



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

EFFETTI DI FITORISANAMENTO E
VERMIRISANAMENTO SU SUOLO CONTAMINATO DA
CLORPIRIFOS

Effect of phytoremediation and vermiremediation on soil contaminated by chlorpyrifos

TIPO TESI: Sperimentale

Studente:
EDOARDO CORVATTA

Relatore:
PROF. COSTANTINO VISCHETTI

Correlatrici:
DOTT.SSA ARIANNA DE BERNARDI

DOTT.SSA ENRICA MARINI

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

*Le nostre mani assorbono come radici,
quindi le poso su ciò che è bello
in questo mondo.*

SAN FRANCESCO D'ASSISI

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ELENCO DELLE FIGURE	6
ACRONIMI E ABBREVIAZIONI	8
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE	9
1.1 Rischio di contaminazione ambientale in agricoltura	9
1.1.1 Potentially Toxic Elements	10
1.1.2 Agrofarmaci.....	14
<i>1.1.2.1 Destino ambientale degli agrofarmaci</i>	17
<i>1.1.2.2 Clorpirifos</i>	20
1.1.3 Antibiotici	23
1.1.4 Idrocarburi Policiclici Aromatici	24
1.2 Principali tecniche di decontaminazione.....	26
1.2.1 Metodi abiotici.....	26
1.2.2 Metodi biologici.....	29
<i>1.2.2.1 Fitorimediazione (phytoremediation)</i>	30
<i>1.2.2.2 Vermirimediazione (vermiremediation)</i>	34
<i>1.2.2.3 Biostimolazione (biostimulation)</i>	39
<i>1.2.2.4 Bioaumento (bioaugmentation)</i>	40
CAPITOLO 2 SCOPO DELLA TESI	42
CAPITOLO 3 MATERIALI E METODI	43
3.1 Suolo	43
3.2 Lombrichi.....	43
3.3 Vermicompost.....	44
3.4 Piante	44
3.5 Insetticida (clorpirifos).....	44
3.6 Struttura della prova.....	45
3.7 Residui di Clorpirifos nel suolo	46
3.7.1 Estrazione del clorpirifos	46

3.8 Effetti sul DNA dei lombrichi.....	47
3.8.1 Comet assay	47
3.9 Analisi biochimiche	50
3.9.1 Carbonio della biomassa microbica	50
3.9.2 Idrolisi della fluoresceina diacetato (FDA).....	51
3.9.3 Fosfatasi alcalina.....	51
3.9.4 β -glucosidasi.....	52
3.9.5 N-acetil- β -glucosaminidasi (NAG)	52
3.10 Analisi statistica	53
CAPITOLO 4 RISULTATI E DISCUSSIONE	54
4.1 Clorpirifos nel suolo	54
4.2 Carbonio della biomassa microbica	57
4.3 Attività enzimatiche	59
CONCLUSIONI	65
BIBLIOGRAFIA	67
SITOGRAFIA	79
RINGRAZIAMENTI	80

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Caratteristiche del suolo utilizzato nella prova.....	43
Tabella 2: Caratteristiche del vermicompost utilizzato.....	44
Tabella 3: Proprietà chimiche e fisiche di Clorpirifos e Dursban 75 WG	45

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1: PTEs distinti in accordo alle funzioni fisiologiche svolte e alla tossicità (Nieder & Benbi, 2024).....	10
Figura 2: Fonti antropiche di contaminazione ambientale da metalli pesanti (Angon et al., 2024)	13
Figura 3: Destino ambientale dei fitofarmaci (Bloomfield et al., 2006).....	18
Figura 4: Struttura molecolare 3D del Clorpirifos (PubChem, 2024).....	20
Figura 5: Meccanismo di degradazione del Clorpirifos (Wolejko et al., 2022).....	21
Figura 6: Fenantrene (sx) e benzo(a)pirene (dx) (PubChem, 2024).	25
Figura 7: Metodi di risanamento abiotici (Aparicio et al., 2022).....	29
Figura 8: Fitorimedio (Chandra et al., 2017).	31
Figura 9: Vermirimedio (Sarma & Joshi, 2023).	36
Figura 10: Ciclo di vita dei lombrichi.	38
Figura 11: Differenti tecniche di biorimedio (Lopes et al., 2022)	40
Figura 12: Serra allestita per l'esperimento.	46
Figura 13: Spettrofotometro (sx) e imbuto separatore (dx).	47
Figura 14: Conta dei celomociti al microscopio.	48
Figura 15: Schematizzazione del comet assay (Møller et al., 2020).....	49
Figura 16: Concentrazioni del CPF nel suolo durante i 120 giorni di esperimento (mg/kg), partendo rispettivamente da 25 mg/kg, a sinistra, e 50 mg/kg, a destra.....	54
Figura 17: Percentuali di riduzione del CPF alla fine dell'esperimento (%).....	55
Figura 18: Sviluppo delle piante a differenti concentrazioni di CPF dopo 54 giorni, da sinistra verso destra 0 ppm → 25 ppm → 50 ppm.	56
Figura 19: Carbonio della biomassa microbica durante il test nel suolo incontaminato (a), contaminato con 25 ppm (b) e 50 ppm (c) di CPF.	57
Figura 20: Attività dell'FDA durante il test nel suolo incontaminato (a), contaminato con 25 ppm (b) e 50 ppm (c) di CPF.	59
Figura 21: Attività della fosfatasi alcalina durante il test nel suolo incontaminato (a), contaminato con 25 (b) e 50 ppm (c) di CPF.	60

Figura 22: Attività della β -glucosidasi durante il test con suolo incontaminato (a), contaminato con 25 (b) e 50 ppm (c) di CPF.....	62
Figura 23: Attività della β -glucosaminidasi durante il test nel suolo incontaminato (a), contaminato con 25 (b) e 50 (c) ppm di CPF.....	63

ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

PTES	<i>Potential Toxicity Elements</i> (elementi potenzialmente tossici)
TCP	3, 5, 6-tricloro-2-piridinolo
CPF	Clorpirifos
AV	Antibiotici Veterinari
IPA	Idrocarburi Policiclici Aromatici

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 Rischio di contaminazione ambientale in agricoltura

Al centro del dibattito pubblico e privato, ormai da qualche anno, c'è il tema dell'inquinamento ambientale. C'è l'urgenza e la necessità di ridurre la contaminazione ambientale in modo da preservare la fertilità e la produttività del suolo. La contaminazione ambientale consiste in un cambiamento indesiderato delle caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche dell'aria, dell'acqua e del suolo che in grado di influenzare negativamente la vita degli esseri umani e delle altre forme di vita presenti su questo pianeta (Soriano, 2014).

La base dell'agricoltura è il suolo, ovvero il sottile strato di materiale organico ed inorganico che ricopre la superficie terrestre. La componente organica, derivante dalla degradazione dei resti di animali e piante, si concentra nella porzione superficiale; mentre quella inorganica, generata tramite il processo di pedogenesi, occupa la porzione sottostante. Nelle ultime decadi, l'aumento delle attività industriali, la rapida urbanizzazione, l'aumento dei consumi e dei comportamenti irresponsabili da parte dell'uomo hanno incrementato vertiginosamente l'inquinamento del suolo da parte di pesticidi, metalli pesanti, idrocarburi, antibiotici e altri composti potenzialmente tossici (Aparicio et al., 2022). Tutte le colture impiegate per l'alimentazione umana o animale derivano dal suolo, di conseguenza si sta perdendo la più importante risorsa naturale di cui dispone l'umanità. Sulla soglia del tracollo planetario, l'agricoltura contemporanea è indispensabile sia faccia promotrice di nuovi modelli produttivi in grado di generare alimenti buoni, puliti e giusti (Smil, 2000; Pollan, 2008; Petrini, 2016).

In passato la contaminazione del suolo non veniva considerata alla stregua di quella atmosferica o idrica, probabilmente ciò era dovuto alle maggiori difficoltà incontrate nello studio del fenomeno. Nonostante questo, recentemente l'attenzione si è concentrata sempre più sulla contaminazione dei suoli, specialmente nei paesi in via di sviluppo dove il problema sembra aver raggiunto dimensioni imponenti (Su, 2014).

1.1.1 Potentially Toxic Elements

I *Potentially Toxic Elements* (PTEs) comprendono i metalli pesanti, che sono caratterizzati da una densità maggiore di 5 g/cm³ e un peso atomico superiore a 20, metalloidi e alcuni non metalli (Nieder & Benbi, 2024). I metalli pesanti rappresentano più di un terzo degli elementi presenti nella tavola periodica. Zinco (Zn), ferro (Fe), rame (Cu), molibdeno (Mo), manganese (Mn), cobalto (Co) e nichel (Ni) sono micronutrienti essenziali per diverse funzioni vitali, ma diventano tossici se presenti a dosi elevate. Lo stesso vale per il Selenio (Se), un non metallo biologicamente importante. Altri metalli non rivestono alcuna funzione per i viventi e la loro presenza è sempre da considerarsi tossica; si tratta di mercurio (Hg), cadmio (Cd), piombo (Pb) e cromo (Cr). A questi si aggiunge l'arsenico (As), un metalloide altamente tossico. In ogni caso, possiamo comunque affermare che, superata una certa soglia di concentrazione, i PTEs risultano tossici e deleteri per tutti gli esseri viventi (Abdu et al., 2017). Negli ultimi anni, con l'espansione dell'economia globale, il contenuto di metalli pesanti nel suolo dovuto all'attività antropica è costantemente aumentato, portando al deterioramento dell'ambiente (Su, 2014).

Period	1 I A	2 II A	3 III B	4 IV B	5 V B	6 VI B	7 VII B	8 VIII B	9 VIII B	10 VIII B	11 I B	12 II B	13 III A	14 IV A	15 V A	16 VI A	17 VII A	18 VIII A
1	H hydrogen 1.008																	He helium 4.003
2	Li lithium 6.968	Be beryllium 9.012											B boron 10.81	C carbon 12.01	N nitrogen 14.01	O oxygen 16.00	F fluorine 19.00	Ne neon 20.18
3	Na sodium 22.99	Mg magnesium 24.31											Al aluminum 26.98	Si silicon 28.09	P phosphorus 30.97	S sulfur 32.07	Cl chlorine 35.45	Ar argon 39.95
4	K potassium 39.10	Ca calcium 40.08	Sc scandium 44.96	Ti titanium 47.87	V vanadium 50.94	Cr chromium 52.00	Mn manganese 54.94	Fe iron 55.85	Co cobalt 58.93	Ni nickel 58.69	Cu copper 63.55	Zn zinc 65.38	Ga gallium 69.72	Ge germanium 72.63	As arsenic 74.92	Se selenium 78.97	Br bromine 79.90	Kr krypton 83.80
5	Rb rubidium 85.47	Sr strontium 87.62	Y yttrium 88.91	Zr zirconium 91.22	Nb niobium 92.91	Mo molybdenum 95.95	Tc technetium 98	Ru ruthenium 101.1	Rh rhodium 102.9	Pd palladium 106.4	Ag silver 107.9	Cd cadmium 112.4	In indium 114.8	Sn tin 118.7	Sb antimony 121.8	Te tellurium 127.6	I iodine 126.9	Xe xenon 131.3
6	Cs cesium 132.9	Ba barium 137.3	Lu lutetium 175.0	Hf hafnium 178.5	Ta tantalum 180.9	W tungsten 183.8	Re rhenium 186.2	Os osmium 190.2	Ir iridium 192.2	Pt platinum 195.1	Au gold 197.0	Hg mercury 200.6	Tl thallium 204.4	Pb lead 207.2	Bi bismuth 209.0	Po polonium 209	At astatine 210	Rn radon 222

Highly toxic heavy metal without physiological function in biota
 Biologically essential heavy metal toxic at high concentration
 Highly toxic non-metal without physiological function in biota
 Biologically essential non-metal toxic at high concentration

Figura 1: PTEs distinti in accordo alle funzioni fisiologiche svolte e alla tossicità (Nieder & Benbi, 2024).

I PTEs possono essere di origine antropica oppure naturale.

Gli agenti atmosferici e la pedogenesi sono considerate le maggiori fonti naturali dei suddetti. Questi metalli entrano a far parte di minerali primari e secondari grazie al processo di inclusione e adsorbimento. Minerali come la galena, la cerussite, la cassiterite e

l'arsenopirite possono essere disgregati dagli agenti atmosferici e liberare quindi i metalli pesanti che li costituiscono. Anche le piogge acide, così come le tempeste di sabbia, gli incendi forestali e le eruzioni vulcaniche vengono annoverate tra le varie cause di inquinamento da metalli pesanti (Abdu et al., 2017).

Come mostrato nella figura 1, la contaminazione dovuta all'opera dell'uomo è la più diffusa e la più deleteria; l'alterazione del ciclo di questi PTEs ha fatto sì che in pochi decenni si producessero l'equivalente di diversi secoli di emissioni naturali. Toth et al. (2016) hanno analizzato 22.000 campioni con lo scopo di valutare la concentrazione di metalli pesanti presente all'interno dei suoli europei. I risultati evidenziano che in diversi casi la concentrazione di questi metalli superava la soglia di contaminazione presa in considerazione dallo studio, specialmente nelle aree meridionali e Mediterranee. Nonostante il rischio, una normativa unica sui metalli pesanti stenta ad essere approvata in Europa, mentre la discrepanza tra le soglie di contaminazione tra i paesi membri è da considerarsi ampia (He et al., 2015).

Attività umane come la fusione, l'estrazione mineraria, l'industrializzazione, lo smaltimento dei rifiuti contenenti metalli e le attività militari sono tra le più comuni fonti di inquinamento da PTEs. Ad esse si aggiungono materiali da costruzione, come le vernici, il fumo di sigaretta, la metallurgia e la fusione, le bombolette spray e gli scarichi fognari (Abdu et al., 2011). La plastica viene colorata tramite l'aggiunta di pigmenti contenenti spesso metalli pesanti, come lo sono comunemente i rivestimenti di posate, utensili di vario tipo, aeroplani, automobili ed altri oggetti che vengono utilizzati quotidianamente. L'usura e la lacerazione di parti di automobili, così come la costante abrasione degli pneumatici e l'utilizzo di combustibili fossili fanno dell'industria automobilistica una delle principali cause dell'immissione di tali PTEs nell'ambiente (Adriano, 2001).

Un'altra attività antropica altamente impattante è l'agricoltura, la quale causa la dispersione nell'ambiente di quantità non indifferenti di PTEs. I fertilizzanti e prodotti fitosanitari sono oggi indispensabili per una produzione agricola soddisfacente dal punto di vista qualitativo e quantitativo; tuttavia, l'utilizzo eccessivo e prolungato nel tempo ha portato a pesanti contaminazioni da metalli pesanti nei suoli e non solo. Hg, As, Cu, Zn e altri PTEs (Arao et al., 2010) sono presenti in diversa misura all'interno dei fertilizzanti; concimi azotati e potassici spesso ne sono sprovvisti, mentre quelli fosfatici generalmente ne contengono una grande quantità. Classificandoli in funzione del loro contenuto di metalli pesanti, si ottiene la

seguinte disposizione: fertilizzanti fosfatici > fertilizzanti composti (ovvero quelli che annoverano al loro interno più di un elemento) > fertilizzanti potassici > fertilizzanti azotati (Boyd, 2010).

L'utilizzo di concimi organici e compost, pratica molto comune in agricoltura, può rappresentare una fonte di inquinamento da PTEs. Non di rado essi contengono alte concentrazioni di metalli pesanti come Cu, Zn, Cd, Ni, Cr,As, Pb e Hg (Kumar et al., 2019). Anche i fanghi di depurazione derivanti dagli scarti urbani ed industriali sono generalmente contaminati, una volta depurati correttamente, possono essere impiegati con successo in agricoltura come fertilizzanti. Dove questo non è sempre possibile, come nei paesi in via di sviluppo, vengono impiegati senza aver ricevuto i trattamenti opportuni e il loro reiterato utilizzo ha condotto ad un notevole aumento della concentrazione dei metalli pesanti nelle aree coltivabili (Rashid et al., 2023).

I pesticidi spesso includono al loro interno dei metalli pesanti, che possono far parte attivamente del formulato commerciale oppure essere presenti come impurità. Uno degli esempi principali è costituito dai fungicidi a base di rame, disponibili in diverse forme (poltiglia bordolese, solfato tribasico, ossido rameoso, idrossido di rame, ossicloruro triramico e tetraramico) e utilizzati da più di un secolo per contrastare funghi come la peronospora. Nonostante l'Unione Europea ne abbia ridotto l'utilizzo consentito, spesso i prodotti a base di Cu rappresentano l'unica soluzione per una lotta efficace alle malattie fungine in agricoltura biologica. Se si considerano poi gli obiettivi dell'UE in merito all'ampliamento della superficie agricola europea coltivata in regime biologico racchiuse all'interno della strategia "Farm to Fork", si capisce quanto la preoccupazione in merito al rame e al suo utilizzo sia un problema attuale (Tamm et al., 2022).

Inoltre, negli ultimi anni la tecnica della pacciamatura ha assunto sempre più rilevanza a livello globale, in particolare per la coltivazione di orticole in pieno campo; spesso vengono utilizzati teli plastici la cui produzione, specialmente per quanto concerne la stabilizzazione al calore, necessita di Cd e Pb (Satarug et al., 2003).

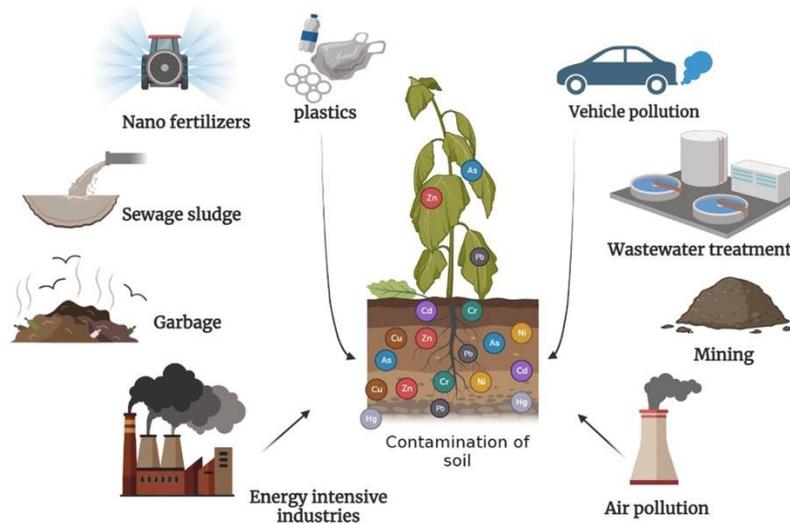


Figura 2: Fonti antropiche di contaminazione ambientale da metalli pesanti (Angon et al., 2024).

I PTEs rappresentano una grande minaccia per l'ecosistema, in quanto sono persistenti e ubiquitari. A causa della loro natura inorganica, non possono essere degradati tramite nessun processo biologico o fisico. Il destino ambientale di questi metalli dipende dalle loro caratteristiche chimiche, da fattori abiotici all'interno dell'ecosistema e dalle loro interazioni con la parte biotica (Suman et al., 2018).

I PTEs tendono ad essere biodisponibili nell'ambiente, e questa caratteristica li rende facilmente assimilabili dagli esseri viventi (Kabata-Pendias, 2000). Questo può portare al loro bioaccumulo, ovvero ad una concentrazione all'interno di un organismo biologico superiore rispetto a quella registrata nell'ambiente esterno. Perché si verifichi quest'accumulo è necessario che l'introduzione della sostanza nell'organismo superi la quota che lo stesso è in grado di consumare o espellere. In questo modo i metalli pesanti risalgono la catena alimentare, aumentando di concentrazione ad ogni passaggio di livello trofico, fino a raggiungere quantità tali da compromettere salute e sopravvivenza, persino dell'essere umano (Sánchez-Castro et al., 2023). Dopo l'ingestione di piombo, arsenico, mercurio e cadmio, negli animali (compreso l'uomo) si riscontrano tossicità cronica o acuta. L'avvelenamento da metalli pesanti può causare vomito, diarrea, nausea, disfunzioni del sistema motorio, calo della vista e dell'udito, danni al cuore e al cervello, ipertensione e altro ancora (Mari et al., 2018). Lo stress ossidativo indotto da questi metalli degrada i lipidi, le proteine, il DNA e aumenta la carcinogenesi; inoltre, sono in grado di aggravare il decorso negativo del cancro riducendo l'efficacia delle terapie svolte (Witkowska et al., 2021).

I PTEs possono influenzare negativamente l'attività dei microorganismi andando a compromettere la fertilità del suolo ed il corretto funzionamento dell'ecosistema. Tra gli effetti primari sulla flora microbica si riscontra un'inibizione della crescita e della moltiplicazione cellulare, che generalmente porta ad una diminuzione della popolazione stessa. Questo calo in termini di biomassa interferisce con attività essenziali come la degradazione della sostanza organica e modifica il ciclo dell'azoto, la nitrificazione e la denitrificazione con un calo nella biodisponibilità generale dei nutrienti nel suolo (Kumar et al., 2022). Alcuni metalli pesanti, come il piombo, sono in grado di acidificare il suolo abbassando il pH, queste fluttuazioni possono avere un grande impatto sulla composizione della flora microbica e sulla biodisponibilità stessa degli altri metalli (Angon et al., 2024). Anche mesofauna e macrofauna ne risentono altrettanto, in particolare i lombrichi, indispensabili fattori della struttura del suolo. *Eisenia fetida*, ad esempio, ha mostrato di riconoscere ed evitare suoli dove la concentrazione di rame supera 110 mg/kg. Un'esposizione forzata e prolungata a dosi maggiori altera la biomassa dei lombrichi, con conseguenze irreversibili oltre i 200 ppm (De Bernardi et al., 2022; Marini et al., 2024).

I vegetali non sono esclusi dalla minaccia costituita da elevate concentrazioni di PTEs, infatti essi possono limitarne riproduzione, sviluppo e resa. Si accumulano all'interno delle parti edibili fino a livelli tali da precluderne la commercializzazione e il consumo, e anche al di sotto di tale soglia possono abbassare la qualità del raccolto riducendo il reddito dell'agricoltore e aumentando lo spreco alimentare (Lebelo et al., 2021). Alcuni di questi metalli, come il piombo e il cadmio, emulano altri micronutrienti sfruttando le stesse vie metaboliche. Questa competizione può portare la pianta ad una situazione di deficit nutrizionale, con relative conseguenze negative sullo sviluppo. Tali interferenze riducono l'assimilazione di nutrienti da parte del vegetale diminuendone la capacità di fronteggiare lo stress ambientale e la resilienza/resistenza nei confronti di eventi climatici avversi (Chaves et al., 2002).

1.1.2 Agrofarmaci

Il gruppo di sostanze conosciute come fitofarmaci, o agrofarmaci, o più semplicemente pesticidi, annovera al suo interno diverse categorie di prodotti utilizzati come insetticidi, fungicidi, erbicidi, rodenticidi, molluschi e nematocidi. Generalmente il termine fitofarmaco viene utilizzato nel contesto legislativo/normativo, mentre l'espressione agrofarmaco è comune nell'ambito tecnico e produttivo. I pesticidi possono essere classificati in funzione della struttura chimica, dei o del gruppo funzionale, del meccanismo di azione e

della tossicità. Dal punto di vista chimico vengono distinti innanzitutto i fitofarmaci inorganici da quelli organici; i primi includono ad esempio il rame e lo zolfo, mentre i secondi hanno una composizione più complessa (Ayilara et al., 2023). Essi vengono commercializzati attraverso formulazioni diverse, più “tradizionali”, come polveri bagnabili, emulsioni concentrate e concentrazioni solubili in acqua, o “moderne”, tra cui granuli idro-disperdibili, sospensioni concentrate, emulsioni acquose, micro-incapsulati, super-emulsioni e dispersioni in olio. La maggior parte dei trattamenti viene eseguito previa diluizione in acqua del prodotto e il principio attivo è spesso accompagnato da co-formulati e coadiuvanti, che possono creare problemi da un punto di vista ecotossicologico (Businelli, 2009).

