

Studio della degradazione dell'erbicida terbutilazina in aree vulnerabili e ruolo dei microrganismi nella sua rimozione



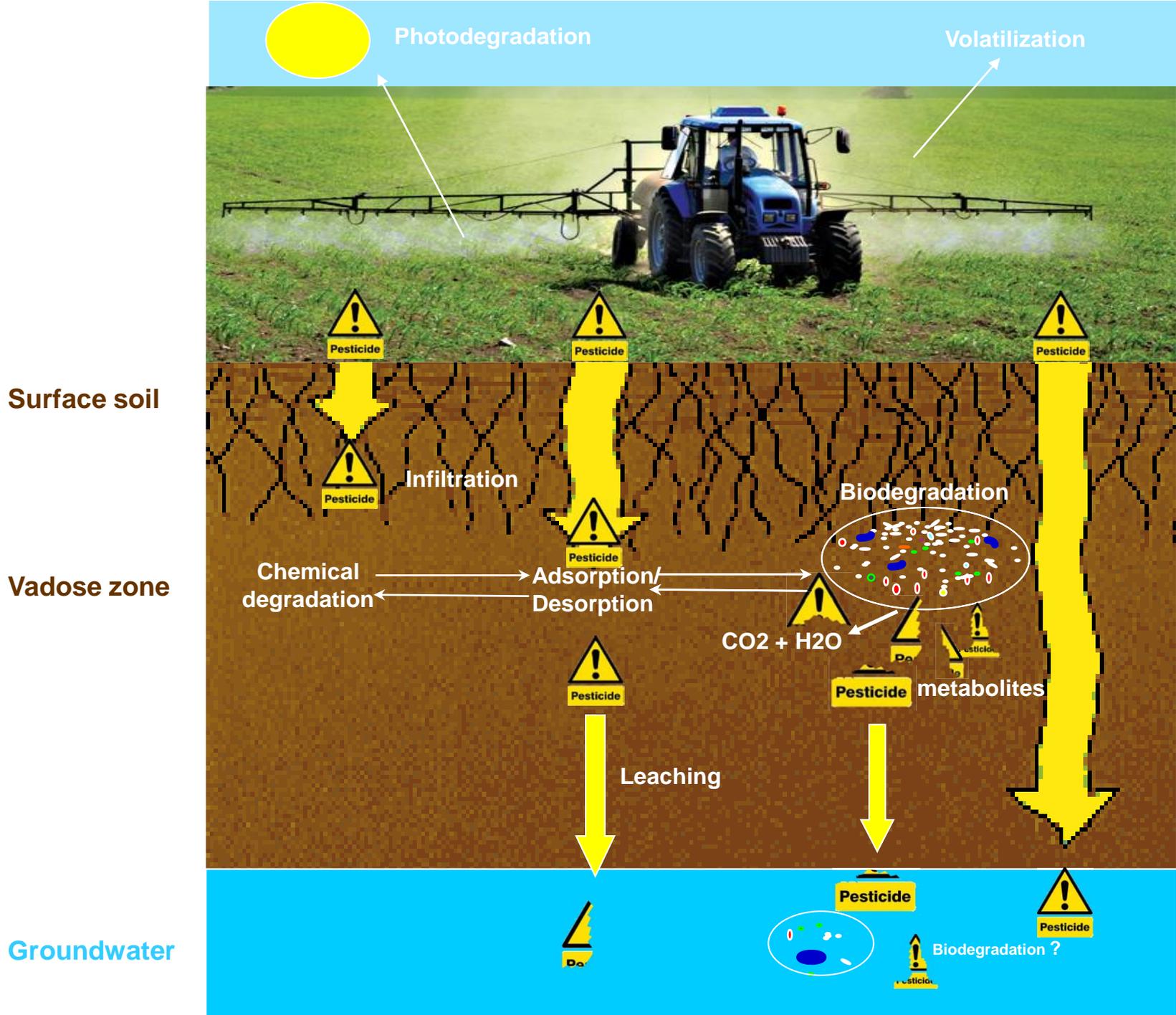
Anna Barra Caracciolo, Paola Grenni

Istituto di Ricerca sulle Acque, Consiglio Nazionale delle Ricerche

IRSA - CNR Via Salaria Km 29,300 Montelibretti - Roma

barracaracciolo@irsa.cnr.it

8° Convegno Nazionale Fitofarmaci e Ambiente, Roma 12 - 13 maggio 2010



s-triazine

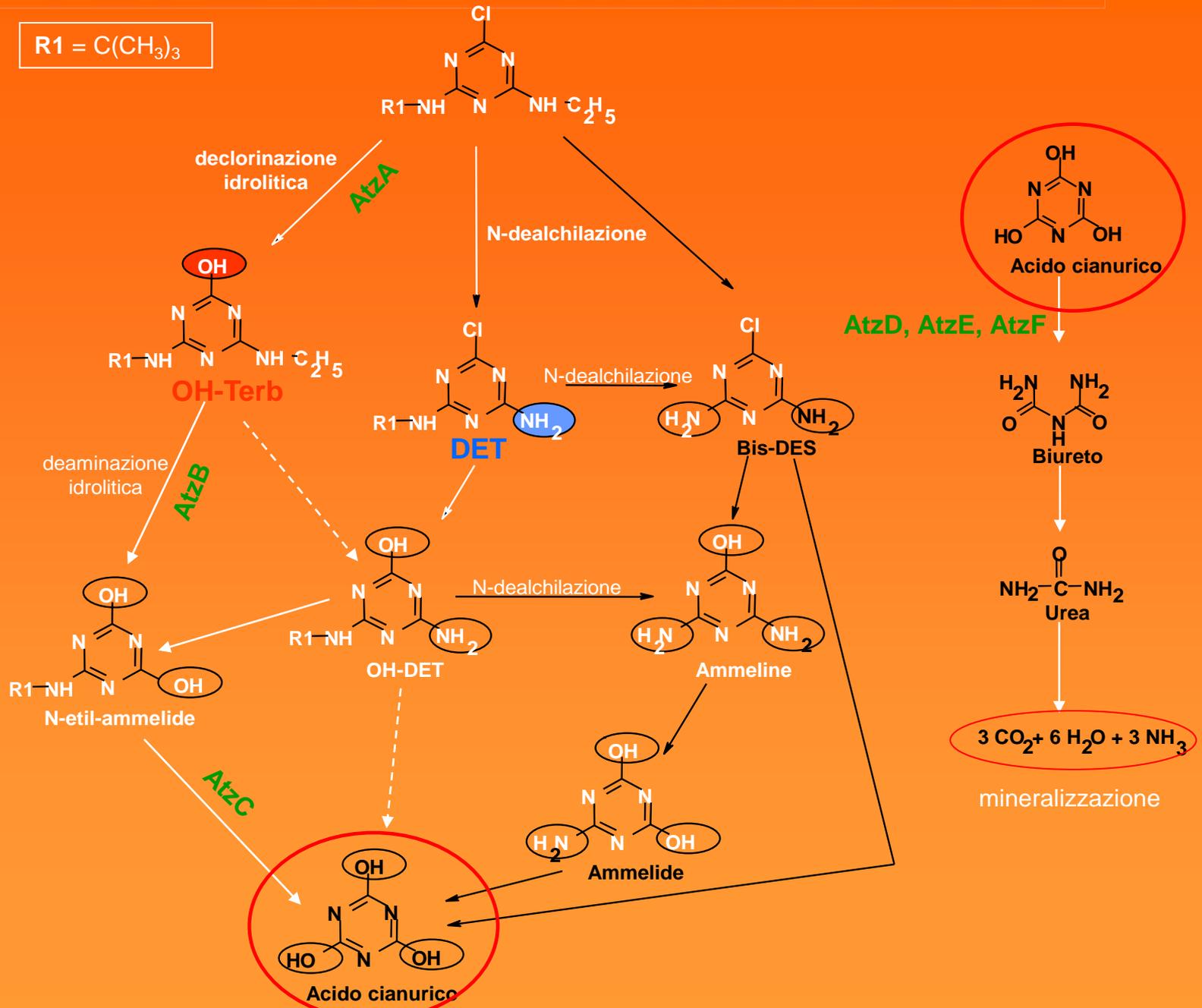
$R_1 \begin{cases} \rightarrow \text{CH}_3\text{CH}_2 = \text{SIMAZINA} \\ \rightarrow \text{C}(\text{CH}_3)_3 = \text{TERBUTILAZINA} \\ \rightarrow \text{CH}(\text{CH}_3)_2 = \text{ATRAZINA} \end{cases}$

