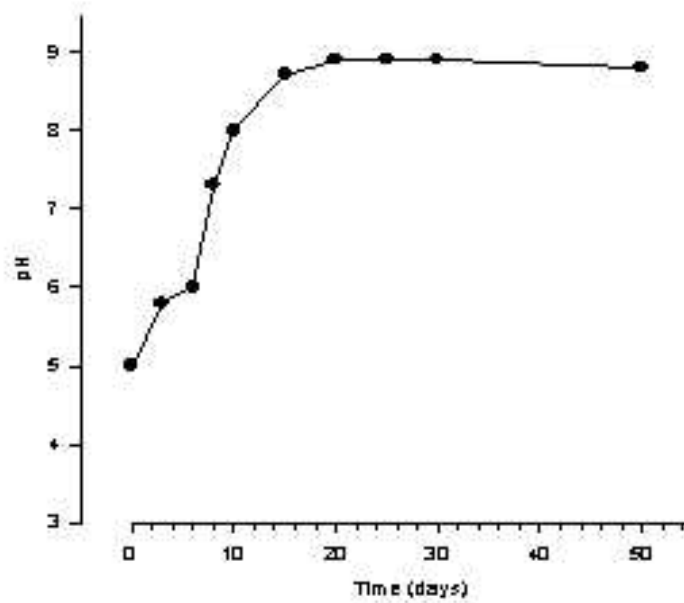


Fig. 4 - Change in pH during composting

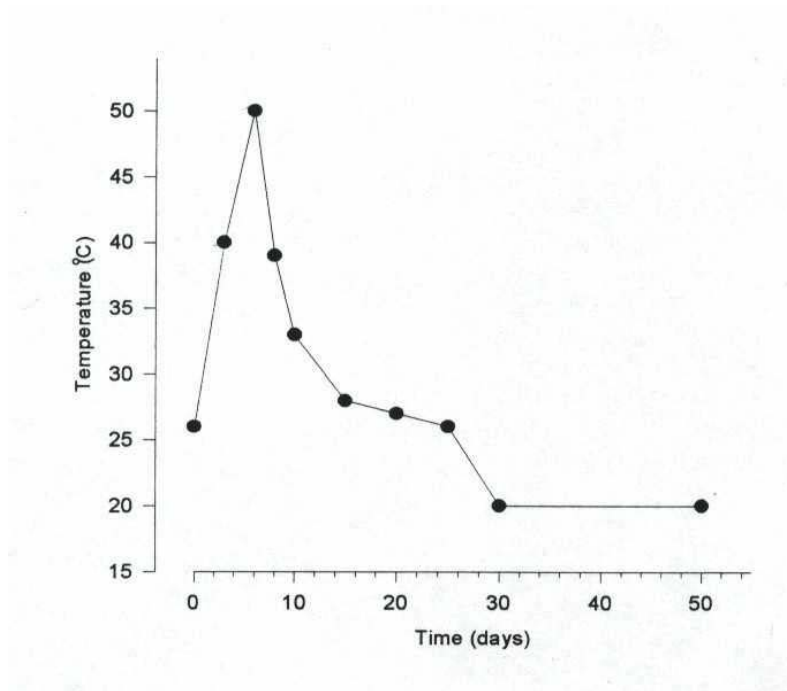


Fig. 5 - Change in temperature during composting

Table 1. Parameters monitored during the composting process

Time (days)	CO ₂ evolution (visual observation)	Starch (visual observation)	No. Bacteria (cfu x 10 ⁸)
0	++	+++	15
7	++++	+	40
50	+	-	13

Many questions, observations and conclusions were drawn about the biochemical processes which occur during the biodegradation of waste materials. Some of the queries were answered by the students themselves, using the

knowledge of biochemistry acquired during the course, or with the help of text books, while others required some input from the teaching staff. Other more complex questions remained unanswered, but possible experiments which might be performed to help elucidate the answers were suggested.

In the course, very simple practical techniques were used, since these were appropriate to undergraduate study in this University. Even so, the unit achieved its objective of presenting the basic facts of biochemistry and introducing important biotechnological points while at the same time showing the students the importance of the interaction between observation, experimentation and theory, which is fundamental to all science (Vella et al., 2000).

4. Interdisciplinary activities

At the end of the semester, an interdisciplinary seminar was held, where the data obtained and discussed during the practical classes was interrelated with that from other courses running in the same semester.

In the Introduction to Agriculture unit, the data on waste composition was compared with the averages for Brazil and other countries. It was noticed that a large amount of waste is produced in Brazil as compared to other countries and the cultural factors which influence this were considered. The possibility of treating these residues to form a useful product (humus) was raised and the attitudes and possible actions of trained agriculturists in response to these matters were discussed.

Knowledge gained in the Chemistry unit contributed to the discussions of pH and the difficulties of its measurement in complex samples such as compost.

In the Zoology unit, the students monitored the insect population in the compost, which brought to the seminar a discussion of the modification in insect colonisation with changing physico-chemical conditions (pH, temperature, etc.). Together with the alterations in microbial populations, this led to a discussion of the interactions between physico-chemical conditions and living organisms and how these conditions change and are changed by biochemical processes.

5. Visit to a composting plant

At the composting plant, the students could observe the composting of wastes from an entire town. They spoke to the person responsible for the plant, who had a degree in Agriculture, about practical and theoretical aspects of composting, trying to relate this to the information acquired in their course.

Conclusion

The students finished the semester with a good level of understanding of theoretical and practical aspects of biodegradation and biotechnological processes for waste treatment. They also had the opportunity to integrate their knowledge with that of other disciplines. The growing interest of the students and their increasing ability to observe and discuss biodegradative processes was apparent in the final seminar, in the visit to the industrial plant and in the written tests.

It was interesting to observe how the use of biodegradative metabolism as a model facilitated the process of understanding, and thus learning, anabolic metabolism and its relation with catabolic processes, in both microorganisms and higher forms of life.

The study may be adapted according to the objectives of the Course. Other types of wastes can be used, from various industries, from fuel stations, etc.,

depending on the focus of the Course. We intend to continue and extend the method, using wastes with higher levels of poorly degraded (recalcitrant) compounds, and to produce a data bank of the techniques, results and discussions from each semester. This will be a valuable teaching resource for the future.

References

- Aizawa, H. 1989 *Metabolic Maps of Pesticides*, New York: Academic Press.
- Atlas, R. M. & Bartha, R. 1986 *Microbial Ecology*, 2nd. ed. California: The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc.
- Beaudin, N., Caron R. F., Legros, R., Ramsay, J., Lawlor L. & Ramsay, B. 1996 Composting of Weathered Hydrocarbon-Contaminated Soil. *Compost Science & Utilization*. **4**: 35-45.
- Crossono, S. K., Kalbus, L. H. & Kalbus, G. E. 1996 Determination of Carbon Dioxide by Titration. *Journal of Chemical Education*, **73**: 175-176.
- EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural). 1996 *Levantamento do tipo e quantidade de agrotóxicos e embalagens produzidas na região de Ijuí*. Rio Grande do Sul, Brasil.
- Glazer, A.N. & Nikaido, H. 1995 *Microbial Biotechnology*. New York: W. H. Freeman and Company.
- He X. T., Traina, S. J. & Logan, T. J. 1992 Chemical Properties of Municipal Solid Waste Composts. *J. Environ. Qual.* **21**: 318-329.

