

# *I fitofarmaci ed i microrganismi del suolo*

Piero PERUCCI  
DI.BI.AG.A.  
Facoltà di Agraria  
Università degli Studi di Ancona

Il suolo è un sistema biologico in precario equilibrio, ed ogni disturbo dell'ambiente può determinare modificazioni dell'attività della microflora e conseguentemente della fertilità del suolo. Il crescente uso dei fitofarmaci, sebbene con l'intento di proteggere le colture, altera per azione diretta o indiretta, questo equilibrio per tempi brevi, medi o lunghi, in dipendenza se il prodotto agisce rapidamente o persiste per molto tempo nella sua forma iniziale o nelle sue forme metaboliche.

Una volta introdotta nell'ambiente, la molecola del fitofarmaco è sottoposta a processi di degradazione abiotica (fotolitica o chimica) e biotica o biologica. La degradazione fotolitica generalmente ha luogo quando la molecola del fitofarmaco è irradiata dalla luce solare, la degradazione chimica avviene quando la molecola è chimicamente instabile nelle condizioni ambientali in cui si trova, mentre la degradazione biotica, definita con il termine "biodegradazione", è quella dovuta alle trasformazioni ad opera degli organismi viventi. Prove condotte in suoli sterili e non sterili hanno evidenziato che tra i processi degradativi nel suolo quello ad opera dei microrganismi è la fonte primaria di trasformazione o degradazione dei fitofarmaci rispetto ai meccanismi fisici e chimici. L'importanza dei microrganismi non è però sorprendente, poiché la diversità e la non unicità delle loro attività metaboliche li rende capaci di prosperare in nicchie ecologiche che sono altrimenti inospitali.

Pertanto, i microrganismi sono agenti chiave nella degradazione di una vasta gamma di molecole organiche in ecosistemi terrestri ed acquatici in seguito a processi aerobici, anaerobici e metabolismo chemiolitotrofico (Anderson *et al.*, 1995). Alcuni xenobiotici sono resistenti alla degradazione microbica e persistono per tempi lunghi nell'ambiente, altri sono invece trasformati in intermedi, che occasionalmente possono avere tossicità maggiore del p.a.

I microrganismi del suolo sono numerosi, e secondo uno studio di Dommergues e Mangenot (1970) i batteri sono i più numerosi con una densità compresa tra  $10^6$  e  $10^9$  batteri/grammo di suolo e gli attinomiceti sono meno densi di un fattore 100, mentre i funghi sono stati stimati compresi nel range  $10^4$ - $10^6$  unità/grammo di suolo (Paszczynski e Crawford, 2000).

## **1 - Metodologie applicate negli studi degli effetti dei fitofarmaci sulla microflora del suolo**

Nonostante le difficoltà nel definire con precisione le proporzioni tra i gruppi di microrganismi, la maggior parte dei ricercatori che studiano gli effetti dei fitofarmaci sulla biomassa microbica del suolo adottano principalmente o la tecnica diretta, quale quello della

conta (Hattori e Hattori, 2000) per la determinazione della microflora in generale e di alcune specie di microrganismi o le tecniche indirette per la stima dell'attività globale della biomassa microbica o di alcuni microrganismi che svolgono un ruolo ben preciso nei cicli biologici.

## 1.1 Metodo diretto

Molto raramente le conte dei microrganismi sono fatte direttamente con un microscopio in una sospensione di suolo dopo trattamento. Con tale tecnica, che pur avendo il vantaggio di essere condotta in condizioni ecologiche, risulta difficile distinguere fra microrganismi vivi e morti, in quanto quelli morti non possono essere contati per la caratterizzazione del livello biologico di un suolo.

## 1.2 Misura dell'attività della microflora

Un metodo interessante per testare gli effetti dei fitofarmaci sulla microflora del suolo consiste nella misura della sua attività biologica totale. Esistono due tipi di tecniche per determinare l'attività totale: a) quelle classiche che tendono a caratterizzare la microflora propria del suolo e b) altre tecniche che valutano l'attività della microflora mediante misure di attività enzimatiche.

### a) Tecniche classiche

-) Misura dell'attività biologica: descritta da Pochon e Tardieux (1962) che consiste nel valutare la rapidità con cui i microrganismi del suolo crescono in un mezzo usato per la conta in presenza di un substrato specifico. Queste tecniche sono usate per lo studio della maggior parte dei gruppi fisiologici della microflora del suolo, per esempio i microrganismi attivi nei cicli del carbonio e dell'azoto: i batteri proteolitici (con siero) e amilolitici (con amido), i batteri nitrificanti (con ammonio solfato e sodio nitrato), denitrificanti (con potassio nitrato) e ammonificanti (con tirosina).

-) Misure cinetiche di degradazione del substrato: tutte queste cinetiche sono effettuate incubando, in condizioni ottimali di temperatura ed umidità, un fitofarmaco direttamente con il suolo stesso. Le cinetiche di degradazione vengono valutate determinando la scomparsa del p.a. o la formazione di un prodotto metabolico con il trascorrere del periodo di incubazione.

-) Misure di respirazione totale del suolo: vengono effettuate misurando l'ossigeno assorbito o la CO<sub>2</sub> prodotta secondo la tecnica di Warbug direttamente sul suolo, trattato o no, o arricchito con nutrienti per misurare gli effetti del pesticida sul metabolismo. Questa tecnica è utilizzabile per misure in tempi relativamente brevi e con piccole quantità di suolo. Per tempi lunghi è spesso usata la tecnica dello sventolare il suolo con aria libera di CO<sub>2</sub>, detta aria arricchendosi con CO<sub>2</sub> prodotta metabolicamente dalla microflora viene fatta passare su una trappola per CO<sub>2</sub> e poi titolata. Con tale tecnica, Anderson e Domsch (1973) hanno valutato l'incidenza dei funghi e dei batteri nella respirazione del suolo.

-) Misure di radioattività: la tecnica radiorespirometrica rappresenta un valido e pratico metodo per la misura della velocità di mineralizzazione dei substrati marcati con <sup>14</sup>C.

### b) Misure di attività enzimatica del suolo

Questa tecnica è basata sull'enzimologia del suolo, in quanto una larga porzione degli enzimi del suolo sono di origine biologica (extra- ed intracellulari). Molti ricercatori hanno cercato di valutare questa frazione dopo trattamento con erbicidi sperando di trovare una correlazione tra attività enzimatica e fertilità del suolo.

### 1.3 Misure di biomassa

La valutazione di questo parametro ha ricevuto, in questo ultimo decennio, molta attenzione e provvede a stimare gli effetti dei fitofarmaci sulla microflora. Il metodo maggiormente impiegato in questa valutazione è quello proposto da Jenkinson e Powlson (1976) modificato da vari autori, ed è basato sulla misura del flusso di CO<sub>2</sub> sviluppato dopo la fumigazione del suolo con CHCl<sub>3</sub>. Altri metodi si basano principalmente sulla determinazione di alcuni costituenti della biomassa microbica quali ad esempio: misura di ATP (presente in tutte le cellule viventi; Jenkinson *et al.*, 1979), acido mumarico (3-O-carbossietil-D-glucosammina, è un costituente delle pareti cellulari di batteri ed alghe blu-verdi; Millar e Casida, 1970), chitina (un polimero della N-acetilglucosammina, un costituente strutturale delle pareti dei funghi; Foster, 1981), acidi nucleici (Anderson, 1967), ecc.