$R_2 = \text{CH}_3\text{CH}_2$

ClC1=NC(R1)N=C(NR2)N1

- Le s-triazine sono i pesticidi più riscontrati, sia nelle acque superficiali che in quelle sotterranee, a concentrazioni superiori ai limiti di legge ($> 0.1 \text{ ug/L}$).
- La **terbutilazina** è tra i pesticidi più venduti ed utilizzati in Italia. Atrazina e Simazina sono state bandite.
- La **desetilterbutilazina** è il metabolita più frequentemente rilevato nelle acque sotterranee.

Terbutilazina e formazione dei suoi metaboliti



Casi di Studio: capacità naturali di recupero degli ecosistemi dalla contaminazione da erbicidi triazinici

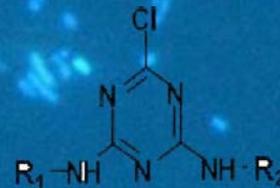
Suolo: esperimenti di degradazione della terbutilazina e simazina in diversi suoli

Acque sotterranee: la degradazione può avvenire anche nelle acque sotterranee ?

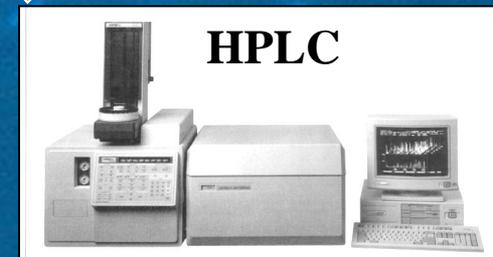
Particolare attenzione viene data al ruolo delle comunità batteriche nella degradazione

Siti sperimentali: Monza e Assisi (L2)

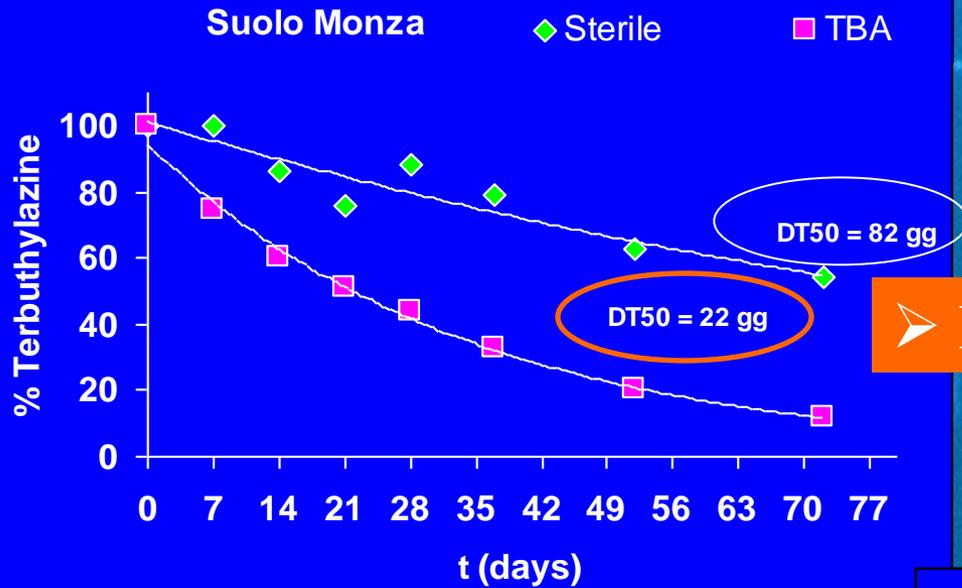
MONZA	ASSISI (L2)
SILTY-LOAM	SILTY-CLAY
a riposo	Agricoltura intensiva
pH 7.3	pH 7.7
OC % 2.6	OC % 0.46



Analisi chimiche: DT50, metaboliti



Degradazione terbutilazina (TBA): DT50 L2 Vs Monza

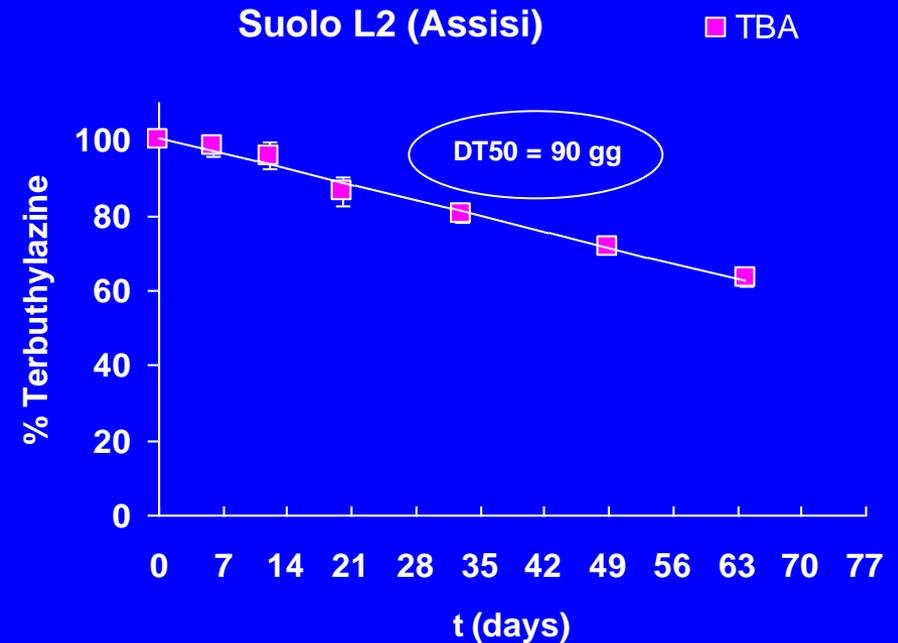


Monza: N. Medio
batteri $3 \cdot 10^7$

➤ Ruolo chiave dei microrganismi

Lo stesso p.a. mostra una degradazione differente a secondo del suolo in cui viene utilizzato