- Hosni, A.M.L. & Gaylarde, C.C. 1995 Degradative activity of various bacteria on two polyethylene formulations. In: *Biodeterioration & Biodegradation* **9** Bousher, A., Chandra, M. & Edyvean, R. eds., Rugby: Inst. Chem. Eng., pp. 297-303.
- Kiehl, E. J. 1985 *Fertilizantes Orgânicos*. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda.
- Lossin, R.D. 1970 Compost studies. *Compost Sci.* **11**: 16-17.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. 1995 *Lehninger: Principles of Biochemistry*. London: Macmillan.
- Parkinson, D., Gray, T.R.G. & Williams, S.T. 1971 *Methods for studying the ecology of soil microorganisms*. Oxford: Adlard, 116p.
- Rodrigues, B. N. & Almeida, F. S. 1988 *Guia de Herbicidas*. 2nd ed. Brasil: Edição dos Autores.
- Stryer, L. 1995 *Biochemistry*. London: W.H. Freeman & Co.
- Thomas, R.W.S.P., Rosa, S., Bicca, F., Coppeti, C.P.S., Fonseca, A.S.K., Termignoni, C. & Gaylarde, C.C. 1995 Keratinase production by bacterial isolates from a chicken feather meal factory. In: *Biodeterioration & Biodegradation* **9**, eds. Bousher, A., Chandra, M. & Edyvean, R. Rugby: Inst. Chem. Eng., pp. 400-406.
- Tondo, E.C., Andretta, C.W.S., Souza, C.F.V., Monteiro, A.L., Henriques, J.A.P. & Ayub, M.A.Z. 1998 High decrease of 4,5,6-trichloroguaiacol by *Bacillus spp.* Isolated from cellulose pulp mill effluent. *Braz. J. Microbiol.* **29**, 265-271.
- Topp, E., Vallaeys, T. & Soulas, G. 1997 Pesticides: microbial degradation and

effects on microorganisms. In: Modern Soil Microbiology, eds. van Elsas, J.D., Trevors, J. & Wellington, E.M.H. pp. 547-576. New York: Marcel Dekker, Inc.

Vargas, V.M.F., Guidobono, R.R., Jordão, C. & Henriques, J.A.P. 1995 Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river treated with different concentration/extraction procedures. *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* **343**, 31-52.

Vella, F., Leopoldo, M., Mehler, A. H., Rombauts, W., White, H. B. & Wood, E. J. 2000 Standards for the Ph.D. Degree in the Molecular Biosciences. *Biochemical Education.* **28**: 2-11.

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A TFL foi lançada no mercado no início da década de sessenta. Durante estas quatro décadas de uso da TFL, apenas quatro trabalhos foram publicados sobre a sua biodegradação por isolados bacterianos (HAMDI e TEWFIK, 1968; CARTER e CAMPER, 1975; SATO, 1992). Cinco bactérias ao todo foram isoladas: uma *Brevundimonas diminuta* (nomeada primeiramente como *Pseudomonas sp.*; usada em nossos experimentos como controle positivo), duas *Pseudomonas sp.*, uma *Alcaligenes sp.* e uma *Moraxella sp.* Estas bactérias tiveram suas origens em solos agrícolas, foram isoladas através dos métodos de subculturas repetidas (CARTER e CAMPER, 1975; SATO, 1992) e identificadas pelo método bioquímico. Os dois primeiros trabalhos publicados não quantificaram o grau de degradação da TFL; detectaram a degradação, medindo o crescimento microbiano e identificando os produtos. Sato (1992) quantificou, pela primeira vez a degradação da TFL, medindo o percentual degradador dos isolados *Alcaligenes sp.* (20 %) e *Moraxella sp.* (95 %), utilizando o método de cromatografia gasosa. Neste experimento Sato (1992), também, identificou, através de espectrometria de massa, três produtos da degradação da TFL.

Estas publicações sobre a biodegradação da TFL por isolados bacterianos são esparsas e todas realizadas por diferentes pesquisadores, resultando, obviamente, em poucos dados consistentes disponíveis sobre o tema. Apenas cinco bacteriais foram isoladas, nenhuma rota bioquímica foi estabelecida e não há dados referentes às questões genéticas. Os resultados obtidos neste trabalho vêm juntar-se a estes dados, até então publicados sobre a biodegradação da TFL por isolados bacterianos, trazendo as seguintes contribuições:

- 1) Foram obtido 5 novas bactérias degradadoras da TFL: *Klebsiella oxytoca* (isolado 1) (24.6 %), *Herbaspirillum seropedicae* (isolado 2) (16.4 %), *Bacillus simplex* 2 (isolado 5) (25.0 %), *Bacillus simplex* 3 (isolado 6) (16.0 %), isolado 9 (21.0 %) (Fig. 3 – capítulo I). Os percentuais de degradação destas linhagens foram semelhante ao percentual da *Alcaligenes sp.* (20 %) (SATO, 1992), e menor do que o percentual degradador da *Moraxella sp.* (95 %) (SATO, 1992). Realmente, o percentual de degradação da *Moraxella sp.* é elevado; contudo devemos salientar que a concentração de TFL usada por SATO (1992) foi de 5 mg.L⁻¹; uma concentração dez vezes menor do que a usada nos experimentos deste nosso trabalho. Desta maneira, novos testes com concentração mais baixas de TFL, poderão resultar em um maior percentual de degradação (Capítulo I).

- 3) Foi medido o grau de degradação da primeira bactéria isolada como degradadora da TFL, *Brevundimonas diminuta* (21 %) (HAMDY e TEWFIK, 1968), cujo grau de degradação ainda não havia sido medido (Capítulo I).

- 4) Os isolados foram identificados através de dois métodos, o bioquímico e do seqüenciamento do rDNA 16S. O uso destes dois métodos possibilitou a identificação das espécies e dos gêneros de todas as bactérias degradadoras da TFL. Nos trabalhos anteriores o método

bioquímico utilizado possibilitou a identificação apenas dos gêneros (Tabela 1, capítulo I).

- 5) Foi proposto um novo método de isolamento de bactérias resistentes à TFL - crescimento ao redor de cristais. Este método é uma técnica simples, visual e rápida de ser posta em prática, e poderá vir a ser uma nova estratégia de isolamento de microrganismos resistentes à TFL, assim como de microrganismo resistente a outros xenobióticos que formam grandes cristais sobre o agar (Capítulo I).

