



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE AGRARIE E DEL TERRITORIO

**COMPORAMENTO DI DUE INSETTICIDI
IN UN SUOLO ORGANICO ED EFFETTI
ECOTOSSICOLOGICI SUL LOMBRICO
EISENIA FOETIDA**

**Behaviour of two insecticides in organic soil and
ecotoxicological effects on the earthworm *Eisenia
foetida***

TIPO TESI: Sperimentale

Relatore:
PROF. COSTANTINO VISCHETTI

Studente:
ELIA BERRÈ

Correlatore:
DOTT.SSA ARIANNA DE BERNARDI

DOTT.SSA ENRICA MARINI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

*Ai miei genitori ed a tutti coloro che mi sono vicini.
A tutti i ragazzi ed al personale docente e non
della Sezione Chimica, Materiali e Biotecnologie dell'IIS E. Mattei
di Recanati degli anni 2020/21 e 2021/22.
Un ringraziamento ultimo, ma non di minor rilievo va al prof. Costantino
Vischetti, alla dott.ssa Arianna de Bernardi, alla dott.ssa Enrica Marini
per avermi seguito con costante attenzione in questo lavoro di tesi.*

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	6
ELENCO DELLE FIGURE	7
SCOPO DELLA TESI.....	9
CAPITOLO 1 INTRODUZIONE.....	10
1.1 Fitofarmaci.....	10
1.1.1 Introduzione Generale.....	10
1.1.2 Formulazioni.....	12
1.1.3 Classificazione degli Agrofarmaci.....	15
1.1.4 Insetticidi	18
1.1.5 Destino Agroambientale degli Agrofarmaci.....	23
1.2 Ecotossicologia	28
1.3 I Lombrichi come Specie Bioindicatrici	32
1.3.1 Eisenia foetida.....	34
CAPITOLO 2 MATERIALI E METODI.....	36
2.1 Lombrichi.....	36
2.2 Suolo	37
2.3 Insetticidi.....	37
2.4 Test di Riproduzione.....	38
2.5 Avoidance Test	40
2.6 Test di Tossicità.....	41
2.6.1 Estrazione ed Analisi dei Residui	42
2.6.2 Comet assay	43
CAPITOLO 3 RISULTATI E DISCUSSIONE	46
3.1 Test di Riproduzione.....	46
3.1.1 Peso Medio dei Lombrichi.....	46
3.1.2 Stato di Salute dei lombrichi durante la prova.....	48
3.2 Avoidance Test	50

3.3 Test di Tossicità	51
3.3.1 Analisi dei residui degli insetticidi	51
3.3.2 Effetti dei Residui sui Lombrichi.....	54
CAPITOLO 4 CONCLUSIONI	61
BIBLIOGRAFIA	62

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1: Proprietà fisiche e chimiche del suolo utilizzato nei test.	37
Tabella 2: Proprietà fisiche e chimiche dei due principi attivi Chlorpyrifos e Spinosad. .	38
Tabella 3: Tasso di crescita % \pm RSD nel test di riproduzione.	47
Tabella 4: Risposte riproduttive dei lombrichi durante i test di riproduzione.	48
Tabella 5: Osservazioni fatte sui lombrichi ad ogni tempo di campionamento durante il test di riproduzione.	48
Tabella 6: Tasso di crescita % \pm RSD nel test di tossicità.	55
Tabella 7: Risposta riproduttiva dei lombrichi al test di tossicità.	55
Tabella 8: Osservazioni fatte sui lombrichi ad ogni tempo di campionamento nel test di tossicità.	56

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Crescita prevista per il mercato dei biopesticidi.	11
Figura 1-2: Esempi di coadiuvanti più utilizzati nelle formulazioni suddivisi per funzione principale.....	14
Figura 1-3: Formula di struttura delle piretrine estratte dal genere <i>Chrysanthemum</i> fam. Asteraceae, sono un esempio di insetticida organico naturale. R1, R2 sono posizioni occupate da differenti sostituenti caratterizzanti le diverse piretrine.	16
Figura 1-4: Classificazione in base al rischio acuto con DL50 su ratto proposta dalla WHO.	17
Figura 1-5: Modello 3D dell'enzima Acetilcolinesterasi (AChE) nell'essere umano.	19
Figura 1-6: Struttura 3D della molecola del principio attivo Chlorpyrifos.....	20
Figura 1-7: Il principio attivo Chlorpyrifos e la sua trasformazione nel metabolita 3,5,6-tricloro-piridinolo (TCP).....	21
Figura 1-8: <i>Saccharopolyspora spinosa</i> al microscopio elettronico.....	22
Figura 1-9: Formula di struttura di base delle spinosine. I diversi sostituenti in R individuano le spinosine A e D che entrano in miscela nel prodotto commerciale Spinosad.23	23
Figura 1-10: Rappresentazione schematica del destino degli agrofarmaci nel suolo.	25
Figura 1-11: Gruppi Funzionali classicamente esposti dalla Sostanza Organica (SOM). 26	26
Figura 1-12: Risk Assesment UE per i Prodotti Fitosanitari secondo il Regolamento 1107/2009.....	28
Figura 1-13: Risposta di un organismo all'aumentare della concentrazione di una sostanza tossica.....	30
Figura 1-14: Schematizzazione delle complesse interazioni tra tossicodinamica, tossicocinetica dello xenobiotico e genoma dell'organismo non-target.	31
Figura 1-15: Categorie di endpoint ecotossicologici	32
Figura 1-16: Schema dei possibili livelli di risposta ed indagine ecotossicologica.	33
Figura 1-17: Scansione a microscopio SEM di immunociti di <i>Eisenia</i> . Con SC sono indicati piccoli celomociti mentre con LC grandi celomociti.	35
Figura 2-1: Esemplare adulto di <i>Eisenia foetida</i>	36

Figura 2-2: Dursban 75 WG e Laser 480 rispettivamente a base di Chlorpyrifos e Spinosad.	37
Figura 2-3: Particolare di un Cocoon del genere Eisenia.....	39
Figura 2-4: Schema di esecuzione dell'Avoidance test.	41
Figura 2-5: Particolare della fase di prelievo e pesatura dei lombrichi dai suoli contaminati.	41
Figura 3-1: Andamento del peso durante il test di riproduzione.....	46
Figura 3-2: Particolare di lesioni, anomalie morfologiche e miniaturizzazioni manifestate dai lombrichi nella prova con Chlorpyrifos a 21 giorni.	49
Figura 3-3: Particolare dello sgusciamiento di una forma giovanile di Eisenia foetida da un cocoon.....	50
Figura 3-4: Risultati del test di avoidance con Eisenia foetida dopo 48 ore.....	51
Figura 3-5: Recupero di Chlorpyrifos dal suolo per ogni periodo di campionamento.....	52
Figura 3-6: Recupero di Spinosad dal suolo per ogni periodo di campionamento.....	52
Figura 3-7: Andamento del peso durante il test di tossicità.....	54
Figura 3-8: Momento della coda delle comete prodotte da Comet Assay (Tail Moment) nei celomociti di Eisenia foetida a 1, 21, 28 giorni dall'inizio delle prove.....	57
Figura 3-9: Lunghezza della coda delle comete prodotte da Comet Assay (Tail Length) nei celomociti di Eisenia foetida a 1, 21, 28 giorni dall'inizio delle prove.....	58
Figura 3-10: Intensità della coda delle comete prodotte da Comet Assay (Tail Intensity) nei celomociti di Eisenia foetida a 1, 21, 28 giorni dall'inizio delle prove.....	59

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della presente tesi è la valutazione della degradazione di due insetticidi in un suolo organico e degli effetti sul lombrico *Eisenia foetida* (Savigni, 1826) a dosi sub-letali.

Nello specifico sono stati comparati un insetticida sintetico ed uno naturale, rispettivamente il chlorpyrifos, poiché di classico e largo utilizzo in agricoltura, e lo spinosad, bio-insetticida ad ampio spettro, il cui impiego è in continua crescita.

L'indagine ecotossicologica è stata condotta sul lombrico *Eisenia foetida*, che, tra gli invertebrati del suolo, risulta maggiormente sensibile agli xenobiotici, tanto da essere comunemente impiegato come bioindicatore. Nella presente tesi, gli effetti su *Eisenia foetida* sono stati studiati in termini di sopravvivenza, riproduzione, comportamento e danni al DNA (mediante Comet Assay).

Capitolo 1 INTRODUZIONE

1.1 Fitofarmaci

1.1.1 Introduzione Generale

Con il termine fitofarmaco, si fa riferimento ad un vasto assortimento di prodotti chimici costituiti da molecole più o meno complesse, atte a combattere, prevenire e/o curare mediante differenti meccanismi d'azione, dipendenti dalle caratteristiche del prodotto stesso e dal target, le principali infezioni e lesioni causate ai vegetali da parte di agenti biotici quali: funghi, batteri, insetti, acari, nematodi, virus, micoplasmi, molluschi, roditori, licheni, microalghe patogene e specie vegetali infestanti. Ulteriori campi di impiego sono rappresentati dagli utilizzi in post-raccolta, per la conservazione o frigo-conservazione delle produzioni agricole ed in qualità di fisiofarmaci o fitoregolatori o corroboranti, con azione regolatrice dei processi metabolici vegetali (Molinari, et. al., 2008). Nel contesto attuale, la denominazione fitofarmaco si trova frequentemente associata ad un utilizzo di sinonimi come agrofarmaco, prodotto fitosanitario, antiparassitario, pesticida. Nello specifico, come evidenziato da Belli (2012), il termine agrofarmaco è utilizzato in un contesto prettamente tecnico-operativo mentre la dicitura prodotto fitosanitario è legata all'ambito normativo.

