

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CATANIA

FACOLTA' DI AGRARIA

**Dipartimento di Scienze Agronomiche, Agrochimiche e delle Produzioni
animali**

Sezione di Scienze Agronomiche

Dottorato di Ricerca in Chimica Agraria ed Ecocompatibilità

XXIV ciclo

Dottorando: ANGELO MALVUCCIO

**INDAGINI SULL' EFFETTO DELL' ACIDO NAFTALENE ACETICO E
DELL' IMIDACLOPRID SULLA MICROFLORA TELLURICA**

Tesi di Dottorato

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Mara Gennari

Tutore:

Chiar.mo Prof. Mara Gennari

TRIENNIO 2009-2011

INDICE

PARTE GENERALE

1. INTRODUZIONE	pag.5
2. STRUTTURA DEL SUOLO	pag.5
3. INQUINAMENTO DEL SUOLO	pag.7
3.1 Mobilità degli inquinanti	pag.10
4. I MICRORGANISMI DEL SUOLO	pag.13
4.1 I funghi	pag.15
4.2. Le alghe	pag.16
4.3. I protozoi	pag.16
4.4. I batteri	pag.17
<i>4.4.1. I batteri del suolo superficiale</i>	pag.19
<i>4.4.2. I batteri del sottosuolo</i>	pag.21
<i>4.4.3. Stato metabolico dei batteri nel suolo</i>	pag.23
5. FATTORI CHE INFLUENZANO I MICRORGANISMI DEL SUOLO	pag.25
6. EFFETTO DEGLI INQUINANTI SUI MICRORGANISMI DEL SUOLO	pag.29
7. EFFETTO DEI FITOFARMACI SUI MICRORGANISMI DEL SUOLO	pag.32
8. EFFETTO DEI FITOFARMACI SUGLI ENZIMI DEL SUOLO	pag.34
8.1 Deidrogenasi	pag.34
8.2. Catalasi	pag.37
8.3 Fosfatasi	pag.37
9. MECCANISMI DI TRASFORMAZIONE MICROBICA DEI FITOFARMACI	pag.38
9.1. Biodegradazione (mineralizzazione)	pag.39
9.2. Cometabolismo	pag.40
9.3. Coniugazione e polimerizzazione	pag.41
9.4. Accumulo microbico	pag.41
9.5. Reazioni biochimiche del metabolismo dei fitofarmaci	pag.42
<i>9.5.1. Ossidazione</i>	pag.44

9.5.2. Idrossilazione	pag.44
9.5.3. N-Dealchilazione	pag.45
9.5.4. β – Ossidazione	pag.45
9.5.5. Solfossidazione	pag.46
9.5.6. Decarbossilazione	pag.46
9.5.7. Rottura di legami di eterificazione	pag.47
9.5.8. Rottura di anelli aromatici ed eterociclici	pag.48
9.5.9. Epossidazione	pag.49
9.5.10. Copulazione ossidativa	pag.49
9.5.11. Riduzione	pag.50
9.5.12. Idrolisi	pag.51
9.5.13. Sintesi	pag.52

PARTE SPERIMENTALE

10. SCOPO DEL LAVORO	pag.53
11. MATERIALI E METODI	
11.1. Descrizione dell'acido 1-naftalene acetico	pag.54
<i>11.1.1. Caratteristiche chimico-fisiche del NAA</i>	pag.56
11.2. Descrizione dell'imidacloprid	pag.57
<i>11.2.1. Caratteristiche chimico-fisiche dell'imidacloprid</i>	pag.60
11.3. Descrizione del suolo	pag.61
11.4. Determinazione della cinetica di degradazione del NAA nel suolo	pag.61
11.5. Determinazione della velocità di degradazione dell'NAA e dell'imidacloprid in seguito ad applicazioni successive.	pag.62
11.6. Determinazione delle isoterme di adsorbimento	pag.62
11.7. Procedure di analisi	pag.63
11.8. Estrazione del DNA	pag.64
11.9. Amplificazione del DNA mediante Polymerase Chain Reaction (PCR)	pag.64
11.10. Gel elettroforesi in gradiente denaturante (DGGE)	pag.66

12. RISULTATI E DISCUSSIONE

12.1. Cinetica di degradazione del NAA nel suolo	pag.67
12.2. Degradazione del NAA nel suolo dopo applicazioni ripetute	pag.68
12.3. Isotherma di adsorbimento del NAA	pag.69
12.4. Analisi DGGE della comunità eubatterica dopo trattamento con NAA	pag.70
12.5. Isotherma di adsorbimento dell'imidacloprid	pag.75
12.6. Degradazione dell'imidacloprid nel suolo dopo applicazioni ripetute	pag.77
12.7. Analisi DGGE della comunità eubatterica dopo trattamento con imidacloprid	pag.80

BIBLIOGRAFIA

pag.84

1. INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, presso l'opinione pubblica, è aumentata la percezione del grave problema rappresentato dall'inquinamento ambientale. Un inquinamento, sempre più grave e diffuso, determinato dalle attività umane, cresciute in maniera esponenziale negli ultimi decenni, con conseguente sfruttamento delle risorse rinnovabili e non rinnovabili del pianeta e con l'impatto sempre meno sostenibile dell'inquinamento a tutti i livelli (aria, acqua e suolo). Tra i vari sistemi ambientali coinvolti in questo massivo inquinamento, il suolo è sicuramente tra i più interessati.

2. STRUTTURA DEL SUOLO

Il suolo è un sistema poroso costituito dalle fasi liquida, gassosa e solida derivanti dalla presenza di acqua (25-35% v/v), aria (15-22% v/v), struttura minerale (50-60% v/v) e sostanza organica (0,5% v/v) (White, 1982).

La struttura del suolo controlla la distribuzione dell'acqua, dell'ossigeno e delle sostanze nutritive, determinando la zona di bioattività.

Generalmente nei terreni più compatti, ad esempio quelli dove prevalgono particelle fini, come l'argilla ed il limo, i nutrienti sono trasportati più lentamente; al contrario, nei terreni più permeabili, quali quelli formati da sabbie e ghiaie, il trasporto di queste sostanze è più facile.

Sulla base della permeabilità e della capacità che il suolo ha di ritenere l'acqua, il suolo

si può suddividere in cinque zone.

a) zona superficiale, insatura e trofica, ricca di humus e di materia organica in decomposizione.

b) zona insatura, o vadosa. E' la porzione del suolo in cui i pori non sono completamente saturi di acqua. Essa giace tra la zona superficiale e la zona satura. In questo strato, l'acqua si muove principalmente per percolamento. Si tratta di un ambiente oligotrofico che presenta una bassa concentrazione di carbonio organico (generalmente $< 0,1\%$), di azoto e fosforo. Il suo spessore varia considerevolmente: quando la zona satura è poco profonda, o comunque più vicina alla superficie, la zona insatura risulta sottile o talvolta inesistente, come nelle terre sommerse (paludi). Al contrario, ci sono molte aree del mondo, aride o semiaride, in cui la zona insatura può essere spessa diverse centinaia di metri.

c) zona capillare. E' il limite di separazione tra zona vadosa e zona satura, in cui il fenomeno dominante è appunto la capillarità. Non ha uno spessore definito, poiché il livello dell'acqua può variare a seconda degli eventi meteorologici.

d) zona satura, si trova subito sotto la frangia capillare. È composta da materiale poroso completamente saturato d'acqua. Rappresenta il corpo idrologico vero e proprio, in cui l'acqua può "scorrere" secondo la conducibilità idraulica che caratterizza lo strato. È un ambiente oligotrofico.

e) base della falda è definita come uno strato impermeabile al di sotto della zona satura.

3. INQUINAMENTO DEL SUOLO

Gli agenti di contaminazione del suolo possono essere organici ed inorganici. Tra le classi di inquinanti organici di maggiore importanza si ricordano: composti cloroalifatici (come il tricloroetilene, forse l'inquinante più diffuso tra i solventi industriali, molto stabile, tossico, cancerogeno), idrocarburi policiclici aromatici (IPA, notoriamente cancerogeni), cloroaromatici (per esempio i PCB, policlorobifenili, tra cui la diossina), aromatici volatili (indicati con la sigla BTEX, Benzene Toluene Etilbenzene Xilene), alifatici volatili (derivati del petrolio, non fra i più tossici), fenolici e azotati. Sono considerati contaminanti organici anche la maggior parte dei fitofarmaci. Queste sostanze vengono impiegate in agricoltura per aumentare le rese di produzione o per preservare i prodotti durante le fasi dell'immagazzinamento e della distribuzione commerciale (Foschi et al., 1985). I fitofarmaci vengono introdotti nell'ambiente mediante trattamenti agricoli, utilizzazioni domestiche ed attività industriali; la loro immissione avviene sotto forma gassosa, liquida o come polveri solubili. In base agli organismi bersaglio, questi prodotti vengono distinti in erbicidi, fungicidi, insetticidi, etc. Nell'ambito di ciascun gruppo di fitofarmaci è possibile un'ulteriore classificazione in base alla natura chimica dei composti (ditiocarbammati, tioftalimmidi, benzimidazoli, dicarbossimidi, etc). Oggi sono disponibili oltre 500 prodotti attivi con più di 55.000 formulati commerciali (Viggiani, 1994).

Se da un lato queste sostanze hanno contribuito, dal dopoguerra ad oggi, al contenimento delle perdite di produzione ed all'ottenimento di prodotti di migliore qualità, dall'altro un loro uso prolungato è stato causa di molti effetti negativi.

Sempre più evidenti, infatti, risultano i danni per la salute e per l'ambiente sia in termini di accumulo di residui tossici e cancerogeni nel tessuto adiposo di uomini e animali, che di avvelenamento dei suoli, delle acque sotterranee e di superficie. Inoltre, con il passare del tempo, sono stati osservati anche fenomeni di resistenza dei parassiti agli stessi fitofarmaci.

I rischi per gli uomini e gli animali derivanti dal contatto o l'assunzione di questi prodotti di sintesi sono molteplici e di varia natura.

La penetrazione nell'organismo dei fitofarmaci può avvenire attraverso la pelle, l'apparato digerente o l'apparato respiratorio e può causare conseguenze pressoché immediate (effetti acuti) o anche molto ritardate nel tempo (effetti cronici). L'intossicazione acuta si manifesta con irritazioni cutanee, nausea, disturbi alla visione ed altri squilibri del sistema nervoso; nei casi più gravi può portare anche alla morte.

Riguardo agli inquinanti inorganici nei terreni, invece, questi si identificano sostanzialmente con i metalli pesanti. Essi sono naturalmente presenti nelle rocce, nel suolo e nelle piante ma, negli ultimi decenni, l'inquinamento ad opera di tali elementi è diventato uno dei maggiori problemi ambientali nei paesi industrializzati ed in via di sviluppo in quanto responsabili di gravi effetti sulla salute umana e sull'ambiente.

I metalli pesanti, così come altri elementi tossici, possono essere dispersi nell'ambiente direttamente dall'industria durante alcuni processi produttivi (industrie minerarie che li estraggono dal sottosuolo), oppure dal consumatore quando utilizza prodotti che li contengono (ad esempio vernici, pneumatici, combustibili, etc). Tra i metalli pesanti cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), rame (Cu) presente in alcuni

fitofarmaci inorganici, mercurio (Hg), manganese (Mn), nichel (Ni), piombo (Pb), zinco (Zn), molibdeno (Mo) e stagno (Sn) sono considerati i più importanti inquinanti del suolo. Ad essi vanno aggiunti anche alcuni metalloidi quali arsenico (As), bismuto (Bi) e selenio (Se). Essi, infatti, sono molto diffusi, tossici e persistenti, ovvero hanno la caratteristica di rimanere in circolo nell'ambiente (ad es. attraverso la catena alimentare) per molto tempo.

E' stato stimato che dalla fine del XIX secolo ad oggi le concentrazioni di Pb, Zn, Cd e Cu siano aumentate anche del 10% negli strati superficiali del suolo (Renella, 2004).

Questi elementi, assieme ad As, Cr, Hg e Ni possono essere ritenuti i più diffusi come inquinanti; il Mn, peraltro relativamente abbondante nel terreno in condizioni naturali, è un agente di contaminazione abbastanza diffuso (Radaelli e Calamai, 2001).

Alcuni metalli pesanti, però, risultano importanti per la vita dei microrganismi (Weast, 1984). Ferro (Fe), Cu, Zn, Cr, Mn, Ni e Co hanno, ad esempio, un importante ruolo fisiologico: in piccole concentrazioni sono essenziali per animali e piante ma, ad elevate concentrazioni, possono dar luogo a fenomeni di tossicità per gli organismi viventi ostacolando lo svolgimento di determinate funzioni vitali della cellula, non essendo gli organismi spesso in grado di eliminarli dal loro interno.

Gli effetti nocivi sulla salute dell'uomo sono strettamente legati alla natura chimica del contaminante, la modalità di esposizione, la quantità di contaminante presente, la durata dell'esposizione e fattori genetici individuali.

L'esposizione a molti dei contaminanti menzionati può essere causa di un aumento dell'incidenza di tumori, danni a reni, fegato e sistema nervoso centrale.

3.1 Mobilità degli inquinanti

Gli inquinanti rilasciati nel suolo vanno incontro a una serie di fenomeni di migrazione, trasformazione e ripartizione tra le varie fasi del suolo stesso (gassosa, liquida e solida); fenomeni che determinano sia l'estensione spaziale e temporale della contaminazione, sia la possibilità che i contaminanti vengano in contatto con l'uomo e con gli altri organismi viventi. La comprensione di tali fenomeni è di essenziale importanza al fine di avere un quadro più completo della distribuzione degli inquinanti e una valutazione più corretta del rischio ambientale che deriva dalla loro presenza.

I fenomeni di trasporto e trasformazione (il "fato" degli inquinanti) sono in genere complessi e dipendono sia dalle proprietà chimico-fisiche delle sostanze coinvolte nell'inquinamento, sia dalle caratteristiche geologiche, idro-geologiche ed ecologiche del sito.

La situazione è particolarmente complicata quando gli inquinanti sono costituiti da miscele complesse e poco idrosolubili, come i prodotti petroliferi, che, insieme all'acqua e agli altri componenti del suolo, costituiscono un sistema a molte fasi e molte componenti.

Quando il contaminante in fase liquida penetra nel sottosuolo tende a drenare negli

strati sottostanti, spiazzando l'aria e l'acqua interstiziale, ed è soggetto ad una serie di fenomeni concomitanti: evaporazione e diffusione in fase di vapore, solubilizzazione in acqua, diffusione ed adsorbimento nella matrice solida del suolo e degradazione microbica. Tali fattori determinano così l'inquinamento del suolo, del sottosuolo, dei sedimenti, delle acque superficiali e profonde e dell'atmosfera con sostanze chimiche pericolose e tossiche (Ronchi, 2002; Bonomo et al., 2005).

La migrazione degli inquinanti è regolata da due tipi di fenomeni concomitanti (Davini et al., 2001):

- macroscopici: processi regolati dalle leggi della dinamica dei fluidi, quali scorrimento, percolazione, adesione al terreno e capillarità;
- microscopici: fenomeni governati dagli equilibri termodinamici, come diffusione, ripartizione tra le fasi, dissoluzione, precipitazione, evaporazione, condensazione, adsorbimento, desorbimento e reazioni chimiche.

In Fig. 1. vengono mostrate, in forma schematica, le principali vie di migrazione percorribili da un inquinante idrocarburico una volta sversato sulla superficie del suolo (Grillo, 2001).

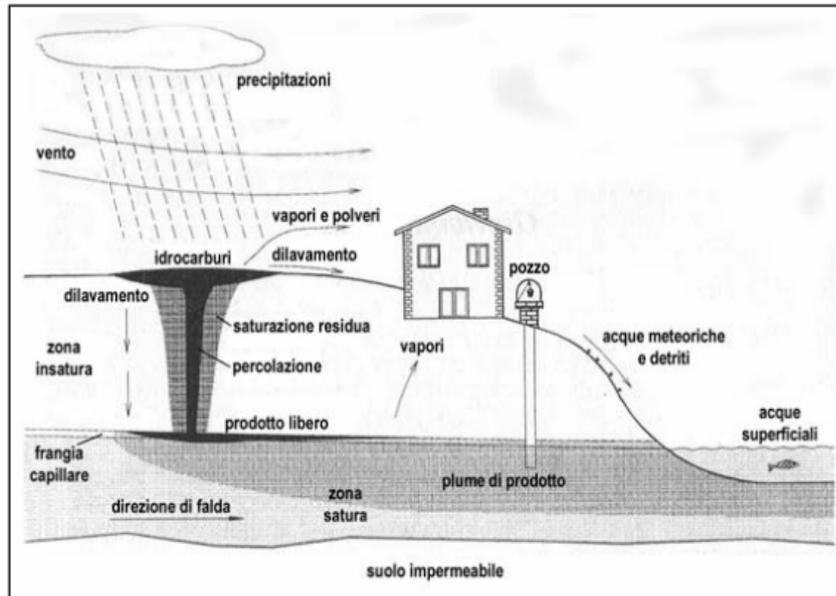


Fig. 1. Distribuzione degli idrocarburi nei sistemi idrici.

In generale, le sostanze inquinanti possono:

- a) diffondersi dal luogo del rilascio muovendosi in superficie con l'acqua piovana, disciolte in essa o trascinate insieme ai detriti;
- b) liberarsi nell'atmosfera, per volatilizzazione diretta o portate dal vento con la polvere;
- c) ritrovarsi nel sottosuolo, dilavate dall'acqua piovana o, se in forma fluida, percolando direttamente verso il basso;
- d) contaminare la falda acquifera, per dilavamento e percolazione.

4. I MICRORGANISMI DEL SUOLO

Il suolo è abitato da popolazioni indigene (autoctone) di batteri, funghi, alghe e protozoi. Sono inoltre presenti fagi o virus che sono in grado di infettare ciascuna di queste classi di organismi, ma le informazioni a riguardo sono ancora limitate (Maier e Pepper, 1995). Oltre alle popolazioni indigene possiamo trovare microrganismi introdotti con l'attività umana (agenti di controllo biologico o agenti biodegradativi) od animale (escrementi).

In generale le colonie microbiche non si distribuiscono uniformemente sulle particelle del terreno. La disponibilità di micronutrienti e di matrice organica, condizionano primariamente la crescita dei microrganismi, e differisce in modo particolare tra l'ambiente superficiale ed il sottosuolo. Tale differenza si riflette in una più alta e più uniforme distribuzione del numero e delle attività dei microrganismi nel suolo superficiale. La maggior parte dei microrganismi si riuniscono a formare degli aggregati, infatti circa l'80-90% delle cellule si adsorbono alla matrice solida mentre le restanti sono libere nel mezzo poroso. La formazione di aggregati e di colonie conferisce notevoli vantaggi ai microrganismi: li protegge dalla predazione da parte dei protozoi; aiuta a concentrare localmente i nutrienti presenti ed a favorire il loro ricircolo; consente di modificare l'ambiente immediatamente circostante le colonie, ottimizzando le condizioni di crescita, attraverso la variazione di fattori come ad esempio il pH.

Le cellule in forma libera sono dunque meno frequenti ma rappresentano un importante meccanismo di dispersione dei microrganismi. Quando le riserve di nutrienti, in un particolare punto della superficie del mezzo poroso, si esauriscono, i microrganismi necessitano di un meccanismo attraverso cui raggiungere nuovi siti in grado di

soddisfare le loro esigenze nutrizionali. I funghi lo fanno attraverso la produzione di spore rilasciate dai corpi fruttiferi o mediante l'estensione delle ife. Un meccanismo di dispersione analogo è stato evoluto anche dagli actinomiceti (batteri) che producono anch'essi esospore. Alcuni batteri utilizzano invece un differente meccanismo noto come rilascio di cellule figlie free-living. Infatti è noto che le cellule presenti sulla superficie della colonia, subiscono dei cambiamenti nella composizione dello strato superficiale che causa il rilascio di cellule figlie neo-formate. Quando tali cellule free-living crescono, la loro superficie subisce delle variazioni nella composizione chimica che permettono l'adesione ad un nuovo sito caratterizzato da più favorevoli condizioni ambientali.