La storia degli agrofarmaci può essere suddivisa in tre periodi temporali. Il primo periodo si estende dagli anni 70' del XIX secolo a ritroso fino a 4500 anni fa, momento in cui i reperti storici riportano il primo utilizzo di un insetticida da parte dell'uomo; i Sumeri usavano lo zolfo per controllare insetti e acari, mentre le erbe infestanti venivano asportate meccanicamente, spesso a mano. Alcune delle sostanze impiegate all'epoca sono oggi ancora in uso, come il Piretro, estratto dai fiori del *Chrysanthemum cinerariaefolium* e utilizzato come insetticida da più di 2000 anni (Unsworth, 2010).

Nel secondo periodo, che va dal 1870 circa fino al 1945, iniziano ad essere utilizzati prodotti di sintesi inorganici. Poco prima dell'inizio del XX secolo, in Svezia lo zolfo e il rame venivano impiegati contro le malattie fungine che colpivano patate ed alberi da frutto. La poltiglia bordolese, ovvero un miscuglio di solfato di rame e idrossido di calcio, cominciò ad essere utilizzata prima a Bordeaux e poi si espanse in tutti i vigneti europei; tutt'ora costituisce uno degli antiperonosporici più utilizzati (Bernardes et al., 2015).

Il terzo, ed ultimo periodo, si estende dal 45' del secolo scorso fino ai nostri giorni, ed è caratterizzato dall'utilizzo di principi attivi organici di origine sintetica. I primi prodotti disponibili, come il diclorodifeniltricloroetano (DDT), il β -esaclorocicloesano noto come “lindano”, l'aldrina, la dieldrina, il clordano, il paration, il captano e il 2,4-D, venivano applicati in grosse quantità, avevano scarsa selettività e si dimostrarono estremamente tossiche (Zhang et al., 2017).

Infatti, il DDT venne ritirato nel 1972, in ragione degli effetti tossi riscontrati sugli organismi non bersaglio, così come per la sua lunghissima persistenza e la capacità di accumularsi all'interno dei tessuti causando danni a lungo termine. A partire dagli anni 70' nuove famiglie di agrofarmaci, come i triazoli, le strobiruline, le spinosine, i neonicotinoidi e gli organofosfati sono stati introdotti nel mercato, la maggior parte utilizzate in quantità

nell'ordine di grammi, non più chili, ad ettaro (Tudi et al., 2021). Ad oggi l'ultima frontiera è rappresentata dai biopesticidi, gruppo all'interno del quale possiamo inserire i mezzi di controllo biologico, biotecnologico e microbiologico. Questi prodotti, a differenza dei "classici" fitofarmaci di origine sintetica, sono caratterizzati dall'origine naturale, presentano un ottimo profilo ecotossicologico, elevata specificità e bassa persistenza. Per questo, costituiscono nel presente, e nel prossimo futuro, una risorsa fondamentale per il raggiungimento di un sistema agricolo meno impattante sull'ambiente (Ayilara et al., 2023).

L'obiettivo della moderna industria degli agrofarmaci è quello di creare fitofarmaci efficaci a ridotti dosaggi, estremamente specifici e poco persistenti nell'ambiente. Le molecole vengono sviluppate per mimare, e quindi sostituire o interferire, con altre che rivestono un ruolo fondamentale nelle reazioni biochimiche specifiche dell'organismo bersaglio. La specificità è tanto maggiore quanto più la molecola è affine alla via metabolica interessata (Gavrilescu, 2005).

Numerosi sono i benefici apportati dall'utilizzo degli agrofarmaci in molti campi di applicazione differenti, dalla salute pubblica all'attività agricola. Nei paesi in via di sviluppo spesso rappresentano la soluzione più semplice ed immediata per contrastare gli insetti vettori di malattie come la malaria. La popolazione mondiale è passata da 1,5 miliardi a 6,1 nell'arco di un secolo (XX), mai nella storia dell'umanità si era assistito ad una crescita simile. Ciò non sarebbe stato possibile se non ci fosse stata anche una parallela crescita della produzione alimentare globale, e nonostante quest'incremento sia dovuto a diversi fattori è impossibile negare il ruolo centrale rivestito dai prodotti fitosanitari (Tudi et al., 2021). Senza l'utilizzo di pesticidi si stima che andrebbe perso il 78% di frutta, il 54% di verdura e il 32% di cereali prodotti (Lamichhane, 2017). Il sistema alimentare contemporaneo si regge sull'utilizzo degli agrofarmaci e, nonostante gli innegabili benefici dovuti al loro utilizzo, moltissime sono le criticità emerse da mezzo secolo a questa parte. In Cina, per esempio, si è assistito all'ascesa dei "*cancer villages*", ovvero dei piccoli centri abitati in corrispondenza dei distretti agricoli, dove il tasso di mortalità dovuta ai tumori ha raggiunto livelli esorbitanti visto l'utilizzo esagerato di pesticidi. Il suolo stesso, indispensabile per la vita dell'umanità sulla terra, è minacciato da questi prodotti, sono stati dimostrati gli effetti negativi sulla consistenza e la biodiversità della flora microbica, sul ciclo dell'azoto, sulla macro e meso-fauna (De Bernardi et al., 2022), e sull'attività enzimatica stessa (Sun et al., 2018).

Per cercare di ridurre l'impatto dei pesticidi sulla salute umana e sull'ambiente negli ultimi anni si sono intensificati gli studi per l'introduzione di pesticidi naturali, cioè sostanze estratte da microorganismi o da piante che possano sostituire i pesticidi di sintesi nei trattamenti in campo. La ricerca si è molto sviluppata riguardo ai fungicidi con la creazione di preparati a base di microorganismi antagonisti e/o di micotossine in grado di combattere molte malattie fungine, specialmente quelle terricole. Passi avanti sono stati fatti anche per gli insetticidi per i quali comunque esistono prodotti naturali da molti anni (piretroidi, azadiractina, spinosad ecc.). Per gli erbicidi naturali la ricerca è andata avanti soprattutto nei Paesi del Nord America dove l'introduzione di organismi geneticamente modificati (OGM) per le piante coltivate ha permesso l'utilizzo di erbicidi totali naturali come ad esempio il glufosinate, mentre in Europa lo sviluppo di erbicidi naturali segna uno stallo dovuto principalmente al divieto di introduzione di OGM in agricoltura per quasi tutti i Paesi dell'Unione.

1.1.2.1 Destino ambientale degli agrofarmaci

Ogni anno vengono utilizzati circa 3 miliardi di chilogrammi di prodotti fitosanitari, di questi solamente l'1% raggiunge l'organismo bersaglio, il resto viene interessato da fenomeni di degradazione, adsorbimento e trasporto che lo allontanano dal punto di applicazione disperdendolo nell'ambiente. Il risultato sono delle possibili contaminazioni di vari comparti ambientali, con dei rischi a breve e lungo termine per gli ecosistemi naturali e per l'uomo (Hayes & Hansen, 2017).

I principali processi che interessano gli spostamenti di un fitofarmaco nell'ambiente sono i seguenti: deriva, volatilizzazione, lisciviazione e ruscellamento. La deriva si manifesta al momento dell'applicazione dell'agrofarmaco, gli ugelli dei dispositivi di diffusione sono progettati per creare delle gocce piccolissime che permettano una dispersione omogenea del prodotto, tanto più queste sono piccole tanto maggiore è la probabilità che vengano allontanate dal vento (Tiryaki & Temur, 2010).

La volatilizzazione consiste nel passaggio dallo stato solido o liquido a quello gassoso, il pesticida una volta raggiunta l'atmosfera può poi depositarsi al suolo, grazie alla pioggia, anche a distanze considerevoli dal punto di applicazione (Tudi et al., 2021).

La lisciviazione è il fenomeno mediante il quale un fitofarmaco si infiltra lungo il profilo del suolo grazie alle acque in percolazione. Essendo direttamente connessa al movimento dell'acqua all'interno del suolo è, come quest'ultima, governata dalla legge di Darcy. La conducibilità idraulica varia in funzione del tipo di suolo e del contenuto idrico, comunque, i

L'adsorbimento generalmente non è permanente, ma è un equilibrio dinamico tra la concentrazione del pesticida nella frazione solida e quella liquida del suolo. Per valutare quantitativamente l'adsorbimento si utilizzano delle isoterme, ovvero delle curve che descrivono la ripartizione di un fitofarmaco tra terra e acqua ad una data temperatura. Molti sono i fattori che influenzano questo processo, ad esempio, le caratteristiche del suolo, come il pH, la tessitura, la struttura e la componente organica. In particolare, suoli che abbondano di sostanza organica, specialmente se ricchi della componente umica, sono maggiormente propensi a trattenere gli xenobiotici in ragione del grande numero di legami che sono in grado di instaurare con questi ultimi (Tudi et al., 2021).

La degradazione di un pesticida può avvenire mediante processi chimici, fotochimici e biologici. Il tempo necessario perché ciò avvenga varia in funzione delle condizioni climatiche e delle caratteristiche del principio attivo. Nella pratica, è utile definire l'emivita (DT50), ovvero il tempo necessario affinché un fitofarmaco dimezzi la sua concentrazione iniziale. Significa che, per esempio, se un pesticida possiede un'emivita di 15 giorni, dopo tale periodo la sua concentrazione sarà il 50% rispetto a quella distribuita, e dopo altri 15 giorni si dimezzerà ulteriormente (25% rispetto alla dose applicata). Stando alla classificazione proposta da Gavrilesco et al. (2005), in funzione dell'emivita, i fitofarmaci possono essere suddivisi in: poco persistenti, quando il DT50 < 30 giorni, moderatamente persistenti, quando il DT50 è compreso tra i 30 e i 100 giorni, e altamente persistenti, quando il DT50 supera i 100 giorni. Il processo di degradazione regola la persistenza del prodotto nell'ambiente e porta alla formazione di svariati metaboliti, questi spesso risultano anche più impattanti del prodotto di partenza. Ad esempio, il 3, 5, 6-tricloro-2-piridinolo (TCP), ovvero il metabolita principale dell'insetticida clorpirifos, è molto più tossico del suo predecessore; entrambi sono stati frequentemente individuati all'interno di suoli e acque sotterranee in molte zone (Zhao et al., 2017).

La degradazione biologica, o biodegradazione, è operata da una moltitudine di microorganismi aerobi e anaerobi, spesso rappresenta la via principale attraverso la quale vengono degradati gli xenobiotici all'interno di suoli e acque.

La degradazione chimica è in gran parte rappresentata da reazioni operate dall'ossigeno con l'ossidazione e dall'acqua con l'idrolisi.

La fotodegradazione, come suggerisce il nome, si avvale della luce per scomporre il principio attivo. Molti insetticidi sono vulnerabili sotto questo punto di vista e il tasso di

degradazione dipende dall'intensità della luce, dal tempo di esposizione e dalle proprietà del prodotto (Tudi et al., 2021).

1.1.2.2 Clorpirifos

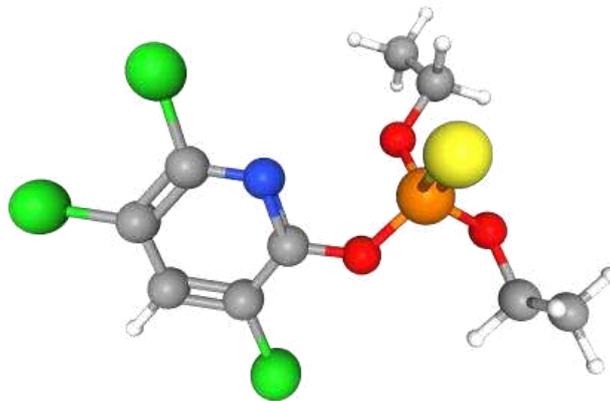


Figura 4: Struttura molecolare 3D del Clorpirifos (PubChem, 2024).

Il Clorpirifos (CPF) è stato registrato negli Stati Uniti d'America nel 1965 dalla Dow Chemical Company ed è un tiofosfato appartiene al gruppo degli insetticidi organofosforici. Il nome ufficiale, stando alla nomenclatura IUPAC, è diethoxy-sulfanylidene-(3,5,6-trichloropyridin-2-yl)oxy- λ 5-phosphane. Si presenta simile ad un solido cristallino di colore bianco, con un forte odore. Non è facilmente miscibile con l'acqua, perciò, è consuetudine trovarlo a livello commerciale miscelato con degli oli oppure incapsulato. Agisce per ingestione, contatto ed inalazione da parte degli insetti, sulla superficie e all'interno della pianta (PubChem, 2024). Una volta entrato nell'organismo bersaglio, il CPF inibisce l'attività dell'Acetilcolinaesterasi (AChE), uno degli enzimi più importanti del sistema nervoso centrale e periferico.

L'applicazione di questo insetticida per fini agricoli ne permette la diffusione in diversi comparti ambientali come l'aria, il suolo, l'acqua superficiale (fiumi, canali e laghi) e sotterranea, alterando il normale funzionamento dell'ecosistema. Vista la struttura chimica e le proprietà fisico-chimiche che lo caratterizzano, il CPF tende a persistere nell'ambiente per lunghi periodi di tempo. È poco solubile in acqua, non particolarmente volatile ed estremamente lipofilo. Data l'affinità con i lipidi, il CPF è in grado di penetrare l'epidermide ed entrare nel flusso sanguigno, nei tessuti, negli organi, nel latte e all'interno dei fluidi corporei degli animali.

Quasi ogni giorno, miliardi di persone sono esposte al Clorpirifos, gli effetti a lungo termine potrebbero portare a diversi problemi di salute, interessando principalmente il sistema nervoso, quello cardiovascolare e quello respiratorio (Wolejko et al., 2022).

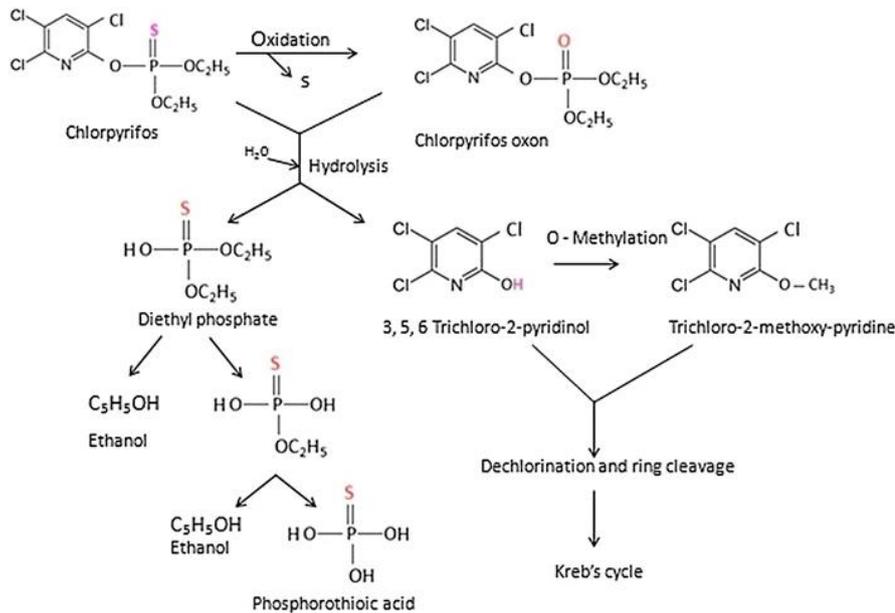


Figura 5: Meccanismo di degradazione del Clorpirifos (Wolejko et al., 2022).

Una volta disperso nell'ambiente il CPF, visto la sua natura, è fortemente adsorbito dalla componente solida ed organica del terreno. Il tempo medio di emivita (DT50) nel suolo varia da 60-120 giorni fino a 4 anni, in base alla dose di applicazione, al clima e alle caratteristiche del suolo stesso (Anwar et al., 2009; Racke et al., 1994); in particolare il pH, l'umidità, la temperatura, la sostanza organica e la flora microbica presente nel suolo influenzano notevolmente il tempo di degradazione del CPF. Numerosi studi indicano che il CPF può influenzare negativamente i microorganismi del suolo, inibendo diversi cicli dei nutrienti, come l'azotofissazione operata dai batteri. Il metabolita principale frutto della sua degradazione è il 3,5,6-tricloro-2-piridinolo (TCP), che è risultato essere persino più tossico del clorpirifos stesso, così come il clorpirifos-oxon (CPFO) (Wolejko et al., 2022).

Gli studi riguardanti l'impatto del clorpirifos sui microorganismi sono spesso contraddittori. Vischetti et al. (2007) hanno registrato una riduzione significativa della biomassa microbica e dell'attività enzimatica, dovuta ad applicazioni ripetute di CPF e all'accumulo di TCP. Altri autori invece non riportano alcuna diminuzione considerevole della popolazione di batteri, sia nitrificanti che denitrificanti, e funghi (Pandey & Singh, 2004; Shan

et al., 2006; Hindumathy & Gayathri, 2013). Comunque, se gli effetti consequenziali dovuti ad una contaminazione di clorpirifos spesso non si evidenziano a basse concentrazioni, è innegabile la presenza di una folta bibliografia in merito agli effetti negativi relativi a dosaggi più alti rispetto a quelli normalmente impiegati nei trattamenti. Il che desta preoccupazione se messo in relazione alla lunga persistenza dell'insetticida (John & Shaik, 2015).

Il clorpirifos non è un agrofarmaco sistemico, quindi non è in grado di entrare nel flusso linfatico della pianta ed essere trasportato all'interno della stessa e alla dose di impiego non è fitotossico. Nonostante questo, la letteratura è ricca di informazioni riguardanti la tossicità e l'inibizione dei vegetali da parte del CPF. I dati indicano che questo insetticida, e i suoi metaboliti, possono accumularsi in svariate piante terrestri e acquatiche; in relazione alla concentrazione si osservano cambiamenti nella dinamica di germinazione, nei tratti morfologici (lunghezza, peso fresco e peso secco dei germogli e delle radici), nelle funzioni biochimiche e nel metabolismo (Gvozdenac et al., 2013) (Wang et al., 2022).

Molti studi confermano la tossicità del clorpirifos nei confronti degli organismi acquatici. Inibendo l'acetilcolinaesterasi (AChE) e l'aliesterasi (AliE) mostra effetti marcati sullo sviluppo e sul comportamento, impattando il sistema nervoso e quello endocrino della fauna acquatica (Carr et al., 1997).

Nell'uomo, il clorpirifos si è dimostrato antiandrogenico ed estrogenico, induce alterazioni alla tiroide e alle ghiandole surrenali, riducendo la produzione dei rispettivi ormoni. I bambini esposti ad alte concentrazioni di CPF hanno maggiori possibilità di incorrere in ritardi dello sviluppo psicomotorio e mentale, problemi di attenzione e iperattività. Gli effetti si estendono alla sfera riproduttiva, sono stati evidenziati danneggiamenti al DNA dello sperma, una diminuzione della quantità, della concentrazione e della mobilità dello stesso, alterazione della lunghezza e del peso del feto e calo della produzione del latte materno. Gli studi sulla cancerogenicità della molecola/dei suoi sottoprodotti, mostrano un incremento del rischio di contrarre cancro al seno; il rapporto con l'insorgenza di altri tipi di tumori resta ancora da chiarire (Wołejko et al., 2022).

Sulla base di numerosi studi, la Commissione Europea (EC), il 10 gennaio 2020, attraverso il Regolamento di esecuzione (UE) 2020/17 ha negato il rinnovo dell'approvazione come sostanza attiva al Clorpirifos, concedendo fino al 16 aprile 2020 la possibilità di utilizzarlo all'interno degli stati membri (EUROPEA, 2020). Prima che venisse ritirato, era tra gli insetticidi più utilizzato sul territorio europeo. Nonostante la comunità scientifica si sia

espressa in maniera uniforme riguardo alla sua tossicità, sfortunatamente, esso continua ad essere utilizzato in altre parti del mondo (John & Shaik, 2015). Il CPF viene ancora applicato in Brasile e in Messico, oltre che in India, Cina e Bangladesh, seppur in modo limitato (Lara-Moreno et al., 2022).

1.1.3 *Antibiotici*

Gli antibiotici possono essere sostanze organiche sintetizzate naturalmente da alcuni microorganismi, attraverso il loro metabolismo secondario, oppure sostanze prodotte artificialmente, che possono eliminare o inibire lo sviluppo o l'attività metabolica di altri microorganismi. Da oltre 60 anni vengono prodotti industrialmente e impiegati largamente in agricoltura e medicina per contrastare l'insorgenza di infezioni microbiche e come integratori alimentari e stimolatori della crescita (Kuppusamy et al., 2018).

L'ascesa della domanda globale di carne e derivati, dal secondo dopo guerra in poi, ha portato ad un incremento senza precedenti dell'utilizzo degli antibiotici veterinari (AV) senza i quali gli stabilimenti più grandi, dove viene prodotta la maggior parte della carne consumata dall'uomo, non potrebbero funzionare (Okaiyeto et al., 2024).

Il consumo mondiale annuo di antibiotici in agricoltura varia considerevolmente (dalle 63'000 alle 240'000 tonnellate) a causa della scarsa sorveglianza e raccolta di dati in molte nazioni. Più del 50% degli antibiotici, considerati fondamentali nel campo della medicina umana e venduti a livello globale, vengono utilizzati negli allevamenti (O'Neill, 2015). La Food and Drug Administration stima che nel 2012 negli Stati Uniti siano state vendute 14'600 tonnellate di AV, più di quattro volte le 3290 tonnellate di antibiotici consumati dal sistema sanitario nazionale nell'arco dell'anno. Nel 2015, in Cina, il più grande produttore di carne al mondo escludendo gli Stati Uniti, circa la metà delle 210'000 tonnellate di antibiotici prodotti sono stati utilizzati per la produzione animale (Kuppusamy et al., 2018).

La maggior parte degli AV che desta preoccupazione è esclusivamente di origine antropica. Gli AV vengono dispersi nell'ecosistema, in primo luogo, tramite fertilizzazione con letame/urina animale contenete antibiotici, fanghi di depurazione e irrigazione con acque contaminate; inoltre possono verificarsi volatilizzazione e trasporto aereo (Du & Liu, 2012). In funzione della farmacocinetica e degli specifici processi di trasformazione negli animali, spesso le ingenti porzioni degli antibiotici somministrati sono mal assorbite dall'intestino e vengono di conseguenza espulse attraverso feci e urine, sotto forma della molecola madre o

dei suoi metaboliti. La quantità degli AV escreti dipende dal dosaggio, dalla specie e dall'età dell'animale e dal tipo di molecola impiegata (Kuppusamy et al., 2018).

Una volta entrati nel suolo, gli AV sono suscettibili alla degradazione microbica, alla fotodegradazione, all'infiltrazione, al ruscellamento superficiale, all'adsorbimento e alla sequestrazione (Du & Liu, 2012). Il tempo di emivita degli antibiotici nel suolo è fortemente influenzato dalle condizioni ambientali, dalla flora microbica presente e dalla percentuale di sostanza organica. Stando allo studio condotto da Yang et. al. (2018), il DT50 delle sulfonamidi oscilla tra i 18,6 e i 23,3 giorni, mentre quello richiesto per le tetracicline è compreso tra 1 e 2 mesi, e quello per enrofloxacin arriva addirittura a 7-8 mesi.

Dall'inizio del XXI secolo, l'opinione globale è d'accordo sul fatto che la dispersione nell'ambiente degli antibiotici costituisca uno dei rischi maggiori per la salute degli agro-ecosistemi. Infatti, la disseminazione e l'accumulo di queste molecole nell'ambiente può portare a: modifiche della struttura e dell'attività della flora microbica, inibizione dell'attività enzimatica del suolo, aumento e diffusione di batteri resistenti agli antibiotici (ARB) e riduzione della germinazione dei vegetali.