La FAO (2009) prevede un incremento della domanda alimentare pari al 70% entro il 2050. In quest'ottica, la protezione delle piante dalle malattie riveste un ruolo fondamentale nell'esaudire la crescente richiesta di cibo in termini quantitativi e qualitativi, si stima infatti che patogeni, animali ed erbe infestanti siano responsabili della perdita del 20-40% della produzione agricola mondiale (Savary, et. al., 2012; Delgado, et. al., 2020). L'utilizzo di fitofarmaci nei moderni sistemi agricoli è associato ad un incremento della potenzialità produttive legate ad un controllo efficace degli agenti di malattia (Carvalho, 2017; Utzeri, et. al., 2021). Tuttavia, caratteristiche negative come persistenza, tossicità, bioaccumulo, capacità contaminanti verso suolo, acque e atmosfera hanno posto notevoli preoccupazioni relativamente all'utilizzo indiscriminato degli agrofarmaci in quanto questi sono capaci di agire direttamente ed indirettamente sulla perdita di biodiversità, sul deterioramento degli

ecosistemi e sulla salute umana (Fenibo, et. al., 2020; Gomes, et. al., 2020; Utzeri, et. al., 2021). Le evidenze degli effetti avversi sull'ambiente e sull'uomo associati all'utilizzo di agrofarmaci sintetici hanno condotto verso una presa di posizione forte da parte dei consumatori con la richiesta di pratiche di difesa delle colture meno dannose (Glare, et. al., 2012). Inoltre, sempre più frequentemente i patogeni ed i parassiti sono in grado di vanificare l'efficacia delle nuove molecole sintetiche sviluppando fenomeni di resistenza (Hawkins, et. al., 2018). Per una maggiore salvaguardia dell'ambiente, degli organismi non-target e dei consumatori, nel tempo sono state intraprese diverse iniziative per regolamentare ed armonizzare l'impiego di agrofarmaci, attualmente in Europa la legislazione di riferimento per l'autorizzazione e l'immissione in commercio dei PPP (Plant Protection Products) o fitofarmaci è il Regolamento (CE) n°1107/2009 del Parlamento e del Consiglio Europeo. Altro step fondamentale è sancito dalla Direttiva (CE) n°128/2009 che definisce un quadro di azione comunitario nei confronti dell'uso sostenibile dei prodotti fitosanitari, ponendo le basi per un disciplinamento nazionale tramite Piano di Azione Nazionale (PAN), che in Italia ha preso atto con il recepimento della Direttiva tramite Decreto Legislativo del 14/08/2012 n°150 (Jondini, 2013). Negli ultimi anni, la presenza di maggiori vincoli normativi a livello internazionale e nazionale ha condotto verso dei cambiamenti sostanziali del mercato dei fitofarmaci: minor numero di principi attivi in commercio, concentrazione delle industrie agrofarmaceutiche in poche entità e focus verso la ricerca di nuove soluzioni per la difesa delle colture a basso impatto tra cui spiccano i prodotti naturali (Phillips, 2020). Si evidenzia in particolare, come un impiego sempre più regolato e restrittivo dei prodotti di sintesi anche nel contesto convenzionale sancito dalla Direttiva 128/2009 (CE) possa sicuramente rappresentare uno stimolo per lo sviluppo industriale di prodotti "ecofriendly" (Altomare, 2020). Tra questi, i biopesticidi sono considerati a minor rischio rispetto a quelli sintetici e riscuotono attualmente un crescente interesse in merito al loro inserimento nelle moderne pratiche di controllo integrato (Villaverde, et. al., 2013).

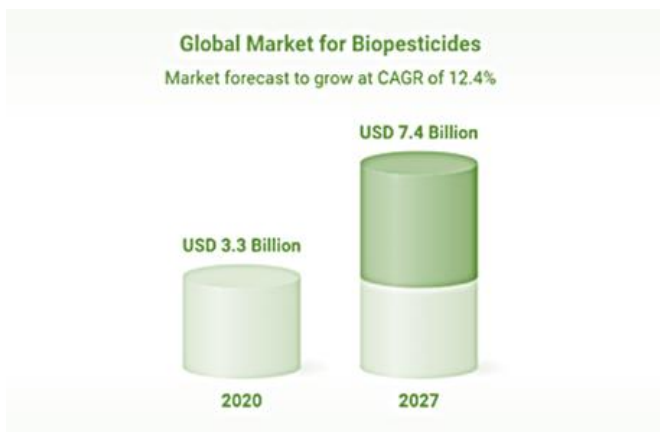


Figura 1-1: Crescita prevista per il mercato dei biopesticidi.

Fonte: Biopesticides-Global Market Trajectory & Analytics (2021).

1.1.2 Formulazioni

Storicamente la difesa delle colture è stata associata all'impiego di prodotti costituiti da elementi o composti inorganici (Molinari, et. al., 2008) e da molecole organiche estratte da parti di piante (Molinari, et. al., 2008; Capasso, et. al., 2011; Molinari, 2013).

In tempi più moderni, gli agrofarmaci sono commercializzati come formulazioni, al fine di raggiungere una maggiore facilità nella produzione, nello stoccaggio, nel trasporto e permettere un'applicazione sicura, conveniente ed efficace (Hazra, et. al., 2019). Sfulcini et. al. (2008) individua come le formulazioni rivestano un ruolo determinante ai fini dell'incremento del rendimento del principio attivo tramite: l'aumento della solubilità in mezzo acquoso, il miglioramento della stabilità chimico-fisica e della biodisponibilità.

Generalmente, la formulazione commerciale consta di (Ferrari, et. al., 2006; Stephenson, et. al., 2006; Sfulcini, et. al., 2008):

- Principio attivo (*Active ingredient o Active substance*) > componente/i dell'agrofarmaco che contribuiscono all'espletamento dell'attività biologica diretta e/o indiretta nei confronti dei parassiti, di agenti di malattia o agendo come regolatore del metabolismo/ della crescita.
- Coadiuvanti > sono componenti che migliorano la solubilità, l'azione e la persistenza del principio attivo (*es. solventi, adesivanti, antievaporanti...*)
- Coformulanti > sono sostanze inerti che diluiscono il principio attivo favorendo il mantenimento della stabilità e la conservabilità della formulazione nel tempo.

Le formulazioni tradizionali a base di polveri bagnabili (WP), emulsioni concentrate (EC), concentrati solubili in H₂O (SL) sono ormai state soppiantate dalle formulazioni moderne che contemplano dei prodotti che offrono maggiore sicurezza per l'operatore, tra le principali si nominano: i granuli idrodispersibili (WDG-WSG), le sospensioni concentrate (SC), le emulsioni acquose (EW), i microincapsulati (CS), le suspoemulsioni (SE) e le dispersioni in olio (OD) (Ferrari, et. al., 2006; Sfulcini, et. al., 2008).

Nelle formulazioni commerciali la presenza di coadiuvanti e coformulanti rappresenta più del 50% del peso totale prodotto (Beck, et. al., 2012) ed a questi sono attribuibili le aumentate performance del principio attivo. Tuttavia, a questo aumento di efficacia si associa spesso un incremento dell'impatto ambientale dovuto sia al rilascio nell'agrosistema dei coadiuvanti che alla modifica della cinetica di degradazione del principio attivo con una conseguente maggiore presenza residuale (Ryckaert, et. al., 2007). I coadiuvanti costituiscono un ampio gruppo di sostanze delle quali solventi e surfactanti sono quelli contemplati maggiormente, ognuna di queste molecole possiede la capacità di distribuirsi in differenti fasi con conseguenti enormi

difficoltà nel definire il loro destino agroambientale, i loro effetti ecotossici e le loro concentrazioni in differenti matrici complesse come il suolo (Krogh, et. al., 2003; Mullin, et. al., 2016; Panizzi, et. al., 2016). Krogh et. al. (2003) evidenzia come uno dei maggiori problemi ambientali causato dai coadiuvanti sia legato alla loro capacità di aumentare la mobilità di altri contaminanti presenti a livello del suolo.

Gli stessi inerti, riportati con voce generica a livello di etichetta dei formulati molte spesso una volta giunti nell'ambiente manifestano una serie di proprietà chimiche e/o biologiche con modifica del loro comportamento a livello ambientale rispetto a quello descritto in formulazione. Inoltre, questi ingredienti possono agire con il resto della formulazione con una modifica sostanziale del comportamento a livello agroambientale con conseguente incremento degli effetti negativi tossicologici ed ecotossicologici (Cox, et. al., 2006; Mullin, et. al., 2016; Panizzi, et. al., 2016; Mesnage, et. al., 2018). Cox, et. al. (2006) evidenzia una crescente attività di ricerca che dimostra l'inaffidabilità dei test di tossicità ed ecotossicità svolti durante la valutazione delle dosi di esposizione ad un principio attivo, in occasione del processo di registrazione.

In ambito europeo, diversamente dalla precedente Direttiva 91/414 (CE) (Panizzi, et. al., 2016), il Regolamento 1107/2009 al capitolo 1, articolo 1 estende il suo campo di azione in termini di disciplina per la registrazione dei prodotti fitosanitari oltre che alle sostanze attive, antidoti e sinergizzanti, anche ai coadiuvanti e coformulanti che rientrano nelle formulazioni commerciali (EU Reg. 1107/2009; Jondini, 2013). Coadiuvanti e coformulanti vengono inclusi nell'agrofarmaco solo dove si dimostri un beneficio per la produzione vegetale senza che siano previsti effetti nocivi sulla salute umana, animale ed impatti ambientali (Jondini, 2013). Tuttavia, le procedure di approvazione per antidoti, sinergici, coformulanti e coadiuvanti appaiono non chiare a livello del Regolamento 1107/2009 che demanda le richieste per l'approvazione delle formulazioni ai vari Stati Membri (Panizzi, et. al., 2016; Robinson, et. al., 2020). In definitiva, i test condotti attualmente per la registrazione dei fitofarmaci interessano il solo principio attivo, senza prendere in carico le proprietà tossicologiche ed ecotossicologiche dei prodotti commerciali (Mesnage, et. al., 2018). Tali caratteristiche possono essere soltanto dedotte dalla sezione riservata delle schede di sicurezza riportate nei dossier di registrazione o da database come i registri dell'Agenzia europea per le sostanze chimiche (ECHA) (Panizzi, et. al., 2016).

