



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE FORESTALI E AMBIENTALI

***Eisenia fetida* e pesticidi:  
valutazione degli effetti di dosi subletali in  
suoli ricchi di sostanza organica**

*Eisenia fetida* and pesticides:  
evaluation of the effects of sub-lethal doses in  
organic soils

TIPO TESI: sperimentale

Studente:  
LUCA CARLETTI

Relatore:  
PROF. CRISTIANO CASUCCI

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

# INDICE

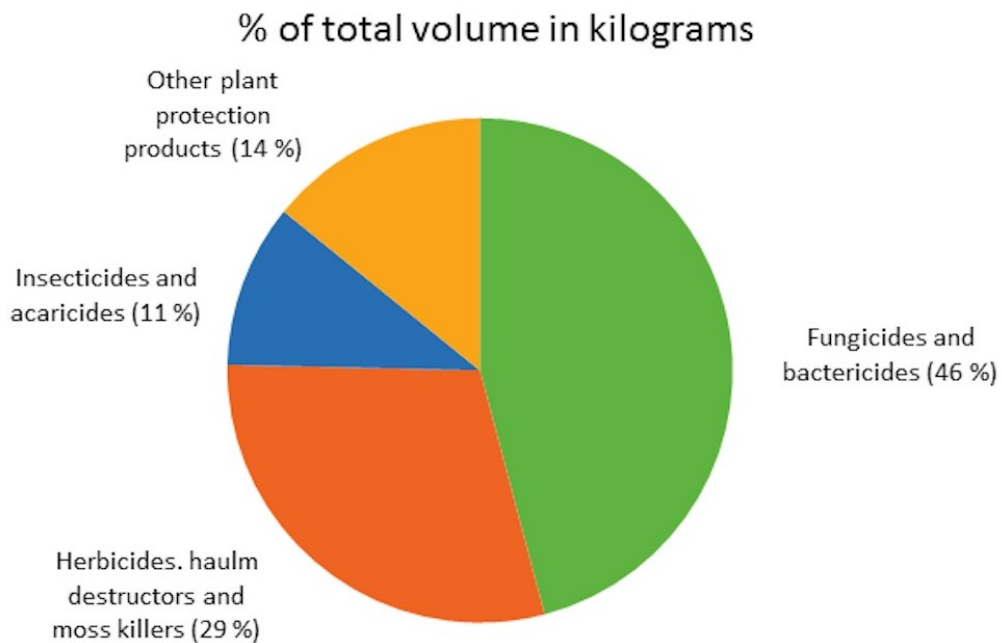
|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| 0. INDICE .....                                             | 2  |
| 1. INTRODUZIONE .....                                       | 4  |
| 1.1 Pesticidi .....                                         | 4  |
| 1.1.1 Classificazione .....                                 | 7  |
| 1.1.2 Destino ambientale dei pesticidi .....                | 10 |
| 1.1.2.1 Contaminazione diffusa .....                        | 11 |
| 1.1.2.2 Contaminazione puntiforme .....                     | 12 |
| 1.1.2.3 Adsorbimento e degradazione .....                   | 13 |
| 1.1.3 Pesticidi naturali .....                              | 16 |
| 1.2 Eco - tossicologia .....                                | 17 |
| 1.3 Lombrichi .....                                         | 23 |
| 1.3.1 I lombrichi come bioindicatori .....                  | 23 |
| 1.3.2 Classificazione .....                                 | 25 |
| 1.3.3 Ecologia .....                                        | 27 |
| 1.3.4 <i>Eisenia fetida</i> .....                           | 29 |
| 2. SCOPO DELLA TESI .....                                   | 31 |
| 3. MATERIALI .....                                          | 32 |
| 3.1 <i>Eisenia fetida</i> : provenienza e allevamento ..... | 32 |
| 3.2 Suolo .....                                             | 33 |
| 3.3 Fitofarmaci utilizzati .....                            | 35 |
| 3.3.1 Chlorpyrifos .....                                    | 35 |
| 3.3.1.1 Meccanismo d'azione .....                           | 35 |
| 3.3.1.2 Tossicologia ed eco-tossicologia .....              | 36 |

|         |                                                       |    |
|---------|-------------------------------------------------------|----|
| 3.3.1.3 | Caratteristiche chimico-fisiche .....                 | 36 |
| 3.3.2   | Spinosad .....                                        | 37 |
| 3.3.2.1 | Meccanismo d'azione .....                             | 38 |
| 3.3.2.2 | Caratteristiche chimico-fisiche .....                 | 39 |
| 3.3.2.3 | Tossicologia ed eco-tossicologia .....                | 39 |
| 4.      | METODI .....                                          | 40 |
| 4.1     | Estrazione ed analisi dei fitofarmaci nel suolo ..... | 40 |
| 4.1.1   | Retta di taratura .....                               | 40 |
| 4.1.2   | Prove di recupero e residui .....                     | 41 |
| 4.1.3   | Contaminazione, estrazione e purificazione .....      | 43 |
| 4.1.4   | Analisi strumentale .....                             | 46 |
| 4.2     | Valutazione danni a <i>Eisenia fetida</i> .....       | 47 |
| 4.2.1   | Comet Assay .....                                     | 48 |
| 5.      | RISULTATI E DISCUSSIONE .....                         | 52 |
| 5.1     | Linearità della risposta strumentale .....            | 52 |
| 5.2     | Residui .....                                         | 54 |
| 5.3     | Recuperi .....                                        | 56 |
| 5.4     | Valutazione danni a <i>Eisenia fetida</i> .....       | 59 |
| 5.4.1   | Comet Assay .....                                     | 61 |
| 6.      | CONCLUSIONI .....                                     | 62 |
| 7.      | BIBLIOGRAFIA.....                                     | 64 |

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 PESTICIDI

Il termine fitofarmaco (o agrofarmaco o pesticida come traduzione letterale dall'inglese "pesticide") indica una categoria di composti xenobiotici, ossia che sono estranei all'ecosistema naturale, utilizzati per combattere, prevenire e/o curare, attraverso diversi meccanismi di azione, le infezioni causate ai vegetali da organismi nocivi quali funghi, insetti, ecc., nonché a contrastare o a eliminare specie vegetali infestanti, incrementando notevolmente la resa e la qualità delle colture.



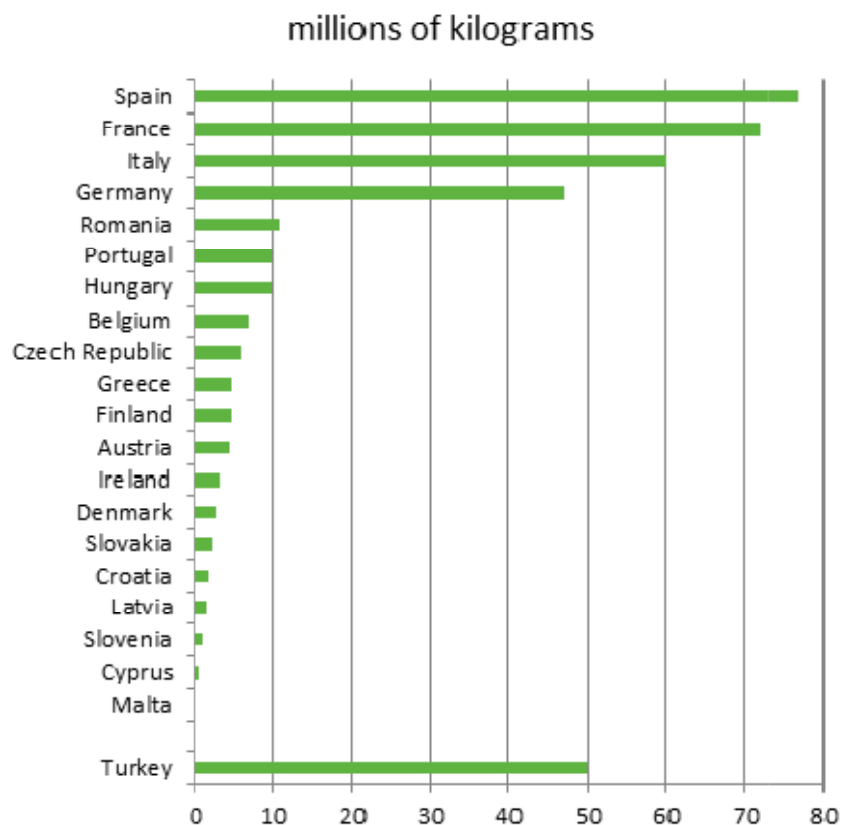
**Grafico 1** – Tipologie pesticidi più venduti in Europa (*EUROSTAT, 2016*)

Queste molecole, tendenzialmente apolari e con catena lineare o ramificata e numerosi gruppi funzionali, possono, in misura diversa, essere dannose e tossiche per gli esseri umani e per l'ecosistema e possono essere causa di contaminazione ambientale, in particolare delle falde acquifere. Nel corso degli anni infatti, frequenti

sono stati i danni a carico di numerosi ecosistemi, a titolo di esempio si può citare il noto insetticida organoclorurato DDT (DicloroDifenilTricloroetano) utilizzato dapprima in ambito civile e successivamente in ambito agricolo. L'uso incontrollato, senza regole e anche senza la conoscenza approfondita di quel composto, ha causato dei danni considerevoli con annessi fenomeni di bioaccumulo, inquinamento della catena alimentare e tossicità cronica (*Molinari et al. 2008*). D'altro canto non si possono tacere numerosi successi ottenuti con l'uso di questa sostanza; ad esempio la malaria, in molte zone dell'Italia, è stata debellata proprio grazie all'utilizzo di questo insetticida. E' quindi importante saper stabilire il giusto grado di utilizzo dei fitofarmaci in relazione alla loro pericolosità intrinseca e alla loro utilità, e aver un'adeguata informazione sul loro corretto utilizzo.

Il PAN (Piano di azione nazionale per l'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari), entrato in vigore tramite il decreto interministeriale 22 gennaio 2014, ai sensi dell'articolo 6 del decreto legislativo 14 agosto 2012, n. 150 recante: «Attuazione della direttiva 2009/128/CE che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi», impone delle misure specifiche da adottare nelle aree frequentate dalla popolazione e da gruppi vulnerabili, tra cui parchi e giardini pubblici, campi sportivi, aree ricreative, cortili ed aree verdi delle scuole o con esse confinanti. Viene espressamente vietato in queste aree l'utilizzo di una serie di pesticidi, già ampiamente noti come pericolosi per la salute urbana. È molto importante vigilare affinché le norme in esso contenute siano applicate integralmente da ogni amministrazione pubblica come anche rispettate dai cittadini. (*Bianco, Jacomini INSPRA, 2005*).

L'Italia è il terzo stato dell'Unione Europea per consumo di prodotti chimici destinati all'agricoltura, ed insieme a Spagna, Francia e Germania rappresenta quasi l'80% del consumo totale europeo.



**Grafico 2** – Vendite pesticidi in Europa (*EUROSTAT, 2016*)

Nel passato veniva effettuata la cosiddetta lotta cieca o “a calendario”, ossia venivano effettuati trattamenti fitosanitari senza verificare l’effettiva presenza del patogeno; c’era quindi un uso incontrollato di fitofarmaci. Attualmente invece il trattamento viene, o almeno dovrebbe essere, effettuato solo se la cosiddetta soglia di intervento viene superata; inoltre si presta molta più attenzione alla prevenzione, alla corretta gestione degli impianti e all’utilizzo di mezzi agronomici e biologici.

### 1.1.1 CLASSIFICAZIONE

I fitofarmaci possono essere classificati secondo diversi criteri basati sul settore di impiego, sulla classificazione chimica e sulla classificazione funzionale (*Molinari et al. 2008*).

Secondo il settore di impiego distinguiamo fondamentalmente sette classi di fitofarmaci, di cui quattro principali:

1. Anticrittogamici o fungicidi: in cui il principio attivo è diretto alla lotta contro i funghi, i fungicidi si dividono a loro volta in:

- Fungicidi di copertura: non in grado di penetrare nei tessuti vegetali e quindi attivi come barriera chimica esterna, aventi generalmente azione multisito preventiva, protettiva ma non curativa; spettro di efficacia generalmente abbastanza ampio. Azione fungitossica fondamentalmente diretta sul processo respiratorio cellulare, con conseguente blocco della germinazione delle spore.
- Fungicidi sistemici: in genere più persistenti dei prodotti di copertura, attivi a dosi nettamente più basse rispetto ai prodotti tradizionali di copertura, aventi spettro di attività più o meno ampio, talvolta specifico. Meccanismo di fungitossicità molto vario, generalmente rivolto verso specifici processi del biochimismo cellulare, aventi azione unisito od oligosito, in grado di svolgere anche un'azione curativa (successiva alla penetrazione del patogeno durante il periodo di incubazione). A causa del meccanismo d'azione generalmente unisito, il rischio di resistenza è più o meno elevato. La resistenza dei patogeni ai fungicidi consiste nella perdita di efficacia da parte di un principio attivo dopo un periodo di impiego più o meno prolungato. Ed è un fenomeno dovuto alla selezione (a seguito dell'impiego ripetuto del fungicida) e diffusione di

isolati dei patogeni meno sensibili o insensibili a un determinato principio attivo. Ha una base genetica, derivando da mutazioni naturali, ed è quindi ereditaria.

- Fungicidi citotropici: aventi scarsa mobilità, interessano solo lo strato superficiale adiacente della superficie trattata.
- Fungicidi translaminari: che hanno buona mobilità, arrivano negli strati più profondi senza però essere traslocati da floema o xilema.

2. Insetticidi: utilizzati nella lotta agli insetti fitopatogeni, aventi anche essi delle classificazioni basate sulla modalità d'azione:

- Insetticidi di contatto: penetrano attraverso l'esoscheletro costituito da cuticola ed epidermide;
- Insetticidi che agiscono per ingestione: sono principi attivi che penetrano a livello dei tubuli digestivi, vengono assunti dall'insetto quando si nutre del vegetale;
- Insetticidi che agiscono per inalazione: penetrano attraverso gli spiracoli, convogliati nelle trachee, si mescolano all'aria respirata dall'insetto raggiungendo i siti d'azione.