Nonostante le numerose conseguenze negative appena elencate, la preoccupazione pubblica si è maggiormente concentrata sui ARB. La resistenza agli antibiotici, infatti, rappresenta un'insidia enorme per la salute dell'uomo moderno. Solamente negli Stati Uniti, il Centro per il Controllo e la Prevenzione delle Malattie (CDC) stima che ogni anno questi batteri siano responsabili di circa due milioni di casi di infezione e 23'000 decessi; in Europa la situazione non sembra essere migliore, con più di 670'000 infezioni e quasi 33'000 morti (Dadgostar, 2019). Nonostante i numeri appena citati, molti paesi in via di sviluppo devono ancora applicare adeguate strategie per controllare e monitorare la diffusione del fenomeno. (Okaiyeto et al., 2024).

1.1.4 *Idrocarburi Policiclici Aromatici*

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA o PAH dall'inglese) sono degli inquinanti onnipresenti. Possono essere di origine naturale o, molto più comunemente, di origine antropica; diverse attività domestiche e industriali, così come l'agricoltura, contribuiscono alla loro diffusione nell'ambiente. Le cause naturali dell'emissione degli IPA si possono ricondurre a fenomeni come gli incendi, l'erosione di rocce sedimentarie contenenti derivati del petrolio, le eruzioni vulcaniche, la sintesi da parte di alghe e batteri. Sono estremamente idrofobici e tendono ad accumularsi negli strati superficiali del suolo; per questo, 16 di loro vengono

considerati inquinanti prioritari dall'agenzia per la protezione dell'ambiente (EPA), negli USA e in Unione Europea (Ansari et al., 2023).

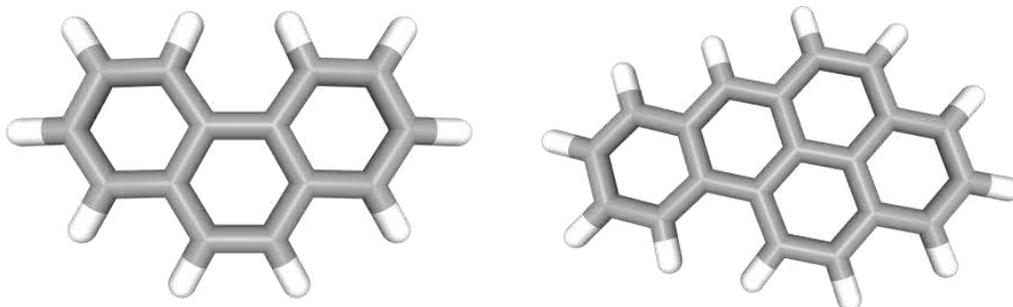


Figura 6: Fenantrene (sx) e benzo(a)pirene (dx) (PubChem, 2024).

Gli IPA sono costituiti da due o più anelli aromatici di benzene fusi in maniera lineare, angolare o a grappolo. Possono essere divisi in due gruppi: a basso peso molecolare (LMW), contenenti meno di quattro anelli, o ad alto peso molecolare (HMW), contenenti quattro anelli o più. All'aumentare del peso molecolare, la tendenza lipofila/idrofobica aumenta e la solubilità diminuisce assieme alla pressione di vapore, rendendo la struttura più recalcitrante. Gli IPA HMW vengono prodotti dalla combustione incompleta di carbone, coke e biomassa e dal traffico intenso, mentre quelli LMW derivano principalmente dal petrolio (Alegbeleye et al., 2017). Sulla base di quanto emerso da numerosi studi, 15 IPA sono stati classificati dall'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro come "probabili cancerogeni" (Ansari et al., 2023).

La distribuzione nel suolo degli IPA è governata da numerose variabili, ambientali e no, quali: le condizioni climatiche, la percentuale di sostanza organica, la densità abitativa e lo sviluppo economico (Ansari et al., 2023).

1.2 *Principali tecniche di decontaminazione*

Per far fronte alla perdita di qualità dei suoli agricoli e naturali è necessario sviluppare delle tecniche innovative capaci di decontaminare in modo efficace, sostenibile ed economico.

La decontaminazione ha lo scopo di portare la concentrazione attiva dell'inquinante al di sotto di una soglia oltre la quale esso non costituisce più un pericolo. In base al luogo dove viene effettuata possono essere distinti metodi ex-situ, in cui il suolo contaminato viene rimosso e trasferito in un altro luogo per essere trattato, on-situ, quando la bonifica viene effettuata in loco previa escavazione del terreno, ed in-situ, dove la decontaminazione non prevede l'asportazione del suolo e si esegue sul posto. La scelta della tecnica di bonifica è influenzata da tipo di contaminazione, che può essere: puntiforme, quando riguarda una superficie ridotta di terreno estremamente contaminata, o diffusa, quando l'inquinante si disperde all'interno dell'agro-ecosistema. In passato la strategia ad essere principalmente utilizzata era quella ex-situ in ragione dell'elevata efficacia, tuttavia, visto gli ingenti costi e le conseguenze ambientali, oggi è passata in secondo piano rispetto alle tecniche in-situ, più sostenibili sul piano economico ed ambientale (Sun et al., 2018).

I suoli possono essere decontaminati utilizzando metodi fisici, chimici e biologici. Le tecniche annoverate all'interno del gruppo metodi fisici e chimici sono utilizzabili efficacemente per la bonifica dei suoli agricoli, tuttavia, vengono utilizzate preferenzialmente in aree interessate dall'inquinamento industriale, raramente sono utilizzate al di fuori di questo contesto per via delle attrezzature necessarie, dei costi e dell'impatto sulla fertilità del suolo. Al contrario, i metodi biologici, come il biorimediazione (*bioremediation*), il fitorimediazione (*phytoremediation*), il vermiremediazione (*vermiremediation*) e altri ancora, in ragione del basso costo e delle scarse attrezzature necessarie, offrono una valida alternativa per il risanamento dei suoli agricoli (Sun et al., 2018).

1.2.1 *Metodi abiotici*

I metodi abiotici, siano essi chimici o fisici o, come spesso accade, fisico-chimici, sfruttano le proprietà fisico-chimiche dell'inquinante per eliminarlo, estrarlo o immobilizzarlo per ridurre la contaminazione (Aparicio et al., 2022).

- Ossidazione chimica (*chemical oxidation*)

Una delle tecniche più valide, utilizzate per prevenire la migrazione dell'inquinante, è l'ossidazione. Generalmente viene eseguita in situ, utilizzando permanganato (MnO_4), perossido di idrogeno (H_2O_2), perossidisolato (S_2O_8)²⁻ e ozono (O_3). Le molecole ossidanti sono iniettate tramite una pompa a diverse profondità nell'area contaminata, per poi diffondersi e reagire con gli inquinanti intercettati. Questa tecnica viene spesso utilizzata per il trattamento di solventi, pesticidi e carburanti (Aparicio et al., 2022). Diverse sono le difficoltà che si incontrano applicando questa strategia, ad esempio: eterogeneità della superficie, solubilità limitata, e progressivo rallentamento della degradazione dell'inquinante, dovuto alla diminuzione della concentrazione di quest'ultimo, con relativo calo di efficienza. Inoltre, sono molte le variabili ambientali che condizionano lo svolgersi delle reazioni (Siegrist et al., 2011).

- Riduzione chimica (*chemical reduction*)

La riduzione chimica in situ fa ricorso a degli agenti riducenti capaci di donare velocemente i propri elettroni alle molecole inquinanti. Di solito vengono utilizzati metalli, specie dello zolfo allo stato ridotto e sostanze debolmente donatrici di elettroni (es. sostanza organica). In terreni risultano efficienti strategie quali recircolo e/o iniezione-estrazione; al contrario, quando la matrice è scarsamente permeabile ed estremamente compatta, può risultare necessario ricorrere alla fratturazione idraulica o pneumatica. Nel sito di applicazione dovrebbe essere mantenuto un ambiente riducente anche dopo l'applicazione dei prodotti utilizzati, in modo che la degradazione degli inquinanti possa proseguire fino al loro esaurimento.

La riduzione chimica in situ presenta diverse limitazioni e sono ancora necessarie numerose ricerche prima che questa tecnologia possa essere ampiamente applicata (Kueper et al., 2014).

- Lavaggio del suolo (*soil washing*)

Il lavaggio del suolo ex situ è un trattamento permanente che consente di separare contaminanti organici e inorganici dal suolo utilizzando una soluzione estraente. Il suolo viene prelevato dal sito contaminato, suddiviso in funzione della dimensione

delle particelle e miscelato con la soluzione estraente, composta generalmente da acqua, tensioattivi e acidi. Vengono effettuati diversi cicli di lavaggio, sostituendo il liquido esausto, finché la concentrazione degli inquinanti nel suolo non scende al di sotto della soglia prestabilita. La soluzione porta ad una solubilizzazione del contaminante tramite reazioni acido-base e/o di ossido-riduzione (Dermont et al., 2008).

Questa tecnica è una delle poche alternative efficaci e permanenti per la rimozione di PTE come As, Cd, Cr, Cu, Ni e Pb. Tra i principali vantaggi del trattamento vi sono il controllo delle condizioni ambientali, il largo spettro di azione, un buon rapporto costo/efficacia e la possibilità di bonificare grandi volumi di suolo. Comunque, l'efficacia varia in funzione della soluzione estrattiva utilizzata e dell'inquinante da rimuovere e inoltre l'ecosistema può risultarne gravemente danneggiato dall'escavazione del suolo (Dermont et al., 2008).

- Stabilizzazione/solidificazione (*stabilization/solidification*)

La stabilizzazione/solidificazione (S/S) consiste nell'introdurre nel suolo dei collanti in grado di formare una struttura integra e compatta, all'interno del quale l'inquinante risulta immobilizzato. Gli agenti solidificanti tradizionalmente impiegati sono: il cemento, l'alite, la calce, il bitume e l'asfalto. La S/S può essere applicata in-situ, attraverso l'iniezione dei collanti direttamente nel suolo, oppure ex-situ, asportando e trattando il suolo altrove. L'applicazione di questo metodo è associata ad una notevole emissione di anidride carbonica, oltre a problemi dovuti alla limitata compatibilità tra cementi e suolo e alla loro scarsa capacità di trattenere i metallodi. Per questo motivo, diversi studiosi stanno valutando la possibilità di utilizzare altri materiali solidificanti, come le ceneri, i fumi di silice e minerali argillosi ad alta capacità assorbente come zeolite, montmorillonite e bentonite (Casucci et al., 2020), i quali hanno efficienza inferiore ma consumo di energia, costi e impatto ambientale minori (Tajudin et al., 2016).

- Estrazione attraverso il vapore (*soil vapor extraction*)

L'estrazione attraverso il vapore, l'insufflazione di aria o l'estrazione sottovuoto, viene eseguita in terreni contaminati da molecole a basso peso molecolare e composti ad alta pressione di vapore, nel tentativo di separarli dalle particelle alle

quali sono legati per consentire la dispersione allo stato gassoso. Questa tecnica può essere eseguita su grandi superfici con un disturbo minimo dell'ambiente. Tuttavia, i costi sono molto elevati, ed è applicabile solo in suoli molto permeabili e con agenti inquinanti volatili (Khan et al., 2004).

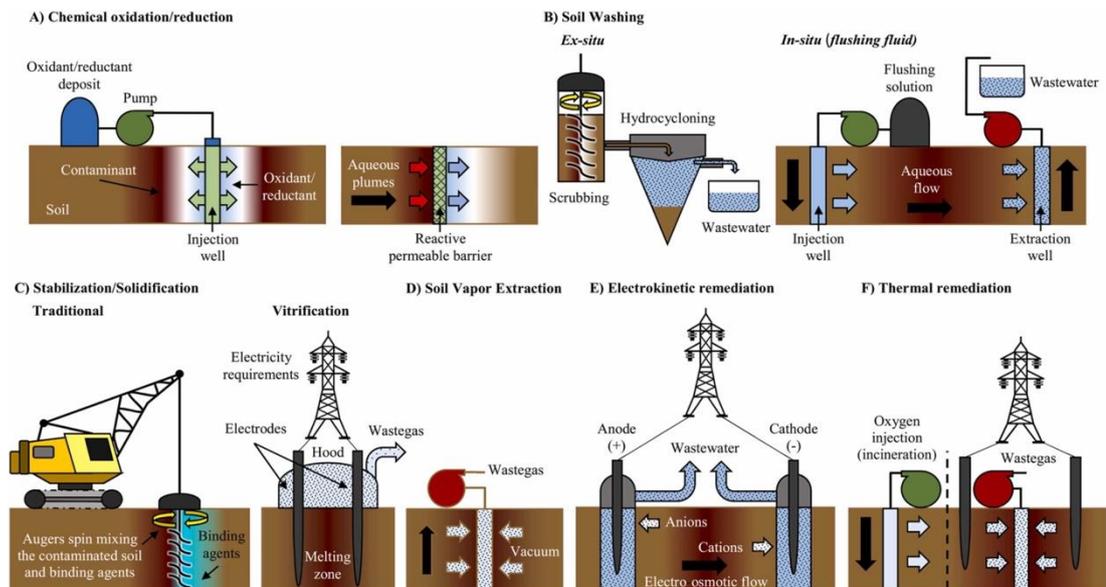


Figura 7: Metodi di risanamento abiotici (Aparicio et al., 2022).

1.2.2 Metodi biologici

I metodi di risanamento biologici, o biorisanamento (*bioremediation*), comprendono vari processi naturali dove le piante (fitorimediazione), la fauna (vermimirimediazione), e i microrganismi (bioaumentazione) del suolo vengono impiegati per mitigare gli effetti e ridurre la contaminazione del suolo (Sales da Silva et al., 2020). In generale, l'uso congiunto di metodi diversi di risanamento rappresenta la strada da seguire quando la concentrazione dei contaminanti è elevata (Tagliabue et al., 2023).

Il fitorimediazione è una delle tecniche maggiormente utilizzate tra quelle disponibili per il biorisanamento, si avvale delle piante e dei microrganismi associati per estrarre e rimuovere gli inquinanti dal terreno o ridurne la biodisponibilità; è particolarmente efficace nel caso dei PTEs, ma viene anche adoperata per altri xenobiotici (Vischetti et al., 2022).

Il bioaumentazione, si serve di alcuni ceppi di batteri e/o funghi, o di un loro consorzio, che hanno dimostrato di poter degradare l'agente contaminante presente nel suolo da bonificare. I microrganismi adoperabili con questo metodo devono avere delle caratteristiche specifiche,

come l'accrescimento rapido, il facile mantenimento in laboratorio e un'elevata capacità di adattarsi e resistere a delle elevate concentrazioni di inquinanti (Nwankwegu et al., 2022).

Il vermiremedio è stato definito per primo da Rodriguez- Campos et al., (2014) fa ricorso ai lombrichi, alle loro interazioni biotiche e abiotiche, al ciclo di vita, allo scavare e nutrirsi di questi organismi per degradare o rimuovere l'agente contaminante dal suolo in questione (Tagliabue et al., 2023).

1.2.2.1 Fitorimediazione (*phytoremediation*)

Il fitorimediazione consiste nell'utilizzo delle piante, e dei microorganismi associati, per rimuovere, stabilizzare o rendere innocui gli inquinanti. La simbiosi mutualistica instaurata tra piante e microbi può aumentare vertiginosamente l'efficacia del fitorimediazione mediante l'incremento della crescita e dello sviluppo del vegetale e modificando la disponibilità della molecola da eliminare. Questa tecnica risulta essere particolarmente adatta per la bonifica dei PTEs, ma viene anche utilizzata per gli xenobiotici di natura organica (Tripathi et al., 2020; De Bernardi et al., 2020; Chen et al., 2022).

Le piante, e gli organismi che popolano la rizosfera, possono essere utilizzati per il fitorimediazione in diversi modi. In funzione delle caratteristiche ambientali, della natura e della concentrazione dell'inquinante, e del meccanismo del vegetale sfruttato, i fenomeni che raggruppiamo all'interno del fitorimediazione sono: fito-estrazione, fito-stabilizzazione, fito-volatilizzazione e fito-degradazione (Thijs et al., 2017).

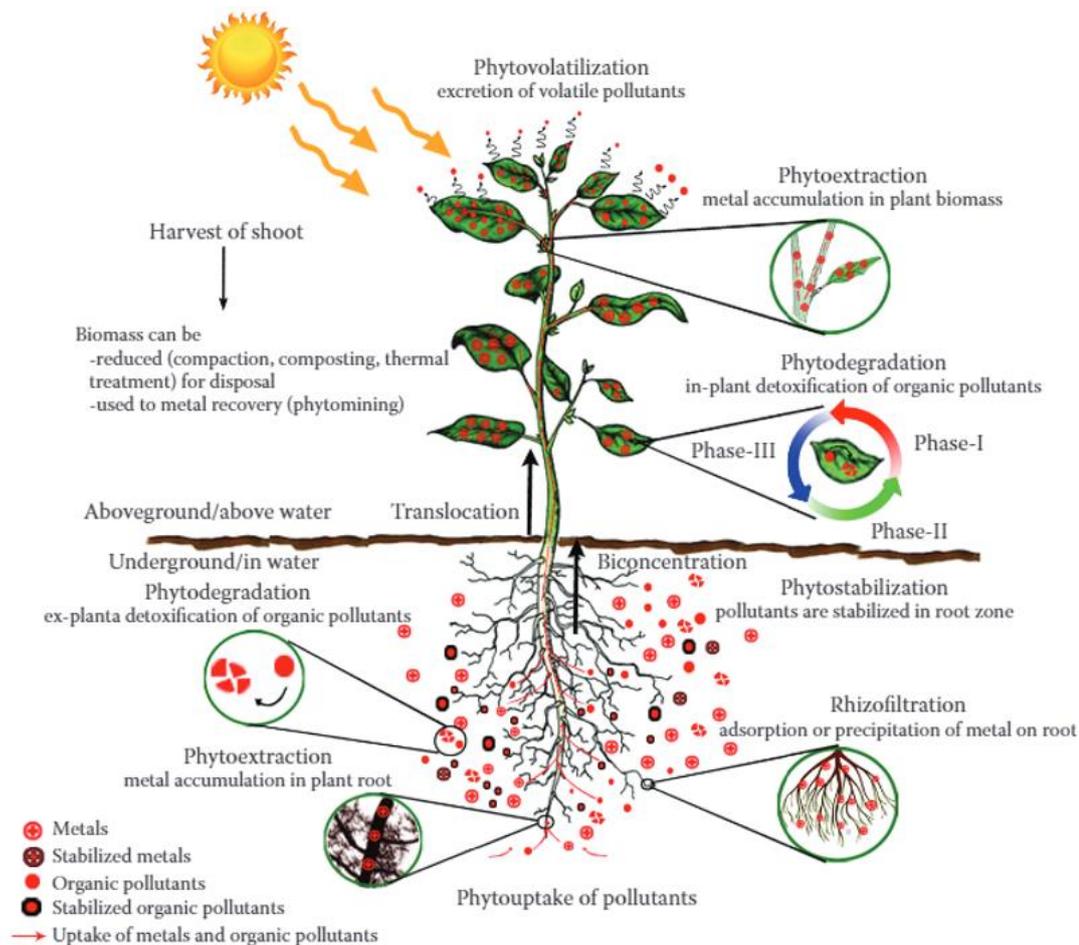


Figura 8: Fitorimediao (Chandra et al., 2017).

Nella fito-estrazione le piante assorbono i contaminanti dal suolo e li accumulano nella biomassa epigea; due sono le tipologie di vegetali che hanno mostrato di essere le più indicate per questa strategia: le specie iperaccumulatrici, le quali producono poca biomassa ma possiedono una formidabile capacità di accumulare inquinanti all'interno dei propri tessuti, e le specie che generano moltissima biomassa pur non essendo così affini agli xenobiotici in questione. I contaminanti così immagazzinati nella parte aerea, possono essere rimossi semplicemente asportando la pianta, o parte di essa, e in seguito smaltiti. Ad esempio, la brassicacea *Noccaea caerulea*, molto valida nell'accumulare metalli pesanti, è in grado di stoccare fino a $100 \mu\text{g Cd g}^{-1}$, $1000 \mu\text{g Ni g}^{-1}$ e $10000 \mu\text{g Zn g}^{-1}$ all'interno dei propri germogli (Jacobs et al., 2018). Ancora, Romeh & Hendawi (2013), hanno dimostrato come *Plantago major* riesca ad assorbire discrete dosi di clorpirifos attraverso l'apparato radicale, contribuendo in maniera significativa alla diminuzione della sua concentrazione nell'ambiente.

Per la fito-estrazione sono indicate anche delle specie di interesse agronomico, come quelle appartenenti al genere Brassica, che dopo aver decontaminato il suolo possono essere valorizzate economicamente tramite la produzione di biodisel (Aparicio et al., 2022).

La fito-stabilizzazione utilizza delle piante per realizzare una copertura vegetale in grado di stabilizzare e/o ridurre la disponibilità dell'agente contaminante nel suolo; spesso viene abbinata all'utilizzo di ammendanti, i quali sostengono lo sviluppo della pianta e aiutano a ridurre la fitotossicità dell'inquinante. Questa tecnica è molto utile per il trattamento di PTEs come Pb, Cd, Cu, Cr, As e Zn. I processi che riducono la mobilità di questi metalli sono: (i) l'assorbimento e il sequestro da parte delle radici, (ii) l'alterazione delle proprietà del suolo come il pH, il contenuto di sostanza organica o il potenziale redox, (iii) la secrezione di essudati radicali. Questo metodo risulta estremamente utile quando la concentrazione dell'inquinante è così elevata da non poter eseguire la fito-estrazione (Park et al., 2012).

La fito-volatilizzazione sfrutta la capacità delle piante di trasformare gli agenti contaminati in composti volatili. È utilizzata solitamente per xenobiotici organici e metalli relativamente volatili come mercurio (Hg) e selenio (Se). Gli inquinanti, una volta assorbiti, possono essere volatilizzati attraverso gli stomi presenti sulla superficie fogliare dei germogli o direttamente nel suolo grazie al metabolismo radicale (Van Oosten & Maggio, 2015).

La fito-degradazione utilizza le piante e la flora microbica associata per degradare agenti contaminati di natura organica direttamente attraverso enzimi ed estratti prodotti dalle radici, dai microorganismi o dall'attività metabolica all'interno dei tessuti del vegetale. È una tecnica molto valida per risanare siti contaminati da agrofarmaci, IPA, solventi clorurati benzene, etilbenzene e xylene. Gli xenobiotici vengono convertiti in metaboliti più semplici, spesso sfruttati dalla pianta per accrescere il suo sviluppo, mediante enzimi come le dealogenasi, le perossidasi e le nitrilasi (Wang & Delavar, 2023).

Quando la degradazione ha luogo nella rizosfera risultano più appropriati termini come fito-stimolazione o rizo-degradazione. Gli essudati radicali si fanno promotori della crescita microbica nell'area circostante, influenzando la composizione e l'attività della flora; essi possono indurre, nei microorganismi, l'espressione di geni che codificano per enzimi coinvolti nei processi di degradazione, oltre a veicolare quelli prodotti dalla pianta. L'attività metabolica dei microbi che popolano la rizosfera incrementa la concentrazione di idrogeno, acidi organici, composti dell'indolo, e siderofori benefici per solubilizzazione degli elementi nutritivi e la

tolleranza degli xenobiotici, portando ad un aumento nella produzione di biomassa (Glick, 2010).

Alcuni microorganismi sono in grado di coadiuvare e migliorare il fitorimedio, tra questi troviamo: batteri capaci di rendere i vegetali più resistenti agli xenobiotici, batteri che assistono nell'attività di degradazione e batteri promotori della crescita della pianta (PGPB). I PGPB migliorano la nutrizione della pianta amplificando la biodisponibilità degli elementi nutritivi come l'azoto, il fosforo e il ferro; ciò si traduce direttamente in un'influenza positiva sullo sviluppo del vegetale e di conseguenza sull'efficacia del fitorimedio (Kidd et al., 2015).

