



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

ACCUMULO DI RAME IN SUOLI DI VIGNETI
BIOLOGICI ED EFFETTI SULLE ATTIVITA'
FUNZIONALI E SUL DNA DEL
BIOINDICATORE *EISENIA FOETIDA*

Copper accumulation in organic vineyard soils and effects
on functional activities and DNA of the bioindicator
Eisenia foetida

TIPO TESI: sperimentale

Studente:

CHIARA RIVOSECCHI

Chiara Rivosecchi

Relatore:

PROF. COSTANTINO VISCHETTI

Costantino Vischetti

Correlatore:

PROF. GIANFRANCO ROMANAZZI

DOTT.SSA ARIANNA DE BERNARDI

Arianna De Bernardi

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

A me stessa,
a Mamma e Babbo

SOMMARIO

SCOPO DELLA TESI	3
CAPITOLO 1 IL RAME E IL SUO COMPORTAMENTO NEL SUOLO.....	4
1.1 Il rame come elemento chimico	4
1.2 Le forme di rame nel suolo	5
1.3 Contaminazione del rame nei suoli viticoli.....	10
CAPITOLO 2 LEGISLAZIONE EUROPEA ED ITALIANA	14
CAPITOLO 3 AGRICOLTURA E VITICOLTURA BIOLOGICA NELLE MARCHE	19
CAPITOLO 4 ECOTOSSICOLOGIA E SPECIE BIOINDICATRICI.....	23
4.1 Introduzione all'ecotossicologia	23
4.2 <i>Eisenia sp.</i> come specie bioindicatrice.....	26
4.3 Effetti del rame su <i>Eisenia foetida</i>	31
CAPITOLO 5 MATERIALI E METODI.....	35
5.1 Area di studio	35
5.2 Metodo di campionamento.....	38
5.3 Analisi dei suoli.....	39
5.4 Estrazione delle tre forme di rame	40
5.5 Determinazione della concentrazione di rame	43
5.6 Contaminazione dei suoli e impostazione prova con <i>Eisenia foetida</i>	43
5.7 <i>Comet assay</i>	45
CAPITOLO 6 RISULTATI E DISCUSSIONE	47
6.1 Residui di rame nella prima campagna di monitoraggio (ottobre 2020)	47
6.1.1 Correlazioni delle tre forme di rame con le proprietà chimico-fisiche del suolo 57	
6.2 Residui di rame nella seconda campagna di monitoraggio (ottobre 2021).....	58
6.3 Conclusioni sulle due campagne di monitoraggio	64
6.4 Effetti sulle attività funzionali e sul DNA del bioindicatore <i>Eisenia foetida</i>	65
CONCLUSIONI	71

BIBLIOGRAFIA.....	72
SITOGRAFIA	75
RINGRAZIAMENTI	76

SCOPO DELLA TESI

La presente tesi ha avuto l'obiettivo di monitorare le concentrazioni di rame in vigneti commerciali coltivati a biologico ed indagare gli effetti di dosi sub-letali di questo elemento sul lombrico terricolo *Eisenia foetida*, organismo non bersaglio ritenuto specie sentinella per l'elevata sensibilità ad agenti xenobiotici. La misurazione dei livelli delle tre forme di rame (totale, biodisponibile e solubile) nei suoli è stata condotta nel 2020 in tre vigneti situati nella provincia di Ancona e ripetuta nel 2021 in due di essi. Nello specifico in due tre vigneti è stata condotta in filari con tre diverse conduzioni di trattamenti anticrittogamici: l'impiego del trattamento rameico per l'intera stagione vegetativa, l'impiego del trattamento rameico nella prima parte della stagione e di un sostituto al rame (chitosano cloridrato) nella seconda parte ed infine l'impiego del solo sostitutivo per tutta la stagione mentre nel terzo vigneto sono stati valutati due diversi tipi di inerbimento.

Il monitoraggio è stato condotto per gli anni 2020 e 2021 per evidenziare eventuali differenze nelle concentrazioni di rame nei due siti.

Partendo dalle dosi riscontrate, è stato realizzato un esperimento di laboratorio per esaminare gli eventuali danni causati dalla presenza del rame sulle attività funzionali e sul DNA dell'organismo scelto impiegando la tecnica innovativa del *Comet assay* (test della cometa).

Per un ulteriore confronto, la prova è stata ripetuta anche a dosi maggiorate del 55% e del 158% rispetto alla concentrazione riscontrata in campo.

Capitolo 1

IL RAME E IL SUO COMPORTAMENTO NEL SUOLO

1.1 Il rame come elemento chimico

Il rame (Cu) è un metallo di transizione con numero atomico 29, peso atomico 63,546, appartenente al gruppo 11, sottogruppo IB della tavola periodica degli elementi e la sua configurazione elettronica è $2-8-18-1$ o $(Ar)3d^{10}4s^1$. A $20^{\circ}C$ il rame ha una densità di $8,96$, a $1083^{\circ}C$ si colloca il suo punto di fusione mentre bolle a $2567^{\circ}C$.

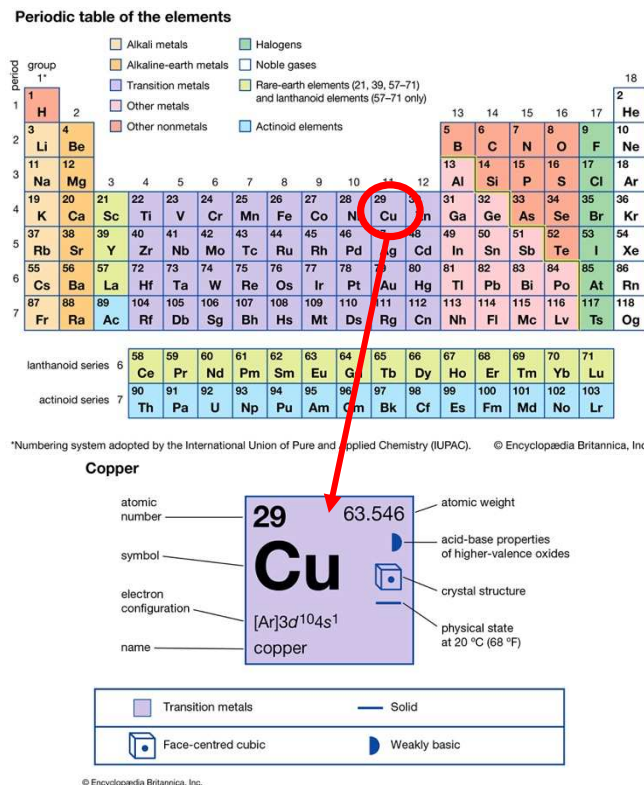


Figura 1-1: Tavola periodica degli elementi e simbolo,
 Fonte: <https://www.britannica.com/science/copper>

Il rame naturale è una miscela di due isotopi stabili: $^{63}_{29}Cu$ al 69,1% e $^{65}_{29}Cu$ al 30,9% e allo stato nativo in natura è un cristallo ad abito cubico o cubottaedrico. Risulta difficile trovare il rame nei giacimenti primari e secondari di una certa importanza data la sua facile ossidabilità ma è presente in numerosi giacimenti allo stato di combinazione. Il rame nei suoi composti si

comporta da monovalente (+1) o bivalente (+2), tuttavia in condizioni speciali possono essere presenti anche composti col rame trivalente. I minerali che si rinvencono sono ossigenati e solforati ai quali appartengono rispettivamente la calcosina Cu_2S , la calcopirite CuFeS_2 , la covellite CuS , la bornite Cu_5FeS_4 , l'enargite Cu_3AsS_4 , la tetraedrite $\text{Cu}_{12}(\text{SbS}_3)_4\text{S}$, la tennantite $\text{Cu}_{12}(\text{AsS}_3)_4\text{S}$ e l'azzurrite $\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$, la malachite $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$, la cuprite Cu_2O e altri di solo valore scientifico. Quando illuminato da luce bianca assume la caratteristica colorazione rossastra e, se ridotto in lamine sottili, per trasparenza è verde-blu. Tra le sue caratteristiche si può annoverare l'elevata duttilità e malleabilità sia a caldo che a freddo e la capacità di condurre bene l'elettricità e il calore, infatti, come metallo puro è secondo solo all'oro per la conducibilità termica ed elettrica. Inoltre, l'alterazione non avviene all'aria secca mentre se esposto all'aria umida una patina verde di carbonato basico di rame (verderame) lo riveste per preservarlo da un'ossidazione successiva. A livello commerciale viene utilizzato principalmente dalle industrie elettriche, per esempio allo stato puro come catalizzatore o nei conduttori elettrici, una parte considerevole è prodotta in leghe (da ricordare sono bronzi e ottoni) ed infine è utilizzato anche sotto forma di sale (<https://www.treccani.it/enciclopedia/rame/>, <https://www.britannica.com/science/copper>). L'uso in agricoltura del rame viene descritto nel paragrafo successivo.

1.2 Le forme di rame nel suolo

Tra le pratiche agricole, la viticoltura svolge sicuramente un ruolo preponderante in molti paesi (M. Komárek et al., 2010), ma le aree viticole mondiali si trovano spesso in regioni climatiche favorevoli (estati calde ed umide, precipitazioni in tarda primavera ed in estate) alla crescita di malattie fungine come la peronospora, causata dall'oomicete biotrofo *Plasmopara viticola* (Brunetto et al., 2016, Gessler et al., 2011). Questa è una malattia potenzialmente distruttiva ed è stata controllata dal 1850 circa fino ad oggi attraverso l'utilizzo regolare di fungicidi a base di rame (nel 1995 il rame ha raggiunto il 20% delle vendite mondiali di fungicidi, Mackie et al., 2012), soprattutto nei vigneti biologici grazie al loro basso costo, all'efficacia nel controllo di peronospora e alla bassa tossicità per le piante (Ruyters, et al., 2013, Miotto et al., 2014; Speiser et al., 2000). Di conseguenza ciò ha portato ad un largo accumulo di Cu nei suoli viticoli eccedendo le concentrazioni necessarie (5-20 mg/L, Zhenli et al., 2005) ad una corretta crescita e funzionamento delle piante. Infatti il Cu è un micronutriente fondamentale legato a processi biochimici e fisiologici di crescita e sviluppo, ma se la concentrazione della frazione biodisponibile di Cu è alta, può avere un effetto tossico sulle piante (l'effetto tossico si esplica a concentrazioni >20 mg/L, Zhenli et al., 2005) compromettendo crescita, produttività, qualità

e valore nutrizionale della produzione (comporta infatti degradazione della clorofilla e dei carotenoidi, aumento della permeabilità della membrana, dei tassi di perossidazione lipidica e dell'attività dell'RNAsi) e sui microrganismi del suolo (Pietrzak e McPhail, 2004, Yruela, 2005, Ambrosini et al., 2015, Cambroll et al., 2013; Juang et al., 2004; Komárek et al., 2010; Tanyolac et al., 2007; Toselli et al., 2009, Lid on e Henriques, 1993a; Lura et al., 1994). Raggiungere livelli di tossicità per le viti è improbabile poiché il Cu è solitamente presente nello strato superficiale mentre la maggiore densità radicale si sviluppa tra 0,4 e 0,8 m con possibilità di raggiungere i 6 m di profondità, ma concentrazioni aumentate di tale elemento nel suolo hanno portato ad un suo alto contenuto nelle uve e ad una diminuzione di alcuni aminoacidi nel succo d'uva (Lehnart et al., 2008, García-Esparza et al., 2006; Miotto et al. 2014; Provenzano et al., 2010, Garde-Cerdán et al., 2017). In alcuni casi, eccede anche i limiti legislativi che l'UE ha imposto per i suoli agricoli ovvero la PNEC (*Predict No Effect Concentration*) fissata tra 20 e 200 mg Cu/kg a seconda delle proprietà del suolo, utile a proteggere sostenibilità e produttività dell'agroecosistema (Komárek, et al., 2010). Inoltre, la contaminazione da metalli, oltre ad essere un problema ambientale e tossicologico in quanto unita a lavorazione ed erosione riduce la qualità dei suoli specialmente in quelli viticoli con proprietà biochimiche già notevolmente danneggiate, desta preoccupazione all'opinione pubblica per i residui di fungicidi presenti nell'acqua e nei prodotti vinicoli consumati quotidianamente (M. Komárek, et al., 2010).

Il materiale parentale e i processi di formazione del suolo influenzano lo stato iniziale e la concentrazione del Cu di fondo, che si attesta ad una media di 30 mg/kg con un *range* che varia da 6 a 80 mg/kg (M. Komárek, et al., 2010, Brunetto et al., 2016, Kabata-Pendias,). Una volta giunto al suolo, il Cu varia celermente la sua speciazione ed è presente in diverse forme distribuite tra le fasi solide e la soluzione circolante. La ripartizione del Cu tra la fase solida e la fase liquida del suolo dipende da fenomeni di precipitazione/dissoluzione (processi importanti che regolano la solubilità in suoli calcarei e in suoli con pH>7), adsorbimento/desorbimento, dalle reazioni di ossidoriduzione, dalla chelazione e l'entità di ogni processo è funzione delle reazioni nel suolo e degli effetti della rizosfera (M. Komárek, et al., 2010, Brunetto et al., 2016, Adriano, 2001, Zhenli et al., 2005). In soluzione il Cu può essere presente come ione Cu^{2+} libero (il Cu in soluzione si comporta secondo la reazione: $\text{Soil-Cu} + 2\text{H}^+ = \text{Cu}^{2+} \log K = 2,8$, Zhenli et al., 2005), ma nella maggior parte dei casi si formano diverse specie ioniche oppure si trova complessato con anioni inorganici e molecole organiche. Tale complessazione ostacola l'adsorbimento del Cu. Nella fase solida intervengono

l'adsorbimento non specifico attraverso i processi di occlusione, coprecipitazione e sostituzione (poiché si ha la formazione di legami ionici, il Cu così adsorbito è facilmente scambiabile ed influenza debolmente la sua disponibilità), l'adsorbimento specifico (attraverso reazioni con donatori di coppie di elettroni e si instaurano in questo modo legami covalenti alquanto forti) e la complessazione con la sostanza organica (G. Brunetto, et al., 2016, A. Kabata-Pendias). Tuttavia, l'adsorbimento specifico è più rilevante rispetto a quello non specifico per quanto riguarda la concentrazione di Cu in soluzione circolante (D. C. Adriano, 2001).

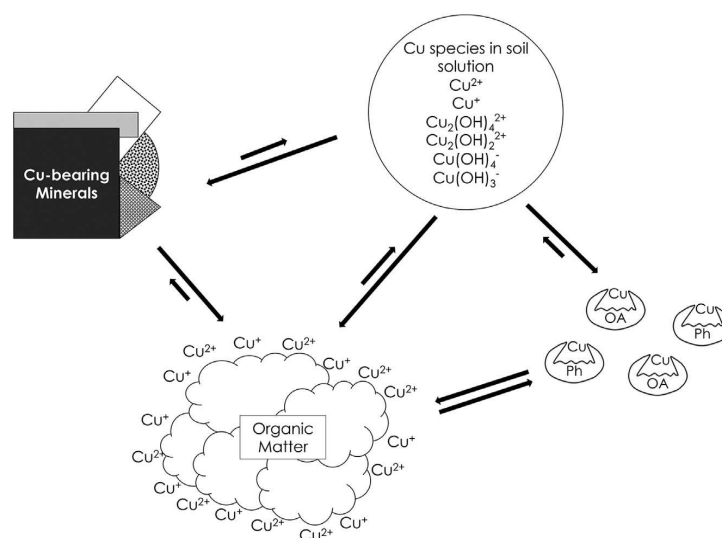


Figura 1-2: Ripartizione del rame tra fase solida e soluzione circolante (OA=organic acids, Ph=phenolic compounds), Fonte: G. Brunetto, et al., 2016

Essendo fortemente complessato e assorbito dalla sostanza organica, da ossidi di Fe e Mn e da minerali argillosi è uno dei metalli meno mobili e così regolarmente distribuito lungo il profilo del suolo (la distribuzione può essere influenzata anche dall'accumulo di sostanza organica e pH). Infatti, in terreni limosi e argillosi il Cu non ha movimento verso il basso mentre un piccolo movimento di circa 1-3 cm si registra in suoli sabbiosi con bassa CSC. Comunque, il suo accumulo avviene nei primi cm di suolo superficiale (D. C. Adriano, 2001).

Per cercare di descrivere il comportamento di questo elemento nel suolo è necessario tenere in considerazione l'interazione tra le proprietà chimico-fisiche del metallo con le caratteristiche del suolo come pH, capacità di scambio cationico (CSC), sostanza organica, idrossidi di Fe, Al e Mn, contenuto e tipo di argilla, granulometria, chelanti solubili, anioni di acidi organici, potenziale ossido riduttivo, che influenzano la sua mobilità e biodisponibilità (la biodisponibilità è anche influenzata dai cambiamenti di pH causati dalla radice, dalle attività microbiche indotte dalla radice e la pianta attraverso l'escrezione di composti che legano il

metallo può complessare gli ioni cuprici liberi e così ridurre direttamente la biodisponibilità, W. H. O Ernst, 1996, M. B. Pedersen et al, 2000) (E. Capri, M. Trevisan,). In particolare:

i. pH

Il pH, insieme alla CSC, è tra le proprietà che influenza più di altre la mobilità e la biodisponibilità dei metalli nel suolo (E. Capri, M. Trevisan, D. C. Adriano, 2001). In generale, minerali di origine antropogenica hanno una mobilità superiore a differenza di quelli di origine naturale più fortemente interagenti con le particelle del suolo (A. Kabata-Pendias,). Il Cu a valori di pH acidi (<6) è più disponibile in forma solubile, in questo modo in suoli acidi si muove tra i profili più agevolmente andando ad inquinare l'acqua di falda. Tuttavia, la sua solubilità può aumentare anche a valori di pH alcalini (>7,5) poiché si ha la solubilizzazione della sostanza organica e la formazione dei complessi Cu-SOM (*Soil Organic Matter*) (M. Komárek, et al., 2010). A valori di pH superiori a 8, come quelli dei suoli utilizzati per questo lavoro di tesi, le componenti di Cu maggiormente presenti sono i complessi idrossi anionici (insolubili) mentre a pH<7 i prodotti dell'idrolisi del rame sono i più importanti (Kabata-Pendias, 2001).

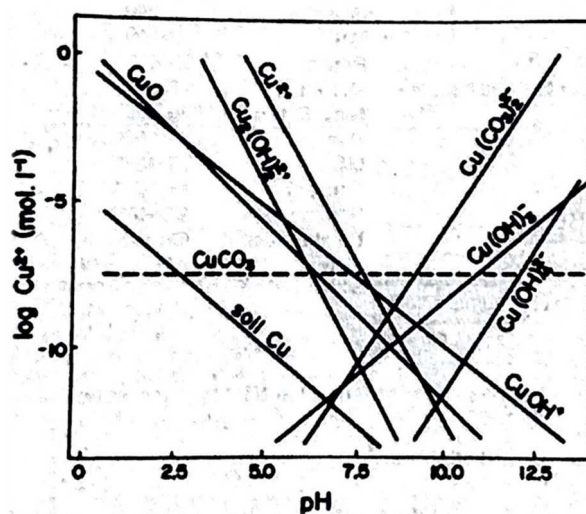


Figura 1-3: Speciazione del rame in funzione del pH, Fonte: Kabata-Pendias, 2001

Inoltre, il pH regola sia la carica superficiale dei minerali del suolo e quindi la loro capacità di assorbire gli ioni rame dalla soluzione sia la formazione dei complessi organici (A. Kabata-Pendias,). Di seguito viene riportato il grafico che mostra le correlazioni tra il pH e la capacità di adsorbimento dei costituenti del suolo:

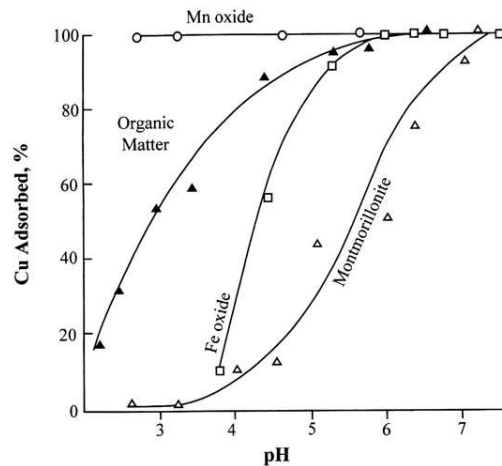


Figura 1-4: Correlazioni tra pH e adsorbimento del Cu, Fonte: D. C. Adriano, 2001

A $\text{pH} > 7$ la forma più importante per l'adsorbimento è il CuOH^+ più che il Cu^{2+} (D. C. Adriano, 2001). L'adsorbimento fa abbassare il pH poiché si ha una sostituzione di H^+ e/o Al^{3+} , d'altra parte l'adsorbimento aumenta con il pH. Acidi organici come l'acido ossalico o citrico diminuiscono l'adsorbimento del Cu (forse a causa della chelazione), anche la presenza del Cl^- influenza l'adsorbimento (Zhenli, et al., 2005). L'assorbimento del Cu nel suolo segue l'isoterma di Langmuir o di Freundlich (M. Komárek, et al., 2010);

ii. Sostanza organica

Il Cu nel suolo è prevalentemente presente in complessi Cu-SOM in forma di chelati ad anello a cinque membri (A. Kabata-Pendias,). La complessazione del Cu con la SOM rappresenta il più importante fenomeno di ritenzione del Cu nel suolo e ha diversi aspetti positivi quali l'inferiore tossicità rispetto al Cu^{2+} libero e la minore vulnerabilità della SOM legata al Cu alla biodegradazione (M. Komárek, et al., 2010). È stato stimato che circa l'80% delle forme di rame solubile (la concentrazione del rame in soluzione è funzione della reattività del rame con i gruppi funzionali sulla superficie della fase solida e delle reazioni con specifiche sostanze) siano chelati organici e la complessazione organica regoli la mobilità del rame lungo i profili del suolo e la sua biodisponibilità. Quest'ultima varia in funzione del peso molecolare dei complessi e della quantità presente (composti a basso peso molecolare potrebbero incentivare la disponibilità di rame alle piante) (A. Kabata-Pendias,). Gli acidi umici e fulvici formano complessi stabili quando il Cu è presente in piccole quantità e il contenuto massimo di Cu^{2+} che può essere legato agli acidi umici e fulvici è più o meno uguale al contenuto di gruppi funzionali acidi e va da 48 a 160 mg Cu/gr acido umico (valori variano in base alle caratteristiche fisiche e chimiche della sostanza organica). La capacità di complessazione deriva dalla presenza di gruppi funzionali che hanno l'ossigeno come carbossile, idrossile

fenolico e carbonili (D. C. Adriano, 2001). Gli acidi umici tramite gli ossigeni funzionali instaurano una coordinazione diretta con il Cu^{2+} mentre lo scambio cationico con i metalli alcalino e alcalino terrosi è uno scambio triplo Cu^{2+} , Ca^{2+} e H^+ (A. Kabata-Pendias,). I complessi con gli acidi fulvici sono più mobili poiché hanno minor peso molecolare e maggiore acidità (D. C. Adriano, 2001). La SOM influenza la mobilità del Cu in due direzioni opposte: il particolato (POM: *Particulate Organic Matter*) funziona da adsorbente mentre la SOM solubile complessa il Cu rendendolo così più solubile specialmente a pH alcalini. Il Cu nei suoli viticoli è principalmente associato alla frazione di suolo ossidabile rispetto a quella riducibile a seconda del contenuto di SOM e di ossidi (M. Komárek, et al., 2010);

iii. Ossidi di Fe e Mn

Gli idrossidi di Mn sono i più affini al Cu mentre le argille meno affini, passando in ordine decrescente di affinità alla sostanza organica e agli idrossidi di Fe (M. Komárek, et al., 2010). I minerali compresi tra $0,0001$ a $1 \mu\text{M dm}^{-3}$ e 30 a $1000 \mu\text{M g}^{-1}$ sono capaci di adsorbire il rame. Tra questi, idrossidi di Fe e Al, così come carbonati, fosfati e in una certa misura anche argille silicati, hanno grande affinità nel legare il rame in maniera non diffondibile originando una porzione stabile del metallo attraverso legami a ponte ossigeno (A. Kabata-Pendias,). La presenza del Cu in forme meno disponibili che quindi diminuiscono la sua mobilità e disponibilità è chiamata “aging”. Come detto prima, i carbonati sono un altro fattore che influenza la mobilità del Cu nel suolo e infatti in suoli calcarei con elevata presenza di carbonati l’attività del Cu è legata alla precipitazione superficiale del CuCO_3 . Il Cu nei suoli calcarei viene ritenuto attraverso la coprecipitazione con i carbonati associata al rilascio di Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ e H^+ nella soluzione circolante in rapporti equimolari (M. Komárek, et al., 2010);

iv. Tipo di argilla e granulometria

I minerali argillosi hanno una capacità di assorbimento che varia in funzione della loro CSC ovvero montmorillonite>illite>caolinite (D. C. Adriano, 2001). Le frazioni più fini della tessitura hanno una funzione importante nell’accumulo e nell’immobilizzazione nel suolo di metalli potenzialmente tossici (M. Komárek, et al., 2010).