## 2 - 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 trasformazioni 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 pesticidi, 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.

### 2.1 - Biodegradazione (mineralizzazione).

L'aspetto più interessante e ambientalmente più importante 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 CO<sub>2</sub> ed in altri composti inorganici ed i microrganismi ottenerne le loro necessità per crescere. L'utilizzo di 5 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.

## 2.2 - 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. viene trasformato in semialdeide 3,5-dicloro-2-idrossimuconica (Horvath, 1971).

### FIGURA 1

Il cometabolismo può portare anche all'accumulo di prodotti intermedi con tossicità maggiore o minore, e così causare un impatto ambientale negativo, ed in alcuni casi anche inibire lo sviluppo microbico così come il loro metabolismo (è stato osservato che il catecolo ed alcuni suoi derivati inibiscono alcune ossigenasi importanti nella degradazione delle molecole aromatiche, Tranter e Cain, 1967; Gibson e Subramanian, 1984).

## 2.3 - 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.

Un particolare esempio è dato dal *Fusarium oxysporum* il quale forma degli azobenzeni molto complessi (Kaufman *et al.* 1972).

### FIGURA 2

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 amminoacidi. 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.

## 2.4 - 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.

### **3 - Fattori che influenzano la biodegradazione dei pesticidi nei suoli**

Molto di ciò che è noto circa le caratteristiche biochimiche, fisiologiche e genetiche dei batteri che degradano i fitofarmaci proviene da studi effettuati in colture pure o miste. Comunque, le velocità e i modi di biodegradazione di un fitofarmaco nel suolo sono determinati da fattori che non possono essere duplicati in un sistema artificiale. Questi fattori sono generalmente specifici al fitofarmaco ed ai microrganismi del suolo che lo degradano, ed in molti casi sono interattivi: fitofarmaco (struttura, concentrazione e trattamento), suolo (umidità, temperatura, sostanza organica, argilla, pH e struttura) e microrganismi (numero, attività specifica e metabolismo/cometabolismo).

Esempi di microrganismi capaci di degradare i fitofarmaci possono essere trovati nel mondo microbico tra le diverse specie di batteri. Ogni tipo di processo fisiologico è inoltre rappresentato nella degradazione microbica di fitofarmaci: aerobico, anaerobico (fermentazione, riduzione-solfati, metanogenesi), chemolitotropico e fotosintetico. Un fitofarmaco può essere mineralizzato da un singolo microrganismo o da più microrganismi. Molti microrganismi del suolo, catalizzanti lo stesso o differente tipo di reazione, possono attaccare simultaneamente un fitofarmaco e la completa degradazione di questi può richiedere comunità di organismi che operando sequenzialmente sono quindi in grado di trasformare i metaboliti prodotti, cosicché la molecola è gradualmente degradata.

L'estrema eterogeneità e rapidità del cambiamento delle condizioni ambientali si riflettono nella distribuzione ed attività dei batteri aerobici responsabile della degradazione del fitofarmaco. Molte reazioni di trasformazione di un fitofarmaco possono avvenire in condizioni riducenti od ossidanti, ma spesso tali condizioni possono essere combinate per accelerare la degradazione. Un esempio è dato dal metossicloro (Fogel *et al.*, 1982). Infine molti dei microrganismi del suolo sono localizzati nello strato sottile di acqua che circonda le particelle del suolo. Rapidi e significativi cambiamenti di Eh dovuti alla respirazione microbica e alla limitazione della diffusione gassosa avvengono in questa zona (Sextone *et al.*, 1985).

Generalmente in pieno campo la degradazione di un fitofarmaco può essere più lenta in suoli collinari secchi piuttosto che in aree umide. La biodegradazione è più bassa nei climi freddi

piuttosto che nelle zone temperate o tropicali, inoltre la velocità decresce con la profondità (Johnson e Lavy, 1994).

## 4 - Reazioni biochimiche del metabolismo dei fitofarmaci

La velocità della degradazione microbica dei pesticidi in pieno campo dipendono da un gran dall'interazione delle condizioni ambientali. In genere le condizioni che promuovono la crescita dei microrganismi responsabile 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). Kearny *et al.* (1986) hanno presentato una review fornendo informazioni dettagliate e molto comprensive sulla degradazione di molti fitofarmaci ad opera di piante, animali e microrganismi.

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 subiscono immediatamente una rapida degradazione con piccoli periodi di induzione. Tale fenomeno potrebbe ridurre l'efficacia dei trattamenti ripetuti.

### FIGURA 3

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

#### 4.1 Reazioni di ossidazione

L'ossidazione dei fitofarmaci, che avviene frequentemente nei microrganismi, è uno dei processi metabolici più importante e procede in ambiente aerobico. I maggiori processi sono riportati qui di seguito. Tali reazioni sono catalizzate da enzimi quali: monoossigenasi, 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 reazione di trasformazione.

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

##### 4.1.1 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 rendendola così 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. A titolo di esempio in Figura 4 viene riportato il metabolismo a carico del metolachlor (Krause *et al.*, 1985) ed in Figura 5 quello del carbofuran (Behki *et al.*, 1994)

## FIGURA 4 - FIGURA 5

### 4.1.2. N-Dealchilazione

Molti pesticidi 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 (atrazina: Behki e Kahn, 1986; trifluralin: Zeyer and Kearny, 1983).

### 4.1.3. $\beta$ -Ossidazione

Molti fitofarmaci aromatici presentano un acido grasso in catena laterale che può essere metabolizzata mediante  $\beta$ -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 di un sostituito acido o-fenossialcano o nella catena laterale ha una forte influenza sulla naturalezza della  $\beta$ -ossidazione. Per un funzionamento normale la  $\beta$ -ossidazione richiede due protoni su entrambi gli atomi di carbonio  $\alpha$  e  $\beta$ . La reazione è ostacolata se negli atomi  $\alpha$  e  $\beta$  vi sono sostituenti, la presenza di sostituenti sugli altri atomi di carbonio della catena alifatica può semplicemente inibire la reazione (Hammond e Alexander, 1972).

Questo tipo di reazione è stata osservata in batteri (Taylor e Wain, 1962), attinomiceti (Webley *et al.*, 1958), funghi (Byrd e Woodrock, 1957) e piante, e presenta uno schema di reazione come sotto descritto in Figura 6:

## FIGURA 6

### 4.1.4 – Solfossidazione

La solfossidazione è quella reazione che implica la conversione enzimatica dell'atomo di zolfo (presenta 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.

### 4.1.5 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 nei microrganismi a carico dei composti naturali è stata riscontrata anche a carico di vari pesticidi. 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) a carico del *Rhodotorula gracilis*.

### FIGURA 7

#### 4.1.6 - 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 il meccanismo è 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 eteri o gruppi alcossilici. La rottura di legami eteri 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.

### FIGURA 8

#### 4.1.7 – 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 pesticidi con anelli aromatici che presentano diversi sostituenti sono molto più resistenti all'attacco microbico in funzione del tipo di legame, dello specifico sostituito, 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, ed i 2 gruppi idrossilici possono posizionarsi sia in orto o in para al sostituito ma comunque devono essere adiacenti (derivato del catecolo), e 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 (Topp *et al.*, 1997).