La selezione delle specie vegetali utilizzate è cruciale per il successo del fitorimedio; tuttavia, passare dalle condizioni di laboratorio a quelle di campo richiede l'implementazione e lo studio delle pratiche agronomiche più efficaci. Tra i modelli applicativi, la ceduzione a ciclo breve riscuote molto successo; consiste nella coltivazione ad alta densità di specie di pioppi e salici a rapido accrescimento, che possono essere tagliati ogni 2-5 anni per produrre biomassa. In aggiunta al ripristino della struttura e della fertilità del suolo, associato alle influenze positive sull'ambiente e altri servizi ecosistemici, questo metodo consente anche di produrre diverse fonti di biomassa rinnovabile da valorizzare eventualmente all'interno del mercato (Chalot et al., 2020).

1.2.2.1.1 Plantago major

Stando alla classificazione delle forme biologiche di Raunkiær, *Plantago major* (PM) appartiene al gruppo delle Emicriptofite, ovvero presenta le gemme svernanti a livello del suolo. Le foglie sono esclusivamente basali e si dispongono a formare una rosetta sulla superficie del terreno, hanno forma ellittica o ovale e sono glabre o raramente scarsamente pubescenti, le nervature si incontrano all'apice e al picciolo. Il frutto, di 2-4,5 x 1,5-2,8 mm, è un pissidio a deiscenza trasversale, al cui interno sono contenuti molti semi di piccole dimensioni, poliedrici o emielissoidi, bruni e a superficie piana. PM è una pianta perenne ampiamente diffusa in tutto il continente euroasiatico e generalmente viene considerata come infestante; nonostante questo, può anche essere utilizzata a scopo officinale o alimentare (ActaPlantarum, 2024).

P. major, essendo una specie erbacea rustica, in grado di crescere rapidamente in un elevato ventaglio di ambienti diversi, per questo viene spesso studiata nell'ambito del fitorimedio.

Aioub et al (2021), hanno indagato il suo possibile utilizzo in campi contaminati da cipermetrina, uno dei piretroidi più diffusi per la lotta ad una vasta gamma di insetti; PM, grazie all'apparato radicale espanso e ai numerosi polifenoli a disposizione, è stata in grado di assorbire il pesticida più velocemente rispetto al pomodoro. Inoltre, gli autori hanno notato come sia possibile coltivare in consociazione pomodoro e PM, abbattendo il tempo di emivita (12,7 giorni nel suolo, 6,81 giorni con suolo + PM + pomodoro) della cipermetrina e proteggendo il pomodoro da questo xenobiotico (Kumar & Trivedi, 2018).

Un altro studio riporta come le radici di PM, insieme a quelle di *Phaseolus vulgaris*, possono essere sfruttate per bonificare dell'acqua contaminata dal piombo (Ali & Al-Homaidan, 2007). Anche Romeh et al (2016) hanno dimostrato come le radici di PM siano capaci di accumulare, rispettivamente, 50.53 mg/kg e 77.12 mg/kg di Pb, dopo 10 e 20 giorni; nel corso dell'esperimento le radici hanno immagazzinato una quantità di Pb maggiore rispetto alle foglie.

Continuando, gli studi condotti hanno dimostrato che PM è in grado di assorbire o metabolizzare diversi composti organici, inclusi imidacloprid (Romeh, 2009), clorpirifos (Romeh & Hendawi, 2013), ftalato dietile (Romeh, 2013), azoxystrobin (Romeh, 2015) e cianofos (Romeh, 2014).

1.2.2.2 Vermirimediazione (*vermiremediation*)

Numerosi organismi del suolo, come i lombrichi, gli enchytraidi e gli acari, possono svolgere un ruolo importante nel processo di biorimediazione, utilizzando gli inquinanti organici all'interno del loro metabolismo. I lombrichi sono essenziali per l'ecosistema terrestre perché svolgono un ruolo fondamentale nel suolo e per questo sono considerati dei veri e propri ingegneri ecosistemici. Essi sono ampiamente conosciuti per l'effetto positivo che esercitano sui processi chimici, fisici e biologici che hanno luogo nelle loro immediate vicinanze. I lombrichi contribuiscono alla formazione del suolo stesso, alla decomposizione della materia organica e alla formazione di humus; per quanto concerne la produzione agricola, sono importanti promotori della fertilità del suolo e della produttività delle piante, portando a un miglioramento generale della struttura del suolo. I lombrichi si trovano ampiamente in una vasta gamma di tipi di suolo e possono rappresentare circa il 60-80% della biomassa totale. In generale, sia la densità che la struttura della comunità di lombrichi riflettono il livello di contaminazione del suolo agricolo (Phillips et al., 2019; Phillips et al., 2021).

I lombrichi, muovendosi nel suolo, formano un intricato groviglio di tunnel che crea delle vie preferenziali per il movimento dell'aria, dell'acqua e degli elementi nutritivi. Scavando, i lombrichi ingeriscono, digeriscono, ed espellono gli aggregati del suolo, li amminutano, rilasciano sostanza organica e agevolano la dispersione microbica. I due millimetri di suolo che circondano le gallerie scavate dai lombrichi vengono chiamati drilosfera. Questa zona perimetrale è sostanzialmente diversa rispetto al resto del suolo e viene spesso considerata come un vero e proprio "hotspot" microbico. Un elevato numero di microorganismi, la loro diversità e l'attività in loro possesso sono influenzati notevolmente dal microbiota intestinale dei lombrichi (Vuković et al., 2021).

I lombrichi possono essere adoperati per la produzione di vermicompost, questo è definito da Gómez-Brandón & Domínguez et al (2014) come il risultato dell'insieme dei processi ossidativi svolti dai lombrichi e dai microorganismi decompositori (batteri, funghi, attinomiceti) che agiscono sinergicamente per trasformare degli scarti di natura organica in un ammendante in grado di migliorare la fertilità fisica, chimica e biologica del suolo. Un ampio assortimento di rifiuti, di origine vegetale, animale e antropica, può essere in questo modo convertito in qualcosa di estremamente utile (Vijay et al., 2022).

Nonostante compost e vermicompost presentino delle similitudini, ci sono delle differenze significative che li contraddistinguono. Infatti, rispetto al normale processo di compostaggio, il vermicompostaggio manca di una fase termofila capace di ridurre gli organismi patogeni, necessita di un maggiore livello di umidità, e mostra degli effetti positivi maggiori sulla fertilità del suolo e sullo sviluppo delle piante (Vuković et al., 2021).

Considerato il loro ruolo fondamentale nell'ecosistema terrestre, i lombrichi sono spesso utilizzati come bioindicatori negli studi ecotossicologici, in quanto sono esposti direttamente ai contaminanti presenti nel terreno grazie alla loro cuticola permeabile e alla diretta ingestione di suolo. Gli xenobiotici possono avere effetti negativi sui lombrichi in termini di riproduzione, tasso di crescita, bioaccumulo e danni al DNA e infine mortalità.

Nel campo della decontaminazione del suolo, alcuni studi risalgono agli anni 80' del secolo scorso. Tuttavia, l'espansione della ricerca in merito e l'adozione del termine vermirimedio sono avvenuti esclusivamente negli ultimi 10-15 anni (Shi et al., 2020).

Il vermirimedio è stato recentemente definito da Shi et. al. (2020) come una tecnica di biorisanamento che impiega i lombrichi e i loro prodotti (vermicompost) per accumulare,

estrarre, trasformare o degradare i contaminati del suolo. La *vermiremediation* sfrutta le interazioni biotiche e abiotiche, il ciclo di vita, il comportamento di scavo e di alimentazione dei lombrichi. Stando a questa definizione, i seguenti termini possono essere utilizzati per descrivere i processi e i meccanismi coinvolti nel vermimirimedio: vermi-estrazione, vermi-accumulo, vermi-trasformazione e vermi-degradazione.

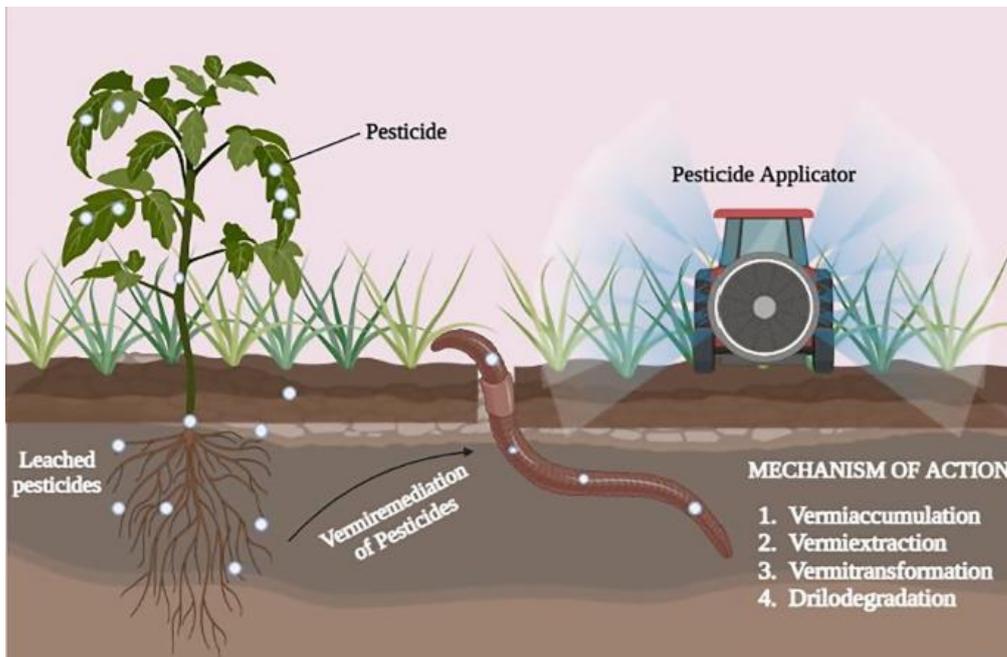


Figura 9: Vermimirimedio (Sarma & Joshi, 2023).

Le specie di lombrichi più comunemente impiegate per il vermimirimedio sono: *Perionyx excavatus*, *Eisenia fetida*, *E. andrei*, *E. tetrahedra*, *Pheretima hawayana*, *Lumbricus rubellus*, *L. terrestris*, *Allolobophora caliginosa*, e *Pontoscolex corethruru* (Usmani et al., 2020).

Vermiestrazione e vermiaccumulo fanno riferimento al processo attraverso il quale i lombrichi assorbono e stoccano i contaminati all'interno del loro corpo, riducendone la concentrazione nel suolo. I lombrichi introducono gli inquinanti nel loro organismo in modo passivo, attraverso l'assorbimento a livello epidermico, e in modo attivo, con l'alimentazione, dopodiché questi vengono accumulati nei tessuti con un alto contenuto di lipidi. Quando la degradabilità dell'agente contaminante è bassa, come per il benzo(a)pirene, i lombrichi spesso riescono a rimuoverne solo una piccola parte. Comunque, questi piccoli animali sono capaci di tollerare e accumulare alte dosi di PTEs, come Cd, Hg, Pb, Mn, Ca, Fe e Zn, nei propri tessuti, alcune volte senza effetti sulla loro fisiologia, specialmente quando questi elementi si trovano

in uno stato non biodisponibile. Gli xenobiotici vengono spesso accumulati nei muscoli, nel ganglio cerebrale, nelle vescicole seminali e nei cloragociti (Usmani & Kumar, 2015).

Detto ciò, il vermiaccumulo non è stato ancora studiato a fondo, inoltre dovrebbero essere condotte ricerche per valutare se i contaminanti possano essere trasferiti al livello trofico successivo (Rodriguez-Campos et al., 2014).

La vermitrasformazione e la vermidegradazione sono i processi attraverso i quali gli inquinati organici vengono degradati all'interno dei lombrichi grazie a enzimi, come il citocromo P450 e la perossidasi, e dalla flora microbica intestinale. Alcune specie di lombrichi (principalmente *E. fetida*) possiedono l'abilità di metabolizzare alcuni xenobiotici come il 2, 4, 6-trinitrotoluene, IPA e agrofarmaci (Shi et al., 2020).

I lombrichi, incrementando il contatto tra gli agenti contaminanti e la flora microbica del suolo, aumentano la velocità con la quale questi vengono degradati. Tanto maggiore è la concentrazione dell'inquinante, tanto minore sarà l'impatto dei lombrichi nella sua degradazione (Aparicio et al., 2022).

Il vermirimedio rappresenta una strategia perseguibile specialmente quando la concentrazione degli inquinanti è sufficientemente limitata da permettere la sopravvivenza e la proliferazione dei lombrichi, indipendentemente dalla specie e dal tipo di contaminante. La capacità dei vermi di rendere gli xenobiotici più biodisponibili è rilevante nella buona riuscita del risanamento del suolo, soprattutto quando vengono poi applicate altre tecniche di decontaminazione.

Nonostante, il vermirimedio rappresenti un'opzione esteticamente gradevole e sostenibile, con un minimo disturbo ambientale, presenta diverse limitazioni; essa non può essere applicata in presenza di elevate dosi di contaminazione, inoltre la sua efficacia è fortemente influenzata dalle condizioni climatiche e dalla specie di lombrico utilizzata (Tagliabue et al., 2023).

1.2.2.2.1 Eisenia Fetida

Eisenia fetida è una delle specie di lombrichi più abbondanti sul pianeta e svolge un ruolo chiave nel mantenere le funzioni ecologiche del suolo. Grazie al breve ciclo vitale, all'alto tasso di riproduzione, alla facilità con la quale viene allevata e all'alta sensibilità agli agenti chimici, viene utilizzata con successo come organismo modello in studi riguardanti l'effetto di sostanze potenzialmente tossiche sull'ambiente (Wang et al., 2015).

Appartiene al Phylum degli Anellida, Classe Clitellata, Sottoclasse Oligochaeta, Ordine Haplotaxida, Famiglia delle Lumbricidae. L'aspetto striato a bande larghe alternate di colore rosso-marrone scuro o bande più strette tendenti al rosa ne agevolano il riconoscimento. È composto da un numero di segmenti compresi tra gli 80 e i 110, in media raggiunge 2-6 mm di larghezza e dai 23 ai 130 mm di lunghezza. Normalmente sono necessari dai 40 ai 60 giorni per passare dalla fase giovanile a quella adulta. Gli individui sessualmente maturi presentano un clitello costituito da 7-9 segmenti che appaio in rilievo e di colorazione leggermente diversa rispetto al resto del corpo; dopo la formazione del clitello sono capaci di deporre le caratteristiche uova chiamate cocoon (Gunya & Masika, 2022).

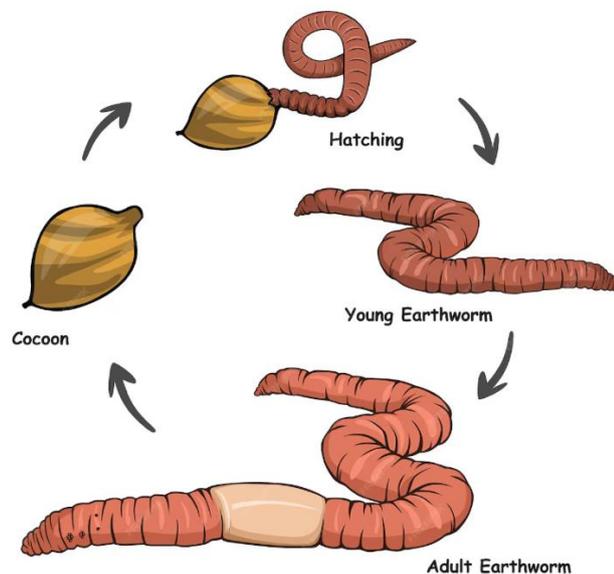


Figura 10: Ciclo di vita dei lombrichi.

La cavità celomatica separa l'intestino dall'endoderma. Diverse sono le funzioni svolte dal celoma, oltre al semplice supporto idrostatico, necessario per la locomozione, è essenziale per la salute del verme. Infatti, nell'atto di nutrirsi e nello scavare, il suolo ingerito, e gli elementi abiotici o biotici potenzialmente presenti in esso, viene direttamente a contatto con il celoma dove incontra i celomociti, ovvero delle cellule immunitarie indispensabili per la gestione di questi ultimi. Tre, sono le subpopolazioni di leucociti celomici distinti: piccoli celomociti, grandi celomociti e cloragociti, questi ultimi direttamente coinvolti nell'attività killer, nella fagocitosi e nella produzione di sostanze litiche.

Attualmente, un importante indicatore biochimico a livello subcellulare è rappresentato proprio dai celomociti e dai danni al DNA in esso riscontrati; è un sistema affidabile, sensibile e dose-correlato (Wang et al., 2021).

E. fetida è un lombrico epigeico, occupa cioè lo strato superficiale del suolo (0-2,5 cm), nonostante questo, ogni giorno riesce ad ingerire circa la metà del proprio peso corporeo in lettiera vegetale trasformandola in nutrienti disponibili per le piante. Per questo è ampiamente utilizzato per il vermi-compostaggio di svariati scarti e rifiuti alimentari, che in questo modo trovano una vita nuova. Modificando poi la struttura del suolo, muovendosi e nutrendosi attraverso esso, e la flora microbica dello stesso, specialmente nella drilosfera, molti ricercatori ne stanno studiando la capacità di decontaminare i suoli, processo che prende il nome di vermiremediation (Xu et al., 2021; Berrè et al., 2020).

1.2.2.3 Biostimolazione (*biostimulation*)

La biostimolazione è una tecnica che si avvale della stimolazione della flora microbica del suolo per la bonifica di aree contaminate. Nutrienti organici e inorganici, micronutrienti, donatori di elettroni (acetato, piruvato, lattato), o accettori (fosforo, azoto, ossigeno, carbonio) vengono introdotti nel suolo per incrementare l'attività dei microorganismi decontaminanti indigeni. Anche gli ammendanti organici, come il biochar, i residui vegetali, compost e vermicompost vengono spesso impiegati per aumentare l'attività dei microbi (Dzionek et al., 2016).

Se il sito in questione è contaminato da tempo, e si assiste progressivamente ad una lenta riduzione dello xenobiotico presente, è probabile che i microorganismi presenti possiedano la capacità di degradazione e che il lento decorso sia imputabile ad un'alimentazione sub-ottimale di questi ultimi (Romantschuk et al., 2023).

La ristorazione del suolo per mezzo della biostimolazione è fortemente influenzata da diversi parametri ambientali, quali il pH, l'umidità e la temperatura.

I contaminati che più si prestano ad essere degradati in questo modo sono gli idrocarburi derivanti dal petrolio, i solfati, poliestere e poliuretano.

Uno dei vantaggi più grandi vantaggi offerti dalla biostimolazione consiste nel fatto che sfruttando la flora microbica indigena, questa, è già adattata e ben distribuita nel suolo. È una tecnica economica a sostenibile che può essere impiegata ovunque, gli apporti ponderati di stimolanti fanno sì che l'ecosistema venga disturbato in maniera minima.

Nonostante i vantaggi sopraelencati, la biostimolazione può essere adoperata solo per inquinanti degradabili attraverso i processi biologici, è enormemente influenzata dai fattori

ambientali richiede una conoscenza microbiologica sito-specifica accurata, i campi di applicazione risultano quindi limitati (Goswami et al., 2018).

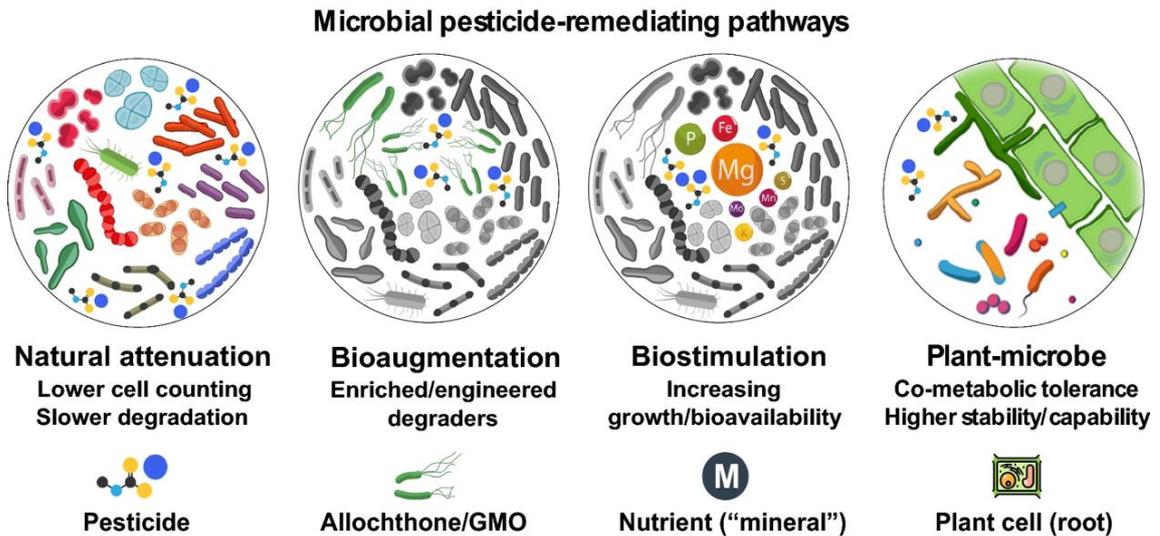


Figura 11: Differenti tecniche di biorimediazione (Lopes et al., 2022)

1.2.2.4 Bioaumentazione (*bioaugmentation*)

Il bioaumentazione consiste nell'introdurre specifiche e pre-selezionate miscele di microrganismi per incentivare e accelerare la bonifica di siti contaminati; esso si avvale di diverse tecniche, quali: l'aggiunta di ceppi batterici pre-adattati; l'inoculo di consorzi microbici pre-adattati; l'introduzione di batteri geneticamente modificati; e l'aggiunzione di vettori, contenenti geni rilevanti per la degradazione, capaci di trasferirli per coniugazione ai microrganismi indigeni. Le prime due tecniche elencate sono quelle maggiormente impiegate (Tyagi et al., 2011).

Gli studi di fattibilità sono un prerequisito fondamentale per applicare il bioaumentazione. Vanno indagate a fondo le proprietà metaboliche della flora indigena prima di considerare l'introduzione di organismi estranei nel sito da risanare. Risulta spesso più efficace utilizzare un consorzio microbico, anziché una coltura pura, visto la maggiore diversità e capacità di adattamento alle condizioni di campo (Aparicio et al., 2022; Romantschuk et al., 2023).

La biomassa impiegata per l'inoculo viene generalmente prodotta all'interno di bioreattori in condizioni controllate, cosa che può rendere difficile il successivo adattamento dei microrganismi in campo; infatti, essi vanno incontro a fluttuazioni, anche estreme, di

temperatura, disponibilità idrica, pH e disponibilità di nutrienti. Inoltre, capita che il consorzio inoculato entri in competizione con la microflora indigena o preferisca altri substrati rispetto all'inquinante obiettivo. Al contrario, se il consorzio applicato si dovesse dimostrare troppo competitivo, potrebbe soppiantare la popolazione microbica autoctona con serie ripercussioni sui cicli biochimici caratterizzanti l'ecosistema in questione (Tyagi et al., 2011).

Quando la biostimolazione non risulta applicabile, poiché la flora indigena non possiede le capacità necessarie per degradare l'agente inquinante o quest'ultimo ha provocato una drastica riduzione della stessa, il bioaumento rappresenta un valido metodo per il biorisanamento del suolo (Romantschuk et al., 2023).

Capitolo 2

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è stato quello di valutare l'effetto di differenti tecniche di biorisanamento, quali fitorimediazione, lombrichi e vermicompost, sulla degradazione del clorpirifos e sulla fertilità biologica del suolo.