1.3 Contaminazione del rame nei suoli viticoli

L’accumulo di elementi in tracce nel suolo determina una repressione delle funzioni del suolo, tossicità per i micro/macroorganismi e per le piante, l’entrata nella catena alimentare con

conseguenze per la salute umana. Fonti naturali e antropogeniche possono causare l'ingresso dell'elemento nell'ecosistema agricolo. Nel caso del rame, oltre alla tossicità per micro/macroorganismi e per le piante, viene disturbato il ciclo dei nutrienti ed impedita la mineralizzazione di nutrienti fondamentali quali l'azoto ed il fosforo (la mineralizzazione dell'azoto, e del carbonio, sembra essere interrotta con concentrazioni di Cu da 20 a 1445 mg/kg, Minnich e Mc Bride, 1986) e l'accumulo proviene dall'uso di concimi, fanghi di depurazione e soprattutto dai composti rameici per il controllo delle malattie delle piante (M. Romić et al., 2014).

Come scritto nel paragrafo 1.2, il Cu viene accumulato negli orizzonti superficiali del suolo a causa dell'immobilizzazione dovuta alla forte interazione con la SOM, ossidi di Fe e Mn e di conseguenza le concentrazioni riscontrate nei primi cm di suoli viticoli a livello europeo molto spesso superano i 200 mg/kg e le concentrazioni più alte si riscontrano sulla fila piuttosto che nell'interfilare (C. Beni e G. Rossi, 2009) ed in vigneti vecchi e abbandonati (M. Komárek, et al., 2010).

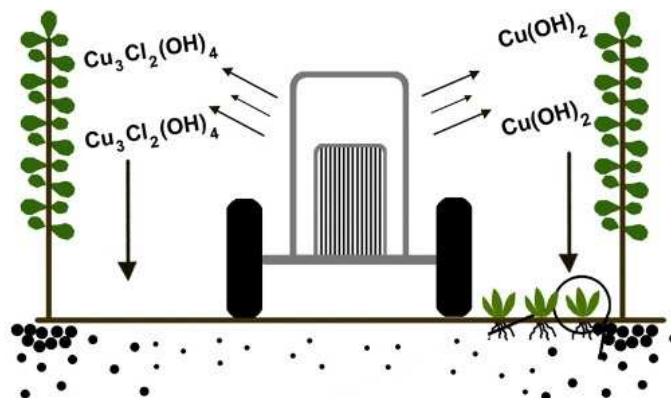


Figura 1-5: Trattamento rameico e distribuzione nel vigneto, Fonte: riadattata da Mackie et al., 2012

A scala mondiale i valori della concentrazione del Cu negli strati superficiali di suoli viticoli si attestano su questi intervalli:

Tabella 1-1: Concentrazione del Cu totale nei suoli viticoli mondiali, Fonte: A. La Torre, 2018

<u>Continente</u>	<u>Paese</u>	<u>Rame totale (mg/kg)</u>	<u>Metodi di estrazione utilizzati</u>	<u>Riferimenti</u>
Europa	Repubblica Ceca	2-168	O ₂ +O ₃ +NO x a 400°C +HNO ₃ +HF	Komárek et al., 2008
	Francia	323	HF	Flores-Vélez et al., 1996
		248-378	HClO ₄ +HF	Besnard et al., 2001

		20-251	HNO ₃ +HCl	Brun et al., 2001
		57-332	LiBO ₂ a 550°C + HNO ₃	Parat et al., 2002
		22-398	HClO ₄ +HF	Chaignon et al., 2003
		17-34	HClO ₄ +HF	Dousset et al., 2007
	Islanda	50-276	Estrazione con acqua regia (ISO 11466, 1995)	Runjić and Čustović, 2017
	Italia	9-945	HNO ₃ +HCl	Deluisa et al., 1996
		215-372	HNO ₃ +HCl	Dell'Amico et al., 2008
	Portogallo	58-130	-	Magalhães et al., 1985
	Slovenia	87-120	HNO ₃ +HCl	Rusjan et al., 2007
	Spagna	25-272	HNO ₃ +HCl+HF	Fernández-Calviño et al., 2008
55-112		HNO ₃ +HCl+HF	Fernández-Calviño et al., 2009	
Americhe	Brasile	37-3216	HNO ₃ +HClO ₄ +HF	Mirlean et al., 2007
Oceania	Australia	9-249	15.5 M HNO ₃	Pietrzak and McPhail, 2004
		6-223	HNO ₃ +HCl	Wightwick et al., 2008

Nella Tabella 1-1 è possibile notare come molte concentrazioni siano superiori ai limiti legislativi *warning and critical* europei che sono rispettivamente di 50 e 140 mg/kg (tuttavia, i valori *warning* e *critical* non descrivono la ripartizione del Cu nel vigneto e il suo assorbimento da parte di flora e fauna, Mackie et al., 2012).

L'uso ripetuto della poltiglia bordolese in Francia ha causato degli accumuli di Cu anche sopra i 1000 mg/kg (vengono effettuate dalle 3 alle 10 applicazioni/anno con concentrazioni medie da 100 a 1500 mg/kg) e concentrazioni ancora più elevate, che vanno sopra i 3000 mg/kg, sono state osservate in vigneti antichi del Brasile. Questi valori possono essere messi in relazione con l'influenza del clima ovvero in regioni umide è maggiore l'applicazione a dosi più elevate di fungicidi rameici dovuta allo sviluppo più vigoroso del fungo. Infatti, in Italia, concentrazioni più elevate sono state misurate nelle regioni umide di montagna piuttosto che nelle secche regioni meridionali. Ulteriore causa di contaminazione da rame è l'erosione poiché è diffusa la localizzazione dei vigneti in collina o su pendii ancora più ripidi e soprattutto quando non sono presenti colture di copertura nell'interfilare utili a trattenere il suolo (Mackie et al., 2012). L'erosione aumenta la mobilità del rame così da andare ad

inquinare l'acqua di falda e superficiale sia come forme solubili in acqua sia legate ai colloidi ed essere tossico per gli organismi acquatici. Oltre all'erosione, anche il pH e le pratiche agricole influenzano la mobilità del Cu in suoli viticoli ed il potenziale inquinamento delle acque di falda. Le lavorazioni (specialmente l'aratura, utilizzata per contenere la crescita delle infestanti nel vigneto) ha un'influenza sulla distribuzione del rame lungo il profilo ovvero è stata riscontrata la stessa concentrazione di Cu nel suolo superficiale e a 40 cm, ciò dovuto al rimescolamento (Mackie et al., 2012). Inoltre, i vigneti biologici soffrono di maggiore compattamento del suolo soprattutto dell'interfilare dovuto alla maggiore necessità di lavoro meccanico e quindi si consiglia l'impiego di macchine leggere con pneumatici gonfiati con la giusta pressione (C. Beni e G. Rossi, 2009).

Diverse sono le pratiche utilizzate per cercare di prevenire il rischio erosione come l'inerbimento dell'interfilare, l'utilizzo di dispositivi antideriva, l'applicazione di scarti di cantine e di ammendanti organici. Questi ultimi incrementano la fertilità e riducono il dilavamento poiché la POM apportata opera sia l'assorbimento del Cu sia il tamponamento del suolo mentre è necessario prestare attenzione agli scarti di cantine (bentonite, perlite) perché, se da una parte migliorano le proprietà del suolo, dall'altra potrebbero aumentare la concentrazione dei metalli (M. Komárek, et al., 2010). In aggiunta, il trattamento a base di rame viene effettuato spruzzando direttamente sulla chioma il prodotto attraverso una nebbia in grado di bagnare completamente la vegetazione ma ciò causa deriva e caduta al terreno con conseguente inquinamento puntiforme. L'uso di dispositivi antideriva potrebbe aiutare a prevenire la perdita di prodotto (Mackie et al., 2012).

Capitolo 2

LEGISLAZIONE EUROPEA ED ITALIANA

L'uso del rame in viticoltura deve essere coerente con gli obiettivi della transizione agroecologica e, poiché il rame si accumula e immobilizza nei suoli andando ad influenzarne la qualità biologica, è stato necessario definire delle soglie di tossicità del rame e giustificare la riduzione dell'uso del rame in viticoltura (Karimi et al., 2021).

La Direttiva 2009/37/CE del 23 aprile (<https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:104:0023:0032:IT:PDF>) ha approvato come sostanze attive composti di rame cinque forme di rame ovvero idrossido di rame, ossicloruro di rame, ossido di rame, poltiglia bordolese e solfato di rame tribasico con differenti abilità di difesa fitosanitaria legate alla loro capacità di liberare ioni in soluzione. Nel gennaio 2018 l'EFSA (*European Food Safety Authority*) in una review (<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2018.5152>) ha pubblicato la valutazione del rischio delle sostanze attive composti di rame. In seguito ai commenti che l'EFSA ha ricevuto sul *Renewal Assessment Report* (RAR) dagli Stati Membri, dai richiedenti e dalla *EU Copper Task Force*, è stato decretato che dovrebbero essere richieste informazioni aggiuntive ai richiedenti e che l'EFSA dovrebbe guidare una consultazione di esperti nell'ambito della tossicologia dei mammiferi, dei residui, del destino e comportamento ambientale e dell'ecotossicologia. Questa mancanza di dati non ha permesso di completare la valutazione del rischio basata sugli usi rappresentativi (consultabili al seguente link https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/action/downloadSupplement?doi=10.2903%2Fj.efsa.2018.5152&file=efs25152-sup-0001-Appendix_A.pdf, La Torre et al., 2018).

Tuttavia, successivamente ai rischi esposti dall'EFSA, le sostanze attive composti di rame sono state approvate come sostanze candidate alla sostituzione con approvazione d'uso dal 1° gennaio 2019 al 31 dicembre 2025. Il Reg. di esecuzione (UE) n. 84/2018 ha fissato al 31 dicembre 2019 la scadenza per l'approvazione delle sostanze attive composti di rame come presente nell'allegato "Sostanze attive approvate per l'utilizzo nei prodotti fitosanitari" parte A del regolamento di esecuzione (UE) n. 540/2011:

N.	Nome comune, numeri di identificazione	Denominazione IUPAC	Purezza (%)	Data di approvazione	Scadenza dell'approvazione	Disposizioni specifiche
277	Composti di rame			1° dicembre 2009	30 novembre 2016	<p>PARTIE A</p> <p>Possono essere autorizzati solo gli usi come battericida e fungicida.</p> <p>PARTIE B</p> <p>Nel valutare le richieste di autorizzazione di prodotti fitosanitari contenenti rame per usi diversi dal trattamento dei pomodori da serra, gli Stati membri devono prestare particolare attenzione ai criteri di cui all'articolo 4, paragrafo 3, del regolamento (CE) n. 1107/2009 e garantire che tutte le informazioni e i dati necessari siano forniti prima del rilascio della relativa autorizzazione.</p> <p>Per l'applicazione dei principi uniformi di cui all'articolo 29, paragrafo 6, del regolamento (CE) n. 1107/2009, si deve tener conto delle conclusioni del rapporto di riesame sui composti di rame, in particolare delle relative appendici I e II, nella versione definitiva elaborata dal comitato permanente per la catena alimentare e la salute degli animali il 23 gennaio 2009.</p> <p>Ai fini di tale valutazione generale gli Stati membri devono prestare particolare attenzione:</p> <ul style="list-style-type: none"> — alle specifiche del materiale tecnico prodotto commercialmente, che devono essere verificate e corredate da adeguati dati analitici. Il materiale di prova utilizzato nei fascicoli sulla tossicità deve essere comparato e verificato a fronte delle specifiche del materiale tecnico. — alla sicurezza degli operatori e dei lavoratori nonché garantire che le condizioni d'impiego prevedano, se del caso, l'uso di appropriati dispositivi di protezione personale. — alla protezione di organismi acquatici non bersaglio. Per quanto riguarda tali rischi accettati, occorre adottare, se del caso, misure di attenuazione dei rischi, come la creazione di zone tampone. — alla quantità di sostanza attiva applicata nonché garantire che le quantità autorizzate in termini di tassi e numero delle applicazioni, siano quelle minime necessarie per conseguire l'effetto desiderato.
	Idrossido di rame	Idrossido di rame (II)	≥ 573 g/kg			
	N. CAS 20427-59-2 N. CIPAC 44.305					
	Ossicloruro di rame	Triidrossocloruro di rame	≥ 550 g/kg			
	N. CAS 1332-65-6 o 1332-40-7 N. CIPAC 44.602					
	Ossido di rame	Ossido di rame	≥ 820 g/kg			
	N. CAS 1317-39-1 N. CIPAC 44.603					
	Poliglia bordolese	Non attribuito	≥ 245 g/kg			
	N. CAS 8011-63-0 N. CIPAC 44.604					
	Solfato di rame tribasico	Non attribuito	≥ 490 g/kg			<p>Gli Stati membri interessati esigono la presentazione di informazioni utili ad un'ulteriore valutazione:</p> <ul style="list-style-type: none"> — del rischio da inalazione. — della valutazione del rischio per gli organismi non bersaglio e per il suolo e l'acqua. <p>Essi devono provvedere affinché che l'autore della notifica su richiesta del quale i composti di rame sono stati iscritti nel presente allegato trasmetta tali informazioni alla Commissione entro il 30 novembre 2011.</p> <p>Gli Stati membri introducono programmi di monitoraggio nelle regioni esposte a rischi. Laddove la contaminazione del terreno da rame costituisce un problema, per fissare, se necessario, limitazioni quale l'indicazione dei valori massimi di applicazione.</p>
	N. CAS 12527-76-3 N. CIPAC 44.306		<p>Le seguenti impurezze presentano problemi tossicologici e non devono superare i livelli indicati:</p> <p>Piombo 0,0005 g/kg max di tenore di rame.</p> <p>Cadmio 0,0001^o g/kg max di tenore di rame.</p> <p>Arsenico 0,0001^o g/kg max di tenore di rame.</p>			

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea

L 313/133

Figura 2-1: Allegato “Sostanze attive per l'utilizzo nei prodotti fitosanitari”, Fonte: Reg. (UE) n. 540/2011

Anche se i criteri di approvazione come presenti nell'articolo 4 del Reg. (CE) n. 1107/2009 per uno o più impieghi rappresentativi di almeno un prodotto per ciascuno dei composti di rame sono stati soddisfatti e quindi rinnovata l'approvazione, la Commissione con il Reg. di esecuzione n° 1981/2018 ha giudicato che le sostanze attive composti di rame siano candidati alla sostituzione secondo l'articolo 24 del Reg. (CE) n. 1107/2009 “1. Una sostanza attiva conforme ai criteri previsti dall'articolo 4 è approvata, per un periodo non superiore a sette anni, come sostanza candidata alla sostituzione se soddisfa uno o più criteri supplementari di cui al punto 4 dell'allegato II (Procedura e criteri per l'approvazione delle sostanze attive, degli antidoti agronomici e dei sinergizzanti a norma del capo II). In deroga all'articolo 14, paragrafo 2, l'approvazione può essere rinnovata una o più volte, per periodi non superiori a sette anni” poiché soddisfano due dei criteri per essere considerate sostanze PBT (Persistenti, Bioaccumulabili, Tossiche) ovvero la persistenza in quanto il tempo di dimezzamento nel suolo è superiore a 120 giorni (punto 3.7.2.1 allegato II Reg. (CE) n. 1107/2009) e la tossicità poiché ha una concentrazione, senza effetti osservati a lungo termine, negli organismi marini o d'acqua dolce inferiore a 0,01 mg/L (punto 3.7.2.3 allegato II Reg. (CE) n. 1107/2009). Tali sostanze sono state poi sottoposte ad ulteriori restrizioni e condizioni secondo l'articolo 14,

paragrafo 1 e l'articolo 6 del Reg. (CE) n. 1107/2009 e le attuali conoscenze scientifiche e tecniche per minimizzare il rischio di accumulo nel suolo e l'esposizione degli organismi non-target consentendo comunque un'adeguata difesa della coltura in relazione alla pressione del patogeno. È stato così imposto l'utilizzo di 28 kg/ha di rame in sette anni (4 kg di Cu/ha/anno in media) e limitata la presenza di impurezze con problemi tossicologici. La scelta da parte dell'EFSA di fissare la *No Observed Effect Concentration* (NOEC) a 4 kg Cu/ha/anno è stata supportata dalla sperimentazione effettuata dalla *European Union Copper Task Force*, la quale ha valutato i rischi sui lombrichi in condizioni agricole abbastanza realistiche (valutati due suoli contaminati da 10 anni con dosi differenti di rame distribuite con tre trattamenti all'anno, Karimi et al., 2021). Di conseguenza l'allegato del Reg. di esecuzione n. 540/2011 è stato così modificato (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R1981&from=EN>):

N.	Nome comune, numeri di identificazione	Denominazione IUPAC	Purezza (%)	Data di approvazione	Scadenza dell'approvazione	Disposizioni specifiche
«10	Composti di rame: idrossido di rame N. CAS 20427-59-2 N. CIPAC 44.305 ossicloruro di rame N. CAS 1332-65-6 o 1332-40-7 N. CIPAC 44.602 ossido di rame N. CAS 1317-39-1 N. CIPAC 44.603 poltiglia bordolese N. CAS 8011-63-0 N. CIPAC 44.604 solfato di rame tribasico N. CAS 12527-76-3 N. CIPAC 44.306	Idrossido di rame (II) Ossicloruro di rame Ossido di rame Non attribuito Non attribuito	≥ 573 g/kg ≥ 550 g/kg ≥ 820 g/kg ≥ 245 g/kg ≥ 490 g/kg Le seguenti impurezze non devono superare i livelli di seguito indicati: arsenico max. 0,1 mg/g Cu cadmio max. 0,1 mg/g Cu piombo max. 0,3 mg/g Cu nichel max. 1 mg/g Cu cobalto max. 3 mg/kg mercurio max. 5 mg/kg cromo max. 100 mg/kg antimonio max. 7 mg/kg	1° gennaio 2019	31 dicembre 2025	Sono autorizzati esclusivamente gli impieghi che comportano un'applicazione totale non superiore a 28 kg di rame per ettaro nell'arco di 7 anni. Per l'applicazione dei principi uniformi di cui all'articolo 29, paragrafo 6, del regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, occorre tener conto delle conclusioni della relazione di esame sui composti di rame, in particolare delle appendici I e II. Nella loro valutazione generale gli Stati membri prestano particolare attenzione: — alla sicurezza degli operatori, dei lavoratori e degli astanti e accertano che le condizioni d'impiego prescrivano il ricorso a dispositivi di protezione personale adeguati e ad altre misure di riduzione dei rischi, come opportuno; — alla protezione dell'acqua e degli organismi non bersaglio. In relazione ai rischi accertati, si applicano, ove opportuno, misure di attenuazione dei rischi, ad esempio zone cuscinetto; — alla quantità di sostanza attiva applicata e accertano che le quantità autorizzate, in termini di dose e numero di applicazioni, non superino le quantità minime necessarie per ottenere gli effetti desiderati e non abbiano effetti inaccettabili sull'ambiente, tenendo conto dei livelli di fondo di rame nel luogo di applicazione e, qualora l'informazione sia disponibile, dell'apporto di rame da altre fonti. Gli Stati membri possono decidere, in particolare, di fissare un valore massimo di applicazione annuo non superiore a 4 kg/ha di rame.»

(¹) Ulteriori dettagli sull'identità e sulle specifiche della sostanza attiva sono contenuti nella relazione di esame.

Figura 2-2: Modifica allegato Reg. (UE) n. 540/2011, Fonte: Reg. (UE) n. 1981/2018

La situazione dell'uso del rame viene gestita diversamente dai diversi paesi, ciò è dovuto alle diverse condizioni pedoclimatiche che influenzano lo sviluppo della malattia. Infatti, il Nord Europa, avendo condizioni sfavorevoli alla peronospora, ha bandito completamente l'uso di tale sostanza mentre in Canada e negli Stati Uniti non ci sono restrizioni per l'impiego del rame. Nella Tabella 2-1 sono riportati i limiti adottati in alcuni paesi europei (La Torre et al., 2018).