Il numero di microrganismi coltivabili dello strato superficiale del suolo può raggiungere il valore di 10^8 CFU (unità formanti colonia) per grammo di suolo secco, tale valore aumenta di uno o due ordini di grandezza se ottenuto con la tecnica della conta diretta. La differenza tra conta diretta e conta dei coltivabili è maggiore nel sottosuolo, per la presenza di un maggior numero di batteri vitali, ma non coltivabili: tali microrganismi, trovandosi in condizioni ambientali sfavorevoli a causa della carenza di sostanze nutrienti e del basso contenuto di substrato organico, vivono in uno stato di stress e possono subire danni subletali. I microrganismi perdono quindi la capacità di crescere nei comuni terreni di coltura secondo metodi convenzionali. E' noto infatti che il 99% dei microrganismi del suolo non siano coltivabili (Roszak e Colwell, 1987).

I microrganismi possono rilasciare gli enzimi nel suolo. Gli enzimi hanno la capacità di catalizzare le reazioni di ossidazione di una varietà di idrocarburi differenti, e alcuni di essi sono caratterizzati da un'ampia specificità di substrato (Gibson e Yeh, 1973).

L'attività degli enzimi nel suolo è la somma dell'attività di tutti gli enzimi accumulati. L'attività dell'enzima nativo è il risultato di molti processi che conducono alla combinazione parziale degli enzimi prodotti localmente nell'ambiente suolo. In altre parole, questi enzimi sono immobilizzati sulla superficie delle particelle del terreno (McLaren, 1975).

4.1 I funghi

I funghi sono microrganismi eucarioti non fototrofi provvisti di pareti cellulari rigide, si distinguono in lieviti e muffe. Tutti i funghi sono eterotrofi e si nutrono mediante l'assorbimento di molecole organiche disciolte. Alcuni funghi sono decompositori, e sono in grado di digerire macromolecole complesse e di trasformarle in molecole più piccole. I funghi miceliari aerobi sono abbondanti sulla superficie del suolo. Il loro numero è generalmente compreso tra 10^5 e 10^6 /g di suolo. Analogamente agli attinomiceti, i funghi svolgono un ruolo importante nella decomposizione di polimeri organici semplici e complessi (come la cellulosa e la lignina), alcuni funghi sono anche capaci di degradare sostanze inquinanti. La loro capacità di degradazione aumenta con l'abbassarsi del pH, in quanto, a differenza degli attinomiceti, preferiscono un ambiente acido. Tra i generi maggiormente rappresentati ed attivi nel terreno vi sono: *Mucor*, *Phyhiium*, *Fusarium*, *Tricoderma*, *Penicillium* (produttori di antibiotici), *Aspergillus* (demolitori dei tannini). I lieviti, anaerobi facoltativi, sono in numero inferiore rispetto ai funghi miceliari, pari a circa 10^3 cellule/g di suolo. Poiché si nutrono di materia organica, li troviamo soprattutto negli strati superficiali, mentre il loro numero decresce

rapidamente con l'aumentare della profondità.

4.2. Le alghe

Le alghe sono microrganismi eucarioti fototrofi, tuttavia a maggiori profondità esistono anche alghe capaci di crescere sia autotroficamente che eterotroficamente (alghe verdi e diatomee). La maggior parte si trova comunque nei primi 10 cm di suolo, in numero pari a circa 5.000 – 10.000 cellule/g di suolo. La popolazione algale del suolo presenta delle variazioni stagionali che prevedono un aumento del loro numero in primavera ed in estate. Le alghe sono spesso i primi colonizzatori di un suolo, ed il loro metabolismo è critico per la sua formazione. Infatti il loro metabolismo produce acidi carbonici che favoriscono la degradazione delle particelle minerali circostanti ed inoltre producono una grande quantità di polisaccaridi extracellulari che partecipano alla formazione del suolo, favorendo l'aggregazione delle particelle.

4.3. I protozoi

I protozoi sono microrganismi eucarioti unicellulari non fototrofi privi di parete cellulare. Principalmente rappresentati da flagellati, presenti in maggior numero (amebe e ciliati), sono i predatori di tutti gli altri microrganismi. A causa delle loro dimensioni e della grande richiesta di microrganismi come fonte alimentare, si ritrovano soprattutto ad una profondità di 15–20 cm, prevalentemente nella rizosfera densamente popolata da batteri.

I protozoi sono abbastanza numerosi, si trovano in numero di circa 30.000 cellule/g di suolo in terreni incolti, 350.000 cellule/g di suolo in campi coltivati a mais e $1,6 \times 10^6$ cellule/g di suolo nelle aree subtropicali.

4.4. I batteri

I batteri sono microrganismi procariotici, che possono essere classificati in diversi modi, ciascuno in funzione dei differenti aspetti del processo metabolico. A livello di fonti di carbonio possono essere distinti in autotrofi o eterotrofi: gli eterotrofi utilizzano uno o più composti organici come fonte di carbonio, mentre gli autotrofi utilizzano la CO_2 . Parallelamente i batteri sono raggruppati in funzione della sorgente di energia: chemiotrofi, ottengono energia dall'ossidazione di sostanze chimiche, e fototrofi i quali ricavano la loro energia dalla luce (Pelczar et al., 1986). Alcuni batteri possono ottenere energia solo in presenza di ossigeno, e sono chiamati quindi aerobi, altri solo in assenza di ossigeno, anaerobi; altri ancora possono ottenere energia sia in presenza di ossigeno che in sua assenza, aerobi facoltativi.

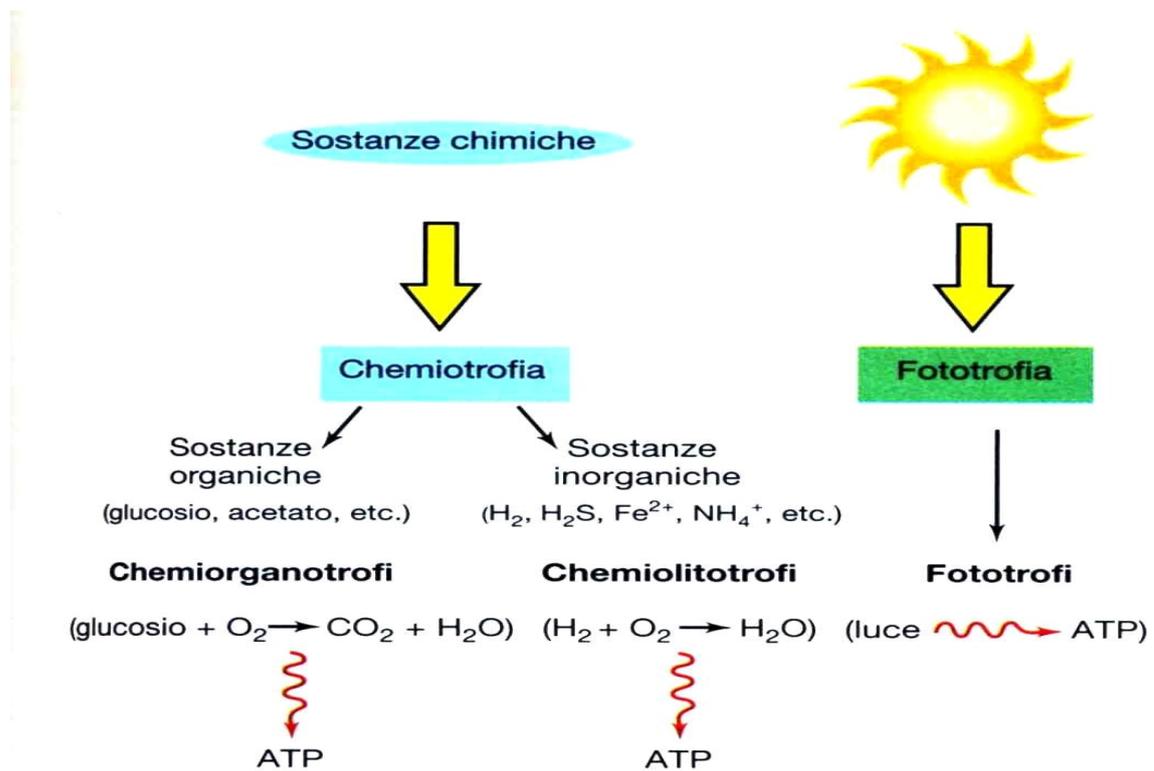


Figura 2. Opzioni metaboliche per ottenere energia

I batteri eterotrofi sono gli organismi più importanti per la trasformazione dei composti organici, per questo motivo essi possono essere utilizzati nel trattamento di composti inquinanti, processo definito "biorisanamento" (bioremediation). Lo scopo delle tecniche di biorisanamento è di aumentare l'attività microbica. I batteri possono essere classificati in due gruppi, i Gram positivi e i Gram negativi in funzione della composizione e della struttura della loro parete cellulare. I batteri Gram positivi hanno una parete cellulare di peptidoglicano spessa ed una volta colorati con la tecnica di colorazione di Gram (introdotta da Christian Gram nel 1884 per poter distinguere i batteri Gram positivi dai Gram negativi utilizzando una serie di reagenti di colorazione), appaiono blu scuri o

viola. I batteri Gram negativi hanno una parete cellulare più complessa per la presenza di una membrana esterna che circonda quella esterna di peptidoglicani. Con la colorazione di Gram, si presentano di colore rosa.

4.4.1. I batteri del suolo superficiale

I batteri sono i microrganismi più numerosi sulla superficie terrestre. Si stima che le specie batteriche costituenti la comunità del suolo, possano raggiungere il numero di 10.000 (Turco e Sadowsky, 1995). Il titolo vitale, variabile in funzione delle condizioni ambientali come composizione del suolo e temperatura, varia tra 10^7 e 10^8 cellule/g di suolo, mentre la popolazione totale può superare le 10^{10} cellule/g di suolo. Generalmente i batteri aerobi superano di due o tre ordini di grandezza quelli anaerobi, mentre la popolazione anaerobica cresce logicamente con l'aumentare della profondità del suolo. Tra i generi più rappresentati vi sono *Pseudomonas* e *Agrobacterium* ed in quantità molto inferiore i generi *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Nitrosomonas*, *Nitrobacter*.

Gli attinomiceti sono i microrganismi coltivabili più abbondantemente presenti nel suolo. Il loro numero è generalmente uno o due ordini di grandezza più piccolo rispetto alla popolazione batterica totale. Gli attinomiceti sono batteri Gram positivi, solitamente immobili (solo le spore possono essere flagellate), essenzialmente aerobi, capaci di formare miceli ramificati e spore. Gli attinomiceti sono un'importante componente della popolazione batterica, specialmente in condizioni di elevato pH, elevate temperature o stress idrico. Essi rivestono una notevole importanza nel processo di mineralizzazione del materiale organico, essendo in grado di disgregare una grande varietà di composti

organici. Essi attaccano le proteine degradate e gli aminoacidi, con produzione di ammoniaca.

Nel suolo tra i generi più rappresentati vi sono *Nocardia* e *Rhodococcus*, attinomiceti nocardiformi, e *Streptomyces*. Le nocardie partecipano al processo di degradazione degli idrocarburi e delle cere e contribuiscono al biodeterioramento delle giunture di gomma nelle condutture idriche e di scolo. Sia il genere *Nocardia* che *Rhodococcus* sono inoltre accomunati dalla presenza di acidi micolici nella parete.

Il genere *Streptomyces* comprende centinaia di specie anche se il loro numero si sta riducendo con il progredire delle conoscenze tassonomiche. Sono strettamente aerobi, formano catene di spore immobili, racchiuse all'interno di un rivestimento fibroso, spesso pigmentati e con struttura liscia, irsuta o spinosa. Nel suolo rappresentano l'1-20% della popolazione microbica coltivabile e sono responsabili della produzione di sostanze volatili come la geosmina a cui si deve l'odore della terra umida. Questi batteri svolgono un ruolo primario nella degradazione e mineralizzazione di sostanze resistenti come la lignina, la pectina, la chitina, la cheratina, il lattice ed i composti aromatici. Sono inoltre noti per la capacità di sintetizzare una grande quantità di antibiotici. Altri gruppi presenti nel suolo annoverano i batteri corineformi, anch'essi inclusi fra gli attinomiceti e gli sporigeni aerobi tra cui il genere *Bacillus*.

La distribuzione dei batteri è funzione della disponibilità di nutrienti. Inoltre risultano di primaria importanza la granulometria e la struttura del suolo: in funzione della tessitura infatti, i microrganismi si localizzano diversamente tra i pori dei microaggregati e, dopo avervi aderito, iniziano a moltiplicarsi. E' importante tener presente che le dimensioni

dei pori controllano il flusso dell'acqua: i pori più larghi drenano più rapidamente rispetto a quelli di minor diametro, quindi la parte interna di questi ultimi mantiene un più elevato tasso di umidità, risultando maggiormente adatta allo sviluppo dei microrganismi. Questo giustifica il motivo per cui i batteri Gram-positivi, che sono meglio adattati a condizioni di disidratazione, tendono ad occupare la parte esterna dei microaggregati, mentre i batteri Gram-negativi si localizzano preferenzialmente nella parte più interna.

4.4.2. I batteri del sottosuolo

Lo studio delle comunità microbiche che popolano il sottosuolo è relativamente recente, a causa della mancanza, prima degli anni '80, di tecniche che potessero garantire prelievi sterili. Per questo abbiamo ancora poche informazioni sui microrganismi che popolano questo ambiente e sui loro metabolismi (Maier e Pepper, 1995). E' stato comunque recentemente dimostrato che sedimenti e rocce della zona vadosa sono ampiamente popolate da microrganismi vitali (Kieft, 1999). Per analizzare a fondo la distribuzione dei microrganismi in tale comparto si deve tener presente la suddivisione in strati del suolo.

Nel sottosuolo poco profondo, le zone più ricche d'acqua sono senza dubbio le più popolate, con un numero relativamente alto di batteri (titolo totale pari a 10^5 - 10^7 cellule/g di suolo). Gran parte della popolazione è costituita da batteri Gram-positivi (soprattutto *Streptomiceti*) aerobi ed eterotrofi, pur essendo presenti anche batteri anaerobi ed autotrofi.

Batteri isolati dal sottosuolo si sono dimostrati capaci di degradare substrati semplici come il glucosio, così come substrati complessi quali composti aromatici, surfattanti e fitofarmaci.

Queste caratteristiche fanno ritenere che i microrganismi del sottosuolo possano essere utilizzati per decontaminare *in situ* zone inquinate da una grande varietà di composti organici. Nella zona vadosa, il titolo totale si mantiene alto e decresce solo di un ordine di grandezza rispetto a quello superficiale. Diversamente la conta vitale decresce di quattro ordini di grandezza/g di suolo. Nella zona insatura l'acqua si presenta in forma di sottile e discontinuo film che forma un menisco concavo nelle fessure tra le particelle. La natura discontinua di questo film d'acqua limita il movimento dei nutrienti dissolti e quello dei microrganismi che è primariamente controllato da fenomeni di diffusione. La zona vadosa presenta normalmente un'elevata umidità, quindi i batteri non sono soggetti a fenomeni di disidratazione. Vista la bassa concentrazione di materia organica e la bassa velocità di diffusione dei nutrienti, i microrganismi presentano una bassa attività metabolica, condizione che può perdurare a lungo. Nella zona satura profonda è presente una grande varietà di microrganismi ed un numero totale che si aggira tra 10^6 e 10^7 cellule/g sedimento.

Le tipologie più rappresentate includono aerobi e anaerobi facoltativi, denitrificanti, nitrificanti, metanogeni, solfato-riduttori. Sono presenti anche alcuni ciano batteri (oltre a funghi e protozoi). Questi microrganismi sono in grado di metabolizzare zuccheri semplici, acidi organici, polimeri complessi come acido β -idrossibutirrico ed alcuni surfattanti come Tween 40 e Tween 80.

Nel sottosuolo si osserva un elevato incremento del numero dei microrganismi negli strati con un'alta quantità di materia organica residua (paleosol) ed in aree contaminate da inquinanti organici o che hanno subito un arricchimento artificiale mediante aggiunta di nutrienti. A dispetto del basso numero e della bassa attività metabolica *in situ* dei microrganismi presenti nella zona vadosa, questi possono giocare un ruolo importante nel biorecupero del sottosuolo contaminato, nella mobilizzazione o immobilizzazione di contaminanti organici ed inorganici sversati nel suolo, nei cicli biogeochimici.

4.4.3. Stato metabolico dei batteri nel suolo

Tutte le cellule richiedono energia, essa può essere ottenuta in tre diversi modi: dai composti chimici di natura organica, da quelli di natura inorganica o dalla luce (Madigan et al., 2003). La grande biodiversità caratteristica del suolo è dovuta alle differenti esigenze nutrizionali dei microrganismi ed alle diverse modalità di utilizzo dei substrati organici e dei nutrienti come donatori e accettori finali di elettroni. Infatti, i composti organici ed inorganici possono essere metabolizzati nell'ambito di un ampio spettro di condizioni redox. Per questo motivo il suolo è considerato un ambiente altamente eterogeneo in cui convivono differenti tipi di organismi, ciascuno dei quali occupa un determinato habitat, e all'interno di questo, una specifica nicchia.

Normalmente nel suolo e nei sedimenti, materiali facilmente degradabili come gli zuccheri, sussistono solo transitoriamente, mentre i substrati più difficili da degradare (es. la lignina) persistono per lunghi periodi di tempo. In particolare, le sostanze umiche (che sono componenti stabili della materia organica) vengono degradati molto

lentamente con una velocità pari al 2-5% per anno. Nell'ambiente inoltre possono essere presenti fattori limitanti quali il potenziale redox, azoto e fosforo, che impediscono l'utilizzo di un substrato presente in grandi quantità.

L'unico momento in cui i batteri del suolo esprimono un'elevata attività metabolica è quando un nuovo substrato viene aggiunto al suolo (es. lettiera di foglie) o quando un determinato microrganismo diventa capace di utilizzare un substrato precedentemente non biodisponibile. In quest'ultimo caso una mutazione genetica o un trasferimento genico orizzontale determina l'espressione di un nuovo sistema enzimatico che consente la degradazione di un substrato precedentemente indegradabile. I microrganismi che esprimono questa nuova funzione, sono in grado di utilizzare il substrato con un'elevata velocità metabolica senza dover competere con altri organismi. Similmente viene espressa un'alta attività metabolica quando un microrganismo alloctono, con una specifica capacità degradativa, viene aggiunto o introdotto nell'ambiente allo scopo, ad esempio, di attivare la biodegradazione di un contaminante organico inquinante.

I composti organici presenti sulla Terra, che possono quindi essere usati dai microrganismi per ottenere energia, sono svariati. Tutti i composti organici naturali e perfino molti di quelli sintetici possono essere degradati da uno o più gruppi microbici. L'energia è quindi ottenuta per ossidazione dei composti e viene conservata all'interno della cellula sotto forma di molecole ad alta energia come l'adenosintrifosfato (ATP) (Madigan et al., 2003).

Nel suolo comunque, la maggior parte dei batteri si trova in condizioni di stress dovute alla competizione per i nutrienti disponibili. Tale stato di stress si manifesta con una

crescita sbilanciata, con la comparsa di morfologie meno definite e più tondeggianti, con danni subletali o letali. Lo stress abiotico può anche determinare la formazione di strutture di quiescenza come le endospore, nel caso del genere *Bacillus*.

5. FATTORI CHE INFLUENZANO I MICRORGANISMI DEL SUOLO

I microrganismi del suolo, dipendono interamente dal suolo stesso per la loro nutrizione, crescita ed attività. I fattori principali che influenzano le popolazioni microbiche sono: pratiche culturali, umidità, temperatura, aerazione, luce, pH, materia organica, natura del terreno ed associazioni microbiche.