Il disegno sperimentale è stato testato a due differenti concentrazioni di clorpirifos (25 e 50 ppm) e su suolo incontaminato, utilizzato come controllo. Per determinare l'efficacia dei trattamenti, le tecniche selezionate sono state testate sia singolarmente sia in combinazione. In particolare, sono state indagate le seguenti tesi: suolo (S), suolo + piante (P), suolo + lombrichi (E), suolo + vermicompost (V), suolo + piante + lombrichi (PE), suolo + piante + vermicompost (PV).

Sono stati determinati i residui del clorpirifos nel suolo per un periodo di 120 giorni, a differenti concentrazioni e con l'applicazione delle differenti tecniche, ed i parametri del suolo legati alla crescita e all'attività della biomassa microbica, quali carbonio della biomassa microbica ed alcune attività enzimatiche tipiche dell'attività microbica, quali FDA-idrolisi, fosfatasi alcalina, betaglucosidasi e betaglucosaminidasi.

I microorganismi, e l'attività enzimatica ad essi connessa, sono stati utilizzati come bioindicatori poiché, oltre ad essere dei fattori fondamentali della fertilità, sono estremamente sensibili alle perturbazioni ambientali.

Capitolo 3

MATERIALI E METODI

3.1 *Suolo*

Il substrato di partenza utilizzato nell'ambito della prova è un suolo agricolo prelevato ad una profondità massima di 20 cm da diversi vigneti a conduzione biologica (UE 2018/848), ubicati in provincia di Ancona (Italia). Il suolo è stato essiccato all'aria, macinato e setacciato a 2 mm. Nella seguente tabella sono illustrate le principali caratteristiche del terreno.

Sabbia	19,6%
Limo	48,7%
Argilla	31,7%
pH (H ₂ O)	7,79
Sostanza organica	1,4%
Conducibilità elettrica	530 nS/cm
Capacità di scambio cationico (CEC)	28,3 meq/100g

Tabella 1: Caratteristiche del suolo utilizzato nella prova.

3.2 *Lombrichi*

Nella prova sono stati utilizzati lombrichi appartenenti alla specie *Eisenia fetida*, acquistati dall'azienda "Lombricoltura Bella Farnia", situata a Sabaudia in provincia di Latina (Italia). I lombrichi sono stati allevati per circa 60 giorni in laboratorio all'interno di contenitori dove il substrato era costituito da compost organico con umidità compresa tra il 70 e l'80%, mantenuto ad una temperatura di 20 ± 1 °C. I lombrichi sono stati alimentati con verdure e avena biologiche.

Al termine della fase di allevamento i lombrichi presentavano un peso compreso tra i 300 e i 600 mg e un clitello ben sviluppato, sono quindi stati spostati all'interno del substrato utilizzato per la prova per una settimana di acclimatamento. Infine, 24 ore prima dell'inizio

della prova essi sono stati trasferiti su piastre Petri con carta filtro, in modo da consentire lo spurgo del tratto intestinale.

3.3 *Vermicompost*

Il vermicompost utilizzato per l'esperimento è stato prodotto da Zomagarden, un'azienda italiana specializzata nella produzione di substrati ed ammendanti di origine naturale. Il prodotto commerciale prende il nome di "HUMUZOM", è ottenuto dalla degradazione di letame bovino da parte di lombrichi appartenenti alla specie *E. fetida* ed è certificato per l'utilizzo in agricoltura biologica.

HUMUZOM	
Azoto totale	3,5%
Azoto organico	2,3%
Carbonio organico	39,7%
pH	7,6
Sostanza organica estraibile	77,7%
Sostanza organica umificata	83,2%
Rapporto C/N	11,3
Rame	174 mg/kg
Zinco	32,8 mg/kg

Tabella 2: Caratteristiche del vermicompost utilizzato.

3.4 *Piante*

I semi utilizzati nella prova appartengono alla specie *Plantago major* L., nota in gergo con il nome di piantaggine maggiore, e sono stati acquistati presso l'azienda agricola Graines De Tortue (FR). Prima dell'inizio dell'esperimento sono state effettuate delle prove di germinazione per valutare la vitalità dei semi.

3.5 *Insetticida (clorpirifos)*

Nell'esperimento è stato impiegato il prodotto commerciale Dursban 75 WG, fornito dall'azienda Dow Agrosiences (Milano, Italia), il cui principio attivo è il clorpirifos. Gli standard analitici del p.a. (purezza del clorpirifos $\geq 98\%$) sono stati ottenuti dalla ditta Sigma-

Aldrich (Milano, Italia). Nella sottostante tabella (3) vengono riassunte le principali proprietà del formulato commerciale e del rispettivo principio attivo.

Clorpirifos	
Massa molecolare (g/mol)	350,58
Solubilità in acqua (mg/l)	1.05
Wow (Log P)	4,7
Koc (l/kg)	5509
Pressione di vapore a 20 °C (mPa)	1,43
LC ₅₀ , <i>Eisenia Foetida</i> , 14 days (mg/kg)	129
Dursban 75 WG	
Principio Attivo (%)	75
Formulazione	Polvere
LC ₅₀ , <i>Eisenia Foetida</i> , 14 days (mg/kg)	681

Tabella 3: Proprietà chimiche e fisiche di Clorpirifos e Dursban 75 WG.

¹: PPDB Pesticide Properties Data Base (2016)

3.6 *Struttura della prova*

L'esperimento è stato condotto all'interno di una serra controllata ed ha avuto una durata totale di 120 giorni. Ogni vaso, delle dimensioni di 20x20 cm, è stato riempito con 2 kg di suolo, e successivamente contaminato con 3 diverse concentrazioni di clorpirifos:

- 1) Controllo negativo (0 mg/kg)
- 2) 25 mg/kg
- 3) 50 mg/kg

Per ogni livello di contaminazione, sono stati applicati sei trattamenti diversi:

- S – Suolo
- P – Suolo + Piante
- E – Suolo + Lombrichi
- V – Suolo + Vermicompost
- PE – Suolo + Piante + Lombrichi
- PV – Suolo + Piante + Vermicompost

Ogni combinazione è stata condotta in triplo.

Nei trattamenti con le piante sono stati seminati circa 50 semi di *P. major*, mentre in quelli con i lombrichi, ogni vaso conteneva 20 esemplari di *E. fetida*. Il vermicompost è stato aggiunto al suolo ad una percentuale del 5%.

Il suolo è stato costantemente mantenuto al 20% di umidità. Dall'inizio della prova, in corrispondenza dei giorni 7, 14, 21, 28, 42, 63, 84, 105 e 120, sono stati prelevati dei campioni di suolo per estrarne il clorpirifos e valutarne la concentrazione. Unica eccezione i vasi contenenti le piante, in questo caso si è preferito attendere che quest'ultime raggiungessero uno sviluppo adeguato, per cui, i prelievi sono iniziati dal 63° giorno. Per quanto concerne le analisi condotte per valutare la salute del suolo, ovvero le analisi enzimatiche, i campioni sono stati prelevati all'inizio (giorno 0), a metà (giorno 63) e alla fine (giorno 120) della prova.



Figura 12: Serra allestita per l'esperimento.

3.7 Residui di Clorpirifos nel suolo

3.7.1 Estrazione del clorpirifos

I residui di clorpirifos nel suolo sono stati analizzati seguendo il protocollo descritto da Vischetti et al. (2008) e De Bernardi et al (2022). In corrispondenza di ogni tempo di prelievo, sono stati raccolti 25 gr di suolo secco. Ad ogni campione sono stati aggiunti 25 ml di soluzione estraente [miscela 80:20 di metanolo (CH_3OH) e acqua (H_2O) deionizzata], sono stati posti in agitazione per 60 minuti, poi centrifugati a 5000 giri al minuto per 15 minuti, ed infine il surnatante è stato filtrato. Sullo stesso campione di suolo l'iter appena descritto è stato applicato per due volte. A questo punto si è reso necessario un processo di purificazione, in modo da ottenere infine il clorpirifos senza impurità.

Sono stati inseriti all'interno di un imbuto separatore 25 ml del filtrato ottenuto e sono stati effettuati tre lavaggi in successione, rispettivamente con 30 ml, 20 ml e 20 ml di cloroformio

(CHCl₃); successivamente il liquido ottenuto è stato fatto evaporare al rotavapor, poi disciolto in 1 ml di metanolo e analizzato attraverso una cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). L'HPLC è stata condotta utilizzando lo Spectra SYSTEM P 4000, dotato di una colonna Supelcosil C₁₈ (25 cm × 4.6 mm i.d.) e un'UV-detector con una lunghezza d'onda di 230 nm. L'eluizione è stata eseguita con acetonitrile (CH₃CN) ed H₂O in rapporto 70:30, la portata del flusso impostata a 1 ml min⁻¹. Con questo settaggio il limite di rilevamento era di 0,67 µg ml⁻¹ e il tempo di ritenzione di 6 minuti (Berrè et al., 2020).



Figura 13: Spettrofotometro (sx) e imbuto separatore (dx).

3.8 Effetti sul DNA dei lombrichi

3.8.1 Comet assay

Il *comet assay* (o test della cometa), noto anche come elettroforesi su singola cellula, ha trovato recentemente spazio nello studio dell'ecotossicologia e nel monitoraggio ambientale. Il termine "cometa" fa riferimento all'aspetto assunto dal DNA nel corso della migrazione sul gel elettroforetico, che spesso somiglia per l'appunto ad una cometa. È una tecnica molto

sensibile che consente di identificare il livello di danneggiamento causato dalla rottura dei filamenti di DNA; ciò, è considerato un marcatore biologico della genotossicità e viene usato per quantificare l'abilità di certi contaminati nel ledere l'informazione genetica all'interno della cellula. Il DNA è estremamente sensibile allo stress ambientale, anche una minima degradazione potrebbe portare a mutazioni e altri effetti tossici devastanti. Il metodo utilizzato è quello descritto da Eyambe et al. (1991) con delle lievi modifiche apportate da De Bernardi et al. (2022).

Al termine della prova sono stati prelevati 3 lombrichi, appartenenti alla specie *E. foetida*, per ognuno dei 6 vasi che ne prevedevano la presenza; 3 per trattamento (E; PE) (dei casi in cui non è stato possibile ne parliamo per niente?). Cercando di sintetizzare, ogni esemplare è stato immerso in 5 ml di soluzione estraente, composta dal 95% di PBS 1x, 5% di etanolo assoluto, 2,5 mg/ml di EDTA e 10mg/ml di Guayacol, il tutto portato a pH 7,5 (o 7,3?) con NaOH; sono rimasti in contatto con la soluzione per 4 minuti a temperatura ambiente per permettere l'estrusione di celomociti. Allo scadere del tempo, i lombrichi sono stati rimossi ed il liquido ottenuto è stato centrifugato a 300g x 10 minuti a 4 °C, si è proceduto eliminando il surnatante e unendo il pellet, formatosi sul fondo delle provette e composto dai celomiciti estrusi, dei 3 individui appartenenti alla medesima prova (3→1). Dopodiché sono stati effettuati due lavaggi successivi con PBS 1x, è stato per un'ultima volta rimosso il surnatante, aggiunto 1 ml di PBS 1x e portato il pellet in sospensivo prima di procedere al conteggio delle cellule.

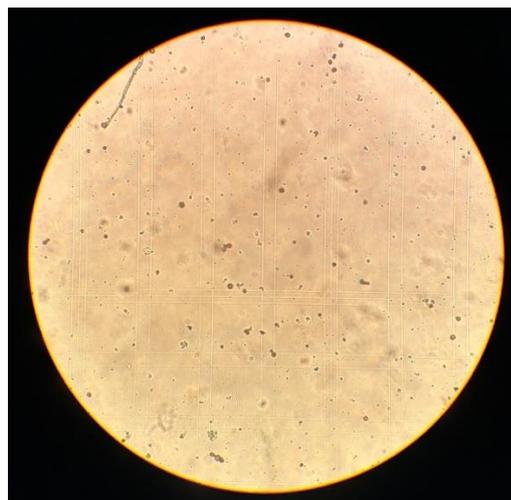


Figura 14: Conta dei celomociti al microscopio.

Individuato il numero di cellule, sono state sospese in agarosio (LMA 1%) a 37 °C e stratificate su vetrini HT Trevigen precedentemente rivestiti con l'1% di agarosio (NMA 1%). Per ogni campione sono state eseguite 3 repliche, ogni spot è ottenuto dalla stratificazione di 25 µl di agarosio LMA contenete 3000 cellule. L'agarosio è stato lasciato solidificare a 4°C per 10 minuti al buio, i vetrini così allestiti sono stati immersi in una soluzione per lisi alcalina (pH 10) composta da cloruro di sodio (NaCl) 2.5 mol/L, sale disodio etilendiaminotetracetico diidrato (Na₂-EDTA) 0.1 mol/L, tris(idrossimetil)amminometano cloridrato (Tris-HCl) 10 mmol/L, dimetilsolfossido (DMSO) al 10% e Triton X-1000 1% (tensioattivo non ionico), e mantenuti a 4 °C per almeno un'ora (Mincarelli, 2016). Dopodiché, ad una temperatura di 4°C per 20 minuti al buio, i vetrini sono stati lasciati in *unwinding* in un buffer per l'elettroforesi costituito da acido etilendiaminotetracetico (EDTA) 1 mmol/L e idrossido di sodio (NaOH) 300 mmol/L, a pH 13. L'elettroforesi è stata poi condotta in una stanza refrigerata a 4°C a 11 V/cm per 20 minuti. E ancora, i vetrini sono stati lavati in acqua per 10 secondi, poi immersi in un tampone di neutralizzazione (0.4 M Tris-HCl stabilizzato a pH 7.5) per 5 minuti e disidratati per 10 secondi in metanolo al 75% (Mincarelli, 2016). In seguito, 10 µg/ml di Sybir Gold sono stati utilizzati per colorare i vetrini. Infine, le immagini sono state acquisite adoperando un microscopio automatico Lionheart FX (Biotek, Winooski, Vermont, USA) attraverso un ingrandimento di 200x, per ogni trattamento sono state acquisite 200 comete (Berrè et al., 2020).

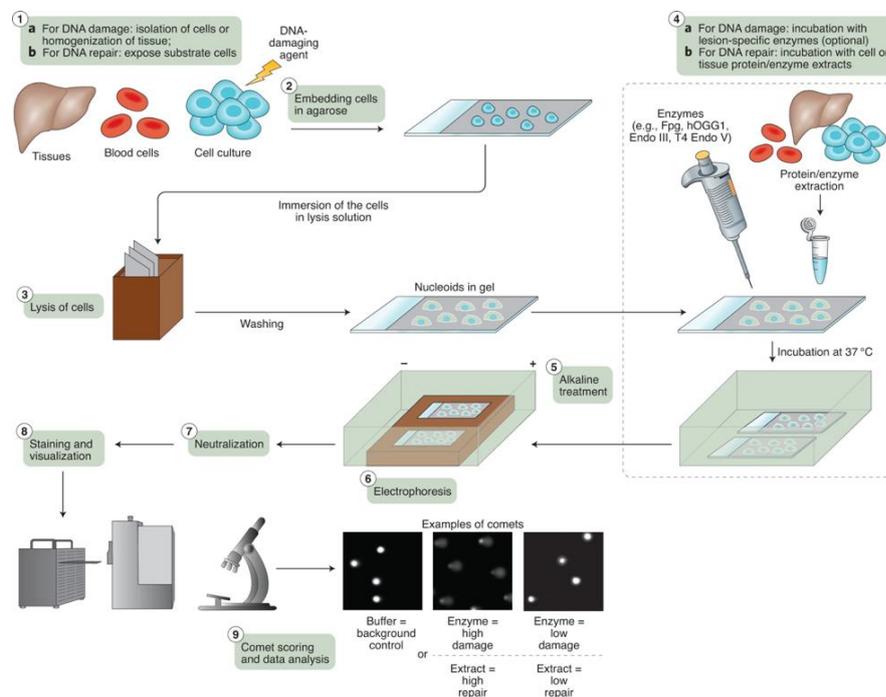


Figura 15: Schematizzazione del comet assay (Møller et al., 2020).

Per evidenziare dalle comete i principali indici di danneggiamento del DNA, è stato utilizzato un software analitico appositamente progettato. La lunghezza della coda della cometa (*Tail Length*), il momento della coda della cometa (*Tail Momentum*) e la percentuale d'intensità della stessa (*Tail Intensity*), sono tra gli indici più importanti estrapolati (Tagliabue et al., 2022).

3.9 *Analisi biochimiche*

I microrganismi possono essere utilizzati come indicatori della qualità del suolo, poiché svolgono funzioni chiave nella degradazione e nella ricircolazione della materia organica e dei nutrienti (Dilly & Munch, 1998).

Gli enzimi del suolo rivestono un ruolo fondamentale all'interno dei processi biogeochimici dei nutrienti, regolano la degradazione e il ripristino della sostanza organica, influenzano fortemente le proprietà del suolo, la biomassa e l'attività microbica, nonché la qualità dell'ecosistema e la produttività agricola. Di conseguenza gli enzimi vengono utilizzati come indicatori ambientali, in quanto sono sensibili alle variazioni ambientali, alle pratiche agronomiche e alla presenza di xenobiotici (Lee, 2020).

In questo lavoro sono state valutate la quantità di microrganismi presenti nel suolo, tramite il carbonio della biomassa microbica, e l'attività di diversi enzimi per avere un'idea dello stato di salute del suolo e mettere in luce le differenze tra i differenti trattamenti. Le analisi enzimatiche sono state effettuate tramite metodo colorimetrico, con lettura dell'assorbanza del campione attraverso uno spettrofotometro, oppure mediante titolazione.

3.9.1 *Carbonio della biomassa microbica*

La biomassa microbica è la componente vivente della sostanza organica (esclusa la macrofauna e le radici) più piccola di 5000 μm^3 , che rappresenta circa l'1-5% (p/p) del carbonio organico totale (Jenkinson & Ladd, 1981).

Il contenuto di carbonio della biomassa microbica (CBM) è stato valutato applicando il metodo di Vance et al. (1987). Sono stati prelevati due campioni da 10 g per ogni suolo da analizzare, uno utilizzato come controllo (non fumigati), mentre l'altro è stato fumigato. La fumigazione consiste nel mantenere il suolo per 20-24 ore in un essiccatore in un'atmosfera di cloroformio, che provoca la lisi delle cellule microbiche e il successivo rilascio di materiale citoplasmatico. A questo punto il materiale di entrambi i campioni è stato estratto aggiungendo

25 ml di soluzione estraente K_2SO_4 0.5M e agitando per 30 minuti a 300 m/s su un agitatore. La procedura prevede una titolazione finale con solfato ferroso di ammonio, previa incubazione con 2 ml di bicromato di potassio, 5 ml di acido fosforico e 10 ml di acido solforico in stufa a 120 °C per 30 minuti. Il CBM viene calcolato prendendo la differenza tra la quantità di carbonio nei campioni fumigati e quella nei campioni non fumigati ed espresso in mg/kg.

3.9.2 *Idrolisi della fluoresceina diacetato (FDA)*

Quest'analisi riassume l'attività idrolitica di numerosi enzimi, come le proteasi, le lipasi e le esterasi, e offre un'idea della capacità idrolitica complessiva di funghi e batteri presenti all'interno del campione.

È stato applicato il metodo di Schnurer & Rosswall (1982), che consiste nel determinare la quantità di FDA idrolizzato in un'ora.

Si pesa 1 g di suolo per campione, lo si inserisce in una beuta di vetro da 100 ml e si aggiungono 10 ml di Work Solution; le beute così ottenute vengono tappate con della carta stagnola e incubate in stufa per 1 ora a 37 °C. La reazione è interrotta aggiungendo 10 ml di acetone. I campioni vengono centrifugati a 5000 giri al minuto per 5 minuti; quindi, l'assorbanza viene letta con λ a 490 nm.

I risultati vengono espressi come μg di FDA idrolizzato $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$, la formula per il calcolo finale è la seguente: $[(\lambda C - \lambda B(uABC))] * 105,26 \rightarrow$ dove A, B e C rappresentano le tre repliche del trattamento in questione.

3.9.3 *Fosfatasi alcalina*

L'analisi delle fosfatasi ci permette di valutare il potenziale di mineralizzazione del fosforo e la sua disponibilità nel suolo. Si riferisce ad un ampio gruppo di enzimi che catalizzano l'idrolisi di esteri e anidridi dell'acido fosforico. È stato applicato il metodo di Tabatabai (1982), basato sulla quantificazione del p-nitrofenolo rilasciato in un'ora.

Si comincia con il pesare 1 gr di suolo per campione, lo si inserisce in una beuta di vetro da 100 ml e si aggiungono 0,25 ml di Toluene, 4 ml di Tampone MUB a pH 11 e 1 ml di Soluzione di p-nitrofenilfosfato 0,005M. Le beute vengono tappate con della carta stagnola e messe ad incubare in stufa per 1 ora a 37 °C. La reazione viene interrotta aggiungendo 1 ml di $CaCl_2$ 0.5M e 4 ml di NaOH 0.5M. I campioni vengono filtrati; quindi, l'assorbanza viene letta con λ a 420 nm.

I risultati vengono espressi come μg di p-nitrofenolo $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$, la formula per il calcolo finale è la seguente: $[(\lambda C - \lambda B (\mu ABC))] * 99,01 \rightarrow$ dove A, B e C rappresentano le tre repliche del trattamento in questione.

3.9.4 β -glucosidasi

Le β -glucosidasi sono enzimi appartenenti alla classe delle idrolasi che catalizzano per reazioni di idrolisi nei confronti di numerosi polisaccaridi liberando glucosio. Sono coinvolti nel ciclo del carbonio e hanno effetti positivi sul contenuto di sostanza organica del suolo. I risultati, applicando il metodo di Eivazi & Tabatabai (1988), sono espressi attraverso la quantità di p-nitrofenolo rilasciato in 60 minuti.

Viene pesato 1 gr di suolo per campione in una beuta di vetro da 100 ml e si aggiungono in successione: 0,25 ml di Toluene, 4 ml di Tampone MUB a pH 6 e 1 ml di Soluzione di p-nitrofenil- β -D-glucopyranoside 0,025M; dopodiché i campioni vengono incubati in stufa a 37 °C per 60 minuti. La reazione viene interrotta aggiungendo 1 ml di CaCl_2 0.5M e 4 ml di Tampone Tris(idrossimetil)amminometano 0,1M. I campioni vengono centrifugati a 5000 giri al minuto per 5 minuti, quindi filtrati. Si conclude leggendo l'assorbanza con λ a 420 nm.

I risultati vengono espressi come μg di p-nitrofenolo $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$, la formula per il calcolo finale è la seguente: $[(\lambda C - \lambda B (\mu ABC))] * 99,01 \rightarrow$ dove A, B e C rappresentano le tre repliche del trattamento in questione.

3.9.5 *N*-acetil- β -glucosaminidasi (NAG)

La NAG è un'idrolasi (chitinasi) capace di idrolizzare gli oligosaccaridi contenenti chitina e peptidoglicano, inoltre è coinvolta nel ciclo dell'azoto e del carbonio. L'analisi è stata condotta utilizzando il metodo sviluppato da Parham & Deng (2000), basato sulla quantificazione del p-nitrofenolo rilasciato in un'ora.

Per ogni campione, si pesa 1 gr di suolo, a cui si aggiungono 4 ml di Tampone Acetato e 1 ml di Soluzione NAG 0,1M; dopodiché i campioni vengono incubati a 37 °C per 1 ora. La reazione viene interrotta con l'aggiunta di 1 ml di CaCl_2 0.5M e 4 ml di NaOH 0.5M e i campioni vengono centrifugati a 5000 giri al minuto per 5 minuti e filtrati. L'assorbanza viene letta con λ a 420 nm.