Tabella 2-1: Limiti imposti all'uso del rame in alcuni paesi europei, Fonte: La Torre et al., 2018

Paese	Agricoltura biologica	Lotta integrata*	Referenze
Austria	da 2 a 4 kg Cu/ha anno a seconda delle colture; su vite 3 kg Cu/ha/anno	-	http://organicrules.org/custom/differences.php?id=2bbc
Repubblica Ceca	3 kg Cu/ha/anno	-	http://organicrules.org/custom/differences.php?id=2bbc
Danimarca	Vietato	Vietato	http://organicrules.org/custom/differences.php?id=2bbc
Finlandia	Vietato	Vietato	http://organicrules.org/custom/differences.php?id=2bbc
Germania	Massimo 3 kg Cu/ha/anno su tutte le colture con l'eccezione del luppolo che ha un limite di 4 kg Cu/ha/anno	-	www.naturland.de
Olanda	Vietato	Vietato	http://organicrules.org/custom/differences.php?id=2bbc
Norvegia	Vietato	Vietato	http://organicrules.org/custom/differences.php?id=2bbc
Slovenia		5 kg Cu/ha/anno	Rusjan et al., 2007
Svezia	Vietato, è permesso solo come fertilizzante ad un massimo di 0,3 kg Cu/ha/anno (dosi fino ad 1 kg/ha sono permesse solo quando è dimostrata una carenza nel suolo)	Vietato, è permesso solo come fertilizzante ad un massimo di 0,3 kg Cu/ha/anno (dosi fino ad 1 kg/ha sono permesse solo quando è dimostrata una carenza nel suolo)	KRAV, 2017
Svizzera	Massimo 4 kg Cu/ha/anno in frutticoltura e orticoltura e 6 kg Cu/ha/anno in viticoltura (in 5 anni consecutivi massimo 20 kg Cu/ha)	-	Federal Ordinance 910.181 on Organic Farming of the Federal Department of Economic Affairs, Education and Research of 22 September 1997 as amended

In risposta al rinnovo delle sostanze attive composti rame come candidati alla sostituzione, questi andranno incontro ad una progressiva sostituzione attraverso una procedura di valutazione comparativa con altri prodotti con più basso profilo tossicologico ed ecotossicologico, ma deve essere tenuta ben presente allo stesso momento la reale efficacia di tali prodotti e l'ampio impiego del rame in agricoltura biologica (La Torre et al., 2018). A livello europeo, infatti, sono state promosse ricerche su prodotti alternativi ai fungicidi rameici integrativi o sostitutivi puntando l'attenzione su composti naturali registrati come PPP (*Plant Protection Product*) o come biostimolanti delle piante (Romanazzi, et al., 2021).

Tutto ciò viene recepito a livello nazionale e attuato a livello regionale attraverso i Disciplinari di Produzione Integrata redatti e revisionati annualmente dai Servizi Fitosanitari Regionali. Le

revisioni annuali consentono di allineare i Disciplinari alle correnti disposizioni normative. Di seguito vengono riportate le linee guida per la gestione di *Plasmopara viticola* su vite per la Regione Marche, nelle quali vengono indicate le sostanze attive utilizzabili per questa avversità, il numero di trattamenti possibili all'anno e con le singole sostanze attive e le combinazioni dei principi attivi da utilizzare per evitare l'insorgere di fenomeni di resistenza.

Linee Guida Difesa Integrata Marche
Anno 2021

DIFESA INTEGRATA DI: VITE (4/7)

AVVERSITÀ	CRITERI D'INTERVENTO	S.A. E AUSILIARI	N° INTERVENTI ANNO		NOTE E LIMITAZIONI D'USO	
			SINGOLA S.A. (*)	MECCANISMO AZIONE (**)		
CRITTOGAME						
Peronospora (<i>Plasmopara viticola</i>)	L'inizio della difesa antiperonosporica è dettato dalla regola dei "3 dieci", mentre i trattamenti successivi vanno cadenzati in previsione delle piogge o prima dello scadere del periodo di incubazione di ciascun ciclo infettivo. Impiegare preferibilmente i prodotti a base di rame dopo l'allegagione. Nei comprensori raggiunti dai comunicati dei Centri Agrometeo Locali, attenersi alle indicazioni contenute nei notiziari fitopatologici.	Rame (1) Fosetil Al Fosfonato di potassio Fosfonato di sodio Metiram (2) (3) Pymclostrobin Famoxadone Cimoxanil Dimetomorf Iprovalicarb Mandipropamide Benthiavalicarb Valifenalate (2) Metalaxil-M Benalaxil (6) Benalaxil-M Zoxamide Fluopicolide Cyazofamid Amisulbrom Ametoctradina Oxathiaprolin (5) Olio essenziale di arancio dolce Cerevisane		5 7	10 3 ⁽⁴⁾ 4 3	(1) Non superare l'applicazione cumulativa di 28 kg di rame per ettaro nell'arco di 7 anni. Si raccomanda di rispettare il quantitativo applicato di 4 kg di rame per ettaro all'anno (al raggiungimento di tale limite concorrono anche gli apporti di rame metallo impiegati per la fertilizzazione) (2) Da impiegare nelle prime fasi della ripresa vegetativa, ma non oltre l'acino "grano di pepe" (3) L'uso del Metiram è limitato a 3 interventi all'anno qualora impiegato come unica sostanza attiva del formulato commerciale (4) Famoxadone, Fenamidone, Azoxystrobin, Pyraclostrobin, Trifloxystrobin sono prodotti alternativi fra loro e non possono essere impiegati in più di 3 trattamenti all'anno, indipendentemente dall'avversità. (5) Usare in miscela con s.a. a diverso meccanismo d'azione (6) Impiegabile fino al 5 ottobre 2021

N.B. Si ricorda che è sempre obbligatorio il rispetto di quanto riportato nell'etichetta di ciascun formulato commerciale.

Figura 2-3: Difesa integrata della Vite, Fonte: Disciplinare Produzione Integrata Regione Marche 2021

Capitolo 3

AGRICOLTURA E VITICOLTURA BIOLOGICA NELLE MARCHE

Il *New Green Deal* europeo è la strategia che punta a far diventare l'Europa il primo continente ad impatto climatico zero. In questa direzione, il sistema agricolo e alimentare europeo, già standard globale in termini di sicurezza, sicurezza dell'approvvigionamento, nutrizione e qualità, è necessario che diventi standard globale per la sostenibilità. L'agricoltura biologica, quindi, riveste una funzione di fondamentale importanza per raggiungere tale scopo ed infatti, all'interno della strategia *Farm to fork*, la Commissione Europea ha istituito un Piano d'azione per l'agricoltura biologica con il quale mira a raggiungere l'obiettivo del *Green Deal* ovvero almeno il 25% dei terreni agricoli dell'UE in agricoltura biologica entro il 2030. L'Italia è uno dei paesi membri (dopo Austria, Estonia, Svezia e Repubblica Ceca) con maggiore SAU destinata alla coltivazione biologica con circa 1.993.236 ha che rappresentano il 15,8% della SAU nazionale (https://ec.europa.eu/info/strategy/priorities-2019-2024/european-green-deal_it; Sinab, 2020). Sono 3 gli orientamenti produttivi che trainano l'agricoltura biologica italiana costituendone circa il 60% ovvero prati pascolo, colture foraggere e cereali ai quali seguono, per estensione, olivo e vite, che hanno avuto tendenze positive di crescita negli ultimi anni. Calando l'attenzione a livello regionale, le Marche hanno 104.567 ha destinati alla coltivazione biologica di cui 5.885 ha sono coltivati a vite biologica o in conversione rappresentando il 5,6% del totale degli ha bio marchigiani (Sinab, 2020) e il 38% della coltivazione viticola delle Marche (15.501 ha coltivati a vite totali) (<http://www.inumeridelvino.it/2020/10/i-numeri-della-viticultura-biologica-in-italia-aggiornamento-2019.html>).

L'agricoltura biologica viene definita dal Reg. (CE) n° 848/2018 come *“sistema globale di gestione dell'azienda agricola e di produzione alimentare basato sull'interazione tra le migliori prassi in materia di ambiente ed azione per il clima, un alto livello di biodiversità, la salvaguardia delle risorse naturali e l'applicazione di criteri rigorosi in materia di benessere degli animali e norme rigorose di produzione confacenti alle preferenze di un numero crescente di consumatori per prodotti ottenuti con sostanze e procedimenti naturali. La*

produzione biologica esplica pertanto una duplice funzione sociale, provvedendo, da un lato, a un mercato specifico che risponde alla domanda di prodotti biologici da parte dei consumatori e, dall'altro, fornendo al pubblico beni che contribuiscono alla tutela dell'ambiente, al benessere degli animali e allo sviluppo rurale” (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0848&from=EN>) e sarà normata dal nuovo regolamento 1693/2020 del Parlamento europeo e del Consiglio che entrerà in vigore nel 2022. Tale definizione inquadra gli obiettivi generali dell'agricoltura biologica che, una volta applicati, si realizzano con pratiche agronomiche che rivolgono elevata attenzione alla gestione del suolo mirando a prevenire compattamento ed erosione, a salvaguardare o aumentare la sostanza organica, biodiversità, stabilità del suolo. Queste ultime sono mantenute attraverso il ricorso alle rotazioni pluriennali inserendo leguminose e colture da sovescio e l'applicazione di concimi naturali di origine animale o materiale organico (meglio se compost) di produzione biologica mentre è consentito l'uso esclusivo di concimi e ammendanti ammessi in biologico e vietati i concimi minerali azotati. La difesa fitosanitaria si basa sulla valutazione del rischio e sull'applicazione di misure preventive e precauzionali come la protezione dei nemici naturali, la scelta delle specie e delle varietà, rotazione delle colture e processi termici, ma in caso di rischio grave (superamento della soglia economica di danno) per una coltura è possibile l'uso di prodotti fitosanitari autorizzati per la produzione biologica presenti nell'allegato II “Antiparassitari – prodotti fitosanitari di cui all'articolo 5, paragrafo 1” del Reg. (UE) n. 2164/2019 (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32019R2164&from=IT>), riportati di seguito:

1. Sostanze di origine vegetale o animale

Denominazione	Descrizione, requisiti di composizione, condizioni per l'uso
Allium sativum (estratto d'aglio)	
Azadiractina estratta da <i>Azadirachta indica</i> (albero del neem)	
Cera d'api	Solo come cicatrizzante/agente di protezione dei tagli di potatura
COS-OGA	
Proteine idrolizzate tranne la gelatina	
Laminarina	L'alga bruna è ottenuta da produzione biologica conformemente all'articolo 6 <i>quinquies</i> o raccolta in modo sostenibile conformemente all'articolo 6 <i>quater</i>
Maltodestrina	
Feromoni	Solo in trappole e distributori
Oli vegetali	Tutti gli usi autorizzati, salvo erbicida
Piretrine	Solo di origine vegetale
Quassia estratta da <i>Quassia amara</i>	Solo come insetticida, repellente
Repellenti olfattivi di origine animale o vegetale/grasso di pecora	Uso consentito solo sulle parti non commestibili della coltura e laddove il materiale vegetale non sia ingerito da ovini e caprini
<i>Salix</i> spp. cortex (estratto di corteccia di salice)	
Terpeni (eugenolo, geraniolo e timolo)	

2. Sostanze di base

Sostanze di base a base di alimenti (compresi: lecitine, saccarosio, fruttosio, aceto, siero di latte, chitosano cloridrato ^(*) ed <i>Equisetum arvense</i> ecc.)	Solo le sostanze di base definite dall'articolo 23 del regolamento (CE) n. 1107/2009 ^(†) che sono alimenti definiti all'articolo 2 del regolamento (CE) n. 178/2002 e sono di origine vegetale o animale Sostanze che non devono essere utilizzate come erbicidi
--	--

(*) Ottenuto da attività di pesca sostenibili o acquacoltura biologica.

(†) Regolamento (CE) n. 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 ottobre 2009, relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari (GU L 309 del 24.11.2009, pag. 1).

3. Microrganismi o sostanze prodotte o derivate da microrganismi

Denominazione	Descrizione, requisiti di composizione, condizioni per l'uso
Microrganismi	Non provenienti da OGM
Spinosad	
Cerevisiane	

4. Sostanze diverse da quelle di cui alle sezioni 1, 2 e 3

Denominazione	Descrizione, requisiti di composizione, condizioni o limitazioni per l'uso
Silicato d'alluminio (caolino)	
Idrossido di calcio	Se utilizzato come fungicida, solo su alberi da frutta, compresi i vivai, per combattere la <i>Nectria galligena</i>
Biossido di carbonio	
Composti del rame sotto forma di idrossido di rame, ossicloruro di rame, ossido di rame, poltiglia bordolese e solfato di rame tribasico	
Fosfato di diammonio	Solo come sostanza attrattiva nelle trappole
Etilene	
Acidi grassi	Tutti gli usi autorizzati, salvo erbicida
Fosfato ferrico (ortofosfato di ferro (III))	Preparati da spargere in superficie tra le piante coltivate
Perossido di idrogeno	
Kieselgur (terra diatomacea)	
Zolfo calcico (polisolfuro di calcio)	
Olio di paraffina	
Idrogenocarbonato di potassio e sodio (bicarbonato di potassio/sodio)	
Piretroidi (solo deltametrina o lambda-cialotrina)	Solo in trappole con specifiche sostanze attrattive; solo contro <i>Bactroera oleae</i> e <i>Ceratitis capitata</i> Wied
Sabbia di quarzo	
Cloruro di sodio	Tutti gli usi autorizzati, salvo erbicida»
Zolfo»	

Figura 3-1: Allegato II “Antiparassitari – prodotti fitosanitari di cui all’articolo 5, paragrafo 1”, Fonte: Reg. (UE) n. 2164/2019

I prodotti fitosanitari sono necessari contro organismi nocivi o malattie specifiche per i quali non sono presenti alternative biologiche, fisiche, vegetali o pratiche colturali e di gestione efficaci e l'intervento applicativo deve essere attestato attraverso documenti giustificativi l'applicazione del prodotto (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R0834&from=ES>).

Capitolo 4

ECOTOSSICOLOGIA E SPECIE BIOINDICATRICI

4.1 Introduzione all'ecotossicologia

L'ecotossicologia è una branca della tossicologia ambientale ed è stata definita dallo *Scientific Committee on Problems of the Environment* (SCOPE, Butler, 1978) come la scienza che “*studia gli effetti tossici degli agenti chimici e fisici su organismi viventi, in particolare su popolazioni e comunità all'interno di un definito ecosistema; inoltre, studia i meccanismi di trasporto di tali agenti e le loro interazioni con l'ambiente*”.

Nella registrazione di un nuovo prodotto fitosanitario o nella ri-valutazione di uno già registrato sono necessari gli studi ecotossicologici come richiede la Direttiva 91/114/CEE.

La quantificazione degli effetti degli agrofarmaci è studiata attraverso l'utilizzo di parametri chiamati *endpoint* ecotossicologici. Questi ultimi sono gli effetti che vengono determinati durante il saggio tossicologico e si identificano con la mortalità, l'immobilizzazione, gli effetti sulla riproduzione, sulla crescita degli individui e della popolazione, l'alterazione di parametri metabolici o fisiologici e del comportamento. Gli *endpoint* sono misurati costruendo una curva dose-risposta ovvero una sigmoide che mette in relazione la concentrazione somministrata di un contaminante e la risposta dell'organismo.

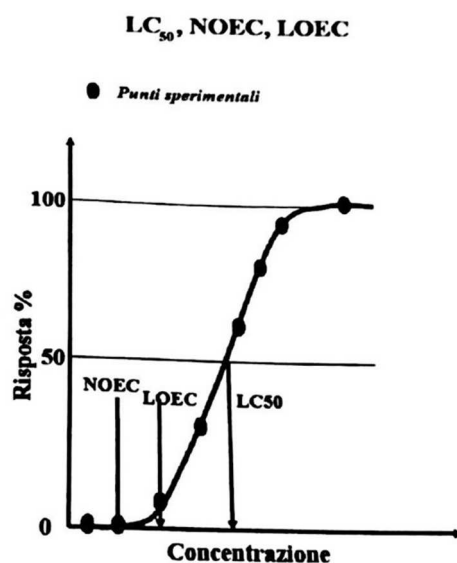


Figura 4-1: Curva dose-risposta, Fonte: Merli e Capri, 2008

Gli *endpoint* più importanti e comunemente utilizzati sono i seguenti:

- LC₅₀ (*Lethal Concentration 50*, mg/L- μ /m³-mg/kg): è la concentrazione letale per il 50% degli individui di una popolazione riferita ad uno specifico tempo di esposizione;
- EC₅₀ (*Effective Concentration 50*, mg/L- μ /m³-mg/kg): è come la LC₅₀ ma prendendo in considerazione effetti diversi della morte;
- LT₅₀ (*Letal Time 50*, secondi-minuti-ore): è il tempo necessario a determinare la morte del 50% degli individui di una popolazione esposta ad una nota concentrazione di sostanza;
- NOEL (*No Observed Effect Level*, mg/kg): è la più alta concentrazione o dose a cui non si sono riscontrati effetti, riferita a precise condizioni sperimentali;
- LOEL (*Lowest Observed Effect Level*, mg/kg): è la più bassa concentrazione o dose a cui sono stati riscontrati effetti, riferita a precise condizioni sperimentali;
- NOEC (*No Observed Effect Concentration*, mg/L- μ /m³-mg/kg): è la concentrazione massima non efficace in un saggio di tossicità acquatica;
- LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration*, mg/L- μ /m³-mg/kg): è la concentrazione minima efficace in un saggio di tossicità acquatica;
- PNEC (*Predict No Effect Concentration*, mg/kg): è la concentrazione ambientale massima priva di effetti dannosi sugli organismi calcolata rapportando uno dei precedenti *endpoint* ad un fattore di sicurezza.

Come detto precedentemente, un organismo sottoposto a concentrazioni di una sostanza tossica genera delle risposte che variano con la concentrazione di tale sostanza. Infatti, a basse

concentrazioni si ha un'omeostasi (compensazione invisibile) e uno stato di salute, alle quali fanno seguito una compensazione e uno sforzo (si osservano degli effetti), uno sbilanciamento e malattia e infine rottura e morte. A questi diversi livelli di risposta corrispondono i vari *enpoint* e tali intervalli sono definiti dalla soglia di effetto, dalla soglia di tossicità e dalla soglia di letalità.

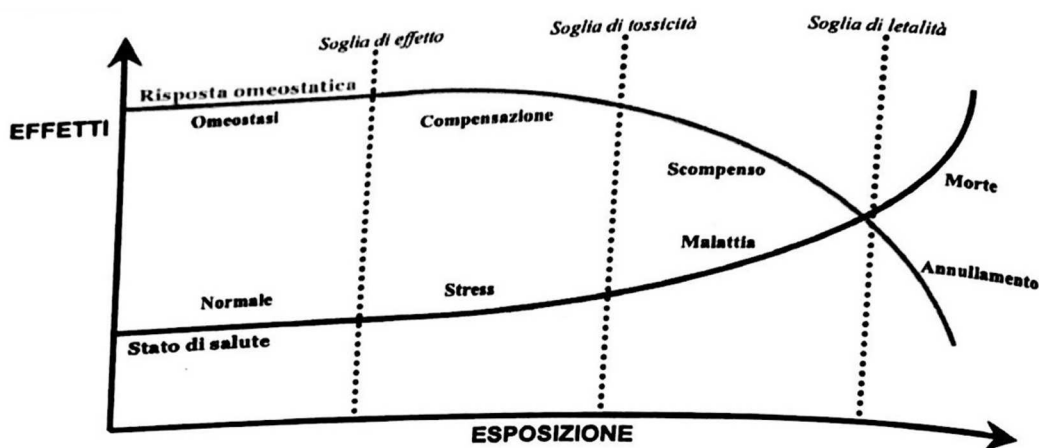


Figura 4-2: Risposta di un organismo in funzione della concentrazione di un tossicante,
Fonte: Merli e Capri, 2008

La soglia di effetto è individuata dal LOEC e al di sopra di essa si notano effetti negativi sugli organismi, i quali attivano i loro sistemi di difesa e di detossificazione (nella soglia di effetto c'è un maggior dispendio energetico dovuto all'attività di contrasto dell'azione tossica ma non si riscontrano danni). Superata la soglia di tossicità si mostrano effetti cronici sub letali ai quali fanno seguito fenomeni acuti e morte dell'organismo.

Secondo la normativa, gli *enpoint* ecotossicologici di danno devono essere misurati attraverso prove a breve e a lungo termine e devono prendere in considerazione sia l'effetto letale che sub letale del contaminante.

Gli effetti tossici causati da una sostanza chimica sono in funzione della dose dell'agrofarmaco e della sua permanenza nel sito d'azione ma anche da altri fattori quali le caratteristiche insite della sostanza, le caratteristiche del sistema biologico (individuo, popolazione, comunità, ecosistema), i fattori ambientali che modificano l'attività della sostanza e vengono studiati facendo ricorso alla ricerca di *biomarker* ecotossicologici ovvero variazioni biochimiche, cellulari, fisiologiche e comportamentali a livello di individuo o popolazione che evidenziano l'esposizione a contaminanti. Il *biomarker* fornisce una valutazione qualitativa dell'esposizione cioè informazioni sullo stato di salute dell'organismo per verificare la possibilità di alterazioni ambientali e inoltre il *biomarker* studia le risposte immediate come,

ad esempio, le alterazioni del DNA così da predire effetti negativi a lungo termine. I *biomarker* soprattutto studiati sono enzimi o sistemi di enzimi come gli enzimi. Gli effetti biochimici possono essere di tipo protettivo come l'induzione di molecole detossificanti (monossigenasi, metallotioneine) o di tipo non protettivo che può portare o meno all'insorgenza di tossicità (ad esempio la formazione di addotti nel DNA ha effetti dannosi se causa mutazioni al DNA). Oltre agli effetti biochimici, si manifestano effetti fisiologici che interagiscono con i processi metabolici e si possono quindi osservare effetti a livello cellulare, di organo, di intero organismo e sulla riproduzione (Merli e Capri, 2008).

Il rischio ambientale che una determinata sostanza tossica ha nei confronti dell'ambiente è dato dal calcolo di due fattori ovvero l'esposizione e gli effetti.

Per valutare gli effetti tossicologici di una sostanza da registrare si utilizza la PNEC che viene misurata attraverso modelli selezionati a livello europeo o con il rapporto tra LC50 o EC50 ed un fattore di sicurezza, diverso per ogni organismo non target.