3. Diserbanti o erbicidi: sostanze chimiche organiche e inorganiche che, opportunamente distribuiti sul terreno e sulla vegetazione, esplicano la loro azione tossica nei confronti delle piante infestanti. Gli erbicidi vengono classificati in base al modo di applicazione, alla selettività e al modo d'azione. Una prima importante distinzione è tra diserbanti totali e diserbanti selettivi e tra erbicidi ad azione di contatto, di traslocazione o residuale:



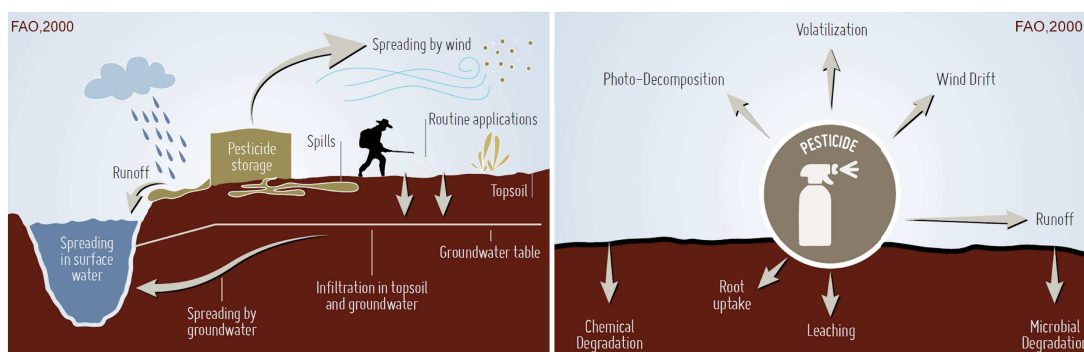
- Erbicidi totali: sono quelli che esplicano la loro azione tossica in modo indiscriminato su ogni specie vegetale (es. glyphosate).
  - Erbicidi selettivi: sono quelli che colpiscono un numero di specie limitato senza arrecare danni alle specie vegetali non-target. La selettività si realizza attraverso molteplici meccanismi legati sia alle caratteristiche intrinseche del diserbante e/o delle piante, sia alle modalità di applicazione dei diserbanti stessi.
  - Erbicidi che agiscono per contatto: erbicidi che agiscono direttamente sugli organi vegetali con cui vengono a contatto, senza avere traslocazione; è quindi importante far entrare in contatto il prodotto con la specie infestante.
  - Erbicidi che agiscono per traslocazione: svolgono la loro azione all'interno della pianta dopo essere stati trasportati a distanza dal punto di applicazione. L'assorbimento può avvenire a livello delle foglie o delle radici. Vengono generalmente utilizzati contro infestanti annuali e perenni.
  - Erbicidi residuali: vengono applicati al suolo e distribuiti nello spazio superficiale dove persistono per un tempo più o meno lungo.
4. Acaricidi: fitofarmaci il cui principio attivo è diretto alla lotta agli acari. Si dividono in ovicidi, neanicidi e adulticidi, in base allo stadio fenologico colpito.
  5. Fitoregolatori: agiscono sulla morfologia e fisiologia dei vegetali trattati
  6. Nematocidi: agiscono sui nematodi
  7. Rodenticidi: agiscono contro i roditori.

Dal punto di vista chimico è possibile dividere i fitofarmaci in tre grandi gruppi (Molinari et al. 2008).

1. Inorganici: molecole costituite da elementi inorganici, come il rame o lo zolfo che vengono utilizzati come anticrittogamici.
2. Organometallici: prodotti formati da metalli in coordinazione con composti organici.
3. Prodotti organici naturali e di sintesi: tutti derivati del carbonio; questi composti vengono raggruppati secondo delle classi omogenee in base alla struttura e proprietà chimico fisiche e all'attività biologica. I composti appartenenti alla stessa famiglia presentano infatti dei gruppi funzionali tipici; il raggruppamento in base all'attività biologica invece è basato sul meccanismo d'azione uguale o simile.

### 1.1.2 DESTINO AMBIENTALE DEI PESTICIDI

Quando vengono effettuati i trattamenti fitosanitari, la gran parte dei fitofarmaci non raggiunge il target prefissato. Questi fitofarmaci e i loro prodotti di trasformazione, sommati ai fitofarmaci che raggiungono il target possono essere trasportati in altri comparti ambientali (Ravier *et al.* 2005) La contaminazione ambientale da fitofarmaci può essere distinta in diffusa e puntiforme.



**Figura 1,2** – Distribuzione dei pesticidi nell'ambiente (FAO, 2000)

### 1.1.2.1 Contaminazione diffusa

La contaminazione diffusa riguarda la ridistribuzione dei fitofarmaci nell'ambiente e si verifica quando i fitofarmaci vengono applicati in ambito agricolo in vaste aree.

I fenomeni che riguardano la ridistribuzione dei fitofarmaci nell'ambiente sono principalmente: la volatilizzazione, la deriva, la lisciviazione e lo scorrimento superficiale.

- La volatilizzazione è il passaggio del fitofarmaco dalla fase liquida (evaporazione) o solida (sublimazione) allo stato gassoso nell'atmosfera, dove può subire fenomeni di dispersione, rideposizione e decomposizione (*Businelli M. 2009*).
- La deriva è il fenomeno che, al momento del trattamento, può portare il fitofarmaco a distanza diversa dal punto di applicazione.

La deriva è un fenomeno molto pericoloso, in quanto causa una contaminazione diretta di acque superficiali, di astanti e di colture adiacenti.



**Figura 3:** Deriva dei pesticidi (*La Stampa, 2018*)

- La lisciviazione è il processo mediante il quale i fitofarmaci vengono trasportati dalle acque percolanti lungo il profilo del suolo (*Businelli M. 2009*). Il deflusso preferenziale dell'acqua e dei soluti attraverso il suolo è principalmente riconducibile al movimento dell'acqua attraverso i macropori, senza che esso sia soggetto all'influenza delle forze capillari agenti nei micropori (*Vischetti et al. 2008*). Inoltre, la quantità di agrofarmaco che si muove nei micropori può essere ridotta anche notevolmente dai processi di adsorbimento e degradazione che ivi avvengono. Nei macropori invece, dato che questi fenomeni non avvengono, il deflusso può interessare quantità di fitofarmaco molto più elevate.
- Il runoff o scorrimento superficiale si verifica quando l'intensità di pioggia è maggiore della velocità d'infiltrazione di micro e macropori (*Vischetti et al. 2008*). Il runoff è un metodo di contaminazione quasi diretta, in quanto l'acqua che proviene dalle precipitazioni solubilizza e trasporta gli agrofarmaci lungo la superficie del suolo, fino ad eventuali acque superficiali.

### **1.1.2.2 Contaminazione puntiforme**

Da molti ricercatori è stato dimostrato che la contaminazione di tipo puntiforme è la principale via di contaminazione delle acque superficiali da fitofarmaci (*Bach et al. 1999, Mason et al. 1999*).

La contaminazione puntiforme può derivare da sversamenti accidentali al momento del caricamento delle macchine irroratrici, dal lavaggio delle attrezzature, dal lavaggio delle parti esterne delle attrezzature. Altre possibili vie di contaminazione puntiforme sono legate a violazioni delle norme vigenti sull'uso e la distribuzione di questi prodotti in agricoltura come la non corretta conservazione nei magazzini con

sversamenti accidentali e, ancor peggio, la discarica dei composti residui dopo il trattamento, nelle adiacenze dei campi o in prossimità dei corpi idrici vicini ai campi (*Vischetti et al. 2008*).

La mitigazione della contaminazione puntiforme si può effettuare con programmi di educazione degli addetti in agricoltura e con sistemi biologici di decontaminazione.

I sistemi biologici di decontaminazione permettono la depurazione delle acque provenienti dai residui dei trattamenti nelle botti e dal lavaggio delle attrezzature attraverso l'uso di particolari filtri costituiti da materiale organico di diversa provenienza (*Tortensson et al. 1997*).

Si possono attuare diverse soluzioni che consistono in buche ai margini dei campi riempite con materiali organici e con un sistema di scarico delle acque raccolte dalle attrezzature per i trattamenti (*Vischetti et al. 2008*). Le acque contaminate, attraversando tali filtri si depurano, tramite vari fenomeni e processi a carico dei fitofarmaci (*Tortensson et al. 1997*).

### **1.1.2.3 Adsorbimento e degradazione**

I due processi chemio-dinamici che possono influenzare la quantità del fitofarmaco disponibile nell'ambiente sono l'adsorbimento e la degradazione.

L'adsorbimento è il fenomeno in virtù del quale la superficie di una sostanza solida, detta adsorbente, fissa molecole provenienti da una fase gassosa o liquida con cui è a contatto. Questo processo permette di trattenere i fitofarmaci, in modo reversibile o irreversibile. L'adsorbimento è funzione sia delle caratteristiche dell'adsorbente che della molecola adsorbita (*Sannino et al. 2008*).

I fitofarmaci vengono adsorbiti tramite dei legami che si instaurano tra adsorbente e molecola adsorbita; tali legami possono essere distinti in deboli e forti.

Tra i legami deboli ricordiamo:

- *Forze di Van der Waals*: forze di interazione relativamente deboli e sempre presenti che uniscono le molecole neutre di quasi tutti i composti organici liquidi e solidi.
- *Forze elettrostatiche coulombiane*: queste forze si instaurano tra il fitofarmaco caricato, positivamente o negativamente, e il doppio strato elettrico della particella colloidale di segno opposto al fitofarmaco.
- *Legami a idrogeno*: legami che si instaurano tra atomi di idrogeno legati ad elementi dotati di forte elettronegatività e posizioni elettronegative presenti su altre molecole.
- *Ponti ad acqua*: particolare tipo di legame a idrogeno.

Tra i legami forti invece troviamo:

- *Legami di coordinazione*: si attua tra gruppi funzionali basici del fitofarmaco e gruppi funzionali basici della sostanza organica tramite un catione metallico messo a ponte tra i due composti. Il legame che si forma è irreversibile.
- *Chemioadsorbimento*: formazione di veri e propri legami covalenti tra gruppi funzionali della molecola del fitofarmaco e dei componenti del suolo.
- *Legame idrofobico*: non è un legame fortissimo, avviene quando le parti apolari di composti diversi si uniscono le une alle altre.

Dal punto di vista quantitativo, la maggior parte dei fenomeni di adsorbimento tra fitofarmaco e suolo sono idrofobici. Il legame idrofobico è particolarmente

importante per i fitofarmaci non polari. Tali molecole vengono adsorbite dalle sostanze umiche del suolo e dalla sostanza organica in generale.

I fitofarmaci si adsorbono nel suolo molto diversamente l'uno dall'altro, non solo come quantità ma anche in funzione della loro concentrazione nella soluzione circolante nel suolo (*Sannino et al. 2008*). L'adsorbimento viene valutato nel suo complesso ed espresso tramite le isoterme di adsorbimento.

I fitofarmaci in base alle loro caratteristiche chimiche e fisiche possono essere più o meno adsorbibili, il Koc (costante di adsorbimento del carbonio organico) ci da un'indicazione dell'adsorbimento di un fitofarmaco, indipendentemente dal tipo di suolo considerato.

|              |                       |
|--------------|-----------------------|
| Koc<150      | Alta mobilità         |
| 150<Koc<500  | Media mobilità        |
| 500<Koc<2000 | Bassa mobilità        |
| Koc>2000     | Praticamente immobile |

**Tabella 1:** Mobilità dei fitofarmaci in base al Koc

La degradazione è un processo che trasforma la molecola del fitofarmaco in molecole sempre più semplici, mediante una serie di processi degradativi la cui velocità è estremamente variabile e che comporta la formazione di tutta una serie di composti intermedi (*Businelli M. 2009*).

A seconda delle cause di degradazione si può avere (*Businelli M. 2009*):

- degradazione fotochimica: catalizzata dalla luce solare e il cui meccanismo consiste nella rottura omolitica dei legami, con formazione di radicali liberi molto attivi.

- degradazione chimica: realizzata in gran parte da reazioni di idrolisi ed ossidazione, è catalizzata sia da ioni presenti nella soluzione del suolo (ioni metallici,  $H_3O^+$  e  $OH^-$ ) sia da componenti solidi come argille, ossidi ed humus.
- degradazione biologica: è quella causata dalla biomassa microbica e tra tutti i processi citati è sicuramente il più importante, viene effettuata da molti generi di microorganismi in seguito a processi aerobici e anaerobici.

Lo studio cinetico della degradazione permette di ricavare il parametro più diffuso ossia il tempo di emivita ( $t_{1/2}$ ) ossia il tempo in giorni che il fitofarmaco impiega ad arrivare alla metà della concentrazione iniziale.

Si è visto che la degradazione dei fitofarmaci può essere associata a una cinetica di primo ordine, in cui la velocità di scomparsa del composto è proporzionale alla concentrazione (*Businelli M. 2009*).

### **1.1.3 PESTICIDI NATURALI**

Come detto pocanzi, l'utilizzo incondizionato dei pesticidi ha causato effetti negativi a carico dei vari ecosistemi e degli organismi non direttamente bersaglio dei fitofarmaci, grazie alla loro capacità di essere facilmente trasportati e/o degradati nell'ambiente.

Per cercare di limitare questo problema, sono stati fatti studi al fine di individuare e sviluppare nuovi sbocchi più sostenibili per il controllo dei patogeni.

Una di queste soluzioni sono proprio i pesticidi naturali, ossia delle sostanze atte a debellare i parassiti, ma non tossiche per l'ambiente e per l'uomo.



## 1.2 ECO - TOSSICOLOGIA

Attualmente i fitofarmaci devono seguire un iter per la registrazione e immissione sul mercato molto rigido, con la produzione di un dossier che derivi da studi decennali per verificarne la tossicologia e soprattutto l'eco-tossicologia. Il dossier di registrazione deve contenere informazioni sia sul principio attivo che sulle varie formulazioni, che siano sufficienti a condurre una valutazione di rischio per la salute e per l'ambiente (*Buratti et al. 2008*)

L'eco-tossicologia è la scienza che studia gli effetti tossici degli agenti chimici e fisici sugli organismi viventi, le modalità di diffusione di questi agenti e le loro interazioni con l'ambiente. Rappresenta una scienza multidisciplinare che unisce la tossicologia, l'ecologia e la chimica ambientale, per prevedere gli effetti potenzialmente tossici degli agenti chimici e fisici sull'ambiente e sugli organismi facenti parte di tutti gli anelli della catena trofica (*Merli et al. 2008*).

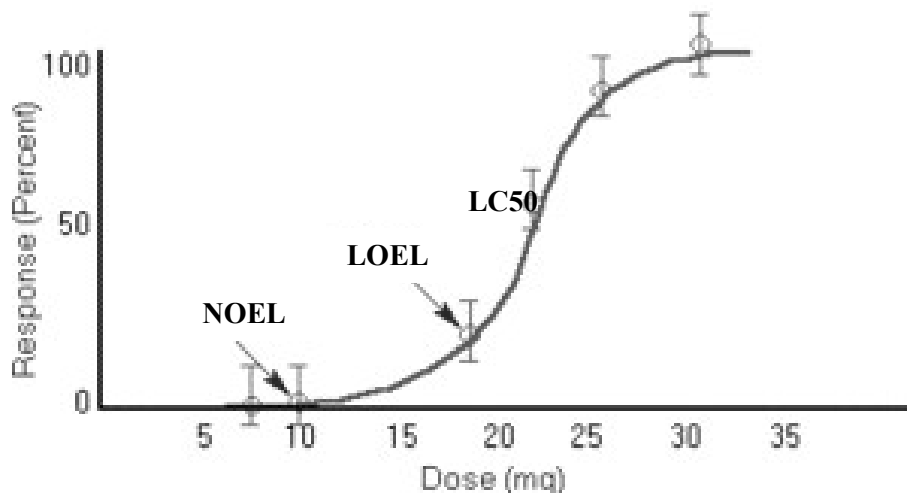
I parametri più comunemente utilizzati per quantificare l'effetto degli agrofarmaci sugli organismi sono chiamati *endpoint* tossicologici. Il principio base dei saggi eco-tossicologici da cui essi derivano, è la misura della curva dose risposta, che mette in relazione la concentrazione somministrata e la risposta dell'organismo (*Merli et al. 2008*).

I principali *endpoint* ecotossicologici sono:

- **LC50** (*Lethal Concentration 50*): concentrazione letale per il 50% degli individui di una popolazione, da riferirsi al tempo di esposizione.
- **EC50** (*Effective Concentration 50*): come la LC50 prendendo però in considerazione effetti diversi dalla morte.