I risultati vengono espressi come μg di p-nitrofenolo $\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$, la formula per il calcolo finale è la seguente: $[(IC - IB)] * 99,01 \text{ ®}$ dove A, B e C rappresentano le tre repliche del trattamento in questione.

3.10 *Analisi statistica*

Le analisi statistiche sono state eseguite attraverso il software R (R Core Team 2023). Quando i dati rispettavano gli assunti, è stata eseguita l'ANOVA e si è poi proceduto con il test post hoc di Tukey. Dove gli assunti non erano rispettati, è stato applicato il test per dati non parametrici Kruskal-Wallis e successivamente il test post hoc di Dunn (aggiustamento del valore p di Bonferroni, $\alpha = 0,05$).

Capitolo 4 RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo capitolo vengono presentati e discussi i risultati ottenuti dall'applicazione delle diverse tecniche di biorisanamento studiate, mirate a valutare la degradazione del clorpirifos e gli effetti sulla salute e fertilità del suolo. I dati raccolti sono organizzati per rispondere agli obiettivi di ricerca descritti nei capitoli precedenti e per confrontare l'efficacia dei diversi trattamenti.

4.1 *Clorpirifos nel suolo*

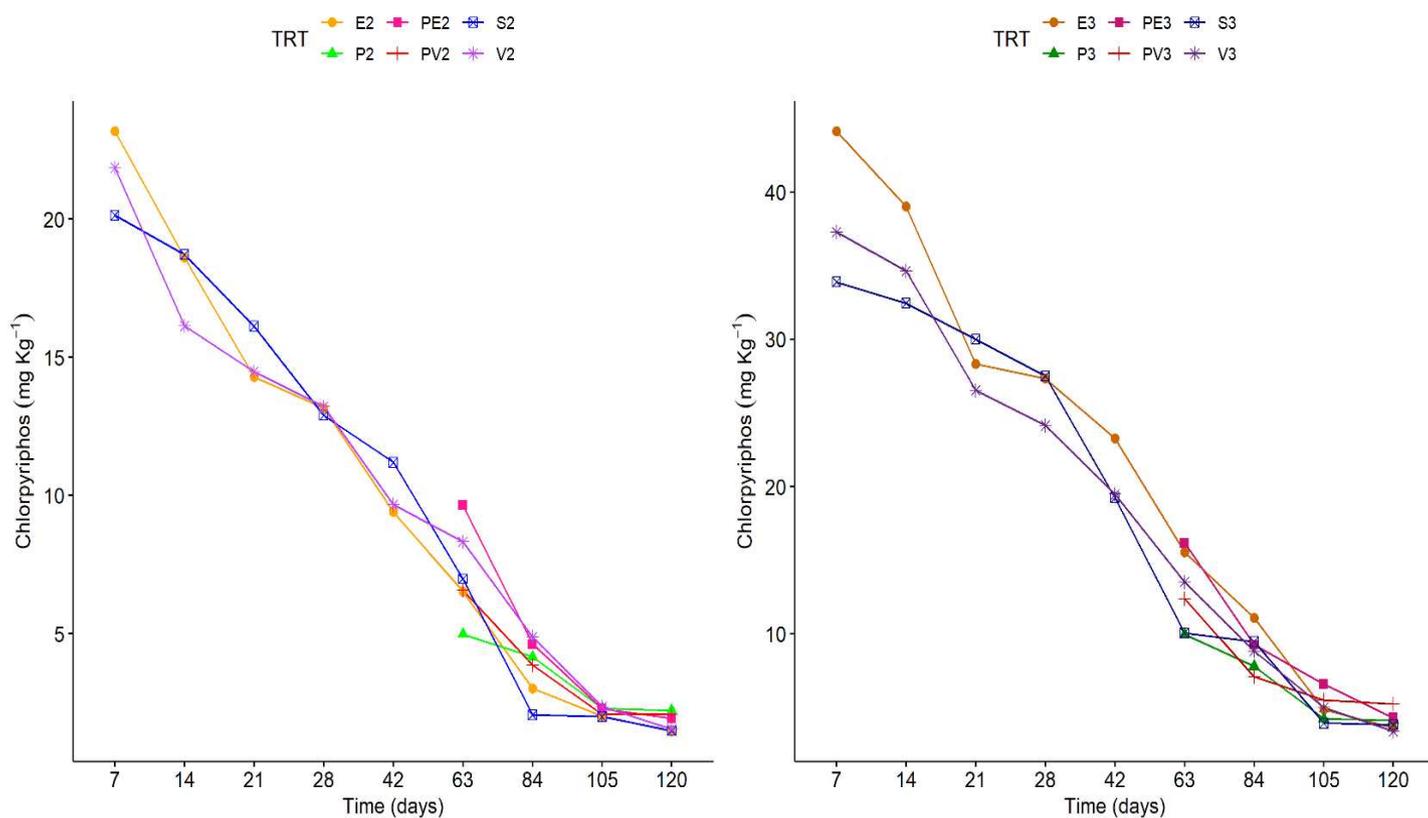


Figura 16: Concentrazioni del CPF nel suolo durante i 120 giorni di esperimento (mg/kg), partendo rispettivamente da 25 mg/kg, a sinistra, e 50 mg/kg, a destra.

La figura 16 mostra l'andamento della concentrazione di clorpirifos nel suolo a ciascun tempo di prelievo, fino alla fine del test; sono riportati tutti i trattamenti, per entrambe le concentrazioni di CPF applicate. Come è possibile osservare, l'andamento del clorpirifos nel suolo ha mantenuto valori simili indipendentemente dalla concentrazione di CPF iniziale e dai diversi trattamenti applicati.

Il tempo di emivita del clorpirifos osservato in questo studio è risultato rapido rispetto ai normali valori riportati in letteratura in vari tipi di suolo che vanno da 80 giorni (Vischetti et al., 2020) fino a valori molto elevati superiori anche ai 1000 giorni (Racke et al., 1994), con valori intermedi riportati da altri autori ma sempre molto elevati (Lewis et al., 2016).

La rapida degradazione osservata potrebbe essere attribuita al fatto che, nelle condizioni studiate, il principale metabolita del clorpirifos, il TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinol), noto per le sue proprietà antimicrobiche, venga degradato dal pool microbico del suolo e delle tecniche di biorimediazione applicate, permettendo così, anche una rapida degradazione del clorpirifos.

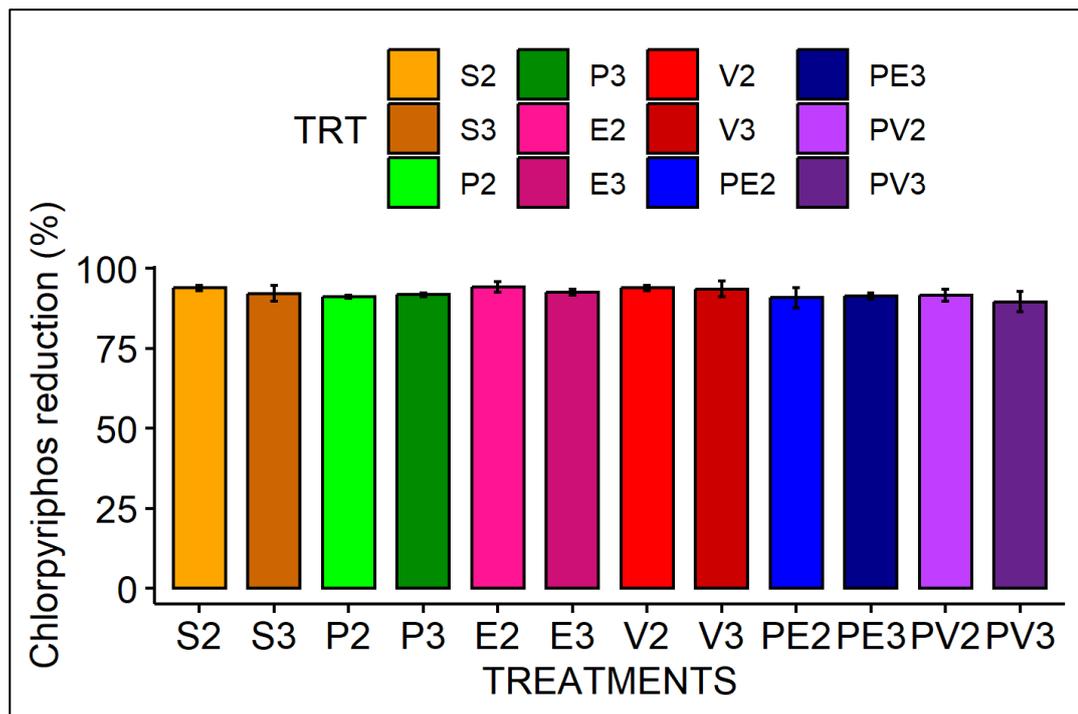


Figura 17: Percentuali di riduzione del CPF alla fine dell'esperimento (%)

Al termine della prova, nessuno dei trattamenti applicati si è dimostrato efficace nel ridurre più velocemente il contenuto di CPF nel suolo; infatti, non sono state trovate differenze statisticamente significative tra i suoli trattati e il suolo tal quale.

In tutti i casi la percentuale di riduzione del CPF dopo 120 giorni dalla contaminazione artificiale ha raggiunto valori superiori al 90%.

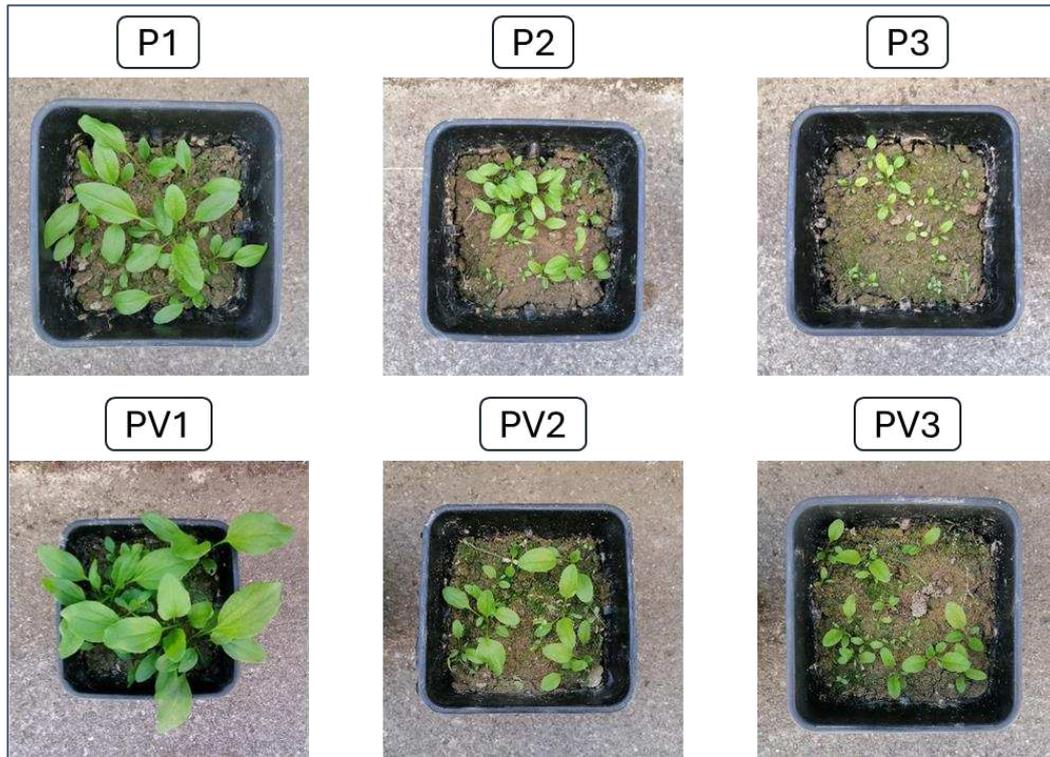


Figura 18: Sviluppo delle piante a differenti concentrazioni di CPF dopo 54 giorni, da sinistra verso destra 0 ppm → 25 ppm → 50 ppm.

Per quanto riguarda *P. major*, la germinazione dei semi non è stata influenzata dalla presenza del CPF ad entrambe le dosi applicate. Al contrario, lo sviluppo delle piante ha mostrato un evidente andamento negativo dose-dipendente; questo aspetto è osservabile in Figura 18, dove è chiaro un rallentamento della crescita delle piante passando da P1 (0 ppm) a P2 (25 ppm) e infine a P3 (50 ppm). *P. major* ha infine impiegato 63 giorni per svilupparsi correttamente nel suolo contaminato.

Inoltre, si evidenzia come, anche in presenza di contaminazione, il vermicompost abbia avuto un effetto positivo sullo sviluppo delle piante; è importante notare, in Figura 18, la visibile differenza di crescita tra P3 e PV3.

4.2 Carbonio della biomassa microbica

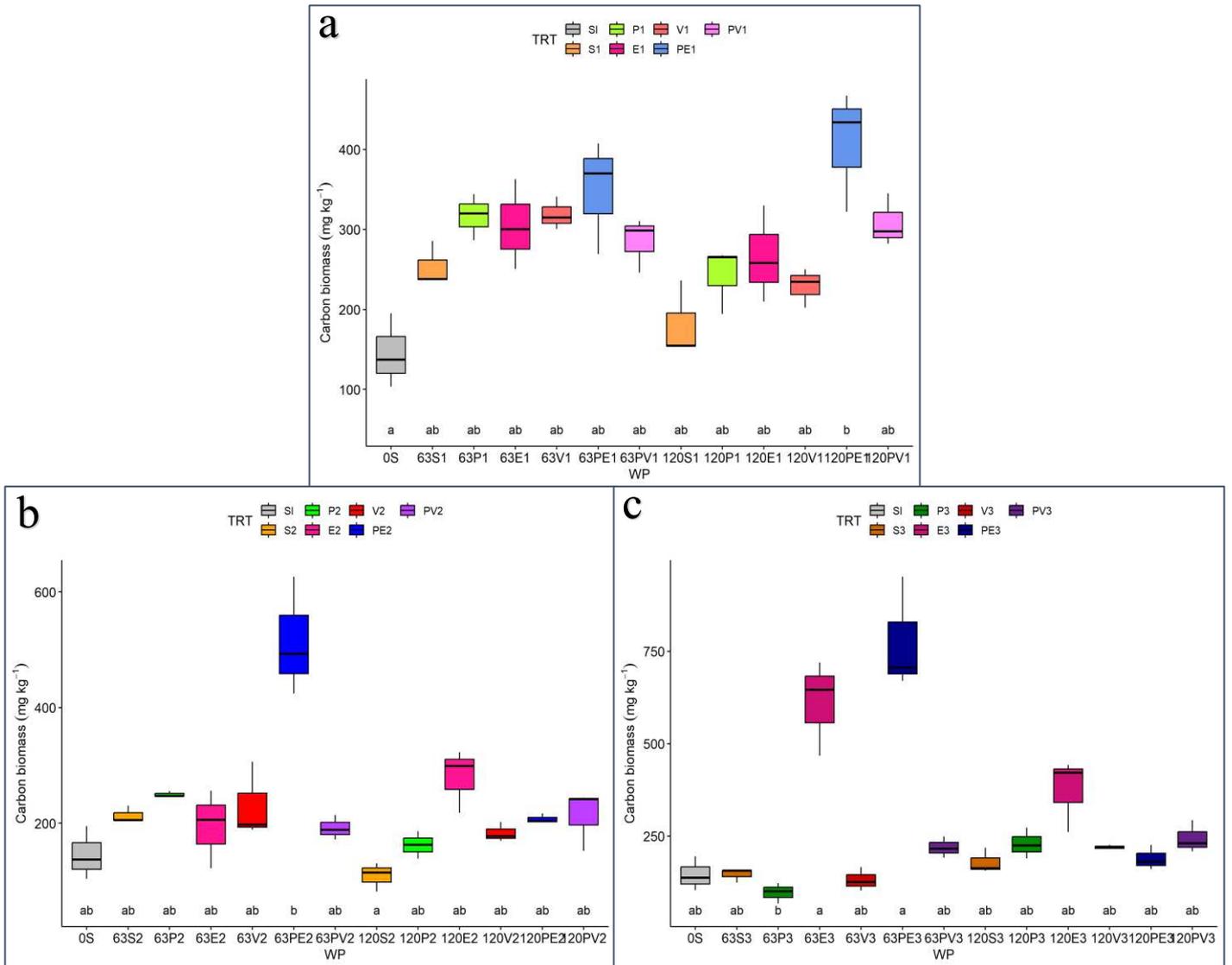


Figura 19: Carbonio della biomassa microbica durante il test nel suolo incontaminato (a), contaminato con 25 ppm (b) e 50 ppm (c) di CPF.

La Figura 19 riporta la variazione del contenuto di carbonio microbico nei 120 giorni dell'esperimento. Come si può notare nella Figura 19a, i differenti trattamenti applicati hanno aumentato il contenuto di carbonio microbico nel suolo non contaminato, con i risultati migliori ottenuti quando piante e lombrichi erano presenti contemporaneamente, sia a T63 che a T120. Complessivamente, tutti i trattamenti hanno contribuito a un incremento della biomassa microbica del suolo, suggerendo un effetto positivo sulla sua fertilità biologica.

Anche con una concentrazione iniziale di 25 ppm di clorpirifos (figura 19b), i trattamenti hanno aumentato la biomassa microbica nel suolo rispetto al suolo di controllo. In particolare, a T63, la combinazione di piante e lombrichi ha portato a un valore di CBM significativamente più alto rispetto al suolo iniziale (OS). Tuttavia, questo effetto non è stato mantenuto fino alla fine dell'esperimento, quando il valore più alto di CBM è stato osservato in presenza dei soli lombrichi (120E2).

Il CBM alla concentrazione più alta di contaminazione (figura 19c) sembra essere stato influenzato positivamente dalla presenza di lombrichi, specialmente a T63, dove sia 63E3 sia 63PE3 mostrano valori notevolmente superiori rispetto al suolo controllo e agli altri trattamenti, seppur non del tutto statisticamente differenti. Il divario è ridotto al termine della prova, infatti, a T120, solo 120E3 ha valori superiori rispetto agli altri trattamenti.

La prova ha quindi confermato l'effetto positivo della presenza delle tecniche di biorimediazione sul carbonio microbico che è la prerogativa essenziale di un suolo fertile, inoltre, questa tendenza è sicuramente molto più evidente quando nel suolo c'è la presenza di lombrichi.

4.3 Attività enzimatiche

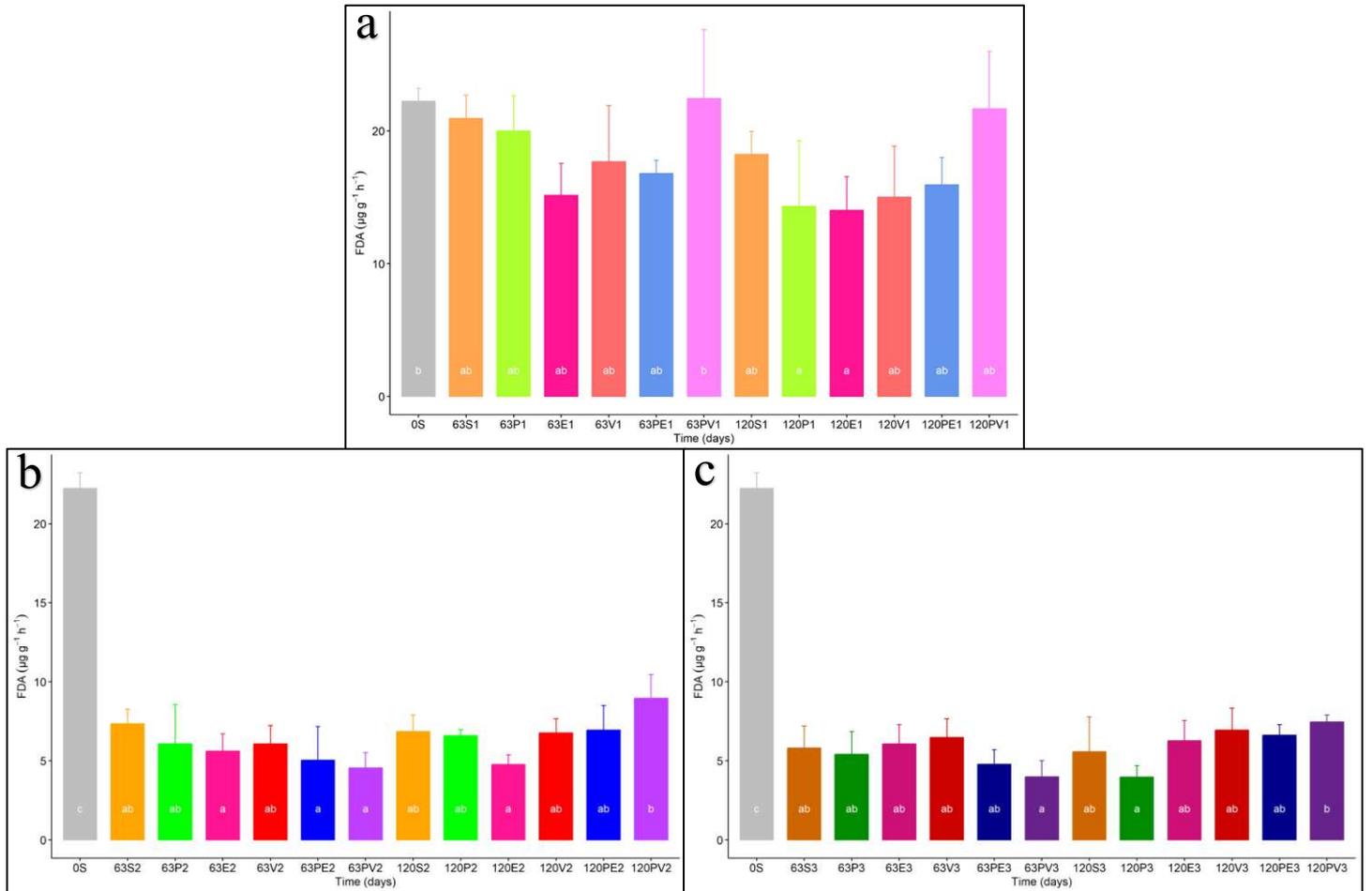


Figura 20: Attività dell’FDA durante il test nel suolo incontaminato (a), contaminato con 25 ppm (b) e 50 ppm (c) di CPF.

L’attività idrolitica complessiva è rimasta stabile in assenza di contaminazione (figura 20a), mantenendo valori elevati e costanti nei trattamenti con piante e vermicompost combinati (63PV1 e 120PV1), per tutta la durata del test. Al contrario, a T120, i trattamenti con soli lombrichi o sole piante (120E1 e 120P1) hanno mostrato un’attività dell’FDA significativamente inferiore rispetto al suolo di partenza (0S).

Come evidente in figura 20b e 20c, la presenza del CPF nel suolo ha provocato un drastico calo dell’attività della FDA, ad entrambe le concentrazioni applicate (25 e 50 ppm). Al termine dell’esperimento, la combinazione di piante e vermicompost (120PV2 e 120PV3) ha mostrato valori di attività superiori rispetto agli altri trattamenti, risultando in alcuni casi anche significativamente diversi sul piano statistico; tuttavia, l’attività di questo enzima rimane ampiamente inferiore rispetto a quella registrata in assenza di contaminazione.

Comunque, un calo di attività idrolitica della biomassa microbica non sempre delinea un calo di fertilità; bisogna infatti valutare le attività separate di ciascuno dei principali enzimi idrolitici. Nella Figura 21 è riportata l'attività della fosfatasi alcalina, enzima chiave nel metabolismo del fosforo organico nel suolo.