- 6) Pela primeira vez, foi detectado um gene catabólico em bactérias degradadoras da TFL. Este gene catabólico, semelhante ao gene *ndoB* que codifica a nafataleno dioxigenase, pode estar codificando uma dioxigenase que transforma a TFL como um substrato principal de uma rota catabólica ou como cometabolismo, realizando reações fortuitas de hidroxilação e N-dealquilação, por exemplo (Capítulo II).

Estes dados obtidos, como se pode observar, contribuem significativamente para o conhecimento sobre biodegradação da TFL a nível mundial, bem como mostra pela primeira vez que o solo da região de Ijuí do Estado do Rio Grande do Sul, exposto à TFL por quatro décadas, contém microrganismos que degradam a TFL. Realmente, solos expostos a agrotóxicos por um longo período, tendem a desenvolver uma microflora bacteriana capaz de

metabolizar estas moléculas (SOMASUNDARAM e COATS, 1990; YARDEN et al. 1990). Vários trabalhos relatam a degradação da TFL em solos agrícolas expostos a esta molécula por longo período (GOLAB et al., 1979; JOLLEY e JOHNSTONE, 1994; MALTERRE et al. , 1997).

O baixo percentual de degradação da TFL, evidenciado nos isolados obtidos neste trabalho (Fig. 3 – Capítulo I), pode ser decorrente da toxicidade do meio, como já discutido, ou devido à sua estrutura aromática recalcitrante (Fig. 1 – Capítulo I). O anel aromático é, em si, recalcitrante comparativamente às outras estruturas orgânica e, no caso da TFL, está envolto pelos grupos -N,N-dipropila, dois nitrogrupos e trifluoro metila, os quais alteram o arranjo eletrônico e a conformação espacial da molécula. Os grupos nitros e trifluorometila, por exemplo, captam elétrons dos carbonos do anel aromático dificultando o ataque eletrofílico das dioxigenases (SPAIN et al., 1994). O grupo trifluorometila ligado à TFL, além de ocasionar recalcitrância no anel aromático, também apresenta elevada energia de ligação entre os átomos de carbono e flúor, dificultando o seu catabolismo (SWARTS, 1922; NEILSON, 1994) . Os únicos trabalhos que relata a alteração biológica do grupo trifluorometila da TFL foram realizados por SATO (1992) e GOLAB (1979). Estes trabalhos mostram que o grupo trifluorometila é oxidado a ácido carboxílico, sem que o mesmo seja liberado e sem que ocorra a ruptura do anel.

A mineralização do anel aromático da TFL tem sido demonstrada em experimentos com solo (GOLAB et al., 1979 e MONTEIRO et al. 1992). Contudo, o anel aromático da TFL permanece intacto em todas as cepas degradadoras da TFL, tendo somente sido detectada a mineralização dos grupos propilas da TFL

(ZEYER e KEARNEY, 1983; SATO, 1992;). O fato de ainda não ter sido comprovada a mineralização do anel aromático da TFL por isolados bacterianos, não significa que seja impossível de ela ocorrer, uma vez que ainda são incipientes os trabalhos realizados sobre a sua biodegradação. Muitas moléculas xenobióticas consideradas, há uma década, impossíveis de serem degradadas por isolados microbianos, hoje, após intensos trabalhos de pesquisa, são comprovadamente degradáveis. Por exemplo, o 2,6-DNT, uma molécula altamente recalcitrante com estrutura semelhante à da TFL, considerada não biodegradável por isolados bacterianos em meio aeróbico é, hoje, comprovadamente biodegradada (SPAIN, 1994; NISHINO et al., 2000).

A hibridização do gene *ndoB*, que codifica a naftaleno dioxigenase, com o genoma cromossomal das quatro bactérias degradadoras da TFL, indica a presença de uma dioxigenase (Fig. 2 – Capítulo II). As dioxigenases fazem parte do principal mecanismo aeróbico de ativação do anel aromático, que será posteriormente rompido (CHUDHRY e CHAPALAMADUGU, 1991; ADRIAENS e VOGEL, 1995;; PARÉS e JUÁREZ, 1997). A presença do gene *ndoB* nestas bactérias degradadoras da TFL, num primeiro momento, parece indicar que as bactérias degradam o naftaleno. Porém, o teste de biodegradação do naftaleno pelo método de “zonas claras”, foi negativo, indicando que estas dioxigenases presentes nas bactérias degradadoras da TFL não pertencem à rota catabólica do naftaleno, mas, provavelmente, atuam na transformação da TFL.

Estudos bioquímicos sobre a biodegradação aeróbica de compostos nitroaromáticos, mostram que o catabolismo destas moléculas pode ser iniciado por dioxigenases e que as mesmas são similares em vários aspectos com a

naftaleno dioxigenase: apresentam uma seqüência nucleotídica similar e catalisam transformações secundárias no anel aromático (SUE et al., 1996; SPAIN et al. 2000). A TFL também é um composto nitroaromático, desta maneira, o gene encontrado nas bactérias degradadoras da TFL pode estar codificando uma dioxigenase que atua sobre a transformação da TFL. Transformação esta que pode ser a hidroxilação do anel aromático para formar catecóis ou transformações fortuitas, como a N-dealquilação e a monohidroxilação da TFL (Fig. 3, Capítulo II).

A redução dos níveis da TFL no teste de degradação (Fig. 3 – Capítulo I), o pico adicional no cromatograma do HPLC (Fig.4 – Capítulo I), a biodegradação da TFL pelo controle positivo, e a hibridização do genoma com o gene *ndoB* (Fig. 2 – Capítulo II) são resultados bioquímicos e genéticos que confluem para a afirmação de que a TFL é degradada pelas bactérias isoladas do solo de Ijuí. Em vista destes dados obtidos, que apontam para um catabolismo aeróbico com atuação de dioxigenase, propõe-se uma rota catabólica aeróbica da degradação da TFL, fundamentada nos dados sobre biodegradação da TFL, nitrocompostos e outros compostos aromáticos, (Fig. 6).

Uma relevante observação pode-se fazer quanto à origem dessas bactérias degradadoras da TFL isoladas até o presente momento: todas elas, incluindo as deste trabalho, procederam de solos agrícolas. Estes solos, talvez, não sejam os mais indicados para isolar microorganismos degradadores de uma molécula de elevada recalcitrância, como a TFL, uma vez que esta é adicionada ao solo na ordem de 1,8 - 3,6 kg/ha. , e apenas uma vez ao ano (RODRIGUES e ALMEIDA, 1995). Vários trabalhos relatam que bactérias degradadoras de moléculas

recalcitrantes, como os nitrocompostos, somente são isoladas de ambientes que recebem regular e freqüentemente estas moléculas (SPAIN et al., 2000). Porém, é importante salientar que JOHNSTON e CAMPER (1991), evidenciaram que amostras de solo de um sítio de depósito de vários tipos de agrotóxicos - diuron, propanil, trifluralina, clorofenol – , degradaram o propanil e o clorofenol, mas não degradaram o diuron e a TFL. Estes dados deixam claro que muitas variáveis devem ser levadas em contas na decisão sobre o local de isolamento de microrganismos degradadores de xenobióticos.