### FIGURE 9 e 10

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)

### FIGURA 11

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 nei cicli degli acidi tricarbossilici quali l'acido succinico e l'acetil-CoA (van der Meer, 1994).

### FIGURA 12

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 biperidilico) 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 (Orpin *et al.*, 1972).

### FIGURA 13

#### 4.1.8 – 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).

#### 4.1.9 – 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; Bollag *et al.* 1995) isolato da funghi *Rhizoctonia praticola* davano il dimero ed a composti a più alto grado di polimerizzazione.

### FIGURE 14

## 4.2 Reazioni di riduzione

Le reazioni di riduzione è una reazione 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 (Grbic-Galic, 1990).

Le reazioni di maggior importanza sono riportate in Tabella 3.

**Tabella 3** – Reazioni di riduzione nel metabolismo microbico

Riduzione del nitro gruppo:	$\begin{array}{l} \text{---RNO}_2 \\ \text{---RNO}_2 \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{ROH} \\ \text{RNH}_2 \end{array}$
Dealogenazione riduttiva:	$\text{Ar}_2\text{CHCCl}_3$	$\text{Ar}_2\text{CHCHCl}_2$
Riduzione del doppio o triplo legame:	$\begin{array}{l} \text{---Ar}_2\text{C}=\text{CH}_2 \\ \text{---RC}=\text{CH} \end{array}$	$\begin{array}{l} \text{Ar}_2\text{CHCH}_3 \\ \text{RCH}=\text{CH}_2 \end{array}$
Riduzione del Sulfossido:	$\text{---RS(=O)R'}$	$\text{RSR'}$



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 pesticidi alogenati in ambienti anaerobici (Tiedje *et al.*, 1987). Esempi specifici sono stati riportati in letteratura ed elencati qui di seguito: DDT dal *Aerobacter aerogenes* (Wedemeyer, 1966), Methoxychlor dal *K. pneumoniae* (Baarschers *et al.*, 1982), Lindano ( $\gamma$ -BHC) dal *Clostridium rectum* (Kurihara *et al.*, 1981) ed infine la sequenza di steps di numerose dealogenazioni riduttive nella mineralizzazione aerobica del PCP (pentaclorofenolo) ad opera del *Flavobacterium* sp (Liu *et al.*, 1996; Topp *et al.*, 1997).

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.

### 4.3 Reazioni di 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 richiede cofattori, le reazioni di idrolisi possono essere catalizzate da enzimi intracellulari o extracellularmente sia da idrolasi escrete da organismi viventi che/o da quelle rilasciate nell'ambiente circostante dopo la loro morte. Molti microrganismi, in particolare i funghi, escretano enzimi idrolitici fuori dalle cellule. Gli enzimi coinvolti nelle reazioni di idrolisi includono esterasi, amidasi, fosfatasi, idrolasi e liasi (vedi successivamente). Pertanto poiché i pesticidi presentano legami di eterificazione, di esterificazioni o ammidici possono sottostare facilmente ad una reazione di idrolisi producendo usualmente composti che hanno perso la loro attività tossica.

Munnecke *et al.* (1982) in una loro review hanno descritto in dettaglio l'idrolisi enzimatica di sei classi di pesticidi, affermando che a seguito dell'idrolisi di organofosfati, fenilcarbammati e ditioati si verificava una forte diminuzione della tossicità, mentre piccole variazioni di tossicità si avevano per le classi dei fenossiacetici, acilanilidi e feniluree.

### 4.4 Reazioni di 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 è la formazione di un gran numero di prodotti.

Le reazioni di sintesi ad opera dei microrganismi possono distinguersi in due tipi:

-) 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.

-) reazioni di condensazione i cui prodotti sono molecole oligomeri o polimeri. In questo tipo di reazione, piuttosto rara nel metabolismo dei microrganismi, sono state riscontrate reazioni con ammino acidi 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 o dalla lignina o da altre molecole, così come sintetizzate dagli stessi

microrganismi, i quali vengono condensati ossidativamente per formare polimeri quali costituenti base del materiale umico (Flaig *et al.*, 1975; Haider *et al.*, 1975; Sjoblad e Bollag 1981). Questo processo può avvenire attraverso reazioni chimiche, autoossidazioni o per mezzo di quella che è considerata il meccanismo primario nelle reazioni di sintesi nel suolo: l'ossidazione per mezzo di enzimi di origine microbica, quali fenolossidasi e perossidasi.

**Tabella 4:** microrganismi e reazioni da loro condotte.

*Trichoderma viride* metilazione di clorofenoli  
*Talaromyces wortmanii* acetilazione di aniline  
*Fusarium oxysporium* acetilazione di aniline  
*Paracoccus* sp. acetilazione aniline  
*Streptomyces* sp. formilazione ed acetilazione di aniline

Qui di seguito vengono riportati alcuni esempi relativi alle reazioni condensazione o copolimerizzazione tra derivati di fitofarmaci (fenolici ed amminici) e composti monomerici derivati dalla sostanza organica, come acido siringico, acido vanillico, orcinolo, ecc. Per esempio, il 2,4-diclorofenolo, un derivato del 2,4-D, in presenza di una laccasi del *Rhizoctonia praticola* polimerizza con l'acido siringico per dare una serie di composti dimeri e pentameri (Bollag *et al.*, 1980).

Haggbloom e Milligan (2000) riportano un modello di polimerizzazione tra un clorofenolo e l'acido siringico che porta alla formazione di una serie di composti (da dimeri a pentameri) contenente un solo atomo di cloro e legati fra di loro tramite un legame etereo in seguito a decarbossilazione dell'acido. Tale modello era stato precedentemente ipotizzato anche da Hoff *et al.* (1985) utilizzando una laccasi del *Trametes versicolor*. La stessa laccasi è anche in grado di condensare l'acido siringico anche con ammine aromatiche derivate da pesticidi (Bollag *et al.*, 1983).

## 5 – Enzimi coinvolti nel metabolismo dei fitofarmaci

Nella letteratura scientifica molte trasformazioni microbiologiche dei fitofarmaci vengono descritte con l'espressione metabolismo, ma solo un numero molto ridotto di studi hanno dimostrato la partecipazione attiva di un preparato enzimatico nella degradazione. Una prima review sull'adattamento di microrganismi ai fitofarmaci è stata pubblicata da Kearney e Kellog (1985).

Essendo i microrganismi i maggiori responsabili dell'attività enzimatica del suolo, quest'ultima può essere ragionevolmente distinta in diverse categorie (Schaffer, 1993)

Molti dati presenti in letteratura si riferiscono a prove condotte in laboratorio e le classi di enzimi maggiormente investigate si riferiscono a quelle che sono state considerate principalmente come indici di fertilità o qualità di un suolo. In particolare, grande attenzione è stata rivolta alle ossidoriduttasi ed alle idrolasi.

A partire dal 1950 l'attività enzimatica di un singolo enzima fu usato come indice di valutazione dell'attività microbiologica di un suolo (Skujins, 1978) ma tale approccio fu considerato sbagliato per tre ragioni:

1. le attività enzimatiche sono correlate a specifiche reazioni e pertanto non possono riflettere lo stato nutriente totale di un suolo o di tutta l'attività metabolica dei microrganismi,
2. l'attività enzimatica del suolo, dipendente anche dall'attività degli enzimi extracellulari immobilizzati sui colloidi, può non essere così sensibile ai fattori ambientali come l'attività microbiologica
3. l'applicazione di fertilizzanti può incrementare la produzione così come l'attività microbiologica ma essi possono diminuire l'attività enzimatiche (Nannipieri, 1994).