Nell'ambito della valutazione dei coadiuvanti e coformulanti il Regolamento (EC) n° 1907/2006 del Parlamento e del Consiglio Europeo sulla Registrazione, Valutazione, Autorizzazione e Restrizione dei prodotti chimici (REACH) fornisce una base di richieste in

merito a specifici endpoints che oltrepassano quelli fisicochimici, tossicologici ed ecotossicologici richiesti dalla corrente regolamentazione in materia di approvazione dei prodotti fitosanitari. Ad ogni modo, l'utilizzo di indicatori appositi per lo studio di coadiuvanti specifici presenta lo svantaggio di non valutare gli eventuali effetti additivi e sinergici che si pongono in atto nell'ambiente reale tra il principio attivo e gli altri componenti della formulazione (Beck, et. al., 2012).

Adjuvant type	Example
Penetration agents	Petroleum or mineral oils, vegetable oils, organosilicon
Oder masking agent	1-octanal
Dyes	fd&c blue no. 1, fd&c red no. 40
Preservatives	Hexamethylenetetramine, potassium benzoate, sorbic acid
Stabilizer	Diisopropanolamine, hydroxyethylidene diphosphonic acid, silver nitrate
Diluents	Aluminum hydroxide
Surfactants	Anionic: alkylbenzene sulfonates, sodium laureth sulfate, soap Cationic: dioctadecyldimethylammonium chloride Amphoteric: cocamidopropyl betaine, cocamidopropyl hydroxysultaine Non-ionic: alkoxyated alcohol, ethoxylated alcohol, nonylphenol ethoxylate, tallow amine ethoxylate, alkyl polyoxyethylene ether
Emulsifiers	Alkanoic and alkenoic acids, monoesters and diesters of α -hydro- ω -hydroxypoly (oxyethylene), glyceryl monostearate, sodium metasilicate
Propellant	1,1-Difluoroethane, butane, propane
Solvents	N-methyl-2-pyrrolidone, polychloromethanes, chlorinated volatile organic compounds, xylene, isopropanol
Antifoaming agent	silicones (e.g., dimethylpolysiloxane), fatty acids
Carriers	Biochar, cyanobacteria, clay minerals, siliceous minerals, zinc-layered hydroxide, polymeric materials such as chitosan, lignin, and poly(ethylene) glycol

Figura 1-2: Esempi di coadiuvanti più utilizzati nelle formulazioni suddivisi per funzione principale.

Fonte: Mesnage, et. al., (2018).

Particolare importanza è attribuita alla capacità dell'industria di produrre componenti delle formulazioni *green* che possano avere minor impatto sull'uomo, sull'ambiente e sugli organismi non-target unitamente ad un miglioramento delle performance della sostanza attiva con conseguente possibilità di ridurre i dosaggi (Beck, et. al., 2012).

1.1.3 Classificazione degli Agrofarmaci

L'ampia gamma di principi attivi messe a disposizione negli anni ha prodotto la necessità di sviluppare dei criteri di classificazione che potessero orientare gli operatori del settore. Tra i vari raggruppamenti proposti, Molinari et. al. (2008) individua schematicamente le principali tipologie di categorizzazione dei fitofarmaci distinguibili in base a:

- Settore di impiego
- Modo di azione o meccanismo di azione
- Struttura chimica o gruppo chimico caratterizzante la sostanza attiva
- Rischio ed effetti sulla salute umana

Da queste suddivisioni specifiche ai fini pratici si opera solitamente una classificazione funzionale organizzata in maniera gerarchica che definisce primariamente come macrogruppo il settore di impiego procedendo successivamente a delineare ulteriori classi per struttura chimica di base e/o modo d'azione.

Secondo il settore di impiego i vari autori delineano diversi gruppi (Ferrari, et. al., 2006; Molinari, et. al. 2008):

- a- Fungicidi o Anticrittogamici > il principio attivo agisce nei confronti dei funghi patogeni con modalità preventiva e curativa o eradicante. Si possono avere prodotti fungistatici generalmente multisito, che bloccano l'attività biologica del fungo agendo a livello della sporulazione e/o germinazione delle spore. I fungicidi propriamente detti sono caratterizzati da un'attività eradicante e curativa che comporta un'azione monosito o sitospecifica.
- b- Insetticidi > sostanze attive con azione prevalente o collaterale nei confronti degli insetti parassiti fitofagi o fitomizi o vettori di virus e fitoplasmi. All'interno di questo gruppo ulteriore classificazione può essere operata per gli stadi e fasi colpiti dell'insetto (ovicidi, neanicidi/larvicidi ed adulticidi), per le modalità di penetrazione nell'insetto (per contatto con l'esoscheletro, per ingestione a livello del canale alimentare, per inalazione tramite gli spiracoli diffondendo poi nell'apparato respiratorio), per l'azione tossica (per via fisica/meccanica: tramite l'asportazione dello strato ceroso epicuticolare o per asfissia a livello tracheale. Per via chimica posseduta da tutti gli insetticidi con un'azione neurotossica a carico del sistema nervoso centrale e/o periferico ed in alcuni casi anche in altri apparati).
- c- Erbicidi > utilizzate contro le erbe infestanti delle colture, suddivisi a seconda dello spettro per generi e famiglie botaniche colpite in ad ampio spettro e selettivi. Ulteriore

classificazione è in base alla modalità di azione per contatto, traslocazione e residuali o antigerminello.

Classi di impiego più limitate sono rappresentate da: Acaricidi, Nematocidi, Rodenticidi, Molluscicidi, Fumiganti, Geodisinfestanti e Fitoregolatori.

Tutti i fitofarmaci, a prescindere dal settore di impiego possono manifestare strutture più o meno apolari e quindi lipofile che li rendono soggetti a diversi gradi di redistribuzione a livello del vegetale. In questo contesto si identificano prodotti: citotropici, traslaminari e sistemici.

Per quanto concerne la struttura chimica Molinari et. al. (2008) individua principi attivi:

- 1- Inorganici > si tratta di elementi semplici della tavola periodica o composti inorganici formati da più elementi semplici. In genere sono rappresentati da sali facilmente solubili in H₂O.
- 2- Organometallici > sono ioni metallici [Me]_x in cui un catione è posto in coordinazione con legame dativo con un composto organico. La struttura organica conferisce maggiori proprietà penetranti al prodotto che tuttavia esplica la tossicità con la porzione inorganica.
- 3- Organici > sono strutture organiche con uno o più atomi di C con valenza +4 uniti tra loro con legami covalenti assieme ad altri elementi (principalmente H, O, N).

3.1 Naturali > sono molecole reperibili in natura prodotte dal metabolismo primario e secondario di vegetali e microrganismi. Sebbene l'ampia variabilità delle strutture naturali, la maggiore bioattività è riconducibile a molecole ricorrenti come alcaloidi, terpenoidi e composti fenolici (Capasso, et. al., 2011; Bufi, et. al., 2013).

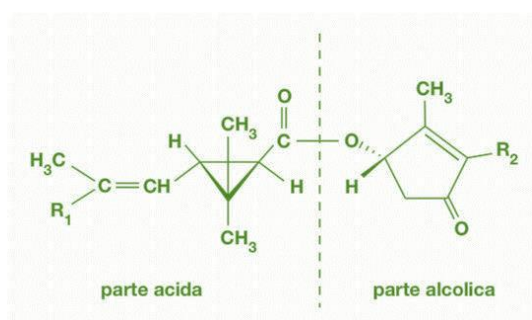


Figura 1-3: Formula di struttura delle piretrine estratte dal genere *Chrysanthemum* fam. Asteraceae, sono un esempio di insetticida organico naturale. R1, R2 sono posizioni occupate da differenti sostituenti caratterizzanti le diverse piretrine.

Fonte: <https://fitogest.imagelinenetwork.com/it/sostanze-attive/estratto-di-piretro/257>

3.2 Di Sintesi > date le criticità relative alle molecole organiche naturali principalmente riassumibili in scarsa persistenza, scarsa tossicità intrinseca dell'estratto e costi per la produzione su larga scala nel tempo la moderna industria ha prodotto degli analoghi sintetici tramite derivatizzazioni mirate su vari punti delle strutture organiche naturali.

Nel 1975, la WHO (World Health Organization) è stata la prima organizzazione internazionale ad ipotizzare una classificazione degli agrofarmaci sulla base del rischio basato sul criterio di valutazione cardine della tossicità acuta orale dermale su ratto (LD_{50}). Questa classificazione ha subito un continuo aggiornamento negli anni con un coinvolgimento progressivo degli Stati Membri e delle autorità per la registrazione dei prodotti fitosanitari (WHO, 2019).

Class		LD ₅₀ for the rat (mg/kg body weight)	
		Oral	Dermal
Ia	Extremely hazardous	< 5	< 50
Ib	Highly hazardous	5–50	50–200
II	Moderately hazardous	50–2000	200–2000
III	Slightly hazardous	Over 2000	Over 2000
U	Unlikely to present acute hazard	5000 or higher	

Figura 1-4: Classificazione in base al rischio acuto con DL_{50} su ratto proposta dalla WHO.

Fonte: WHO (2019).