Tutti questi fattori giocano un grande ruolo nel determinare non solo il numero ed il tipo di organismo, ma anche le loro attività. Variazioni di uno o più di questi fattori può portare a cambiamenti nell'attività degli organismi che alla fine influenzano il livello di fertilità del suolo.

Le pratiche colturali quali la coltivazione, la rotazione delle colture, l'applicazione di concimi e l'applicazione di fitofarmaci hanno sicuramente effetti sui microrganismi. Le operazioni di aratura facilitano l'aerazione, l'esposizione al sole e di conseguenza aumentano le attività dei microrganismi, in particolare dei batteri. La rotazione delle colture mantiene l'equilibrio favorevole alla popolazione microbica, in particolare la fissazione del N_2 da parte dei batteri. Anche l'uso di fertilizzanti, fornisce un approvvigionamento alimentare per microrganismi del suolo, invece l'applicazione fogliare o al suolo di diverse sostanze chimiche (fitosanitari), può portare alla

degradazione di queste sostanze da parte dei microrganismi oppure lasciare residui tossici nel terreno, che sono pericolosi perché causano una profonda riduzione della normale attività microbica del suolo.

L'umidità è uno dei fattori importanti che influenzano la popolazione microbica e la loro attività nel suolo. Infatti, l'acqua viene utilizzata dai microrganismi in due modi: come fonte di nutrienti e come solvente. Alcune ricerche hanno visto che la maggior parte delle comunità microbiche del terreno vengono inattivate dal disseccamento del suolo e solo le forme più resistenti sono in grado di sopravvivere (Florenzano, 1983). Lo stesso autore (Florenzano, 1983) ha visto che un terreno secco conservato per 10 anni subisce una riduzione della componente microbica di 100 volte e la sopravvivenza dei microrganismi rimanenti dipende dalla presenza di strutture resistenti oppure di residui di acqua osmotica od igroscopica. Inoltre, ha notato che la reidratazione del suolo secco non solo ripristina di nuovo il numero della componente microbica che era presente prima dell'essiccamento, ma addirittura la supera. Tutto ciò può essere spiegato dalla risolubilizzazione dei nutrienti nell'acqua; inoltre, l'essiccamento porta alla morte di alcuni microrganismi che poi diventano fonte alimentare per quelli superstiti. Anche l'eccesso di umidità è un fattore limitante, perché causa una mancanza di aerazione portando così alla soppressione dei microrganismi aerobi ed allo sviluppo di quelli anaerobi. Le condizioni ottimali di umidità sono compresi tra il 20 ed il 60%.

Anche la temperatura è un fattore in grado di influenzare la popolazione microbica del suolo, in quanto le attività microbiche, aumentano con l'aumentare della temperatura, sebbene temperature troppo elevate possano diventare limitanti. Anche se i microrganismi sono in grado di tollerare temperature estreme, l'intervallo di temperatura

ottimale alla quale i microrganismi del suolo possono crescere ed effettuare le proprie funzioni, è piuttosto ristretto ed è compreso tra i 25 ed i 37°C (Florenzano, 1983). A seconda della temperatura alla quale i microrganismi possono crescere e funzionare, sono divisi in tre gruppi: psicrofili (crescono a bassa temperatura sotto i 10°C); mesofili (crescono bene nell'intervallo di temperatura compreso tra i 20°C ed i 45°C); termofili (crescono a temperature comprese tra i 45°C ed i 60°C). Le variazioni stagionali di temperatura del suolo influenzano la popolazione microbica e la loro attività, soprattutto nelle regioni temperate. In inverno, quando la temperatura è bassa, il numero e l'attività dei microrganismi diminuiscono, mentre in primavera quando il suolo si riscalda, aumentano il numero e le attività. In generale, le popolazioni e le attività dei microrganismi del suolo sono più alti in primavera e più bassi durante la stagione invernale.

Anche l'aerazione del suolo gioca un ruolo fondamentale, perché la presenza di ossigeno serve per le reazioni di ossido-riduzione nei processi microbici. Infatti, in presenza di questo gas i microrganismi attuano la respirazione aerobica, ma quando le concentrazioni sono basse vengono utilizzate altre molecole come accettori di elettroni (ad esempio lo zolfo, ferro, etc.) (Scow e Kate 2008.). Invece, la CO₂ influenza il pH del suolo e fornisce carbonio ai microrganismi autotrofi. A seconda delle esigenze di ossigeno, i microrganismi del suolo sono raggruppati in diverse categorie: aerobi (necessitano di ossigeno); anaerobi (non richiedono ossigeno) e micro-aerofili (richiedono bassa concentrazione/livello di ossigeno).

L'effetto della luce solare porta al riscaldamento e di conseguenza aumento della temperatura del suolo (più di 45°C). Quindi la parte superiore ad un centimetro dello

strato arabile è di solito povera di microrganismi.

Il pH influenza i microrganismi del suolo ed in particolare gli enzimi; l'attività di questi enzimi, oltre a dipendere da numerosi fattori dipende anche da valori ottimali di pH (Paul e Clark, 1996). Il pH ottimale per la maggior parte dei microrganismi è compreso tra 4 e 9, anche se ci sono microrganismi che possono vivere a range di pH diversi, come gli acidofili (pH compresi tra 1 e 6), acidofili estremi (tra 1 e 3), basofili (7,3 e 9,6), basofili estremi (pH intorno a 13).

Per quanto riguarda la materia organica nel suolo, essa è la fonte principale di energia e di cibo per la maggior parte degli organismi del terreno ed ha una grande influenza sulla popolazione microbica. La materia organica influenza la popolazione microbica e la sua attività anche indirettamente, condizionando la struttura del suolo. Alcuni studi hanno dimostrato l'importanza della tessitura e della struttura del suolo. Sessitsch et al. (2001) notarono che le dimensioni delle particelle del suolo, influenzano la distribuzione della comunità microbica. I risultati portarono a dimostrare che nelle frazioni granulometriche di minori dimensioni la diversità microbica era maggiore che nelle frazioni di maggiori dimensioni e che le comunità presentavano una elevata specificità per diverse classi granulometriche.

Le caratteristiche chimico-fisiche del suolo influenzano lo stato nutrizionale della popolazione microbica sia quantitativamente che qualitativamente. I terreni in buone condizioni fisiche hanno una migliore aerazione ed umidità che è essenziale per l'ottimale attività microbica. Allo stesso modo i nutrienti (macro e micro) ed i costituenti organici sono responsabili dell'assenza o della presenza di alcuni tipi di microrganismi e

la loro attività. Per esempio l'attività e la presenza di batteri che fissano l'azoto è fortemente influenzato dalla disponibilità di molibdeno e l'assenza di fosfati disponibili limita la crescita di *Azotobacter*.

Per quando riguarda le associazioni, i microrganismi interagiscono tra loro dando luogo ad interazioni antagoniste o simbiotiche che influenzano la loro attività. L'abitudine predatoria di alcuni protozoi e micobatteri può ridurre o eliminare alcune popolazioni batteriche. D'altra parte, le attività di alcuni microrganismi sono utili ad altri; per esempio, gli acidi organici liberati dai funghi, la produzione di ossigeno da parte delle alghe.

6. EFFETTO DEGLI INQUINANTI SUI MICRORGANISMI DEL SUOLO

Per inquinanti del suolo intendiamo tutte quelle sostanze inorganiche o organiche, che vengono immesse nel suolo e che alterano l'ambiente naturale dello stesso.

Le sostanze chimiche comunemente coinvolte sono: metalli pesanti, idrocarburi e fitofarmaci.

La contaminazione da metalli pesanti provoca un grave problema che è l'accumulo, perché non possono essere naturalmente degradati come avviene per gli inquinanti organici.

Questo causa profonde modifiche nello sviluppo e nelle attività dei microrganismi del suolo (Filip, 2002). Molti studi hanno dimostrato che i metalli pesanti influenzano i

microrganismi agendo in modo avverso sulla loro crescita, la morfologia e l'attività biochimica, portando solitamente ad una riduzione della biomassa (Sandaa et al., 2001). Esposizioni a breve ed a lungo termine a metalli pesanti risultano inoltre in riduzioni nell'attività e nella diversità delle comunità microbiche nei suoli (McGrath et al., 2001).

Per quanto riguarda i microrganismi nitrificanti (autotrofi), si ritiene che siano molto più suscettibili all'inibizione rispetto ai microrganismi responsabili dell'ossidazione di materiale carbonioso (eterotrofi). Studi recenti hanno mostrato la presenza di un forte effetto tossico di inibizione della biomassa autotrofa da parte dei metalli pesanti e vari composti organici, sulla base del confronto delle velocità di crescita della biomassa in condizioni normali ed inibenti. Tale effetto agisce sulla nitrificazione portando a riduzioni del 50% e talvolta anche maggiori (Juliastuti et al., 2003).

Sono stati valutati gli effetti a bassa (1 ppm) e alta (500-2000 ppm) concentrazione di piombo sulla comunità microbica del terreno studiando tramite PCR/DGGE il gene 16S e marcatori nirK, indicativi rispettivamente della comunità microbica generale e della comunità denitrificante. E' stato dimostrato che il Pb ha effetti rilevabili sulla diversità della comunità anche a bassa concentrazione. I dati preliminari ottenuti in questo studio suggeriscono che la comunità microbica denitrificante si adatta a concentrazioni elevate di Pb, selezionando forme di nitrato riduttasi resistenti al metallo (Sobolev e Begonia, 2008).

Muller et al. (2001), in uno studio sull'effetto a lungo termine dell'esposizione al mercurio sulla comunità microbica del suolo, notarono che le dimensioni della popolazione batterica veniva ridotta nel terreno più contaminato. Inoltre, la popolazione

batterica era strutturalmente meno diversificata e conteneva una porzione di forme più resistenti e a rapida crescita.

L'effetto del Cr (VI) sulla popolazione microbica del suolo determina nei primi giorni di esposizione una diminuzione del numero dei batteri eterotrofi coltivabili ma a lungo termine il loro numero aumenta fino ad essere superiore rispetto a quelli iniziali.

Tale risultato può essere spiegato considerando che la sostanza organica, rilasciata dalla lisi delle cellule microbiche sensibili al Cr (VI) può essere impiegata dai microrganismi che non sono stati uccisi (Viti et al 2003). L'analisi della biodiversità dei batteri eterotrofi coltivabili, valutata sulla base della morfologia delle colonie sviluppatesi in piastra, ha mostrato che l'aumentare della concentrazione del Cr (VI) presente nel suolo la biodiversità tende a diminuire e questa diminuzione si accentua all'aumentare del tempo di esposizione del Cr (VI).

Contemporaneamente alla riduzione della biodiversità, il Cr (VI) seleziona alcune specie che diventano dominanti (Viti e Giovannetti 2005; Viti et al. 2003). La riduzione della biodiversità delle specie che costituiscono le comunità microbiche del suolo è un fenomeno comune che si verifica in seguito alla contaminazione dei suoli con metalli pesanti.

Sulla base di studi cinetici sul DNA estratto dalla comunità microbica di suoli non contaminati e contaminati con metalli pesanti è stato stimato che in un grammo di suolo non contaminato sono contenute circa un milione di genomi batterici diversi, mentre in presenza di metalli pesanti la ricchezza della specie può ridursi del 99,9% (Gans et al. 2005).

7. EFFETTO DEI FITOFARMACI SUI MICRORGANISMI DEL SUOLO

Nei suoli agricoli contaminati con fitofarmaci di solito si osserva una diminuzione della biodiversità, crescita, morfologia e l'attività biochimica, portando solitamente ad una riduzione della biomassa dei batteri a causa della tossicità degli inquinanti. Tuttavia, si può verificare un aumento in alcune popolazioni che non subiscono effetti tossici.

In uno studio sugli effetti a lungo termine (15 anni) del 2,4-D sulla comunità batterica e fungina del suolo, si è osservata una diminuzione della popolazione rispetto al controllo. L'entità della diminuzione è dipendente dalla formulazione di 2,4 D utilizzata (Nairain Rai, 1992).

In un altro studio effettuato sull'effetto del 2,4 D sui microrganismi del suolo, un ricercatore (Soulas 1993) notò che vi erano due gruppi microbici in grado di degradare questa molecola erbicida. Il primo gruppo microbico era in grado di degradare immediatamente la molecola, mentre l'altro gruppo si sviluppava dopo 25 giorni dalla sua aggiunta. E' stato inoltre riscontrato che la capacità degradante dei microrganismi veniva progressivamente ridotta all'aumentare della concentrazione della molecola.

Un'altra sperimentazione ha valutato l'effetto sulla respirazione basale del 2,4 D, picloram e glifosate. Tutti gli erbicidi hanno portato ad un aumento della respirazione basale dopo 9 giorni dall'applicazione solo alla concentrazione $200 \mu\text{g g}^{-1}$. Si è concluso che, gli effetti delle molecole sulle comunità microbiche si verificano solo a concentrazioni di inquinante molto superiori a quelle riscontrate dopo un'applicazione in campo risultando, quindi, di poca importanza ecologica (Wardle e Parkinson, 1990).

Altri test di laboratorio condotti con quattro insetticidi organo fosforici (Bay 37289, diazinone, dusban e zinophos), applicati ad un terriccio sabbioso alle concentrazioni di 10 e 100 µg/g hanno mostrato effetti sulle popolazioni batteriche durante la prima e la seconda settimana di incubazione per poi tornare a livelli simili a quelli dei controlli. In tutti i casi, gli insetticidi hanno determinato un aumento della produzione di ammonio ed in alcuni casi si è verificata una leggera depressione della nitrificazione.

L'ossidazione dello zolfo è stata pari o migliore di quella ottenuta dal suolo non trattato e non c'è stato alcun effetto significativo sulla mineralizzazione del fosforo. Il consumo di ossigeno, indice dell'entità della respirazione microbica, è aumentato in proporzione alla concentrazione degli insetticidi, suggerendo la possibilità che vi sia stata degradazione microbica delle sostanze e dei loro metaboliti.

Bej et al. (1991) notarono un aumento della biodiversità dopo aggiunta, in un suolo contaminato con 2,4,5-T, di un ceppo geneticamente modificato *P. cepacea* in grado di degradare il fitofarmaco. Dopo l'aggiunta del ceppo batterico, è stato osservato un aumento sia del ceppo stesso sia di altri batteri presenti nel suolo. Secondo gli autori, tale aumento può essere dovuto alla produzione di metaboliti del 2,4,5-T e che sono stati utilizzati dagli altri microrganismi come substrati di crescita.

8. EFFETTO DEI FITOFARMACI SUGLI ENZIMI DEL SUOLO

L'effetto dei fitofarmaci sugli enzimi del suolo dipende dalla complessa relazione tra inquinanti e popolazione microbica, enzimi e colloidali del suolo. Infatti se un fitofarmaco inibisce l'attività di un enzima questo effetto può perdurare fino a che la concentrazione del fitofarmaco è sufficientemente alta da permettere ancora una sua interazione con l'enzima. Effetti transitori dei fitofarmaci sull'attività enzimatica del suolo sono spesso dovuti alla completa mineralizzazione o trasformazione in un prodotto (metabolita o prodotto di degradazione) meno tossico, così come l'adsorbimento sui colloidali del suolo. L'effetto chimico su parte della popolazione microbica sensibile al fitofarmaco può non far variare o anche incrementare l'attività enzimatica del suolo come risultato della stimolazione dei microrganismi resistenti. Inoltre, ripetute aggiunte di fitofarmaco generalmente determinano la selezione di una popolazione microbica resistente e l'effetto inibente sull'attività enzimatica può essere nullo o meno pronunciato nel caso di una singola applicazione (Nannipieri, 1994).

8.1 Deidrogenasi

Molti autori hanno individuato questa classe come un utile indicatore per testare gli effetti secondari dei fitofarmaci sui microrganismi del suolo.

Numerosi studi hanno evidenziato correlazioni tra l'attività di questo enzima ed un gran numero di parametri della biomassa microbica, quali il numero dei microrganismi, l'attività respiratoria del suolo, la concentrazione di ATP, come con altre attività

enzimatiche legate ai cicli del carbonio e dell'azoto, oltre al contenuto di sostanza organica (Dougherty e Lanza, 1989; Nannipieri et al., 1990). In questa ottica i risultati, spesso contraddittori, devono essere attentamente valutati.

Un lavoro di Malkomes (1981) condotto per 5 anni in pieno campo, su alcuni suoli sabbiosi limosi con contenuto in carbonio organico compreso tra 1.7 e 2.8 e pH compresi tra 6.9 e 7.0, sottoposti a rotazione con canna da zucchero, frumento ed orzo invernale e trattati successivamente con due diverse serie di miscele di fitofarmaci, evidenziò un effetto inibente sulla deidrogenasi minore del 20% nei primi tre anni e, successivamente, una stimolazione di tale attività. Simile risultato fu ottenuto anche da Mitterer et al. (1981) con l'impiego di una miscela di alcuni fungicidi (benomyl, mancozeb, captan-folpet-focidin e quintozene). Dopo aver osservato una inibizione inferiore del 20% per circa 6 settimane si verificò una stimolazione dell'attività deidrogenasica del 40% rispetto al controllo nelle 20 settimane successive. Gli autori ipotizzarono che il decremento era imputabile ad un effetto tossico su alcune specie microbiche, mentre affermavano che la stimolazione dell'attività deidrogenasica indicava il verificarsi di un processo di detossificazione che era parzialmente correlato con l'incremento dell'attività respiratoria.

Altro dato in questa linea fu riscontrato Schinner et al. (1983) i quali impiegando dinoseb, paraquat, 2,4-D, simazina e chloroxuron osservarono un decremento dell'attività deidrogenasica solo dopo 2 settimane dal trattamento e un principio di incremento dopo 10 settimane. Dopo 20 settimane, i suoli trattati hanno evidenziato gli stessi valori rispetto al controllo. Contemporaneamente gli autori misurarono l'attività respiratoria la quale aumentava per le prime 6 settimane per poi diminuire e quindi di

nuovo aumentare fino ai livelli dei controlli solo dopo 20 settimane. L'ipotesi fatta in questo caso fu che l'incremento iniziale di attività respiratoria poteva essere una reazione di stress dei microrganismi alla presenza dei fitofarmaci, la diminuzione a un'inibizione dovuta alla soppressione delle specie sensibili ed il successivo incremento alla crescita di specie resistenti che si nutrivano delle specie uccise.

In un successivo lavoro, riguardante esperimenti condotti in presenza di dinoseb, sia in pieno campo che in laboratorio, Malkomes (1983) evidenziò il fatto che in entrambi i casi si verificava un effetto inibente sull'attività della deidrogenasi, ma che mentre nella prove in pieno campo tale effetto scompariva dopo alcune settimane, nella prove di laboratorio tale effetto perdurava per molti mesi. La ragione di tale comportamento fu giustificata ipotizzando che in condizioni di laboratorio il recupero della biomassa era molto più lento di quello osservato in pieno campo dove probabilmente poteva esserci l'intervento delle popolazioni presenti negli strati più profondi del suolo.

Perucci et al. (1999) hanno cercato di mettere in relazione l'andamento dell'attività deidrogenasica con la variazione del contenuto di C-biomassa in diverse condizioni ambientali ed impiegando concentrazioni differenti di rimsulfuron. L'andamento dell'attività deidrogenasica risultava analoga a quanto riscontrato in letteratura, cioè una diminuzione di attività subito dopo il trattamento ed un successivo recupero di attività, con ritorno ai valori del controllo, in tempi diversi a seconda della concentrazione e delle condizioni di incubazione. Stesso andamento fu osservato nel contenuto di C-biomassa. Gli autori ipotizzarono in questo caso che l'effetto tossico sui microrganismi fosse di tipo secondario e che, in seguito alla lisi cellulare, si sarebbe dovuto osservare un incremento immediato e temporaneo dell'attività.