Per misurare il rischio è comunque fondamentale riportare il dato tossicologico all'esposizione quindi per calcolare la TER ovvero la *Toxicity Exposure Ratio* (rappresenta il rapporto tossicità/esposizione) è necessario riportare la PNEC con la PEC (*Predicted Environmental Concentration*) ovvero la concentrazione alla quale l'individuo è soggetto durante la sua permanenza nell'ecosistema. La PEC viene determinata con dei modelli di simulazione del destino ambientale degli agrofarmaci. Successivamente il TER deve essere confrontato con un valore di riferimento (*trigger*) che determina la soglia di allarme. Il TER può essere estremamente negativo, negativo o positivo, in funzione di valori scritti in una tabella che l'EFSA ha stilato. Questa tabella riporta i valori *trigger* per ogni specie non bersaglio (sono valori che delimitano la differenza tra non rischio e rischio ambientale). Se il TER è maggiore del *trigger* vuol dire che il rischio è accettabile o non c'è rischio mentre se il TER è inferiore del *trigger* il rischio è grave, non viene data l'autorizzazione alla registrazione o si chiede la necessità di ulteriori studi o si abbandona il prodotto. Se il TER è uguale al *trigger* la decisione sulla autorizzazione alla registrazione spetta alla commissione.

4.2 *Eisenia sp.* come specie bioindicatrice

L'impiego del rame in viticoltura da oltre 150 anni ha portato alla contaminazione dei suoli viticoli con ripercussioni sulla vita del suolo, sulle risorse idriche e sulla biodiversità (EFSA, 2018) causando gravi problemi ambientali e modificazioni nella fisiologia e biochimica di organismi del suolo come i lombrichi (Clasen et al., 2021). Pertanto, sono stati utilizzati diversi

indicatori della qualità biologica del suolo intesa come la capacità del suolo di ospitare una grande quantità e diversità di organismi viventi coinvolti nel suo funzionamento e nella fornitura di servizi ecosistemici (Karimi et al., 2020) per ricercare i livelli di sostanze tossiche capaci di danneggiare l'ecosistema (Krüger et al., 2018). In questo ambito, il lombrico terricolo *Eisenia sp. (foetida e andrei)* è considerato uno dei migliori bioindicatori o specie sentinella per sorvegliare sulla sanità dell'ecosistema data la sua stretta convivenza col suolo e la sua abbondanza (rappresenta il 60-80% della biomassa totale della biocenosi) (Sanchez-Hernandez, 2006; Hirano e Tamae, 2011). Infatti, esso riveste il ruolo di “ingegnere dell'ecosistema” (Jones et al., 1994) con funzioni essenziali nelle proprietà del suolo come il mantenimento della struttura, il ciclo dei nutrienti, le trasformazioni del carbonio ed il controllo di parassiti e malattie (Balvanera et al., 2006; Perrings et al., 2006; Kibblewhite et al., 2008; Chagnon et al., 2015). L'attività di scavo (i lombrichi sono capaci di scavare 8900 km di gallerie/ha) influenza la porosità del suolo modificando l'areazione, aumentando l'infiltrazione e la ritenzione e diminuendo il compattamento, riducendo in questo modo del 50% l'erosione del suolo (Pisa et al., 2015; Ram, 2019; (Blouin et al., 2013; Gaupp-Berghausen et al., 2015). Inoltre, è necessario sottolineare come i lombrichi, rompendo la letteria e rilasciando il cast (feci) ricco di sostanze organiche, formino circa la metà degli aggregati del suolo e ciò porta ad un maggiore sequestro di carbonio nel suolo e di conseguenza a limitare le emissioni di combustibile fossile (Stork and Eggleton, 1992; (Lal, 2004a,b; Lavelle et al., 2006; Dirzo et al., 2014).

Eisenia sp. è un invertebrato di 4-15 cm, epigeico con striature rosso scuro-marroni appartenente al Phylum degli Anellida, alla Classe Clitellata, alla Sottoclasse Oligochaeta, all'Ordine Haplotaxida e alla Famiglia dei Lumbricidae. È un ermafrodita ma non pratica l'autofecondazione. Gli individui sessualmente maturi hanno una parte dell'epidermide ingrossata a forma di anello chiamata clitello che ha la funzione di secernere muco che terrà uniti due individui durante l'accoppiamento e hanno la capacità di produrre delle caratteristiche uova chiamate coccon, gialle appena deposte per poi diventare marroni quando più mature. Se percepisce un pericolo estrude un liquido giallognolo maleodorante. Lo scambio di gas, fluidi e nutrienti tra l'organismo e l'ambiente è pressoché diretto poiché, non avendo organi respiratori distinti, si verifica a mezzo del sottile epitelio che si trova come separatore del tessuto endodermico dal suolo. Inoltre, all'interno del corpo del lombrico l'intestino è separato dall'endoderma dalla cavità celomatica (Mincarelli et al., 2016).

Il celoma, settato e riempito di liquido, e i muscoli delle pareti del corpo si muovono in antagonismo e creano un sistema di locomozione adatto allo scavo di gallerie. Durante lo scavo, ingerendo le particelle di terreno, assorbono le sostanze attraverso l'epitelio intestinale nella cavità celomica. Qui i tossicanti entrano in contatto diretto con il fluido celomico all'interno del quale scorrono i celomociti, i quali presentano differenze a livello strutturale e funzionale e ciò potrebbe essere legato ad una diversa sensibilità nei confronti dei diversi contaminanti (Mincarelli et al., 2016).

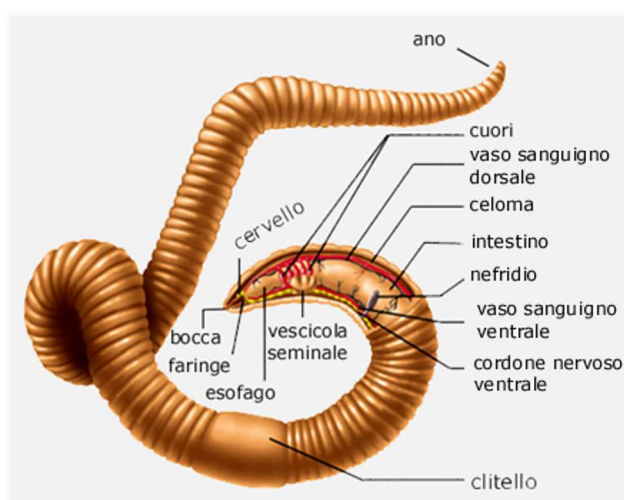


Figura 4-3: Rappresentazione delle parti del corpo di un lombrico, Fonte:

<http://www.luciopesce.net/zoologia/anellidi/oligo.htm>

Negli animali celomati inferiori come i lombrichi le cellule immunitarie prendono il nome di celomociti e si originano dal rivestimento mesenchimale della cavità celomica (Bilej et al., 2010). Sono leucociti che interessano i meccanismi che regolano la risposta immunitaria innata (Hostetter e Cooper, 1972). Sono state individuate tre popolazioni di celomociti: piccoli celomociti, grandi celomociti e cloragociti (Mincarelli et al., 2019). Fattori di stress come lo stress chimico possono influenzare il comportamento metabolico dei celomociti e l'aggregazione di questi è un fenomeno importante. In aggiunta, i celomociti risultano sensibili agli elementi che danneggiano il DNA, con un effetto dose-risposta e la diminuzione dei meccanismi che vanno a riparare il DNA porta ad aumento della loro suscettibilità (Mincarelli et al., 2016).

Vista l'importanza ecologica e la sensibilità alle variazioni soprattutto in suoli contaminati da metalli (Xiong et al., 2014; Yang et al., 2018), i lombrichi, ed in particolare, la specie *Eisenia foetida*, data la sua facilità di allevamento e il suo corto periodo di tempo tra una generazione

e l'altra (Yasmin e D'Souza, 2007) (d'altra parte però non è diffusa nell'ambiente naturale ed è meno sensibile ai contaminanti rispetto ad altre specie rilevabili in suoli coltivati, Pelosi et al., 2013), vengono utilizzati per valutare il rischio ambientale e la tossicità chimica dei contaminanti sia in laboratorio che in campo attraverso l'utilizzo di protocolli standardizzati e linee guida sviluppati e/o adottati da organizzazioni internazionali come l'*Organization of Economic Cooperation and Development* (OECD), l'*International Organization for Standardization* (ISO), l'*American Society for Testing and Materials* (ASTM) e da agenzie nazionali di regolamentazione come la *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA), l'*Environment Canada* (EC) e l'Unione Europea (UE) (Gong e Perkins, 2016). Negli ultimi decenni la valutazione del rischio ecologico è stata sempre più studiata facendo ricorso all'utilizzo sugli invertebrati del suolo di *biomarker* con i quali è possibile, attraverso la ricerca di mutamenti fisiologici negli organismi, ipotizzare i probabili cambiamenti nell'ecosistema. I test utilizzati per lo studio della risposta ecotossicologica dei lombrichi sono il test di tossicità acuta ed il test sulla riproduzione utilizzando gli *endpoints* della mortalità, riproduzione (produzione dei cocoon e la schiusa dei giovani) e il cambiamento del peso corporeo degli adulti (questi test sono standardizzati nelle linee guida ISO 11268-1/2). Spesso vengono studiati altri *endpoints* come i cambiamenti comportamentali, morfologici e fisiologici. Questi ultimi riflettono gli effetti indiretti dei contaminanti mentre i test di tossicità riflettono gli effetti diretti (letali e subletali) (Schaefer, 2003). La maggior parte delle risposte è però di tipo indiretto come la compensazione o la *restoration* (Ankley et al., 2006). Infatti, gli organismi che utilizzano risorse nei processi di detossificazione impiegano meno risorse in processi quali riproduzione o crescita (Pelosi et al., 2014). La tossicità acuta fornisce poche informazioni degli effetti sulla popolazione in un ambiente naturale (Slimak, 1997) ma può risultare utile per un primo *screening* di suoli altamente contaminati mentre è necessario utilizzare test con *endpoints* sub letali per uno studio più accurato del rischio ecologico a lungo termine e a più basse concentrazioni (Van Gestel et al., 2001) come gli *endpoints* di test cronici (riproduzione) o comportamentali (*avoidance behaviour*). Un altro esempio di risposta diretta è l'effetto sull'espressione genica dell'annetocina, ormone coinvolto nella riproduzione di *Eisenia foetida* (Ricketts et al., 2004) e questo ormone è un promettente *biomarker* data la sua correlazione con la riproduzione (Pelosi et al., 2014). Come detto precedentemente, i *biomarkers* che fanno riferimento al comportamento sono considerati tra i più sensibili date le numerose funzioni alle quali si rivolgono come locomozione, riproduzione, nutrizione e la loro rilevanza ecologica poiché gli effetti sul comportamento possono essere legati a conseguenze per i livelli biologici superiori (Pelosi et al., 2014). Quattro sono le principali funzioni

influenzate dall'effetto dei contaminanti sui lombrichi: *avoidance behaviour*, *burrowing behaviour*, *bioturbation* e *burial of organic matter*. Si pensa che l'*avoidance behaviour* sia determinato da un cambiamento della "habitat function" del suolo cioè un cambiamento della sua qualità chimica e questo implica che i lombrichi siano in grado di individuare la presenza del contaminante e sfuggirne. L'*avoidance* test segue lo standard ISO 17512-1 2008 ed è il test sul comportamento più utilizzato perché molto semplice ed economicamente conveniente (Pelosi et al., 2014). L'*avoidance* behaviour, inoltre, ha una rilevanza ecologica poiché la migrazione (anche se considerata lenta, Stein et al., 1992) dei lombrichi e la conseguente perdita delle loro funzioni nel suolo porta ad un deperimento delle qualità del suolo. In aggiunta, la migrazione da un'area porta ad una variazione del numero e della distribuzione dei loro predatori vertebrati, andando così ad impattare l'ecosistema (Schaefer, 2003). I lombrichi grazie alle cellule sensoriali presenti nella regione della bocca sono capaci di selezionare il cibo, proteggersi da ambienti sfavorevoli (come l'acidità del suolo) (Mangold, 1953), che prima esplorano con la loro parte anteriore, e di rilevare secrezioni di muco di altri lombrichi (Edwards e Lofty, 1972) e questa capacità insieme alle abilità di locomozione permette ai lombrichi di evitare habitat avversi (Stephenson et al., 1998). Un altro dei *biomarker* sicuramente più studiati è lo stress ossidativo fondato sull'esame dell'attività degli enzimi antiossidanti.

Tuttavia, i meccanismi cellulari e molecolari potrebbero essere intaccati senza però avere conseguenze sulla fisiologia dell'organismo. Di conseguenza, il biomarcatore molecolare fornisce informazioni utili a completare il quadro della risposta dell'organismo all'esposizione ai contaminanti. La genotossicità di diversi xenobiotici causa danni a cellule ed eventualmente a tessuti e organismi (Mincarelli et al., 2016). Infatti, negli ultimi anni sono stati inseriti diversi *endpoint* per studiare gli effetti a dosi sub letali della genotossicità che può avere legami sia con la vitalità delle specie non bersaglio ma anche con le prestazioni riproduttive quindi con la loro fitness ecologica. La rottura del doppio filamento del DNA è un indicatore sensibile di genotossicità (Lourenço et al., 2011). Infatti, sono state inserite nuove metodologie come il *comet assay*, il quale valuta i danni al DNA in base alla mobilità elettroforetica del DNA (Langie et al., 2015; Costa et al., 2014) e rappresenta uno dei metodi più efficaci per studiare la genotossicità nel biomonitoraggio, per la sua realizzazione semplice diretta e conveniente. Le comete causate dal danneggiamento del DNA vengono esaminate attraverso un software analizzatore di immagini che fornisce indici numerici di danno, tra i quali è presente la *Tail Length* ovvero la lunghezza della cometa, la *Tail Intensity* ovvero la % di DNA presente nella cometa ed infine il *Tail Moment* cioè il prodotto degli altri due indici.

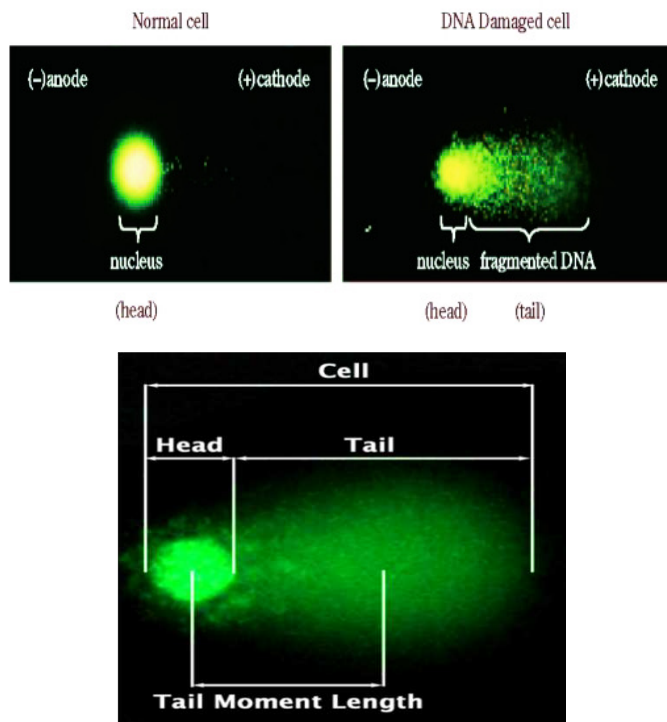


Figura 4-4: Rappresentazione della cometa e degli indici del comet assay, Fonte:

4.3 Effetti del rame su *Eisenia foetida*

I lombrichi del genere *Eisenia* sp. hanno la capacità di accumulare lentamente il rame e di moderare il suo assorbimento utilizzando i meccanismi di escrezione (Owojori et al., 2010) ed infatti hanno ghiandole calcifere più attive delle specie endogene (che spesso risentono di più delle contaminazioni) così da essere più efficienti nell'escrezione del rame (Mirmonsef et al., 2017).

In suoli con elevata concentrazione di rame i lombrichi possono subire **perdita di biomassa** di circa il 30% quando applicati 40, 1600, o 20000 kg Cu/ha (Helling et al., 2000) in seguito al ridotto apporto di cibo poiché riducono gli spostamenti per cercare la fonte nutritiva (Tatsi et al., 2018). Infatti, i lombrichi esposti a fungicidi rameici entrano in un periodo di quiescenza che permette loro di sopravvivere alla contaminazione ma porta, appunto, ad una perdita di biomassa (Bart et al., 2017).

Gli ioni dei metalli di transizione, come appunto il rame, sono redox-attivi di conseguenza favoriscono la formazione delle **specie reattive dell'ossigeno** (*Reactive Oxygen Species*), innescando il danneggiamento cellulare dovuto ai radicali liberi (Gaetke et al. 2014) e può essere dalle due alle quattro volte maggiore con una dose di 400 kg Cu/ha e dalle 3 alle 11

volte con 800 kg Cu/ha, a seconda che si tratti dell'applicazione della poltiglia bordolese o dell'ossicloruro di rame (Wang et al., 2018). Gli enzimi antiossidanti sono il primo meccanismo di difesa poiché eliminano e disattivano gli eccessi di ROS (Gautam et al., 2018). Studiando l'espressione dei geni che codificano per le **metallotioneine**, proteine coinvolte nell'omeostasi dei metalli e nella detossificazione, è stata osservata una sovraregolazione che dimostra che tali proteine intervengono nell'omeostasi del rame e proteggono le cellule dai danni ossidativi (Mincarelli et al., 2019). Un altro gruppo di proteine è stato studiato, le **Heat Shock Proteins**, ed è stato visto che le Hsp70 possono essere considerate un *early-warning biomarker* di basse concentrazioni di agenti di stress (Nadeau et al., 2001) ma non è stata registrata una alterazione della loro espressione (Mincarelli et al., 2019).

Concentrazioni di rame sub letali causano cambiamenti nell'attività enzimatica così come per l'esposizione ad altri metalli (Pb, Zn, Cd) (Banni et al., 2009; Maity et al., 2008). Per quanto riguarda la risposta dell'*Eisenia foetida* all'attività dell'**acetilcolinesterasi** (AChE) si è notata una relazione dose/risposta bifasica chiamata ormesi poiché i lombrichi hanno una temporanea risposta adattativa all'inizio dell'esposizione (Hackenberger et al., 2012). Infatti, l'azione dell'AChE viene inibita nei primi giorni di esposizione mentre elevate dosi di rame aumentano l'attività dell'AChE nel lungo periodo (Zheng et al., 2013). Quindi elevate concentrazioni del metallo e lunghi tempi di esposizione portano alla produzione dell'enzima poiché a seguito dell'apoptosi cellulare e quindi della rottura della membrana si ha un rilascio dell'AChE (Zhang et al., 2002). Difatti l'AChE è utilizzata come *biomarker* dell'esposizione degli organismi ai contaminanti anche grazie alla sua sensibilità ai cambiamenti abiotici dovuta alla funzione che svolge nella neurotrasmissione (Banni et al., 2010). Anche la **GST** svolge un ruolo importante nella detossificazione (Wang et al., 2020) e la sua attività aumenta in periodi abbastanza lunghi in seguito all'accumulo di maggiori concentrazioni di rame nei tessuti (Cataldo et al., 2011). Durante l'esposizione al rame si osserva anche un aumento del livello delle **ThioBarbituric Acid Reactive Substances** (TBARS) soprattutto in lombrichi sottoposti ad una leggera contaminazione ed un incremento della **malondialdeide** (MDA) che deriva dalla reazione tra acidi grassi e radicali liberi causando danni alle membrane lipidiche (Zhou et al., 2013).

Con elevate concentrazioni di rame si osserva una compromissione dei **parametri riproduttivi** come il numero, il peso e la schiusura con successo dei cocoon e si osserva quindi una diminuzione del numero di questi che può essere del 35% a partire dall'applicazione di 12,8 kg Cu/ha (Helling et al., 2000) ma in suoli con una leggera contaminazione si registra invece un aumento del numero di cocoon e ciò può essere spiegato dalla risposta ormonale

ovvero dalla stimolazione originata da basse concentrazioni di contaminanti (Gao et al., 2019). Infatti, molti autori suggeriscono di studiare l'effetto dei contaminanti oltre che sulla sopravvivenza degli organismi anche sulla riproduzione o crescita (Choo e Baker 1998; Yasmin e D'Souza 2010), indicando che la produzione dei cocoon nei lombrichi è più sensibile allo stress indotto dai tossicanti rispetto alla crescita (Addison e Holmes 1995, Kokta 1992 a, Neuhauser e Callahan 1990). L'esposizione al rame causa un aumento della sensibilità dei cocoon all'essiccazione o al gelo (Holmstrup et al., 1998). I contaminanti hanno un diverso effetto a seconda dell'età e dello stadio di sviluppo (Lowe e Butt, 2007), i giovani sono sicuramente più sensibili degli adulti (Booth e O'Halloran 2001; Spurgeon e Hopkin 1996; Zhou et al., 2008) ma la valutazione del rischio ecotossicologico sfrutta solamente gli individui adulti con il rischio di sottostimare l'effetto dei contaminanti sulla popolazione (van Gestel e Weeks 2004).

Comunque, la variabilità degli effetti ecotossicologici del rame sui lombrichi è variabile e dipende dalle caratteristiche fisico-chimiche del suolo e dalla specie impiegata nei test (Karimi et al., 2021).

I **danni al DNA** sono spesso legati ad un aumento delle ROS a causa del deterioramento cellulare e ciò potrebbe spiegare il meccanismo di genotossicità dei contaminanti.

Con l'esposizione prolungata si è osservata una significativa diminuzione del tasso di danno al DNA. Questo potrebbe significare un potenziale adattamento a basse dosi di sostanza tossica ma potrebbe essere anche dovuto alla minore mobilità del DNA danneggiato a causa di legami DNA-DNA o al legame DNA-proteina. Nel breve periodo e in dipendenza dalla specie gli effetti citotossici e genotossici del rame sono molto variabili, di conseguenza, è difficile collegarli direttamente alla risposta della componente biologica del suolo o del suo funzionamento (Karimi et al., 2021).

È necessario però fare un'importante precisazione ovvero che negli studi ecotossicologici sono state utilizzate dosi che vanno da 2,8 a 20000 kg Cu/ha/anno e di queste l'80% è uguale o superiore a 200 kg Cu/ha/anno cioè la dose che identifica la soglia di ecotossicità del rame, al di sopra della quale si hanno effetti distruttivi sugli organismi del suolo ed inoltre tale soglia è 50 volte superiore la dose autorizzata in viticoltura. Questa soglia cambia a seconda del gruppo biologico e i lombrichi rappresentano il gruppo più sensibile con effetti deleteri sulla loro biomassa (Karimi et al., 2021).