Embora este trabalho, como os outros publicados, se detiveram na investigação da biodegradação sob condições aeróbicas da TFL por isolados bacterianos, deve-se considerar que um metabolismo sob condições anaeróbicas, ou mesmo um metabolismo misto - anaeróbico e aeróbico -, poderá favorecer a sua biodegradação. Camper et al. (1980), realizando experimentos em laboratório com amostras de solo sob condições aeróbicas e anaeróbicas, constatou que houve uma maior biodegradação da TFL em condições anaeróbicas. O metabolismo anaeróbico, muitas vezes, mostra-se mais propício para degradar moléculas de elevada persistência, como demonstrado na biodegradação de compostos polialogenados (WACKETT, 1997). A eliminação de grupos ligados ao anel aromático, o nitrogrupo no caso da TFL, pode ser facilitada pelas vias redutivas que são típicas do metabolismo anaeróbico. A *Pseudomonas pseudoalcaligenes* utiliza passos redutivos que antecedem ao oxidativo na rota catabólica aeróbica do 2-nitrotolueno (HE e SPAIN, 1997).

Pesquisa sobre biodegradação é um trabalho moroso e requer, além de uma boa estrutura laboratorial, um grupo de profissionais que tenham uma

formação e uma postura interdisciplinar. Todavia, a formação dos profissionais que atuam neste campo de trabalho, de maneira geral, não é dirigida para que eles pensem sobre as questões práticas e teóricas da biodegradação. Neste trabalho também fez-se uma proposta e implantou-se um método de ensino da bioquímica da biodegradação, dentro da disciplina de bioquímica do curso de agronomia da UNIJUÍ, usando como eixo temático o processo biotecnológico da compostagem, e levando em conta a interdisciplinariedade (Capítulo – III).

Bons resultados foram obtidos junto aos alunos. Observou-se que, ao longo do semestre, os mesmos desenvolveram uma lógica de raciocínio abrangente sobre as questões práticas e teóricas do metabolismo microbiano da biodegradação, sendo capazes de articularem e discutirem idéias sobre o assunto. Esta proposta metodológica, sugerida e executada por este trabalho, mostrou-se rica para o entendimento teórico e prático da biodegradação. Ela poderá ser melhorada em vários aspectos; como por exemplo, na adição de algum xenobiótico mais facilmente biodegradável e o isolamento de bactérias degradadoras desta molécula; o estudo da bioquímica destes isolados- a medição da atividade enzimática da população microbiana- e a verificação da presença de plasmídeos degradadores desta molécula.

O conhecimento teórico e prático sobre biodegradação pode ser traduzido para uma forma de ensino mais simples que a existente e ser socializado também na comunidade de ensino do 1º e 2º graus. A observação dos fenômenos biológicos de um processo de biodegradação, como por exemplo a do próprio lixo escolar, propicia a integração de várias disciplinas, melhorando o entendimento do

saber científico e desenvolvendo uma aprendizagem mais comprometida com o desenvolvimento social e tecnológico (BELLINASSO E ALMEIDA,1994).

Este trabalho de tese de doutorado, que abrangeu a pesquisa sobre a biodegradação da TFL e a implantação de um método de ensino de biodegradação, foi sem dúvida profícuo para todo o grupo de pesquisa que se empenhou diretamente na sua execução e para os alunos de graduação do curso de agronomia que participaram da proposta metodológica. No encerramento desta etapa, espera-se estar contribuindo, no âmbito técnico e no do ensino, para a viabilização de um desenvolvimento tecnológico comprometido com a sustentabilidade do meio ambiente.

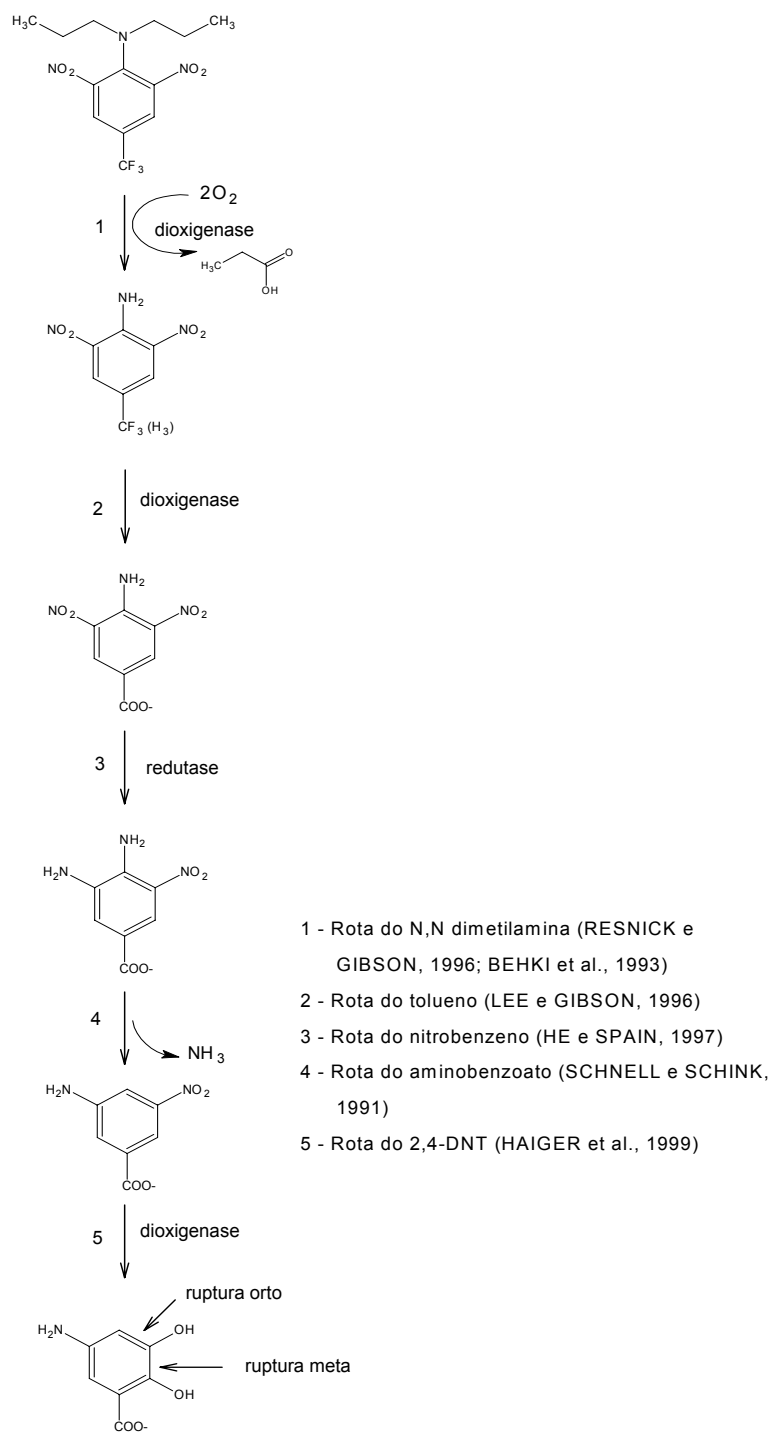


Fig. 6 Proposta de rota catabólica da trifluralina, com participação de dioxigenases.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Geral

Este trabalho propiciou um melhor entendimento sobre os processos biológicos envolvidos na biodegradação da trifluralina por isolados bacterianos de solo agrícola, bem como a proposição de uma metodologia de ensino sobre a bioquímica do processo de biodegradação.