8.2. Catalasi

I lavori riguardanti questa classe di enzimi sono pochi. Perucci e Scarponi (1994) e Perucci et al. (1999) hanno studiato l'effetto della presenza degli erbicidi imazetaphyr e rimsulfuron sulla catalasi e la deidrogenasi. In presenza di imazetahpyr il comportamento della catalasi fu perfettamente uguale a quello osservato per la deidrogenasi (forte inibizione subito dopo il trattamento e lento recupero con il passare del tempo, il tutto in funzione del dosaggio e delle condizioni di sperimentazione) mentre in presenza di rimsulfuron il comportamento delle due ossidoriduttasi era opposto.

8.3 Fosfatasi

Svariate sono le attività idrolitiche investigate: le esterasi (fosfatasi, solfatasi), le glicosidasi (α e β -glucosidasi, amilasi, cellulasi), le proteasi, le amidoidrolasi (asparaginasi, acilamidasi, ureasi). La letteratura in questi casi è molto vasta e nella generalità dei casi anche con questa classe di enzimi la diversità delle risposte ai trattamenti rende estremamente difficile una conclusione generale.

Le fosfatasi, in considerazione del fatto che per molto tempo sono state considerate un ottimo parametro per la valutazione della fertilità di un suolo, rappresentano il gruppo di estere idrolasi più investigate in quanto esse costituiscono un ampio range di enzimi extracellulari così come enzimi-accumulati. L'importanza di questi enzimi è dovuta al

fatto che essi sono correlati con un gran numero di microrganismi ed all'attività respiratoria del suolo e nello stesso tempo sono state trovate correlate con il contenuto di fosforo disponibile del suolo.

9. MECCANISMI DI TRASFORMAZIONE MICROBICA DEI FITOFARMACI

La degradazione microbiologica dei fitofarmaci è considerato il meccanismo primario di trasformazione biologica. I microrganismi sono in grado di proliferare in differenti tipi di ambiente in forza della loro capacità di mutazione ed adattamento, e tale capacità sembra essere una grande potenzialità affinché acquisiscano capacità degradanti quando vengono a contatto con xenobiotici. Alcuni meccanismi di trasformazione microbica sono unici e non possono essere trovati in altri organismi. L'abilità di certi microrganismi di fermentare carboidrati, di svilupparsi in condizioni anaerobiche e di produrre enzimi che sono attivi extracellularmente esemplifica l'enorme diversità del metabolismo microbico.

In natura la degradazione microbica dei fitofarmaci può essere dovuta a metabolismo diretto (metabolismo primario) o ad un effetto indiretto dei microbi sull'ambiente chimico e fisico, risultante in una reazione di trasformazione secondaria.

Fondamentalmente cinque sono i processi in cui sono coinvolti le trasformazione microbiologiche dei fitofarmaci:

a) *la biodegradazione*: in cui il fitofarmaco viene utilizzato come substrato per la crescita; b) *il cometabolismo*: in cui il fitofarmaco è trasformato mediante reazione

metaboliche ma che non serve come sorgente di energia per i microrganismi;

c) *la polimerizzazione o la coniugazione*: in cui le molecole del fitofarmaco sono legate insieme con altri fitofarmaci, o con composti naturali;

d) *l'accumulazione*: in cui il fitofarmaco è incorporato entro i microrganismi;

e) *gli effetti secondari dell'attività microbica*: in cui il fitofarmaco è trasformato a causa di variazioni di pH, condizioni ossido-riduttive, reattività dei prodotti, ecc.

La trasformazione microbiologica di un fitofarmaco può coinvolgere più di un processo, e in diverse condizioni, diversi prodotti possono ottenersi dal p.a. in funzione delle condizioni ambientali, inoltre i processi di trasformazione possono essere mediati da uno o più organismi.

9.1. Biodegradazione (mineralizzazione).

L'aspetto più interessante e più importante dal punto di vista ambientale della degradazione di un fitofarmaco ad opera dei microrganismi del suolo è la completa biodegradazione della molecola xenobiotica. Se un fitofarmaco può essere utilizzato in qualche modo da uno o più microrganismi, esso sarà metabolizzato in CO₂ ed in altri composti inorganici. L'utilizzo di cinque solfoniluree come sorgente di carbonio per la crescita microbica fu osservata ad opera di *Neurospora sithophila* da Dumontet *et al.* (1993).

Da un punto di vista ambientale il completo metabolismo di un fitofarmaco è

desiderabile onde evitare la generazione di intermedi potenzialmente pericolosi.

9.2. Cometabolismo

La degradazione di composti sintetici nell'ambiente coinvolge largamente il cometabolismo; esso è infatti la forma prevalente nel metabolismo microbico. Nel cometabolismo i microrganismi, mentre crescono a spese di un substrato di crescita, sono capaci di trasformare un fitofarmaco senza derivarne alcun nutrimento od energia per svilupparsi. Così, il cometabolismo è un metabolismo fortuito, in cui gli enzimi coinvolti nella reazione iniziale di catalisi sono spesso deficitari del substrato specifico.

Il cometabolismo generalmente non dà una degradazione elevata di certi substrati, ma è possibile che differenti microrganismi possono trasformare una molecola in seguito ad attacchi cometabolici sequenziali o che i prodotti del cometabolismo di un organismo possano essere usati da altri come substrati per la crescita. Un esempio è fornito dal 2,4,5-T e dal 2,3,6-triclorobenzoato che sono convertiti prima, per ossidazione cometabolica, in 3,5-diclorocatecolo dal *Brevibacterium* sp. (Horvath, 1970) e successivamente per intervento di un *Achromobacter* sp. venir trasformato in semialdeide 3,5-dicloro-2-idrossimuconica (Horvath, 1971).

Il cometabolismo può portare anche all'accumulo di prodotti intermedi con tossicità maggiore e così causare un impatto ambientale negativo, ed in alcuni casi anche inibire lo sviluppo dei microrganismi così come il loro metabolismo.

9.3. Coniugazione e polimerizzazione

In molti casi i fitofarmaci possono essere trasformati non per biodegradazione, ma mediante polimerizzazioni e coniugazioni mediate dai microrganismi.

La polimerizzazione è generalmente un processo di unione ossidativa in cui un fitofarmaco o un suo intermedio si combinano o con residui di altri xenobiotici o con prodotti naturali fino a formare delle macromolecole. Tale tipo di reazione è abbastanza nota a carico delle aniline clorurate. In genere due molecole di aniline sostituite formano un azobenzene.

Nelle reazioni di coniugazione il fitofarmaco o il suo intermedio vengono legati insieme con un substrato endogeno formando composti metilati, acetilati o alchilati, così come glicosidi ed ammino acidi. Bollag e Loll (1983) hanno messo in evidenza il ruolo importante che la polimerizzazione microbica ha nell'incorporazione di xenobiotici nella sostanza organica del suolo.

9.4. Accumulo microbico

L'accumulo dei fitofarmaci in cellule di microrganismi bersaglio e non-bersaglio è un altro tipo di interferenza microbica con fitofarmaci. Infatti, molti studi hanno dimostrato che il processo primario di assorbimento microbico dei fitofarmaci è attribuito ad un processo fisico passivo piuttosto che ad un processo metabolico attivo.

La velocità di accumulo dipende oltre che dal tipo e concentrazione del fitofarmaco nel mezzo circostante anche dal tipo di organismo. Per esempio il *Bacillus subtilis* richiede

solo 30 secondi per accumulare il 90% di residui di DDT accumulatosi nel mezzo in 24 ore, mentre il *Agrobacterium tumefaciens* accumula il 100% di DDT dopo 4 ore (Chacko e Lockwood, 1967). Altri esempi si trovano in letteratura: per l'atrazina a carico del *Neurospora sitophila* (Burchfield e Storrs, 1957), per il dieldrin a carico della *Chlorella pyrenoidosa* (Sordergren, 1971), e per il fensulfotion a carico della *Klebsiella pneumoniae* (Timms e McRae, 1983).

Nonostante che nella rimozione di composti tossici dal mezzo giochi un ruolo importante, l'accumulo microbico può anche essere considerato un processo di traslocazione dei fitofarmaci.

Molti microrganismi sono importanti risorse alimentari per un ampio spettro di organismi alimentari. La presenza di microrganismi contenenti fitofarmaci in ambiente acquatico inquina la catena alimentare per i pesci e vertebrati superiori, e quest'ultimi li possono trasportare ad un nuovo ambiente.

9.5. Reazioni biochimiche del metabolismo dei fitofarmaci

La velocità della degradazione microbica dei fitofarmaci in pieno campo dipendono molto dalle condizioni ambientali. In genere le condizioni che promuovono la crescita dei microrganismi responsabili della degradazione accelerano la velocità mentre quelle che inibiscono la crescita dei microrganismi riducono la velocità di biodegradazione.

I microrganismi degradano gli erbicidi mediante un numero svariato di reazioni incluse

le ossidazioni, riduzioni, idrolisi, idrossilazione, decarbossilazione, deaminazione, dealogenazione, dealchilazione, dealcossilazione, detioazione e coniugazione con normali metaboliti, generalmente zuccheri, amminoacidi o peptidi (glutazione).

Un particolare ed interessante fenomeno della degradazione microbica degli erbicidi che ha un significato pratico è quello dell'arricchimento. L'arricchimento è un incremento nel numero e/o nell'attività dei microrganismi capaci di metabolizzare un particolare xenobiotico a seguito dell'aggiunta di questo al suolo. Infatti, quando un xenobiotico, che è il soggetto della degradazione microbica, è applicato per la prima volta ad un suolo, passa un certo tempo prima che la degradazione proceda con una velocità significativa (induzione). Segue quindi un periodo relativamente veloce di degradazione. Le successive applicazioni dello stesso erbicida allo stesso suolo inducono immediatamente una rapida degradazione con piccoli periodi di induzione. Tale fenomeno potrebbe ridurre l'efficacia dei trattamenti ripetuti.

I principali processi coinvolti nel metabolismo dei fitofarmaci sono: ossidazione, riduzione, idrolisi e sintesi.

9.5.1. Ossidazione

L'ossidazione dei fitofarmaci, che avviene frequentemente ad opera dei microrganismi, è uno dei processi metabolici più importanti e procede in ambiente aerobico. I maggiori processi sono riportati qui di seguito. Tali reazioni sono catalizzate da enzimi quali: mono-ossigenasi, diossigenasi, laccasi e perossidasi. Le condizioni aerobiche sono necessarie poiché funzionando come accettore finale di elettroni nella respirazione, l'ossigeno è un reagente d'obbligo nelle reazioni di trasformazione.

I prodotti delle reazioni ossidative presentano generalmente un gruppo ossidrilico o carbossilico risultando così più polari del prodotto di partenza, quindi più solubili in acqua. In tal modo possono essere biodegradati e più facilmente immobilizzati covalentemente su sostanze umiche.

9.5.2. Idrossilazione

L'idrossilazione microbica è spesso il primo stadio di attacco nella degradazione dei fitofarmaci.

L'aggiunta di un gruppo ossidrilico nella molecola del pesticida rende il composto più polare e quindi più solubile in acqua, di conseguenza, più reattiva biologicamente. Gli enzimi che catalizzano questa reazione sono: idrolasi, mono-ossigenasi o ossigenasi miste. L'idrossilazione può avvenire sia nell'anello aromatico che in composti alifatici, in tutti i casi vi è la necessità di ossigeno molecolare e NADH in modo da rendere le ossigenasi capaci di aggredire il composto.

9.5.3. N-Dealchilazione

Molti fitofarmaci posseggono gruppi alchilici legati all'azoto o all'ossigeno. La biodegradazione di questi fitofarmaci inizia generalmente con un processo di rimozione ossidativo. Questo tipo di reazione è catalizzata da mono- e di-ossigenasi che richiedono ossigeno e NADH. La dealchilazione è la strada primaria di degradazione degli erbicidi s- triazinici.

9.5.4. β – Ossidazione

Molti fitofarmaci aromatici presentano un acido grasso nella catena laterale che può essere metabolizzata mediante β -ossidazione. Questa reazione procede mediante la rottura di un legame C-C della catena dell'acido grasso riducendo la catena di un frammento di due atomi di carbonio fino a ridurla di due atomi. La presenza sull'anello aromatico o nella catena laterale di un sostituente ha una forte influenza sulla realizzazione della β -ossidazione.

Per un funzionamento normale, la β -ossidazione richiede due protoni su entrambi gli atomi di carbonio α e β . La reazione è ostacolata se negli atomi α e β vi sono sostituenti, la presenza di sostituenti sugli altri atomi di carbonio della catena alifatica può semplicemente inibire la reazione (Hammond e Alexander, 1972).

9.5.5. Solfossidazione

La solfossidazione è quella reazione che implica la conversione enzimatica dell'atomo di zolfo (presente sotto forma di solfuro) a solfossido ed occasionalmente a sulfone:



Un esempio di solfossidazione è stato osservato a carico del carboxin (fungicida sistemico) ma poiché questa reazione avviene anche in suolo sterile, come per altri composti, non potrebbe essere addebitata solamente ad una degradazione microbica. Ciononostante, Lyr *et al.* (1974) trovarono che un mitocondrio isolato dal fungo *Ustilago maydis* era in grado di operare l'ossidazione del carboxin.

9.5.6. Decarbossilazione

La sostituzione di un gruppo carbossilico con un H è un'altra reazione comune a carico dell'attività microbica. Nel caso di acidi carbossilici alifatici il gruppo carbossile può essere più o meno degradato in dipendenza della configurazione della molecola e dei sostituenti presenti.

Questa reazione largamente diffusa della degradazione dei prodotti naturali, è stata riscontrata anche a carico di vari fitofarmaci. Molti esempi di decarbossilazione sono stati pubblicati a carico di alcuni erbicidi derivati di acido benzoico (Frear, 1975), biperidilici (Cripps e Roberts, 1978) ed acaricidi clorurati. Un esempio di decarbossilazione di un acaricida, il clorobenzilate, è stato osservato da Miyazaki et al. (1969) da parte di *Rhodotorula gracilis*.

9.5.7. Rottura di legami di eterificazione

La rottura di un legame di eterificazione porta spesso alla diminuzione di tossicità del composto verso l'organismo bersaglio. Il meccanismo di questa reazione non è ancora molto chiaro anche se alcuni studi hanno evidenziato che la reazione avviene ad opera di una ossidasi in presenza di NADH ed ossigeno.

Molti fitofarmaci, come erbicidi derivati dell'acido benzoico, organofosfati, carbammati, metossi-s-triazine presentano legami eterici o gruppi alcossilici. La rottura di legami eterici porta generalmente ad un derivato fenolico, ad esempio l'MCPA in presenza di NADH o NADPH per intervento dell'*Arthrobacter* sp. (Loos, 1975) o dello *Pseudomonas* sp. (Gamar e Gaunt, 1971) viene ossidato ad acido gliossilico e 2-metil-4-clorofenolo.

9.5.8. Rottura di anelli aromatici ed eterociclici

Molti fitofarmaci presentano uno o più anelli aromatici e quindi il loro completo metabolismo è legato alla possibilità della rottura dell'anello. Mentre molti microrganismi, batteri in particolare, sono in grado di rompere l'anello del benzene, è stato visto che i fitofarmaci con anelli aromatici che presentano diversi sostituenti sono molto più resistenti all'attacco microbico in funzione del tipo di legame, dello specifico sostituente, della posizione dei sostituenti e del loro numero.

La prima reazione necessaria per la fissione dell'anello è la reazione di diidrossilazione, essenziale per questo meccanismo in quanto rende l'anello più reattivo. I due gruppi idrossilici possono posizionarsi sia in orto sia in para al sostituente ma comunque devono essere adiacenti (derivato del catecolo); le diossigenasi sono gli enzimi responsabili della rottura dell'anello, reazione che conducono generalmente alla formazione di acido *cis,cis*-muconico o alla semialdeide 2-idrossimuconica.

Altro esempio di rottura dell'anello di un fenolo può essere descritto dalla fissione del 4-(metilmercapto)-fenolo, un prodotto di idrolisi di vari insetticidi organofosforici e metil carbammati che porta alla formazione della semialdeide 2-idrossi-5-metilmercaptomuconica ad opera della *Nocardia* sp. (Engelhardt et al., 1977)

Un esempio di metabolismo completo è dato dalla degradazione del 2,4-D ad opera del *Alcaligenes eutrophus* che porta alla formazione di due composti importanti che entrano nel ciclo degli acidi tricarbossilici quali l'acido succinico e l'acetil-CoA.

Come i composti aromatici, anche gli eterociclici sono soggetti a degradazione

microbica. La scarsa attenzione è dovuta al fatto che dato che l'eteroatomo può essere O, N e S diventa difficile l'individuazione dei metaboliti prodotti nella degradazione.

Un composto che ha ricevuto qualche attenzione è il paraquat (erbicida bipyridilico) il quale a seguito della degradazione fotolitica, che determina la scissione primaria in acido N-metilisonicotinico e metilammina, viene attaccato da un batterio che utilizza l'acido come fonte primaria di carbonio degradando il substrato mediante una prima idrossilazione e N-dealchilazione quindi una ulteriore idrossilazione e successiva rottura dell'anello che ne determina la degradazione fino alla formazione di acido maleamico.

9.5.9. Epossidazione

L'eossidazione, inserimento di un atomo di ossigeno in un doppio legame C=C, porta alla formazione di un composto con un più alto grado di tossicità ambientale. Korte *et al.* (1962) trovarono per primi che alcuni microrganismi, quali: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium notatum* erano in grado di trasformare l'aldrin (insetticida) nel corrispondente dieldrin (insetticida).

9.5.10. Copulazione ossidativa

La copulazione ossidativa o reazione di condensazione è catalizzata da fenol ossidasi quali laccasi e perossidasi. Questo processo, molto importante nella formazione dell'humus porta generalmente alla formazione di una miscela di molecole polimerizzate. Ad esempio il 2,4-D è degradato a 2,4-diclorofenolo da una fenolossidasi

e quindi per intervento di una laccasi (Minard et al., 1981) isolato da funghi *Rhizoctonia praticola* davano il dimero ed a composti a più alto grado di polimerizzazione.

9.5.11. Riduzione

La reazione di riduzione è molto comune in suoli asfittici (suoli allagati), mentre la saturazione del doppio legame in un processo di degradazione anaerobica di molecole aromatiche è molto importante.

Le reazioni di maggior importanza sono riportate in Tabella 1.

Riduzione del nitro gruppo:	$RNO_2 \text{ ROH} \longrightarrow RNO_2 \text{ RNH}_2$
Dealogenazione riduttiva:	$Ar_2CHCCl_3 \longrightarrow Ar_2CHCHCl_2$
Riduzione del doppio legame:	$Ar_2C=CH_2 \longrightarrow Ar_2CHCH_3$
Riduzione del Sulfossido:	$RS(O)R' \longrightarrow RSR'$

Tabella 1 – Reazioni di riduzione nel metabolismo microbico

Il nitro gruppo, attraverso gruppi intermedi di tipo nitroso e idrossiamminico, può essere ridotto ad ammino gruppo, tale reazione è stata osservata per il parathion (insetticida) in un sedimento lacustre (Graetz et al., 1970), come per altri insetticidi quali il paraoxon o

fenitrothion (Matsumura e Benezet, 1978).

La dealogenazione riduttiva è estremamente importante nella trasformazione di fitofarmaci alogenati in ambienti anaerobici.

Altre reazioni frequentemente trovate sono: saturazione di doppi legami, riduzione di gruppi aldeidici ad alcool, riduzione di gruppi chetonici ad alcool secondari ed anche riduzione di alcuni metalli.

9.5.12. Idrolisi

Le reazioni idrolitiche sono molto comuni e molto importanti nella degradazione di un pesticida. Il gruppo ossidrilico viene introdotto nella molecola ad opera dell'acqua, pertanto questa reazione può avvenire in presenza o in assenza di ossigeno. Inoltre, poiché non richiedono cofattori, le reazioni di idrolisi possono essere catalizzate da enzimi intracellulari o extracellulari escreti da organismi viventi o dalle cellule microbiche dopo la loro morte.