L2: N. Medio batteri
 $2 \cdot 10^7$



Degradazione terbutilazina: confronto DT50 tra Suolo L2 Vs Monza

- Le differenze in degradazione possono dipendere da: T, % OC, pH, profondità, ossigeno, presenza di altri contaminanti, (es. fertilizzanti azotati)
- Precedenti studi hanno messo in evidenza che in presenza di azoto la TBA può essere degradata più lentamente poiché i microrganismi sarebbero meno stimolati ad utilizzarla come fonte di N (Barra Caracciolo *et al.*, 2005)
- La possibilità che l'erbicida venga lisciviato dal suolo alle acque sotterranee dipende dalle condizioni idrogeologiche e dalla vulnerabilità degli acquiferi. Maggiore la persistenza (DT50), maggiore la possibilità di essere lisciviato.
- La degradazione dipende da tutte quelle condizioni che direttamente o indirettamente influenzano l'attività microbica e lo studio dei microrganismi è la chiave di volta per la comprensione dei fenomeni che avvengono a livello di sito specifico

Effetti di un pesticida sulla comunità batterica:

- 1. Cambiamenti nella struttura della comunità autoctona in termini di dominanza o scomparsa di alcuni gruppi batterici.**
- 2. Presenza di alcune popolazioni batteriche adattate alla presenza del pesticida e in grado di utilizzarlo come fonte di carbonio e/o di azoto e, quindi, di rimuoverlo.**

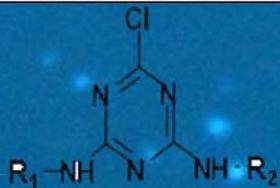
Perché i batteri?

- ✓ I batteri e le loro attività sono indicatori di qualità degli ecosistemi
- ✓ sono organismi che si possono adattare anche alle condizioni avverse in tempi relativamente brevi grazie alla loro struttura piccola e relativamente semplice e alla capacità di riprodursi molto velocemente (ore, giorni).
- ✓ Queste caratteristiche fanno sì che le forze selettive (es. un tossico) possano agire diversamente sulle popolazioni naturali e selezionare 1 o qualche specie in grado di adattarsi agli effetti nocivi di un tossico ed essere in grado di metabolizzarlo e trasformarlo.