Específica

1. No solo agrícola de Ijuí existem bactérias resistentes à concentração de até 100mg. L⁻¹ de trifluralina, identificadas como: *Klebsiella oxytoca*, *Herbaspirillum seropedicae*, 3 *Bacillus simplex*, 2 *Pseudomonas montelli* e 1 *Pseudomonas sp.*
2. O método de crescimento ao redor de cristais, desenvolvido neste trabalho, mostrou-se eficaz para isolar bactérias resistentes à trifluralina.
3. Dos cinco meios utilizados no teste de biodegradação da trifluralina, apenas o meio complexo, com 50mg.L⁻¹ de trifluralina, propiciou a degradação da trifluralina, pelos isolados bacterianos.

4. Das nove bactérias isoladas, cinco biodegradaram a trifluralina : *Klebsiella oxytoca* (24.6 %), *Herbaspirillum seropedicae* (16,4 %), *Bacillus simplex* 2 (25.0 %), *Bacillus simplex* 3 (16.0 %), isolado 9 (21 %).
5. As bactérias isoladas do solo de Ijuí que degradam a trifluralina apresentam um percentual de degradação semelhante ao percentual do controle positivo, *Brevundimonas diminuta* (26%).
6. Com exceção do isolado 9, que ainda não foi testado, as demais bactérias degradadoras da trifluralina apresentaram plasmídeos de elevada massa molecular.
7. Com exceção do isolado 9, que ainda não foi testado, o gene *ndoB* hibridizou como o genoma cromossomal das bactérias degradadoras da trifluralina. Isto indica que nestas bactérias existe um gene de dioxigenase, semelhante ao gene da naftaleno dioxigenase, que pode estar envolvido na degradação da trifluralina.
8. A proposta de ensino de biodegradação desenvolvida facilitou e direcionou o aprendizado sobre os processos bioquímicos da biodegradação microbiana de moléculas persistentes.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

Na projeção de metas de continuidade deste trabalho, devemos considerar que: é uma área de pesquisa relativamente nova, carente de metodologias e recursos humanos no Brasil, requer a interface de várias áreas do conhecimento e infra-estrutura laboratorial cara para a execução dos métodos analíticos e de biologia molecular. Desta maneira, a elaboração de um projeto deve, prioritariamente, manter e estender vínculos inter-institucionais e inter-disciplinares.

Em função dos resultados, abaixo algumas propostas de continuidade do trabalho:

- Testar o potencial de todos isolados em degradar a trifluralina, utilizando concentrações menores que 50 mg.L^{-1} .
- Identificar os produtos da degradação da trifluralina, através de Cromatografia Gasosa-Spectrometria de Massa (GC-MS).
- Testar a eficácia da nova técnica de "crescimento ao redor de cristais", para isolar microrganismos degradadores da trifluralina e de outros compostos apolares.
- Clonar e seqüenciar o fragmento de DNA que hibridizou para o gene *ndoB*, com o objetivo de verificar se estes isolados são realmente portadores de dioxigenase.

- Iniciar um trabalho de biodegradação de nitrocompostos que sejam efluentes de indústrias do estado do Rio Grande do Sul.
- Continuar trabalhando sobre proposições de metodologias de ensino de biodegradação; no sentido de trabalhar, também, com moléculas xenobióticas e de desenvolver outras técnicas simples e possíveis de serem executadas em sala de aula.

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

Trifluralina (a, a, a, trifluoro-2,6-dinitro-N, N-dipropil-p-toluidina) (TFL) é um herbicida pré-emergente, incorporado ao solo que tem sido usado na agricultura desde a década de sessenta; ele é moderadamente persistente em vários tipos de solos do Brasil. O objetivo deste estudo foi isolar - de um solo agrícola contaminado por quatro décadas - e caracterizar bactérias resistentes a TFL, determinar suas habilidades em degradar a TFL, investigar a presença de genes degradadores que possam estar envolvidos na degradação da TFL e propor um método de ensino teórico prático sobre a biodegradação, para cursos de graduação.

Oito bactérias foram isoladas, pela técnica de subculturas repetidas em meio contendo TFL como única fonte de carbono, e identificadas, pelo método bioquímico e seqüenciamento do rDNA 16S como *Klebsiella oxytoca*, *Herbaspirillum seropedicae*, 3 strains of *Bacillus simplex*, 2 de *Pseudomonas montelli* e uma outra *Pseudomonas sp.* Uma terceira bactéria (isolado #9), não identificada, que crescia ao redor de cristais de TFL em meio sólido, foi isolada; esta é uma técnica nova que poderá ser útil no isolamento de bactérias que são resistentes a outros compostos pouco solúveis em água. Todas as bactérias isoladas foram submetidas ao teste de biodegradação, em um meio contendo sais minerais, 0,1% succinato, 0,1 % de extrato de leveduras e 50 mg. L⁻¹ de TFL. Cinco bactérias reduziram a concentração de TFL no meio, após trinta dias de incubação: *Klebsiella oxytoca* (24,6 %), *Herbaspirillum seropedicae* (16,4 %), *Bacillus simplex* 2 (25.0 %), *Bacillus simplex* 3 (16.0 %) e isolado 9 (21.0 %). Uma

bactéria conhecida como degradadora da TFL, *Brevundimonas diminuta* (NCIMB 10329) degradou a TFL, neste meio, de maneira semelhantes ao das bactérias isoladas.

Os DNAs extraídos das quatro bactérias identificadas degradadoras da TFL, foram sondados para os gens catbólicos *ndoB*, *todC*, *xyIX*, *catA* e *xyIE*, os quais codificam as enzimas naftaleno 1,2-dioxigenase, toluene dioxigenase, toluate 1,2-dioxigenase, catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase, respectivamente. Técnicas de PCR e hibridização demonstraram que os DNAs de todas estas quatro bactérias foram fortemente hibridizadas para o gen *ndoB*, contudo, usando a técnica de "zonas claras", observou-se que nenhuma delas degradou naftaleno. Estes resultados indicam a presença de gens dioxigenases, nestas bactérias degradadoras da TFL, que poderiam estar transformando a TFL como substrato principal, ou como cometabolismo.