- **NOEL** (*No Observed Effect Level*): rappresenta la più alta concentrazione o dosi a cui non si sono riscontrati effetti.
- **LOEL** (*Lowest Observed Effect Level*): rappresenta la più bassa concentrazione o dose a cui sono stati riscontrati effetti.
- **PNEC** (*Predicted No Effect Concentrations*): rappresenta la concentrazione ambientale massima senza effetti dannosi e viene calcolata utilizzando i dati di LC50, NOEL, LOEL ecc. e il fattore di sicurezza, che dipende dalla qualità e dal numero di informazioni disponibili

$$PNEC = \frac{\text{valore tossicologico (LC50 o EC50)}}{\text{fattore di sicurezza (spesso 1000)}}$$



**Grafico 3:** Esempio di curva dose-risposta (Colacci 2009)

La stima del rischio ambientale da sostanze contaminanti si può definire come la valutazione quantitativa della probabilità che si verifichi un certo effetto ambientale, come risultato dell'esposizione ad una sostanza contaminante (Merli et al. 2008).

L'articolo VI della Direttiva 91/414/CEE, sostituita dal regolamento CE 1107/2009, riguardante l'immissione in commercio dei fitofarmaci, introduceva in

concetto di TER (*Toxicity Exposure Ratio*) definito come il rapporto tra un determinato *endpoint* tossicologico (LC50, PNEC ecc) riferito ad una certa categoria di organismi non bersaglio e l'esposizione prevedibile PEC nei diversi comparti ambientali nei quali si muove l'organismo non bersaglio sotto osservazione (*Predicted Environmental Concentrations*), ottenuta tramite simulazioni ad hoc.

$$TER: \frac{LC50 \text{ o } EC50}{PEC}$$

La procedura di valutazione del TER tramite modelli simulativi, come stabilito dal capitolo 8 del dossier di registrazione dei fitofarmaci presente nel regolamento CE 1107/2009, potrebbe non rappresentare la situazione reale.




Nella realtà le cose possono essere diverse dalla situazione deterministica e di simulazione effettuata dalle case produttrici. A tal proposito, negli ultimi anni si sono sviluppate ricerche eco-tossicologiche a diversi livelli di approfondimento, avendo come scopo finale quello di valutare gli effettivi rischi dovuti all'immissione di sostanze potenzialmente tossiche in ecosistemi più o meno sensibili.

L'Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico (OCSE) – in inglese *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) – è un'organizzazione intergovernativa costituita da 30 Paesi membri, siti in Nord America, Europa e Pacifico. L'OECD lavora per coordinare ed armonizzare politiche governative, affrontare questioni di reciproco interesse e rispondere ai problemi internazionali (*OECD n°15, 2002*).

Il *Pesticide Programme* fu creato dalla Divisione OECD della salute e sicurezza ambientale nel 1992, con lo scopo di:

- Armonizzare le procedure di revisione dei pesticidi

- Condividere il lavoro di valutazione dei pesticidi
- Ridurre i rischi associati all'utilizzo dei pesticidi

|                                                                                    |                                                                                                                                                                            |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  |                                                                                                                                                                            |
| <b>Sede centrale</b>                                                               | Parigi                                                                                                                                                                     |
| <b>Abbreviazione</b>                                                               | OCSE (it) – OECD (ing) – OCDE (fr)                                                                                                                                         |
| <b>Tipo</b>                                                                        | organizzazione internazionale                                                                                                                                              |
| <b>Fondazione</b>                                                                  | 16 aprile 1948 (come OECE)<br>30 settembre 1961 (trasformata in OCSE)                                                                                                      |
| <b>Sede centrale</b>                                                               |  Château de la Muette, Parigi                                                           |
| <b>Area di azione</b>                                                              | <br> |
| <b>Segretario generale</b>                                                         |  Ángel Gurría                                                                           |
| <b>Direttore</b>                                                                   | Anthony Rottier, executive director                                                                                                                                        |
| <b>Lingue ufficiali</b>                                                            | Inglese, francese                                                                                                                                                          |

**Tabella 2:** Descrizione OECD (*Wikipedia*)

I vari test effettuati in questa tesi, sono stati fatti basandosi sulle procedure standardizzate dell'OECD. I principali parametri considerati, che verranno poi spiegati in seguito, sono le condizioni analitiche e ambientali dei test e le

osservazioni per la valutazione dello stato di salute degli organismi utilizzati per le varie prove.

L'eco-tossicologia si avvale di numerosi tipi di indicatori che possono essere abiotici e biotici. La prima tipologia di indicatori valuta la qualità ambientale, la seconda è decisamente meno standardizzata e diffusa e si basa sul concetto di "organismo indicatore" (bioindicatore) (Merli *et al.* 2008).

Con organismo bioindicatore si intende una specie, generalmente animale, particolarmente sensibile a cambiamenti apportati da fattori inquinanti all'ecosistema.

L'impiego di bioindicatori è particolarmente sviluppato nello studio delle acque correnti e del suolo.

Lo studio e il monitoraggio di questi organismi "sentinella" hanno permesso di valutare le risposte che un organismo, una popolazione o una comunità naturale può generare, nei confronti di uno stress chimico ambientale. Queste risposte in campo biologico vengono definite *biomarker*, o marcatori biologici.

Secondo la definizione fornita da Depledge, un *biomarker* eco-tossicologico rappresenta "quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica e comportamentale che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo, che da evidenza di esposizione e/o effetto a uno o più composti inquinanti". I biomarker permettono quindi di valutare le alterazioni a carico dell'organismo sentinella causate dall'agente tossico. I biomarker maggiormente studiati possono essere di vario genere e tipo (Merli *et al.* 2008):

- indicatori di stress ossidativi oppure la presenza di radicali liberi e ROS (*Reacting Oxygen Species*);
- proteine da stress come le *Heat Shock Proteins* (HSP), la loro sintesi viene indotta dai danni generati da diversi fattori di stress, tra cui le sostanze tossiche;
- parametri riproduttivi;
- parametri genotossici.

In particolare, lo studio dei parametri di genotossicità ha portato negli anni allo sviluppo di nuove metodologie sperimentali per rilevare effetti di tossicità sugli organismi bioindicatori.

Molti composti rilasciati nell'ambiente sono potenzialmente genotossici, ed essi sono in grado cioè di interagire con il materiale genetico direttamente o a seguito di attivazione metabolica, modificandone la struttura. Le lesioni che non sono riparate possono portare alla fissazione di anomalie del materiale genetico. Numerose sono le tecniche e metodologie disponibili per rilevare le varie risposte genotossiche che possono essere indotte in organismi esposti a contaminanti (*Shugart et al, 1995*). Uno dei procedimenti più utilizzati per valutare la genotossicità dei fitofarmaci nei confronti degli organismi sentinella è il *comet assay*, che verrà debitamente descritto in seguito.

Fra gli organismi maggiormente utilizzati come bioindicatori nel suolo troviamo i vermi terricoli (*Lanno et al. 2004, Piola et al. 2009*), proprio per la loro caratteristica di essere efficienti accumulatori di xenobiotici, entrando in stretto contatto con il suolo e cibandosi di esso, e di rispondere alla loro esposizione in modo sensibile e misurabile.

## 1.3 LOMBRICHI

In natura i lombrichi svolgono un ruolo importante nella degradazione della sostanza organica e nel ciclo dei nutrienti. Per i loro molteplici effetti sulla struttura fisica ed il funzionamento biochimico del suolo, hanno una notevole valenza ecologica (Edwards, 2004). I lombrichi sono organismi onnipresenti, abbondanti e molto produttivi; essi sono specie chiave nelle reti alimentari del suolo e sono spesso definiti “ingegneri dell’ecosistema” (Lavelle 1988, Jones et al. 1994, Brown et al. 2000). Esistono numerose specie di lombrichi, secondo Reynolds e Wetzel (2010), sono ben 8300 le specie finora descritte e circa la metà sono terrestri. Appartengono tutte al phylum *Anellida*, classe *Oligochaeta*.

### 1.3.1 I LOMBRICHI COME BIOINDICATORI

La fauna del suolo è un importante componente degli ecosistemi edafici in quanto è coinvolta in numerosi aspetti della decomposizione della sostanza organica, contribuisce alla regolazione dell’attività microbica, del ciclo dei nutrienti e della struttura del suolo (Pateris et al. 2012). La fauna edafica impiegata nel monitoraggio degli inquinanti nei suoli include Nematodi, Enchitreidi, Gasteropodi, Collemboli, Isopodi, Aracnidi, Oligocheti (Cortet et al., 1999). Tra gli Oligocheti spiccano per importanza i lombrichi. Essi sono senza dubbio i componenti biotici più importanti del suolo in termini di formazione e manutenzione della sua struttura e fertilità, e le loro grandi dimensioni li rendono i maggiori costituenti della biomassa di invertebrati nel suolo. Aristotele fu uno dei primi a richiamare l’attenzione sul ruolo dei lombrichi, da lui giustamente chiamati gli “intestini della Terra”. Come dimostrò Charles Darwin nel suo libro del 1881, “La Formazione di terra vegetale per azione

dei vermi, con osservazioni sulle loro abitudini”, le attività dei lombrichi hanno un effetto benefico sul suolo: per alimentarsi il lombrico ingerisce terreno contenente detriti vegetali e altre sostanze organiche, che il suo apparato digerente trita e omogeneizza prima di evacuarlo con deiezioni terrose, visibili sotto forma di montagnole, che costituiscono un humus assai favorevole allo sviluppo dei vegetali. Inoltre con il loro movimento, i lombrichi scavano gallerie frantumando il suolo, permettendo così l'aerazione e il rimescolamento delle sue componenti. I cunicoli scavati sia in orizzontale che in verticale aumentano la porosità, permettendo un maggiore drenaggio delle acque e una migliore penetrazione delle radici delle piante. Il suolo è portato dalla profondità alla superficie sotto forma di masse fecali, mentre il materiale organico passa dalla superficie a livelli inferiori, aumentando la fertilità del terreno. I lombrichi rendono i nutrienti del terreno maggiormente biodisponibili, e le loro feci contengono fino a 5 volte più azoto, 7 volte più fosforo e 11 volte più potassio della terra circostante. Con questo eccellente concime forniscono un contributo sostanziale all'approvvigionamento di sostanze nutritive delle piante. Questi organismi sono sfruttati spesso per la loro capacità di trasformare la materia organica, in quanto grazie al loro utilizzo (*vermicompostaggio*) è possibile produrre fertilizzante a partire dalle deiezioni animali.

I lombrichi sono considerati ottimi bioindicatori dello stato di salute del suolo perché sono onnipresenti e resilienti, sensibili a un gran numero di contaminanti, hanno un alto tasso riproduttivo e un ciclo di vita relativamente lungo, sono resistenti a una vasta gamma di temperature e umidità, possono essere facilmente allevati e manipolati, sono a diretto contatto col substrato in cui vivono, e ne ingeriscono grandi quantità. Inoltre non sono rivestiti di cuticola e possono quindi assorbire



inquinanti direttamente attraverso la superficie corporea. Potrebbero essere considerati gli equivalenti terrestri degli organismi acquatici filtratori. La risposta dei lombrichi ad un inquinante tossico non si limita alla mortalità, ma prima sono influenzati anche il tasso di crescita, la riproduzione e il comportamento; sono anche in grado di accumulare alcuni inquinanti, come i metalli, nei loro tessuti. Le vie di esposizione dei lombrichi ai contaminanti presenti nel suolo sono rappresentate prevalentemente dall'assorbimento dell'acqua interstiziale attraverso la superficie corporea, e in misura minore dall'ingestione del suolo e della sostanza organica in esso presente e dalla respirazione dell'aria interstiziale.

### **1.3.2 CLASSIFICAZIONE**

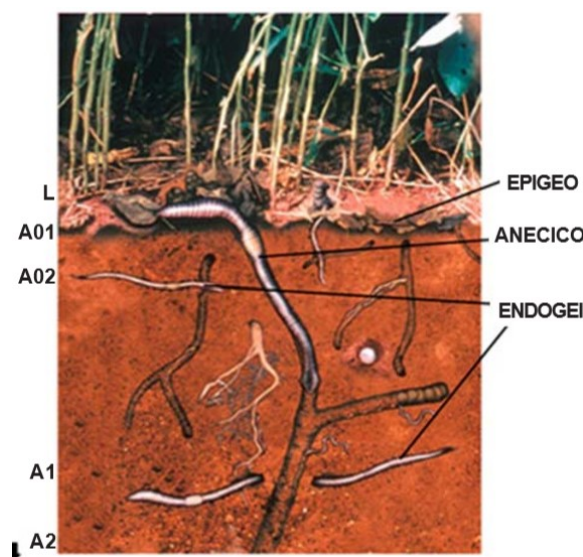
I Lombrichi, secondo la letteratura (*Bouché, 1972; Sims e Gerard, 1985; Lee, 1985; Paoletti, 1999; Edwards, 1998*), possono essere classificati in:

- Epigei: pigmentati dorsalmente, frequentano lo strato della lettiera L e l'orizzonte A01 del suolo, in cui è riconoscibile la forma del materiale organico originario;
- Endogei: in genere ma non sempre meno pigmentati, frequentano l'orizzonte A02 (strato organico in cui la forma del materiale originario non è riconoscibile) fino all'orizzonte A1 (evolutosi in seguito all'accumulo di sostanza organica umificata associata alla frazione minerale); scavano gallerie prevalentemente orizzontali;
- Anecici o profondi scavatori: anche di grandi dimensioni, possono arrivare fino all'orizzonte A2 (caratterizzato dalla perdita di argilla, ferro o alluminio con concentrazione di minerali resistenti) e B (ove si accumulano argilla, minerali di ferro, carbonati, humus rendendo questo orizzonte colorato); scavano gallerie

verticali che possono raggiungere anche qualche metro di profondità, spesso salgono presso la superficie per nutrirsi di lettiera;

– Coprofagi: lombrichi che vivono nel letame o nel compost e sono strettamente associati ad esso e quindi raramente si raccolgono nei suoli dove non sopravvivono a lungo, in seguito allo spandimento di materiali organici (letame e compost);

– Idrofili: lombrichi amanti di suoli con falda freatica superficiale, anche in prossimità di fiumi, nelle bonifiche e nelle zone intertidali.



**Figura 4:** Schema di profilo pedologico con rappresentazione di alcune categorie ecologiche di lombrichi (modificato da *Lavelle P., 1996*).

L'appartenenza alle diverse categorie viene determinata mediante l'impiego di chiavi dicotomiche. Una chiave dicotomica si basa sulle definizioni dei caratteri morfologici, macroscopici o microscopici; da essa si diramano due soluzioni possibili, se hanno o non hanno un determinato carattere (*Wikipedia*).