Capitolo 5

MATERIALI E METODI

5.1 Area di studio

Le due campagne di monitoraggio condotte al termine della vendemmia (ottobre 2020 /ottobre 2021) hanno avuto come oggetto di sperimentazione tre vigneti marchigiani nella provincia di Ancona, precisamente a Castelplanio (vigneto Mulino) e ad Angeli di Varano (vigneto Mazzoni), entrambi gestiti in biologico dalla Società Cooperativa Agricola Terre Cortesi Moncaro di Camerano (AN), ed un terzo a San Paolo di Jesi (vigneto Dottori), anch'esso gestito in biologico.

Vigneto Castelplanio:

Tabella 5-1: Dati vigneto Mulino, Castelplanio

Coordinate	43°30'39''N 13°03'29''E
Estensione	0,8 ha (interessati dalla prova)
Esposizione	Est
Cultivar	Verdicchio
Portainnesto	SO4
Sesto d'impianto	Guyot (2,5 m tra le file, 1 m lungo la fila)
Anno impianto	2008
Interfilare	inerbito a file alterne

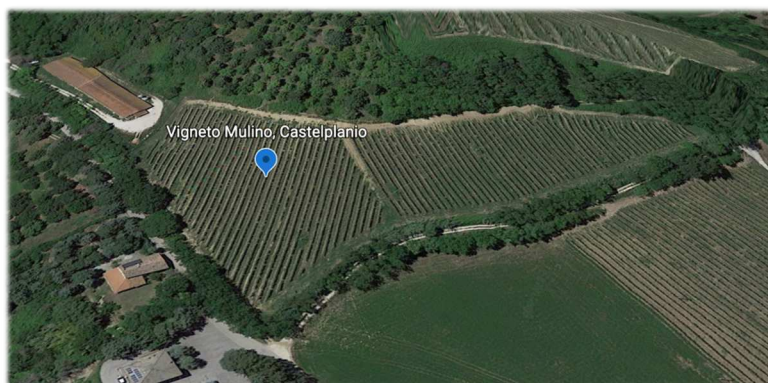


Figura 5-1: Foto aerea vigneto Mulino, Castelplanio, Fonte: Google Earth 3D

Vigneto Angeli di Varano:

Tabella 5-2: Dati vigneto Mazzoni, Varano 2020

Coordinate	43°33'03''N 13°32'19''E
Estensione	1,5 ha (interessati dalla prova)
Esposizione	Sud
Cultivar	Montepulciano
Portainnesto	SO4
Sesto d'impianto	Cordone speronato (2,2 m tra le file, 1 m lungo la fila)
Anno impianto	2003
Interfilare	Inerbito a file alterne



Figura 5-2: Foto aerea vigneto Mazzoni, Varano 2020, Fonte: Google Earth 3D

Vigneto Dottori:

Tabella 5-4: Dati vigneto Dottori

Coordinate	43°27'42''N 13°09'20''E
Estensione	4 ha (interessati dalla prova)
Esposizione	Nord-Est
Cultivar	Verdicchio
Portainnesto	1503 Paulsen
Sesto d'impianto	Guyot bilaterale (3 m tra le file, 1,10 m lungo la fila)
Anno impianto	2014
Interfilare	Inerbito (trifoglio alessandrino, inerbimento spontaneo)

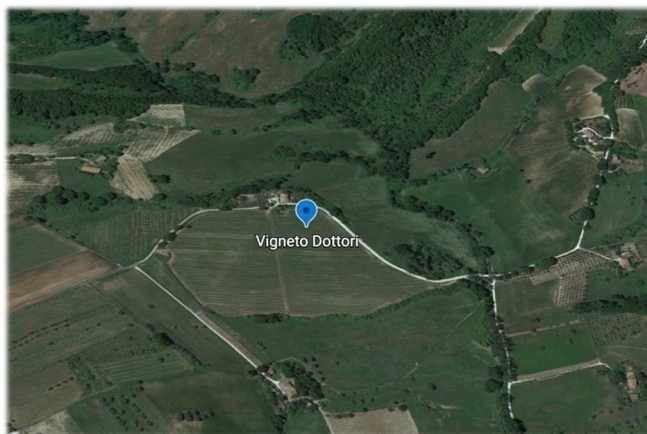


Figura 5-3: Foto aerea vigneto Dottori, San Paolo di Jesi 2020, Fonte: Google Earth 3D

L'area dei vigneti di Castelplanio e Varano interessata dalla sperimentazione è stata ripartita in cinque tesi (trattamenti) con uno schema sperimentale a blocchi randomizzati con tre ripetizioni (zona a monte, zona intermedia e zona a valle del filare) per sottoporre le tesi agli stessi fattori ambientali influenzanti lo sviluppo della peronospora e per valutare l'efficacia dei trattamenti contro la malattia. Ogni tesi comprende in media 7 filari (il numero varia in base alla lunghezza dei filari) che vengono gestiti secondo il trattamento che rappresentano. Le tesi individuate sono le seguenti:

- testimone aziendale (utilizzo per l'intera stagione vegetativa di prodotti a base di rame);
- trattamenti con sostituto al rame (utilizzo del chitosano allo 0,5% di p.a. per l'intera stagione vegetativa);
- trattamenti alternati (utilizzo del rame come nella strategia aziendale nella prima parte della stagione e dopo la fioritura utilizzo del chitosano allo 0,5% di p.a.);
- trattamenti combinati (utilizzo di una miscela di ossicloruro di rame a metà della dose massima di etichetta-125 mL/hL- e chitosano allo 0,25% di p.a.);
- testimone non trattato.

Le prime tre tesi sono state analizzate in questo lavoro di tesi.

Nel 2020 nel vigneto di Varano nell'ambito del testimone aziendale nel corso della stagione vegetativa sono stati effettuati 9 trattamenti a base di rame e 4 trattamenti a base di rame nel trattamento alternato. Nel 2021 nello stesso vigneto sono stati applicati 7 trattamenti a base di rame per il testimone aziendale e 5 per il trattamento alternato. Nel vigneto di Castelplanio nel 2020 sono stati utilizzati per il controllo della peronospora 9 trattamenti rameici per il testimone aziendale e 4 per il trattamento alternato mentre nel 2021 i trattamenti rameici per il testimone aziendale sono stati 5 e 4 per il trattamento alternato (da notare come in entrambi i vigneti nel 2021 il numero di trattamenti è diminuito a seguito dell'andamento più secco della

stagione). Si può inoltre aggiungere che per il testimone aziendale sono stati utilizzati in media 2-3 kg/ha di rame metallo (Cu^{2+}) distribuito principalmente sotto forma di solfato di rame tribasico, solfato di rame neutralizzato, idrossido di rame e ossido rameoso mentre per il trattamento alternato è stato stimato l'impiego in media di 1 kg/ha di rame metallo distribuito con gli stessi prodotti.

Nel vigneto Dottori sono state individuate due tesi nell'area destinata alla sperimentazione, la prima con inerbimento con *cover crop* di trifoglio alessandrino per 1/3 dell'appezzamento e la seconda con inerbimento spontaneo nella parte restante, entrambe con la stessa difesa biologica dalla peronospora. Nel 2020 sono stati necessari 8 trattamenti in tutt'e due le tesi impiegando circa 1,7 kg Cu^{2+} /ha in forma principalmente di idrossido di rame.

5.2 Metodo di campionamento

Nei vigneti di Castelplanio e di Varano, le tre tesi scelte sono state identificate con i seguenti codici:

A= testimone aziendale (utilizzo per l'intera stagione vegetativa di prodotti a base di rame);

B= trattamenti alternati (utilizzo del rame come nella strategia aziendale nella prima parte della stagione e dopo la fioritura utilizzo del chitosano allo 0,5% di p.a.);

C= trattamenti con sostituto al rame (utilizzo del chitosano allo 0,5% di p.a. per l'intera stagione vegetativa).

Per ogni tesi sono stati individuati cinque punti di campionamento distanziati lungo tutta la lunghezza del filare individuato per una determinata tesi (sono stati utilizzati i filari centrali di ogni tesi per evitare contaminazione da deriva). In ogni punto sono stati prelevati 5 campioni di suolo alla profondità di 0-20 cm (compreso il cotico erboso) e 5 alla profondità di 20-40 cm, successivamente sono stati etichettati con i rispettivi codici (es. A1 0-20 Varano, A1 20-40 Varano, A2, A3, A4, A5) ed imbustati, per un totale di 30 campioni a vigneto.

Nel vigneto Dottori, i codici delle due tesi sono:

D= inerbimento spontaneo;

E= inerbimento con trifoglio alessandrino.

Nei tre punti di campionamento istituiti sono stati prelevati 3 campioni alla profondità di 0-20 cm (con cotico erboso) e 3 campioni alla profondità di 20-40 cm, ottenendo in totale 12 campioni. Anche questi campioni sono stati etichettati ed imbustati con le stesse modalità.

Nel 2021 il metodo di campionamento utilizzato è lo stesso descritto precedentemente (nel 2021 il vigneto Dottori non è stato campionato).



Figure 5-4 e 5-5: Prelievo dei campioni in campo

5.3 Analisi dei suoli

I campioni così prelevati sono stati essiccati all'aria, a seguire macinati manualmente con l'aiuto di un mortaio e setacciati con vaglio di 2 mm fino a ricavare circa 3 kg di terra fine per ogni campione.



Figure 5-6 e 5-7: Essiccamento all'aria dei campioni a sinistra, setacciatura a destra

I suoli così setacciati sono stati inviati al centro agrochimico regionale dell'ASSAM (Agenzia Servizi Settore Agroalimentare Marche) di Jesi per effettuare le analisi delle caratteristiche del suolo:

- pH in H₂O (DM 13/09/99 GU SO n° 248 del 21/10/1999-III.1);
- tessitura a 3 frazioni gr/kg (sabbia, limo, argilla) (DM 13/09/99 GU SO n° 248 del 21/10/1999-II.5);
- conducibilità elettrica dS/m (DM 13/09/99 GU SO n° 248 del 21/10/1999-IV.1);
- carbonio organico gr/kg (DM 13/09/99 GU SO n° 248 del 21/10/1999-VII.3);

- sostanza organica gr/kg (DM 13/09/99 GU SO n° 248 del 21/10/1999-VII.3, VII.3,6);
- capacità di scambio cationico meq/100 gr (DM 13/09/99 GU SO n° 248 del 21/10/1999-XIII.2).

5.4 Estrazione delle tre forme di rame

- Estrazione del RAME BIODISPONIBILE (protocollo da Lindsay e Norwell 1969, DM 13 settembre 1999)

Come da protocollo, viene impiegata una soluzione estraente di DTPA (diethylenetriamine pentaacetato) composta da TEA (trietanolamina) 0,1M, DTPA 0,005 M e calcio cloruro 2-idrato ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,01M, sciolti in H_2O deionizzata e si porta a pH 7,3 con HCl (acido cloridrico).



Figura 5-8: pHmetro



Figura 5-9: Matraccio da 1 L con soluzione estraente

L'estrazione del rame biodisponibile è stata condotta come segue:

- al campione di suolo secco è stata addizionata la soluzione estraente di cui sopra in rapporto 1:2;

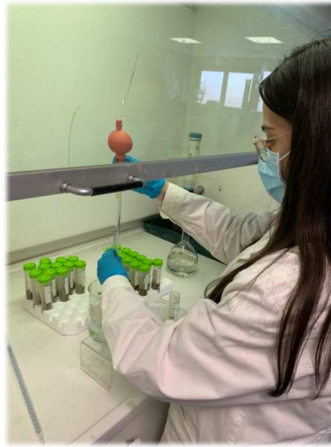


Figura 5-10: Aggiunta di 25 mL di soluzione estraente

- agitazione per 2 ore a 120 giri/min;



Figura 5-11: Campioni in agitazione

- centrifugazione a 5000 rpm per 5 minuti;



Figura 5-12: Campioni in centrifuga

- filtraggio con carta filtro.



Figura 5-13: Campione durante la filtrazione

- Estrazione RAME SOLUBILE (protocollo UNI EN 12457-2)
L'estrazione del rame solubile è stata condotta come segue:
 - al campione di suolo secco è stata addizionata H₂O deionizzata (in rapporto 1:10 Lt/kg);
 - agitazione per 24 ore a 120 giri/min;
 - centrifugazione a 5000 rpm per 5 minuti;
 - filtraggio su carta filtro.
- Estrazione RAME TOTALE (protocollo in acqua regia con modificazioni, Kasassi et al., 2008)
 - si pesano 0,5 grammi di suolo secco in provette di vetro ai quali vengono 2 mL di acqua ossigenata (H₂O₂) al 30% e vengono lasciate *overnight* sotto cappa;

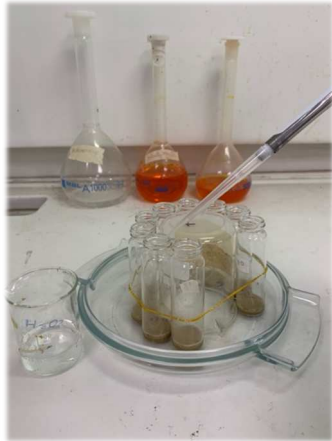


Figure 5-14 e 5-15: Aggiunta di H_2O_2

- dopo 12 ore, si procede con l'attacco acido aggiungendo 7 mL di HNO_3 ;
- le provette vengono messe con un galleggiante in bagnetto d'acqua preriscaldato ($>85^\circ C$) per 15 ore;

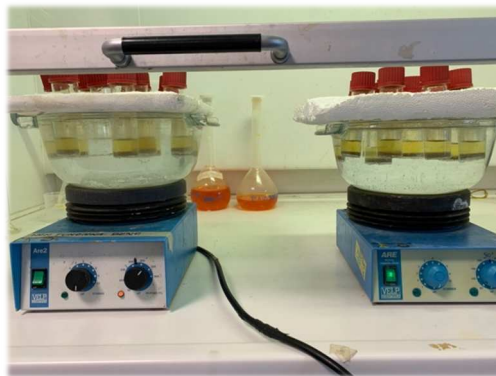


Figura 5-16: Campioni nel bagnetto d'acqua

- terminate le 15 ore si lasciano raffreddare i campioni e si filtrano con carta filtro.

5.5 Determinazione della concentrazione di rame

La concentrazione delle tre forme di rame è stata determinata attraverso l'utilizzo dell'ICP-MS (spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente). Tale metodo è stato impiegato sia nella campagna di monitoraggio 2020 che 2021.

5.6 Contaminazione dei suoli e impostazione prova con *Eisenia foetida*

Per la valutazione degli effetti di dosi sub letali sulle attività funzionali e sul DNA del lombrico terricolo *Eisenia foetida* è stato utilizzato come suolo di partenza quello alla profondità 0-20

cm del vigneto di Varano appartenente alla tesi del testimone aziendale (Varano A 0-20 cm). Tale suolo aveva un contenuto in Cu totale medio di 58 mg/kg.

Nell'ottica di testare altre concentrazioni, il suolo di cui sopra è stato ulteriormente contaminato con il prodotto commerciale Siamam 20 WG (http://www.fitosanitari.salute.gov.it/fitosanitariwsWeb_new/FitosanitariServlet) che deriva dal solfato di rame. È stato utilizzato questo prodotto poiché è quello maggiormente impiegato nei vigneti oggetto di studio. Si è scelto quindi di contaminare il suolo campionato raggiungendo le concentrazioni finali di Cu di 90 mg/kg e 150 mg/kg, rimanendo al di sotto sia della concentrazione soglia di contaminazione di 200 mg/kg indicata per suoli agricoli dal Decreto del 1° marzo, n°46 nell'Allegato 2 (<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2019/06/07/19G00052/sg>) sia dell'LC₅₀ (*Lethal Concentration 50*) riferita al solfato di rame per il lombrico *Eisenia foetida* fissata a valori superiori ai 155 mg/kg, come indicata nel PPDB (*Pesticides Properties DataBase*).

Nel complesso, dunque, sono state allestite tre tesi con concentrazioni di rame di: 58 mg/kg (suolo tal quale), 90 mg/kg (suolo tal quale fortificato con Siamam 20 WG) e 150 mg/kg (suolo tal quale fortificato con Siamam 20 WG). Ogni tesi è stata condotta in tre repliche costituite da 600 gr di suolo secco, 12 lombrichi e acqua fino al raggiungimento di un'umidità del 27%.

Per seguire l'andamento dei cambiamenti morfologici e comportamentali dei lombrichi sono stati istituiti 5 tempi di prelievo (a 2, 7, 14, 21, 28 giorni dalla contaminazione). Ad ogni tempo di prelievo i lombrichi presenti nelle 3 repliche, dopo essere stati sciacquati con H₂O deionizzata, sono stati pesati ed oltre al loro peso è stato registrato ogni cambiamento visibile della morfologia (restringimenti, miniaturizzazioni, lesioni ecc.), del comportamento (spasmi, inabilità di scavo, ecc.) ed eventuali decessi.

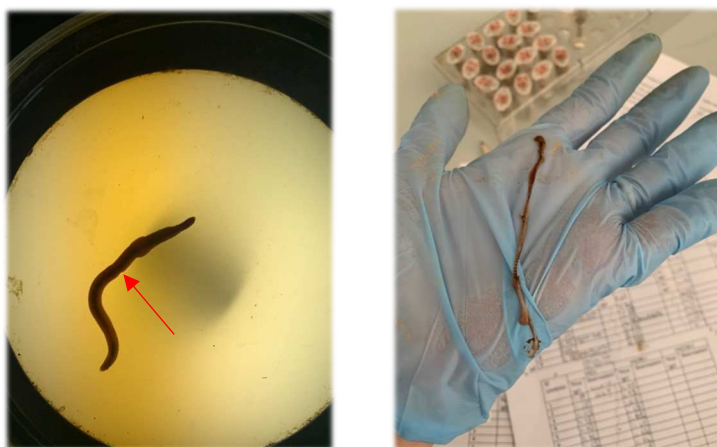


Figure 5-17 e 5-18: Lombrico con restringimento a sinistra, lombrico morto a destra

Tre lombrichi (uno per replica) da ogni tesi sono stati prelevati ad ogni tempo di osservazione e lasciati spurgare su piastre Petri con carta filtro ben umidificata per una notte, così da essere utilizzati per l'analisi del *Comet assay*.

5.7 *Comet assay*

(protocollo da Mincarelli et al., 2019 con modificazioni)

Di seguito le fasi per la raccolta dei celomociti e la preparazione del vetrino:

- si espone il lombrico a 5 mL di soluzione di estrusione a pH 7,5 (PBS 1×-phosphate-buffered saline- + etanolo assoluto al 5% + EDTA-acido etilendiamminotetraacetico- 25 mg/mL + Guaiacolo 10 mg/mL) e si aspettano 4-5 minuti a T° ambiente;
- si raccolgono e si lavano con PBS 1x le cellule estruse con 3 cicli di centrifugazione (300 giri/min, 4°C, 10 minuti);
- si effettua la conta delle cellule nella camera di Burker al microscopio ottico, per calcolare quanti microlitri di soluzione cellulare è necessario prelevare per standardizzare il numero di cellule per spot;
- si spottano 35 µL di cellule in LMA (1%) a 37°C.

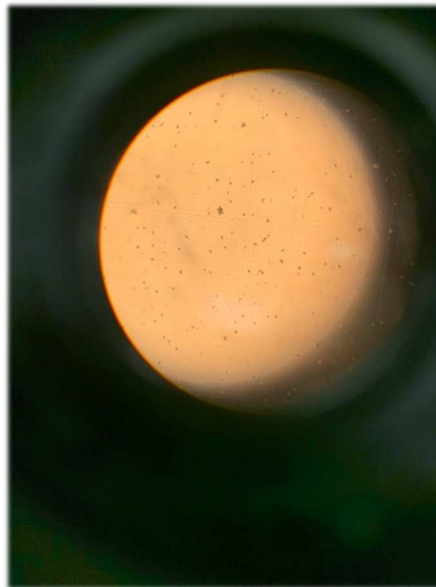


Figura 5-19: Celomociti osservati al microscopio ottico

- si pone il vetrino su ghiaccio per 15 minuti al buio per permettere la completa solidificazione dell'agarosio;

- si immergono i vetrini nella soluzione di lisi (DMSO-dimetil sulfoxide- + Triton X-100 + soluzione salina) fredda per un'ora;
- unwinding: si posizionano i vetrini nella vasca elettroforetica ricoperti dal tampone elettroforetico (Na_2EDTA in H_2O , pH 13) per 20 minuti;
- corsa elettroforetica: 11 V per 20 minuti;
- lavaggio, disidratazione, colorazione e lettura dei vetrini al microscopio automatizzato Lionheart FX.

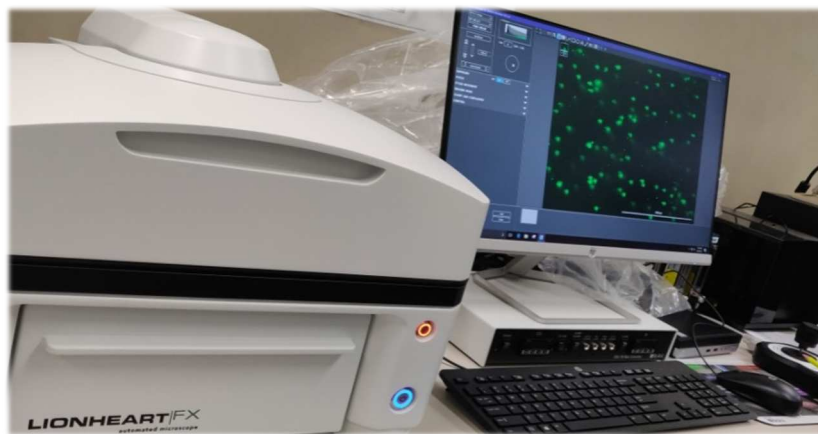


Figura 5-20: Microscopio automatizzato Lionheart FX ed elaborazione computerizzata delle comete

I danni al DNA (rottura del singolo o doppio filamento) sono stati valutati attraverso l'elaborazione computerizzata delle immagini e sono stati indicati in termini di *Tail Intensity*.