O conhecimento sobre processos de biodegradação é necessário para os graduados dos cursos de agronomia, química, biologia, tecnologia de alimentos, etc. Neste trabalho, também, propomos o estudo teórico e prático da compostagem o qual estimula o interesse dos estudantes em aprender sobre o metabolismo envolvido neste, e em outros, processos biotecnológicos.

ABSTRACT

Trifluralin (α,α,α , trifluoro-2,6- dinitro-N,N-dipropyl-p-toluidine) (TFL) is a preemergence, soil-incorporated herbicide that has been in agricultural use since

the early 1960s and is moderately persistent in various Brazilian soils. The purpose of this study was to isolate and characterize TFL-resistant bacteria from a soil in which this pesticide has been used for the last 4 decades, determine their ability to degrade TFL, investigate the presence of genes which might be involved in degradation and propose a teaching model to transfer an understanding of biodegradative processes to undergraduate students.

Eight bacteria were isolated by repeated subculture in medium with TFL as sole carbon source and identified by biochemical tests and 16S rDNA sequencing as *Klebsiella oxytoca*, *Herbaspirillum seropedicae*, 3 strains of *Bacillus simplex*, 2 of *Pseudomonas montellii* and a second *Pseudomonas* sp. Another, unidentified bacterium (isolate #9) was obtained following growth on crystals of TFL on a solid mineral medium, a new technique that could be usefully employed for other poorly soluble substrates. In a mineral salts medium with 0.1% succinate, 0.1% yeast extract and 50mg.L⁻¹ TFL, reductions in the level of pesticide of 24.6% for *Klebsiella oxytoca*; 16.4% for *Herbaspirillum seropedicae*; 25.0% for *Bacillus simplex* 2; 16.0% for *Bacillus simplex* 3 and 21.0% for unidentified isolate #9 were obtained after 30 days. These were similar to the level obtained using a known TFL-degrading bacterium, *Brevundimonas diminuta* (NCIMB 10329).

DNA **extracted** from the 4 identified degrading bacteria was probed with the catabolic genes *ndoB*, *todC*, *xyiX*, *catA* and *xyiE*, which encode the enzymes naphthalene 1,2-dioxygenase, toluene dioxygenase, toluate 1,2-dioxygenase, catechol 1,2- dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase, respectively. Using PCR and hybridization analysis, the strong hybridization of the *ndoB* gene with all genomic DNAs was demonstrated, in spite of the fact that none of the isolates

were able to degrade naphthalene, as indicated by the “clear zone” test. The results indicated the presence in these bacteria of a dioxygenase gene, whose product could act on TFL as its principal substrate, or fortuitously, by cometabolism.

A knowledge of biodegradation processes involved is necessary for undergraduates in agriculture, chemistry, biology, food technology, etc. A theoretical and practical study of composting, which stimulates the interest of the students in metabolic pathways involved in this, and other, biotechnological processes, is suggested.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADRIAENS, P.; VOGEL, T. M. (1995) Biological treatment of chlorinated organics. In: YOUNG, L. Y. e CERNIGLIA, C. E. ***Microbiol. Transformation and Degradation of Toxic Organic Chemicals***. Willey-Liss, Inc., cap. 12, p.487-513.

ALEXANDER, M. (1999) ***Biodegradation and bioremediation***. 2nd ed. New York : Academic Press. 453 p.

AMBRAMOWICZ, D. A . (1990) Aerobic and anaerobic biodegradation of PCBs : a review. ***Crit Rev. Biotechnol.***, Cleveland, v. 10, p.241-251.

ANDERSON, K. E.; et al.(1997) Metabolic activation of aromatic amines by human pancreas. ***Carcinogenesis***, Oxford, v. 18, p. 1085-1092.

ATLAS, R. M. ; BARTHA, R. (1998) ***Microbial ecology***. 4th ed. Menlo Park : The Benjamin/Cummings. 533 p.

BARBIERI, S. M. (1994) ***Estudos da biodegradação de compostos aromáticos por linhagens bacterianas***. Tese (doutorado) -Universidade de São Carlos, São Carlos.

BEHKI, R. M.; TOPP, E.; DICK, W.; GERMON, P. (1993) ***Appl. Environ. Microbiol.***, v. 59, p. 1995.

BELLINASSO, M.L. ; ALMEIDA, M. L. (1994) Gerenciamento e tratamento do lixo escolar um eixo temático interdisciplinar. ***Espaço Escola***, Unijuí, Ijuí, RS. - Uma proposta pedagógica para o ensino de Bioquímica na Agronomia e Biologia. In:

SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2., 1994, Ijuí. **Resumos ... Ijuí : UNIJUÍ, 1994.**

BOYETTE, K. D.; MOORMAN, T. B.; KOSKINEN, W. C. (1988). Effects of trifluralin and metabolites on the decomposition of selected substrates by soil microorganisms. **Biol. Fertil. Soils, Berlin**, v. 6, p. 100-105.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente (1990). Decreto nº 98.816, de janeiro de 1990. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 1990.

CAMPER, N. D. ; STRALKA, K. ; SKIPPER, H. D. (1980) Aerobic and anaerobic degradation of profluralin and trifluralin. **J. Environ. Sci. Health. B**, New York, v. 15, p. 457-473.

CARSON, R. (1962) **Primavera silenciosa**. São Paulo : Melhoramentos. 305 p.

CARTER, N. D.; CAMPER, N. D. (1975) Soil enrichment studies with trifluralin. **Weed Sci.**, Champaign v. 23, p. 71-74.

CHAUDHRY, G.R. ; CHAPALAMADUGU, S. (1991) Biodegradation of halogenated organic compounds. **Microbiol. Rev. Washington**, v. 55, p. 59-79.

CAMPER, N. D.; STRALKA, K.; SKIPER, H. D. (1980) Aerobic and anaerobic degradation of profluralin and trifluralin, **J. Environ. Sci. Health**. V. 15B, n. 5, p. 457-473.

DAVIS, B. N. K. ; WILLIAMS, C. T. (1990) Buffer zone widths for honeybees from ground and aerial spraying of insecticides. **Environmental Pollution**, London, v. 63, p. 247-259.

DIGRAZIO, P. M et al. (1990) Development of a systems analysis approach for

resolving the structure of biodegrading soil systems. ***Applied Biochemistry and Biotechnology***, Clifton, v. 24, p 237-252.

DORAN, J.W. ; SARRANTONIO, M. ; LIEBIG, M.A . (1996) ***Soil health and sustainability***. New York : Academic Press. v. 56, p. 1-54.

EBERT, E.; LEIST, K. -H.; HACK, R.; EHLING, G. (1992) Toxicology and hazard potential of trifluralin, *Fd Chem. Toxic.*, v. 30, n. 12, p. 1031-1044.

ELSAS, J.D. ; TREVORS, J.K. ; WELLINGTON, E.M.H. (1997) Modern soil microbiology . In: LEUNG, K.T. et al. ***A case study of Bioremediation of polluted soil: biodegradation and toxicity of chlorophenols in soil***. New York : Marcel Dekker. 683 p.