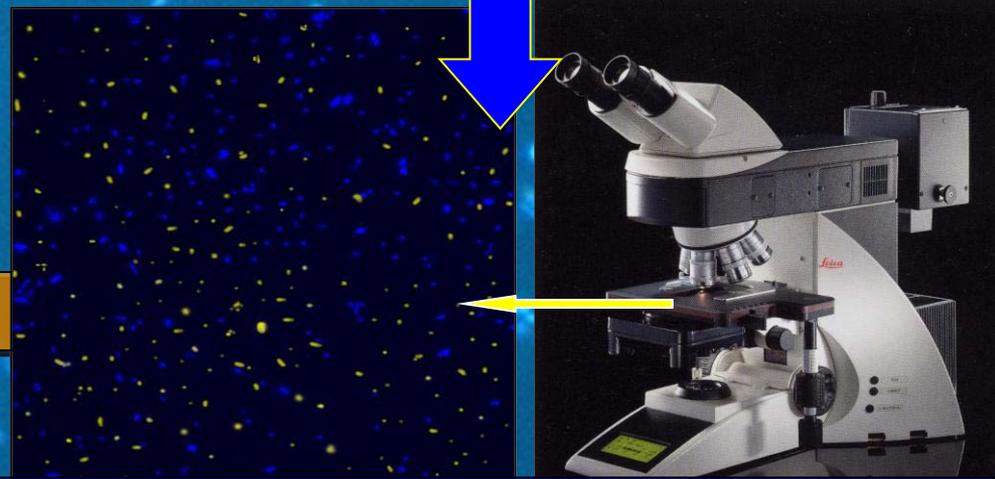
Sito sperimentale: Lodi

LODI
Loam
Agricoltura intensiva
pH 5.9
OC % 0.8

Esperimento di degradazione nel suolo



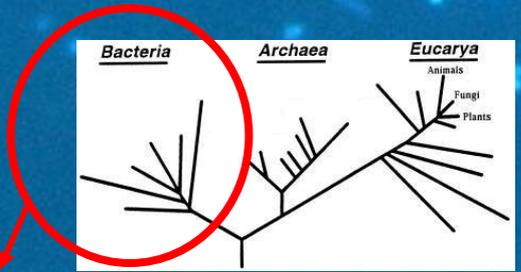
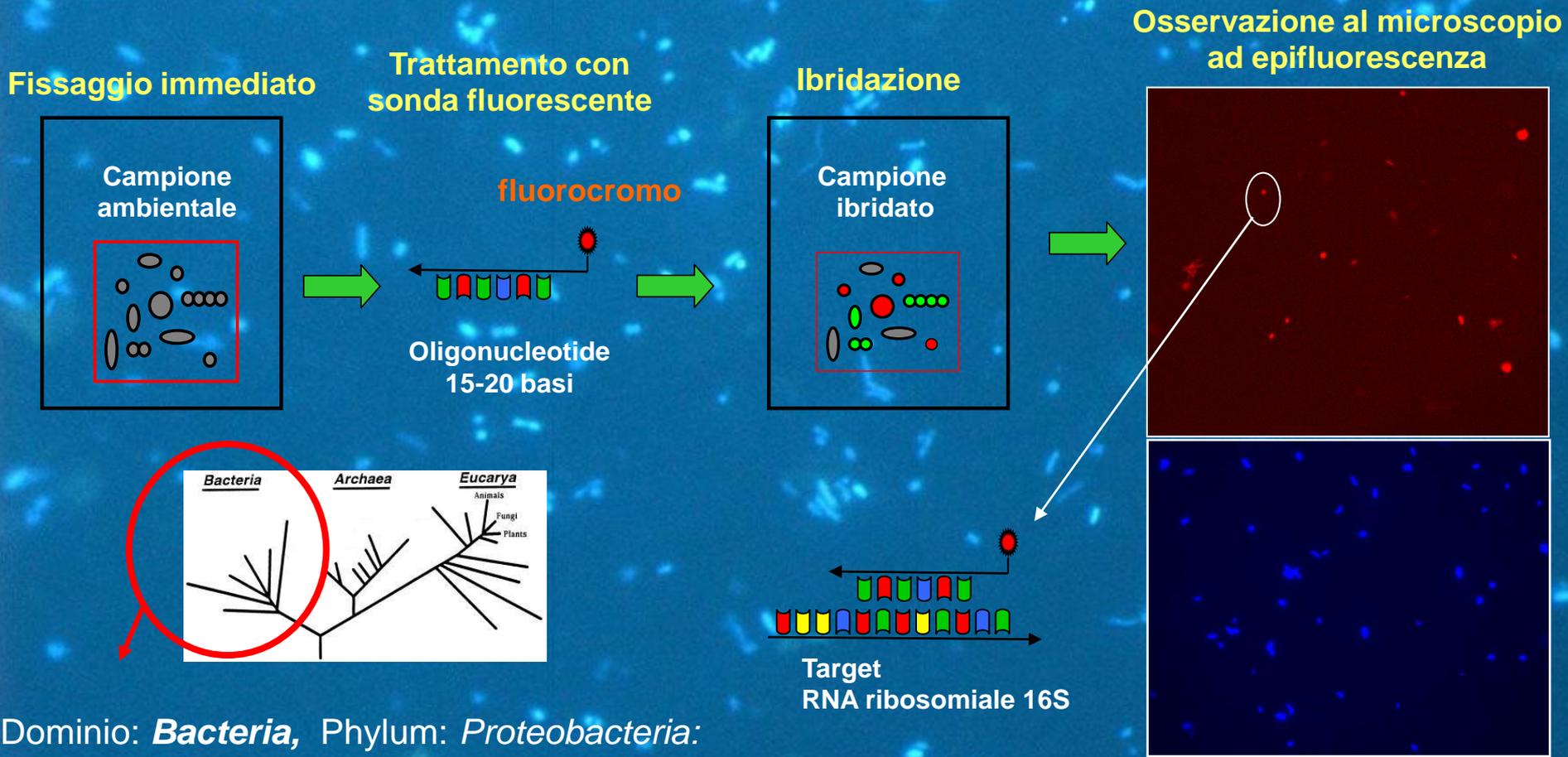
Analisi chimiche: DT50, metaboliti



Microscopio ad epifluorescenza per la conta batterica, vitalità cellulare e caratterizzazione filogenetica con FISH

Caratterizzazione delle comunità batteriche attraverso la Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH):

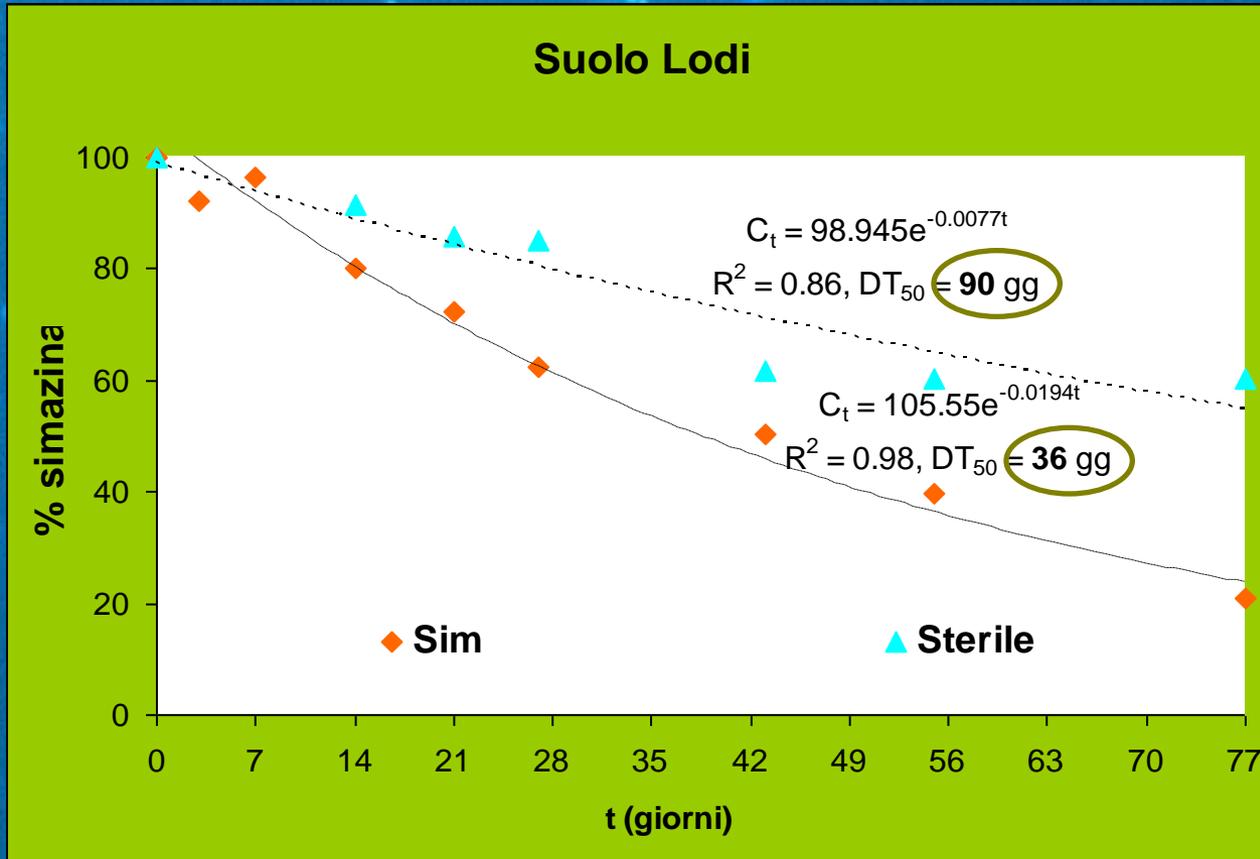
identificazione *in situ* di batteri con sonde oligonucleotidiche fluorescenti con target l'rRNA 16S.



Dominio: **Bacteria**, Phylum: *Proteobacteria*:
 Classi: α, β, γ -*Proteobacteria*.....