La possibilità di disporre di una classificazione per ciascun fitofarmaco in base al rischio connesso alla sua tossicità consente di redigere etichette e schede di sicurezza (SDS) in grado di consentire una gestione sicura del prodotto stesso. In quest'ottica risulta fondamentale l'armonizzazione prodotta col sistema di classificazione GHS (UN, 2019), recepito dall'UE con il Regolamento (CE) n. 1272/2008 relativo alla classificazione, etichettatura ed imballaggio delle sostanze e delle miscele (noto come regolamento CLP *Classification, Labelling and Packaging*) (UN, 2019; UE, 2008). Per le sostanze chimiche, tra cui agrofarmaci classificati per le regole previste dal CLP si forniscono informazioni circa: i pittogrammi, avvertenza di attenzione o di pericolo, le frasi H (indicatori di pericolo), le frasi P (consigli di prudenza) nello specifico a carattere generale, prevenzione, reazione, conservazione e smaltimento (UE, 2008; Carletti, 2015).

1.1.4 Insetticidi

Le specie di insetti conosciute sono circa 1 milione, di queste circa diecimila (1% di quelle conosciute) hanno un effetto negativo sulla specie umana. Si stima che i parassiti siano in grado di distruggere annualmente il 30-40% della produzione agricola mondiale ed il 20% nel post-raccolta (Caboni, et. al., 2013; Basaglia, et. al., 2020). Oltre agli effetti diretti sulle colture diversi insetti sono vettori privilegiati di malattie umane come malaria, animali e vegetali che possono compromettere ulteriormente le produzioni (Caboni, et. al., 2013).

Nell'ottica di un controllo efficace degli insetti è indubbio il ruolo degli insetticidi quale principale classe di agrofarmaci che manifesta la sua attività primaria verso questo target (Miglani, et. al., 2019). Tuttavia, tra i fitofarmaci, gli insetticidi rappresentano anche una delle principali sorgenti antropogeniche della contaminazione del suolo, in quanto solo una porzione del prodotto distribuito raggiunge l'organismo bersaglio a fronte di una maggiore quantità che si disperde nell'ambiente contaminandolo (Carriger, et. al., 2006). Una volta rilasciate nell'agroecosistema le formulazioni subiscono una separazione delle varie componenti con la formazione di metaboliti che possono risultare più tossici rispetto alle sostanze di partenza (Mahmood, et. al., 2016). Inoltre, tra le categorie di agrofarmaci, senza dubbio, quella degli insetticidi è la classe che manifesta maggiori criticità in termini di tossicità acuta, ponendo seri rischi verso gli organismi non-target (Aktar, et. al., 2009; Mahmood, et. al., 2016; Miglani, et. al., 2019).

1.1.4.1 Insetticidi Organofosforici

Dalla fine degli anni '90, uno dei gruppi largamente utilizzato nella difesa delle produzioni agricole nei confronti degli insetti è rappresentato dagli organofosforici che grazie alla loro efficacia, all'ampio spettro e ai bassi costi furono ritenuti delle valide alternative agli organoclorurati come il DDT (Caboni, et. al., 2013).

Gli organofosforici sono un insieme di molecole molto eterogeneo accomunate dalla presenza dell'atomo di P posto centralmente e legato a catene laterali ed altri elementi, ulteriore tratto distintivo è rappresentato dal gruppo uscente (*leaving group*) componente della molecola maggiormente idrolizzabile che distaccandosi facilmente favorisce la bioattività della stessa (Costa, 2006; Gupta, 2006). La tossicità acuta degli organofosforici si esplica con un'azione neurotossica a livello sinaptico tramite legame con l'enzima acetilcolinesterasi (AChE: EC 3.1.1.7), con conseguente impedimento all'idrolisi dell'acetilcolina che finisce per accumularsi nello spazio intersinaptico non permettendo l'interruzione dello stato di eccitazione della membrana post-sinaptica (Pollini, 2006; Molinari, et. al., 2008). Costa (2006), evidenzia come oltre all'attività principale neurotossica, in virtù della loro eterogeneità

e dei complessi processi di biotrasformazione che intercorrono nei diversi organismi, gli organofosforici siano capaci di interagire in maniera più complessa e spesso non del tutto prevedibile con altri enzimi, recettori e sistemi di trasduzione del segnale. Diversi studi, riportano anche la capacità di alcuni organofosforici di esercitare azione di disturbo del DNA, RNA con ruolo mutageno, teratogeno ed embriotossico (Dedek, et. al., 1976; Wooder, et. al., 1981; Jokanović, 2001; Sultatos, 2006; Axelrad, et. al., 2002; Mostafalou, et. al., 2018; Tsiaoussis, et. al., 2018).



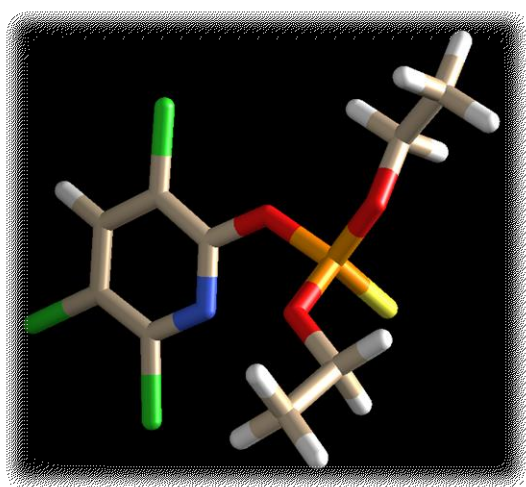
Figura 1-5: Modello 3D dell'enzima Acetilcolinesterasi (AChE) nell'essere umano.

Fonte: Protein Data Bank, riadattato in UCSF Chimera.

Ad ogni modo, nonostante la moltitudine di possibili implicazioni di queste molecole descritte in letteratura, quella preponderante e condivisa da tutto il raggruppamento è sicuramente l'azione neurotossica che si localizza sul sistema nervoso centrale ed interessa sia gli invertebrati che i vertebrati (Thimchalk, 2006). Costa (2006), indica come questo meccanismo, unitamente alla similarità tra il sistema nervoso colinergico degli insetti e quello dei mammiferi rende gli insetticidi organofosforici tra i principali agrofarmaci responsabili per milioni di avvelenamenti e morti annuali. Eddleston et. al. (2012) riporta un ruolo significativo dei coformulanti che possono potenziare l'azione tossica nei confronti degli organismi non-target e che fino al momento sono stati oggetto di poche considerazioni da parte degli studi tossicologici ed ecotossicologici relativi agli organofosforici.

Inoltre, Talesa et. al. (2012) evidenzia come la moderna difesa dagli insetti parassiti sia stata per molto tempo legata all'utilizzo intensivo di insetticidi con meccanismo di azione specifico sull'AChE che ha condotto verso la comparsa di resistenze con una progressiva perdita di efficacia di gruppi di molecole tra cui gli stessi organofosforici.

Nell'ambito dell'utilizzo di questo gruppo chimico è indubbia l'importanza ricoperta da principi attivi come il Chlorpirifos ($C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$), soggetto ad un ampio utilizzo nell'ultimo mezzo secolo verso un ampio spettro di insetti parassiti (Whitney, et. al., 1995; Zhou, et. al., 2007; Testai, et. al., 2010; Hou, et. al., 2021; Varghese, et. al., 2021).



**Figura 1-6: Struttura 3D della molecola del principio attivo Chlorpirifos
(*O,O*-diethyl *O*-[3,5,6-trichloro-2-pyridyl] fosfotionato)**

Fonte: PubChem.

Nello specifico, il Chlorpirifos appartiene al sottogruppo degli insetticidi organofosfotionati (OPT) e manifesta un'attività antiacetilcolinesterasica non sistemica agendo per contatto, ingestione ed inalazione (Testai, et. al., 2010).

Diversi studi, indicano come questo principio attivo ed i suoi numerosi metaboliti, una volta giunti nell'ambiente possono risultare estremamente persistenti con conseguente contaminazione su suolo, acque di falda ed acque superficiali (Zhou, et. al., 2007; Hou, et. al., 2021). In particolare, Baskaran et. al. (2003) evidenziano un'alta persistenza del principale metabolita del Chlorpirifos, il TCP che per la sua struttura apolare risulta tendenzialmente scarsamente adsorbito dai suoli con conseguenti fenomeni di *leaching* in falda.

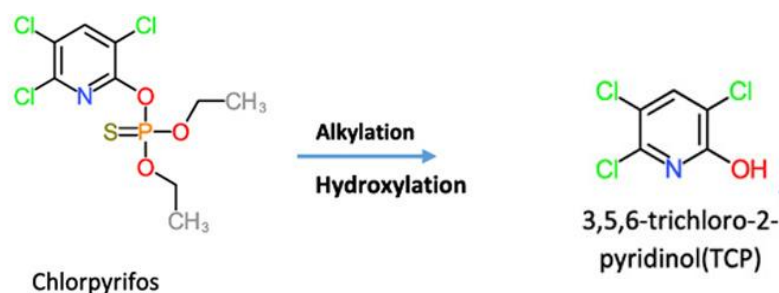


Figura 1-7: Il principio attivo Chlorpyrifos e la sua trasformazione nel metabolita 3,5,6-tricoloro-piridinolo (TCP).

Fonte: riadattato da Bose, et. al. (2021).

Le maggiori preoccupazioni derivate dalla contaminazione dei vari comparti ambientali sono derivate dal fatto che il Chlorpyrifos e diversi suoi metaboliti sono in grado di esplicare effetti tossici verso i microrganismi del suolo (Dutta, et. al., 2010; Orts, et. al., 2017; Hou, et. al., 2021), piante (Bassey, et. al., 2015; Hou, et. al., 2021), ecosistema acquatico (Cáceres, et. al., 2007; Ali, et. al., 2009; Wang, et. al., 2014; Costa, et. al., 2015, Bonifacio, et. al., 2017; Hou, et. al., 2021), agli invertebrati (Garcia-Gòmez, et. al., 2019; Sandal et. al., 2011; Wang, et. al., 2012; Hou, et. al., 2021) e vertebrati terrestri (Ojha, et. al., 2013; Zhu, et. al., 2020; Hou, et. al., 2021).