EMATER. (1994) ***Levantamento da comercialização de agrotóxico na região de Ijuí/RS no ano de 1994***. Ijuí. Não paginado.

EMATER. (2000) ***Agrotóxico***, Porto Alegre, 2000. Não paginado. Programa Estadual de Qualificação Profissional.

ENGESSER, K. H.; RUBIO, M. A.; KNACKMUSS, H.-J. (1990) Bacterial metabolism of side-chain-fluorinated aromatics: unproductive meta cleavage of 3-trifluoromethylcatechol. ***Appl. Microbiol. Biotechnol.*** V. 32, 600-608 p.

EBERT, E.; LEIST, K. H.; HACK, R.; EHLING, G. (1992) Toxicology and hazard potential of trifluralin *Fd. Chem. Toxic.*, v. 30, n. 12, p. 1031- 1044.

EPA. (1993) ***Integrated risk information system (IRIS) on trifluraline***. Washington, 1993.

FELSOT, A .S. ; PEDERSEN, W.L. (1991) Pesticidal activity of degradation products. In: SOMASUNDARAM, L. ; COATS, J.R. ***Pesticide transformation***

products : fate and significance in the environment. Washington: American Chemical Society. p. 172-187.

GALLO, M.A. ; LAWIRK, N.J. (1990) **Handbook of pesticides toxicology**. San Diego: Academic Press. v. 2.

GLAZER, A N. ; NIKAIDO, H. (1995) **Microbial biotechnology**. New York : W.H. Freeman. 662 p.

GOLAB, T. ; ALTHUS, W.A . ; WOOTEN H.L. (1979) Fate of (14-C) trifluralin in soil. **J. Agric. Food Chem.** , Eastln, v. 27, n. 1, p. 163-179.

GRIBBLE, G.W. (1995) Natural organohalogenes. **Journal of Chemical Education**, Easton, v . 71, n. 11, p. 907-911.

GRIMBERG, S.J. ; AITKEN, M.D. (1995). Biodegradation of phenanthrene solubilized in surfactant micelles. In: HINCHEE, R.E. ; BROCKMAN, F.J. ; VOGEL, C.M. **Microbial process for bioremediation**. Columbus : Battelle Press. p. 59-66.

GROVER, R. et al. (1997) Environmental fate of trifluralin. 1997. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v. 153, p. 1-64.

HADERLEIN, S.B. ; SCHWARZENBACH, R.P. (1995) Environmental processes influencing the rate of abiotic reduction of nitroaromatic compounds in the subsurface. In SPAIN J.C. **Biodegradation of aromatic compounds**. New York : Plenum. p. 199-226.

HAIGLER, B.E. ; WALLACE, W.H. ; SPAIN, J.C. (1994) Biodegradation of 2-nitrotoluene by *pseudomonas sp.* JS42. **Appl. Environ. Microbiol.** Washington, v. 60, p. 3466-3469.

HAIGLER, B.E. et al. (1999) Biochemical and genetic evidence for meta-ring cleavage of 2,4,5-trihydroxytoluene in *Burkholderia* sp. strain DNT. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181, p. 3965-3972.

HAMDI, Y.A. ; TEWFIK, M.S. (1969) Decomposition of the herbicide trifluralin by a *Pseudomonas*. **Acta Microbiologic Polinica Ser. B 1**, v . 18, n. 2, p. 83-83.

HARDY, A.R. (1990) Estimation exposure: the identification of species at risk and routes of exposure. In: SOMERVILLE, L. ; WALKER, C.H. **Effects of pesticides on terrestrial wildlife**. London : Taylor & Francis. p. 81-97.

HARTTER, D.R. (1985) The use and importance of nitroaromatic chemicals in the chemical industry. In: RICKERT, D.E. **Toxicity of nitroaromatic compounds**. Washington : Hemisphere. Chemical Industry Institute of Toxicology .Series.

HAWARI, J. et al. (1999) Biotransformation of 2,4,6-Trinitrotoluene with *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4,5. **Appl. Environ. Microbiol**, Washington, v. 65, p. 2977-2986.

HE, Z. ; SPAIN, J.C. (1997) Studies of the pathway of degradation of nitrobenzene by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* JS45 : removal of the amino group from 2-aminomuconic semialdehyde. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 63, p. 4839-4843.

HENRIQUES, J.A..P. ; QUEROL, C.B. (1986) Base molecular das mutações. In: COSTA, S.O..P. **Genética molecular e de microrganismo**. São Paulo : Manole. p. 117-134.

JONHRI, A..K. et al. (1999) Characterization and regulation of catabolic genes. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 25, p. 245-273.

JOHNSTON, W. H.; CAMPER, N. D. (1991) Microbial degradation activity in pesticide pretreated soil. **J. Environ. Sci. Health**, v. 26B, n. 1, p. 1-14.

JOLLEY, A . V.; JOHNSTONE, P. K. (1994) Degradation of trifluralin in three Victorian soils under field and laboratory conditions. Australian Journal of Experimental **Agriculture**, v. 34, p. 57-65.

KAUPPI, B.; LEE, K.; CARREDANO, R. E.; PARALES, R. E.; GIBSON, D> T.; EKELUND, H.; RAMASWAMY, S. (1998) Structure of an aromatic ring-hydroxylating dioxygenase-naphthalene 1,2-dioxygenase. **Structure**, Philadelphia, v. 6, p. 571-586.

LÉVÊQUE, C.A. (1997) **A biodiversidade**. Baurú : EDUSC. 245 p.

MALTERRE, F.; GREBIL, G.; PIERRE, J-G; SCHIAVON, M. (1997) Trifluralin behavior in soil: a microlysimeter study. **Chemosphere**, Elsevier Science, v. 34, n. 3, p. 447-454.

MATTOS, M.L. (1996) **Degradação do herbicida Clomazone por uma espécie de Pseudomonas isolada de um planosolo cultivado com arroz irrigado**. f. Tese (doutorado)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Porto Alegre, 1996.

MELO, I. S .; AZEVEDO, J.L (1997a) Microbiologia ambiental. In: MONTEIRO, R.T. **Degradação de pesticida**. Jaguariúna : EMBRAPA-CNPMA,. p. 107-124.

MELO, I. S. ; AZEVEDO, J.L (1997b). Microbiologia ambiental. In: MONTEIRO, R.T. **Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas**. Jaguariúna : EMBRAPA-CNPMA. p. 107-124.

MELO, I. S. ; AZEVEDO, J.L (1997c). Microbiologia ambiental. In: BARBIERI, S. M. **Biodegradação de compostos aromáticos**. Jaguariúna : EMBRAPA-CNPMA. p. 211-241.

MIKESELL, M.D. ; BOYD, S.A.J. (1985) **Environmental Qual.**, Washington, v. 14, p. 337-340.