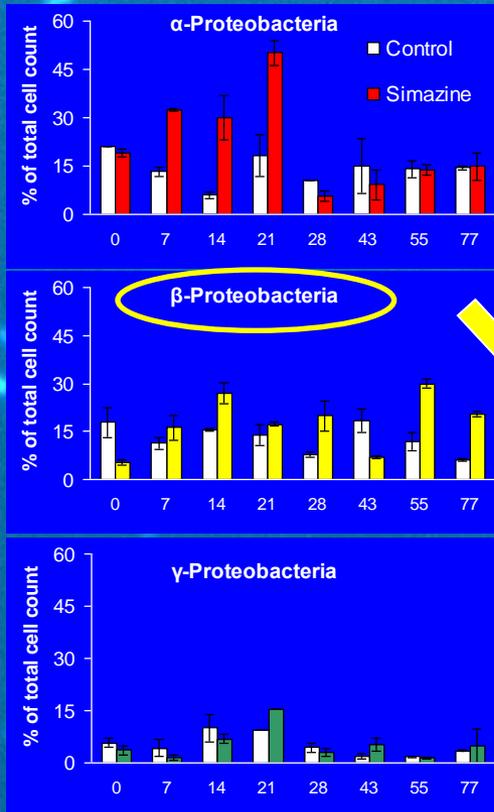
La stima delle cellule positive alla sonda fluorescente è espressa in percentuale rispetto alle cellule totali rilevate dal colorante DAPI.

Degradazione Simazina (Sim): DT₅₀

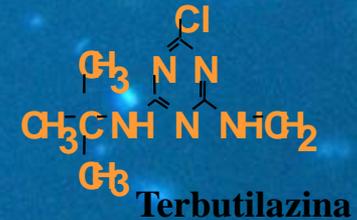


La degradazione dei microrganismi ha un ruolo chiave nella scomparsa dall'ambiente anche nel caso della simazina

IL RUOLO CHIAVE DEI BATTERI NELLA DEGRADAZIONE DI S-TRIAZINE



Colture di arricchimento ed isolamento di ceppi su erbicida come fonte di C per la crescita



PCR ed identificazione

- *Burkholderia*
- *Acinetobacter Iwoffii*
- *Rhodococcus ruber*

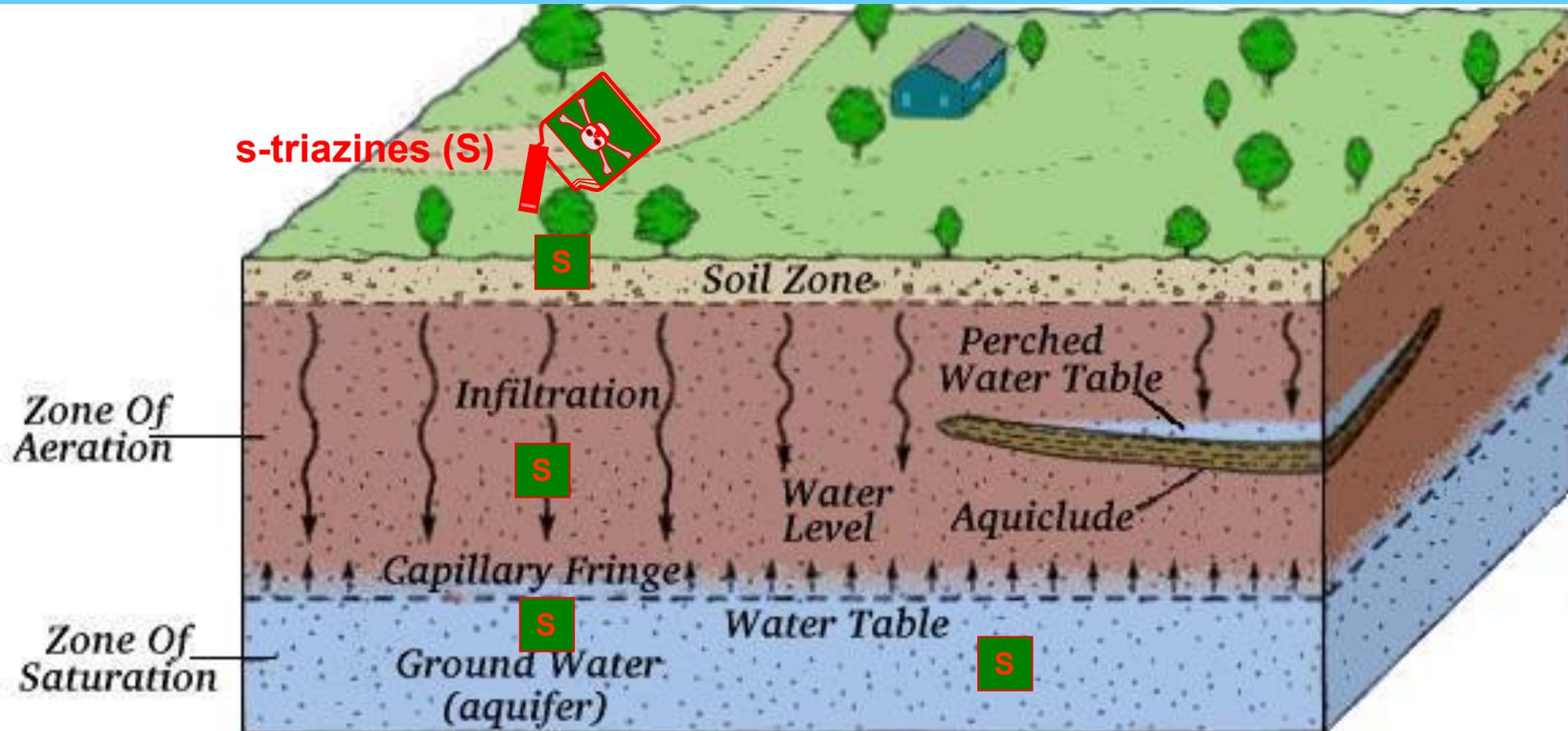
α- e β-Proteobacteria o positivamente influenzati dalla presenza del pesticida, suggerendo un loro ruolo nella degradazione.

La tecnica FISH è stata uno strumento utile per seguire le dinamiche delle popolazioni microbiche individuali nell'ecosistema suolo

Sono stati individuati nel suolo ceppi batterici in grado di utilizzare le triazine per la crescita e rimuoverle dall'ambiente.

Ma la degradazione delle triazine può avvenire nelle acque sotterranee ?

Groundwater contamination from agricultural areas in which the use of s-triazines is a common practice



Are there bacterial populations able to recover from s-triazine contamination?

La degradazione della terbutilazina può avvenire nelle acque sotterranee ?