Le caratteristiche morfologiche più comunemente impiegate nella definizione delle categorie ecologiche dei lombrichi, sono riportati nella **tabella 3**.

| Categoria ecologica | Pigmento                                                                                | Lunghezza adulto (cm)                                            | Diametro (mm) | Muscolatura                    | Mobilità                                                          | Forma regione caudale                | Tipo di gallerie                                                                  | Cibo                                                              | Habitat preferito                                                                        | Capacità riproduttiva                   | Reazione al disseccamento del suolo | Capacità rigenerativa |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------|
| EPIGEI              | Marrone, rossiccio, vinaccia, più scuro sul dorso e verso la testa                      | Piccola (Vivo: < 14; Conservato: < 8)                            | 1 < X > 2,5   | Ridotta                        | Elevata                                                           | Cilindrica                           | Non permanenti                                                                    | Letiera, funghi e microrganismi di essa                           | Letiera fino ai primi 2,5 cm di profondità, anche sotto corteccia                        | Elevata (65-106 bozzoli /anno)          | Bozzoli                             | Ridotta               |
| ENDOGEI             | Grigiastro, bluastro, giallastro, a volte con la testa rosa chiaro (depigmentazione)    | Piccola- media-grande (Vivo: 6 < X > 22; Conservato: 3 < X > 18) | 1 < X > 6,5   | Ben sviluppata                 | Variabile                                                         | Cilindrica                           | Sistemi ramificati di gallerie sub-orizzontali                                    | Suolo, sostanza organica, funghi e microrganismi presenti in esso | Prevalentemente entro i primi 50 cm di profondità                                        | Scarsa (8-27 bozzoli /anno)             | Quiescenza (Fig. 4)                 | Variabile             |
| ANECICI             | Rossiccio, marrone, anche a bande, più scuro sul dorso, iridescente, anche depigmentati | Media-grande (Vivo: > 20; Conservato: > 12,5)                    | 4 < X > 15    | Ben sviluppata                 | Altamente contrattili, capaci di rapide retrazioni nelle gallerie | Depressa, a forma di pala lanceolata | Prevalentemente verticali, permanenti che possono raggiungere i 3 m di profondità | Letiera fresca, suolo                                             | Percorrono tutti gli strati del suolo fino a circa 2-3 m; di notte salgono in superficie | Bassa (1-8 bozzoli/anno)                | Diapausa                            | Sviluppata            |
| COPROFAGI           | Vario, anche a bande                                                                    | Piccola (Vivo: < 14; Conservato: < 7)                            | 2 < X > 5     | Non particolarmente sviluppata | Elevata                                                           | Cilindrica                           | Non scavano gallerie                                                              | Solo sostanza organica fresca                                     | Letame o compost                                                                         | Elevata (107 bozzoli /anno *E. foetida) |                                     | Sviluppata            |
| IDROFILFI           | Vario, rosso, verdastro                                                                 | Piccola-media (Vivo: < 15; Conservato: < 12)                     | 2 < X > 5     | Non particolarmente sviluppata | Elevata                                                           | Con doccia dorsale                   | Non scavano gallerie                                                              | Sostanza organica                                                 | Terreni con falda superficiale, benthos di piccoli corsi d'acqua                         | Media (41 bozzoli /anno)                |                                     |                       |

**Tabella 3:** Elenco dei caratteri utili per distinguere le categorie ecologiche dei lombrichi (Paoletti et al. 2013)

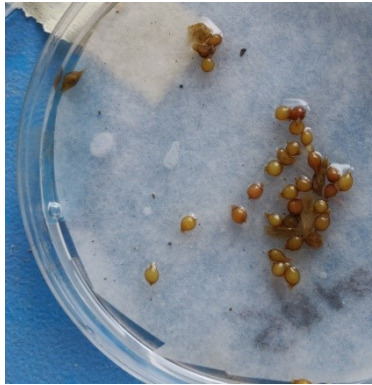
### 1.3.3 ECOLOGIA

I vermi terricoli appartenenti alla famiglia dei Lombricidi, in particolare le specie *Allolobophora caliginosa*, *Eisenia foetida*, *Eisenia andrei* sono le più presenti nella pedofauna europea. I lombrichi sono organismi dal corpo cilindrico allungato e diviso in segmenti, a simmetria bilaterale, con una ghiandola esterna dalla forma ad anello rigonfio (clitello) che si trova dietro i pori genitali e che ha la funzione di produrre le uova (secrete in bozzoli, chiamati *cocoons*), un lobo sensoriale davanti alla bocca (prostomio), e un ano alla fine del corpo animale, con un piccolo numero di setole su ciascun segmento. Assumendo condizioni favorevoli, essi raggiungono la maturità sessuale in un arco di tempo compreso tra due mesi e un anno di vita. Gli individui sessualmente maturi possono essere facilmente distinti dalla presenza del

clitello, che può essere di colore più o meno scuro rispetto al resto del corpo (Dominguez e Edwards, 2011). I lombrichi sono animali ermafroditi insufficienti che praticano la fecondazione incrociata all'interno dei bozzoli. Il clitello, pochi giorni dopo l'accoppiamento, secerne il cocon, e le cellule della ghiandola clitellare producono un liquido nutritivo albuminoso che riempie il cocoon. Il cocoon pieno di albume scivola in avanti mentre il verme si ritrae, successivamente passa prima sui gonopori femminili, dove le uova sono liberate all'interno del cocoon, poi passa ai ricettacoli seminali, dai quali sono liberati gli spermatozoi: così le uova subiscono la fecondazione incrociata. I cocons, che sono di forma ovoidale e di colore bruno-giallastro, sono solitamente depositati vicino alla superficie del suolo, tranne in periodi di siccità quando possono essere deposti in strati più profondi. In condizioni favorevoli, i lombrichi possono accoppiarsi continuamente durante la primavera e formare cocons ogni tre o quattro giorni. Le uova si schiudono dopo un periodo di incubazione che varia a seconda della specie di lombrico e delle condizioni ambientali (Pateris et al. 2012).



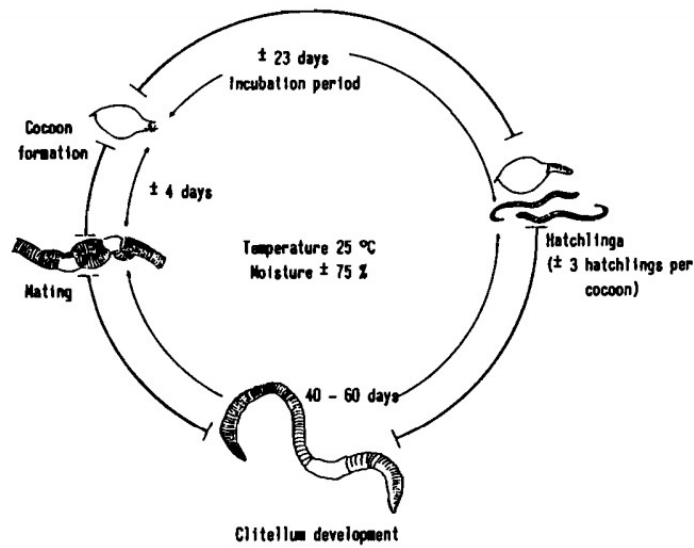
**Figura 5** : Esempari di *Eisenia fetida* prelevati dall'allevamento



**Figura 6:** Cocoons

### **1.3.4 *Eisenia fetida***

*Eisenia fetida*, il comune verme rosso, è una delle specie di Lombrichi più diffuse in Europa, e si trova soprattutto in climi temperati ed in ambienti molto ricchi di sostanza organica. Essendo una specie *coprofaga*, è diffusa nel compost, mentre non si trova frequentemente in campo. La temperatura ottimale per la crescita di questa specie è tra i 18 e i 25°C, e sebbene possa tollerare una vasta gamma di condizioni di umidità, l'umidità ottimale è 85%. Il ciclo di vita e la biologia delle popolazioni di *E. fetida* sono stati studiati da diversi autori (*Venter et al. 1988, Yijun et al. 2019, Jialong et al 2019*). In condizioni ottimali la durata del loro ciclo di vita (*figura 7*) (dalla posa del bozzolo al lombrico adulto) varia da 60 a 80 giorni. Il tempo necessario ai neonati per raggiungere la maturità sessuale varia da 40 a 60 giorni. La produzione di cocoons inizia circa 4 giorni dopo l'accoppiamento, e il tasso di produzione di essi è di circa 0,35 al giorno (3,5 cocoons/10 days). Il ciclo è molto influenzato dall'ambiente in cui il lombrico si trova; i parametri più condizionanti sono la temperatura, la quantità di sostanza organica presente nel suolo, il pH e la presenza di eventuali inquinanti, come Cadmio e Piombo.



**Figura 7:** Ciclo vitale di *E. fetida*, a 25°C (Venter et al. 1988)

Il peso medio di un verme adulto è di 0,60 g e la taglia media è 2-4 mm × 5-12 mm. (Paoletti et al. 2013). Le linee guida OECD suggeriscono di utilizzare *Eisenia andrei* come bioindicatore per determinare la genotossicità di alcuni contaminanti del suolo, prelevando come tessuto target i celomociti. I celomociti, cellule con potenzialità di fagocitosi ed immunitarie, sono particolarmente esposti agli inquinanti ed essendo facilmente prelevabili con meccanismo di estrusione, possono essere considerati come tessuto surrogato per la determinazione dei biomarker.



**Figura 8:** esemplari di *Eisenia fetida*, dall'allevamento

## 2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è la valutazione degli effetti di dosi subletali di due pesticidi, in suoli ricchi di sostanza organica, sul verme terricolo *Eisenia fetida*. I pesticidi confrontati sono lo Spinosad (insetticida naturale) e il Chlorpyrifos (insetticida di sintesi).

Per questo scopo sono state impiegate diverse concentrazioni dei due fitofarmaci nel suolo organico, ai fini di valutare i recuperi percentuali della quota bio-disponibile di fitofarmaco, che è quella potenzialmente tossica nei confronti di *Eisenia fetida*. Questa quota deve considerarsi come sub-letale, cioè che non provochi morte degli organismi ma possa arrecare danni anche non visibili.

Gli effetti di queste dosi nei confronti dell'organismo studiato, sono stati misurati in termini di danni al DNA attraverso la tecnica del *Comet assay*, in uno studio preliminare di 28 giorni di esposizione a dosi sub-letali dei due fitofarmaci ed in base a caratteristiche fisico-morfologiche dei lombrichi analizzati.

L'utilizzo di insetticidi per lo studio descritto è stato deciso per il fatto che gli studi di tossicità ed ecotossicità dei fitofarmaci nei suoli hanno riguardato in genere gli erbicidi, trascurando il fatto che, al momento dei trattamenti, una gran parte di fungicidi e insetticidi può finire a terra e non colpire il target, come dimostrato in numerosi studi sull'argomento (*Komarek et al. 2010, Monaci et al. 2011*).

Le prove dell'OECD prevedono l'utilizzo di suoli artificiali standard, invece in questo progetto di ricerca si è utilizzato un suolo naturale, ricco di sostanza organica, proveniente dall'azienda sperimentale Pasquale Rosati dell'Università Politecnica delle Marche, situata ad Agugliano. Questo perché la specie di lombrico utilizzata è

molto esigente di sostanza organica, inoltre si voleva valutare l'effetto di pesticidi su suoli potenzialmente trattabili.

### **3. MATERIALI**

#### **3.1 *Eisenia Fetida*: PROVENIENZA E ALLEVAMENTO**

Gli organismi bioindicatori utilizzati nella tesi appartengono alla specie *Eisenia fetida*.

*Eisenia fetida* è largamente utilizzata per gli studi ecotossicologici nel suolo insieme ad *Eisenia andrei* (Piola et al. 2009), entrambi appartenenti al *Phylum Anellida*, famiglia *Lumbricidae*.

I lombrichi assumono un ruolo chiave nell'ecosistema suolo per quanto riguarda la struttura e la fertilità dello stesso (Lee et al. 1985) ed inoltre sono importanti bioindicatori dell'inquinamento ambientale (Zhou et al. 2007)

Per allestire l'allevamento di lombrichi, sono stati acquistati 600 individui di *Eisenia foetida* dalla compagnia Bella Farnia, Sabaudia, Italia.

I vermi terricoli sono stati posti in un box contenente un suolo ricco di sostanza organica (circa 24%) e mantenuti ad un tasso di umidità ottimale intorno al 60%, a temperatura ambiente ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ). Per evitare la fuga delle *Eisenie*, e allo stesso tempo mantenere una certa areazione, il box è stato sigillato con un'apposita garza. L'alimentazione è stata dosata settimanalmente e consisteva prevalentemente di scarti alimentari vegetali biologici, farina d'avena biologica, ecc.





**Figura 9:** allevamento lombrichi

### 3.2 SUOLO

Il suolo utilizzato per l'allevamento dell'organismo sentinella *Eisenia foetida* è stato prelevato presso l'azienda sperimentale Pasquale Rosati dell'Università Politecnica delle Marche, situata ad Agugliano, in un sito specifico che presentava un notevole contenuto in sostanza organica prodotto da spargimenti pluriennali di residui colturali. Il suolo su cui sono state condotte le sperimentazioni è invece una miscela composta dal suolo descritto in precedenza e da suolo prelevato dall'orto botanico di Gallignano.

Dopo avere effettuato la miscelazione, ai fini della sperimentazione è stato effettuato il setacciamento con setaccio a maglie di due millimetri di diametro.



**Figura 10:** Suolo setacciato

Le due tipologie di suolo sono state analizzate per la determinazione dei principali parametri chimico-fisici di interesse.

**Tabella 4:** Caratteristiche del suolo utilizzato per l'allevamento di *Eisenia foetida*.

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| <b>pH</b>                    | 8,4   |
| <b>Sostanza organica (%)</b> | 24,76 |
| <b>CSC (meq/100g)</b>        | 61,46 |

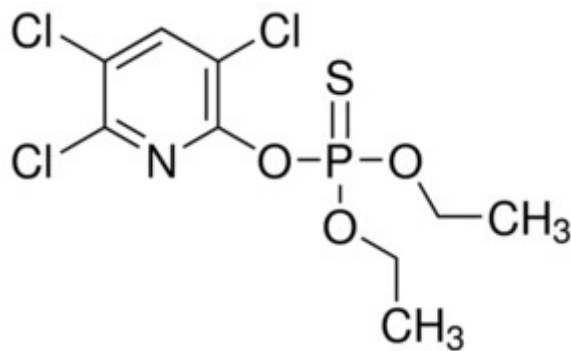
**Tabella 5:** Caratteristiche del suolo utilizzato per le sperimentazioni

|                              |       |
|------------------------------|-------|
| <b>Terra fine (%)</b>        | 100   |
| <b>Sabbia grossa (%)</b>     | 9     |
| <b>Sabbia fine (%)</b>       | 14    |
| <b>Limo (%)</b>              | 47    |
| <b>Argilla (%)</b>           | 30    |
| <b>pH</b>                    | 8,2   |
| <b>Sostanza organica (%)</b> | 7,99  |
| <b>CSC (meq/100g)</b>        | 28,29 |
| <b>CEe (ms/cm)</b>           | 1,56  |

## 3.3 FITOFARMACI UTILIZZATI

### 3.3.1 CHLORPYRIFOS

Il Chlorpyrifos (O,O-diethyl O-[3,5,6-trichloro-2-pyridyl] fosfotionato) è un insetticida organofosforico ampiamente utilizzato nel mondo (*Qingming Zhang et al. 2011, Wu et al. 2011*) attivo mediante ingestione e contatto.



**Figura 11:** Formula di struttura del Chlorpyrifos

Presenta una bassa solubilità in acqua, una media volatilità (PPDB) e non è sensibile alle radiazioni ultraviolette, è stabile in soluzioni neutre o debolmente acidi mentre è idrolizzato da basi forti (*Zalat et al. 2014*).

#### 3.3.1.1 Meccanismo d'azione

Il Chlorpyrifos agisce fosforilando l'acetilcolinesterasi, l'enzima che degrada l'acetilcolina, (*Zalat et al. 2014, Qingming Zhang et al. 2011, Wu et al. 2011*) sia a livello delle sinapsi dei neuroni che nel plasma (*Zalat et al. 2014*). L'inattivazione dell'acetilcolinesterasi causa un accumulo di acetilcolina, normalmente idrolizzata dall'enzima, paralizzando il sito sinaptico. La manifestazione dell'avvelenamento è associata con l'innalzamento delle concentrazioni di acetilcolina nel sito sinaptico.

### 3.3.1.2 Tossicologia ed eco-tossicologia:

In tabella 5 vengono riportate le caratteristiche tossicologiche (mammifero) ed ecotossicologiche (*Eisenia fetida*) riferite al principio attivo puro e al formulato commerciale Dursban, di Dow Agroscience contenente chlorpyrifos al 75%. Viene inoltre evidenziata la classe tossicologica e il tempo di degradazione.