Gli enzimi coinvolti nelle reazioni di idrolisi includono esterasi, amidasi, fosfatasi, idrolasi e liasi. Pertanto, poiché i fitofarmaci presentano legami eterei, estereidi o ammidici, possono sottostare facilmente ad una reazione di idrolisi producendo usualmente composti che hanno perso la loro attività tossica.

9.5.13. Sintesi

I microrganismi del suolo sono in grado di operare reazioni di sintesi in cui molecole di fitofarmaci o di loro intermedi vengono legati tra loro o con altri composti presenti nel suolo. Il risultato di queste reazioni di sintesi é la formazione di un gran numero di prodotti. Le reazioni di sintesi ad opera dei microrganismi possono distinguersi in due tipi: a) reazioni di coniugazione in cui si verifica l'unione di due molecole. In questo tipo di reazione troviamo la metilazione e l'acetilazione, molto comuni nel metabolismo microbico dei fitofarmaci.

b) reazioni di condensazione i cui prodotti sono oligomeri o polimeri. In questo tipo di reazione, piuttosto rara nel metabolismo dei microrganismi, sono state riscontrate reazioni con amminoacidi o con S e formazione di glucosidi. E' noto che i microrganismi del suolo giocano un ruolo importante nel legare residui di fitofarmaci con la sostanza organica del suolo. Nel suolo infatti sono presenti composti fenolici e chinonici derivati della lignina o prodotti dagli stessi microrganismi i quali vengono condensati ossidativamente per formare polimeri quali costituenti base del materiale umico. Questo processo può avvenire attraverso reazioni chimiche, autoossidazioni o per mezzo dell'azione delle polifenolossidasi.

10. SCOPO DEL LAVORO

Molti fitofarmaci persistono nel suolo non perché recalcitranti ma causa di condizioni chimico-fisiche sfavorevoli o per l'assenza di microrganismi capaci di operare la biodegradazione.

In alcuni casi, la grande persistenza di una molecola è anche dovuta ad un'azione tossica nei confronti della microflora del suolo.

I fitofarmaci possono anche esercitare un'azione stimolante nei confronti di ceppi microbici quando costituiscono per gli stessi fonte di carbonio ed energia.

Gli studi sull'effetto dei fitofarmaci sulla microflora del suolo sono ridotti e nessuna informazione è disponibile per l'acido naftalene acetico e l'imidacloprid.

Lo scopo del lavoro è stato di studiare la risposta della microflora del suolo all'aggiunta di queste due molecole e, nel contempo, di valutare le eventuali variazioni della persistenza dei principi attivi in seguito ad applicazioni ripetute.

E' stato anche valutata l'entità dell'adsorbimento, processo che influisce fortemente sulla biodisponibilità dei fitofarmaci.

11. MATERIALI E METODI

11.1. Descrizione dell'acido 1-naftalene acetico

L'acido 1-naftilacetico o acido alfa-naftalenacetico (NAA) è un acido carbossilico derivato dal naftalene. Esso è un regolatore di crescita che mima l'auxina, ormone naturale importante per lo sviluppo dei semi e delle radici. Da questo punto di vista l'NAA è simile al 2,4 D e diverso dall'anti-auxinico 2,4,5, T.

Sui fruttiferi impedisce la cascola pre-raccolta ritardando la formazione dello strato di abscissione alla base del peduncolo del frutto. Esplica inoltre azione diradante del melo, allegante su orticoli e fruttiferi, spollonante su fruttiferi e radicante su talee erbacee e legnose.

Le informazioni riguardanti l'impatto ambientale dell' NAA sono ridotte. Sulla base della sua pressione di vapore, è ipotizzabile una elevata tendenza a trasferirsi dalle foglie all'atmosfera. La volatilizzazione dal suolo o dai corpi idrici è stata stimata di un livello molto inferiore. Il tempo di semivita stimato sulla vegetazione è di 72 ore; l'andamento della cinetica osservato è di primo ordine.

Sempre sulla base delle caratteristiche chimico-fisiche della molecola, si suppone che l'NAA subisca una rapida fotolisi nel suolo, nell'acqua e sulla vegetazione.

Anche le informazioni sulla biodegradabilità della molecola, come quelle sulla degradazione abiotica, derivano dall'elaborazione di modelli matematici. E' stato ipotizzato che l'NAA sia biodegradabile con un tempo di semivita medio di 15 gg nel suolo e nell'acqua con oscillazioni che vanno dagli 11,7 giorni in ambiente aerobico e 23,4 giorni in ambiente anaerobico.

Sulla base del valore di Koc stimato (160-610), l'NAA appare mediamente mobile nel suolo.

I dati tossicologici indicano che l'NAA è praticamente non tossico nei confronti degli uccelli su basi acute. Non sono disponibili dati di tossicità cronica sugli uccelli. Il valore di LD₅₀ per i ratti è risultata di 933 mg/kg. In prove di tossicità cronica, la dose senza effetto per i mammiferi è stata stabilita pari a 210 mg/kg; questo dato è stato ottenuto sui ratti mantenuti per due generazioni.

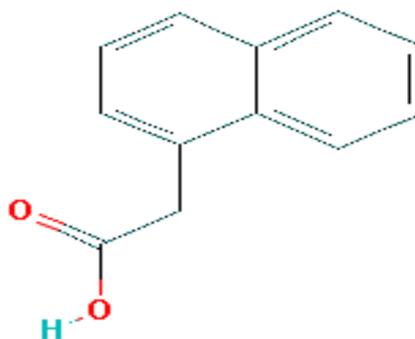
Anche gli organismi acquatici così come quelli marini non hanno dimostrato sensibilità all'NAA.

11.1.1. Caratteristiche chimico-fisiche del NAA

Nome comune: NAA

Formula bruta: $C_{12}H_{10}O_2$

Formula di struttura:



Nome chimico IUPAC: Acido-1-naftalenacetico

Peso molecolare: 186,21

Punto di fusione: 129-131°C

Tensione di vapore: Trascurabile

Solubilità in acqua (a 20°C; pH 5-7): 0,38g/l

Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (pH 7; 20°C): Log Kow 2,59

11.2. Descrizione dell'imidacloprid

L'imidacloprid è un insetticida relativamente recente ad attività sistemica e chimicamente correlato alla tossina del tabacco, la nicotina. Esso agisce bloccando gli elementi del sistema nervoso degli insetti che sono più suscettibili all'effetto tossico degli animali a sangue caldo.

La sistemicità della molecola è stata dimostrata da Alsayeda et al (2005). Foglie e fusti di pomodoro allevati su un suolo contaminato da imidacloprid hanno assorbito, in totale, circa l'85% della radioattività applicata; questa era rappresentata per il 50% dal prodotto di partenza e per il resto dal suo principale metabolita privo di gruppo nitrico.

L'imidacloprid ha un vasto campo di applicazione ed è usato sul suolo, sui semi e sui vegetali. Esso viene usato per il controllo di afidi, tripidi e mosca bianca; è anche attivo contro insetti del suolo, termiti ed alcuni scarafaggi che infestano i semi mentre non ha effetto sui nematodi. Viene utilizzato nelle coltivazioni di riso, cotone, cereali, mais, canna da zucchero, patate, agrumi, mele e pere.

L'imidacloprid può causare fitotossicità nei confronti delle colture sulle quali viene applicato se non vengono rispettati i protocolli indicati dalla ditta produttrice ed ha una tendenza a ridurre la produzione di semi ed il vigore della pianta.

L'imidacloprid è considerato moderatamente tossico dalla World Health Organization (WHO). Studi di laboratorio sugli animali hanno mostrato quali sintomi tossicità acuta apatia e difficoltà respiratorie della durata di circa cinque giorni. L' LD₅₀ è di 450 mg/kg nei ratti e 131 mg/kg nei topi; la tossicità dermale sui ratti è risultata solo a dosi superiori a 5000 mg/kg mentre non è considerato irritante per gli occhi e la pelle dei conigli.

Le formulazioni commerciali hanno determinato alcuni danni di tossicità acuta: attività ridotta, difetti nel coordinamento, tremulti, diarrea e perdita di peso. Alcuni di questi sintomi sono perdurati per 12 giorni dopo l'esposizione.

Attraverso studi di tossicità cronica è stato appurato che l'imidacloprid provoca danni alla tiroide quando somministrato a femmine di topo in ragione di 17 mg/kg al giorno. Dosi leggermente superiori (25 mg/kg al giorno), hanno provocato perdita di peso.

L'insetticida può avere un debole effetto mutagenetico mentre non sono stati riscontrati danni genetici se non a dosi molto alte, qualche effetto è stato riscontrato sulla riproduzione: conigli alimentati con il principio attivo tra il sesto ed il diciottesimo giorno di gravidanza (72 mg/kg al giorno) hanno manifestato un maggior rischio di aborto ed hanno partorito cuccioli con malformazioni scheletriche.

Per quanto riguarda gli effetti ecologici, è stata osservata una grande varietà di effetti sugli uccelli. Esso è fortemente tossico nei confronti di alcune specie come il passero, la quaglia giapponese, il piccione. Su questi uccelli la molecola induce perdita di coordinamento e inabilità al volo.

L'imidacloprid è fortemente tossico nei confronti dei pesci adulti quando applicato a dosi superiori agli 80 mg/kg e provoca morie delle api e dei lombrichi

Non sono riportati in letteratura lavori riguardanti l'effetto dell'imidacloprid sulla microflora del suolo. Larink e Sommer (2001) hanno effettuato una sperimentazione mirata a valutare l'effetto del principio attivo su alcuni organismi del suolo. Essi hanno dimostrato un effetto inibente nei confronti dei Collemboli i quali presentavano un'attività ridotta. E' necessario evidenziare, tuttavia, che in questo lavoro l'imidacloprid è stato applicato in associazione con il β -cyfluthrin.

Per quanto concerne la contaminazione dell'acqua, l'insetticida ha buone probabilità di percolare verso la falda. Inoltre, a causa della sua alta solubilità, può essere trasportato nei corpi idrici superficiali con il ruscellamento.

Studi di interazione dell'imidacloprid nel suolo, hanno dimostrato che la molecola viene adsorbita dai colloidali e che l'entità del processo è direttamente proporzionale al contenuto di carbonio organico. Ulteriori studi hanno dimostrato che il processo è di tipo isteretico. Gli stessi autori hanno effettuato una prova di degradazione su tre suoli ed hanno riscontrato che il processo era bifasico: ad un rapido decremento seguiva una diminuzione più lenta del principio attivo (Cox, 1998).

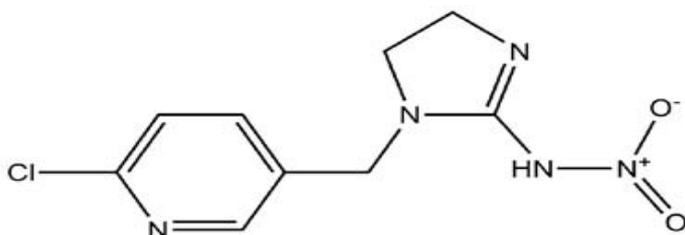
Rouchaud et al. (1996), osservarono una lenta degradazione del composto durante i primi 50-53 giorni dopo l'applicazione in un suolo ammendato con materiale organico. La degradazione ha subito un'accelerazione durante le due settimane successive (scomparsa del 67% del p.a.). Tuttavia, nello stesso suolo non ammendato, il 63% dell'imidacloprid applicato si è degradato nei primi 50-53 giorni ed il 33% nelle successive 3 settimane. Questi risultati fanno supporre che il materiale organico adsorba il principio attivo limitandone la biodisponibilità.

11.2.1. Caratteristiche chimico-fisiche dell'imidacloprid

Nome comune: IMIDACLOPRID

Formula bruta: $C_9H_{10}ClN_5O_2$

Formula di struttura:



Nome chimico IUPAC: 1-((6-Cloro-3-piridinil)metil)-N-nitro-2-imidazolidinimmina

Peso molecolare: 255,7 g/mol

Punto di fusione: 143,8 o 136,4 °C

Tensione di vapore: 3×10^{-12} mmHg at 20 °C

Solubilità in acqua (a 20°C; pH 5-7): 0,61g/l

Coefficiente di ripartizione ottanolo-acqua (pH 7; 21°C): Log Kow 0.57

11.3. Descrizione del suolo

Il suolo utilizzato nello studio è stato prelevato in un vigneto posto sul versante orientale dell'Etna (Milo) il quale è mai stato interessato da trattamenti con NAA. Esso presentava un pH acido (5,3), un contenuto di sostanza organica del 2%, sabbia 89,1%, limo 8% ed una bassa percentuale di argilla (2,9%).

Il campionamento è stato eseguito con delle pale alla profondità di 10 cm circa.

Dopo il campionamento, il suolo è stato setacciato a 2mm in condizione umide e conservato a 4 °C per il mantenimento delle attività biologiche sino al momento dell'utilizzo.

11.4. Determinazione della cinetica di degradazione del NAA nel suolo

Gli studi sulla degradazione sono stati eseguiti in condizione di umidità del suolo pari al 50% della Capacità Idrica Massima (CIM).

I campioni di suolo (20 g peso secco), posti in bottiglie di polietilene, sono stati contaminati con 2 ml di NAA in acqua (59 ppm), umidificati al livello desiderato quindi incubati in termostato a 25°C al buio. Le condizioni aerobiche sono state garantite dalla chiusura parziale del tappo a vite.

La concentrazione del NAA è stata determinata dopo 15 minuti e 4-7-14-28-56-112 giorni.

11.5. Determinazione della velocità di degradazione dell’NAA e dell’imidacloprid in seguito ad applicazioni successive.

Il suolo (20 g peso secco), umidificato al 50% della CIM, è stato contaminato con imidacloprid o con NAA in ragione di 3,0 e 4,2 mg/kg rispettivamente ogni 7 giorni per cinque settimane. Durante questo periodo, il suolo è stato mantenuto al buio, in termostato a 30°C, in aerobiosi. Un aliquota di suolo non contaminato è stata mantenuta nelle stesse condizioni sperimentali.

Quindici minuti e 7 giorni dopo ogni applicazione è stata eseguita l’analisi della concentrazione dei due principi attivi.

In occasione di ogni prelievo, è stata prelevata un’aliquota di suolo da destinare agli studi molecolari. I campioni sono stati conservati in congelatore (-25° C) fino al momento dell’analisi.

11.6. Determinazione delle isoterme di adsorbimento.

L’isoterma di adsorbimento è stata determinata allo scopo di misurare l’interazione tra il suolo ed i fitofarmaci, processo che condiziona la biodisponibilità e la mobilità delle sostanze.

Si è proceduto ponendo 1 g di suolo e 5 ml di soluzione di NAA o imidacloprid in CaCl_2 0,01 N a concentrazioni crescenti (da 2,5 a 14 ppm), in contenitori di vetro provvisti di tappo a vite. I campioni sono stati posti ad agitare per 1 ora (tempo necessario per raggiungere l’equilibrio) in cella climatica a 30°C, quindi sono stati centrifugati a 3000 rpm per 15 minuti.

La concentrazione dei principi attivi è stata determinata nel surnatante secondo le procedure riportate di seguito.

11.7. Procedure di analisi

Per la determinazione dell'NAA e dell'imidacloprid, il suolo è stato addizionato di 10 g di farina di diatomee (Extrelut, Merk), miscelato accuratamente quindi sottoposto ad estrazione mediante aggiunta di 100 ml di una soluzione costituita da cicloesano-acetato di etile (70:30; v:v) per l'NAA e acetato di etile-acetonitrile (70:30 v:v) per l'imidacloprid. La sospensione è stata prima agitata meccanicamente per 30 minuti, poi lasciata sedimentare per consentire la filtrazione del surnatante su un filtro preparato con cotone idrofilo e solfato di sodio anidro ed il suo travaso in un pallone da vuoto. L'estrazione è stata ripetuta per altre due volte usando 75 ml di soluzione estraente e lasciando agitare per 15 minuti.

I tre estratti riuniti sono portati a secco mediante evaporatore rotante e ripresi con 10 ml di metanolo.

Per la determinazione delle sostanze è stato usato uno strumento LC PerkinElmer Serie 200, detector UV/VIS PerkinElmer serie 200, colonna LiChrospher 100 RP-18 (250 cm, 4,6mm, 5 μ m).

L'NAA è stata eluito con fase mobile costituita da acqua acidificata con acido acetico allo 0,08% (55%) ed acetonitrile (45%), flusso 1ml/min. Il detector è stato impostato ad una lunghezza d'onda di 225 nm (Gambino et al., 2008).

L'imidacloprid è stato eluito con fase mobile costituita da acqua acidificata con acido fosforico allo 0,1% (70%) ed acetonitrile (30%), flusso 1,4 ml/min. La lunghezza d'onda del detector era di 215 nm.

11.8. Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto direttamente da 250 mg di suolo (Martin-Laurent et al., 2001). I campioni sono stati omogeneizzati in 1 ml di tampone d'estrazione { 100mM Tris, pH 8; 100mM EDTA; 100mM NaCl; 1% polyvinylpyrrolidone (w/v); 2% sodio dodici solfato (w/v)} per 30 s a 1600 rpm in mini-bead beater (Mikro-Dismembrator S; B. Braun Biotech International). Il suolo e le cellule distrutte sono state rimosse mediante centrifugazione (5 min a 14000 giri). Le proteine sono state eliminate mediante precipitazione con sodio acetato. Gli acidi nucleici sono stati recuperati mediante precipitazione con isopropanolo freddo e lavati con etanolo al 70%. Il DNA estratto è stato purificato su colonnine di polyvinylpyrrolidone e sepharose 4B. La qualità e l'integrità del DNA estratto sono state controllate tramite elettroforesi su gel di agarosio all'1%.

Il DNA è stato quantificato mediante concentrazione standard di calf thymus.

11.9. Amplificazione del DNA mediante Polymerase Chain Reaction (PCR)

La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica che consente di sintetizzare in grandi quantità ed in tempi relativamente brevi frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziale e terminale. Con questa tecnica, un filamento complementare ad un filamento stampo di DNA viene sintetizzato utilizzando

nucleotidi liberi grazie all'azione dell'enzima termostabile Taq DNA polimerasi; tale enzima, estratto dall'organismo termofilo

Thermus aquaticus da cui deriva la sigla dell'enzima, risulta stabile ed attivo ad alte temperature, permettendo di eseguire ripetutamente i tre cicli dell'amplificazione del DNA con una sola aggiunta di enzima all'inizio della procedura. L'amplificazione dei frammenti di interesse avviene utilizzando come innesco oligonucleotidi la cui sequenza è complementare a quella della porzione da amplificare. In tal caso i primer sono detti specifici e permettono di studiare geni poco rappresentati nel campione in esame. Le fasi della PCR consistono in:

- Denaturazione – in questa fase la soluzione di reazione contenente DNA stampo, desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, primers e Taq DNA polimerasi, viene portata a una temperatura di 94 °C. La doppia elica si denatura e i due filamenti di cui essa è composta sono liberi e distesi;
- Appaiamento – durante questa fase, la temperatura di 50–58 °C permette il legame dei primers alle regioni complementari dei filamenti del DNA denaturato;
- Estensione – fase in cui la temperatura è di circa 72 °C, condizione ottimale per l'attività della Taq polimerasi. L'azione dell'enzima determina un allungamento dei filamenti di DNA grazie agli oligonucleotidi liberi in soluzione che si legano in successione partendo dai primers, ed utilizzando come stampo i singoli filamenti di DNA originati durante la denaturazione.

La sequenza 16S rDNA è stata amplificata utilizzando i primers eubatterici GC-968f (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GCG GGG GGG GGG GCA CGG GAA CGC GAA GAA CCT TA-3 ') e 1401r (5'-GCG TGT GTA CAA GAC CC-3 '), come descritto da Felske et al. (2001) in modo da ottenere frammenti di circa 450 bp.