La serie di impatti possibili ed accertati hanno reso il Chlorpyrifos tra gli insetticidi più critici al mondo, tanto che diverse nazioni stanno gradualmente provvedendone al bando (Jia, et. al., 2021). In Europa, nel 2019, l'EFSA ha sottomesso una dichiarazione per la revisione della molecola in base a nuovi dati emersi nei riguardi: della tossicità della molecola per i mammiferi, effetti genotossici, effetti neurotossici, effetti tossici per la riproduzione, attività di interferenza e disturbo endocrino, neurotossicità nello sviluppo (EFSA, 2019).

A seguito dell'analisi dei dati proposti da EFSA, la Commissione Europea ha formalmente adottato la decisione di non rinnovare l'approvazione dell'insetticida Chlorpyrifos con il Reg. (EU) 2020/1085, ponendo i limiti massimi residui negli alimenti al minimo della rilevabilità strumentale (UE, 2020 [1]; UE, 2020 [2]). La stessa EPA con risoluzione del 30 agosto 2021 ha dichiarato l'abolizione dell'uso del principio attivo dal 29/10/2021 (EPA, 2021).

1.1.4.2 Bio-insetticidi

Sebbene l'utilizzo di agrofarmaci di sintesi, tra cui gli insetticidi abbia ridotto notevolmente le perdite dovute ai parassiti ed ai patogeni, il loro impiego eccessivo ha causato una serie di

impatti negativi sull'uomo e sull'ambiente. Pertanto, ad oggi, il loro uso deve essere necessariamente limitato ricercando alternative meno pericolose per la salute e più ecosostenibili che possano permetterne un abbandono definitivo. Inoltre, mentre gli insetticidi sintetici fanno della neurotossicità il principale meccanismo d'azione, i bio-insetticidi hanno altri modi di agire, inclusi diversi aspecifici come: mating-disruption, anti-feeding, soffocamento, disseccamento, regolazione della crescita (Capasso, et. al., 2011; Denholm, 2012; Olson, 2015). Attualmente, a livello del mercato mondiale degli insetticidi, l'impiego dei bio-insetticidi è in continua crescita, tra questi si citano in particolare: estratti vegetali e loro derivati sintetici ed emisintetici (Capasso, et. al., 2011; Caboni, et. al., 2013; Cavoski, et. al., 2013) e metaboliti microbici prodotti il più delle volte dal metabolismo secondario di vari microrganismi (Altomare, 2020).

Tra i bio-insetticidi a base di metaboliti microbici si colloca il principio attivo Spinosad, composto dai prodotti di fermentazione dell'Attinomicete tellurico *Saccharopolyspora spinosa* (Caboni, et. al., 2013).

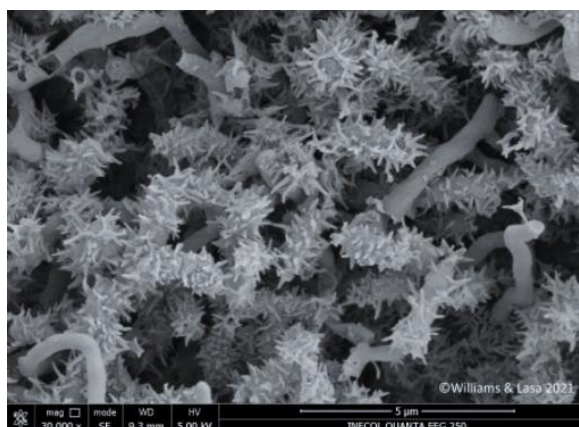


Figura 1-8: *Saccharopolyspora spinosa* al microscopio elettronico.

Fonte: <http://www.trevorwilliams.info/Spinosad.htm>

Dal metabolismo primario di questo batterio si producono le spinosine, macrolidi con scheletro composto da un lattone tetraciclico a 21 atomi di C a cui sono legati due deossizuccheri derivati dal ramnosio e dalla forosamina che evidenziano l'attività insetticida diretta verso insetti di vari Ordini come Tisanotteri (tripidi), Lepidotteri (minatori, carpfagi e xilofagi), Rincoti, Ditteri (*Dacus oleae*), Imenotteri e alcuni Coleotteri (*Dorifora*) (Altomare, 2020).

Le spinosine sono sostanze citotropiche, ad ampio spettro che risultano attive per contatto ed ingestione. Attualmente sono state caratterizzate circa 30 forme di spinosine naturali nominate con le lettere dell'alfabeto alle quali è seguita la produzione di circa 150 spinosoidi di origine

sintetica. Queste molecole esercitano un'azione neurotossica primaria che si esplica tramite legame con i recettori nicotinici dell'acetilcolina con conseguente blocco della neurotrasmissione. Si evidenzia inoltre, un'azione neurotossica secondaria attraverso il sequestro dei recettori dell'acido γ -amminobutirrico (GABA) con eccitazione del sistema nervoso, contrazioni muscolari involontarie, tremori e paralisi dell'insetto che cessa quindi l'attività trofica a carico della coltura (Altomare, 2020). Il prodotto Spinosad come evidenziato dal nome è costituito dalla miscela di spinosine A ($C_{41}H_{65}NO_{10}$) e D ($C_{42}H_{67}NO_{10}$) con rapporto variabile da 85 a 15. La rapida espansione commerciale è riassumibile; nell'azione ad ampio spettro (che tuttavia è in grado di salvaguardare organismi non-target come predatori e parassitoidi), il meccanismo innovativo di tipo neurotossico multisito, il favorevole profilo tossicologico ed ambientale. Riguardo al destino ambientale dello Spinosad diversi studi concordano sulla fotolisi quale principale percorso degradativo della molecola in acqua, su piante e superfici (Cavoski, et. al., 2013).

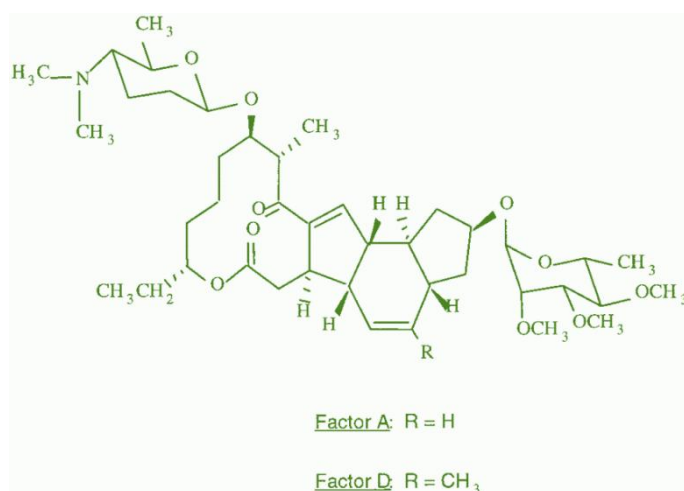


Figura 1-9: Formula di struttura di base delle spinosine. I diversi sostituenti in R individuano le spinosine A e D che entrano in miscela nel prodotto commerciale Spinosad.

Fonte: Hanley et. al. (2002).

1.1.5 Destino Agroambientale degli Agrofarmaci

L'impiego indiscriminato di agrofarmaci nella moderna pratica agricola è stato più volte oggetto di fenomeni di contaminazione e conseguente inquinamento dei vari comparti ambientali, con ricadute a breve e lungo termine sugli ecosistemi naturali (Ferrari, et. al., 2008; Tudi, et. al., 2021). Tang, et. al. (2021) rileva come il 64% della terra coltivata a livello mondiale (circa 24,5 milioni di km²) sia a rischio di contaminazione da più di un principio

attivo e il 31% è ad alto rischio. Tra queste ultime il 34% è rappresentato da zone ad elevata biodiversità. Mentre il destino agroambientale degli erbicidi è stato ampiamente indagato data la loro diretta applicazione al suolo, minori sono le attenzioni nei confronti dei fungicidi e degli insetticidi (Monaci, et. al., 2011). Mentre i fenomeni fisici influenzano prettamente il trasporto e la ridistribuzione dei fitofarmaci nei vari comparti ambientali, le reazioni chimiche e biochimiche comportano delle alterazioni molecolari. Sebbene tali modificazioni siano il più delle volte fondamentali ai fini di una completa degradazione e mineralizzazione del prodotto in elementi semplici privi di tossicità per l'ambiente, spesso nei passaggi intermedi si incorre nella formazione di nuovi xenobiotici. Questi residui possono presentare strutture talmente diverse da far variare in maniera consistente le loro proprietà fisicochimiche e la mobilità all'interno dell'ecosistema rispetto alla molecola di partenza rendendo difficili le valutazioni di tossicità ed ecotossicità (Mansour, 2018).

Tra i possibili destini degli agrofarmaci una volta distribuiti nell'ambiente si citano:

- Volatilizzazione > il fitofarmaco per evaporazione o sublimazione passa allo stato gassoso in atmosfera dove può subire il trasporto in zone differenti con possibili rideposizione da parte di agenti atmosferici. In alcuni casi può verificarsi anche un processo di fotodegradazione con rottura omolitica dei legami ad opera dei raggi U.V. (Ferrati, et. al., 2008).
- Fotodegradazione o Fotolisi > a contatto con la luce visibile o ultravioletta i fitofarmaci possono subire trasformazioni direttamente o per via di un sensibilizzatore o donatore (Pinna, et. al., 2008).
- *Drift* o *Deriva* > particolare fenomeno di volatilizzazione che avviene durante il trattamento, è da evitare poiché può portare il fitofarmaco in forma di spray a notevoli distanze dal punto di applicazione con possibili problemi di contaminazione su acque superficiali, centri abitati, fitotossicità o residui non ammessi su colture (Ferrati, et. al., 2008).
- *Leaching* o *Lisciviazione* > l'acqua in virtù della natura polare può trascinare lungo il profilo del suolo agrofarmaci che manifestano una polarità simile. Questo movimento può interessare, a seconda della tipologia di terreno e dell'evento piovoso la microporosità o arrivare ad un deflusso che interessa la macroporosità. Il deflusso nei micropori è sicuramente quello maggiormente auspicabile ai fini dell'adsorbimento e della degradazione dei fitofarmaci presenti nel suolo (Vischetti, 2008).
- *Runoff* o *Scorrimento superficiale* > si evidenzia con una saturazione della microporosità e macroporosità ed un deflusso superficiale. Si tratta di uno dei

fenomeni più pericolosi poiché in questo caso il fitofarmaco anche se apolare viene facilmente trasportato dalla corrente di acqua sfuggendo totalmente al potere adsorbente del suolo e quindi ad una possibile degradazione. Ulteriore rischio è quello che lo scorrimento dell'acqua provochi fenomeni erosivi a livello del suolo con trasporto di particelle di terreno che possono aver adsorbito nel tempo agrofarmaci (Vischetti, 2008).