**Tabella 6:** Caratteristiche tossicologiche ed eco tossicologiche (PPDB)

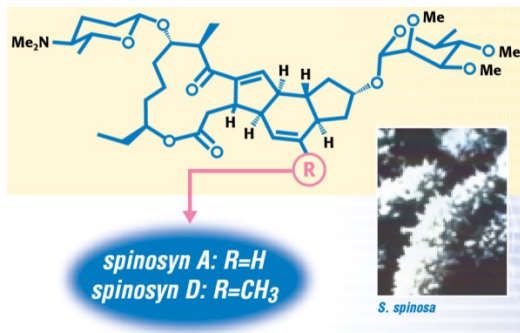
| Indice tossicologico MAMMIFERI (Acute oral LC <sub>50</sub> , rat) |                                                         | Indice eco-tossicologico (Acute LC <sub>50</sub> , 14 d, <i>Eisenia fetida</i> ) |                               | Classe tossicologica (WHO) | Soil degradation                 |                              |
|--------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Principio attivo (mg/kg bw)                                        | Formulato commerciale Dursban, Dow AgroSciences (mg/kg) | Principio attivo (mg as/kg dw soil)                                              | Formulato commerciale (mg/kg) | II, Moderately hazardous   | Dt <sub>50</sub> Lab 20°C (days) | Dt <sub>50</sub> soil (days) |
| 66                                                                 | > 300 - 500                                             | 129                                                                              | 313                           |                            | 386                              | 386                          |

### 3.3.1.3 Caratteristiche chimico-fisiche (PPDB):

- Peso molecolare: 350.58 g/mol
- Formula molecolare: C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS
- Costante di Henry a 25 °C: 0.478 Pa m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>
- Solubilità in acqua a 20°C: 1.05 mg/l
- Punto di fusione: 42°C
- Koc: 5509

### 3.3.2 SPINOSAD

Lo Spinosad è un insetticida naturale ad ampio spettro, composto da due molecole principali: Spinosina A e Spinosina D (PPDB).



**Figura 12:** Formula di struttura della Spinosad (*Dow AroSciences*)

Questa insetticida, come è possibile vedere anche dalla figura 12, deriva da una specie di batterio Actinomicete denominato *Saccharopolyspora spinosa*. I due metaboliti più attivi di *S. spinosa*, spinosyn A e spinosyn D, costituiscono infatti la miscela denominata “Spinosad”. Il nome “spinos-a-d” deriva appunto dalla specie “spinosa” dell’organismo che lo produce, aggiunto a quello delle due spinosine “A” e “D” (*Dow AroSciences*).

Per la sua rapida degradazione nel suolo, lo Spinosad è una sostanza che si può definire “non mobile” e “non persistente”. La principale via di degradazione in acqua è la fotodegradazione, che avviene più rapidamente in condizioni di campo che in condizioni di laboratorio. Tale principio attivo risulta stabile all’idrolisi a valori di pH da 5 a 9. Non è una sostanza volatile ed è caratterizzata da un valore di emi-vita nell’aria molto basso. La bassa volatilità dello Spinosad unitamente alla scarsa solubilità in acqua annullano praticamente il rischio di “effetto-deriva” del prodotto (*Dow AroSciences*).

Lo Spinosad non presenta alcuna sensibilità alle diverse temperature, evidenziando un comportamento da neutro a tendenzialmente positivo all'aumentare della temperatura. Tutti i formulati a base di Spinosad sono risultati stabili entro un ampio spettro di valori di pH. Si è comunque visto che l'uso dello Spinosad con soluzioni altamente acide potrebbe determinare modifiche nell'effetto residuale e quindi tutte le sostanze acidificanti dovrebbero essere evitate. E' considerato un prodotto dilavabile fino a che le superfici trattate non sono asciugate. In tutti i casi è opportuno non trattare in prossimità di un evento piovoso (*Dow AgroSciences*).

Essendo un insetticida naturale, il suo utilizzo è consentito anche nell'ambito del biologico; infatti è presente nell'allegato II del Regolamento 889/08, che è l'applicativo del regolamento 834/07, che rappresenta il riferimento normativo europeo del biologico.

### **3.3.2.1 Meccanismo d'azione**

Lo Spinosad agisce sia per contatto che per ingestione. Anche se l'azione per ingestione è di almeno 5-10 volte superiore a quella di contatto. Questa sostanza interferisce sulla trasmissione degli impulsi nervosi: il meccanismo d'azione principale, consiste nell'esaltare e prolungare l'azione dell'acetilcolina (Ach). I neuroni diventano iperattivi, l'attività motoria aumenta e conduce a contrazioni dei muscoli involontari, provocando tremori e paralisi finale. Quando questi sintomi hanno inizio, gli insetti cessano immediatamente di nutrirsi, evitando di continuare il danno. Spinosad agisce anche su neurotrasmettitori diversi dall'acetilcolina come il l'acido gamma-amino-butirrico (GABA). GABA è un neurotrasmettitore inibitore

rilasciato nelle sinapsi degli insetti per aprire canali che permettono agli ioni  $\text{Cl}^-$  di fluire all'interno della cellula (*Boselli M.*)

### 3.3.2.2 Caratteristiche chimico-fisiche (PPDB):

- Peso molecolare: 731,98 g/mol (Spinosina A) + 745,98 g/mol (Spinosina D)
- Formula molecolare: Spinosina A  $\text{C}_{14}\text{H}_{65}\text{NO}_{10}$  - Spinosina D  $\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{NO}_{10}$
- Costante di Henry a 25°C:  $1,89 \times 10^{-7}$
- Solubilità in acqua a 20°C: 7,6 mg/l
- Punto di fusione: 136°C

### 3.3.2.3 Tossicologia ed eco-tossicologia:

Vengono riportate, in tabella 6, le caratteristiche tossicologiche (mammifero) ed ecotossicologiche (*Eisenia foetida*) riferite al principio attivo puro e al formulato commerciale LASER, contenente spinosad al 44,2%. Viene inoltre indicata la classe tossicologica e il tempo di degradazione.

**Tabella 7:** Caratteristiche eco tossicologiche (PPDB, Dow AroSciences)

| Indice tossicologico mammiferi (Acute oral LC <sub>50</sub> , rat) |                                     | Indice eco-tossicologico (Acute LC <sub>50</sub> , Eisenia fetida) |                                     | Classe tossicologica (WHO) | Soil degradation                 |                              |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| Principio attivo (mg/kg bw)                                        | Formulato commerciale LASER (mg/kg) | Principio attivo (mg as/kg dw soil)                                | Formulato commerciale LASER (mg/kg) |                            | Dt <sub>50</sub> Lab 20°C (days) | Dt <sub>50</sub> soil (days) |
| >2000                                                              | >5000                               | <458                                                               | >458                                | III, Slightly hazardous    | 15                               | 14                           |

I principi attivi puri sono stati acquistati presso la compagnia Sigma-Aldrich e sono stati utilizzati esclusivamente per l'ottenimento delle soluzioni standard adoperate per la costruzione della curva di taratura.

Le prove di recupero e i test sono state effettuate utilizzando i rispettivi formulati commerciali.

## **4. METODI**

### **4.1 ESTRAZIONE ED ANALISI DEI FITOFARMACI NEL SUOLO**

#### **4.1.1 Retta di taratura**

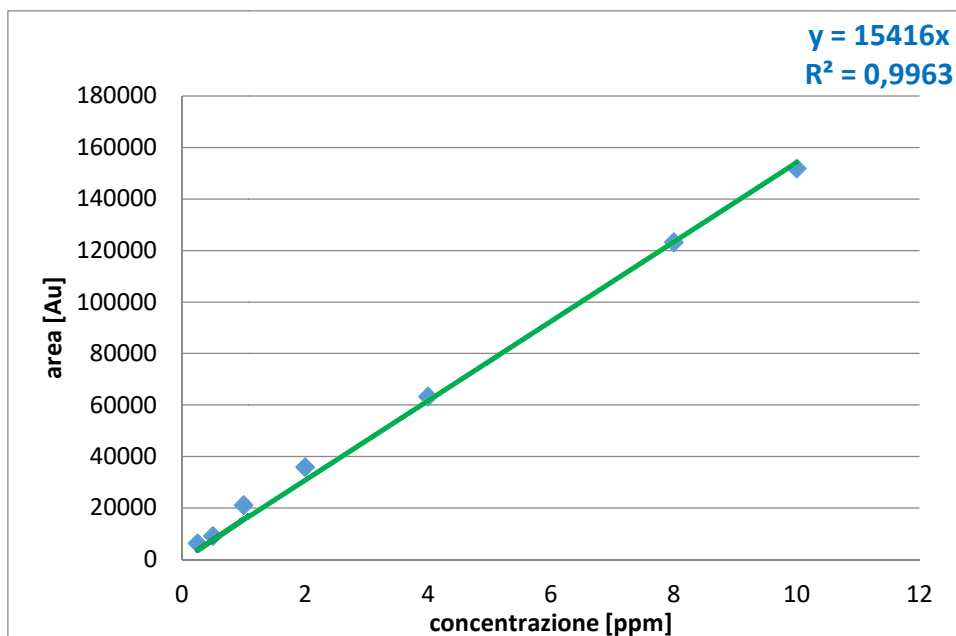
La prima operazione effettuata è stata la realizzazione di soluzioni standard, ossia soluzioni a concentrazione nota del fitofarmaco, da utilizzare come riferimento. Per ottenere la soluzione standard a 100ppm, da cui sono state ottenute le soluzioni standard ulteriormente diluite, è stata utilizzata una dose di 0,01 g di principio attivo diluito in 100ml di metanolo. Sono state realizzate soluzioni standard per entrambi i fitofarmaci per determinare la curva di taratura e quindi valutare la linearità della risposta strumentale.

Successivamente le soluzioni standard a concentrazione nota sono state iniettate al cromatografo (HPLC) per la realizzazione della curva di taratura (concentrazione/area picco)

✓ **Chlorpyrifos** → preparazione e iniezione dei seguenti standards analitici: 10 ppm, 8 ppm, 4 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0.50 ppm e 0.25 ppm.



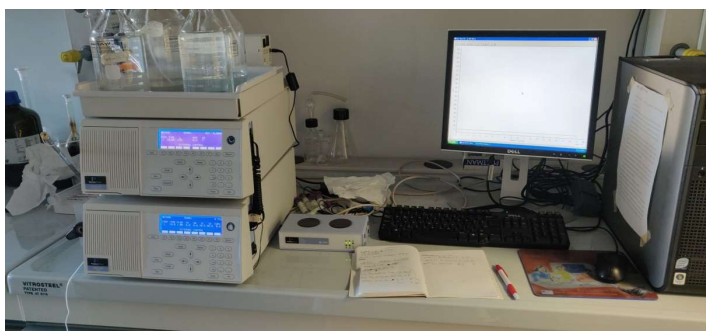
- ✓ **Spinosad** → preparazione e iniezione dei seguenti standard: 10 ppm, 8 ppm, 4 ppm, 2 ppm, 1 ppm, 0.50 ppm e 0.25 ppm.



**Grafico 3** – Retta di taratura Spinosad

#### 4.1.2 Prove di recupero e residui

Le **prove di recupero** consistono nella determinazione delle concentrazioni dei due fitofarmaci negli estratti del suolo contaminato a differenti concentrazioni ed estratti in tempi diversi, mediante l'utilizzo dell'HPLC.



**Figura 13** - HPLC

Le concentrazioni si riferiscono al principio attivo del fitofarmaco, anche se per la contaminazione è stata utilizzata una soluzione del formulato commerciale.

Sono state effettuate per ogni concentrazione 6 repliche, per garantire la riproducibilità del metodo: 3 repliche per l'estrazione dopo 30 minuti e 3 repliche per l'estrazione dopo 15 ore.

| SPINOSAD |        | CHLORPYRIFOS |        |
|----------|--------|--------------|--------|
| 10 ppm   | 30 min | 9 ppm        | 30 min |
|          | 15 h   |              | 15 h   |
| 50 ppm   | 30 min | 45 ppm       | 30 min |
|          | 15 h   |              | 15 h   |
| 100 ppm  | 30 min | 90 ppm       | 30 min |
|          | 15 h   |              | 15 h   |

**Tabella 8** – Concentrazioni utilizzate per la determinazione delle % di recupero

I **residui** rappresentano la quantità di fitofarmaco che si riesce ad estrarre dal suolo dove sono stati i lombrichi.

La determinazione della concentrazione dei due fitofarmaci è stata fatta in tempi diversi, applicando lo stesso metodo utilizzato per la determinazione dei recuperi. L'unica differenza sta nel fatto che il suolo è stato contaminato con una sola concentrazione per ogni fitofarmaco.

I tempi di estrazione coincidono con i tempi di controllo utilizzati per la determinazione dei cambiamenti fisico-morfologici e molecolari dei lombrichi, cioè ad 1 giorno (1T), 1 settimana (2T), 2 settimane (3T) e 3 settimane (4T) dalla

contaminazione. Per garantire la riproducibilità del metodo, sono state fatte 3 repliche per ogni tempo di estrazione.

Prima di allestire la prova, i lombrichi sono stati messi per 1 settimana in acclimatamento, cioè in un contenitore areato con lo stesso substrato utilizzato per svolgere la prova.

CONDIZIONI OPERATIVE: 1Kg di suolo secco con 20 lombrichi (*OECD, 2002*)

#### **4.1.3 Contaminazione, estrazione e purificazione**

In seguito alla realizzazione della retta di taratura, al fine di valutare la quantità di fitofarmaco nel suolo, questo è stato contaminato a concentrazioni note dei due fitofarmaci. Una volta avvenuta la contaminazione si è proceduto con l'estrazione dei fitofarmaci dal suolo e successivamente con la purificazione dell'estratto e con l'iniezione in HPLC per valutare la percentuale di recupero. Questo è stato fatto sia in presenza che in assenza di *Eisenie*, per valutare delle eventuali differenze.

Per l'estrazione del Chlorpyrifos è stato seguito il protocollo pubblicato da Vischetti et al, (2008), mentre per lo Spinosad quello di Akbar et al. (2012).

##### Chlorpyrifos:

- contaminazione di 25 gr di suolo secco con il fitofarmaco, a diversa concentrazione, con aggiunta di acqua fino ad arrivare ad un'umidità del 30% circa;
- estrazione del fitofarmaco con soluzione estraente metanolo: acqua 80:20;
- agitazione in shaker elettrico per 1 ora a 250 giri/min;

- centrifugazione a 3.000 RPM per 15 minuti;
- filtrazione dell'estratto su carta da filtro;
- separazione liquido/liquido con imbuto separatore di 30 ml di estratto con 100 ml di Cloroformio, da ripartire in tre aliquote di 30, 40 e 30 ml rispettivamente;
- 1° evaporazione in evaporatore rotante utilizzando un sistema STEROGLOSS STRIKE 300 (Rotavapor) ;
- evaporazione finale (a secchezza) tramite insufflazione con l'azoto;
- sospensione del residuo in metanolo.