## **Tabella 5** – Possibili categorie di enzimi presenti nel suolo

- a) Intracellulari
- b) periplasmatici
- c) enzimi associati alle membrane cellulari
- d) enzimi associati alla sostanza umica
- e) enzimi secreti dalle cellule,
- f) enzimi extracellulari presenti nella soluzione circolante
- g) enzimi adsorbiti sui costituenti inorganici del suolo
- h) enzimi delle cellule non proliferanti
- i) enzimi legati a cellule morte o a detriti cellulari
- l) enzimi intracellulari fuorisciti da cellule
- m) enzimi complessati a substrati

Una estesa bibliografia è disponibile sulle interferenze dei fitofarmaci sull'attività enzimatica del suolo come testimoniano le numerose reviews (Anderson, 1978; Wainwright, 1978; Schaffer 1993). I risultati sono spesso contraddittori, e questo fatto dipende dalla complessa relazione tra fitofarmaci e popolazione microbica, tra fitofarmaci ed enzimi e tra fitofarmaci e colloidi 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 tale 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 colloidi 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).

### **5.1 - Ossidoriduttasi**

Tra le ossidoriduttasi quelle investigate con maggior frequenza sono state le deidrogenasi (almeno più di 300 lavori si possono riscontrare in letteratura) mentre scarsa attenzione è stata rivolta alle catalasi, perossidasi e fenolossidasi.

#### **a) Deidrogenasi**

Molti autori, tra i quali Anderson, Malkomes, Domsch, Sommerville hanno individuato questa classe come un utile indicatore per testare gli effetti secondari dei fitofarmaci sui microrganismi del suolo. Chiaramente non è possibile né significativo presentare un completo

esame della rilevante letteratura, in quanto in ogni lavoro a seconda del comportamento sono state suggerite ipotesi le più disparate, ma che tutte trovavano una giustificazione qualora l'andamento dell'attività deidrogenasica poiché questa era trovata correlata con altri parametri che vengono utilizzati per definire gli effetti secondari dei fitofarmaci sulla microflora 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 legati 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 riducono il significato di tali relazioni che devono essere attentamente valutati mediante il confronto delle rispettive condizioni sperimentali in cui tali risultati sono stati ottenuti.

Un lavoro di Malkomes (1981) condotto per 5 anni in pieno campo, su alcuni suoli sabbiosi limosi con contenuto in carbonio organico compreso tra 1.7-2.8 e pH compresi tra 6.9-7.0, sottoposti a rotazione con canna da zucchero, frumento ed orzo invernale e trattati successivamente con due diverse serie di miscele di pesticidi, una prima serie costituita da chlortorulon, mecoprop, carbendazin, tridimefon e oxydemeton-methyl e una seconda serie costituita da methadenzthiazuron, metoxuron, mecoprop, tridemorph, thiophanate-methyl e dimetoato, evidenziò un effetto inibente sulla deidrogenasi minore del 20% e che ha partire dal terzo anno ebbe luogo 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 per 20 settimane. Gli autori anche in questo caso 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 i quali osservarono un decremento dell'attività deidrogenasica solo dopo 2 settimane dal trattamento a cui seguiva un principio di incremento dopo 10 settimane e raggiungeva i stessi valori del controllo dopo 20 settimane. 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 (produzione di CO<sub>2</sub>) poteva essere una reazione di stress per l'adattamento dei microrganismi, con l'aumentare dello stress dovuto alla persistenza dei pesticidi si verificava una inibizione dell'attività respiratoria delle specie non resistenti mentre il conseguente aumento veniva attribuito alla crescita di specie resistenti che si nutrivano delle specie uccise.

Un successivo lavoro di Malkomes (1983) confrontando esperimenti condotti in presenza di dinoseb, sia in pieno campo che in laboratorio, evidenziò il fatto che in entrambi gli esperimenti vi fu 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 perdurò 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 un recupero di biomassa dagli strati più profondi del suolo.

Data la molteplicità delle ipotesi oltre alla contraddittorietà delle diverse risposte in termini di interferenze, 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, in tempi diversi a seconda della concentrazione e delle condizioni di incubazione, con ritorno ai valori dei rispettivi controlli. Stesso andamento fu osservato nel contenuto di C-biomassa. Gli autori ipotizzarono in questo caso che l'effetto tossico sui microrganismi era un effetto secondario e che in seguito alla lisi cellulare si sarebbe dovuto osservare un incremento immediato e temporaneo dell'attività deidrogenasica (e catalasica) essendo questo enzima intracellulare ed eventualmente il decremento dovrebbe essere osservato dopo un certo tempo probabilmente a causa dell'intervento delle proteasi. Il mancato incremento della deidrogenasi, così come la catalasi, è stato ipotizzato essere dovuto alla presenza di ossigeno molecolare disciolto nell'ambiente di reazione, poiché alle temperature più basse ed alle più elevate umidità si sono avuti effetti più duraturi e più significativi.

#### **b) Altre ossidoriduttasi**

I pochi dati reperibili in letteratura hanno messo in evidenza effetti contrastanti e concordanti così come osservato per le deidrogenasi. Infatti un simile comportamento è stato messo in evidenza in un lavoro di Perucci e Scarponi (1994) prima e da Perucci *et al.* (1999) poi, in presenza due erbicidi che presentano lo stesso bersaglio (ALS), l'imazetaphyr (un imidazolinone) ed il rimsulfuron (una solfonilurea). In presenza di imazetaphyr il comportamento della catalasi fu perfettamente uguale al 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.

## **5.2 – Idrolasi**

Svariate sono le attività idrolitiche investigate le quali si sono interessati dei diversi tipi di idrolisi: le esterasi (fosfatasi, solfatasi), le glucosidasi ( $\alpha$ - e  $\beta$ -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. (Al riguardo ci sono delle buone reviews.)

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 solo qualche sono state trovate correlate con il contenuto di fosforo disponibile del suolo. Svariati sono stati i pesticidi impiegati nello studio del comportamento di questo gruppo di enzimi in seguito a trattamento erbicidale. Una buona review è stata presentata da Schaffer (1993) ed i dati presentati indicano nella quasi totalità un effetto tossico di quasi tutte le classi di pesticidi investigate.

## **6 – Tecniche di misura nella valutazione dei rischi**

L'attività microbiologica di un suolo può essere determinata nel suo complesso con diverse metodologie tra cui: la respirazione, i cambiamenti nel contenuto di acidi nucleici e calcolo della carica energetica adenalinica (AEC adenylate energy charge), attività enzimatiche specifiche,

idrolisi del diacetato di fluoresceina (FDA), ecc. Come visto nel paragrafo precedente le ossidoriduttasi ed idrolasi sono le attività enzimatiche più studiate come indicatori di inquinamento o di risposta ai trattamenti. In accordo con quanto riportato da Nannipieri *et al.* (1997) l'uso di più criteri sembra essere un miglior approccio che non la singola determinazione.