Capitolo 6

RISULTATI E DISCUSSIONE

6.1 Residui di rame nella prima campagna di monitoraggio (ottobre 2020)

I tre vigneti allo studio hanno un'età differente e una differente storia dei trattamenti, di conseguenza sarebbe lecito aspettarsi valori di rame totale nel suolo diversificati tra loro e forse non in linea con il valore della concentrazione soglia di contaminazione. Per quanto riguarda l'età, i vigneti di Castelplanio e Varano hanno un'età simile e quantificabile in 15-20 anni mentre il vigneto Dottori ha un'età di 7 anni. Il numero dei trattamenti effettuati nei due anni di sperimentazione è riportato in Tabella 6-1:

Tabella 6-1: Numero dei trattamenti cuprici effettuati nei tre vigneti allo studio nei due anni di sperimentazione

	anno 2020		anno 2021	
	Testimone aziendale	Trattamento alternato	Testimone aziendale	Trattamento alternato
Castelplanio	9	4	5	4
Varano	9	4	7	5
	Inerbimento spontaneo	Inerbimento con cover crop	Inerbimento spontaneo	Inerbimento con cover crop
Dottori	8	8	non campionato	non campionato

Il calcolo approssimativo delle quantità di rame in mg/kg aggiunte al suolo attraverso i trattamenti nelle varie tesi è stato effettuato considerando le dosi distribuite nei due anni studiati e ammettendo che la media di rame che giunge al suolo al momento del trattamento sia il 30% del prodotto irrorato (<https://rivistafrutticoltura.edagricole.it/meccanizzazione/migliorare-lirrorazione-dei-fitofarmaci-riducendo-volumi-e-deriva/>). Nel 2020 sia nel testimone aziendale di Castelplanio che di Varano sono stati distribuiti in media 2,5 kg Cu/ha e con 9 trattamenti si raggiungono i 22,5 kg Cu/ha di cui 6,75 kg Cu/ha cadono a terra. Prendendo in esame uno spessore di 20 cm, in un ettaro si hanno circa 3 milioni di kg di suolo, di conseguenza la quantità aggiunta corrisponde a 4,5 mg Cu/kg. Nella tesi del trattamento alternato, invece, nel 2020 sono stati

aggiunti 0,8 mg Cu/kg. Nelle due tesi del vigneto Dottori nel 2020 sono stati necessari circa 1,7 kg Cu/ha e con 8 trattamenti si hanno 13,6 kg Cu/ha di cui il 30% arriva al suolo cioè 4,08 kg Cu/ha. Considerando lo stesso spessore di suolo di Varano e Castelplanio, i mg Cu/ha aggiunti sono 2,72.

Tali aggiunte dovrebbero portare ad avere concentrazioni iniziali di rame totale diverse nelle varie tesi.

I residui del rame totale in mg/kg rilevati nella prima campagna di monitoraggio (ottobre 2020) sono riportati nella Tabella 6-2:

Tabella 6-2: Residui di rame totale, ottobre 2020

Trattamento (A=trattamento intera stagione con rame, B=trattamento metà stagione con rame/metà stagione con sostituto al rame, C=trattamento intera stagione con sostituto al rame)	Media	Deviazione standard
Varano A 0-20 cm	58,770	11,450
Varano B 0-20 cm	46,710	7,930
Varano C 0-20 cm	53,300	4,981
Varano A 20-40 cm	36,638	6,528
Varano B 20-40 cm	37,195	2,306
Varano C 20-40 cm	41,366	2,403
Castelplanio A 0-20 cm	63,822	5,559
Castelplanio B 0-20 cm	56,368	6,791
Castelplanio C 0-20 cm	54,522	8,327
Castelplanio A 20-40 cm	57,718	10,945
Castelplanio B 20-40 cm	46,008	15,253
Castelplanio C 20-40 cm	45,806	8,287
Dottori D 0-20 cm	39,900	7,543
Dottori D 20-40 cm	41,596	4,440
Dottori E 0-20 cm	45,650	6,091
Dottori E 20-40 cm	41,325	2,489

I valori del rame totale (estratto in acqua regia) misurati in mg/kg nello strato 0-20 cm nei tre vigneti allo studio oscillano tra 39,900 mg/kg e 63,822 mg/kg, mostrando che i trattamenti rameici effettuati nel corso degli anni di coltivazione di questi vigneti hanno seguito in maniera scrupolosa le norme dettate a livello europeo e nazionale sulla quantità di p.a. da impiegare in agricoltura biologica e sulla sua modalità di distribuzione. Infatti, risultano essere inferiori per entrambe le profondità alla concentrazione soglia di contaminazione per le aree agricole fissata

a 200* mg/kg dal Decreto del 1° marzo 2019, n°46 nell'Allegato 2 (*Valore da utilizzare solo in caso di assenza di Valori di Fondo Geochimico (VFG) validati da ARPA/APPA).

Se confrontati con i valori di accumulo di rame nei suoli di vigneto riportati dalla letteratura, si può notare come questi valori risultino decisamente inferiori. Nel report dell'ARPAV per la provincia di Treviso (ARPAV, 2011) vengono misurati valori medi in mg/kg di rame totale come riferiti in Tabella 6-3:

Tabella 6-3: Parametri statistici del rame negli orizzonti superficiali di suoli veneti coltivati a vigneto

	N° dati	Media	Deviazione standard	Mediana	Minimo	Massimo	95° percentile
Vigneti	141	95,2	70	76	16	430	231

Per 141 vigneti analizzati si ha una media di 95,2 mg/kg con valori massimi fino a 430 mg/kg e un 95° percentile di 231.

In un altro rapporto dell'ARPAV del 2019, il rame totale nei suoli di vigneto presenta valori molto elevati compresi tra 315 mg/kg e 840 mg/kg mentre il biodisponibile estratto con DTPA in media rappresenta il 32% del totale (ARPAV, 2019). Anche dall'analisi ambientale sulla contaminazione diffusa di suolo e acque sotterranee condotta dall'ARPA della regione Piemonte (ARPA, 2014), si estrapolano dati del contenuto di rame totale in mg/kg in suoli viticoli superiori a quelli monitorati in questo lavoro, come riportato in Tabella 6-4 dove si ha una media di 119 mg/kg con valori massimi che raggiungono i 379 mg/kg:

Tabella 6-4: Parametri statistici del rame negli orizzonti superficiali di suoli piemontesi coltivati a vigneto

Media	Deviazione standard	Mediana	Minimo	Massimo	95° percentile
119	94	88	17	379	347

Analizzando le tre tesi nei due vigneti di Castelplanio e Varano, non si notano grandi differenze nel contenuto di rame totale, anche considerando le differenti dosi aggiunte nel 2020 e cioè 4,5 mg/kg, 0,8 mg/kg e zero mg/kg, rispettivamente. Si nota invece una certa variabilità dei dati con elevati valori di deviazione standard che in alcuni casi arriva al 20% (con un picco del 33%) della media, indicando una forte influenza spaziale sulla concentrazione dovuta in parte alla eterogeneità del suolo ed anche agli eventi meteorici. Inoltre, le differenze di concentrazione tra i due strati di suolo (0-20 cm e 20-40 cm) risultano in maniera statisticamente significativa superiori nel caso dello strato superficiale (0-20 cm) di Varano rispetto allo strato sotto superficiale (20-40 cm) mentre in Castelplanio non ci sono differenze

significative tra le due profondità. Comunque, considerando le tre tesi nei due siti di Varano e Castelplanio, si può notare un trend in diminuzione del rame totale passando dalla dose del testimone aziendale alla dose zero nello strato 0-20 cm, anche se i valori non risultano statisticamente differenti tra loro, come è possibile notare dal Grafico 6-1.

Per quanto riguarda il vigneto Dottori, anche in questo caso i due inerbimenti non hanno provocato notevoli variazioni nelle concentrazioni del rame totale, comparabili con quelle degli altri due vigneti.

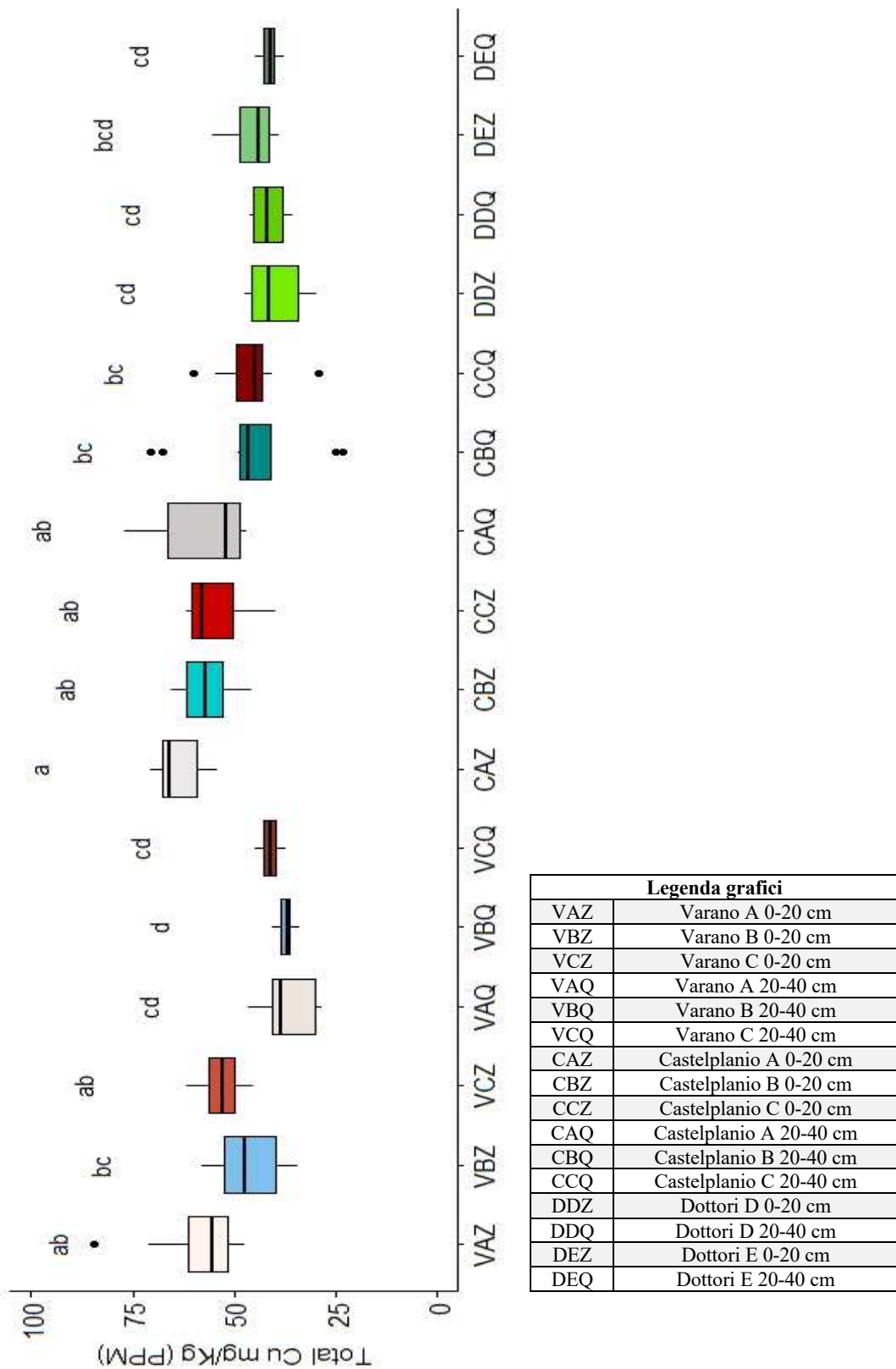


Grafico 6-1: Boxplot dati Cu totale ottobre 2020 con statistica (Dunn's test per comparazioni multiple a seguito del Kruskal-wallis test risultato significativo, aggiustamento p-value; Bonferroni)

Tuttavia, la specie di rame che deve essere monitorata ai fini del rischio di contaminazione ambientale e del rischio di tossicità per gli organismi non bersaglio è sicuramente la biodisponibile, poiché questa può essere lisciviata con rischio di contaminazione delle acque e assimilata dagli organismi presenti nel suolo, comprese le radici delle piante (Brunetto et al., 2016). I valori del rame biodisponibile in mg/kg riportati nella Tabella 6-5 risultano in percentuale rispetto al rame totale oscillanti tra il 7,43% e il 15,07%, certamente inferiori al valore medio del 32% riscontrato nella campagna di misurazioni effettuata dalla Regione Veneto nel 2019 (ARPAV, 2019).

Tabella 6-5: Residui di rame biodisponibile, ottobre 2020

Trattamento (A=trattamento intera stagione con rame, B=trattamento metà stagione con rame/metà stagione con sostituto al rame, C=trattamento intera stagione con sostituto al rame)	Media	Deviazione standard	% sul rame TOTALE
Varano A 0-20 cm	9,623	4,232	16,374
Varano B 0-20 cm	4,032	0,808	8,632
Varano C 0-20 cm	3,915	0,700	7,345
Varano A 20-40 cm	4,393	1,507	11,990
Varano B 20-40 cm	2,972	0,827	7,990
Varano C 20-40 cm	2,725	0,595	6,588
Castelplanio A 0-20 cm	10,821	2,191	16,955
Castelplanio B 0-20 cm	7,861	1,455	13,946
Castelplanio C 0-20 cm	6,823	1,360	12,514
Castelplanio A 20-40 cm	9,002	2,031	15,597
Castelplanio B 20-40 cm	6,819	3,068	14,821
Castelplanio C 20-40 cm	6,212	1,142	13,562
Dottori D 0-20 cm	4,817	1,170	12,073
Dottori D 20-40 cm	5,589	0,554	13,436
Dottori E 0-20 cm	5,409	0,735	11,849
Dottori E 20-40 cm	4,451	0,647	10,771

Nel Grafico 6-2 sono riportati i box-plot con la concentrazione del rame biodisponibile riscontrato nelle varie tesi nei tre vigneti alle due profondità:

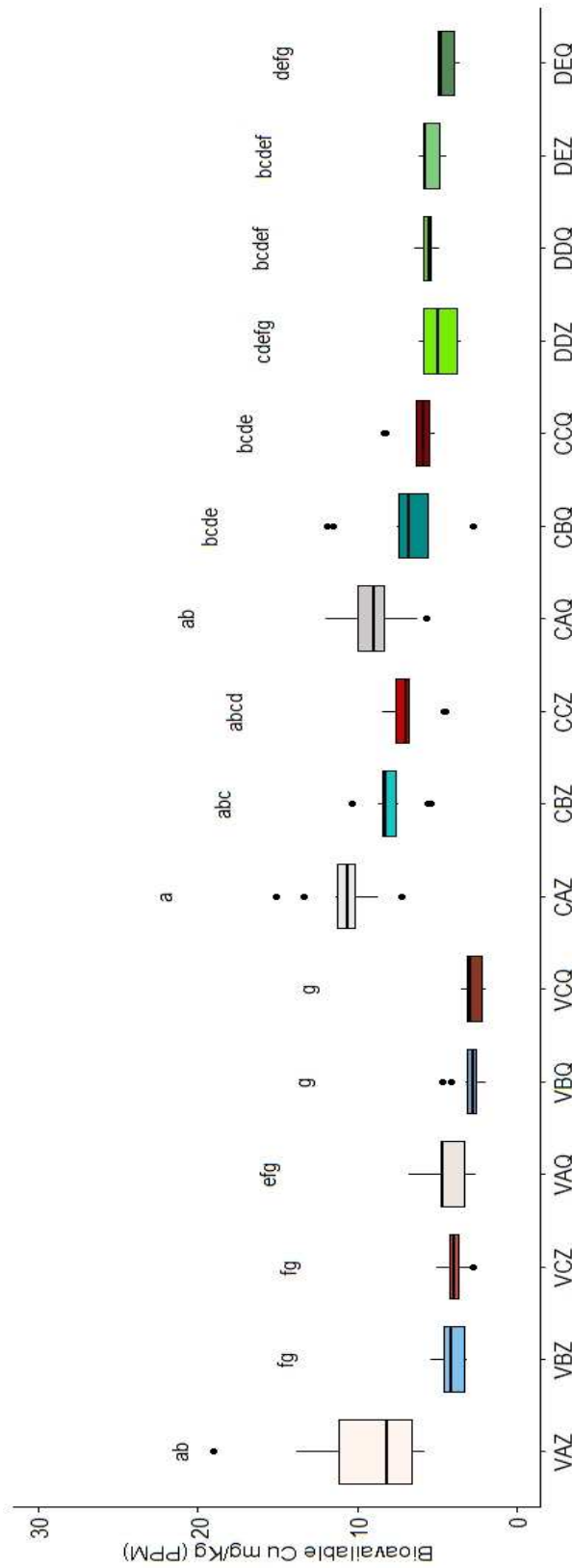


Grafico 6-2: Boxplot dati Cu biodisponibile ottobre 2020 con statistica (Dunn's test per comparazioni multiple a seguito del Kruskal-wallis test risultato significativo, aggiustamento p-value; Bonferroni)

Dal Grafico 6-2 non è possibile ricavare informazioni univoche. Nel caso del vigneto di Varano, la tesi del testimone aziendale dove è stata aggiunta la maggiore quantità di rame al suolo (4,5 mg/kg) mostra una concentrazione di biodisponibile significativamente più elevata rispetto alle altre due tesi nei primi 20 cm di suolo. Lo stesso trend si riscontra anche in Castelplanio ma con valori statisticamente non differenti tra loro e nel vigneto Dottori i due tipi di inerbimento non mostrano differenze significative di rame biodisponibile nei due strati 0-20 cm e 20-40 cm. D'altronde si può affermare che l'aggiunta di rame mediante i trattamenti sotto forme prontamente utilizzabili porti sicuramente ad un aumento della quota biodisponibile che poi nel tempo verrà fissata sia sulla sostanza organica che sui minerali grazie al processo definito "aging" (M. Komárek, et al., 2010), risultando indisponibile. Essendo la quota biodisponibile causa di possibili effetti tossici verso gli organismi dell'ecosistema, le sue variazioni vanno strettamente controllate per limitare il rischio ambientale. Tuttavia, osservando i valori del rame solubile in µg/kg riportati nella Tabella 6-6, questi risultano in percentuali molto basse rispetto al biodisponibile e si può quindi affermare che i rischi di diffusione ambientale del rame e cioè di lisciviazione verso gli strati profondi o scorrimento verso le acque superficiali o trasporto erosivo con le acque meteoriche, nelle condizioni di questa sperimentazione, risultano realmente molto limitati.

Tabella 6-6: Residui di rame solubile, ottobre 2020

Trattamento (A=trattamento intera stagione con rame, B=trattamento metà stagione con rame/metà stagione con sostituto al rame, C=trattamento intera stagione con sostituto al rame)	Media	Deviazione standard	% sul rame BIODISPONIBILE
Varano A 0-20 cm	226,90	49,769	2,359
Varano B 0-20 cm	137,10	21,255	3,398
Varano C 0-20 cm	166,78	23,573	4,266
Varano A 20-40 cm	121,80	23,500	2,777
Varano B 20-40 cm	96,25	14,305	3,230
Varano C 20-40 cm	114,25	49,799	4,183
Castelplanio A 0-20 cm	385,15	27,162	3,558
Castelplanio B 0-20 cm	288,30	53,463	3,664
Castelplanio C 0-20 cm	248,30	46,227	3,635
Castelplanio A 20-40 cm	307,97	87,330	3,421
Castelplanio B 20-40 cm	224,97	107,176	3,300
Castelplanio C 20-40 cm	245,60	50,524	3,960
Dottori D 0-20 cm	218,250	53,937	4,526

Dottori D 20-40 cm	217,833	46,748	3,901
Dottori E 0-20 cm	223,917	37,972	4,141
Dottori E 20-40 cm	186,250	33,731	4,179

Il suo monitoraggio è comunque importante ai fini della contaminazione diretta delle acque superficiali e profonde e molto spesso il test di cessione in acqua è utilizzato come test per la individuazione dei siti inquinati (la soglia di contaminazione delle acque sotterranee è di 1000 µg/L come scritta nel D.Lgs. 152/2006 nell'Allegato 5, Parte IV, Tabella 2, <https://www.gazzettaufficiale.it/dettaglio/codici/materiaAmbientale>).

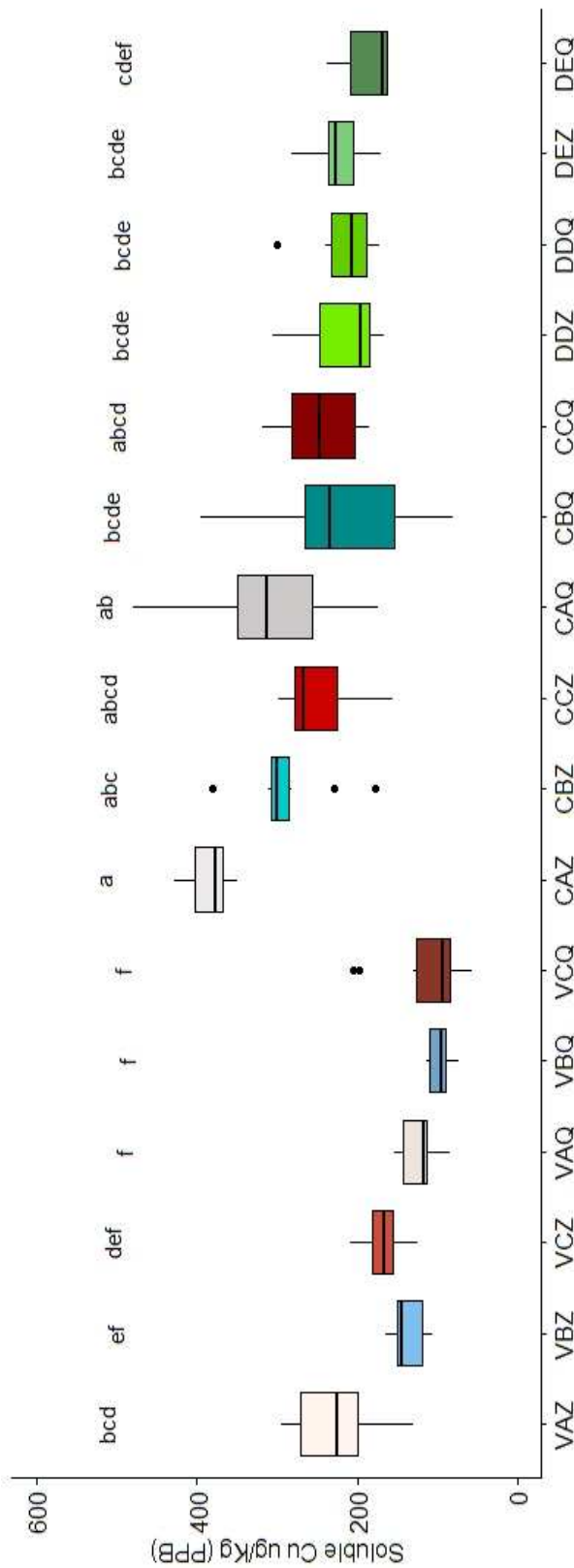


Grafico 6-3: Boxplot dati Cu solubile ottobre 2020 con statistica (Dunn's test per comparazioni multiple a seguito del Kruskal-wallis test risultato significativo, aggiustamento p-value; Bonferroni)

6.1.1 Correlazioni delle tre forme di rame con le proprietà chimico-fisiche del suolo

Le proprietà chimico-fisiche del suolo possono influenzare la speciazione del rame e quindi la sua presenza nelle tre forme misurate. Nella Tabella 6-7 sono riportate le principali caratteristiche chimico-fisiche dei suoli studiati.