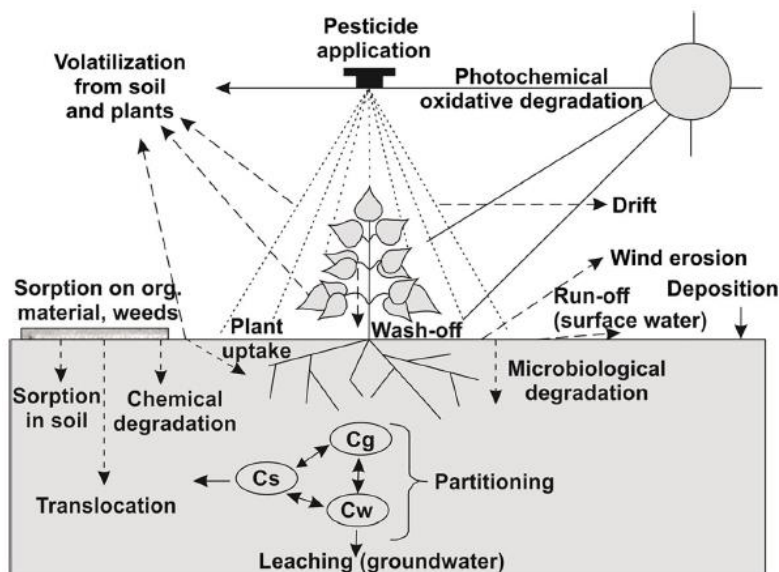


Figura 1-10: Rappresentazione schematica del destino degli agrofarmaci nel suolo.

Fonte: Galon, et. al. (2021)

Fenomeni come runoff, leaching e deriva sono tra le maggiori cause che comportano la contaminazione delle acque da agrofarmaci (Carter, 2000; Rice, et. al., 2001; Elias, et. al., 2018) con possibili tossicità esplicate su microrganismi acquatici (McMahon et. al., 2012; Elias, et. al., 2014; Elias, et. al., 2018), fauna selvatica (Hayes, et. al., 2006; Elias, et. al., 2018) e uomo (Rinsky, et. al., 2012; Elias, et. al., 2018).

Ai fini dell'immobilizzazione e progressiva degradazione degli agrofarmaci risulta fondamentale l'adsorbimento di questi sulle superfici della sostanza organica. In particolare, la frazione della sostanza organica umica, più matura, in virtù della sua complessità strutturale è in grado di esporre la maggiore eterogeneità di gruppi funzionali che possono fungere da leganti con quelli dei fitofarmaci e dei rispettivi metaboliti.

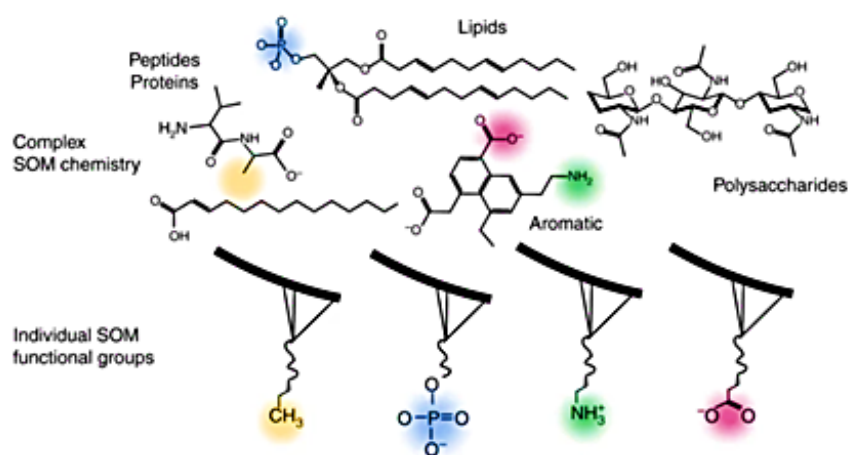


Figura 1-11: Gruppi Funzionali classicamente esposti dalla Sostanza Organica (SOM).

Fonte: riadattato da Newcomb et. al. (2017).

Maggiori possibilità di legame si traducono il più delle volte in un'azione contemporanea e cooperativa di vari meccanismi, tra i principali (Sannino, et. al., 2008):

- a- Interazioni di van der Waals (dipolo-dipolo indotto o tra dipoli indotti) > si tratta di interazioni deboli sempre presenti tra molecole che agiscono in maniera cumulativa.
- b- Legame idrofobico > per agrofarmaci tendenzialmente apolari, sulle superfici idrofobiche delle sostanze umiche. Un buon indicatore del comportamento delle molecole in termini di apolarità e quindi idrofobicità è espresso dalla costante di ripartizione in ottanolo-acqua (K_{ow}).
- c- Legame a H > interazione di tipo dipolo-dipolo in cui un atomo di H fa da ponte tra due atomi elettronegativi creando un'interazione elettrostatica con uno ed un legame covalente con l'altro.
- d- Ponte metallico > è un tipo di interazione tra agrofarmaco e fasi solide del suolo con catione metallico che fa da ponte.
- e- Ponte ad H₂O > le molecole di H₂O di idratazione formano un ponte ad acqua tra un catione adsorbito dal suolo e l'agrofarmaco.
- f- Complessazione di metalli
- g- Legame covalente

Gli xenobiotici che strutturalmente presentano similarità con l'humus in termini di eterogeneità di gruppi funzionali superficiali sono facilmente incorporabili dalla sostanza organica durante il processo di umificazione con conseguente rapido cambiamento nella mobilità, *leaching* e biodisponibilità (Borpatragohain, et. al., 2019).

Sotto questo profilo, una riflessione è dedicata al ruolo innovativo dell'uso dei metaboliti microbici nella difesa delle colture che come rilevato da Altomare (2020) sono caratterizzati da una varietà e complessità strutturale di difficile replicazione mediante sintesi chimica industriale.

A livello sperimentale le prove di adsorbimento e desorbimento conducono alla costruzione delle rispettive isoterme che forniscono delle indicazioni valide in merito all'affinità dell'agrofarmaco con i siti di adsorbimento nel suolo e l'entità delle interazioni. Ai fini della degradazione sicuramente è auspicabile una tipologia di adsorbimento chimico irreversibile che non presupponga un rilascio della sostanza legata alle particelle di suolo (Sannino, et. al, 2008). Una volta adsorbito, l'agrofarmaco va incontro a processi di degradazione abiotica operata principalmente dall'H₂O con l'idrolisi e dall'O₂ con l'ossidazione. Tuttavia, di maggiore interesse ai fini della mineralizzazione completa dell'agrofarmaco sono i processi di degradazione biotica di tipo diretto con coinvolgimento della molecola xenobiotica nel metabolismo dei microrganismi del suolo (Braschi, et. al., 2008).

La persistenza nel suolo di un fitofarmaco e dei suoi metaboliti è descritto tramite il $t_{1/2}$ o t_{50} (DT50) che rappresenta il tempo di emivita ovvero il tempo necessario affinché la concentrazione iniziale venga dimezzata. Altra modalità di esprimere la persistenza di un agrofarmaco è il t_{90} che esprime il tempo impiegato per ridursi del 90% (Sannino, et. al, 2008). Wang et. al. (2018) descrive come il tempo di emivita sia il risultato di reciproche influenze tra parametri ambientali come il contenuto di sostanza organica e le proprietà fisico-chimiche intrinseche dell'agrofarmaco. I valori di DT50 vengono ricavati tramite condizioni sperimentali supponendo che la degradazione del fitofarmaco segua una cinetica di primo ordine, ossia dipendente dalla concentrazione iniziale dello stesso a livello del suolo a t_0 (Beulke, et. al., 2001). Nonostante molto sia stato compreso sui parametri che possono influenzare la degradazione degli agrofarmaci nel suolo, minore risulta quella della correlazione di questi con gli effetti quantitativamente apprezzabili (Boethling, et. al., 2009; McLachlan, et. al., 2016; Wang, et. al., 2018). Perciò, per una data sostanza si possono avere delle variazioni delle costanti di degradazione in funzione della variazione delle condizioni ambientali (Aronson, et. al., 2006; Fenner, et. al., 2007; Wang, et. al., 2018). Le possibili differenze riscontrabili sono relative alla diversa forza delle tipologie di interazioni fisiche, fisico-chimiche e chimiche ed alla differente stabilità della frazione organica con cui l'agrofarmaco si lega (Castillo, et. al, 2008; Mamy, et. al., 2011; Katagi, 2013; Borpatragohain, et. al., 2019).

Nonostante le diverse critiche relative alla semplificazione apportata dall'uso del $t_{1/2}$, le simulazioni in vitro rivestono ancora un ruolo centrale nella modellizzazione del destino degli agrofarmaci in ambito di *Risk assessment* per la procedura di registrazione (Beulke, et. al., 2001).

La valutazione della persistenza e della traslocazione nei vari comparti ambientali, nonché dei fenomeni di bioaccumulo sono fondamentali per gli studi eco-tossicologici, ormai sempre più fondamentali nella valutazione degli impatti dei prodotti fitosanitari operata ai fini dell'approvazione di nuove molecole o della revisione di quelle già esistenti (FOCUS EU, 2006).