## 6.1 - Respirazione e quoziente metabolico

L'evoluzione della CO<sub>2</sub> o l'assorbimento di O<sub>2</sub> sono tecniche spesso impiegate per la valutazione degli effetti di pesticidi sull'attività metabolica globale della popolazione microbica sia in condizioni di laboratorio che in pieno campo (Anderson 1982; Nannipieri, 1990). Comunque anche per questo parametro è richiesta della cautela nell'interpretazione dei dati, in quanto la respirazione è una attività non specifica e la sua stima non da indicazioni sulla selettività dei processi. Inoltre, è necessario tener presente che l'evoluzione della CO<sub>2</sub> del suolo in pieno campo varia marcatamente durante l'anno e durante il giorno in funzione delle condizioni climatiche, mentre in condizione controllate, quali quelle di laboratorio la respirazione di un suolo può essere determinata accuratamente e precisamente.

Il rapporto tra CO<sub>2</sub> sviluppata come respirazione basale della biomassa microbica viene indicata come quoziente metabolico ( $qCO_2$ ) pur essendo un parametro variabile in funzione dello stato fisiologico e della composizione della biomassa microbica, può essere considerato un buon parametro nella valutazione degli effetti del trattamento con pesticidi sulla biomassa microbica. Un incremento del  $qCO_2$  indica un effetto deprimente dei pesticidi sui microrganismi i quali sono costretti ad utilizzare una gran parte del loro bagaglio energetico per mantenersi agli stessi livelli, riducendo così l'attività di mineralizzazione (Anderson e Domsch 1990)

Un esempio di interferenza per alcuni ceppi microbici in pura coltura da parte di alcune solfoniluree sull'attività respiratoria indotta (SIR, descritta da Dumontet e Mathur, 1989) e sul quoziente metabolico è riportato da Dumontet *et al.* (1993). I risultati di questa indagine hanno messo in evidenza la forte tossicità del rimsulfuron sulla maggior parte dei ceppi considerati rispetto alle altre solfoniluree.

## Tabella 6

Perucci *et al.* (2000) in un lavoro inerente gli effetti di due erbicidi (una solfonilurea: rimsulfuron, ed un imidazolinone: imazethapyr) a diverse dosaggi e in presenza di compost da RSU hanno osservato decrementi del contenuto di C-biomassa e di attività respiratoria accompagnati da incrementi del quoziente metabolico, evidenziando così come entrambi gli erbicidi esercitano un effetto tossico sulla biomassa microbica.

## 6.2 - Contenuto di ATP

Il contenuto di ATP di un suolo è un indice di valutazione della biomassa microbica in campioni di suolo incubati in condizioni controllate per 7-10 giorni prima della determinazione (Einland, 1985; Jenkinson, 1988). L'incubazione si rende necessaria poiché durante questo tempo l'ATP dei residui vegetali scompare rapidamente per cui un campione di suolo preincubato contiene solamente ATP di origine microbica. Decrementi non significativi del contenuto di ATP sono stati osservati da Perucci *et al.* (1999) in un suolo di medio impasto dopo trattamento con rimsulfuron ad una dose 10 volte la dose di campo.

## 6.3 Idrolisi del diacetato di fluoresceina

Poiché l'idrolisi del FDA è catalizzata da un buon numero di enzimi (lipasi, proteasi ed esterasi) l'attività idrolasica globale del suolo intesa come quantità di fluoresceina diacetato idrolizzato viene considerata tuttora come una misura dell'attività microbiologica del suolo nel suo insieme (Schnurer e Rosswall, 1982). L'uso di questo parametro risulta abbastanza vicino alla realtà, in quanto l'estere, essendo non polare, può essere facilmente trasportato attraverso la membrana cellulare delle cellule attive mentre il prodotto idrolizzato essendo polare rimane fuori della cellula. Pertanto, in questo modo è possibile valutare le cellule attive presenti nel suolo (Alef, 1995) le quali sono in grado di rispondere a qualunque stress ambientale.

Al momento attuale pochi ricercatori considerano questo parametro un buono strumento a disposizione per lo studio degli effetti dei pesticidi sulla biomassa microbica. I primi lavori in questa direzione sono stati condotti sia in condizioni controllate di laboratorio per 15 settimane in presenza di imazethapyr (Perucci e Scarponi, 1994) che in pieno campo ed in condizioni controllate di laboratorio in presenza di rimsulfuron (Perucci e Scarponi, 1996). I risultati riportati dai due ricercatori hanno evidenziato l'effetto tossico di questi erbicidi sulla biomassa microbica poiché al decremento del contenuto di C-biomassa corrispondeva un incremento dell'attività proteasica, andamenti che confortati dall'incremento dell'attività FDA-idrolasica convergono all'ipotesi della morte di alcuni microrganismi e conseguente lisi cellulare. I risultati ottenuti in condizioni di laboratorio hanno evidenziato l'effetto tossico sulla biomassa microbica, ma questo effetto è transitorio e significativamente evidenziato solo alle dosi superiori di quelle di campo. Il confronto di questi dati con quelle ottenuti nelle prove in pieno campo, dove molti fattori intervengono nel ridurre o addirittura mascherare la tossicità del pesticida, mettono in evidenza che far riflettere i dati di laboratorio con quanto accade in pieno campo è puramente speculativo. Questo tipo di studio fu ulteriormente approfondito mettendo i due erbicidi a confronto (Perucci *et al.*, 2000) su un suolo diverso dal precedente, tal quale ed ammendato con un compost da RSU. Le risposte della microflora del suolo ai diversi trattamenti sono risultate influenzate sia dal tipo di erbicida così come dalla sua concentrazione oltre che dalla sostanza organica aggiunta. In questo stesso lavoro per poter meglio capire ed interpretare i risultati ottenuti gli autori hanno espresso l'attività idrolasica globale in funzione della unità di massa microbica, definendo così un nuovo parametro il *qFDA (attività idrolasica specifica)*. Gli aumenti del valore di questo indice indicano un indebolimento dell'attività metabolica della microflora del suolo a seguito del trattamento e che l'aggiunta di compost sembra avere un effetto effimero sulla tossicità del pesticida.

In questi ultimi anni si è andato a sviluppare una nuova linea di ricerca atta alla individuazione di una equazione matematica che sia in grado di prevedere il comportamento di un pesticida nel suolo ed in ultima analisi di prevedere quale potrebbe essere il suo destino e la sua persistenza in quel suolo. Sono nati così i modelli previsionali del destino di un pesticida nell'ambiente suolo. In tali modelli attualmente gli inputs dati riguardano quasi esclusivamente le proprietà chimiche e chimico-fisico del suolo mentre sono state escluse, al momento attuale, le proprietà biologiche del suolo. I gruppi di ricerca coordinati da Perucci (Università degli Studi di Ancona) e Vischetti (CNR - Perugia) stanno cercando di poter aumentare la validità di un modello previsionale con l'inserimento di inputs di alcuni parametri microbiologici in considerazione del fatto che i microrganismi sono i maggiori responsabili dell'attività biologica di un suolo e della velocità di degradazione di un pesticida.