Spinosad:

- contaminazione (stessa procedura del Clhorpyrifos)
- estrazione del fitofarmaco con soluzione estraente acetonitrile: acqua 80:20;
- agitazione in shaker elettrico per 30 min a 200 giri/min (al buio);



**Figura 13** – shaker elettrico

- centrifugazione a 7.000 RPM per 15 minuti;
- filtrazione dell'estratto su carta da filtro;
- separazione liquido/liquido in imbuto separatore con 30 ml di Diclorometano (1° separazione);
- separazione liquido/liquido con 10ml di Metanolo + 1ml NaOH 1N + 30 ml di Diclorometano (2° separazione);



**Figura 14 e 15** – 1° e 2° separazione liquido/liquido con imbuto separatore

- evaporazione degli estratti riuniti in evaporatore rotante utilizzando un sistema STEROGLOSS STRIKE 300 (Rotavapor) ;



**Figura 16** – evaporazione con Rotavapor

- evaporazione finale (a secchezza) tramite insufflazione con l'azoto;
- sospensione del residuo in Metanolo.

#### **4.1.4 Analisi strumentale**

La concentrazione di principio attivo presente nell'estratto purificato è stata determinata mediante analisi in HPLC, utilizzando un sistema Perkin Elmer series 200.

L'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) rappresenta una tecnica cromatografica che prende il nome di "alte prestazioni" grazie all'elevata velocità e risoluzione nella separazione dei diversi componenti del soluto. L'alta prestazione si ottiene impiegando come fase stazionaria particelle di diametro molto piccolo, dell'ordine delle decine di  $\mu\text{m}$  o inferiori, impaccate in colonne di acciaio, vetro o materiale plastico. Minore è il diametro delle particelle impaccate, minore è l'ampiezza delle bande di soluto e quindi l'ampiezza dei picchi risultanti. L'uso di piccole particelle impaccate spesso richiede l'impiego di alte pressioni per spingere la fase mobile attraverso la colonna. Generalmente le pressioni impiegate vanno tra 400 e 4.000 psi (1 psi = 0,068 at) (*De Sio F., 1997*).

Lo strumento presentava una colonna C18 in fase inversa, in acciaio levigato inossidabile, di 25 cm di lunghezza e 4.6 mm di diametro interno. Il rivelatore è un UV/visibile e i dati di assorbanza vengono rielaborati in cromatogrammi tramite software TotalChrom.

Le condizioni operative dell'HPLC, come si può notare dalla Tabella 9, variano in base al fitofarmaco da analizzare.

|                            | <b>SPINOSAD</b>                  | <b>CHLORPYRIFOS</b>           |
|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| <b>Eluenti</b>             | 65% Acetonitrile<br>35% Metanolo | 80% Acetonitrile<br>20% Acqua |
| <b>Flusso</b>              | 1,2 ml/min                       | 1 ml/min                      |
| <b>Tempo di ritenzione</b> | 3,5 min                          | 6.0 min                       |
| <b>Tempo di corsa</b>      | 8 minuti                         | 20 minuti                     |
| $\lambda$                  | 250 nm                           | 230 nm                        |

**Tabella 9:** Condizioni operative HPLC.

## 4.2 VALUTAZIONE DANNI A *Eisenia fetida*

La valutazione dei danni alle *Eisenie* è stata effettuata a tempi diversi dalla contaminazione seguendo i principi riportati nella pubblicazione del 2002 dell'OECD. I parametri che sono stati analizzati sono stati le anomalie corporee, i comportamenti anomali, la variazione del peso, la presenza o meno di coocons/lombrichetti, la mortalità ed i danni al DNA, mediante il Comet Assay.

La determinazione dei danni fisico-morfologici è stata realizzata mediante semplice osservazione visiva e con l'impiego di una bilancia elettronica, mentre per il Comet Assay, è stato redatto un protocollo basandosi su altre pubblicazioni.



**Figura 17** – Determinazione peso lombrichi

#### 4.2.1 Comet Assay

Il *Comet Assay* è un test molto utilizzato nei test di genotossicità sia in medicina sia in ecotossicologia (*Fairbairn D.W et al. 1995*), poiché, generalente, è applicabile a tutti i tipi di tessuti dai quali si possa ottenere con facilità una sospensione di cellule isolate.

È considerata una tecnica standard per lo studio, sia in vitro che in vivo, del danno primario di DNA rilevato generalmente come rotture a singolo o doppio filamento, in diversi tipi di cellule eucariote (*Dhawan A. 2009*).

La tecnica del *comet assay* consiste in un'elettroforesi su gel di agarosio di campioni di cellule estratte dagli organismi esposti ad un potenziale agente genotossico, in grado di provocare rotture a carico del DNA (*Fairbairn D.W et al. 1995*).

Durante l'elettroforesi i filamenti di DNA sano e degradato si muovono in maniera differente, infatti i filamenti di DNA degradato migreranno con velocità diversa in base alla loro lunghezza; mentre quelli sani migreranno in maniera compatta.

Dopo l'elettroforesi i campioni vengono incubati con bromuro di etidio e osservati al microscopio a fluorescenza, le immagini ottenute vengono analizzate tramite uno specifico software.

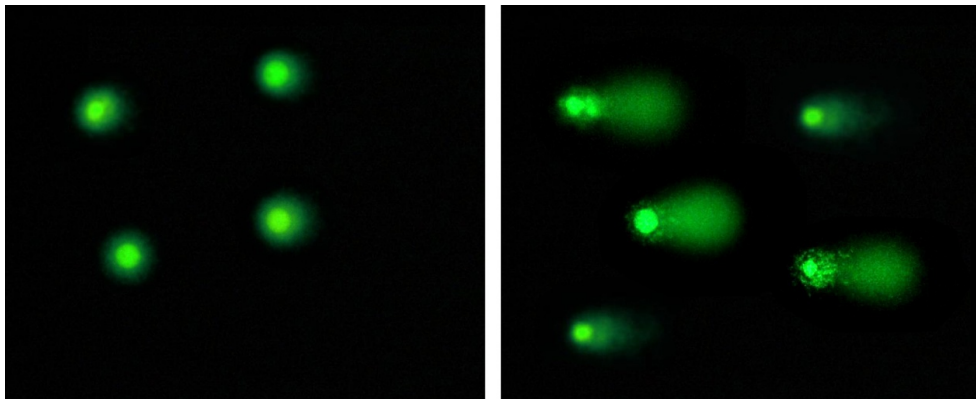
Il DNA danneggiato avrà la tipica struttura a “cometa”, formata da una “testa” costituita dalla porzione di DNA intatto, e una “coda”, formata dai frammenti degradati. La coda presenta quindi dimensioni proporzionali al danno presente a carico del DNA; maggiore la lunghezza della coda, maggiore la quantità di DNA danneggiato, e quindi maggiore il danno.



L'entità delle rotture viene stimata attraverso i parametri strutturali della cometa :

- Il *Tail length*: lunghezza della coda della cometa descritta dalla migrazione del DNA dalla testa della cometa, ovvero dal nucleo;
- Il *Tail Intensity*: intensità di fluorescenza della coda, direttamente proporzionale alla quantità di DNA presente nella coda della cometa;

A partire da questi è possibile calcolare il *Tail moment*, che ingloba i due precedenti ed è assunto quale indice di danno al DNA (A.R. 2004).



**Figura 18 e 19** – cellule sane e cellule danneggiate (*comete*) (Cell Biolabs, Inc)

Il protocollo seguito per lo svolgimento del Comet Assay, qui di seguito riportato, è stato sviluppato basandosi sui protocolli già presenti in letteratura (Fairbairn D.W et al. 1995, Dhawan A. 2009, A.R. 2004 ).

- Estrusione celomociti: per far estrudere i lombrichi, si è utilizzata una soluzione di estrusione composta dal 95% di un buffer salino (PBS) e dal 5% di etanolo. Avvenuta l'estrusione, si è centrifugato il tutto a 300g/min per 10 min a 10°C, ripetendo il passaggio per due volte.



**Figura 20** – lombrichi nella soluzione di estrusione

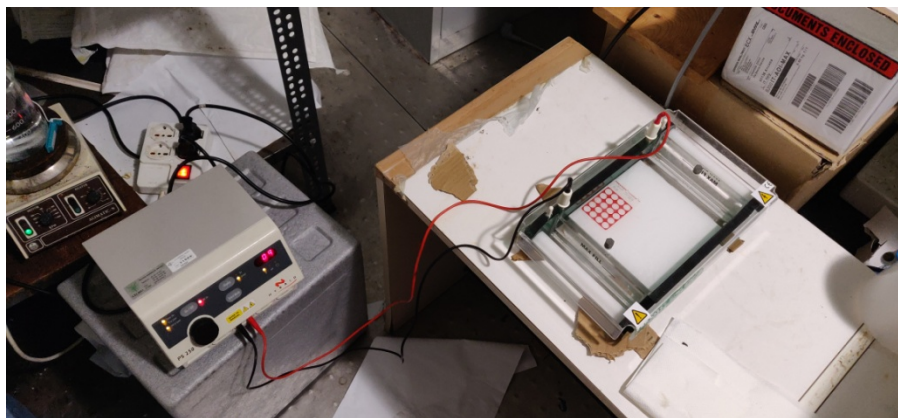
- Conteggio cellule: per osservare meglio le cellule e fare meno errori, occorre che siano presenti in un determinato numero, altrimenti occorre fare delle diluzioni seriali. Il conteggio viene fatto mediante la camera di conteggio.



**Figura 21** - camera di conteggio

- Congelamento celomociti: se non si intende effettuare il Comet Assay immediatamente, i celomociti possono essere congelati, mediante una soluzione di congelamento formata da: 60% di albumina [5%], 20% di albumina [20%], 20% di DMSO [20%]. Il congelamento viene fatto in provette eppendorf contenenti egual volume di cellule e soluzione di congelamento, a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

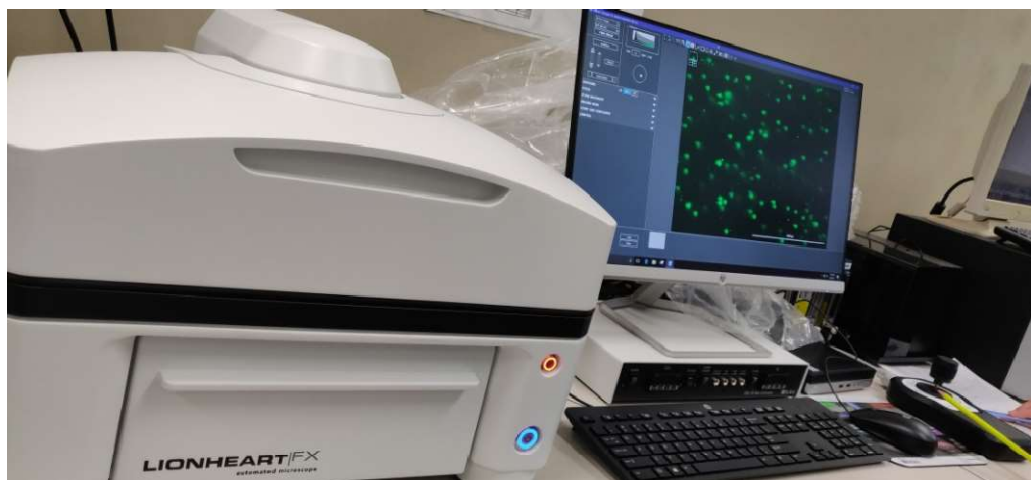
- Scongelamento celomociti: lo scongelamento viene fatto mediante una soluzione di scongelamento, in rapporto 1:1 rispetto a ciò che si vuole scongelare. Questa soluzione è composta da albumina al 20%, PBS e destrano, e deve essere mantenuta a 37°C fino al suo utilizzo.
- Preparazione vetrino: una volta scongelati, prelevare la giusta quantità di cellule (calcolata con appositi calcoli), lavare il tutto con 200  $\mu$ l di PBS e centrifugare a 2000 rpm per 5 min a 4°C. Dopo aver eliminato il surnatante, aggiungere il substrato dove avverrà l'elettroforesi (LMA 1%). Spottare 35  $\mu$ l di sospensione su ogni pozzetto del vetrino, sopra il ghiaccio e lasciare al buio per 15 min.
- Elettroforesi: dopo aver lasciato per almeno 1 ora il vetrino nella soluzione di lisi (10% DMSO, 1% Triton X, 89% soluzione salina) in camera fredda a 4°C, metterlo nella cameretta elettroforetica con il tampone, e far andare l'elettroforesi per 15 min a 18 volt.



**Figura 22** – elettroforesi in camera fredda (4°C)

- Lavaggi: avvenuta l'elettroforesi occorre fare dei lavaggi seriali. In ordine: 10 secondi in acqua, 5 min nel tampone di neutralizzazione e 10 secondi in metanolo.

- Essiccazione vetrino: per far essiccare il vetrino occorre metterlo per 50-60 min in stufa
- Lettura dei risultati: una volta essiccato, posso leggere il vetrino quando voglio. La visualizzazione avviene con il microscopio a fluorescenza, dopo averlo colorato con 1ml di acqua e 10  $\mu$ l di S. Gold.



**Figura 23** – Lettura dei risultati al microscopio a fluorescenza

- Analisi comete: l'analisi delle comete viene fatta mediante l'impiego di un apposito software.

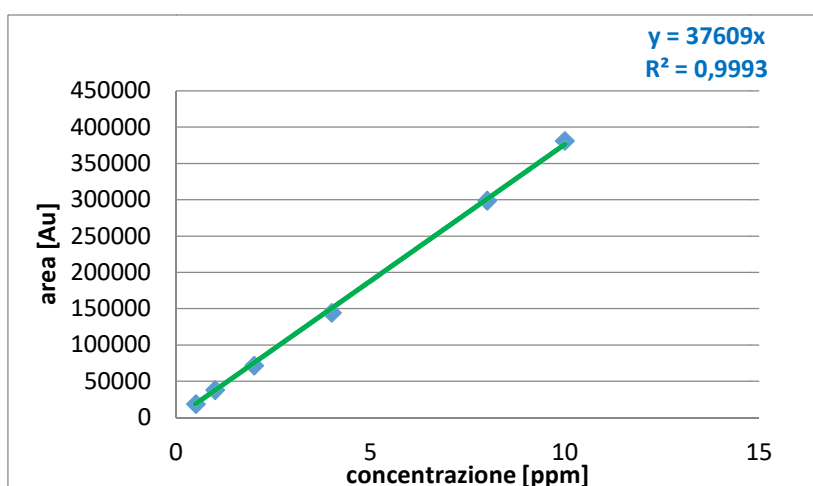
## **5. RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **5.1 LINEARITÀ DELLA RISPOSTA STRUMENTALE**

Per i due fitofarmaci la linearità della risposta strumentale è stata determinata tramite le rispettive curve di taratura, partendo da concentrazioni note ottenute dal principio attivo stesso.

| Concentrazione [ppm] | Area picco [Au] | Tempo di ritenzione [min] |
|----------------------|-----------------|---------------------------|
| 0,25                 | 10318           | 5,023                     |
| 0,5                  | 18614           | 5,002                     |
| 1                    | 37825           | 5,019                     |
| 2                    | 71613           | 5,009                     |
| 4                    | 144113          | 5,029                     |
| 8                    | 298790          | 5,003                     |
| 10                   | 381001          | 5,001                     |

**Tabella 10:** Concentrazione e area corrispondente dei picchi del Chlorpyrifos.



**Grafico 4:** Retta di taratura Chlorpyrifos

| concentrazione [ppm] | area [Au] | Tempo di ritenzione [min] |
|----------------------|-----------|---------------------------|
| 0,25                 | 6332,17   | 3,31                      |
| 0,5                  | 9113,57   | 3,325                     |
| 1                    | 21142,56  | 3,308                     |
| 2                    | 35857,58  | 3,297                     |
| 4                    | 63275,49  | 3,295                     |
| 8                    | 123228,7  | 3,298                     |
| 10                   | 151890,2  | 3,297                     |

**Tabella 11:** Concentrazione e area corrispondente dei picchi dello Spinosad

L'  $R^2$  indica la correlazione esistente tra la concentrazione del fitofarmaco e l'area del picco che per entrambi i fitofarmaci è risultata maggiore di 0,99 indicando una perfetta linearità di risposta del metodo analitico.