Tabella 6-7: Risultati dell'analisi delle principali caratteristiche dei tre suoli alle due profondità

Campione	pH in H ₂ O	Tessitura a 3 frazioni	Carbonio organico	Sostanza organica	Capacità di scambio cationico
Varano A 0-20 cm	8,13	Tendenzialmente argilloso	14,7	25,3	24,5
Varano A 20-40 cm	8,19	Tendenzialmente argilloso	7,3	12,6	25,6
Varano B 0-20 cm	8,17	Tendenzialmente argilloso	11,9	20,5	30,9
Varano B 20-40 cm	8,17	Tendenzialmente argilloso	8,7	15	30,6
Varano C0-20 cm	8,2	Tendenzialmente argilloso	11,7	20,2	29,1
Varano C 20-40 cm	8,2	Tendenzialmente argilloso	9,8	16,9	29,6
Castelplanio A 0-20 cm	8,1	Medio impasto	12,85	22,15	25,4
Castelplanio A 20-40 cm	8,2	Medio impasto	6,85	11,8	24,5
Castelplanio B 0-20 cm	8,06	Medio impasto	13,2	22,75	22,4
Castelplanio B 20-40 cm	8,16	Medio impasto	7,7	13,3	22
Castelplanio C 0-20 cm	8,08	Tendenzialmente argilloso	11,7	20,2	24,1
Castelplanio C 20-40 cm	8,13	Tendenzialmente argilloso	8	13,8	21,9
Dottori D 0-20 cm	8,08	Tendenzialmente argilloso	7,7	13,3	21,2
Dottori D 20-40 cm	8,1	Tendenzialmente argilloso	7,2	12,4	21,2
Dottori E 0-20 cm	8,06	Tendenzialmente argilloso	9	15,5	21
Dottori E 20-40 cm	8,18	Tendenzialmente argilloso	5,75	9,9	20

Come si può notare, trattandosi di suoli con coltivazione in biologico, i valori della sostanza organica totale e della capacità di scambio cationico (CSC) sono elevati soprattutto se

confrontati con terreni con coltivazione in convenzionale ed esiste una correlazione positiva tra i colloidi del suolo e la capacità di scambio cationico. Essendo la CSC indicativa del numero di cationi biodisponibili presenti sul complesso di scambio colloidale, la quantità di rame biodisponibile sarà sicuramente correlata alla maggiore o minore presenza di colloidi. L'humus è il colloide principale dei suoli che, oltre ad assorbire sul complesso di scambio notevoli quantità di cationi, può immobilizzare il rame formando dei complessi insolubili e spesso irreversibili (M. Komárek, et al., 2010). I valori elevati di pH di questi suoli possono inoltre contribuire a insolubilizzare il rame sotto forma di idrossido (A. Kabata-Pendias, 2001), per cui le forme biodisponibile e solubile possono essere limitate a percentuali del totale molto più basse rispetto ad altri terreni, come osservabile dalle Tabelle 6-5 e 6-6 con valori che vanno da 6,588 a 16,374 come % di rame biodisponibile sul rame totale e da 2,359 a 4,526 come % di rame solubile sul rame biodisponibile. In definitiva, una coltivazione in biologico permette ai suoli di trattenere i metalli molto di più dei suoli con coltivazione in convenzionale e spesso a trasformarli in specie chimiche insolubili o indisponibili, infatti, il suolo ottimale per evitare che piante e microrganismi assorbano il Cu a livelli tossici e promuovere l'immobilità è un suolo che ha pH elevato, alta CSC ed elevato contenuto di sostanza organica (Mackie et al., 2012).

6.2 Residui di rame nella seconda campagna di monitoraggio (ottobre 2021)

In analogia con i dati riportati per il 2020 si riportano nelle successive Tabelle i dati riguardanti la campagna di monitoraggio 2021. Il monitoraggio è stato effettuato per valutare l'eventuale variazione delle concentrazioni delle tre forme di rame nei vigneti di Varano e Castelplano. Le Tabelle 6-8, 6-9 e 6-10 inquadrano i valori riscontrati rispettivamente per il rame totale (in mg/kg), biodisponibile (in mg/kg) e solubile (in µg/kg) mentre i Grafici 6-4, 6-5 e 6-6 riferiscono l'analisi statistica dei dati, visualizzando anche il trend delle concentrazioni nei due vigneti.

Tabella 6-8: Residui di rame totale, ottobre 2021

<u>Trattamento</u> (A=trattamento intera stagione con rame, B=trattamento metà stagione con rame/metà stagione con sostituto al rame, C=trattamento intera stagione con sostituto al rame)	<u>Media</u>	<u>Deviazione standard</u>
Varano A 0-20 cm	54,095	11,687
Varano B 0-20 cm	49,524	8,350
Varano C 0-20 cm	51,714	10,425
Varano A 20-40 cm	38,381	13,987

Varano B 20-40 cm	37,143	3,734
Varano C 20-40 cm	38,095	3,824
Castelplanio A 0-20 cm	57,810	6,305
Castelplanio B 0-20 cm	56,000	7,412
Castelplanio C 0-20 cm	54,381	6,541
Castelplanio A 20-40 cm	46,381	4,575
Castelplanio B 20-40 cm	42,952	6,610
Castelplanio C 20-40 cm	43,429	8,994

Tabella 6-9: Residui di rame biodisponibile, ottobre 2021

Trattamento (A=trattamento intera stagione con rame, B=trattamento metà stagione con rame/metà stagione con sostituto al rame, C=trattamento intera stagione con sostituto al rame)	Media	Deviazione standard	% sul rame TOTALE
Varano A 0-20 cm	8,860	2,440	16,379
Varano B 0-20 cm	5,942	1,807	11,998
Varano C 0-20 cm	5,342	1,667	10,330
Varano A 20-40 cm	5,205	2,745	13,561
Varano B 20-40 cm	3,124	0,325	8,411
Varano C 20-40 cm	2,785	0,412	7,311
Castelplanio A 0-20 cm	8,090	1,225	13,994
Castelplanio B 0-20 cm	8,774	1,679	15,668
Castelplanio C 0-20 cm	7,050	1,293	12,964
Castelplanio A 20-40 cm	5,941	1,281	12,809
Castelplanio B 20-40 cm	5,454	1,116	12,698
Castelplanio C 20-40 cm	5,400	2,149	12,434

Tabella 6-10: Residui di rame solubile, ottobre 2021

Trattamento (A=trattamento intera stagione con rame, B=trattamento metà stagione con rame/metà stagione con sostituto al rame, C=trattamento intera stagione con sostituto al rame)	Media	Deviazione standard	% sul rame BIODISPONIBILE
Varano A 0-20 cm	485,600	84,737	5,485
Varano B 0-20 cm	335,400	63,862	5,638
Varano C 0-20 cm	322,200	87,600	6,028
Varano A 20-40 cm	508,600	248,312	9,779
Varano B 20-40 cm	253,000	37,437	8,099
Varano C 20-40 cm	241,316	40,259	8,654
Castelplanio A 0-20 cm	489,474	49,736	6,044
Castelplanio B 0-20 cm	588,000	139,351	6,702
Castelplanio C 0-20 cm	444,444	74,722	6,298
Castelplanio A 20-40 cm	357,263	31,378	6,009
Castelplanio B 20-40 cm	399,778	60,896	7,334
Castelplanio C 20-40 cm	375,333	106,163	6,944

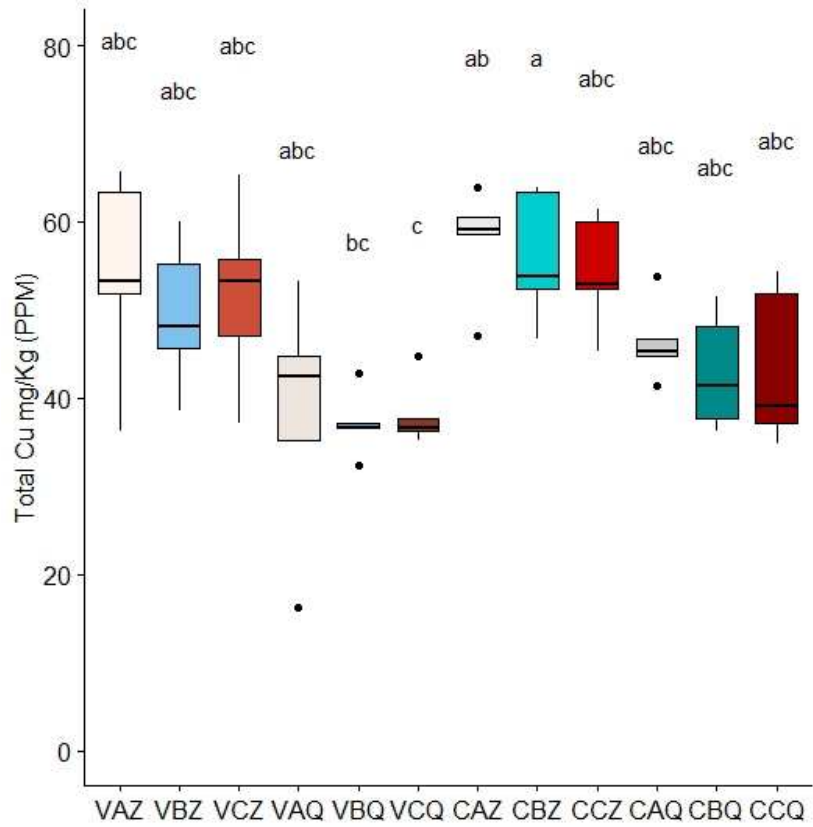


Grafico 6-4: Boxplot dati Cu totale ottobre 2021 con statistica (Dunn's test per comparazioni multiple a seguito del Kruskal-wallis test risultato significativo, aggiustamento p-value; Bonferroni)

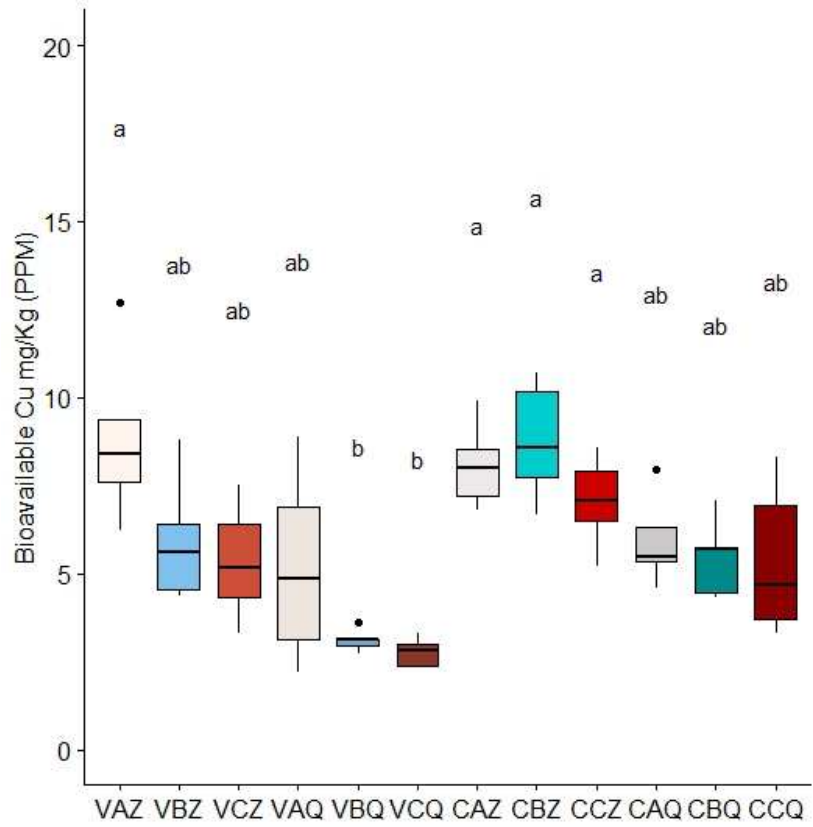


Grafico 6-5: Boxplot dati Cu biodisponibile ottobre 2021 con statistica (Dunn's test per comparazioni multiple a seguito del Kruskal-wallis test risultato significativo, aggiustamento p-value; Bonferroni)

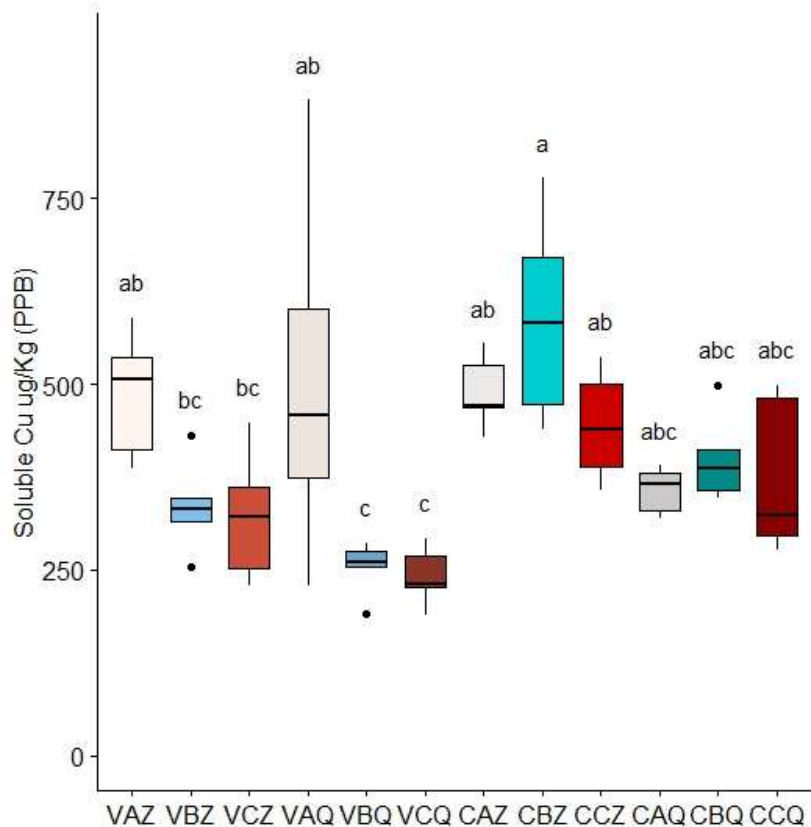


Grafico 6-6: Boxplot dati Cu solubile ottobre 2021 con statistica (Dunn's test per comparazioni multiple a seguito del Kruskal-wallis test risultato significativo, aggiustamento p-value; Bonferroni)

Come si può osservare non si rilevano sostanziali differenze nelle concentrazioni di rame totale nelle varie tesi saggate mentre, contrariamente alla prima campagna di monitoraggio, si rilevano differenze tra le due profondità testate in entrambi i vigneti anche se non statisticamente significative, stando ad indicare una minore mobilità del rame in questo secondo anno di sperimentazione. Anche nel secondo monitoraggio la quota biodisponibile è risultata in percentuale non molto elevata rispetto al totale mentre la % della quota solubile rispetto al biodisponibile è risultata più elevata del primo anno di sperimentazione. È comunque interessante andare a rilevare le differenze nelle concentrazioni delle tre forme di rame riscontrate nei due anni di monitoraggio per tutte le tesi saggate. Le diminuzioni, caratterizzate dal segno meno (-), o gli aumenti caratterizzati dal segno (+), riscontrati nei due anni di sperimentazioni sono riportati nelle Tabelle 6-11, 6-12 e 6-13.

Tabella 6-11: Confronti della variazione di concentrazione del rame totale nei due anni di sperimentazione

Campioni	Variazione della concentrazione del rame dal 2020 al 2021 (mg/kg)
Varano A 0-20 cm	-4,675
Varano B 0-20 cm	+2,814
Varano C 0-20 cm	-1,586
Varano A 20-40 cm	+1,743
Varano B 20-40 cm	-0,052
Varano C 20-40 cm	-3,271
Castelplanio A 0-20 cm	-6,012
Castelplanio B 0-20 cm	-0,368
Castelplanio C 0-20 cm	-0,141
Castelplanio A 20-40 cm	-11,337
Castelplanio B 20-40 cm	-3,056
Castelplanio C 20-40 cm	-2,377

Nel caso del rame totale sono stati riscontrati su 12 campioni solo due aumenti di concentrazione nel secondo campionamento, nel testimone aziendale nello strato 20-40 cm e nel trattamento alternato a 0-20 cm. La diminuzione di concentrazione se da un lato è un fattore positivo ai fini del contenuto di rame totale nei suoli agricoli, dall'altro indica che possono essersi verificate nell'arco di un anno delle perdite di rame probabilmente dovute a lisciviazione, scorrimento superficiale o anche dall'assorbimento da parte della coltura. Si tratta comunque in definitiva di variazioni di concentrazione di scarsa entità che indicano una buona gestione dei trattamenti cuprici.

Tabella 6-12: Confronti della variazione di concentrazione del rame biodisponibile nei due anni di sperimentazione

Campioni	Variazione della concentrazione del rame dal 2020 al 2021 (mg/kg)
Varano A 0-20 cm	-0,763
Varano B 0-20 cm	+1,91
Varano C 0-20 cm	+1,427
Varano A 20-40 cm	+0,812
Varano B 20-40 cm	+0,152
Varano C 20-40 cm	+0,06
Castelplanio A 0-20 cm	-2,731
Castelplanio B 0-20 cm	+0,913
Castelplanio C 0-20 cm	+0,227
Castelplanio A 20-40 cm	-3,061
Castelplanio B 20-40 cm	-1,365
Castelplanio C 20-40 cm	-0,812

Per quanto riguarda il rame biodisponibile, più della metà dei campioni ha subito un aumento di concentrazione nel 2021, con aumenti più consistenti nello strato superficiale di suolo. Osservando le due forme di rame, totale e biodisponibile, si nota come sia nel sito di Varano che di Castelplanio, nel testimone aziendale si verificano diminuzioni delle concentrazioni, più marcate nel totale e comunque presenti anche per il biodisponibile. Una possibile spiegazione potrebbe essere legata al fatto che i trattamenti vengono effettuati principalmente con forme solubili di rame e quindi facilmente allontanabili dal terreno con le acque di lisciviazione e/o di scorrimento laterale. Se da un punto di vista strettamente legato alla attività aziendale, la diminuzione della concentrazione del rame nel suolo può essere considerato un fattore positivo, dal punto di vista ambientale l'incremento della concentrazione di rame nelle acque superficiali e profonde potrebbe destare preoccupazione, ricordano comunque che la soglia di contaminazione delle acque è di 1000 µg/L.

Tabella 6-13: Confronti della variazione di concentrazione del rame solubile nei due anni di sperimentazione

Campioni	Variazione della concentrazione del rame dal 2020 al 2021 (µg/kg)
Varano A 0-20 cm	+259
Varano B 0-20 cm	+198
Varano C 0-20 cm	+155
Varano A 20-40 cm	+387
Varano B 20-40 cm	+157
Varano C 20-40 cm	+127
Castelplanio A 0-20 cm	+104
Castelplanio B 0-20 cm	+300
Castelplanio C 0-20 cm	+196
Castelplanio A 20-40 cm	+49
Castelplanio B 20-40 cm	+175
Castelplanio C 20-40 cm	+129

Tutti i campioni hanno registrato un aumento di rame solubile, sia nello strato superficiale che in quello sotto superficiale che potrebbe confermare l'osservazione fatta precedentemente per il biodisponibile.

6.3 Conclusioni sulle due campagne di monitoraggio

Si può affermare che nei due anni di sperimentazione la gestione dei vigneti sotto osservazione dal punto di vista dei trattamenti cuprici è stata sicuramente oculata e che i valori delle concentrazioni delle tre forme di rame non hanno subito grandi variazioni. Una particolare

attenzione dovrebbe essere dedicata ai fungicidi a base di rame utilizzati, preferendo possibilmente, quelli a lento rilascio per cercare di evitare il più possibile la dispersione ambientale.

6.4 Effetti sulle attività funzionali e sul DNA del bioindicatore *Eisenia foetida*

La valutazione degli effetti sulle attività funzionali e sul DNA del bioindicatore *Eisenia foetida* è stata effettuata utilizzando il solo suolo di Varano a tre concentrazioni di rame: concentrazione media rilevata in campo (58 mg/kg), contaminazione a 90 mg/kg e contaminazione a 150 mg/kg di suolo.

Tabella 6-14: Concentrazioni del rame totale e biodisponibile del suolo test nelle tre tesi nei 28 giorni di durata dell'esperimento

Time (days)	Varano A 0-20 cm concentrazione di campo		Varano A 0-20 cm contaminazione a 90 mg/kg		Varano A 0-20 cm contaminazione a 150 mg/kg	
	Cu tot (mg/kg)	Cu bio (mg/kg)	Cu tot (mg/kg)	Cu bio (mg/kg)	Cu tot (mg/kg)	Cu bio (mg/kg)
2	62,30	9,64	104,80	25,33	136,10	55,08
7	-	13,00	-	23,92	-	53,10
14	59,50	13,78	87,73	26,60	165,53	43,38
21	-	13,90	-	17,48	-	42,99
28	60,23	11,95	96,88	19,75	134,78	35,93

Per valutare gli eventuali effetti avversi delle varie concentrazioni di rame sul lombrico terricolo, ad ogni tempo di prelievo, sono stati osservati diversi parametri come l'andamento del peso, la mortalità, l'integrità morfologica e comportamentale e i danni al DNA (le differenze significative tra i gruppi sono state verificate utilizzando il test non parametrico Kruskal Wallis ed il post-hoc Dunn's).