Il primo tentativo fatto da questi ricercatori è stato quello di simulare in laboratorio alcune condizioni che possono verificarsi nel microambiente legato ai microrganismi, mediante variazione delle condizioni di temperatura e di umidità. In questo primo approccio è stato impiegato il rimsulfuron poiché era stato osservato precedentemente che questi ha un effetto tossico sui microrganismi e che ha anche un effetto inibente per l'attività di alcuni sistemi enzimatici quali: fosfatasi (acida ed alcalina), catalasi, deidrogenasi, nitratoriduttasi, contenuto di

ATP, ecc. Le indagini sono state orientate allo scopo di individuare quale parametro poteva essere più utile nella relazione tra persistenza di un pesticida e variazione di un parametro microbiologico o biochimico ad esso connesso. Si è pertanto orientati verso due parametri che potevano essere facilmente determinabili e che rappresentavano nella loro determinazione una valutazione della situazione e comportamento di tutto lo scomparto biologico: la determinazione del contenuto di C-biomassa e dell'attività idrolasica globale. Le prime valutazioni hanno evidenziato che le variazioni del contenuto di C-biomassa meglio si correlavano con la persistenza del rimsulfuron (Vischetti *et al.*, 1997). Su questa scia l'indagine è stata ulteriormente ampliata operando a tre concentrazioni di rimsulfuron (dose di campo, 10 e 100 volte la dose di campo) poiché è stato osservato che la dose di applicazione ha un suo effetto sulla biomassa microbica ed in tre diverse condizioni che potevano simulare le fasce aride, temperate e fredde). La parabola ottenuta e riportata in Figura 15 (Vischetti *et al.*, 2000) definita utilizzando tutti i dati a tutte le condizioni testate conferma l'opportunità di tale equazione nel valutare l'andamento della biomassa microbica del suolo in relazione alla concentrazione del p.a. ancora presente indipendentemente dalla concentrazione iniziale del pesticida, in particolare risulta possibile conoscere il contenuto di C-biomassa una volta noto solamente l'andamento cinetico di degradazione del pesticida in quel suolo

### Figure 15

La validità di tale approccio, necessitando di ulteriori sperimentazione, è stata nuovamente investigata impiegando altri due classi di erbicidi: l'imazamox (un imidazolinone) il cui debole effetto tossico sulla biomassa microbica è stato messo in evidenza da Perucci e Scarponi (1994) ed il benfluralin (una dinitroanilina) il quale mostrava invece un forte effetto tossico sulla biomassa microbica (Dumontet e Perucci, 1992). In questo lavoro sono stati utilizzati 3 diversi suoli ed i due erbicidi applicati a due diversi dosi (quella di campo ed una doppia –nel caso del benfluralin- ed una quattro volte la dose di campo –nel caso dell'imazamox). Le condizioni di sperimentazione erano variate in funzione della temperatura da 10, 25 e 40 °C con umidità relative al punto di appassimento (33%) ed al 70% della capacità di campo. Le curve paraboliche (Vischetti *et al.*, 2002) ottenute presentavano lo stesso andamento ed indicavano un massimo di influenza dei pesticidi sulla biomassa microbica fino al raggiungimento di un residuo intorno al 50-60% del valore iniziale, dopo di che l'effetto tossico scompariva ed un recupero della biomassa microbica veniva evidenziato.

## BIBLIOGRAFIA

- Alef K. "Estimation of the hydrolysis of fluoirescein diacetate". In: *Methods in applied soil microbiology and Biochemistry*, Alef K. e Nannipieri P. (eds), pp 232-233. Academic Press, London, 1995.
- Anderson G. "Nucleic acid, derivatives, and organic phosphates". In: *Soil Biochemistry*, McLaren A.D. e Peterson G.H. (eds), Vol 1, pp 67-90. Marcel Dekker, New York, 1967.
- Anderson J.R. "Some methods for assessing pesticide effects on non-target soil microorganisms and their derivatives". In: *Pesticide Microbiology*, Hill I.R. e Wright J.L. (eds), pp 247-313, Academic Press, London, 1978.
- Anderson J.P.E. e K.H. Domsch. "Quantification of bacterial and fungal contribution to soil respiration". *Arch. Microbiol.* 93:113-127, 1973.

- Anderson J.P.E. "Soil Respiration". In: *Methods of Soil Analysis:2. Chemical and Microbiological Properties*, Page A.L., Miller R.H. e Keeney D.R. (eds), pp 467-476. American Society of Agronomy, Madison, WI, USA, 1982.
- Anderson T.H. e K.H. Domsch. "Application of eco-physiological quotient (qCO<sub>2</sub> and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories". *Soil Biol Biochem.* 22:251-255, 1990.
- Anderson T.A., D.C. White e B.T. Walton. "Degradation of hazardous organic compounds by rhizosphere microbial communities". In: *Biotransformations: microbial degradation of health-risk compounds*, Singh V.P. (ed), Volk 32, pp 205-225. Elsevier, Amsterdam, 1995.
- Baarschers W.H., A.I. Bharath, J. Elvish e M. Davies. "The biodegradation of metoxychlor by *Klebsiella pneumonia*". *Can J. Microbiol.* 28:176-179, 1982.
- Behki R.M. e S.U. Kahn. "Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites". *J. Agric. Food Chem.* 34:746-749, 1986.
- Behki R.M., E. Topp e B.J. Blackwell. "Ring hydroxylation of N-methylcarbamate insecticides by *Rhodococcus* TE1" *Agric. Food Chem.* 42:1375-1381, 1994.
- Bollag J.M., S.Y. Liu e R.D. Minard. "Cross-coupling of phenolic humus constituents and 2,4-dichlorophenol". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44:52-56, 1980.
- Bollag J.M. e S.Y. Liu. "Copolymerization of halogenated phenols and syringic acid". *Pest. Biochem. Physiol.* 23:261-272, 1985.
- Bollag J.M. e M.J. Loll. "Incorporation of xenobiotics into soil humus". *Experientia* 39:1221-1231, 1983.
- Bollag J.M., R.D. Minard e S.Y. Liu. "Cross-linkage between anilines and phenolic humus constituents". *Environ. Sci. Technol.* 17:72-80, 1983.
- Burchfield H.P. e E.E. Storrs. "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, 1957.
- Byrd R.J.W. e D.Woodrock. "Fungal detoxification. 2. The metabolism of some phenoxy-n-alkylcarboxylic acids by *Aspergillus niger*". *Biochem. J.* 65:682-686, 1957.
- Chacko C.I. e J.L. Lockwood. "Accumulation of DDT and dieldrin by microorganisms". *Can. J. Microbiol.* 13:1123-1126, 1967.
- Cripps R.E. e T.R. Roberts. "Microbial degradation of herbicides". In: *Pesticide microbiology*, Hill I.R. e Wright S.J.L. (eds), pp 669-732, Academic Press, London, 1978.
- Dommergues Y.R. e R. Manganot. *Ecologie Microbienne du sol*, pp 796. Masson, Paris, 1970.
- Dougherty J.M. e G.R. Lanza. "Anaerobic sub-surface soil microcosms: methods to monitor effects of organic pollutants on indigenous microbial activity". *Tox. Assess.* 4:85-104, 1989.
- Dumontet S. e S.P. Mathur. "Evaluation of respiration-based methods for measuring microbial biomass in metal-contaminated acidic mineral and organic soils." *Soil Biol.Biochem.* 21:431-436, 1989.
- Dumontet S. e P. Perucci. "The effect of acifluorfen and trifluralin on the size of microbial biomass in soil". *The Science of the Total Environment*, 261-266, 123/124, 1992.
- Dumontet S., P. Perucci, A. Scopa e A. Ricciardi. "Sulfonylureas: Preliminary study on the effect on selected microbial strains and soil respiration". *Soil Sci.(Trends in Agric. Sci.)* 193-198, 1993.
- Einland F. "Determination of adenosine triphosphate (ATP) and adenylate energy charge (AEC) in soil and use of adenine nucleotides as measure of soil biomass and activity". *Danish J. Plant Soil Sci.* S.1777:1-193, 1985.
- Engelhardt G., H.G. Rast e P.R. Wallnofer. "Bacterial metabolism of substituted phenols. Oxidation of 4-(methylmercapto)-and 4-(methylsulfinyl)-phenol by *Norcadia* spec. DEM 43251". *Arch. Microbiol.* 22:284-288, 1977.