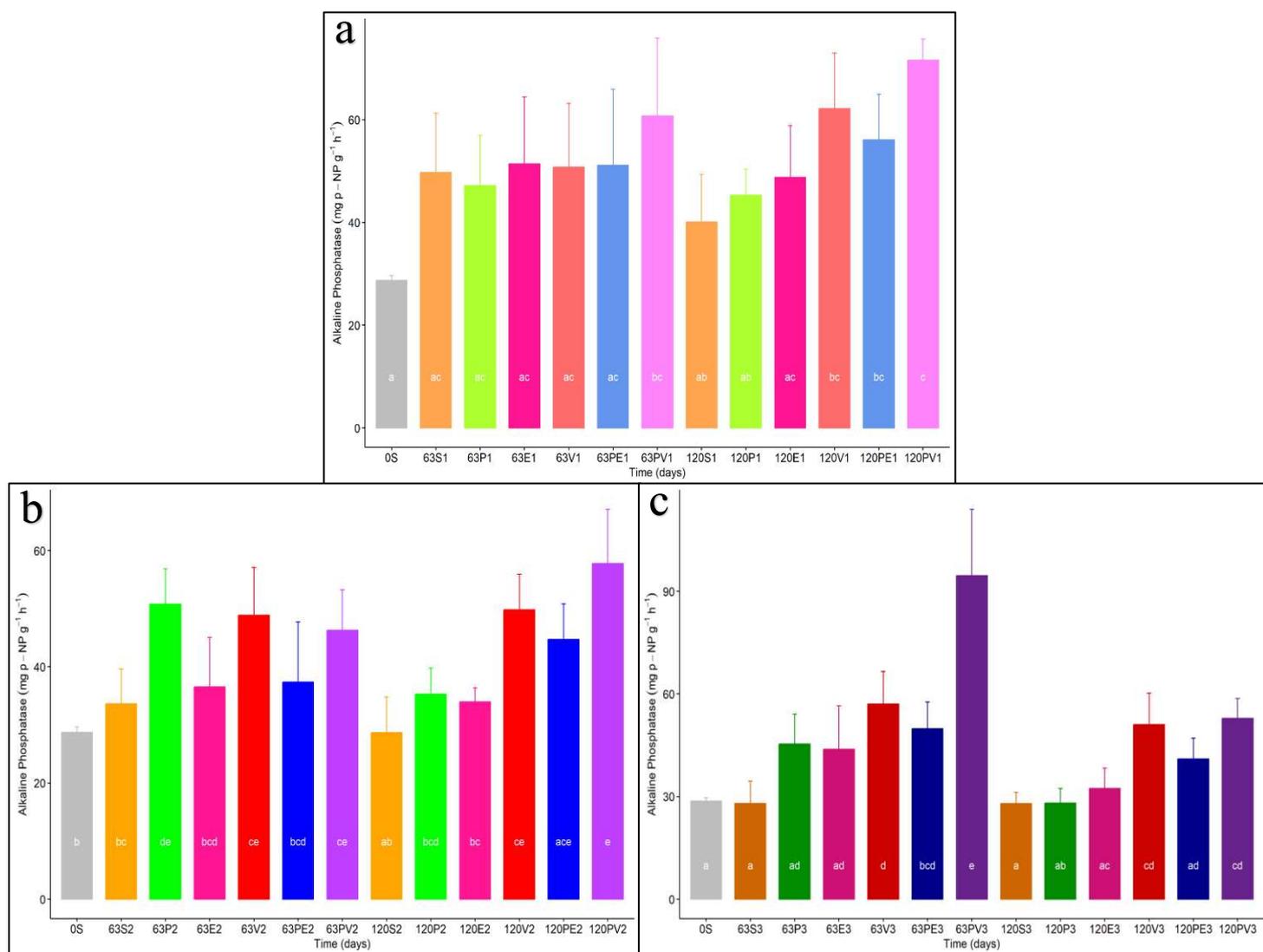


Figura 21: Attività della fosfatasi alcalina durante il test nel suolo incontaminato (a), contaminato con 25 (b) e 50 ppm (c) di CPF.

Come si evince dalla figura 21a, l'attività della fosfatasi alcalina ha subito un incremento in tutti i trattamenti in assenza di contaminazione, se comparati con il valore del suolo iniziale (0S).

A T120, la presenza di vermicompost ha determinato un incremento significativo dell'attività enzimatica sia in 120V1 sia in 120PV1 rispetto al suolo di partenza (0S). Questo effetto è attribuibile al potere ammendante del vermicompost, che arricchisce il suolo di sostanza organica, aumentando la disponibilità di fosforo, un elemento spesso limitante nel suolo.

A una contaminazione di 25 ppm (figura 21b), il CPF non sembra avere un impatto negativo sull'attività della fosfatasi alcalina, con valori solo leggermente inferiori rispetto ai suoli non contaminati. Come evidenziato nel grafico, i trattamenti con vermicompost hanno prodotto i valori più alti di attività fosfataseica. In particolare, nei suoli V2 e PV2, l'attività è rimasta significativamente superiore rispetto al suolo di partenza (0S) durante tutto l'esperimento, sia a T63 che a T120.

Come visibile in figura 21c, anche alla concentrazione più elevata di CPF (50 ppm), l'attività fosfataseica è aumentata grazie ai trattamenti applicati, ciò è particolarmente evidente a metà dell'esperimento. Dopo 63 giorni, la combinazione di piante e vermicompost ha prodotto un incremento significativo rispetto al suolo controllo e agli altri trattamenti. Tuttavia, questo effetto positivo non è stato mantenuto a lungo termine, pur rimanendo 120PV3 statisticamente superiore a 120S3. Anche il vermicompost da solo ha dato risultati interessanti, con 63V3 e 120V3 che, alla fine della prova, si sono distinti significativamente rispetto ai rispettivi controlli (63S3 e 120S3).

L'effetto benefico dei vari trattamenti sull'attività fosfataseica del suolo contribuisce all'aumento di fertilità del suolo attraverso la liberazione di fosforo sottoforma di fosfato inorganico, essenziale per la nutrizione vegetale; ciò avviene soprattutto dove è presente vermicompost che presenta notevole concentrazione di questo elemento.

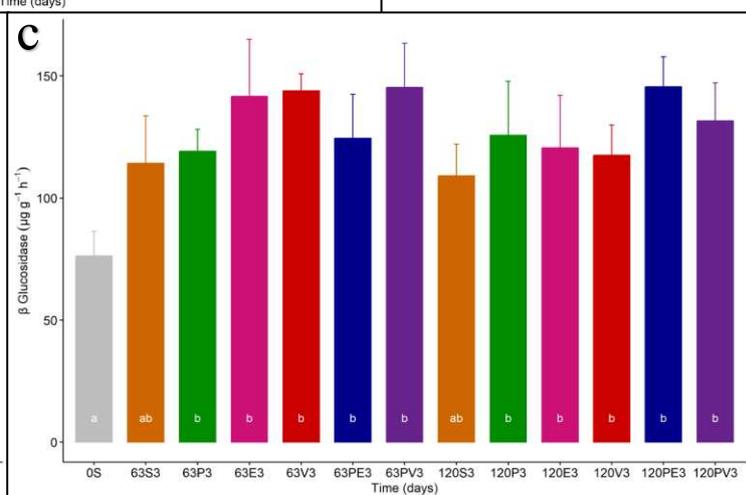
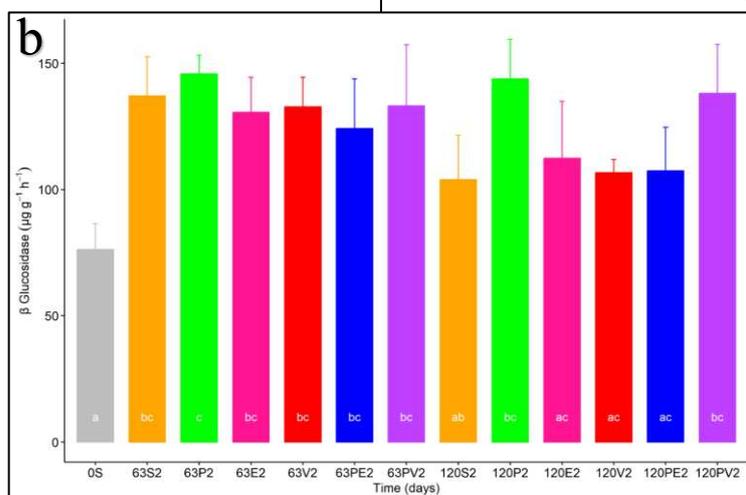
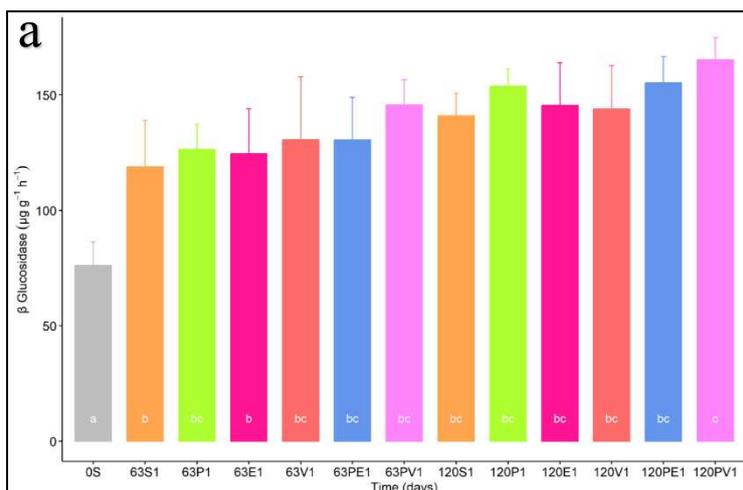


Figura 22: Attività della β -glucosidasi durante il test con suolo incontaminato (a), contaminato con 25 (b) e 50 ppm (c) di CPF.

L'attività della β -glucosidasi è riportata in Figura 22. Tutti i trattamenti hanno portato a un incremento statisticamente significativo dell'attività della β -glucosidasi rispetto al suolo di partenza (0S), in assenza di contaminazione (figura 22a); tuttavia questo aumento è stato registrato anche nel suolo tale quale durante la prova (63S1 e 120S1), anche se in misura minore, di conseguenza l'effetto positivo dato dai trattamenti risulta ridotto.

Come osservabile invece in figura 22b e 22c, i microrganismi in grado di degradare i residui lignino-cellulosici mostrano una buona resistenza o tolleranza al CPF. Questo è evidenziato dal fatto che, nei suoli contaminati, indipendentemente dalla concentrazione, l'attività β -glucosidasica non subisce cali significativi, mantenendosi stabile e funzionale; inoltre, l'effetto positivo dei vari trattamenti applicati permane anche in presenza di suolo contaminato. A 25 ppm, la presenza delle piante, da sole (P2) o in combinazione con il vermicompost (PV2), ha portato a valori elevati che sono stati mantenuti durante tutto il corso della prova (T63 e T120)

e ciò è probabilmente dovuto alla presenza di più residui vegetali freschi da attaccare per la β -glucosidasi. I valori più elevati con 50 ppm di CPF sono stati registrati in presenza di piante, sia in combinazione con i lombrichi (120PE3) che con il vermicompost (120PV3); tuttavia, questi incrementi non sono risultati statisticamente significativi.

In conclusione, sebbene l'aumento dell'attività β -glucosidasica rispetto al tempo iniziale sia evidente in tutti i trattamenti, il confronto con il suolo al medesimo tempo di prelievo mostra un incremento meno marcato. Questo suggerisce che, nonostante i trattamenti stimolino inizialmente l'attività, nel tempo anche essi si trovano a fronteggiare le difficoltà tipiche della degradazione dei residui lignino-cellulosici.

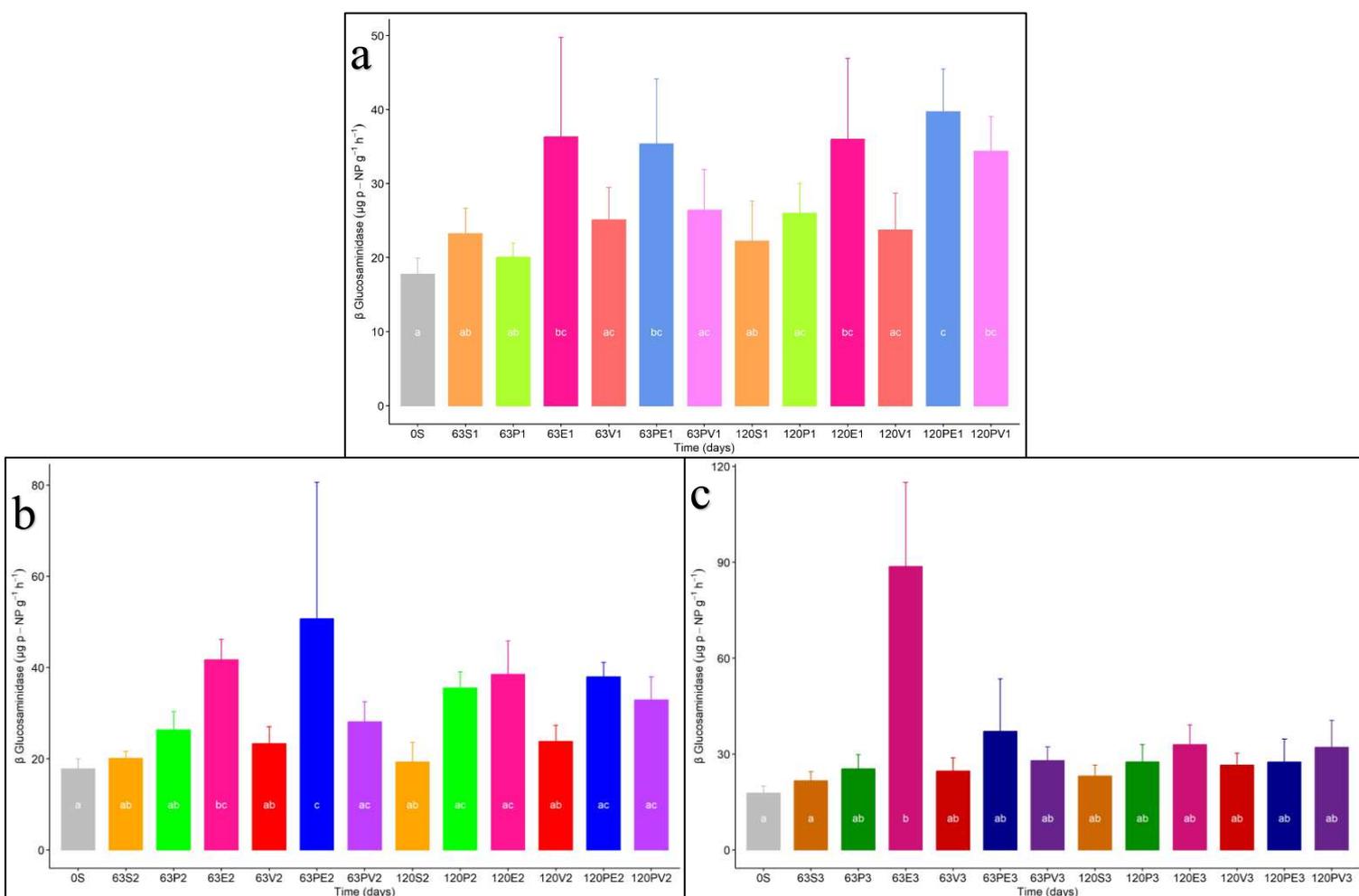


Figura 23: Attività della β -glucosaminidasi durante il test nel suolo incontaminato (a), contaminato con 25 (b) e 50 (c) ppm di CPF.

La Figura 23 riporta l'attività della β -glucosaminidasi, enzima chiave nel ciclo dell'azoto organico.

L'attività della β -glucosaminidasi è aumentata grazie all'applicazione di tutti i trattamenti, in assenza di CPF (figura 23a). In particolare, è possibile osservare come la presenza dei lombrichi, da soli o in combinazione con le piante, abbia portato ai valori più elevati. L'attività enzimatica in 120PE1 è risultata statisticamente differente rispetto al corrispettivo suolo controllo (120S1).

Come osservabile in figura 23b, il CPF ad una dose di 25 ppm non ha avuto alcuna influenza sull'attività della β -glucosaminidasi; i valori registrati sono risultati molto simili a quelli osservati in assenza di contaminazione. Anche in questo caso emerge il ruolo positivo dei lombrichi nell'incrementare l'attività della NAG. A metà della prova (T63), sia 63E2 che 63PE2 hanno registrato valori significativamente superiori rispetto al suolo controllo (63S2) e al suolo iniziale (0S). Tuttavia, a T120 queste differenze non si sono mantenute, suggerendo che l'effetto benefico dei lombrichi diminuisce nel tempo.

Fatta eccezione agli alti valori assunti da 63E3 a metà della prova, l'andamento dell'attività della NAG riscontrato alla dose di contaminazione di 50 ppm (figura 23c) risulta simile a quanto emerso con 25 ppm. Infatti, a T63 i lombrichi (63E3) incrementano notevolmente i valori di attività della NAG, che però non vengono mantenuti nel lungo termine.

In questo esperimento, l'intervento dei lombrichi sulla disponibilità di azoto nel terreno si è dimostrato significativo.

Concludendo, i risultati suggeriscono che, sebbene le tre tecniche di biorisanamento non abbiano determinato un aumento apprezzabile nella velocità di degradazione del clorpirifos — già rapida rispetto a suoli simili — esse hanno contribuito ad aumentare la fertilità biologica del suolo. Tale incremento si riflette sia nel maggiore contenuto di carbonio microbico totale, sia, soprattutto, nel potenziamento di alcune attività enzimatiche fondamentali per la nutrizione delle piante.

CONCLUSIONI

La degradazione del clorpirifos nel suolo di tutte le tesi studiate è risultata veloce rispetto ai normali valori riportati in letteratura, probabilmente grazie alla capacità di questo suolo e delle tecniche di biorisanamento di degradare il TCP, suo principale metabolita, tossico per i microorganismi. Comunque, nessuno dei trattamenti applicati si è dimostrato efficace nel ridurre più rapidamente il contenuto di clorpirifos nel suolo; in tutti i casi, la percentuale di riduzione del CPF ha raggiunto valori prossimi al 100% dopo 120 giorni dalla contaminazione artificiale.

Per quanto riguarda la fertilità biologica del suolo, tutti i trattamenti applicati hanno mostrato effetti positivi, seppur variabili, sia sul contenuto di biomassa microbica sia sulle attività enzimatiche analizzate, non solo su suolo non contaminato, ma anche in presenza di CPF. In particolare, i lombrichi hanno favorito l'incremento della biomassa microbica e dell'attività della β -glucosaminidasi, mentre il vermicompost, da solo o in combinazione con le piante, ha stimolato significativamente l'attività idrolitica complessiva e la fosfatasi alcalina. Le piante, invece, hanno influenzato positivamente l'attività enzimatica della β -glucosidasi, evidenziando un contributo diversificato per ciascun trattamento.

Il tentativo di usare la *Plantago major* come assorbente e degradante del clorpirifos ha evidenziato i limiti dell'uso diretto dei semi anziché di piantine già sviluppate per la decontaminazione di suoli inquinati da clorpirifos. La crescita delle piante è stata rallentata dalla presenza di CPF, suggerendo che futuri test dovrebbero essere condotti impiegando piantine a uno stadio avanzato di sviluppo.

La germinazione dei semi non è stata influenzata dalla presenza di CPF, mentre il tasso di crescita delle piante ha mostrato un andamento negativo dose-dipendente. Le piante nel terreno contaminato hanno impiegato 63 giorni per svilupparsi correttamente. L'utilizzo di vermicompost ha mostrato effetti positivi sullo sviluppo delle piante, anche in suoli contaminati, mitigando gli effetti negativi del CPF.

L'effetto del clorpirifos sui lombrichi è stato indagato mediante il *comet assay*, i risultati del test sono ancora in fase di elaborazione.

BIBLIOGRAFIA

- Abdu, N., Abdulkadir, A., Agbenin, J. O. & Buerkert, A., 2011. Vertical distribution of heavy metals in wastewater-irrigated vegetable garden soils of three West African cities. *Nutrient cycling in agroecosystems*, pp. 89, 387-397.
- Abdu, N., Abdullahi, A. & Abdulkadir, A., 2017. Heavy metals and soil microbes. *Environmental chemistry letters*, 15(1), pp. 65-84.
- Adriano, D. C., 2001. *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals*. New York: Springer.
- Aioub, A. A., Zuo, Y., Aioub, A. A. & Hu, Z., 2021. Biochemical and phytoremediation of *Plantago major* L. to protect tomato plants from the contamination of cypermethrin pesticide. *Environmental Science and Pollution Research*, Volume 28, pp. 43992-44001.
- Alegbeleye, O. O., Opeolu, B. O. & Jackson, V. A., 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a critical review of environmental occurrence and bioremediation.. *Environmental management*, Volume 60, pp. 758-783.
- Ali, A. A. & Al-Homaidan, A. A., 2007. Removal of lead ions from polluted water using *Plantago major* L. and *Phaseolus vulgaris* L.. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(4), pp. 467-472.
- Angon, P. B. et al., 2024. Sources, effects and present perspectives of heavy metals contamination: Soil, plants and human food chain. *Heliyon*.
- Ansari, F., Ahmad, A. & Rafatullah, M., 2023. Review on bioremediation technologies of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil: Mechanisms and future perspective.. *International Biodeterioration & Biodegradation*, pp. 179, 105582.
- Anwar, S. et al., 2009. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1.. *Journal of Hazardous Materials*, 168(1), pp. 400-405.

- Aparicio, J. D. et al., 2022. A review of physicochemical and biological technologies, and the potential of their strategic combination. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 10(2).
- Arao, T. et al., 2010. Heavy metal contamination of agricultural soil and countermeasures in Japan. *Paddy and water Environment*, Volume 8, pp. 247-257.
- Ayilara, M. S. et al., 2023. Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticide. *Frontiers in Microbiology*, Volume 14, p. 1040901.
- Bernardes, M. F. F., Pazin, M., Pereira, L. C. & Dorta, D. J., 2015. Impact of pesticides on environmental and human health. *Toxicology studies-cells, drugs and environment*, pp. 195-233.
- Berrè, E., Vischetti, C., De Berardi, A. & Marini, E., 2020. *Comportamento di due insetticidi in un suolo organico ed effetti ecotossicologici sul lombrico Eisenia foetida*. Ancona: Università Politecnica delle Marche.
- Bloomfield, J. P. et al., 2006. Impacts of climate change on the fate and behaviour of pesticides in surface and groundwater—a UK perspective. *Science of the total Environment*, 369(1-3), pp. 163-177.
- Boyd, R. S., 2010. Heavy metal pollutants and chemical ecology: exploring new frontiers. *Journal of chemical ecology*, Volume 36, pp. 46-58.
- Businelli, M., 2009. *Chimica del suolo*. Perugia: Morlacchi editore.
- Cang, T. D. D. Y. G. Y. Y. L. L. C. L. .. & W. Y., 2017. Combined toxicity of imidacloprid and three insecticides to the earthworm, *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta)... *Environmental Science and Pollution Research* , pp. 24, 8722-8730.
- Carr, R. L., Ho, L. L. & Chambers, J. E., 1997. Selective toxicity of chlorpyrifos to several species of fish during an environmental exposure: biochemical mechanisms.. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(11), pp. 2369-2374.
- Casucci, C. et al., 2020. Zeolite and bentonite as nickel sequestrants in carbonation lime coming from the sugar industry.. *Environmental Science and Pollution Research*, Volume 27, pp. 8803-18809.