Il template di DNA (80 ng) è stato amplificato con 5 U di Taq DNA polimerasi, 10 μ M di ciascun primer, 10mM di ciascun dNTP, 10mM di MgCl₂, 500 μ g ml⁻¹ di BSA ed il tampone di reazione 1x (Invitrogen) in un volume finale di reazione di 50 μ l.

Le condizioni di PCR sono state: 94°C per 90 s, seguiti da 33 cicli a 95°C per 20 s, 56°C per 30s, 72°C per 45 s ed uno step finale di allungamento a 72°C per 7min.

I prodotti di PCR sono stati esaminati per elettroforesi nelle condizioni sopra riportate.

11.10. Gel elettroforesi in gradiente denaturante (DGGE)

L'analisi DGGE sui frammenti 16S rDNA è stata eseguita usando il DCode System (Universal Mutation Detection System, Bio-rad). Gli ampliconi sono stati caricati su un gel al 6% di poliacrilammide (Acrylamide/Bisacrylamide, 40%, 37.5:1, Bio-rad) con un gradiente denaturante di 46-56% parallelo alla direzione dell'elettroforesi ottenuto con urea e formammide. I gel sono stati sottoposti ad elettroforesi ad una temperatura costante di 60°C ed un voltaggio di 75 V per 16 ore e colorati con SYBR Green I (FMC Bio Products).

12. RISULTATI E DISCUSSIONE

12.1. Cinetica di degradazione del NAA nel suolo

L'NAA si degrada molto velocemente nel suolo infatti, il suo tempo di semivita nelle condizioni sperimentali adottate è risultato di 1,1 giorni. La cinetica riscontrata è stata di primo ordine ($r^2 = 0,96$). (Fig. 3).

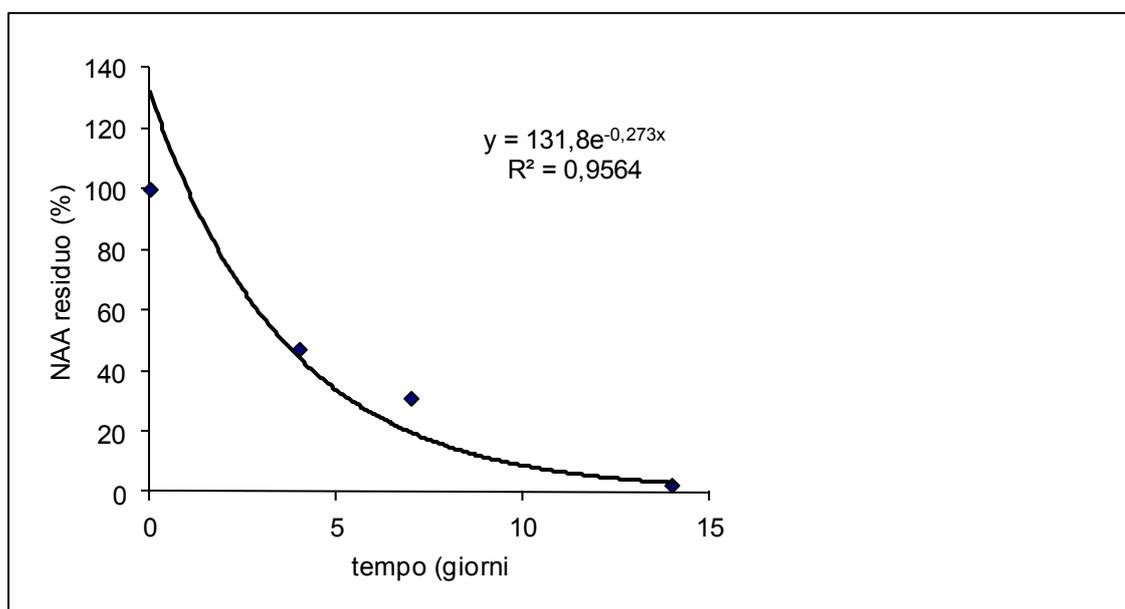


Fig 3. Cinetica di degradazione del NAA nel suolo

Parallelamente alla scomparsa del principio attivo è stata evidenziata la comparsa di un metabolita la concentrazione del quale è aumentata nel tempo. Non è stato possibile identificare la sostanza poichè tutte le analisi LC-MS non hanno dato esito positivo.

Nella Fig. 4 è riportato un grafico che riproduce l'andamento della concentrazione della sostanza tenendo conto dell' area del picco cromatografico. La curva ottenuta dimostra che il metabolita subisce un'aumento di tipo esponenziale ($r^2 = 0,96$).

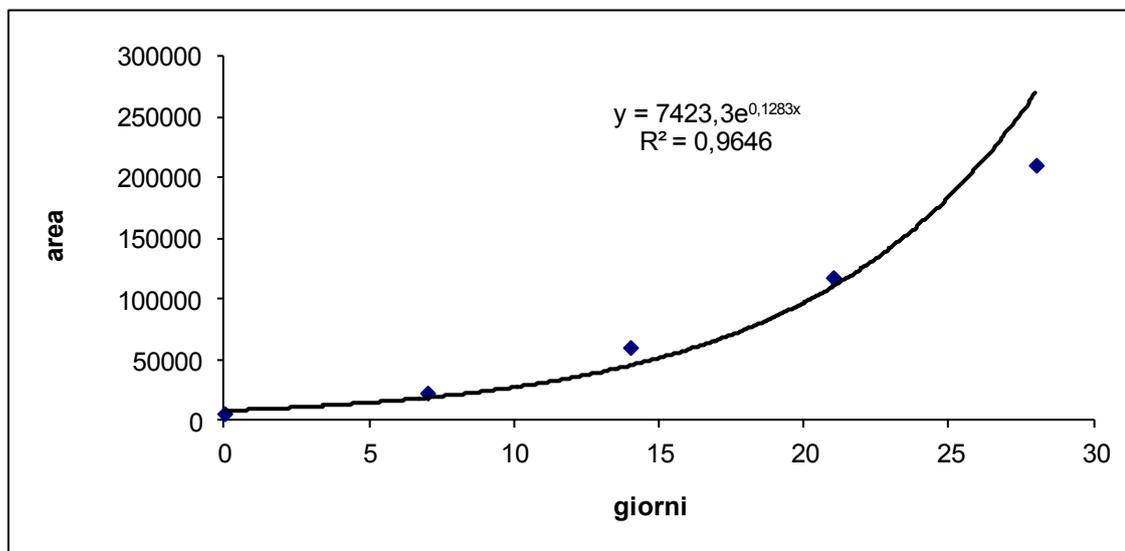


Fig. 4. Cinetica di comparsa del metabolita del NAA

Non esistono dati bibliografici riguardanti la degradazione del NAA nel suolo. Le previsioni sull'andamento dei residui basate sui modelli matematici indicano tempi di semivita leggermente superiori (12-15 giorni).

12.2. Degradazione del NAA nel suolo dopo applicazioni ripetute

Nei sette giorni successivi alla prima applicazione si è degradato il 68% del principio attivo. Dopo i tre trattamenti successivi, sempre nell'arco di sette giorni, la molecola ha subito una degradazione del 95%, 96% e 98% rispettivamente.

Questo comportamento fa supporre che, come conseguenza della presenza del NAA nel suolo, si verifichi un adattamento della microflora specializzata nel degradare il composto (Fig. 5).

Questo esperimento ha confermato la veloce scomparsa della molecola nel suolo già dimostrata nella prova riguardante la determinazione della cinetica di degradazione

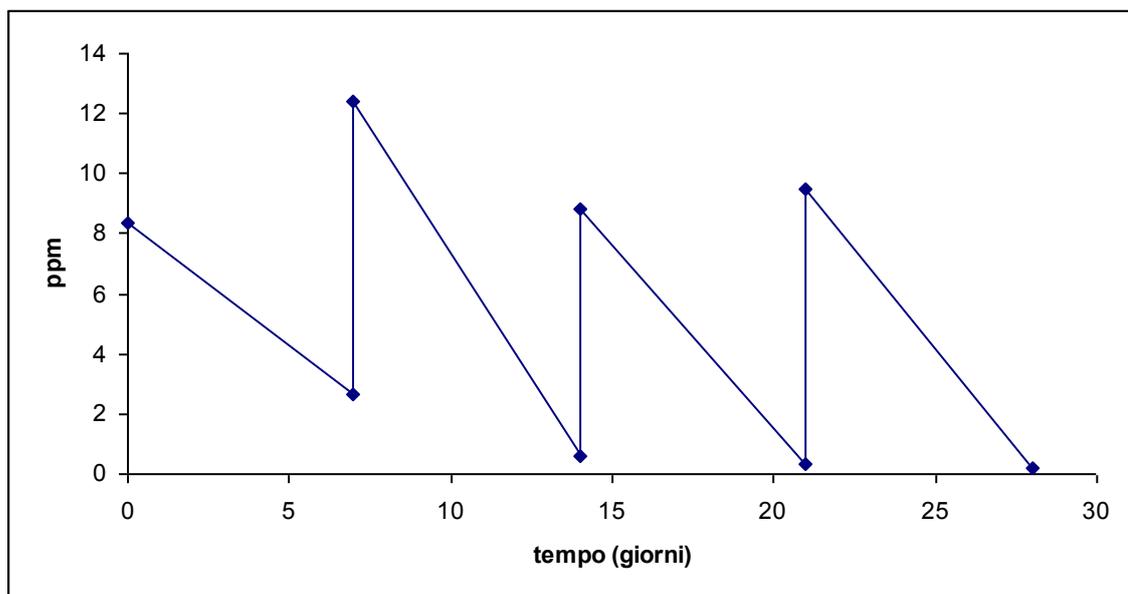


Fig 5. Concentrazioni di NAA nel suolo in seguito ad applicazioni ripetute.

12.3. Isoterma di adsorbimento del NAA

L'isoterma di adsorbimento del NAA è riportata in Fig. 6. Essa è stata ben interpretata con l'equazione di Freundlich ($r^2= 0,99$). Secondo la classificazione di Giles (1960), l'isoterma risultata è di tipo S. Questo tipo di curva si forma quando l'adsorbente ha

maggiore affinità per le molecole di solvente rispetto a quelle del soluto il quale, inizialmente, verrà poco adsorbito. L'interazione aumenta all'aumentare della sua concentrazione perchè le molecole presenti sulla superficie fungono da siti di adsorbimento per altre molecole della sostanza stessa.

Questa prova ha consentito di evidenziare che l'NAA viene adsorbito sui colloidi del suolo e che il processo è tanto maggiore quanto più elevata la concentrazione della molecola.

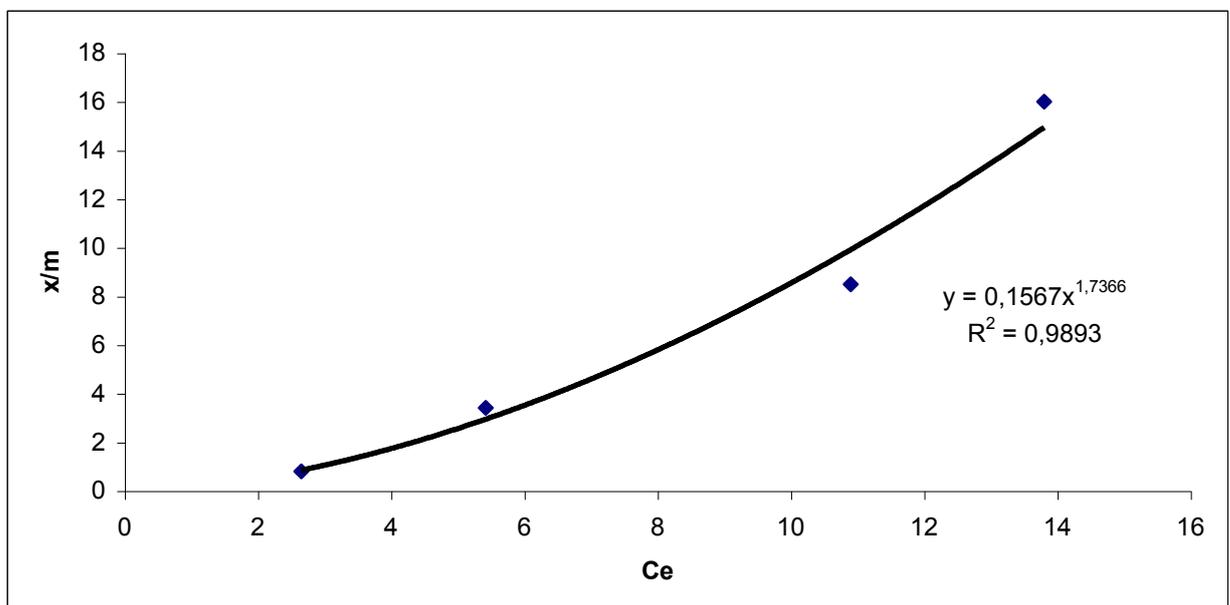


Fig. 6. Isotherma di adsorbimento del NAA nel suolo

12.4. Analisi DGGE della comunità eubatterica dopo trattamento con NAA

Ad oggi in letteratura si ritrovano soltanto lavori riguardanti l'effetto dei fitormoni 2,4-D e MCPA sulla microflora del suolo. Diversi autori negli ultimi anni hanno isolato alcuni

batteri in grado di degradare i due fitormoni sopra menzionati, in particolare appartenenti ai generi *Pseudomonas* (Kilpi et al., 1980), *Alcaligenes* (Pieper et al., 1988), *Arthrobacter* (Beadle e Smith, 1982) e *Flavobacterium* (Chaudry e Huang, 1988). Nel contempo, altri autori (Chaudry e Huang, 1988; Sandmann et al., 1988) sono stati in grado di individuare i meccanismi coinvolti nella degradazione di tali composti chimici. A differenza dei lavori sopra citati che sono stati condotti su suoli agricoli, McGhee e Burns (1995) hanno isolato tre microrganismi, quali *Xanthomonas maltophilia*, *Pseudomonas* sp. e *Rhodococcus globerulus*, capaci di degradare il 2,4-D e MCPA in suoli inquinati industrialmente.

Esaminando la letteratura recente è indubbio che sono disponibili poche nozioni riguardo il destino ambientale dell'acido naftalene acetico, infatti la comprensione sulla sua tossicità ed i meccanismi di biodegradazione risulta ancora incompleta. Tutto ciò risulta evidente dalla mancanza di informazioni riguardo l'effetto che ha sulla microflora del suolo coinvolta nel processo di biodegradazione.

Al fine, dunque, di valutare l'effetto dell'acido naftalene acetico sulla microflora del suolo è stato utilizzato un approccio molecolare, che dapprima ha previsto l'estrazione del DNA direttamente dai campioni di suolo, l'amplificazione mediante PCR del gene 16S del rDNA e la successiva analisi di tali ampliconi con la tecnica elettroforetica DGGE.

I risultati ottenuti mediante DGGE sulla comunità eubatterica trattata con NAA sono riportati nella Fig 7.

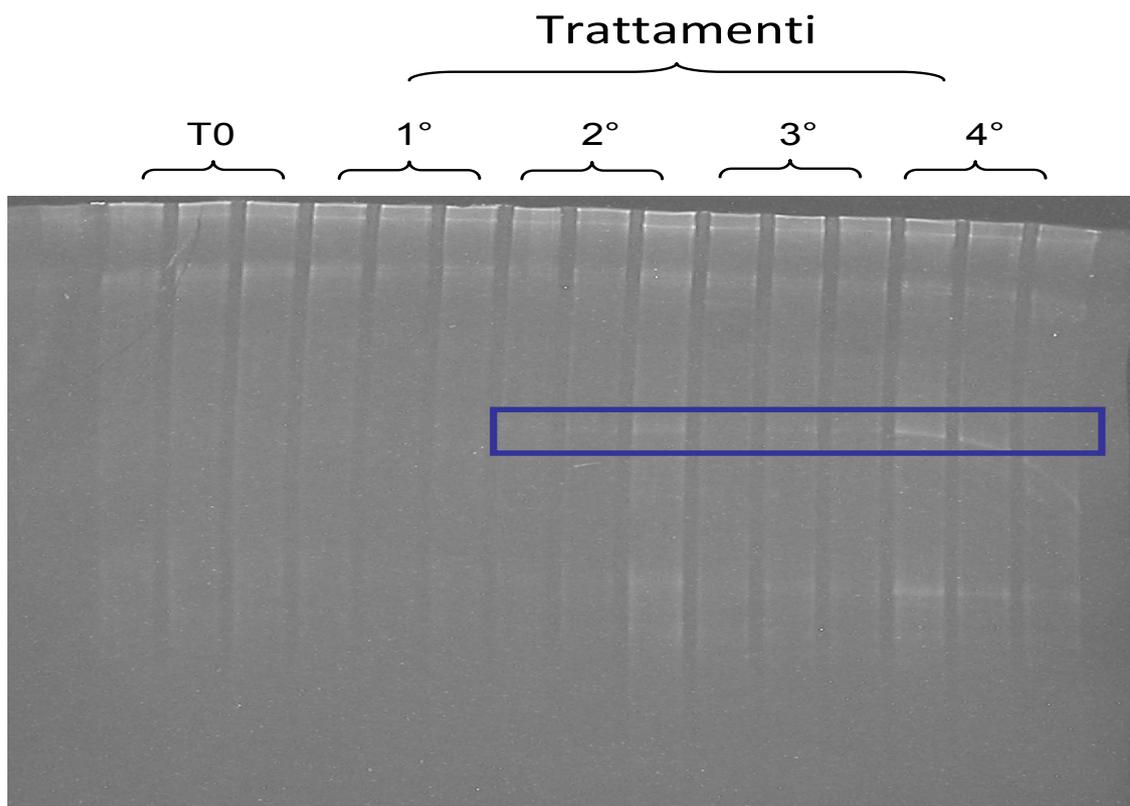


Fig. 7. Gel DGGE relativo alla comunità batterica trattata con NAA

I gel hanno mostrato la comparsa di una banda nei profili dei campioni dopo due trattamenti con NAA, confermando che la presenza di NAA nel suolo ha avuto un effetto stimolatore sulla microflora.

Un esperimento di controllo, riportato in Fig. 8, è stato eseguito per verificare se i risultati ottenuti fossero realmente dovuti alla presenza di NAA.