- Flaig W., H. Beutelspacher e E. Rietz; "Chemical composition and physical properties of humic substances". In: *Soil Components*, J.E. Gieseking (ed). Vol 1, pag 1-211, Springer-Verlag, New York, 1975.
- Fogel S., R.L. Lancione e A.E. Sewal. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:113-119, 1982.
- Foster R.C. "Polysaccharides in soil fabrics". *Science* 214:665-669, 1981.
- Frear D.S. "The benzoic acid herbicides". In: *Herbicides: chemistry degradation and mode of action*, Kearney P.C. e Kaufman D.D. (eds), pp 541-503. Marcel Dekker, New York, 1975.
- Gamar Y. e J.K. Gaunt. "Bacterial metabolism of 4-chloro-2-methylphenoxyacetate, formation of glyoxylate by side-chain cleavage". *Biochem. J.* 122:527-531, 1971.
- Gibson D.T. e V. Subramarian. "Microbial degradation of aromatic compounds". In: Gibson D.T. (ed), pp181-252. Marcel Dekker, New York, 1984.
- Graetz D.A., G. Chesters, T.C. Daniel, L.W. Newland e C.B. Lee. *J. Wat. Poll. Cont. Fed.* 12:76-81, 1970.
- Grbic-Galic D. "Anaerobic microbial transformation of nonoxygenated aromatic and alicyclic compounds in soil, subsurface, and freshwater sediments". In: *Soil Biochemistry*, Bollag J.M. e Stotzky G. (eds), Vol 6, pag 117, Marcel Dekker, New York, 1990.
- Hagblom M.M. e P.W. Milligna. "Anaerobic biodegradation of halogenated pesticides. Influence of alternate electron acceptors". In: *Soil Biochemistry*, Bollag J.M. e Stotzky G. (eds), Vol 10, pp 1-34. Marcel Dekker Inc., New York, 2000.
- Haider K., J.P. Martin e Z. Filip. "Humus chemistry". In: *Soil Biochemistry*, Paul E.A. e McLaren A.D. (eds). Vol 4, pag 195-244, Marcel Dekker, New York, 1975.
- Hammond M.W. e M. Alexander. "Effect of chemical structure on microbial degradation of methyl-substituted aliphatic acids". *Environ. Sci. Technol.* 6:732-735, 1972.
- Hattori T. e R. Hattori. "The plate count method: An attempt to delineate the bacterial life in the microhabitat of soil". In: *Soil biochemistry*, Bollag J.M. e Stotzky G. (eds), Vol 10, pp 271-302. Marcel Dekker Inc., New York, 2000.
- Hoff T., S.Y. Liu e J.M. Bollag. "Transformation of halogen-, alkyl- and alkoxy- substituted anilines by a laccase of *Trametes versicolor*". *Appl. Environ. Microbiol.* 49:1040-1045, 1985.
- Horvath R.S. "Microbial cometabolism of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid". *Bull. Environ. Contam.* 5:537-541, 1970.
- Horvath R.S. "Co-metabolism of methyl- and chloro-substituted catechols by an *Achromobacter* sp. possessing a new meta-cleaving oxygenase". *Biochem. J.* 119:871-876, 1971.
- Jenkinson D.S. e D.S. Powlson. "The effects of biocidal treatments on metabolism of soil. V". *Soil Biol. Biochem.* 8:209-213, 1976.
- Jenkinson D.S., S.A. Davidson e D.S. Powlson. "Adenosine triphosphate and microbial biomass in soil". *Soil Biol. Biochem.* 11:521-527, 1979.
- Jenkinson D.S. "Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil". In: *Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems*, Wilson J.T. (ed), pp 368-386. CAB International, Wallingford, Great Britain, 1988.
- Johnson D.B. e J. Lavy. *Environ. Qual.* 23:556-561, 1994.
- Kaufman D.D., J.R. Plimmer, J.E. Iwan, U.I. Kliengebiel. "3,3',4,4'-Tetrachloroazoxybenzene from 3,4-dichloroaniline in microbial cultures". *J. Agric. Food Chem.* 20:916-921, 1972.
- Kearney P.C. e S.T. Kellog. "Microbial adaption to pesticides". *Pure Appl. Chem.* 57:389-403, 1985.
- Kearney P.C., J.S. Karns e W.W. Mulbry. "Biochemical and genetic aspects of pesticide microbial metabolism. Am. Chem. Soc. 192<sup>nd</sup> ACS Natl. Meet., Anaheim, CA, 1976.
- Korte F., G. Ludwig e J. Vogel. "Umwandlung von Aldrin-(<sup>14</sup>C) und Dieldrin-(<sup>14</sup>C) durch Mikroorganismen, Leberhomogenate und Mosquito-Larven". *Liebeg Ann. Chem.* 656:135-140, 1962.