## 5.2 RESIDUI

Vengono di seguito riportati (Tabella 12) i risultati delle prove dei residui di chlorpyrifos e spinosad, in seguito ad analisi cromatografica. Dall'analisi HPLC è stata poi fatta una valutazione sulle percentuali di fitofarmaco "residuale".

Per rientrare nel range di linearità di risposta strumentale, nel caso del chlorpyrifos sono stati aggiunti 5ml di metanolo all' essiccato, prelevati poi 200 uL e portato a volume con metanolo in un matraccio da 10 ml. Nel caso dello spinosad sono stati aggiunti 5ml di metanolo all' essiccato, prelevati poi 0,5 mL e portato a volume con metanolo in un matraccio da 25 ml.

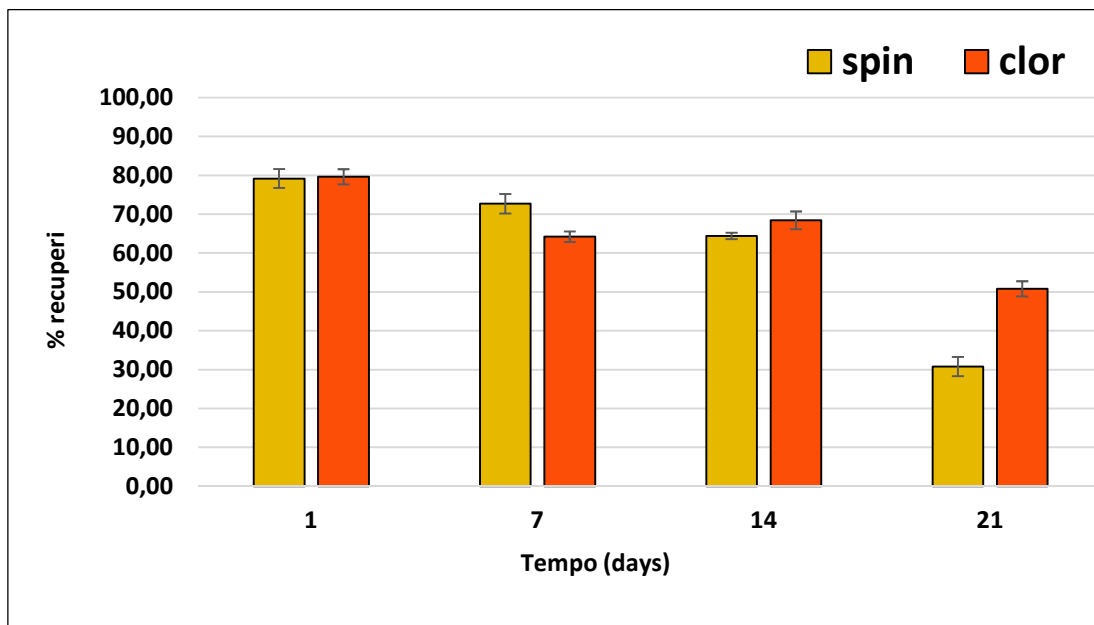
I valori riportati in tabella sono una media dei valori delle tre repliche per ogni tempo di estrazione prefissato.

| Tempo di controllo | CHLORPYRIFOS     |            | SPINOSAD         |            |
|--------------------|------------------|------------|------------------|------------|
|                    | 375 ppm          |            | 323 ppm          |            |
|                    | Media area picco | % recupero | Media area picco | % recupero |
| T1                 | 707818,51        | 83,64      | 393828,50        | 79,16      |
| T2                 | 543313,66        | 64,20      | 345009,73        | 69,35      |
| T3                 | 579083,72        | 68,43      | 320504,41        | 64,42      |
| T4                 | 468586,05        | 55,37      | 175382,02        | 35,25      |

**Tabella 12:** Percentuali di recupero ottenute dall'analisi dei residui dei due fitofarmaci

Per rendere i dati significativi, è stata fatta un'elaborazione statistica utilizzando la %RSD (*Relative Standard Deviation*). La RSD permette di valutare la dispersione dei valori attorno alla media indipendentemente dall'unità di misura.

Come è possibile notare dal Grafico 5, con il passare del tempo (T1 → T4), le percentuali di recupero sono tendenzialmente diminuite, questo è spiegabile perché i fitofarmaci tendono a degradarsi, sia ad opera dei microrganismi presenti nel substrato, sia grazie alle condizioni ambientali. In aggiunta a questo si possono formare anche legami più forti fra fitofarmaco e sostanza organica, che rendono il pesticida meno disponibile.



**Grafico 5:** Percentuali di recupero ottenute dall'analisi dei residui dei due fitofarmaci

E' possibile osservare come nel suolo utilizzato per la sperimentazioni lo spinosad tenda a degradarsi molto più velocemente rispetto al chlorpyrifos, come

confermato dai valori del tempo di emivita dei due fitofarmaci ( $DT_{50}$ ), riportati sul database dei pesticidi *PPDB* (Tabella 13).

| SPINOSAD         |                        | CHLORPYRIFOS     |                        |
|------------------|------------------------|------------------|------------------------|
| $DT_{50}$ [days] | $DT_{50}$ (lab) [days] | $DT_{50}$ [days] | $DT_{50}$ (lab) [days] |
| 14               | 15                     | 386              | 386                    |

**Tabella 13:** Tempo di emivita ( $DT_{50}$ ) dei due fitofarmaci (*PPDB*)

### 5.3 RECUPERI

I risultati delle prove dei recuperi dal substrato dello spinosad e del chlorpyrifos sono riportati nelle Tabelle 14 e 15. Anche in questo caso i valori riportati sono stati ottenuti a seguito di analisi cromatografica HPLC, da cui sono state calcolate poi le concentrazioni di pesticida recuperato.

Per ogni concentrazione di fitofarmaco utilizzato, sono state svolte 6 repliche (3 per ogni tempo di controllo).

| ppm                     | t      | % recupero |
|-------------------------|--------|------------|
| 10                      | 30 min | 74,50      |
|                         | 15 h   | 69,85      |
| 50                      | 30 min | 65,10      |
|                         | 15 h   | 63,11      |
| 100                     | 30 min | 58,96      |
|                         | 15 h   | 45,91      |
| media recuperi a 30 min |        | 66,19      |
| media recuperi a 15 h   |        | 59,62      |

**Tabella 14:** Percentuali di recupero dal substrato dello spinosad

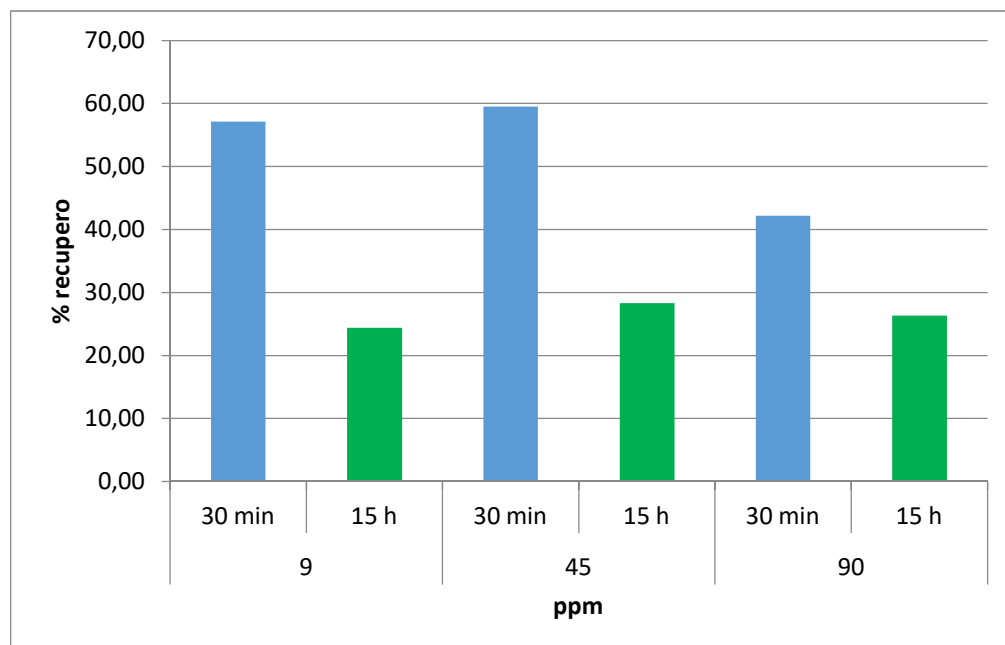


| ppm | t      | %recupero |
|-----|--------|-----------|
| 9   | 30 min | 57,10     |
|     | 15 h   | 25,41     |
| 45  | 30 min | 59,50     |
|     | 15 h   | 28,34     |
| 90  | 30 min | 42,20     |
|     | 15 h   | 26,33     |

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| media recuperi a 30 min | 52,93 |
| media recuperi a 15 h   | 26,69 |

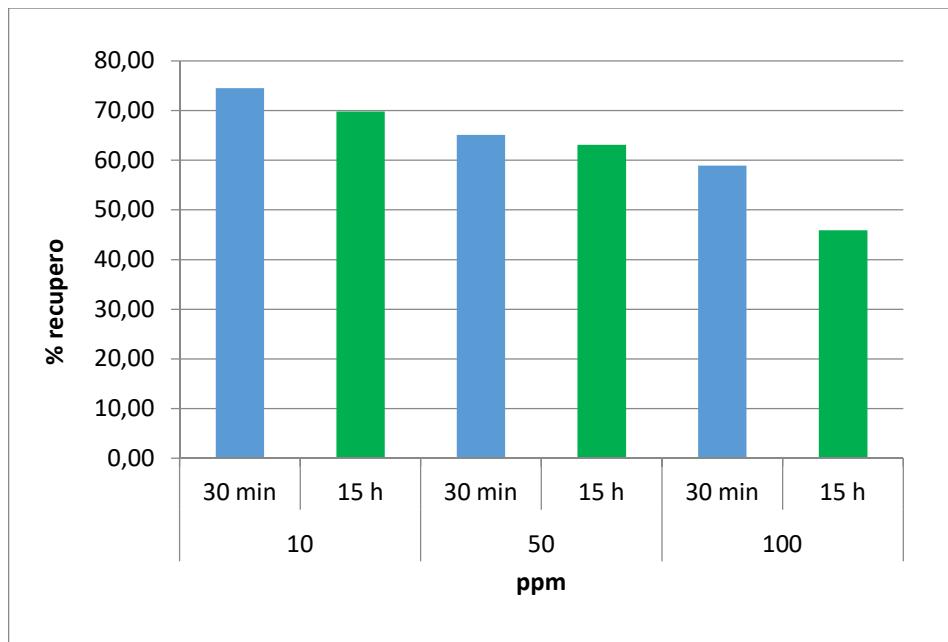
**Tabella 15:** Percentuali di recupero dal substrato del chlorpyrifos

Per visualizzare in maniera più chiara ed immediata i risultati, sono stati costruiti i seguenti grafici , uno per ogni fitofarmaco.



**Grafico 6:** Recupero dal substrato del chlorpyrifos

Dal grafico 6 è possibile notare come a 15 ore la percentuale di recupero del chlorpyrifos è molto minore rispetto a quella ottenuta a 30 minuti. Questo perché evidentemente si sono formati dei legami con la sostanza organica, che ha reso il fitofarmaco meno disponibile.



**Grafico 7:** Recupero dal substrato dello spinosad

Nel caso dello spinosad invece, le percentuali di recupero a 15 ore e a 30 minuti sono molto simili. Questo sta a significare che i legami fra sostanza organica e fitofarmaco formati sono simili in tutti e due i tempi di osservazione.

Confrontando i risultati ottenuti nelle prove dei recuperi con quelli delle prove dei residui è possibile osservare che la percentuale risulta maggiore in quest'ultima, ossia nel substrato dove erano presenti anche i lombrichi. Questo è spiegabile dal fatto che la sostanza organica forma dei legami con il principio attivo del fitofarmaco

e lo trattiene, ma i lombrichi, ingerendo il substrato, rompono i legami formatisi, rendendo il principio attivo nuovamente disponibile.

## 5.4 VALUTAZIONE DANNI A *Eisenia fetida*

I danni agli esemplari di *Eisenia fetida* sono stati valutati andando a prelevare i lombrichi dai contenitori con il substrato contaminato, ad ogni tempo di prelievo utilizzato per la prova dei residui.

I risultati delle osservazioni fatte ad ogni tempo, sono stati riportati nella seguente tabella, riportando la presenza o meno dei vari parametri considerati<sup>1</sup>.

| TRATTAMENTI             |    | Controllo |           |                       |                   | Spinosad |           |                       |                   | Chlorpyrifos |           |                       |                   |
|-------------------------|----|-----------|-----------|-----------------------|-------------------|----------|-----------|-----------------------|-------------------|--------------|-----------|-----------------------|-------------------|
| ⊗ assenza<br>✓ presenza |    | cocoons   | mortalità | comportamento anomalo | anomalie corporee | cocoons  | mortalità | comportamento anomalo | anomalie corporee | cocoons      | mortalità | comportamento anomalo | anomalie corporee |
| Tempo (days)            | 1  | ⊗         | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 | ⊗        | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 | ⊗            | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 |
|                         | 7  | ✓         | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 | ✓        | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 | ⊗            | ⊗         | ✓                     | ⊗                 |
|                         | 14 | ✓         | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 | ✓        | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 | ⊗            | ⊗         | ✓                     | ✓                 |
|                         | 21 | ✓         | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 | ✓        | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 | ⊗            | ✓         | ✓                     | ✓                 |
|                         | 28 | ✓         | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 | ✓        | ⊗         | ⊗                     | ⊗                 | ⊗            | ✓         | ✓                     | ✓                 |

**Tabella 16:** Osservazioni dei lombrichi ad ogni tempo di controllo

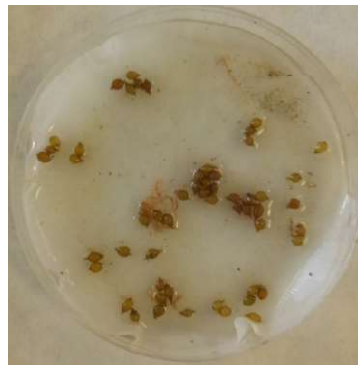
Dalla tabella è possibile osservare come il chlorpyrifos ha causato maggiori danni ai lombrichi: la morte degli esemplari è avvenuta dopo 21 giorni dalla contaminazione, mentre i comportamenti anomali e le anomalie corporee sono risultati costanti già dal secondo tempo di controllo (7giorni).