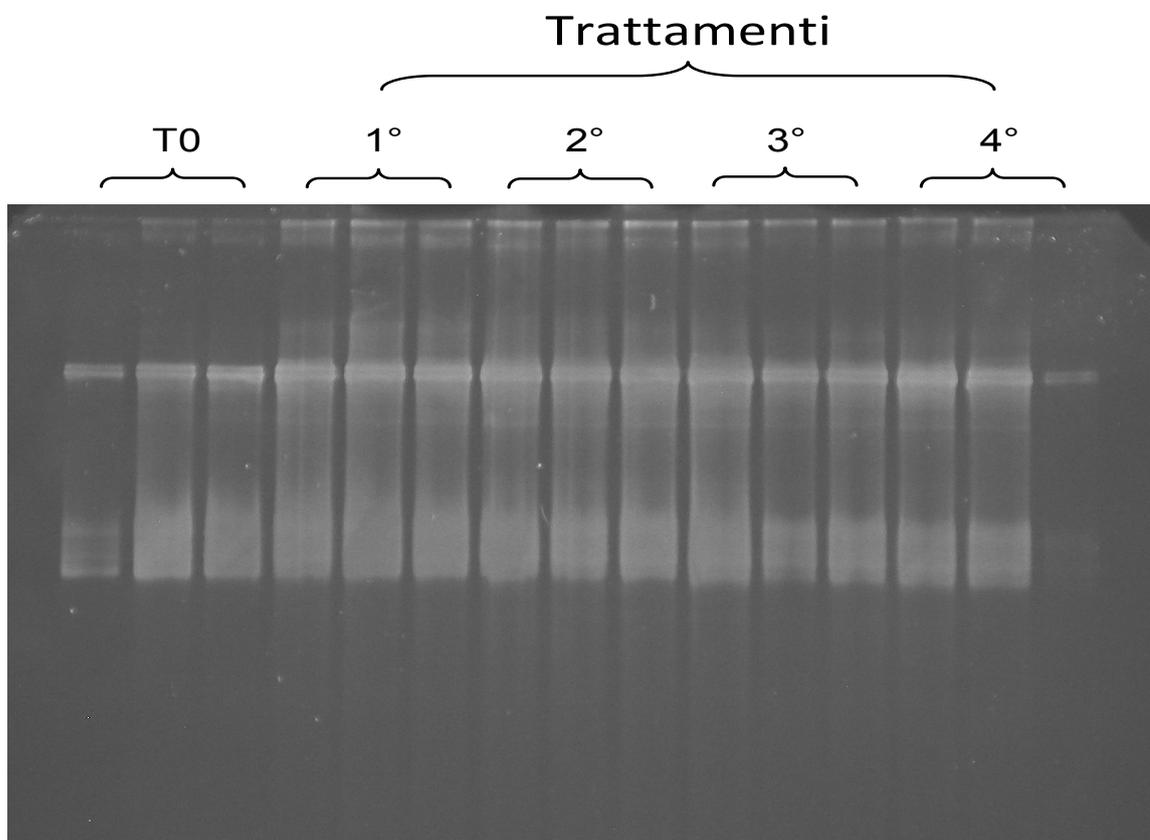


Fig. 8. Gel DGGE relativo alla comunità batterica non trattata con NAA

I profili elettroforetici DGGE della comunità eubatterica non trattata con NAA non hanno mostrato alcuna differenza nel consorzio microbico dopo gli arricchimenti. Infatti, i patterns elettroforetici hanno mostrato un elevato indice di similarità, confermato dalla presenza di un eguale numero di bande. Inoltre tali bande hanno mostrato anche uguale intensità.

Pertanto, si può supporre che il microrganismo, relativo alla banda indicata dal rettangolo blu, sia stato influenzato solo dall'effetto di NAA.

Tale banda è stata tagliata dal gel ed il relativo DNA è stato identificato mediante sequenziamento in *Azospirillum* sp.

Tale batterio è un organismo azoto fissatore, di forma bastoncellare a curvatura elicoidale. Di recente si è scoperto che può instaurare delle relazioni simbiotiche con cereali coltivati, mentre prima si pensava che fosse solo un azoto fissatore libero.

I batteri del suolo che crescono in simbiosi con le radici di molte piante utilizzano i nutrienti secreti dai vegetali ed in cambio fissano l'azoto dell'atmosfera. Nel caso degli azospirilli la fissazione dell'azoto è particolarmente rilevante per alcune graminacee tropicali e per la canna da zucchero, tuttavia questi organismi possono essere isolati anche dal sistema radicale di molte piante coltivate tipiche del clima temperato, come il mais.

I batteri diazotrofi associati possono favorire la crescita della pianta ospite apportando azoto alla pianta mediante azoto fissazione oppure producendo fitormoni, quali auxine, citochinine e gibberelline.

Se da una parte *Azospirillum* sp. è in grado di produrre ormoni indispensabili per la crescita delle piante, dall'altra parte è un risultato promettente il fatto che la presenza nel terreno di acido naftalene acetico riesca a stimolare la crescita di tale batterio e che al

contempo quest'ultimo riesca a degradarlo, probabilmente usandolo come fonte di carbonio ed energia per il suo metabolismo.

Ciò viene confermato dai dati ottenuti dalle cinetiche di degradazione, dove si evince che dopo il secondo trattamento la molecola viene degradata quasi totalmente.

Tale risultato appare di fondamentale importanza per prevenire l'accumulo nel suolo di composti sintetici, quali l'acido naftalene acetico, che se pur fondamentali nella crescita delle piante possono essere causa di fenomeni di inquinamento.

12.5. Isotherma di adsorbimento dell'imidacloprid

L'isoterma di adsorbimento dell'imidacloprid è riportata nella Fig. 9.

Quando i valori di $1/n$ sono inferiori a 1, l'isoterma si colloca nel gruppo L secondo la classificazione di Giles (1960). In questo caso, la quantità adsorbita decresce con l'aumentare della concentrazione del principio attivo. Questo può essere spiegato con una difficoltà nell'accesso ai siti di adsorbimento quando la concentrazione della molecola è elevata.

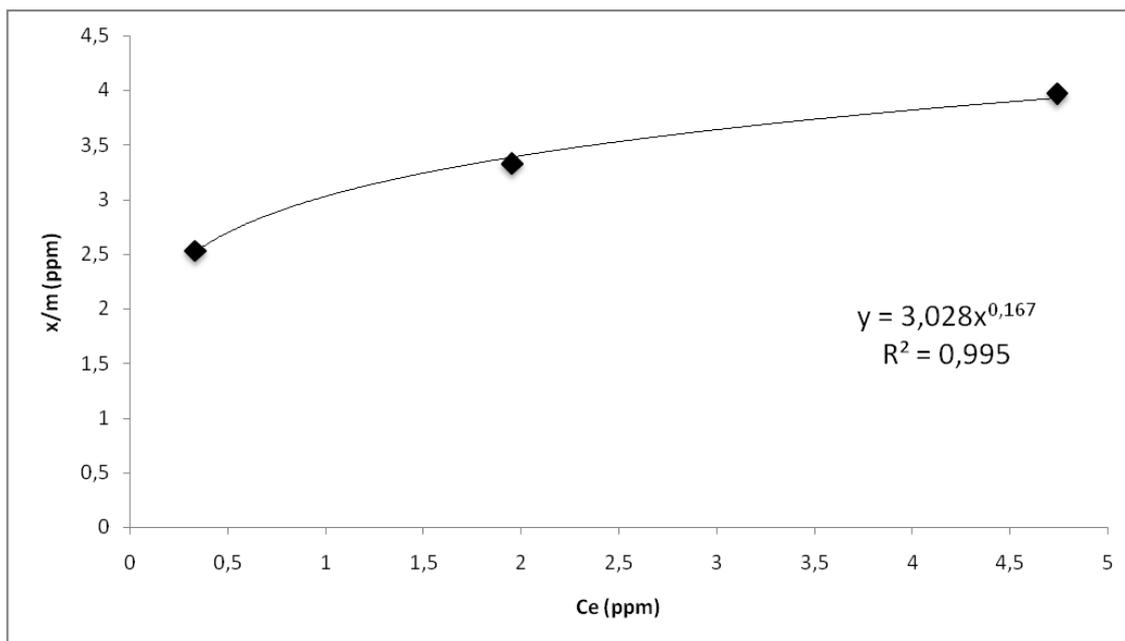


Fig. 9. Isotherma di adsorbimento dell'imidacloprid.

Anche Nemeth-Konda et al. (2002) hanno riscontrato per l'imidacloprid isoterme di tipo L con un valore di $1/n$ di 0,76. Gli stessi autori hanno osservato che l'imidacloprid veniva desorbito in misura del 47-77% e che la quantità rilasciata era inversamente proporzionale alla quantità presente sui siti di adsorbimento.

Fernandez-Bayo et al. (2007) hanno valutato l'adsorbimento dell'imidacloprid in diversi suoli addizionati e non con vermicompost. L'adsorbimento è risultato correlato al contenuto di sostanza organica del suolo ed è aumentato con l'aggiunta di vermicompost. La percentuale di adsorbimento variava dal 18 al 51% mentre sul vermicompost da solo era del 79%. I valori di $1/n$ sono risultati inferiori a 1 ma molto più alti (0,62-0,81) rispetto a quello osservato nella nostra sperimentazione (0,17).

12.6. Degradazione dell'imidacloprid nel suolo dopo applicazioni ripetute

L'imidacloprid ha subito una degradazione molto più lenta rispetto al NAA. Questo ha determinato un progressivo accumulo della sostanza man mano che il principio attivo veniva aggiunto al suolo. Infatti la concentrazione della sostanza, che dopo la prima applicazione era di 6,0 ppm, ha raggiunto il livello di 19,2 ppm dopo la quinta applicazione (Fig. 10).

La percentuale di degradazione è apparsa più alta dopo la prima applicazione (63%) rispetto alle due applicazioni successive (84 e 87% rispettivamente). Dopo la quarta applicazione si è degradato del 74 % e dopo la quinta applicazione del 69%. Il fatto che l'imidacloprid scompaia in misura maggiore dopo il primo trattamento rispetto al secondo, fa ipotizzare che alla scomparsa della molecola abbia contribuito il processo di adsorbimento che ha reso parte del composto non estraibile. Probabilmente, in seguito alla seconda applicazione, solo una piccola parte del principio attivo è stata adsorbita consentendo un maggior recupero analitico. Questo sarebbe confermato dal basso coefficiente $1/n$ dell'isoterma di Freundlich che indica come l'adsorbimento diminuisca fortemente con un lieve aumento della concentrazione della molecola.

L'incremento della velocità di degradazione dopo l'ultima applicazione potrebbe essere imputabile ad un aumento della microflora degradante.

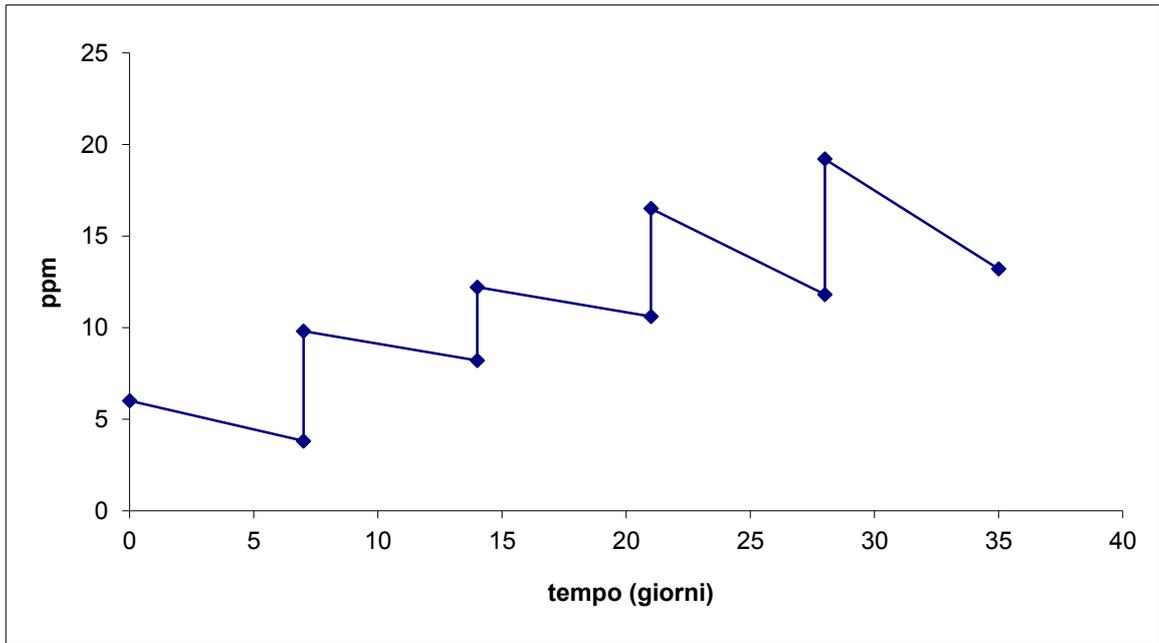


Fig 10. Concentrazioni di imidacloprid nel suolo in seguito ad applicazioni ripetute.

Altri lavori riportano risultati che dimostrano come l'imidacloprid si degradi nel suolo abbastanza lentamente. Infatti, Baskaran et al. (1999) hanno ottenuto tempi di semivita compresi tra 175 e 1576 gg in cinque differenti suoli.

In studi di laboratorio, Sholtz e Spiteller (1992) hanno trovato tempi di semivita di 48 gg in presenza di vegetazione e 190 gg senza vegetazione. La cinetica di degradazione è risultata di primo ordine.

Rauchard et al. (1996) hanno riportato, con prove di campo, un tempo di semivita per l'imidacloprid di 36 giorni. In generale, i più importanti steps metabolici osservati sono: ossidazione a livello del gruppo imidazolidinico, riduzione o perdita del nitrogruppo, idrolisi ad acido 6-cloronicotinico, produzione di CO₂.

El-Hamady (2008) hanno appurato che parte dell'imidacloprid applicato al suolo veniva legato permanentemente alla matrice solida quindi non recuperato con il metodo di estrazione adottato. L'entità dei residui legati aumentava con l'incremento del tempo intercorrente tra l'applicazione e l'estrazione. La quantità riconducibile ai residui legati variava dal 22 al 53% nell'ambito della durata della sperimentazione (28 gg).

La formazione di residui legati è da molti considerata una via di dissipazione del fitofarmaco in quanto questo risulta biologicamente inerte. Tuttavia, sebbene i residui legati siano fortemente stabilizzati, possono venir rilasciati dalle particelle di suolo e venir biodegradati o assorbiti dalle piante. (Raman e Rao, 1988).

Sono state formulate numerose ipotesi per spiegare la formazione di residui legati: legame chimico con i costituenti organici del suolo, incorporazione nei polimeri fenolici, bioincorporazione in strutture cellulari. Tutte le ipotesi includono il ruolo fondamentale della sostanza organica e dei microrganismi del suolo. Gli acidi fulvici sembra siano importanti nelle fasi iniziali di immobilizzazione dei residui. Tuttavia, con il passare del tempo, la proporzione di residui legata agli acidi fulvici diminuisce mentre aumenta quella associata a sostanze a più alto grado di polimerizzazione (Bertin et al, 1991).

12.7. Analisi DGGE della comunità eubatterica dopo trattamento con imidacloprid

I dati che si ritrovano in letteratura relativi all'effetto dell'insetticida imidacloprid sulla microflora del suolo appaiono esigui, per tale ragione è stato condotto tale studio al fine di valutare l'impatto della molecola sulla comunità eubatterica del suolo.

È stato utilizzato il medesimo approccio dello studio con l'acido naftalene acetico, ovvero estrazione del DNA direttamente dai campioni di suolo, amplificazione mediante reazione a catena della polimerasi del gene 16S del rDNA e successiva analisi elettroforetica in gradiente denaturante ottenuto con urea e formammide.

I patterns elettroforetici relativi ai campioni di suolo trattati con l'insetticida sono mostrati nella Fig. 11.

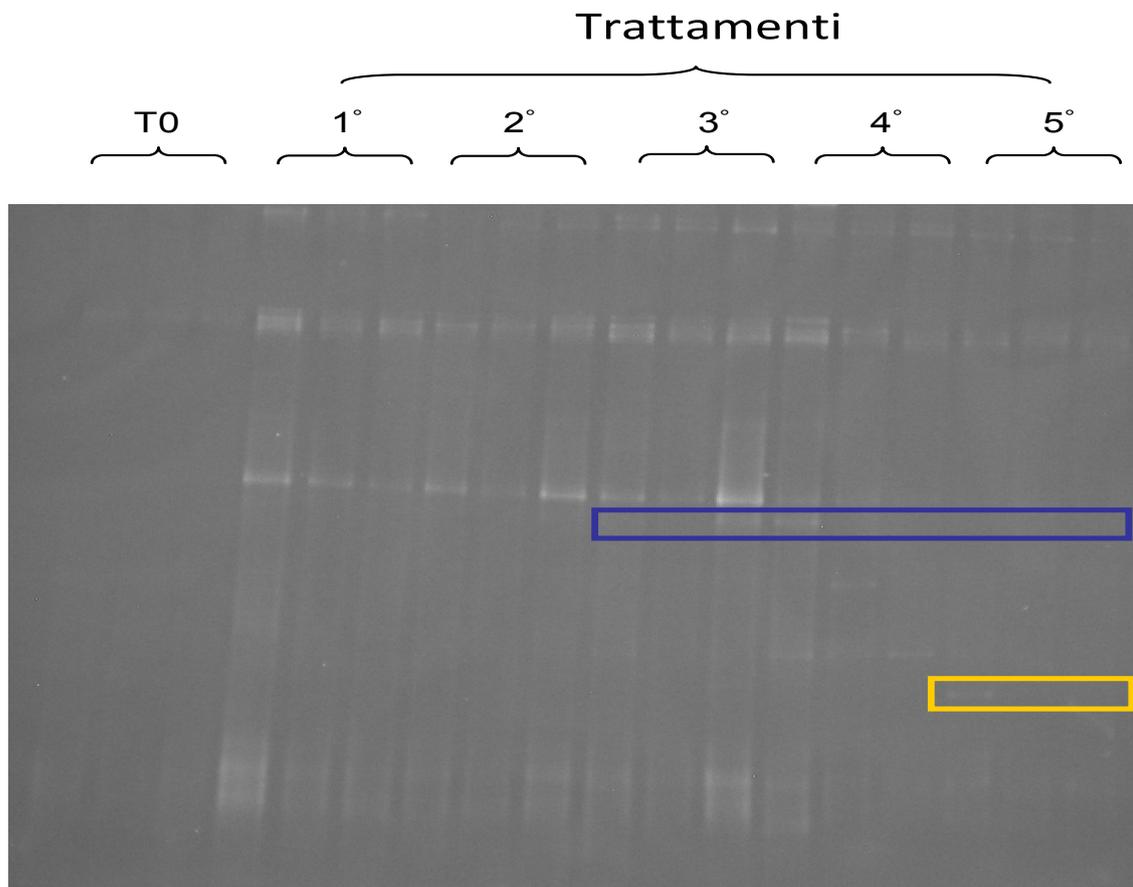


Fig. 11. Gel DGGE relativo alla comunità batterica trattata con imidacloprid.

I gel DGGE mostrano la comparsa di due bande, indicate dai rettangoli blu e giallo. La banda indicata dal rettangolo blu compare dopo la terza applicazione della molecola e persiste sino alla fine della prova; la banda, invece indicata dal rettangolo giallo, compare dopo l'ultimo trattamento di imidacloprid.

Nella Fig 12 è riportata la prova di controllo effettuata non trattando i campioni di suolo con l'insetticida.