- Krause A., W.G. Hancock, R.D. Minard, A.J. Freyer, R.C. Honeycutt, H.M. Le Baron, D.L. Paulson, S.Y. Liu e J.M. Bollag. "Microbial transformation of the herbicide metolachlor by a soil actinomycete". *J.Agric.Food Chem.* 33:584-589, 1985.
- Kurihara N., N. Ohisa, M. Nakajima, T. Kakutani e M. Senda. "Relationship between microbial degradability and polarographic half-wave potential of polychlorocyclohexenes and BHC isomers". *Agric. Biol. Chem.* 45:1229-1235, 1981.
- Liu S.M., C.E. Kuo e T.B. Hsu. "Reductive dechlorination of chlophenols and pentachlorophenol in anoxic estuarine sediments". *Chemosphere* 32:1287-1300, 1996.
- Loos M.A.. "Phenoxyalkanoic acids". In: *Herbicides: chemistry degradation and mode of action*, Kearney P.C. e Kaufman D.D. (eds). Vol 1, pag 1-128, 1975. Marcel Dekker, New York.
- Lyr H., G. Ritter e L. Banasiak. "Detoxification of caboxin". *Z. Allg. Mikrobiol.* 14:313-320, 1974.
- Malkomes H.P.. "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, 1981.
- Malkomes H.P.. "Testing and evaluating some methods to investigate side effects of environmental chemicals on soil microorganisms". *Ecotoxicol. Environ. Safety* 7:284-294, 1983.
- Matsumura F. e H.J. Benezet. "Microbial degradation of insecticides". In: *Pesticide Microbiology*, Hill I.R. e Wright S.J.L. (eds), pag 648-667. Academic Press, London, 1978.
- Miyazaki S., G.M. Boush e F. Matsumura. "Metabolism of <sup>14</sup>C-chlorobenzilate and <sup>14</sup>C-chloropylate by *Rhodotorula gracilis*". *Appl. Microbiol.* 18:972-977, 1969.
- Miles J.R.W., C.M. Tu e C.R. Harris. "metabolism of heptachlor and its degradation products by soil microorganisms". *J. Econ. Entomol.* 62:1334-1337, 1969.
- Millar W.N. e L.E. Casida. "Evidence for muramic acid in soil". *Can. J. Microbiol.* 16:299-304, 1970.
- Minard R.D., S.Y. Liu e J.M. Bollag. "Oligomers and quinones from 2,4-dichlorophenol". *J. Agric. Food Chem.* 29:250-253, 1981.
- Mitterer M., H. Bayer e F. Schinner. "The influence of fungicides on microbial activity in soil". *Z. Pflanzenern. Bodenkd.* 144:463-471, 1981.
- Munnecke D.M., L.M. Johnson, H.W. Talbot e S. Barik. "Microbial metabolism and enzymology of selected pesticides". In: *Biodegradation and detoxification of environmental pollutants*, Chakrabary A.M. (ed), pp 1-32. CRC Press, FL, Boca Raton, 1982.
- Nannipieri P., S. Greco e B. Ceccanti. "Ecological significance of the biological activity in soil". In: *Soil Biochemistry*, Bollag J.M. e Stotzky G. (eds), Vol 6, pp 293-355. Marcel Dekker, New York, 1990.
- Nannipieri P.. "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), pp 238-244. CSIRO, Adelaide, Australia, 1994.
- Nannipieri P., L.O. Badalucco, L. Landi e G. Pietramellara. "Measurement in assessing the risk of chemicals to the soil ecosystem". In: *Ecotoxicology: responses, biomarkers and risk assessment*, Cap 34, pp 1-28, SOS Publication, Fair Haven, NJ, USA, 1997.
- Orpin C.G., M. Knight e W.C. Evans. "The bacterial oxidation of N-methylisonicotinate, a photolic product of paraquat". *Biochem. J.* 127:833-844, 1972.
- Paszczynski A. e R.L. Crawford. "Recent advances in the use of fungi in environmental remedation and biotechnology". In: *Soil biochemistry*, Bollag J.M. e Stotzky G. (eds), Vol 10, pp 379-422, 2000. Marcel Dekker Inc., New York.

- Perucci P. e L. Scarponi. "Effects of the herbicide imazethapyr on soil microbial biomass and various enzyme activities"; *Biol. Fertil. Soils*, 14:237-240, 1994.
- Perucci P., L. Martinetti e F. Patisso. "Rimsulfuron: interferenze su aspetti del biochimismo di un sistema suolo-pianta". Atti del XIV Convegno Nazionale SICA, pp 567-573, 1996.
- Perucci P. e L. Scarponi. "Side-effects of rimsulfuron on the microbial biomass of a clay-loam soil". *J. Environ. Qual.* 25:610-613, 1996.
- Perucci P., C. Vischetti e F. Battistoni. "Rimsulfuron in a silty clay loam soil: interferences on microbiological and biochemical properties under varying microcosm conditions". *Soil Biol. Biochem.* 31:195-204, 1999.
- Perucci P., S. Dumontet, S.A. Bufo, A. Mazzatura e C. Casucci. "Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass". *Biol. Fertil. Soils*, 32:17-23, 2000.
- Pochon J. e P. Tardieux. In: "Techniques d'analyse en microbiologie des sols. Applications Agronomiques", p 49-80, 1962. La Tourelle, Paris.
- Scarponi L., Perucci P. e Monotti M.. "Interference with soil phosphatase activity by maize herbicidal treatment and incorporation of maize residues"; *Biol. Fert. Soils* 6:428-433, 1988.
- Schaffer A. "Pesticide effects on enzyme activities in the soil ecosystems". In: *Soil Biochemistry*, Bollag J.M. e Stotzky G. (eds), Vol 7, pp 273-340, Marcel Dekker, New York, 1993.
- Schinner F., Bayer H. e Mitterer M. The Influence of herbicides on microbial activity in soil materials. *Bodenkultur* 34:22-30, 1983.
- Schnurer J. e Rosswall T.. "Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter". *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1256-1261, 1982.
- Sextone A.J., N.P. Revsbech, T.N. Parkin e J.M. Tiedje. "Direct measurement of oxygen profiles and denitrification rates in soil aggregates". *Soil Sci. Soc. Am. J.* 49:645-649, 1985.
- Sjogblad R.D. e J.M. Bollag. "Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms". In: *Soil Biochemistry*, Paul E.A. e Ladd J.N. (eds), Vol 5, pp 113-152, Marcel Dekker, New York, 1981.
- Skujins J.. "History of abiotic soil enzyme research". In: *Soil Enzymes*, Burns R.G. (ed), Vol 3, pp 1-49. Academic Press, London, 1978.
- Sordergren A.. "Accumulation and distribution of chlorinated hydrocarbons in cultures of *Chlorella pyrenoidosa*". *Oikos* 22:215-220, 1971.
- Taylor H.F. e R.L. Wain. "Side-chain degradation of certain o-phenoxyalkane carboxylic acids by *Nocardia coeliaca* and other microorganisms isolated from soil". *Proc. R. Soc. London, B* 156:172-186, 1962.
- Tiedje J.M., S.A. Boyd e B.Z. Fathepure. "Anaerobic degradation of chlorinated aromatic hydrocarbons". *Dev. Ind. Microbiol.* 27:117-121, 1987.
- Timms P. e I.C. McRae. "Reduction of fensulfothion and accumulation of the products fensulfothion sulfide by selected microbes". *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31:112-115, 1983.
- Topp E., T. Vallaeyss e G. Soulas. "Pesticides: microbial degradation and effects on microorganisms". In: *Modern soil microbiology*, van Elsa J.D., Trevors J.T. e Wellington E.M.H. (eds), pp 547-576, 1997. Marcell Dekker Inc., New York.
- Tranter E.K. e R.B. Cain. "The degradation of fluoro aromatic compounds to fluorocitrate and fluoroacetate by bacteria". *Biochem. J.* 103:22-23, 1997.
- Van der Meer J.R., W.M. de Vos, S. Harayama e A.J.B. Zehender. *Microbiol. Rev.* 56:677-683, 1992.
- Vischetti C., P. Perucci e L. Scarponi. "Rimsulfuron in soil: Effect of persistence on growth and activity of microbial biomass at varying environmental conditions". *Biogeochemistry* 39:165-176, 1997.

- Vischetti C., Perucci P. e Scarponi L.. "Relationship between rimsulfuron degradation and microbial biomass content in a clay-loam soil". *Biol. Fertil. Soils* 31:310-314, 2000.
- Vischetti C., C. Casucci e P. Perucci. "Relationship between changes of soil microbial biomass content and imazamox and benfluralin degradation". *Biol. Fertil. Soils* 35:13-17, 2002.
- Wainwright M.. "A review of the effects of pesticides on microbiological activity in soil. *J. Soil Sci.* 29:287-298, 1978.
- Webley D.M., R.B. Duff e V.C. Farmer. "The influence of chemical structure on  $\beta$ -oxidation by soil Norcadias". *J. Gen. Microbiol.* 18:733-746, 1958.
- Wedemeyer G.. "Dechlorination of DDT by *Aerobacter aerogenes*". *Science* 152:647-649, 1966.
- Zeyer J. e P.C. Kearny. "Microbial dealkylation of trifluralin in pure culture". *Pestic. Biochem. Physiol.* 20:10-18, 1983.