Lo spinosad non ha causato danni visibili ai lombrichi, tanto che si sono riprodotti ugualmente, producendo i cocoons. I cocoons presenti nella prova dello spinosad a 28 giorni sono stati prelevati, e messi in una piastra Petri con della carta filtro. Questi

<sup>1</sup> COMPORTAMENTO ANOMALO: bassa reattività, minore attività di scavo, movimenti compulsivi

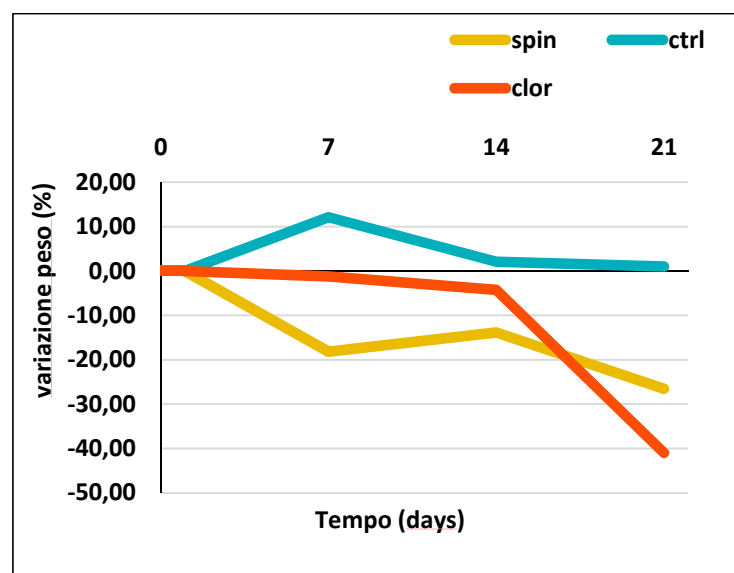
ANOMALIE CORPOREE: lesioni, miniaturizzazione corporea, colorazione anomala

sono stati messi a confronto con quelli presi del controllo, e si è notata una diminuzione di natività del 40%. Anche il numero di cocoons presenti nella prova dello spinosad era minore: 53 cocoons/Kg rispetto a 60 cocoons/Kg presenti nel controllo.



**Figura 24:** Piastra Petri con carta da filtro per monitorare la nascita dei lombrichetti

La variazione di peso dei lombrichi è stata misurata prelevando i lombrichi dai contenitori, ad ogni tempo di controllo. I risultati, espressi in percentuale di diminuzione di peso, sono riportati nel grafico 8.

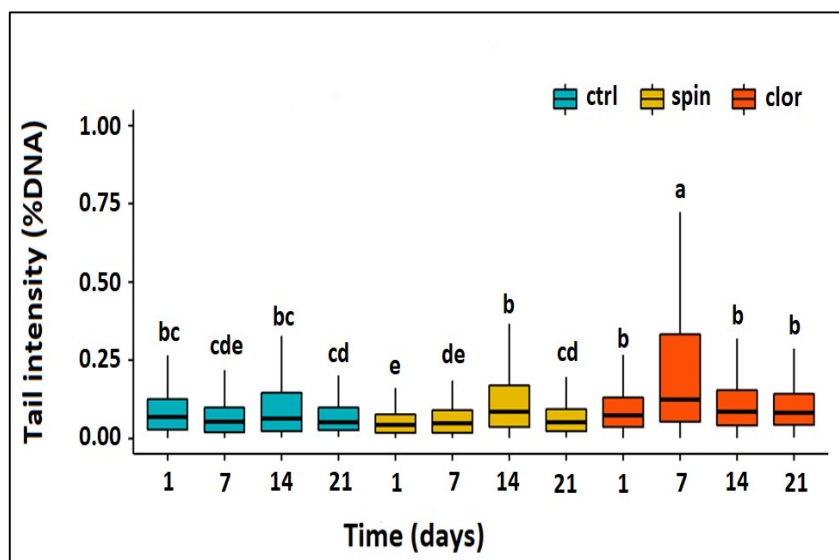


**Grafico 8:** Variazione percentuale di peso dei lombrichi, rispetto al loro peso al tempo 0

Dal grafico è possibile osservare come il chlorpyrifos ha causato una maggior diminuzione di peso dei lombrichi, rispetto allo spinosad, anche se quest'ultimo ha portato ad una diminuzione più immediata. Nel controllo si è assistito ad un aumento di peso durante il primo periodo, e ad una successiva diminuzione dovuta, probabilmente, all'aumentare delle sostanze di scarto e alla diminuzione di nutrimento, dato che tutte le prove sono state svolte in un ambiente chiuso.

#### 5.4.1 Comet Assay

I risultati del Comet Assay, nel grafico 9, sono stati ottenuti da un'elaborazione in R, utilizzando il Kruskal-Wallis test (Bonferroni correction,  $P < 0.05$ ). R è un software statistico distribuito in Internet sotto licenza GPL, sviluppato da un team di ricercatori in ambito statistico e informatico di fama mondiale. Esso permette un'elevatissima flessibilità nell'interpretazione di funzioni di calcolo e di rappresentazione grafica statistica (Mineo Angelo).



**Grafico 9:** Tail intensity nei celomociti estrusi da *E. fetida*. Le differenti lettere indicano differenze significative nella forma delle distribuzioni.

Per quanto riguarda lo spinosad, è possibile notare che il picco massimo di DNA danneggiato dei lombrichi è stato raggiunto a 14 giorni, e ha avuto tendenzialmente una diminuzione sostanziale nei giorni seguenti. In generale però i risultati ottenuti con lo spinosad, sono molto simili e statisticamente paragonabili a quelli ottenuti con il controllo; mentre quelli ottenuti con il chlorpyrifos sono statisticamente differenti, ed evidenziano un maggior danno al DNA. In quest'ultimo caso il picco massimo di DNA danneggiato è stato raggiunto a 7 giorni, mentre nei successivi controlli esso è diminuito e rimasto sostanzialmente stabile.

I danni al DNA sono presenti anche nel controllo. Questo può essere dovuto al fatto che l'estrusione dei celomociti è abbastanza invasiva, e potrebbe aver provocato un danneggiato del DNA.

## **6. CONCLUSIONI**

Nella presente tesi sono stati valutati e confrontati gli effetti di dosi sub letali di chlorpyrifos e spinosad su un suolo ricco di sostanza organica, impiegando come bioindicatore *Eisenia fetida*.

Valutando i risultati delle varie prove, si è giunti alla conclusione che il chlorpyrifos risulta essere più tossico rispetto allo spinosad poiché, nonostante si sia lavorato con dosi sub-letali, esso ha causato la morte dei lombrichi.

I danni al DNA causati dallo spinosad risultano minori e presenti con gradualità mostrando un picco massimo a 14 giorni; il chlorpyrifos ha causato invece un danneggiamento repentino, mostrando il picco massimo solo dopo 7 giorni.

Una conferma ulteriore del maggior danno provato dal chlorpyrifos è la risposta ottenuta dall'osservazione dei lombrichi nel substrato contaminato con tale pesticida. Il fitofarmaco ha causato una diminuzione significativa nel peso dei lombrichi, un blocco dell'attività riproduttiva e numerosi segni di sofferenza.

Le prove di recupero hanno evidenziato percentuali di recupero piuttosto basse per l'azione adsorbente esercitata dalla sostanza organica del suolo verso i due fitofarmaci e per la loro successiva degradazione .

I residui, calcolati come % di recupero del fitofarmaco dal suolo con la presenza del verme terricolo *Eisenia fetida*, hanno portato a risultati in accordo con i loro tempi di degradazione (DT<sub>50</sub>). Importante è sottolineare che la presenza dei lombrichi ha portato a recuperi maggiori, in quanto ingerendo il substrato, essi rompono i legami fitofarmaco – sostanza organica, rendendo il pesticida più disponibile.

Il protocollo utilizzato per il Comet Assay andrebbe rivisto soprattutto per valutare se cambiando il metodo di estrusione dei celomociti e/o il numero di cellule sottoposte al test, si potrebbero ottenere risultati migliori.

## BIBLIOGRAFIA

A.R., C., *Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations*. Mol. Biotechnol, 2004

Akbar F., Abdul Haq M., Khan M.F. et al., *Degradation Analysis of some syntthetic and bio-insecticides Sprayed on Okra Crop using HPLC*, 2012

Bach, M., *Reduction of pesticide contamination at the catchment level. Proceedings of the Warwick Conference, Agriculture and the Environment. Challenges and conflicts for the New Millenium*, 1999

Bianco Pietro Massimiliano, Jacomini Carlo: *Diffusione, destino ambientale e danni ecologici dei prodotti chimici per l'agricoltura in Italia*, 2005

Boselli Mauro, Servizio Fitosanitario Regione Emilia Romagna, *Spinosad*

Bouché M.B., *Lombriciens de France. Ecologie et Systematique*. Institut National de la Recherche Agronomique, 1972

Brown G.G., Barois I., Lavelle P., *Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaohic fuctional domains*. Eur J Soil Biol, 2000

Buratti F. M., T.E., *Valutazione del rischio per la salute umana da esposizione ad agrofarmaci: aspetti regolatori e nuove prospettive*. In: *Agrofarmaci, conoscenze per un uso sostenibile a cura di Mara Gennari e Marco Trevisan*, 2008



Businelli, M., *Rischio ambientale da pratiche agricole in: Chimica del suolo*, 2009

Cell Biolabs, Inc, *Comet Assay Kits, 96 Well* (<https://www.cellbiolabs.com/comet-assay-kits-96-well>)

Colacci Annamaria (ARPA): *Strategie per il miglioramento delle procedure di valutazione del rischio da fitofarmaci*, 2009

Cortet, J., Gomot-De Vaufleury A., Poinot-Balaguer N., Gomot L., Texier C., Cluzeau D., *The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects*, European Journal of Soil Biology, Vol. 35, 1999

De Sio Francesco, *Introduzione all'HPLC - Manuale per corso di formazione "Addetti Controllo Qualità"*, 1997

Dhawan A., B.M., Parmar D., *Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models*. Cell Biol. Toxicol, 2009

Dominguez J., Edwards C.A., *Biology and Ecology of Earthworm Species Used for Vermicomposting, in Vermiculture Technology, Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*, Taylor & Francis Group, LLC, 2011

Dow AgroSciences, *Scheda tecnica Laser*

Edwards C.A. *Earthworms Ecology*. St. Lucie Press, 1998

Edwards C.A., *Earthworms Ecology*, 2nd ediction, CRC Press, Boca Raton, FL USA, 2004

EU, *REGOLAMENTO (CE) N. 1107/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 21 ottobre 2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414/CEE.*, Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 2009

EUROSTAT: *Sales of pesticides in the EU*

Fairbairn D.W., O.P.L., O'Neill K.L, *Comet assay: A comprehensive review*, 1995

FAO. 2000. *Assessing soil contamination A reference manual*. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (<http://www.fao.org/docrep/003/X2570E/X2570E00.HTM>).

J.M. Venter & A.J. Reinecke, *The life-cycle of the compost worm Eiseniafetida (Oligochaeta)*, South African Journal of Zoology, 1988

Jialong Wu & Zongling Ren<sup>1,2,3,4</sup> & Chi Zhang & Mikael Motelica-Heino<sup>5</sup> & Ting Deng & Haoyu Wang<sup>1,2,3,4</sup> & Jun Dai<sup>1</sup>, *Effects of soil acid stress on the survival, growth, reproduction, antioxidant enzyme activities, and protein contents in earthworm (Eisenia fetida)*, 2019

Jones C.G., Lawton J.H., Shachak M., *Organisms as eco system engineers*. Oikos, 1994

Komarek, M.C.a., ' E.; Chrastny, ' V. ; Bordas, F.; Bollinger, J. C., *Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects*. Environ. International, 2010

Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N. , *The bioavailability of chemicals in soil for earthworms*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 2004

Lavelle P. *Earthworms and the soil system*. Biol. Fertil. Soil, 1988

Lavelle P., *Diversity of soil fauna and ecosystem function*, Biology International, 1996

Lee K.E., *Earthworms. Their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, 1985

Mason P. J., F.I.D.L., Carter A.D., Walker A. et al., *Relative importance of point source contamination of surface waters: River Cherwell catchment monitoring study*. XI Pesticide Chemistry Conference, Cremona, Italy, 1999

Merli, A., Capri, E., *Ecotossicologia: cenni, effetti, misure e indicatori in Agrofarmaci: conoscenze per un uso sostenibile a cura di Mara Gennari e Marco Trevisan*, 2008

Mineo Angelo M., *Una guida all'utilizzo dell'Ambiente Statistico R*

Molinari, G.P., Magistrati, P., *Agrofarmaci: generalità, classificazione e modo di azione in: Agrofarmaci, conoscenze per un uso sostenibile. A cura di M. Gennari e M. Trevisan*, 2008

Monaci E., C.L., Casucci C., Vischetti C., *Losses and dissipation of penconazole in vineyard soil as affected by mid-row management system. Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2011

OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Pesticides n°. 15: *Persistent, Bioaccumulative, and Toxic Pesticides in OECD Member Countries (ENV/JM/MONO(2002)22)*, 2002

P.P.D.B. The Pesticide Properties Database, *Spinosad, Chlorpyrifos*

Paoletti M.G. , Sommaggio D., Fusaro S., *Proposta di Indice di Qualità Biologica del Suolo (QBS-e) basato sui Lombrichi e applicato agli Agroecosistemi*, UNIVPD, 2013

Paoletti M.G. *The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators*. Agriculture, Ecosystems and Environment, 1999

Pasteris A., Buratti S., Fabbri E., *Contaminanti emergenti nei suoli: il lombrico Eisenia andrei come modello sperimentale per la valutazione degli effetti biologici del bisfenolo A*, (Tesi di laurea di Arniani S.- UNIBO), 2012

Piola L. et al., *Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters*. Pesq. agropec. bras., 2009

Qingming Zhang , L.Z., Chang Han, Jun Wang, Hui Xie , Jinhua Wang and Shujuan Sun *Analysis of chlorpyrifos and TCP residues in agricultural soil and apples by HPLC*. Journal of Food, Agriculture & Environment, 2011

Ravier I, H.E., Cle ´ment M, Seux R, Briand O *Field experiments for the evaluation of pesticide spraydrift on arable crops*. Pest Manag Sci, 2005

Regolamento (CE) n.889/08 della Commissione, *Allegato II*, 2008

Reynolds J.W. & Wetzel M.J., *Nomenclatura Oligochaetologica. Supplementum Quartum. A catalogue of names, descriptions and type specimens of the Oligochaeta*. Illinois Natural History Survey Soecial Pubblication Chicago, 2010

Sannino, F., Braschi, I., *Adsorbimento e desorbimento degli agrofarmaci nel suolo in: Agrofarmaci conoscenze per un uso sostenibile. aA cura di M. Gennari e M. Trevisan, 2008*

Shugart L.R., *Environmental genotoxicology. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment, 1995*

Sims R.W., Gerard B.M. *Earthworms, 1985*

Tortensson, L., Castillo, M.D.P., *Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spraying equipment, 1997*

Toscano S (La Stampa). , *Alla larga dalle case: 25.000 firme per disciplinare l'uso di pesticidi, 2018*

Vischetti, C., Monaci, E., Cardinali, A., Casucci, C., Perucci, P., *The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. Chemosphere, 2008*

Vischetti, C., *Trasporto di agrofarmaci nel suolo in: Agrofarmaci, conoscenze per un uso sostenibile. A cura di M. gennari e M. Trevisan. 2008*

Wikipedia: *OECD*

Wu X.M., Y.L., Yu, M. Li, Y.H. Long, H. Fang and S.N. Li, *Prediction of bioavailability of chlorpyrifos residues in soil to earthworms*. J. Soil Sci. Plant Nutr., 2011

Yijun Yua, Xinfang Lib, Guiling Yangb,, Yanhua Wangb, Xinquan Wangb, Leiming Caib,Xinju Liu, *Joint toxic effects of cadmium and four pesticides on the earthworm(Eisenia fetida)*, 2019

Zalat O. A., Elsayed M.A., M. S. Fayed, M. K. Abd El Megid *Validation of UV Spectrophotometric and HPLC Methods for Quantitative determination of chlorpyrifos*. International Letters of Chemistry, Physics and Astronomy, 2014

ZHOU, S.P., et al., *Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods* Journal of Environmental Sciences, 2007