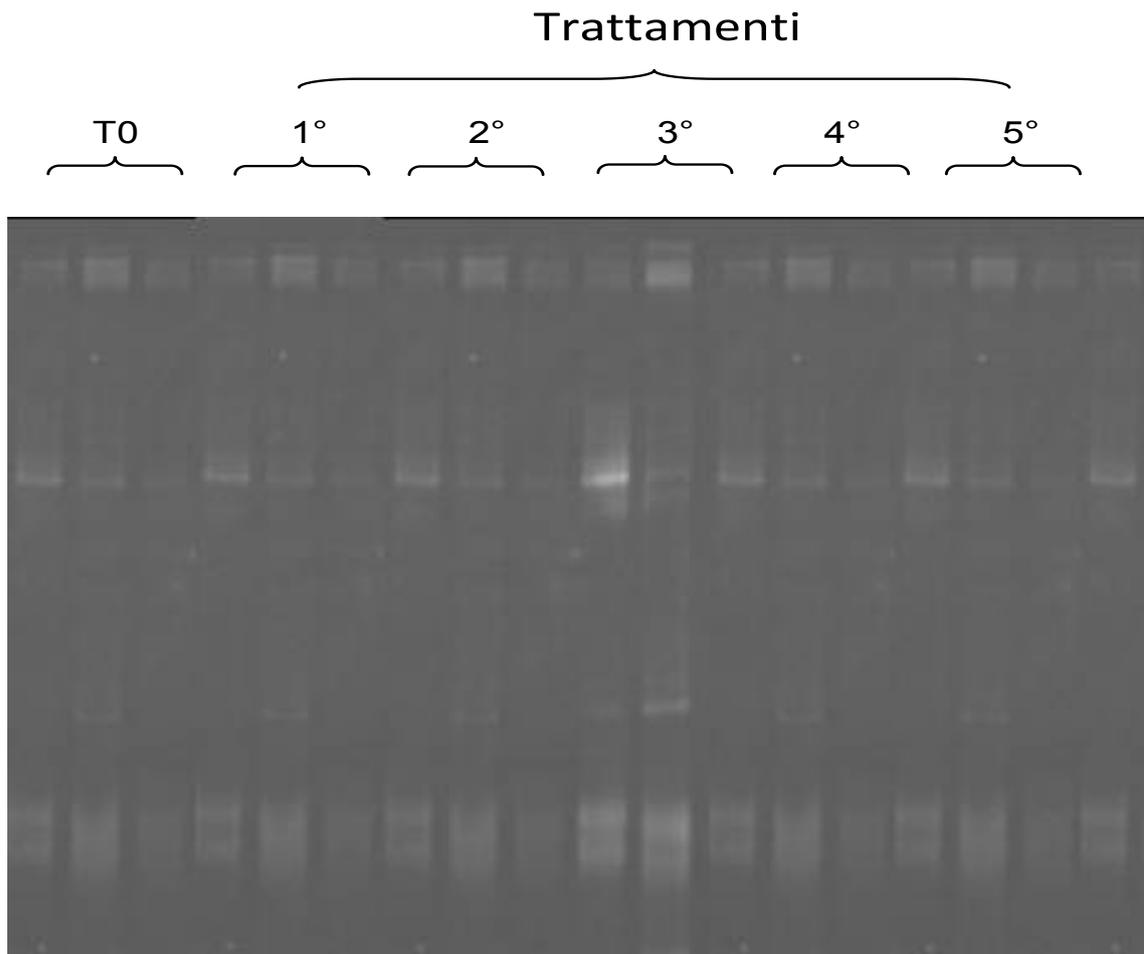


Fig. 12. Gel DGGE relativo alla comunità batterica non trattata con imidacloprid.

I profili elettroforetici relativi al DNA della comunità eubatterica non trattata con l'insetticida non mostrano differenze significative. Come è evidente dalla figura, le bande nel gel DGGE sono presenti in egual numero ed intensità nei diversi campioni esaminati.

Risulta quindi ipotizzabile che le bande, segnalate dai due rettangoli, siano influenzate soltanto dalla presenza dell'imidacloprid.

I risultati, ottenuti con l'approccio molecolare DGGE, non solo evidenziano un effetto stimolatore da parte dell'insetticida testato sulla microflora del suolo ma confermano quanto ottenuto con le isoterme di adsorbimento e le cinetiche di degradazione.

È presumibile che durante la prima settimana la molecola venga adsorbita dalla sostanza organica del suolo e per questa ragione viene degradata soltanto del 40%, i gel DGGE sono un'ulteriore conferma di tale dato non mostrando alcuna specie microbica specializzata. Successivamente i dati ottenuti dalle cinetiche di degradazione mostrano un'accelerazione del processo di degradazione della molecola, confermato dall'analisi DGGE con la presenza delle due bande.

I dati ottenuti in questo lavoro mostrano che entrambe le molecole testate, quali acido naftalene acetico ed imidacloprid, non hanno effetti tossici sulla comunità eubatterica, anzi all'interno di quest'ultima vi sono delle specie microbiche specializzate, in grado di crescere e selezionarsi in presenza di tali composti xenobiotici.

BIBLIOGRAFIA

Alsayed H., Pascal-Lorber S., Nallanthigal C., Debrauwer L. e Laurent F., 2008. *Transfer of the insecticide [¹⁴C] imidacloprid from soil to tomato plants*. Environ Chem. Lett., 6: 229–234.

Baskaran S., Kookana R. S. e Naidu R., 1999. *Degradation of bifenthrin, chlorpyrifos and imidacloprid in soil and bedding materials at termiticidal application rates*. Pestic. Sci. 55:1222-1228.

Beadle C.A. e Smith A.R.W., 1982. *The purification and properties of 2,4-dichlorophenol hydroxylase from a strain of Acinetobacter species*. Eur. J. Biochem., 123: 323-332.

Bej A. K., Perlin M. e Atlas R. M., 1991. *Effect of introducing genetically engineered microorganisms on soil microbial community diversity*. FEMS Microbiol. Letts., 86: 169-175.

Bertin, G., Schiavon, M., Portal, J.M. e Andreux, F., 1991. *Contribution to the study of non-extractable pesticide residues in soils: Incorporation of atrazine in model humic acids prepared from catechol*. In: Berthelin, J. (Ed.), Diversity of Environmental Biogeochemistry. Elsevier, Amsterdam, 105-110.

Bollag J. M. e Loll M. J., 1983. *Incorporation of xenobiotics into soil humus*. Experientia, 39: 1221-1231.

Bonomo L., Saponaro S., Renoldi F., 2005. *Bonifica dei Siti, Caratterizzazione e Tecnologie di Risanamento*, McGraw-Hill.

Burchfield H.P. e Storrs E. E., 1957. *Effect of chlorine substitution and isomerization on the interaction of s-triazine derivatives with conidia of Neurospora sitophila*. Contrib. Boyce Thompson Inst., 18: 429-462.

Chacko C.I. e Lockwood J.L., 1967. *Accumulation of DDT and dieldrin by microorganisms*. Can. J. Microbiol., 13: 1123-1126.

Chaudry G.R. e Huang G.H., 1988. *Isolation and characterisation of a new plasmid from a Flavobacterium sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*. J. Bacteriol., 170: 3897-3902.

- Cox L., Koskinen W.C., Celis R., Yen P.Y., Hermosin M.C., e Cornejo J., 1998. *Sorption of Imidacloprid on Soil Clay Mineral and Organic Components*. Soil Sci. Soc. Am. J., 62: 911–915.
- Cox L., Koskinen W.C, e Yen P. Y., 1998. *Changes in Sorption of Imidacloprid with Incubation Time*. Soil Sci. Soc. Am. J., 62: 342–347.
- Cripps R.E. e Roberts T.R., 1978. *Microbial degradation of herbicides*. In: Pesticide microbiology, Hill I.R. e Wright S.J.L. (eds), 669-732, Academic Press, London.
- Davini E., Di Leo C., Grillo G., Molinari M., Nardella A., e Robertiello A., 2001. *La bonifica biologica di siti inquinati da idrocarburi*. Eni Tecnologie e Agip Petroli, Hoepli Editore.
- Dougherty J.M. e G.R. Lanza G.R., 1989. *Anaerobic sub-surface soil microcosms: methods to monitor effects of organic pollutants on indigenous microbial activity*. Tox. Assess., 4: 85-104.
- Dumontet S., P. Perucci, A. Scopa e A. Ricciardi., 1993. *Sulfonylureas: Preliminary study on the effect on selected microbial strains and soil respiration*. Soil Sci., 1: 193-198.
- El-Hamady Sherif E., Kubiak R. e Derbalah Aly S., 2008. *Fate of imidacloprid in soil and plant after application to cotton seeds*. Chemosphere 71: 2173–2179.
- Engelhardt G., Rast H.G. e Wallnofer P.R., 1977. *Bacterial metabolism of substituted phenols. Oxidation of 4-(methylmercapto)-and 4-(methylsulfinyl)-phenol by Norcadia spec. DEM 43251*. Arch. Microbiol., 22: 284-288.
- Felske A., Akkermans A. D. L. e De Vos W. M., 1998. *Quantification of 16S rRNAs in Complex Bacterial Communities by Multiple Competitive Reverse Transcription-PCR in Temperature Gradient Gel Electrophoresis Fingerprints*. Appl. Environ. Microbiol., 11:4581-4587
- Fernández-Bayo J.D., Nogales R. e Romero E., 2007. *Improved retention of imidacloprid (Confidor®) in soils by adding vermicompost from spent grape marc*. Science of the Total Environment, 378: 95-100.
- Filip Z., 2002. *International approach to assessing soil quality by ecologically-related biological parameters*. Agric. Ecosyst. Environ., 88: 169–174.

- Florenzano G., 1983. *Fondamenti di microbiologia del terreno*. REDA, Roma.
- Foschi, S., Brunelli, A. e Ponti, I., 1985. *Terapia vegetale*. Ed agricole Bologna, pp. 442.
- Frear D.S. 1975 *The benzoic acid herbicides*. In: *Herbicides: chemistry degradation and mode of action*, Kearney P.C. e Kaufman D.D. (eds), 541-503. Marcel Dekker, New York.
- Gamar Y. e Gaunt J.K., 1971. *Bacterial metabolism of 4-chloro-2-methylphenoxyacetate, formation of glyoxylate by side-chain cleavage*. *Biochem. J.*, 122: 527-531.
- Gambino G. L., Pagano P., Scordino M., Sabatino L., Scollo E., Traulo P. e Gagliano G., 2008. *Determination of Plant Hormones in Fertilizers by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection: Method Development and Single-Laboratory Validation*. *Journal of AOAC International* Vol. 91, No. 6.
- Gans J., Wolinsky M. e Dunbar J., 2005. *Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil*. *Science*, 309: 1387-90.
- Gibson. D.T. e Yeh, W. K. (1973). *Microbial degradation of aromatic hydrocarbons*. *The Microbial Degradation of Oil Pollutants*. Ed. by Ahearn, D.G. and Meyers, S .P. Louisiana State University. Baton Rouge, LA. Publication No. LSU-SG-734: 33-38.
- Giles C.H., McEwan T.H., Nakhwa SN., Smith D., 1960. *Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherm, and its use diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids*. *J. Chem. Soc.*, 4: 3973-3993.
- Graetz D.A., G. Chesters, Daniel T.C, Newland L.W. e Lee C.B., 1970. *Parathion degradation in lake sediments*. *J. Wat. Poll.Cont. Fed.*, 12: 76-81.
- Hammond M.W. e Alexander M., 1972. *Effect of chemical structure on microbial degradation of methyl-substituted aliphatic acids*. *Environ. Sci. Technol.*, 6: 732-735.
- Horvath R.S. , 1970. *Microbial cometabolism of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid*. *Bull. Environ.Contam.*, 5: 537-541.
- Horvath R.S., 1971. *Co-metabolism of methyl- and chloro-substituted catechols by an Achromobacter sp. possessing a new meta-cleaving oxygenase*. *Biochem. J.*, 119: 871-876.

- Juliastuti S.R., Baeyens J., Creemers C., Bixio D. e Lodewyckx E., 2003. *The inhibitory effects of heavy metals and organic compounds on the net maximum specific growth rate of the autotrophic biomass in activated sludge*. Journal of Hazardous Materials, 100: 271-283.
- Kieft T.L., 1999. *Microbial ecology of the vadose zone*. Microbial Biosystem: New Frontiers. Proceedings of the 8 th International Symposium on Microbial Ecology.
- Kilpi S., Backstrom V., Korhola M. 1980. *Degradation of 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA), 2,4-dichlorophenoxyacetic (2,4-D), benzoic acid and salicylic acid by Pseudomonas sp. HV3*. FEMS Microbiol. Lett., 8: 177-182.
- Korte F., Ludwig G. e Vogel J., 1962. *Umwandlung von Aldrin-(¹⁴C) und Dieldrin-(¹⁴C) durch Mikroorganismen, Leberhomogenate und Moskito-Larven*. Liebig Ann. Chem., 656: 135-140.
- Larink O. e Sommer R., 2002. *Influence of coated seeds on soil organisms tested with bait lamina*. European Journal of Soil Biology, 38: 287-290.
- Loos M.A., 1975. *Phenoxyalkanoic acids*. In: Herbicides: chemistry degradation and mode of action, Kearney P.C. e Kaufman D.D. (eds). Vol 1: 1-128. Marcel Dekker, New York
- Lyr H., Ritter G. e Banasiak L., 1974 *Detoxification of caboxin*. Z. Allg. Mikrobiol., 14: 313-320.
- Madigan M. T., Martinko J.M., Parker J., 2003. *Brock, Biologia dei microrganismi*. Vol. 1, Casa Editrice Ambrosiana, edizione italiana.
- Maier R.M. e Pepper I.L., 1995. *Terrestrial Environments*. In Microbial Biotechnology, Fundamentals of applied microbiology. Glazer A.N., Nikaido H., Edizioni Freeman.
- Malkomes H.P., 1981 *Effects of plant protection systems applied to winter cereals on biological activity in soils. Part I: dehydrogenase activity and straw decomposition*. Z. Pflkrankh. Pflschutz, Sonderheft IX: 301-311.
- Malkomes H.P., 1983. *Testing and evaluating some methods to investigate side effects of environmental chemicals on soil microorganisms*. Ecotoxicol. Environ. Safety, 7: 284-294.

- Martin-Laurent F., L. Philippot L., Hallet S., Chaussod R., Germon J.C., Soulas G., e Catroux G., 2001. *DNA Extraction from Soils: Old Bias for New Microbial Diversity Analysis Methods*. Appl. Environ Microbiol., 67: 2354-2359.
- Matsumura F. e Benezet H.J., 1978. *Microbial degradation of insecticides*. In: Pesticide Microbiology, Hill I.R. e Wright S.J.L. (eds), pag 648-667. Academic Press, London.
- McGhee I. e Burns R.G., 1995. *Biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid (MCPA) in contaminated soil*. Appl. Soil Ecol., 2: 143-154.
- McGrath S.P., Zhao F.J. e Lombi E., 2001. *Plant and rhizosphere processes involved in phytoremediation of metal-contaminated soils*. Plant and Soil., 232 (1-2): 207-214.
- McLaren A.D., 1975. *Soil as a system of humus and clay with immobilized enzymes*. Chem. Scr., 8: 9-97
- Mengoni A., Tatti E., Decorosi F. e Viti C., Bazzicalupo M., Giovannetti L., 2005. *Comparison of 16S rRNA and 16S rDNA T-RFLP approaches to study bacterial communities in soil microcosms treated with chromate as perturbing agent*. Microb Ecol., 50: 375-84
- Minard R.D., Liu S.Y. e Bollag J.M., 1981. *Oligomers and quinones from 2,4-dichlorophenol*. J. Agric. Food Chem., 29: 250-253.
- Mitterer M., Bayer H. e Schinner F., 1981 *The influence of fungicides on microbial activity in soil*. Z. Pflanzenern. Bodenkd., 144: 463-471.
- Miyazaki S., Boush G.M. e Matsumura F., 1969. *Metabolism of ¹⁴C-chlorobenzilate and ¹⁴Cchloropylate by Rhodotorula gracilis*. Appl. Microbiol., 18: 972-977.
- Muller A. K., Westergaard K., Christensen S. e Örensen S. J., 2001 *The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community*. FEMS Microbiology Ecology., 36: 11-19.
- Nairain Rai J. P., 1992. *Effects of long-term 2,4-D application on microbial populations and biochemical processes in cultivated soil*. Biol. Fertil. Soils., 13: 187-191.
- Nannipieri P., 1994. *The potential use of soil enzymes as indicators of productivity, sustainability and pollution*. In: Soil Biota. Management in Sustainable Farming

Systems, Pankhurst C.E., Doube B.M., Gupta V.S.R. e Grace P.R. (eds): 238-244. CSIRO, Adelaide, Australia.

Nannipieri P., Greco S. e Ceccanti B., 1990. *Ecological significance of the biological activity in soil*. In: Soil Biochemistry, Bollag J.M. e Stotzky G. (eds), Vol 6: 293-355. Marcel Dekker, New York.

Nemeth-Konda L., Füleky Gy, Morovjan Gy. Csokan P., 2002. *Sorption behaviour of acetochlor, atrazine, carbendazim, diazinon, imidacloprid and isoproturon on Hungarian agricultural soil*. Chemosphere 48: 545-552.

Paul E.A., Clark F.E., 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego USA.

Pelczar M.J., Chan E.C.S., e Krieg N.R., 1986. *Microbiology*. McGraw-Hill Book Company. New York.

Perucci P. e Scarponi L., 1994. *Effects of the herbicide imazethapyr on soil microbial biomass and various enzyme activities*. Biol. Fertil. Soils, 14: 237-240.

Perucci P., Vischetti C. e Battistoni F., 1999. *Rimsulfuron in a silty clay loam soil: interferences on microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions*. Soil Biol. Biochem., 31: 195-204.

Pieper D.M., Reineke W., Engesser K.H. e Knackmuss H.J. 1988. *Metabolism of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and 2-methylphenoxyacetic acid by Alcaligenes eutrophus JMP 134*. Arch. Microbiol., 150: 95-102.

Radaelli L. e Calamai L. 2001. *Chimica del terreno*. Piccin Ed., Padova.

Raman, S. e Rao, C., 1988. *The kinetics of extraction of soil-applied metoxuron by methanol and its biological implications*. Water Air Soil Pollut. 38:217-222.

Renella G., Landi L. e Nannipieri P., 2004. *Degradation of low molecular weight organic acids complexed with heavy metals in soil*. Geoderma, 122: 311-315.

Ronchi E., 2002. *Un Futuro Sostenibile per l'Italia*. Rapporto ISSI 2002, Editori Riuniti.

Roszak D.B. e Colwell R.R., 1987. *Survival strategies of bacteria in the natural environment*. Microbiol., 51: 365-379.

- Rouchaud J., Gustin F. e Wauters A. 1996. *Imidacloprid insecticide soil metabolism in sugar beet field crops*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56:29–36
- Sandaa R.A., Torsvik V. e Enger Ø., 2001. *Influence of long-term heavy-metal contamination on microbial communities in soil*. Soil Biology & Biochemistry, 33: 287–295.
- Sandmann E., Loos M.A. e Van Dyk L.P., 1988. *The microbial degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil*. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 101: 1-51.
- Schinner F., Bayer H. e Mitterer M., 1983. *The Influence of herbicides on microbial activity in soil materials*. Bodenkultur, 34: 22-30.
- Scholz, K. e Spitteller M., 1992. *Influence of Groundcover on the Degradation of ¹⁴C-Imidacloprid in Soil*. Brighton Crop Protection Conference. Pests and Diseases. 883-888.
- Scow K., 2008. *Lectures in Soil Microbiology*. Dept. of Land, Air, and Water, University of California Davis.
- Sessitsch A., Weilharter A., Gerzabek H., Kirchmann H. e Kandeler E., 2001. *Microbial Population Structures in Soil Particle Size Fractions of a Long-Term Fertilizer Field Experiment*. Applied and Environmental Microbiology, 67: 4215-4223.
- Sobolev D., Begonia M. F. T., 2008., *Effects of Heavy Metal Contamination upon Soil Microbes: Lead-induced Changes in General and Denitrifying Microbial Communities as Evidenced by Molecular Markers*. International Journal of Environmental Research and Public Health., 5: 450-456.
- Sordergren A., 1971. *Accumulation and distribution of chlorinated hydrocarbons in cultures of Chlorella pyrenoidosa*. Oikos, 22: 215-220.
- Soulas G., 1993. *Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial community responsible for 2,4-D mineralization in soil*. Soil Biol. Biochem., 25: 443-449.
- Timms P. e McRae I.C., 1983. *Reduction of fensulfothion and accumulation of the products fensulfothion sulfide by selected microbes*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 31: 112-115.

Turco R.F. e Sadowsky M., 1995. *The microflora of bioremediation*. In: Bioremediation: Science and Application, Special Publ. No. 43, Soil Science Society of America, Madison, WI: 87-102.

Viggiani, G., 1994. *Lotta biologica ed integrata nella difesa fitosanitaria*. Ed. Liguori, Napoli: 517.

Viti C., Pace A., e Giovannetti L., 2003. *Characterization of Cr(VI)-resistant bacteria isolated from chromium-contaminated soil by tannery activity*. Curr. Microbiol., 46: 1-5.

Wardled A., e Parkinsiond D., 1990. *Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity*. Plant and Soil., 122: 21-28.

Weast R.C., 1984. *CRC Handbook of chemistry and physics*, 64th edn. Boca Raton, CRC Press.