CASO DI STUDIO: ACQUIFERO CRONICAMENTE CONTAMINATO DA ERBICIDI TRIAZINICI IN AREA AGRICOLA



Lithology	Alluvial sands, gravels and clays
Depth (m)	40
Depth to water (m)	12
Pump depth (m)	36
Elevation (m a.s.l.)	217
Geochemical facies	Alkaline-bicarbonate
Vulnerability estimation	Medium-High
Land use	Intensive agriculture
Temperature °C	14
Eh (mV)	210
Conducibility (µS/cm)	930
pH	7.1
O ₂ (mg/L)	9.01
s-triazine contamination	> 0.1 µg/L
Nitrate contamination	> 100 mg/L

Acquifero L2 (Assisi)

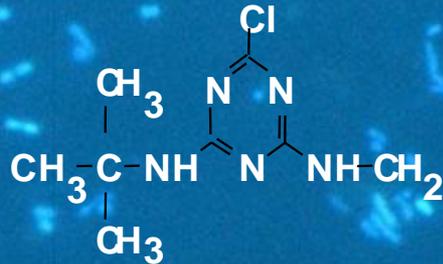


Groundwater microcosms:
Terbuthylazine (TBA) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 15°C



Chemical analysis (DT50)

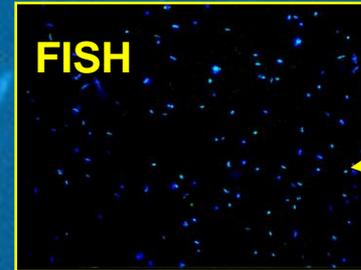
GC-ES/MS



Terbuthylazine (TBA)

Bacterial community characterization

FISH

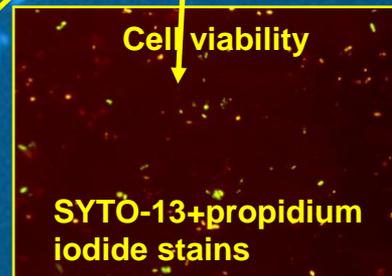


Bacterial abundance

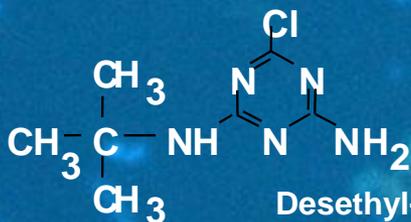


DAPI stain

Cell viability



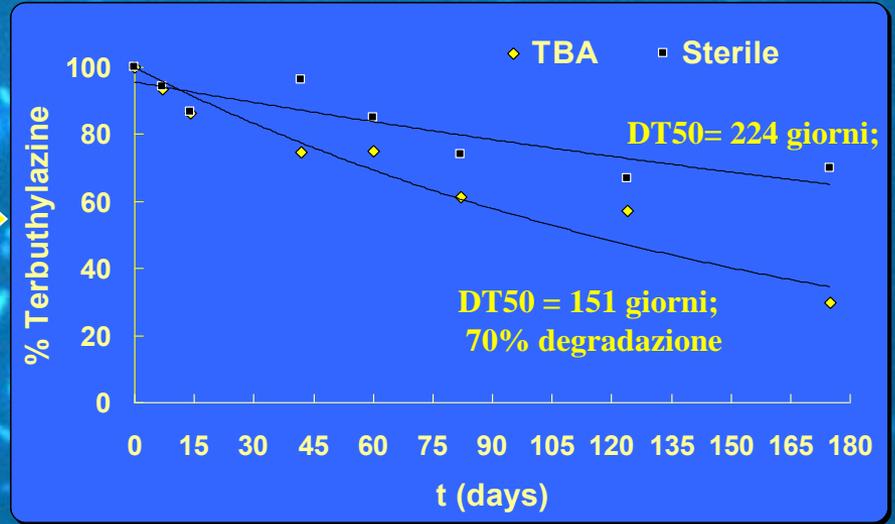
SYTO-13+propidium iodide stains



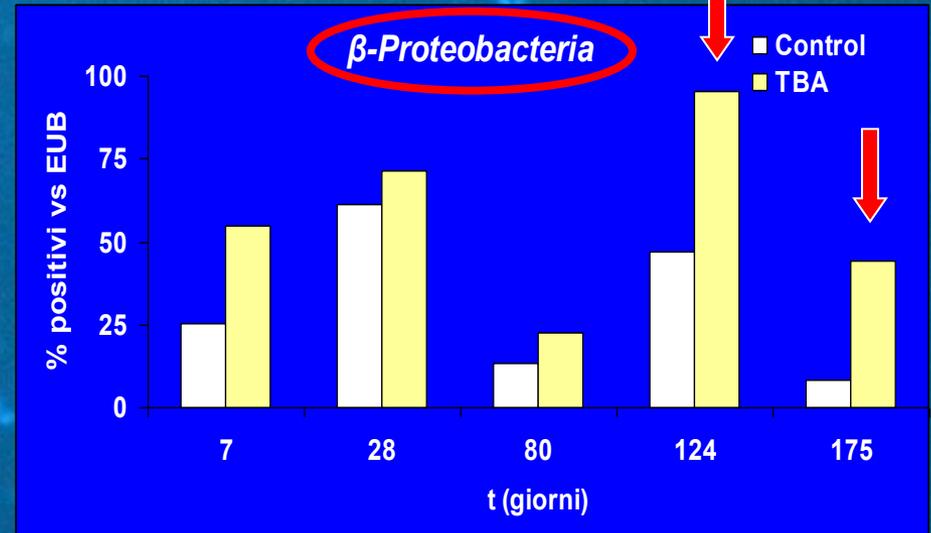
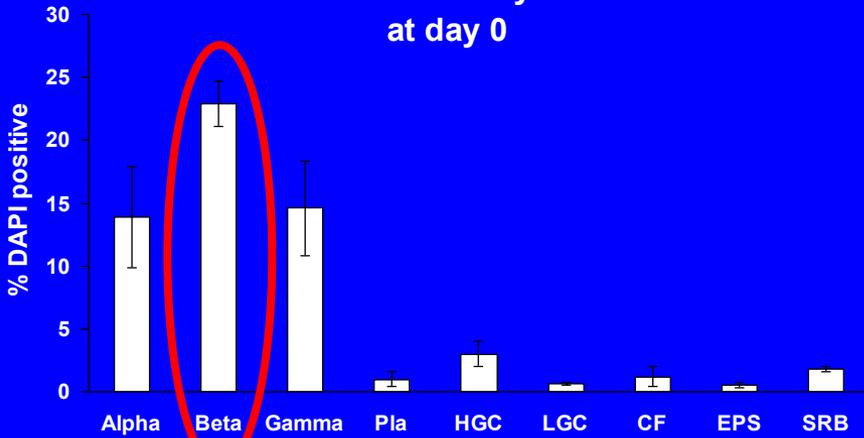
Desethyl-terbuthylazine (DES)

IL RUOLO CHIAVE DELLE POPOLAZIONI BATTERICHE DIMOSTRATO ANCHE NELL'ECOSISTEMA SOTTERRANEO

Groundwater microcosms:
Terbutylazine (TBA) 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 15°C

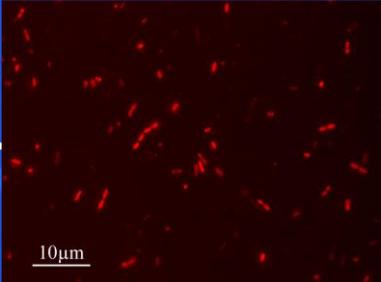
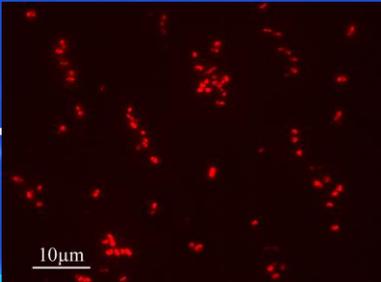