MONTEIRO, R.T.R. ; DELVECHIO, R.C. ; SILVA, P.M. (1992) Degradação de (14-C) trifluralina em solos da região amazônica. In: CONGRESSO GERAL DE ENERGIA NUCLEAR, 4. Rio de Janeiro. **Anais ...** Rio de Janeiro, 1992. v. 2, p. 809-810.

NARRO, M.L. et al. (1992) Metabolism of phenanthrene by the marine cyanobacterium *agmenellum quadruplicatum* PR-6. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 28, p. 1351-1359.

NEILSON, A.H. (1994) **Organic chemicals in the aquatic environment**. Boca Raton: Lewis Publishers, 438 p.

NELSON, D. L. ; COX, M.M. (2000) **Lehninger : principles of biochemistry**. 3th ed. New York : Worth Publishers, 1151 p.

NISHINO, S.F. ; PAOLI, G.C. ; SPAIN, J.C. (2000) Aerobic degradation of dinitrotoluenes and the pathway for bacterial degradation of 2,6-dinitrotoluene. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 66, p. 2139-2147

NISHINO, S.F. ; SPAIN, J.C. (1993) Degradation of nitrobenzene by a *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. ***Appl. Environ. Microbiol.***, Washington, v. 9, p. 2520-2525.

NISHINO, S.F. ; SPAIN, J.C. (1995) Oxidative pathway for the biodegradation of nitrobenzene by *Comamonas* sp. strain JS765. ***Appl. Environ. Microbiol.*** , v. 61, p. 2308-2313.

PARÉS, R. ; JUÁREZ, A. (1997) ***Bioquímica de los microorganismos***. Barcelona Reverté. 380 p.

PARRIS, G.E. (1986) Covalent binding of aromatic amines to humates. I. Reaction with carbonyl and quinones. ***Environ. Sci. Technol.***, Easton, v. 14, p. 1099-1106.

RABELLO-GAY, et al. (1991) ***Mutagênese teratogênese e carcinogênese : método e critério de avaliação***. Ribeirão Preto : Sociedade Brasileira de Genética. 246 p.

RESNIK, S. M.; LEE K.; GIBSON, D. T. (1996) ***J. Ind. Microbiol.***, v. 17, p. 438-57.

RODRIGUES, B.N. ; ALMEIDA, F.S. (1995) ***Guia de herbicidas***. 3. ed. Londrina. 675 p.

SATO, Y. (1992) Degradation of trifluralin by bacteria isolated from soil. ***Weed Research. Japan.***, v. 37, n. 3, p. 213-219.

SCHMITT, C.J. ; LUDKE, J.L.; WALSH, D.F. (1981) Organochlorine residues in fish: national pesticide monitoring program, 1970-74. ***Pesticide Monitoring Journal***, v. 14, p. 136-155.

SCHNELL, S.; SCHINIK, B. (1991) *Arch. Microbiol.* V. 155, p. 183.

SOMASUNDARAM, L.; COATS, J. R. (1990) Influence of pesticide metabolites on the development of enhanced biodegradation. In: Enhanced biodegradation of pesticides in the environment. Washington: American Chemical Society, p. 128-140. (ACS Symposium Series, 426).

SPAIN, J.C. ; HUGHES, J.B. ; KNACKMUSS, H.-J. (2000) ***Biodegradation of nitroaromatic compounds and explosives***. New York : Lewis Publishers. 434 p.

SPAIN, J.C. ; HUGHES, J.B. ; KNACKMUSS, H.-J. (1994) Biodegradation of nitroaromatic compounds. In: SPAIN, J.C. ***Bacterial degradation of nitroaromatic compounds under aerobic conditions***. New York : Plenum Press. p. 19-35.

SPANGGORD, R. J.; SPAIN, J. C.; NISHINO, S. F.; MORTELMANS, K. E. (1991) Biodegradation of 2,4-dinitrotoluene by a *Pseudomonas sp.* ***Appl. Environ. Microbiol.*** , Washington, v. 57, p. 3200-3205.

STRYER, L. (1995) ***Biochemistry***. 4th ed. London : W.H. Freeman. 1064 p.

SUEN, Wen-Chen ; HAIGLER, B E. ; SPAIN, J.C. (1996) 2,4-Dinitrotoluene dioxygenase from *Burkholderia sp.* strain DNT: Similarity to Naphthalene Dioxygenase. ***J. Bacteriol.***, Washington, v. 178, p. 4926-4934.

SWARTS, F. (1922) Sur l'acide trfluoracétique. ***Bull. Acad. Roy. Belg.*** , v. 8, p. 343-370.

SWOBODA-COLBERG, N.G. (1995) Chemical contamination of the environment: sources, types, and fate of syntetic organic chemichals. In: YUNG, L. Y. and CERNIGLIA, C. E. ***Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals***. New York : Willey-Liss. cap. 2, p. 27-76.

TAYLOR, S. J. C.; AMADOR, J. A. ; LEVINSON, H. S. (1993) Degradation of meta-trifluoro-methylbenzoate by sequential microbial and photochemical treatments. ***Femes Microbiol. Lett.***, v. 110, p. 213-216.

TOKIWA, H. ; OHNISHI, Y. (1986) Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. ***Crit. Rev. Toxicol.***, v. 17, p. 23-60.

TONDO, E.C. (1995) ***Biodegradação aeróbica de 4,5,6-tricloroguaiacole e avaliação da presença de ADN plasmidial em bactérias degradadoras***. F. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente, Porto Alegre, 1995.

VOET, D. ; VIET, J.G. ; PRATT, C.W. (2000). ***Fundamentos de bioquímica***. Porto Alegre : Artes Médica Sul. 931 p.

WACKETT, L.P. (1997) Biodegradation of Halogenated Solvents. In: HURST. C. J.; KNUDSEN, G. R.; McINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. (Eds.) ***Manual of Environmental Microbiology***, ASM Press, cap. 86, p. 784-789.

WANG, A. ; BAND, R.N. ; KOPACHIK, W. (1995). Effects of trifluralin on growth and differentiation of the amoeba-flagellate Naegleria. ***Femes Microbiology Letters***, Amsterdam, v. 127, p. 99-103.

WARE, G.W. (1980) Effects of pesticides on nontarget organisms. **Residue Reviews**, New York, v. 76, p. 173-201.

WHYTE, L. Get al. (1999) Bioremediation assessment of hydrocarbon-contaminated Soils from the high artic. **Bioremediation Journal**, v. 3, n. 1, p. 69-79.

WHYTE, L. ; W.G. ; BOURBONNIÈRE, L. ; GREER, C.W. (1997) Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic pseudomonas strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 9, p. 3719-3723.

YARDEN, O.; SALOMON, R. ; KATAN, J.; AHARONSON, N. (1990) Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole compounds in soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v.36, p. 15-23.

ZEYER, J.; KEARNEY, P.C. (1983) Microbial dealkylation of trifluralin in pure culture. **Pesticide Biochem. Physiol.** , San Diego, v. 20, p. 10-18.