- Chalot, M. et al., 2020. Poplar rotation coppice at a trace element-contaminated phytomanagement site: A 10-year study revealing biomass production, element export and impact on extractable elements.. *Science of the Total Environment*, Volume 699, p. 134260..
- Chandra, R., Dubey, N. K. & Kumar, V., 2017. *Phytoremediation of environmental pollutants*. s.l.:CRC Press.
- Chaves, M. M. et al., 2002. How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Annals of botany*, 89(7), p. 907.
- Chen, L. et al., 2022. Phytoremediation of potentially toxic elements (PTEs) contaminated soils using alfalfa (*Medicago sativa* L.): A comprehensive review.. *Chemosphere*, , Volume 293, p. 133577.
- Dadgostar, P., 2019. Antimicrobial resistance: implications and costs. *Infection and drug resistance*, pp. 3903-3910.
- De Bernardi, A. et al., 2020. Phytoremediation potential of crop plants in countering nickel contamination in carbonation lime coming from the sugar industry. *Plants*, 9(5), p. 580.
- De Bernardi, A. et al., 2022. Copper monitoring in vineyard soils of Central Italy subjected to three antifungal treatments, and effects of sub-lethal copper doses on the earthworm *Eisenia fetida*. *Toxics*, 10(6), p. 310.
- De Bernardi, A. et al., 2022. Ecotoxicological effects of a synthetic and a natural insecticide on earthworms and soil bacterial community. *Environmental Advances*, pp. 8, 100225.
- Dermont, G., Bergeron, M., Mercier, G. & Richer-Lafleche, M., 2008. Soil washing for metal removal: a review of physical/chemical technologies and field applications.. *Journal of hazardous materials*, 152(1), pp. 1-31.
- Dilly, O. & Munch, J. C., 1998. Ratios between estimates of microbial biomass content and microbial activity in soils. *Biology and fertility of Soils*, Volume 27, pp. 374-379.
- Du, L. & Liu, W., 2012. Occurrence, fate, and ecotoxicity of antibiotics in agro-ecosystems. A review.. *Agronomy for sustainable development*, Volume 32, pp. 309-327.
- Dzionic, A., Wojcieszynska, D. & Guzik, U., 2016. Natural carriers in bioremediation: A review.. *Electronic Journal of Biotechnology*, Volume 23, pp. 28-36.
- Eivazi, F. & Tabatabai, M. A., 1988. Glucosidases and galactosidases in soils.. *Soil Biology and Biochemistry*, 20(5), pp. 601-606.

- EUROPEA, C., 2020. REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) 2020/17 DELLA COMMISSIONE. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, 10 gennaio.
- Eyambe, G. S. G. A. J. F. L. C. V. B. J. & C. E. L., 1991. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Laboratory Animals*, 25(1). *Laboratory Animals.*, p. 25(1).
- Gavrilescu, M., 2005. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in life sciences*, pp. 5(6), 497-526.
- Glick, B. R., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation.. *Biotechnology advances*, 28(3), pp. 367-374.
- Goswami, M. et al., 2018. Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation.. *J Microbiol Exp*, 6(5), pp. 223-231.
- Gómez-Brandón, M. & Domínguez, J., 2014. Recycling of solid organic wastes through vermicomposting: microbial community changes throughout the process and use of vermicompost as a soil amendment.. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 44(12), pp. 1289-1312..
- Gunya, B. & Masika, P. J., 2022. *Eisenia fetida* worm as an alternative source of protein for poultry: a review.. *International Journal of Tropical Insect Science*, pp. 42(1), 1-8.
- Gvozdenac, S., Inđić, D. & Vuković, S., 2013. Phytotoxicity of chlorpyrifos to white mustard (*Sinapis alba* L.) and maize (*Zea mays* L.): Potential indicators of insecticide presence in water.. *Pesticidi i fitomedicina*, 28(4), pp. 265-271.
- Hayes, T. B. & Hansen, M., 2017. From silent spring to silent night: Agrochemicals and the anthropocene. *Elementa: Science of the Anthropocene*, Volume 5, p. 57.
- He, Z. et al., 2015. Heavy metal contamination of soils: sources, indicators and assessment.. *Journal of Environmental Indicators*, Volume 9, pp. 17-18.
- Hindumathy, C. K. & Gayathri, V., 2013. Effect of pesticide (Chlorpyrifos) on soil microbial Flora and pesticide degradation by strains isolated from contaminated soil. *Journal of Bioremediation and Biodegradation*, 4(2).
- Jacobs, A., Drouet, T. & Noret, N., 2018. Field evaluation of cultural cycles for improved cadmium and zinc phytoextraction with *Noccaea caerulea*.. *Plant and soil*, Volume 430, pp. 381-394 .

- Jenkinson, D. S. & Ladd, J. N., 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover.. In: E. A. Paul & J. N. Ladd, a cura di *Soil Biochemistry: volume 5*. New York and Basel: MARCEL DAKKER, pp. 415-471.
- John, E. & Shaik, J., 2015. Chlorpyrifos: pollution and remediation. *Environmental Chemistry Letters*, Volume 13, pp. 269-291.
- Kabata-Pendias, A., 2000. *Trace elements in soils and plants*.. s.l.:CRC press..
- Khan, F. I., Husain, T. & Hejazi, R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies.. *Journal of environmental management*, 71(2), pp. 95-122.
- Kidd, P. et al., 2015. Agronomic practices for improving gentle remediation of trace element-contaminated soils.. *International journal of phytoremediation*, 17(11), pp. 1005-1037.
- Kueper, B., Stroo, H., Vogel, C. & Ward, C., 2014. IN SITU Chemical Reduction For Source Remediation. In: P. Tratnyek, R. Johnson, G. Lowry & R. Brown, a cura di *Chlorinated Solvent Source Zone Remediation*. New York: Springer.
- Kumar, H. et al., 2022. Bioremediation: plants and microbes for restoration of heavy metal contaminated soils. *In Bioenergy Crops*, pp. 37-70.
- Kumar, S. & Trivedi, P. K., 2018. Glutathione S-Transferases: Role in Combating Abiotic Stresses Including Arsenic Detoxification in Plants. *Frontiers in Plant Science* , Volume 9, p. 751.
- Kumar, V., Singh, J. & Kumar, P., 2019. Heavy metals accumulation in crop plants: Sources, response mechanisms, stress tolerance and their effects.. *Contaminants in agriculture and environment: health risks and remediation*., Volume 1, p. 38.
- Kuppusamy, S. et al., 2018. Veterinary antibiotics (VAs) contamination as a global agro-ecological issue: A critical view. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, Volume 257, pp. 47-59.
- Lamichhane, J. R., 2017. Pesticide use and risk reduction in European farming systems with IPM: An introduction to the special issue. *Crop Prot*, pp. 97, 1-6.
- Lara-Moreno, A. et al., 2022. Chlorpyrifos removal in an artificially contaminated soil using novel bacterial strains and cyclodextrin. Evaluation of its effectiveness by ecotoxicity studies.. *Agronomy*., 12(8).

- Lebelo, K., Malebo, N., Mochane, M. J. & Masinde, M., 2021. Chemical contamination pathways and the food safety implications along the various stages of food production: a review. *International journal of environmental research and public health*, 18(11), p. 5795.
- Lee, S. H., Kim, M. S., Kim, J. G. & Kim, S. O., 2020. Use of soil enzymes as indicators for contaminated soil monitoring and sustainable management.. *Sustainability*, pp. 12(19), 8209..
- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J. & Green, A., 2016. An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and ecological risk assessment: An International Journal*, 22(4), pp. 1050-1064.
- Lopes, P. R. M. et al., 2022. Microbial bioremediation of pesticides in agricultural soils: an integrative review on natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 21(4), pp. 851-876.
- Møller, P., Azqueta, A. & Boutet-Robinet, E., 2020. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): recommendations for describing comet assay procedures and results.. *Nature Protocols.*, Volume 15, p. 3817–3826.
- Mari, M. et al., 2018. Partial replacement of fossil fuels in a cement plant: Assessment of human health risks by metals, metalloids and PCDD/Fs. *Environmental research*, Volume 167, pp. 191-197.
- Marini, E. et al., 2024. Copper toxicity on *Eisenia fetida* in a vineyard soil: a combined study with standard tests, genotoxicity assessment and gut metagenomic analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 31(9), pp. 13141-13154.
- Mincarelli, L. V. C. C. J. & T. L., 2016. DNA damage in different *Eisenia andrei* coelomocytes sub-populations after in vitro exposure to hydrogen peroxide.. *SpringerPlus*, pp. 5, 1-7.
- Nieder, R. & Benbi, D. K., 2024. Potentially toxic elements in the environment—a review of sources, sinks, pathways and mitigation measures.. *Reviews on Environmental Health*, 39(3), pp. 561-575.
- Nwankwegu, A. S. et al., 2022. Bioaugmentation as a green technology for hydrocarbon pollution remediation. Problems and prospects.. *Journal of Environmental Management*, Volume 304, p. 114313.

- Okaiyeto, S. A. et al., 2024. Antibiotic resistant bacteria in food systems: Current status, resistance mechanisms, and mitigation strategies. *Agriculture Communications*, p. 100027.
- O'Neill, J., 2015. *Antimicrobials in agriculture and the environment: reducing unnecessary use and waste : the review on antimicrobial resistance*, Londra: Wellcometrust.
- Pandey, S. & Singh, D. K., 2004. Total bacterial and fungal population after chlorpyrifos and quinalphos treatments in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) soil.. *Chemosphere*, 55(2), pp. 197-205.
- Parham, J. A. & Deng, S. P., 2000. Detection, quantification and characterization of β -glucosaminidase activity in soil.. *Soil biology and biochemistry*, 32(8-9), pp. 1183-1190.
- Park, J., Kim, J. Y. & Kim, K. W., 2012. Phytoremediation of soil contaminated with heavy metals using *Brassica napus*.. *Geosystem Engineering*, 15(1), pp. 10-18.
- Petrini, C., 2016. *Buono, pulito e giusto*. Bra (CN): Slow Food Editore.
- Pollan, M., 2008. *Il dilemma dell'onnivoro*. Torino: GLI ADELPHI.
- Racke, K. D., Fontaine, D. D., Yoder, R. N. & Miller, J. R., 1994. Chlorpyrifos degradation in soil at termiticidal application rates.. *Pesticide science*, 42(1), pp. 43-51.
- Rashid, A. et al., 2023. Heavy metal contamination in agricultural soil: environmental pollutants affecting crop health.. *Agronomy*, 13(6), p. 1521.
- Rodriguez-Campos, J., Dendooven, L., Alvarez-Bernal, D. & Contreras-Ramos, S., 2014. Potential of Earthworms to Accelerate Removal of Organic Contaminants from Soil: A Review. *Appl. Soil Ecol.* 2014, 79, 10–25.. *Applied Soil Ecology*, Volume 79, pp. 10-25.
- Rodriguez-Campos, J., Dendooven, L., Alvarez-Bernal, D. & Contreras-Ramos, S. M., 2014. Potential of earthworms to accelerate removal of organic contaminants from soil: a review.. *Applied Soil Ecology*, Volume 79, pp. 10-25.
- Romantschuk, M. et al., 2023. Bioremediation of contaminated soil and groundwater by in situ biostimulation.. *Frontiers in Microbiology*, Volume 14, p. 1258148.
- Romeh, A. A., 2009. Phytoremediation of water and soil contaminated with imidacloprid pesticide by *Plantago major*, L.. *International Journal of phytoremediation*, 12(2), pp. 188-199.
- Romeh, A. A., 2013. Diethyl phthalate and dioctyl phthalate in *Plantago major* L.. *African Journal of Agricultural Research*, 8(32), pp. 4360-4364.

- Romeh, A. A., 2014. Phytoremediation of cyanophos insecticide by *Plantago major* L. in water.. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, Volume 12, pp. 1-8.
- Romeh, A. A., 2015. Evaluation of the phytoremediation potential of three plant species for azoxystrobin-contaminated soil.. *International journal of environmental science and technology*, Volume 12, pp. 3509-3518.
- Romeh, A. A. & Hendawi, M. Y., 2013. Chlorpyrifos insecticide uptake by plantain from polluted water and soil.. *Environmental chemistry letters*, Volume 11, pp. 163-170.
- Romeh, A. A., Khamis, M. A. & Metwally, S. M., 2016. Potential of *Plantago major* L. for phytoremediation of lead-contaminated soil and water.. *Water, Air, & Soil Pollution*, Volume 227, pp. 1-9.
- Rossi, M., Bianchi, G. & Verdi, G., 2018. Titolo dell'articolo. *Journal Name*, pp. 10-15.
- Sánchez-Castro, I., Molina, L., Prieto-Fernández, M. Á. & Segura, A., 2023. "Past, present and future trends in the remediation of heavy-metal contaminated soil-Remediation techniques applied in real soil-contamination events.". *Heliyon.*, 9(6).
- Sales da Silva, I. et al., 2020. Soil Bioremediation: Overview of Technologies and Trends.. *Energies.*, Volume 13, p. 4664.
- Sannino, F. & Braschi, I., 2008. Assorbimento e Desorbimento degli Agrofarmaci nel Suolo.. In: M. Gennari & M. Trevisan, a cura di *Agrofarmaci - Conoscenze per un Uso Sostenibile.* Bologna: Oasi Albero Perdisa., pp. 171-206.
- Sarma, H. & Joshi, S., 2023. Vermiremediation of Pesticides. In: S. Nag, et al. a cura di *Land Remediation and Management: Bioengineering Strategies.* Singapore: Springer, pp. 211-229.
- Satarug, S. et al., 2003. A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicology letters*, 137((1-2)), pp. 65-83.
- Schnurer, J. & Rosswall, T., 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter.. *Applied and environmental microbiology.*, 43(6), pp. 1256-1261.
- Shan, M. et al., 2006. Effect of chlorpyrifos on soil microbial populations and enzyme activities. *Journal of Environmental Sciences*, 18(1), pp. 4-5.
- Sharma, A. K. V. S. B. T. M. S. G. P. S. H. N. .. & T. A. K., 2019. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*, pp. 1, 1-16.

- Shi, Z. et al., 2020. Vermiremediation of organically contaminated soils: Concepts, current status, and future perspectives. *Applied Soil Ecology*, p. 147.
- Siegrist, R., Crimi, M. & Brown, R., 2011. In Situ Chemical Oxidation: Technology Description and Status.. In: R. C. M. S. T. Siegrist, a cura di *In Situ Chemical Oxidation for Groundwater Remediation*. New York: Springer.
- Smil, V., 2000. *Feeding the World: A Challenge for the Twenty-First Century*. Cambridge, MA: MIT Press .
- Soriano, M. C. H. (., 2014. Soil Contamination, Risk Assessment and Remediation. In: M. Muhammad Aqeel Ashraf, J. Maah & I. Yusoff, a cura di *Environmental risk assessment of soil contamination..* s.l.:BoD–Books on Demand..
- Su, C., 2014. A review on heavy metal contamination in the soil worldwide: Situation, impact and remediation techniques.. *Environmental Skeptics and Critics*, 3(2), p. 24.
- Suman, J., Uhlik, O., Viktorova, J. & Macek, T., 2018. Phytoextraction of heavy metals: a promising tool for clean-up of polluted environment?.. *Frontiers in plant science.*, p. 1476.
- Sun, S., Sidhu, V. & Rong, Y., 2018. Pesticide Pollution in Agricultural Soils and Sustainable Remediation Methods: a Review. *Curr Pollution Rep*, Volume 4, p. 240–250.
- Tabatabai, M. A., 1982. Soil enzymes.. *Methods of Soil Analysis: Part 2 Chemical and Microbiological Properties.*, Volume 9, pp. 903-947.
- Tagliabue, F., Casucci, C. & De Bernardi, A., 2022. *Tossicità di diverse concentrazioni di rame su Eisenia foetida in suolo da vigneto biologico..* Ancona(AN): Univeristà Politecnica delle Marche.
- Tagliabue, F. et al., 2023. A Systematic Review on Earthworms in Soil Bioremediation.. *Applied Sciences*, 3(18), p. 10239.
- Tajudin, S. A., Azmi, M. M. & Nabila, A. T. A., 2016. Stabilization/solidification remediation method for contaminated soil: a review.. *IOP conference series: materials science and engineerin*, 136(1), p. 012043.
- Tamm, L. et al., 2022. Use of copper-based fungicides in organic agriculture in twelve European countries.. *Agronomy*, 12(3), p. 673.
- Thijs, S., Sillen, W., Weyens, N. & Vangronsveld, J., 2017. Phytoremediation: state-of-the-art and a key role for the plant microbiome in future trends and research prospects.. *International journal of phytoremediation*, 19(1), pp. 23-38.

- Tiryaki, O. & Temur, C., 2010. The fate of pesticide in the environment.. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 4(10), pp. 29-38.
- Tripathi, S. et al., 2020. Phytoremediation of organic pollutants: current status and future directions.. *Abatement of environmental pollutants*, pp. 81-105.
- Tudi, M. et al., 2021. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. *International journal of environmental research and public health*, pp. 18(3), 1112.
- Tóth, G., Hermann, T., Da Silva, M. R. & Montanarella, L. J. E. I., 2016. Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. *Environment international*, Volume 88, pp. 299-309.
- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R. & de Carvalho, C. C., 2011. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes.. *Biodegradation*, Volume 22, pp. 231-241.
- Usmani, Z. & Kumar, V., 2015. Role of earthworms against metal contamination: a review.. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, pp. 6(1), 414-427.
- Usmani, Z., Rani, R., Gupta, P. & Prasad, M. N. V., 2020. Vermiremediation of agrochemicals. In: *Pesticides and Chemical Fertilizers*. s.l.:Elviser, Butterworth-Heinemann, pp. 329-367.
- Van Oosten, M. J. & Maggio, A., 2015. Functional biology of halophytes in the phytoremediation of heavy metal contaminated soils.. *Environmental and experimental botany*, Volume 111, pp. 135-146.
- Vance, E. D., Brookes, P. C. & Jenkinson, D. S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology and Biochemistry*, 19(6), pp. 703-707.
- Vijay, M., Mahipal, C., Ram Prakash, Y. & Sunita Kumari, M., 2022. Vermicomposting: a step towards sustainability.. In: P. Saha, A. Barman & A. Bera, a cura di *Sustainable Crop Production: Recent Advances*. s.l.:BoD – Books on Demand, p. 53.
- Vischetti, C. C. L. M. E. C. A. & C. M. D. P., 2007. Microbial impact of the pesticide chlorpyrifos on Swedish and Italian biobeds. *Agronomy for Sustainable Development*, pp. 27, 267-272.

- Vischetti, C., Marini, E., Casucci, C. & De Bernardi, A., 2022. Nickel in the Environment: Bioremediation Techniques for Soils with Low or Moderate Contamination in European Union.. *Environments.*, 9(10), p. 133.
- Vischetti, C. M. E. C. A. C. C. & P. P., 2008. The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture.. *Chemosphere*, pp. 72(11), 1739-1743.
- Vuković, A. et al., 2021. Vermicomposting—facts, benefits and knowledge gaps.. *Agronomy.*, 11(10), p. 1952..
- Wang, J. & Delavar, M. A., 2023. Techno-economic analysis of phytoremediation: A strategic rethinking. *Science of The Total Environment*, p. 165949.
- Wang, K. et al., 2015. Biological response of earthworm, *Eisenia fetida*, to five neonicotinoid insecticides.. *Chemosphere*, Volume 132, pp. 120-126.
- Wang, L. et al., 2022. Persistence behavior of chlorpyrifos and biological toxicity mechanism to cucumbers under greenhouse conditions.. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 242.
- Wang, Z. et al., 2021. Antioxidant defense system responses, lysosomal membrane stability and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to perfluorooctanoic acid: an integrated biomarker approach. *RSC advances*, pp. 11(43), 26481-26492..
- Wielgomas, B. & Krechniak, J., 2006. Toxicokinetic Interactions of α -Cypermethrin and Chlorpyrifos in Rats. *Polish Journal of Environmental Studies*, pp. 267-274.
- Witkowska, D., Słowik, J. & Chilicka, K., 2021. Heavy metals and human health: Possible exposure pathways and the competition for protein binding sites.. *Molecules*, 26(19), p. 6060.
- Wołejko, E. et al., 2022. Chlorpyrifos occurrence and toxicological risk assessment: a review. *International journal of environmental research and public health*, 19(19), p. 12209.
- Xu, Z., Yang, Z., Zhu, T. & Shu, W., 2021. Toxicity of soil antimony to earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) before and after the aging process. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 207, p. 111278.
- Yang, L. et al., 2018. Dissipation of antibiotics in three different agricultural soils after repeated application of biosolids.. *Environmental Science and Pollution Research.*, Volume 25, pp. 104-114.

Zhang, Q. et al., 2017. Human health risk assessment of DDTs and HCHs through dietary exposure in Nanjing, China.. *The LancetChemosphere*, Volume 177, pp. 1771-1772.

Zhao, Y., Wendling, L. A., Wang, C. & Pei, Y., 2017. Behavior of chlorpyrifos and its major metabolite TCP (3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol) in agricultural soils amended with drinking water treatment residuals. *Journal of Soils and Sediments*, Volume 17, pp. 889-900.

SITOGRAFIA

ActaPlantarum, 2024. *Plantago major L. - Scheda IPFI, Acta Plantarum.* [Online]

Available at: https://www.actaplantarum.org/flora/flora_info.php?id=505097

National Center for Biotechnology, I., 2024. *PubChem Compound Summary for CID 2730, Chlorpyrifos.* [Online]

Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorpyrifos>

National Center for Biotechnology, I., 2024. *PubChem Compound Summary for CID 995, Phenanthrene & PubChem Compound Summary for CID 2336, Benzo[a]pyrene.* [Online]

Available at: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenanthrene.](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenanthrene) & [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzo_a_pyrene.](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Benzo_a_pyrene)

Unsworth, J., 2010. *History of pesticide use.* [Online]

Available at: http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31 [Consultato il giorno 10 10 2024].

RINGRAZIAMENTI

Un sentito grazie al professor Vischetti, per la bocciatura che ha cambiato il mio modo di essere studente, per il supporto e la disponibilità lungo il percorso. Un grande grazie a Francesca, correlatrice di fatto, per il tempo condiviso in laboratorio e l'attenta e puntuale revisione. Ad Arianna ed Enrica, per il contributo concreto e l'attenzione dedicatami.

Un grazie infinito alla mia famiglia.

A mia Mamma, dotata di un empatia senza eguali, grazie per aver sacrificato tutto affinché potessi camminare indisturbato.

A mio Babbo, a cui non dico mai abbastanza "ti voglio bene", per predicare bene e razzolare anche meglio.

A mio Fratello, la mia metà.

A mia Sorella, la versione ben riuscita dei tre.

A Mildred e a Giuliano per essere coautori di questa famiglia fuori dal comune.

Ai miei nonni, artefici insospettabili.

A Laetitia, grazie per amarmi più di quanto meriti, in un modo che supera ogni mia capacità di ricambiare. Nei tuoi occhi sfavillanti di lacrime ho visto la versione migliore di me. Spero che ogni mio gesto possa raccontarti ciò che il cuore non riesce a dire.

Un grazie speciale alla Calcinara per avermi permesso di conciliare attività professionale e accademica senza sforzo, per avermi fatto sentire parte della famiglia e avermi insegnato quanto sia prezioso un gesto agricolo. A Paolo ed Eleonora per aver creato valore attraverso dei valori, ai momenti spensierati con Fra, ai discorsi con Massi.

Un pensiero speciale agli amici che mi hanno accompagnato lungo questa strada, grazie per aver reso questo viaggio meno solitario e infinitamente più gioioso.

Un sentito grazie al progetto Policoro, a Sara, all'equipe di Caritas e a quella di Pastorale Giovanile. Per essere stati una bussola quando avevo bisogno di orientarmi.

Sempre sia lodato il tuo nome Signore, per donarmi felice compimento e sognare più in grade di quanto sarei mai capace.

Infine, a te che stai leggendo i ringraziamenti, probabilmente l'unica cosa che ritieni interessante all'interno di questa tesi (come biasimarti). Se hai trovato il tuo nome benone, altrimenti, sappi che ti voglio bene lo stesso; d'altronde lo sai, sono una frana con in nomi.