1.2 Ecotossicologia

L'ecotossicologia è una branca della tossicologia che focalizza l'attenzione dei suoi studi su tutta la biocenosi, allo scopo di evidenziare eventuali effetti dannosi di xenobiotici sugli individui, sulle popolazioni e sulle comunità di esseri viventi che popolano un determinato ambiente (Merli, et. al., 2008). L'applicazione dell'ecotossicologia agli agrofarmaci è relativamente recente, ma si è subito costituita parte integrante e imprescindibile del processo di valutazione per l'approvazione e la commercializzazione dei prodotti fitosanitari messo in atto dall'EPA negli Stati Uniti e dall'EFSA in Europa (Vischetti, et. al., 2020).

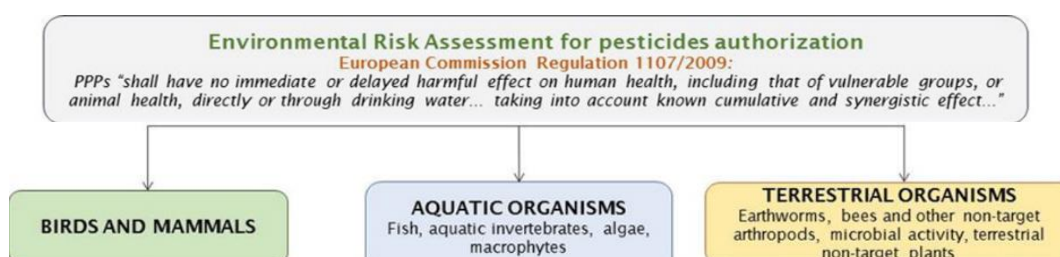


Figura 1-12: Risk Assesment UE per i Prodotti Fitosanitari secondo il Regolamento 1107/2009.

Fonte: riadattata da Panizzi, et. al. (2017).

Nell'UE, un primo livello del *Risk assessment* è stabilito dall'EFSA in cooperazione con le agenzie nazionali dei vari Stati Membri tramite test di tossicità standard eseguiti su specie

singole, in condizioni controllate di laboratorio adottando degli opportuni fattori di sicurezza (EU Reg. 1107/2009; Jondini, 2013; Vischetti, et. al., 2020).

I parametri comunemente utilizzati per la quantificazione degli impatti degli agrofarmaci sugli organismi sono definiti *endpoint* ecotossicologici e sono rappresentati da effetti misurabili attraverso saggi ecotossicologici. Tra i principali endpoint si riportano: la mortalità, effetti sulla riproduzione, effetti sulla crescita degli individui, l'alterazione a carico di parametri metabolici o fisiologici, l'alterazione delle caratteristiche comportamentali. L'osservazione di questi *endpoint* è soggetta al principio base della curva dose-risposta. Ai fini del processo di registrazione degli agrofarmaci risultano fondamentali i seguenti endpoint (Merli, et. al., 2008):

- LC_{50} (*Lethal Concentration* in mg/l o mg/kg o $\mu\text{g}/\text{m}^3$) > rappresenta la concentrazione letale per il 50% degli individui di una popolazione riferita ad un certo tempo di esposizione.
- EC_{50} (*Effective Concentration* in mg/l o mg/kg o $\mu\text{g}/\text{m}^3$) > come la LC_{50} ma prendendo in considerazione effetti differenti dalla morte.
- LT_{50} (*Lethal Time* in unità temporale ore, minuti, secondi) > tempo necessario a determinare la morte del 50% degli individui esposti ad una precisa concentrazione della sostanza.
- NOEL (*No Observed Effect Level* in mg/kg) > rappresenta la più alta concentrazione a dose a cui non si sono riscontrati effetti, riferita a precise condizioni sperimentali.
- LOEL (*Lowest Observed Effect Level* in mg/kg) > rappresenta la più bassa concentrazione a dose a cui sono stati riscontrati effetti, riferita a precise condizioni sperimentali.
- NOEC (*No Observed Effect Concentration* in mg/l o mg/kg o $\mu\text{g}/\text{m}^3$) > rappresenta la concentrazione massima non efficace in un saggio di tossicità acquatica.
- LOEC (*Lowest Observed Effect Concentration* in mg/l o mg/kg o $\mu\text{g}/\text{m}^3$) > rappresenta la concentrazione minima efficace in un saggio di tossicità acquatica.
- PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) > concentrazione massima ambientale senza effetti dannosi ricavata da uno dei precedenti valori tossicologici rapportato ad un fattore di sicurezza.

L'esposizione di un organismo a concentrazioni crescenti di una sostanza tossica conduce a delle risposte dello stesso: inizialmente si evidenzia un'omeostasi, segue una fase di compensazione e sforzo per terminare con danneggiamento e morte. Questi intervalli sono

identificati con delle soglie, rispettivamente: di effetto, di tossicità e di letalità (Merli, et. al., 2008).



Figura 1-13: Risposta di un organismo all'aumentare della concentrazione di una sostanza tossica.

Fonte: Merli et. al. (2008).

Tuttavia, data l'ampia variabilità e la scarsa conoscenza delle basi di una diversa sensibilità all'azione tossica delle varie specie bioindicatrici scelte nei test, tale approccio può portare ad un'eccessiva semplificazione del sistema, con una stima del rischio che può risultare sottodimensionata o sovradimensionata (Spurgeon, et. al., 2020)

Pertanto, oltre a questi *endpoint* classicamente adottati, nel tempo si è progressivamente consolidato l'utilizzo complementare di altri indicatori dotati di maggiore sensibilità ed in grado di riflettere la tossicità a concentrazioni sub-letali (Rice, et. al., 1997).

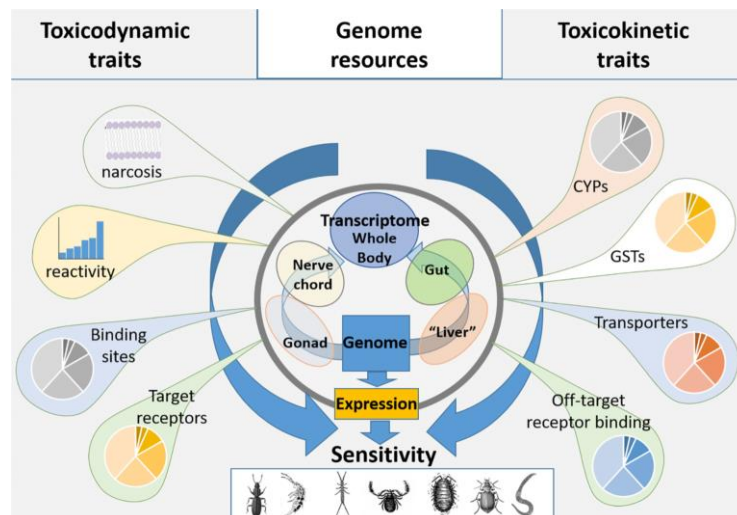


Figura 1-14: Schematizzazione delle complesse interazioni tra tossicodinamica, tossicocinetica dello xenobiotico e genoma dell'organismo non-target.

Fonte: Spurgeon et. al. (2020).

Lo studio degli esiti tossici è stato a lungo associato alla ricerca di *biomarker* ecotossicologici cioè variazioni biochimiche, cellulari, fisiologiche e comportamentali misurabili che possono rendere manifeste a livello dell'organismo, della popolazione o della comunità le conseguenze dell'esposizione ad un composto inquinante.

Gli effetti tossici dovuti all'interazione della sostanza con l'organismo si evidenziano con effetti biochimici variabili di tipo protettivo, dovuti all'induzione di enzimi con funzione detossificante come le monossigenasi o proteine come le metallotioneine. Altri effetti biochimici possono essere di tipo non protettivo dovuti all'impatto della molecola tossica sull'organismo stesso.

L'esposizione ad uno xenobiotico conduce l'organismo verso uno stress ossidativo con accumulo di ROS (Reactive Oxygen Species) che causano ulteriori stress ossidativi comportando dei cambiamenti a livello della modulazione dell'attività di enzimi antiossidanti come SOD (Superossido Dismutasi), CAT (Catalasi) e GST (Glutazione-S-Transferasi) (Mincarelli, et. al., 2019; Wen, et. al., 2021).

Ulteriori manifestazioni che si possono evidenziare sono quelle di tipo fisiologico che si suddividono in effetti a livello cellulare, di organo, di intero sistema organismo ed effetti sulla riproduzione (Merli, et. al., 2008).

I danni cellulari dovuti all'esposizione di un organismo ad uno xenobiotico, soprattutto a dosi sub-letali, iniziano ad evidenziarsi come malfunzionamenti molecolari all'interno di specifici organelli cellulari progredendo nel tempo verso disordini cronici. In tale ambito diventa fondamentale lo studio dei cambiamenti comportamentali quale strumento per una diagnosi rapida e complementare all'utilizzo di altri *biomarker* di stress (Dënoel, 2012; Anogwih, 2016). Tra questi, sicuramente la genotossicità rappresenta uno dei *marker* più critici nei confronti della stima degli effetti sub-letali anche in funzione della sua ormai appurata correlazione con una diminuita capacità riproduttiva ed embriotossicità (Vischetti, et. al., 2020). I danneggiamenti al DNA sono considerati un evento iniziale che definisce molto spesso l'avvio di processi di carcinogenesi nell'organismo (Møller, 2005; Araldi, et. al., 2015).