I risultati della valutazione sulle attività funzionali sono riassunti nella Tabella 6-15:

Tabella 6-15: Risultati dei test di valutazione sulle attività funzionali di *Eisenia foetida*

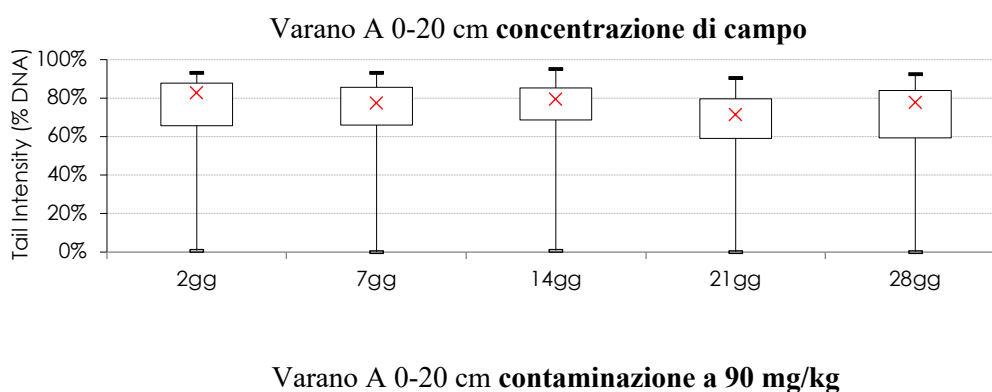
Time (days)	Varano A 0-20 cm concentrazione di campo			Varano A 0-20 cm contaminazione a 90 mg/kg			Varano A 0-20 cm contaminazione a 150 mg/kg		
	Ub	Ma	M	Ub	Ma	M	Ub	Ma	M
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	2,8% (1/36)	✓	✓	-	-	✓	2,8% (1/36)
21	-	✓	5,6% (2/36)	-	✓	-	-	-	5,6% (2/36)

28	✓	✓	8,3% (3/36)	✓	✓	-	-	-	8,3% (3/36)
✓ presence - absence Ub: Unusual behaviour (low reactivity, less digging activity, compulsive movements) Ma: Morphological anomalies (injuries, miniaturisation, abnormal colouring) M: Mortality percentage variation compared to the initial number of earthworms (%±RSD)									

Nei tre diversi livelli di concentrazione non si notano notevoli differenze tra i vari parametri. A 28 giorni dall'inizio della prova si registrano comportamenti inusuali nella prova a concentrazione di campo e in quella a 90 mg/kg e nessuna particolare variazione in quella a 150 mg/kg. La mortalità valutata su 36 individui risulta identica nella prova a concentrazione di campo e in quella a 150 mg/kg con il 2,8% a 14 giorni, 5,6% a 21 giorni e l'8,3% a 28 giorni. Le anomalie morfologiche sono state osservate soprattutto nella contaminazione a 90 mg/kg a partire dal quattordicesimo giorno e con sporadiche comparse anche nella concentrazione di campo e in quella a 150 mg/kg. Da queste osservazioni sembrerebbe evidenziarsi un effetto minore della dose più elevata sui tre parametri con una mortalità simile alla concentrazione di campo, stando ad indicare che una dose di 150 mg/kg non provoca danni evidenti e tossicità elevata sul lombrico.

Per quanto riguarda i danni al DNA, i risultati in termini di *Tail Intensity* sono riportati nel Grafico 6-7 mentre le Tabelle 6-16, 6-17 e 6-18 riferiscono l'analisi statistica effettuata per confrontare le differenze tra il tempo di prelievo a 2 giorni e gli altri tempi di prelievo alle tre concentrazioni.

Grafico 6-7: Valori della Tail Intensity delle tre concentrazioni ai diversi tempi di prelievo



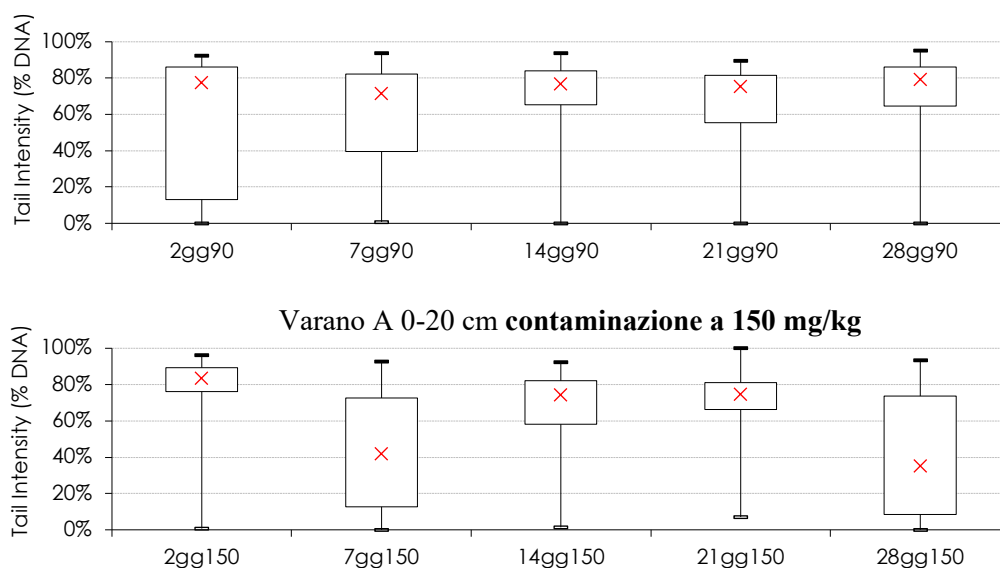


Tabella 6-16: Risultati del comet assay alla concentrazione di campo

Varano A 0-20 cm concentrazione di campo	
Confronti	Statistica
2 gg vs. 7 gg	non significativo
2 gg vs. 14 gg	non significativo
2 gg vs. 21 gg	****
2 gg vs. 28 gg	**
** p<0,01	
**** p<0,0001	

Nella prova alla concentrazione di campo si nota come il danno al DNA rappresentato dalla percentuale di *Tail Intensity* registrato a 2 giorni dall'inizio del test (83%) abbia un trend di diminuzione nel tempo fino ad abbassarsi significativamente negli ultimi due tempi di prelievo (21 e 28 giorni, rispettivamente a 72% e 78%) rispetto all'inizio.

Tabella 6-17: Risultati del comet assay alla contaminazione di 90 mg/kg

Varano A 0-20 cm contaminazione a 90 mg/kg	
Confronti	Statistica
2 gg vs. 7 gg	non significativo
2 gg vs. 14 gg	non significativo
2 gg vs. 21 gg	non significativo
2 gg vs. 28 gg	non significativo

Secondo i dati della Tabella 6-17 non esistono differenze significative nei danni a tutti i tempi di prelievo alla contaminazione di 90 mg/kg.

Tabella 6-18: Risultati del comet assay alla contaminazione di 150 mg/kg

Varano A 0-20 cm contaminazione a 150 mg/kg	
Confronti	Statistica
2 gg vs. 7 gg	****
2 gg vs. 14 gg	****
2 gg vs. 21 gg	**
2 gg vs. 28 gg	****
** p<0,01 **** p<0,0001	

Alla contaminazione di 150 mg/kg, invece, le differenze ai tempi di prelievo successivi al secondo giorno risultano sempre altamente significative con valori della *Tail Intensity* che ai 5 tempi di prelievo sono dell'83%, 42%, 74%, 75% e 35%, rispettivamente.

È interessante notare dal Grafico 6-7 come i danni provocati al secondo giorno vengano in gran parte riparati al giorno 7 per poi essere elevati ai giorni 14 e 21 ed essere di nuovo riparati al giorno 28. Queste ultime affermazioni trovano riscontro anche nelle analisi statistiche presenti nella Tabella 6-19 che mostra le differenze nei danni al DNA ai cinque tempi di prelievo tra la concentrazione di campo e quella a 90 mg/kg e 150 mg/kg. Infatti, i confronti ai diversi giorni di prelievo tra le contaminazioni a 90 mg/kg e a 150 mg/kg con la concentrazione di campo mostrano differenze significative soprattutto a 7 giorni per entrambe le contaminazioni e a 28 giorni per la concentrazione a 150 mg/kg. Ciò vuol dire che a 7 e a 28 giorni i lombrichi sottoposti alla dose più elevata hanno avuto modo di riparare i danni al DNA mostrando un valore di *Tail Intensity* nettamente più basso delle altre tesi. Una ulteriore dimostrazione di quanto affermato può essere ricavata osservando il Grafico 6-8 che riporta i pesi medi dei lombrichi presenti nelle tre tesi a differenti concentrazioni nei 28 giorni di esperimento.

Tabella 6-19: Confronto tra concentrazione di campo e contaminazione a 90 mg/kg e 150 mg/kg ai 5 tempi di prelievo

	2 giorni	7 giorni	14 giorni	21 giorni	28 giorni
Confronti	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica	Statistica
concentrazione di campo vs. 90 mg/kg	*	**	non significativo	non significativo	non significativo

concentrazione di campo vs. 150 mg/kg	non significativo	****	***	non significativo	****
* p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 **** p<0,0001					

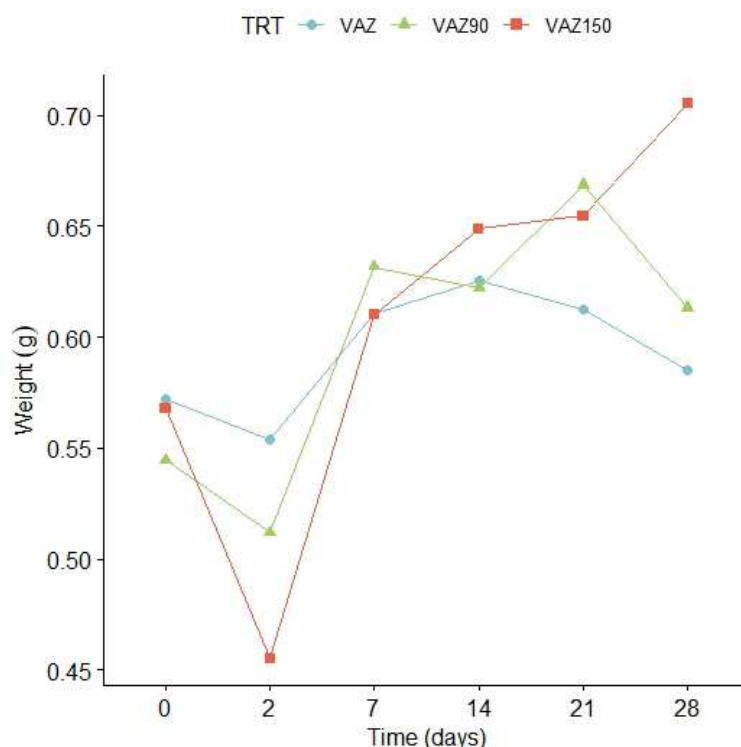


Grafico 6-8: Peso medio dei lombrichi presenti nelle tre tesi ai tempi di prelievo (VAZ= Varano A 0-20 cm concentrazione di campo, VAZ90= Varano A 0-20 cm contaminazione a 90 mg/kg, VAZ150= Varano A 0-20 cm contaminazione a 150 mg/kg)

Come si può osservare, un calo del peso medio viene misurato in tutte e tre le concentrazioni al secondo giorno ed in maniera più marcata per la dose a 150 mg/kg. I pesi alla concentrazione di campo e a 90 mg/kg, dopo un recupero al settimo giorno, restano pressoché costanti mentre il peso della contaminazione a 150 mg/kg ha un forte recupero a sette giorni e continua ad aumentare fino ad essere significativamente più elevato delle altre due concentrazioni al giorno 28. Il forte recupero al giorno 7 del peso è correlabile al notevole calo dei danni al DNA così come l'aumento del peso finale al giorno 28 è ugualmente correlabile al calo dei danni al DNA.

L'esperimento di tossicità effettuato ha fornito interessanti indicazioni anche confrontandolo con alcuni lavori scientifici. La Torre et al., 2018 in una review sulla situazione dell'utilizzo

del rame in agricoltura, parlando degli effetti sui lombrichi terricoli, rilevano come, se da un lato i lombrichi possono evitare effetti tossici del rame migrando nelle parti di suolo incontaminate, dall'altro si suggeriscono effetti adattativi dei lombrichi con sviluppo di meccanismi biochimici di detossificazione (Strumpf et al., 2015). In un altro lavoro (Mincarelli et al, 2019) viene confermato il concetto di adattamento del lombrico a dosi di rame comparabili con la dose presente in questo esperimento. Infatti, a 9 giorni dal trattamento con una dose di 120 mg/kg si ha un valore della *Tail Intensity* inferiore rispetto ai giorni precedenti e tale meccanismo adattativo è, secondo gli autori, attribuibile al livello delle metallotioneine che si sviluppano a questa dose e che sono responsabili della detossificazione del rame.

Nel presente esperimento sembrerebbe che la contaminazione a 150 mg/kg, pur provocando un iniziale effetto tossico più elevato rispetto alle altre due dosi, stimoli nel lombrico un effetto adattativo che lo porta a riparare i danni al suo DNA e a raggiungere un peso nettamente superiore ai pesi dei lombrichi presenti nelle altre due concentrazioni.

In conclusione, si può affermare che alle dosi di campo rilevate nel presente esperimento gli effetti ecotossicologici su una specie non bersaglio estremamente sensibile come il verme terricolo *Eisenia foetida* risultano poco evidenti, spesso trascurabili e comunque sempre non significativi. Anche a dosi artificialmente aumentate del 55% e del 158% rispetto alla concentrazione di campo gli effetti sul lombrico terricolo risultano comunque transitori e non preoccupanti e addirittura, nel caso della contaminazione più elevata, stimolanti per la crescita e con livelli di mortalità estremamente bassi. A conferma di ciò le Figura 6-1 e 6-2 riportano dei reperti di lombrichi presenti nei suoli dei vigneti rilevati durante i campionamenti.



Figure 6-1 e 6-2: Reperti dei lombrichi rilevati trovati durante i campionamenti

CONCLUSIONI

- Le campagne di monitoraggio effettuate negli anni 2020 e 2021 per la concentrazione di rame in tre vigneti della provincia di Ancona sono risultate soddisfacenti sia per le concentrazioni di rame totale rilevate, generalmente inferiori a monitoraggi effettuati in altre regioni d'Italia, sia per le concentrazioni delle altre due forme di rame (biodisponibile e solubili) presenti in % molto contenute;
- Le variazioni di concentrazione riscontrate nei due anni di monitoraggio risultano quasi sempre molto contenute;
- Tali variazioni sono risultate in diminuzione per le due forme totale e biodisponibile indicando probabilmente delle perdite dovute a eventi meteorici e/o all'assorbimento della coltura;
- Sembra quindi essere importante la scelta della formulazione di rame da utilizzare nei trattamenti ai fini del contenimento della contaminazione ambientale;
- Gli effetti ecotossicologici sulla specie sentinella *Eisenia foetida* sono risultati trascurabili alla concentrazione di campo mentre a dosi superiori si sono avuti danni momentanei facilmente riparati nel tempo e con effetti stimolanti verso la crescita del lombrico;
- La viticoltura biologica della provincia di Ancona nelle condizioni del presente esperimento mostra caratteristiche positive per quanto riguarda i trattamenti rameici sia dal punto di vista dei residui nell'ambiente e sia dal punto di vista degli effetti sugli organismi non bersaglio.

BIBLIOGRAFIA

M. Komárek, E. Čadková, V. Chrastný, F. Bordas, J. Bollinger, Contamination of vineyards soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects, *Environment International*, pp 138-151, 2010

G. Brunetto, G. Wellington Bastos de Melo, R. Terzano, D. Del Buono, S. Astolfi, N. Tomasi, Y. Pii, T. Mimmo, S. Cesco, Copper accumulation in vineyards soils: Rhizosphere processes and agronomic practices to limit its toxicity, *Chemosphere*, volume 162, pp 293-307, 2016

S. Ruyters, P. Salaets, K. Oorts, E. Smolders, Copper toxicity in soils under established vineyards in Europe: a survey, *Science of the Total Environment*, volume 443, pp 470-477, 2013

G. Romanazzi, V. Mancini, R. Foglia, D. Marcolini, M. Kavari, S. Piancatelli, Use of chitosan and other natural compounds alone or in different strategies with copper hydroxide for control of Grapevine Downy Mildew, *Plant Disease*, 2021

E. Capri, M. Trevisan, I metalli pesanti di origine agricola nei suoli e nelle acque sotterranee, Pitagora Editrice Bologna, 2002

A. Kabata-Pendias, Trace elements in soils and plants, third edition, 2001

D. C. Adriano, Trace elements in terrestrial environment, biogeochemistry, bioavailability and risks of metals, second edition, volume I, seconda edizione, 2001

A. La Torre, V. Iovino, F. Caradonia, Copper in plant protection: current situation and prospects, *Phytopathologia Mediterranea* (2018), 57, 2, 201–236, 2018

L. H. Zhenli, X. E. Yang, P. J. Steffella, Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 125–140, 2005

M. Romić, L. Matijević, H. Bakić, D. Romić, Copper accumulation in vineyard soils: distribution, fractionation and bioavailability assessment, Environmental of risk assessment of soil contamination, 2014

C. Beni, G. Rossi, Conventional and organic farming: estimation of some effects on soil, copper accumulation and wine in a central Italy vineyard, *Agrochimica*, volume LIII n°3, 2009

K.A. Mackie, T. Müller, S. Zikeli, E. Kandeler, Long-term copper application in an organic vineyard modifies spatial distribution of soil micro-organisms, *Environmental Pollution*, volume 167, pp 16-26, 2013

L. Mincarelli, C. Vischetti, J. Craft, L. Tiano, DNA damage in different *Eisenia andrei* coelomocytes sub-populations after in vitro exposure to hydrogen peroxide, SpringerPlus, 2016

T. Gunstone, T. Cornelisse, K. Klein, A. Dubey, N. Donley, Pesticides and Soil Invertebrates: A Hazard Assessment, *Frontiers in environmental science*, 2021

M. Schaefer, Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology, Evaluation of different test systems in soil toxicity assessment, *J Soils & Sediments*, 2003

D. J. Spurgeon, J. M. Weeks, C. A. M. Van Gestel, A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology, *Pedobiologia*, volume 47, pp 588-606, 2003

C. Pelosi, S. Barot, Y. Capowiez, M. Hedde, F. Vandembulcke, Pesticides and earthworms, a review, *Agronomy for sustainable dev*, pp 199-228, 2013

P. Gong, E. J. Perkins, Earthworm toxicogenomics: a renewed genome-wide quest for novel biomarkers and mechanistic insights, *Applied soil ecology*, volume 104, pp 12-24, 2016

B. Karimi, V. Masson, C. Guillard, E. Leroy, S. Pellegrinelli, E. Giboulot, P-A Maron, L. Ranjard, Ecotoxicity of copper input and accumulation for soil biodiversity in vineyards, *Environmental chemistry letters*, volume 19, pp 2013-2030, 2021

A. Merli e E. Capri, *Ecotossicologia: cenni, effetti, misure e indicatori, Agrofarmaci, conoscenze per un uso sostenibile*, 2008

C. Vischetti, C. Casucci, A. De Bernardi, E. Monaci, L. Tiano, F. Marcheggiani, M. Ciani, F. Comitini, E. Marini, E. Taskin, E. Puglisi, Sub-lethal effects of pesticides on the DNA of soil organisms as early ecotoxicological biomarkers, *Frontiers in microbiology*, 2020

L. Mincarelli, L. Tiano, J. Craft, F. Marcheggiani, C. Vischetti, Evaluation of gene expression of different molecular biomarkers of stress response as an effect of copper exposure on the earthworm *Eisenia Andrei*, *Ecotoxicology*, volume 28, pp 938-948, 2019

Sinab, Bio in cifre, 2020

Reg. (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 21 ottobre 2009 relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che abroga le direttive del Consiglio 79/117/CEE e 91/414 CEE

Reg. di esecuzione (UE) n° 540/2011 della Commissione del 25 maggio 2011 recante disposizioni di attuazione del regolamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda l'elenco delle sostanze attive approvate

Reg. di esecuzione 2018/1981 della Commissione del 13 dicembre 2018 che rinnova l'approvazione delle sostanze attive composti di rame, come candidati alla sostituzione, in conformità al reg. (CE) n° 1107/2009 del Parlamento europeo e del Consiglio relativo all'immissione sul mercato dei prodotti fitosanitari e che modifica l'allegato del reg. di esecuzione (UE) n°540/2011 della Commissione

Reg. (UE) 2018/848 del parlamento europeo e del Consiglio del 30 maggio 2018 relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il reg. (CE) n° 834/2007 del Consiglio

Reg. di esecuzione (UE) 2019/2164 della Commissione del 17 dicembre 2019 che modifica il reg. (CE) n° 889/2008 recante modalità di applicazione del reg. (CE) n° 834/2007 del Consiglio relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici, per quanto riguarda la produzione biologica, l'etichettatura e i controlli

Reg. (CE) n° 834/2007 del Consiglio del 28 giugno 2007 relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il reg. (CEE) n° 2092/91

Regione Marche, Agenzia servizi settore agroalimentare delle Marche, servizio fitosanitario delle Marche, Linee guida per la produzione integrata delle colture: difesa fitosanitaria e controllo delle infestanti, 2021

SITOGRAFIA

www.britannica.com

www.treccani.it

eur-lex.europa.eu

europa.eu

www.inumeridelvino.it

www.fitosanitari.salute.gov.it

www.gazzettaufficiale.it

www.rivistafrutticoltura.edagricole.it

RINGRAZIAMENTI

Giunta al termine di questo percorso, il primo pensiero va a chi mi ha affiancato nel percorrerlo. E chi ringraziare se non il mio Relatore, il Prof. Costantino Vischetti, il quale mi ha guidato nella stesura di questo lavoro di tesi mettendomi a disposizione il suo immenso sapere, il suo tempo e la sua pazienza.

Un ringraziamento speciale alla mia correlatrice, la Dott.ssa Arianna De Bernardi, la quale, mi ha guidato passo passo nelle attività di laboratorio ed è stata un aiuto fondamentale nella realizzazione di questo lavoro di tesi ed al mio correlatore il Prof. Gianfranco Romanazzi.

È giunto il momento di ringraziare i miei genitori. Dire che mi hanno supportata, stimolata, spinta ad andare avanti e coccolata sarebbe diminutivo quindi il mio GRAZIE! va all'amore che ogni giorno mi dimostrano e all'aver reso possibile tutto questo.

Infine, ringrazio me stessa per non aver mollato nei momenti difficile ed averci creduto fino in fondo.