Bacterial community structure
at day 0

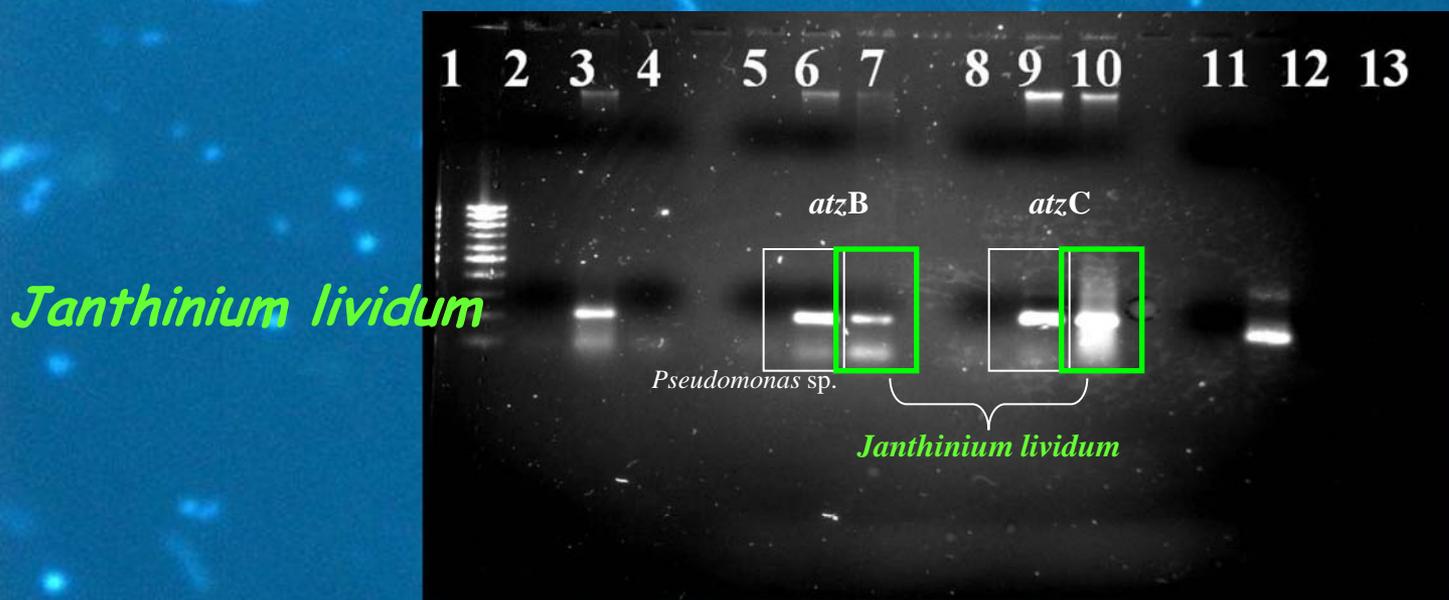
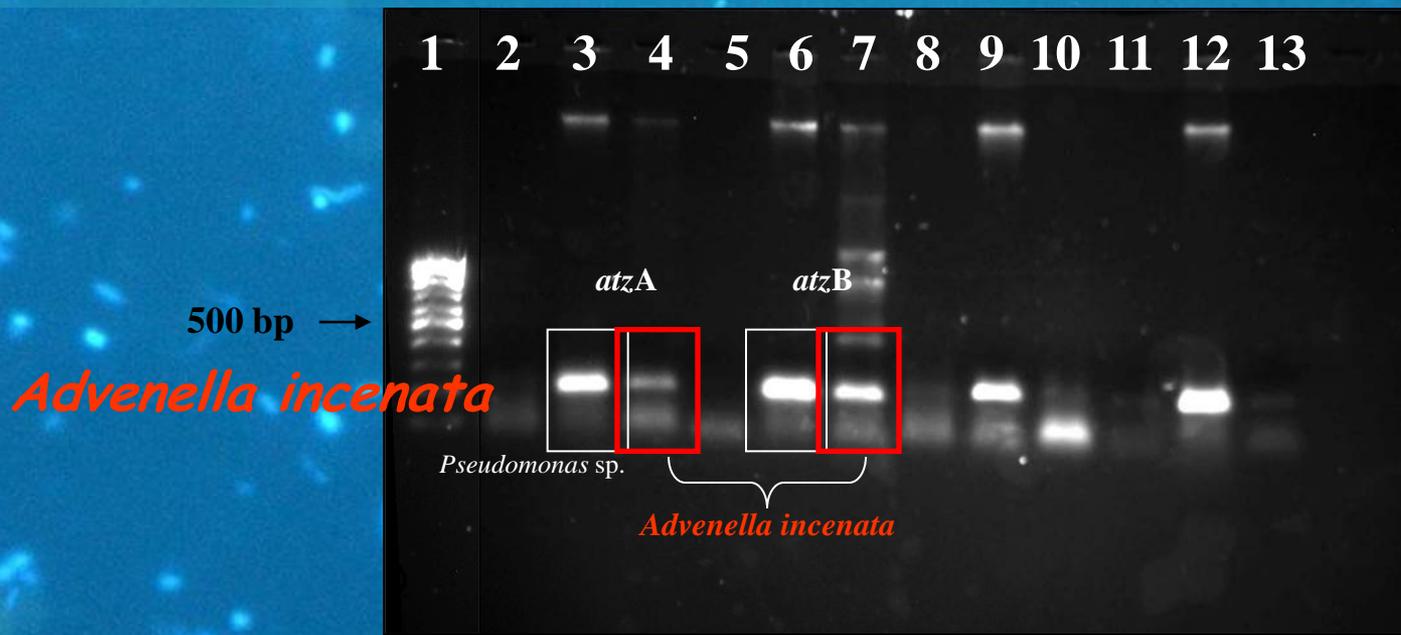


Isolamento dai microcosmi di batteri con capacità di crescere in presenza di triazine come fonte di carbonio ed analisi molecolare degli isolati per l'identificazione dei ceppi.

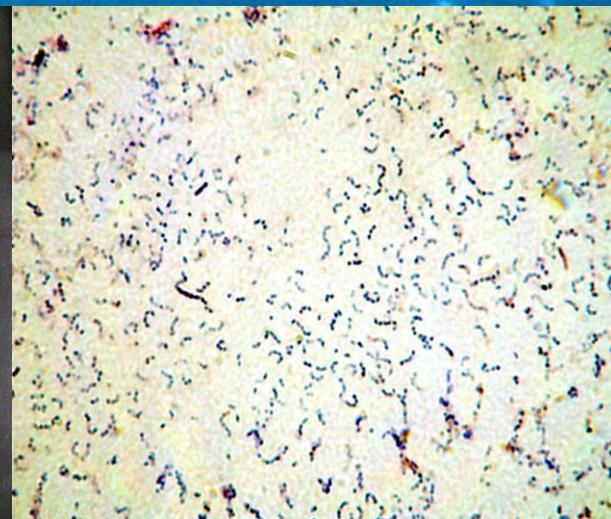


Isolamento:	FISH Identification	PCR e 16S rRNA identificazione
terbutilazina	β -  10 μ m	<i>Janthinobacterium lividum</i>
terbutilazina	β -  10 μ m	<i>Advenella incenata</i>

Prodotti della PCR per l'identificazione di geni *atz* (*atzA*, *atzB*, *atzC*) che codificano enzimi coinvolti nella degradazione delle *s*-triazine.



Isolamento dall'acquifero di ceppi degradatori



Crescita in coltura liquida con
erbicida: 10 mg/l; 100 mg/l

Simazina, terbutilazina, atrazina,
idrossi-simazina, detil-atrazina,
etilamina ed isopropilamina come
unica fonte di carbonio

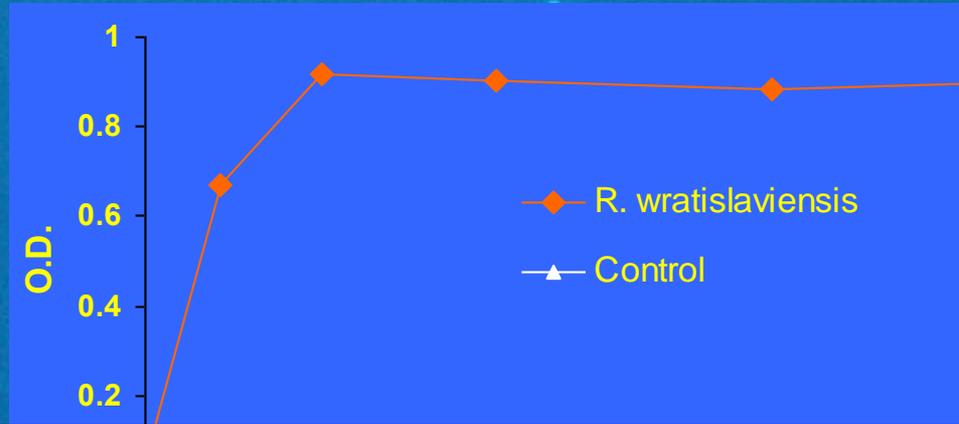
FISH

PCR ed identificazione

Gram-positivi
HGC

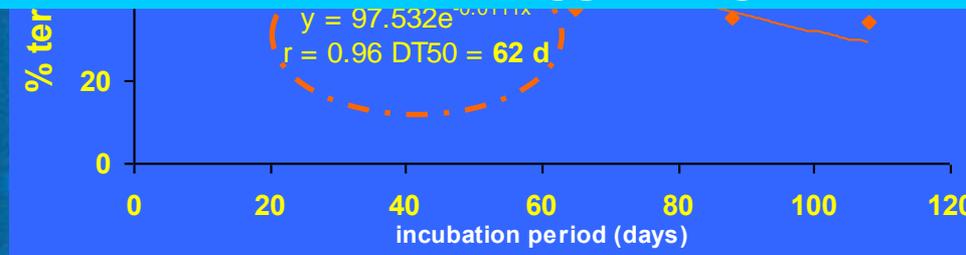
Rhodococcus wratislaviensis

Rhodococcus wratislaviensis FPA1



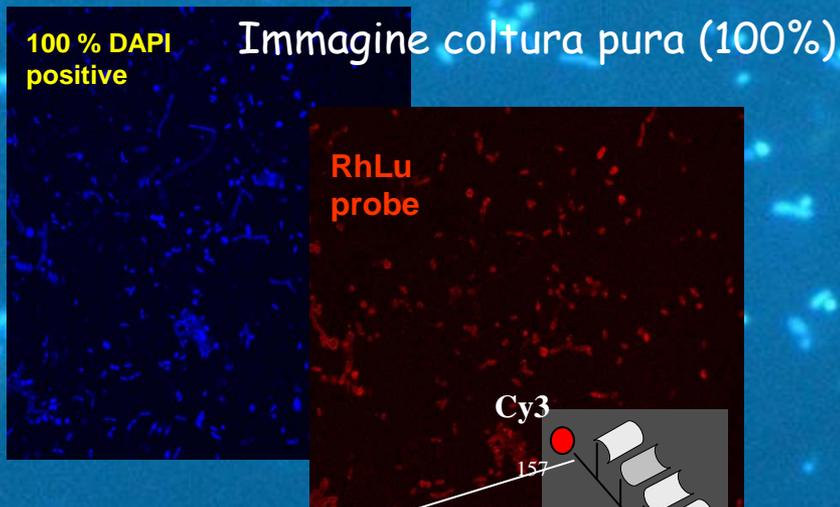
La presenza di *Rhodococcus wratislaviensis* FPA1 può essere considerata come un *indicatore* di capacità potenziale di recupero dalla contaminazione da s-triazine.

Il ceppo può essere utilizzato in strategie di *Bioremediation*, come per esempio nel caso di fuoriuscita accidentale dai serbatoi di distribuzione dell'erbicida o nel lavaggio degli stessi.



Il ceppo isolato mostra capacità degradativa superiore al pool microbico

Una nuova sonda molecolare (con target l'RNA 16S) è stata disegnata per l'identificazione di *Rhodococcus wratislaviensis* FPA1 tramite FISH. La nuova sonda è stata denominata RhLu



La sonda può essere utile per biomonitorare la presenza di batteri in grado di degradare le s-triazine in suoli ed acque contaminate.

Utilizzando la sonda RhLu, *R. wratislaviensis* può essere facilmente rilevato e le dinamiche di popolazione facilmente monitorate in ecosistemi contaminati da s-triazine (acqua e suolo)

E' la prima volta che viene isolato un batterio dalle acque sotterranee in grado di degradare le s-triazine

A new fluorescent oligonucleotide probe for in situ detection of s-triazine-degrading *Rhodococcus wratislaviensis* in contaminated groundwater and soil samples. *Water Research* 2009, 43: 2999-3008.

CONCLUSIONI

Studi ad *hoc* in aree vulnerabili da un punto di vista geopedologico (con situazioni di falda libera poco profonda e non protetta) e caratterizzate da una forte pressione agricola sono auspicabili per potere valutare su scala territoriale le situazioni di criticità derivanti dall'uso di taluni principi attivi di prodotti fitosanitari (es. terbutilazina) e di eventuali prodotti di degradazione di rilevanza ambientale e sanitaria.

Fine

Grazie per l'attenzione!

barracaracciolo@irsa.cnr.it