1. Mortality — survival and/or average lifespan.
2. Abundance — number of individuals and/or activity-density.
3. Biomass — weight of organisms.
4. Behavior — behavioral responses, including avoidance, mounding or burrowing activity, litter decomposition, food consumption and predation on or parasitism of target pests, cast or fecal production, locomotor functioning, defensiveness and aggression, and foraging and flight efficiency.
5. Reproduction — fecundity, reproductive anatomy and function, and offspring production, including egg laying rate, hatching rate, juvenile number, larval ejection, ovary development and sperm deformation, sex ratio, brood number and production, sterility, and viable brood cells.
6. Biochemical biomarkers — biochemical or molecular responses from toxic exposure, including oxidative stress (ROS), enzymatic, protein, and lipid activity or content, gene expression, cellular energy allocation or energy available, mitochondrial response, metabolism, neutral red retention time (NRRRT), DNA damage, and synapsin levels.
7. Growth — weight and development of individuals, including adults and juveniles, molting rate, larval growth, and cocoon production.
8. Richness and diversity — community structure and composition, including richness, diversity, and evenness.
9. Structural changes — visible, physical histological and/or morphological changes, such as damage to the epidermis.

Figura 1-15: Categorie di endpoint ecotossicologici

Fonte: Gunstone et. al. (2021).

1.3 I Lombrichi come Specie Bioindicatrici

Lo sviluppo dell'ecotossicologia applicata agli invertebrati del suolo si è costituita intorno al 1960, mentre soltanto al 1980-1990 è entrata quale parte integrante della valutazione del rischio dei prodotti chimici immessi nel mercato (Van Gestel, 2012).

Il suolo è uno degli ecosistemi più complessi sulla terra che contiene circa un quarto della biodiversità presente sul pianeta. Una manciata di suolo si stima contenga tra i 10 ed i 100 milioni di organismi appartenenti a più di 5000 *taxa*, dei quali soltanto una minima parte è conosciuto (Gunstone, et. al., 2021). Un suolo in buono stato comprende centinaia di migliaia di specie di macroinvertebrati (Bardgett, et. al., 2014; Singh, et. al., 2019; Gunstone, et. al., 2021), organismi capaci di provvedere ad una serie di servizi ecosistemici essenziali (Gunstone, et. al., 2021). Proprio in virtù della loro relazione con il suolo, gli invertebrati sono ritenuti da molti autori, degli efficienti accumulatori di xenobiotici, perciò sono ampiamente utilizzati come bioindicatori della contaminazione del suolo da agrofarmaci (Mincarelli, et. al., 2016; Mincarelli, et. al., 2019). Tra gli invertebrati del suolo, i lombrichi vengono comunemente studiati nelle prove ecotossicologiche proprio per il loro ruolo ecologico a livello di biocenosi: in condizioni ottimali questi possono rappresentare il 60/80% della

biomassa nel suolo e sono ritenuti tra i principali protagonisti della funzionalità dell'ecosistema in quanto sono in grado di influenzare la struttura del suolo, l'areazione, la redistribuzione di sostanza organica e della comunità microbica (Römbke, et. al., 2005; Pelosi, et. al., 2013; Mincarelli, et. al., 2016; Mincarelli, et. al., 2019; Sekulić, et. al., 2020). Si considera che i soli lombrichi possano costruire più di 8900 km di tunnel per ettaro diminuendo l'erosione del 50% attraverso un miglioramento generale delle caratteristiche strutturali del suolo e della capacità di infiltrazione dell'acqua (Blouin, et. al., 2013; Gaupp-Berghausen, et. al., 2015). Data la capacità di ingerire grandi quantità di suolo, i lombrichi sono tra gli organismi maggiormente sensibili alla presenza di contaminanti presenti nello stesso (Mincarelli, et. al., 2016; Mincarelli, et. al., 2019; Sekulić, et. al., 2020). Pertanto, su questi, possono valutarsi diversi *endpoint* ecotossicologici dovuti sia ad esposizioni acute con osservazione della mortalità, riproduzione e cambiamenti nel peso degli adulti ma anche ad altri *endpoint* come quelli comportamentali, morfologici e fisiologici (Schaefer, 2003).

Le metodologie correnti per il *risk assessment* degli agrofarmaci a livello dell'UE per i test di laboratorio su invertebrati sono standardizzate dall'OECD (OECD, 2004; OECD, 2016 a; OECD, 2016 b; Vischetti, et. al., 2020).

La mortalità dei lombrichi risulta un *endpoint* ampiamente studiato, tuttavia non provvede a dare delle informazioni soddisfacenti nel 95% dei casi. Di maggiore interesse risulta l'indagine della compromissione di funzioni normali come riproduzione, crescita, alimentazione e attività di scavo (Gunstone, et. al., 2021).

Per la valutazione degli *endpoint* comportamentali, Hund-Rinke et. al. (2001) e Schaefer (2003) indicano come il test di *avoidance* permetta il raggiungimento di una maggiore sensibilità rispetto alle classiche prove di mortalità: la sua durata minore rispetto ai test di tossicità cronica ed acuta permette un rapido *screening* per l'identificazione della tossicità di contaminanti presenti in un suolo.

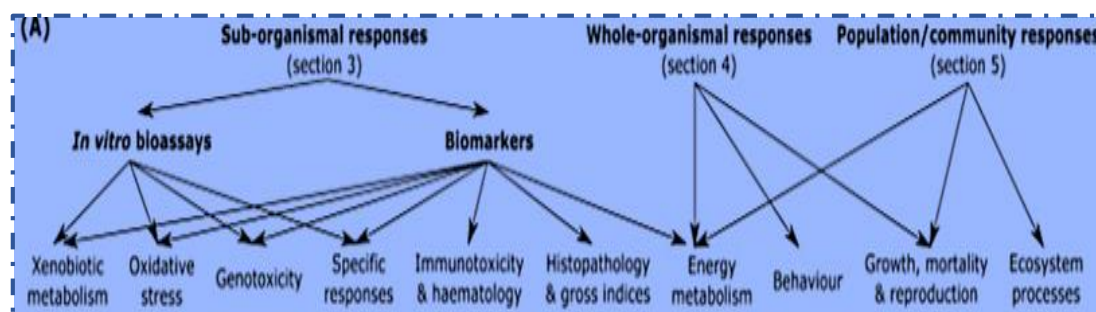


Figura 1-16: Schema dei possibili livelli di risposta ed indagine ecotossicologica.

Fonte: Schuijt et. al. (2021).

1.3.1 *Eisenia foetida*

Tra i lombrichi, il genere *Eisenia* con le due specie *foetida* ed *andrei* sono state utilizzate nei test per l'autorizzazione dei prodotti fitosanitari a livello europeo dall'inizio degli anni '80. Nello specifico, *Eisenia foetida* risulta particolarmente appropriata per i test di tossicità in quanto può facilmente essere allevata su una grande varietà di scarti organici, presenta tempi brevi tra una generazione e l'altra (Pelosi, et. al., 2013) ed è facilmente reperibile a livello commerciale tanto da essere consigliata per questo scopo dal protocollo di esposizione ai prodotti chimici OECD (Wang, et. al., 2021).

E. foetida appartiene al Phylum degli Anellida, Classe Clitellata, Sottoclasse Oligochaeta, Ordine Haplotaxida, Famiglia Lumbricidae e rappresenta una delle più abbondanti specie terrestri (Wang, et. al., 2015). Il lombrico è facilmente identificato dall'aspetto striato a bande larghe alternate di colore rosso-marrone scuro o bande più strette dalla colorazione rosa pallido. Mediamente raggiunge dimensioni dai 2-6 mm di larghezza e dai 26-130 in lunghezza ed è caratterizzato dalla presenza di un clitello che viene esibito dagli esemplari sessualmente maturi capaci di deporre delle caratteristiche uova definite cocoon (Singh, et. al., 2020).

E. foetida è un lombrico epigeico che gioca un ruolo importante nell'ecologia del suolo poiché giornalmente può trasformare lettiera vegetale in nutrienti disponibili per le piante in quantità superiore al proprio peso pertanto trova un largo impiego nel vermicompostaggio di vari scarti e rifiuti organici (Mitchell, 1997; Garg, et. al., 2006; Sharma, et. al., 2018; Srivastava, et. al., 2021). Si evidenzia come il ruolo del lombrico sia più ampio della semplice decomposizione dei substrati di varia natura, poiché la sua presenza influenza la modifica del profilo fisiologico delle comunità microbiche e dei funghi contribuendo ad una maggiore funzionalità biochimica e diversità delle stesse con conseguente possibilità di impiego nella *vermiremediation* (Aira, et. al., 2007; Xu, et. al., 2021).

Come in tutti i lombrichi, anche in *E. foetida* gli scambi tra organismo ed ambiente sono pressochè diretti, infatti non presentando organi respiratori ben definiti l'aria diffonde entrando attraverso il fine epitelio. Inoltre, l'intestino è separato dall'endoderma dalla cavità celomatica. Il celoma ha diverse funzioni fondamentali che vanno dal supporto idrostatico per la locomozione alla salute stessa del lombrico, poichè il suolo che viene ingerito viene immediatamente a contatto con il fluido celomico che presenta delle cellule immunitarie dette celomociti (Mincarelli, et. al., 2016). Lo studio dei leucociti celomici (celomociti) è basilare per la comprensione del sistema immunitario innato presente in questi invertebrati e come questo reagisce ai diversi stimoli esterni (Griffith, et. al., 2019; Singh, et. al., 2020). Si sono definite tre distinte subpopolazioni di celomociti: piccoli celomociti, grandi celomociti e

cloragociti che partecipano rispettivamente alla attività *natural killer (NK- like activity)*, fagocitosi e produzione di sostanze litiche (Hendawi, et. al., 2004; Mincarelli, et. al., 2019). Si evidenzia come l'aggregazione cellulare sia un comportamento metabolico importante dei celomociti spesso influenzato dalla presenza di contaminanti chimici (Singh, et. al., 2020). La verifica dei danni al DNA dei celomociti rappresenta attualmente un indicatore biochimico a livello subcellulare, che pertanto è caratterizzato da un'estrema sensibilità, affidabilità e correlazione alla dose (Wang, et. al., 2021).

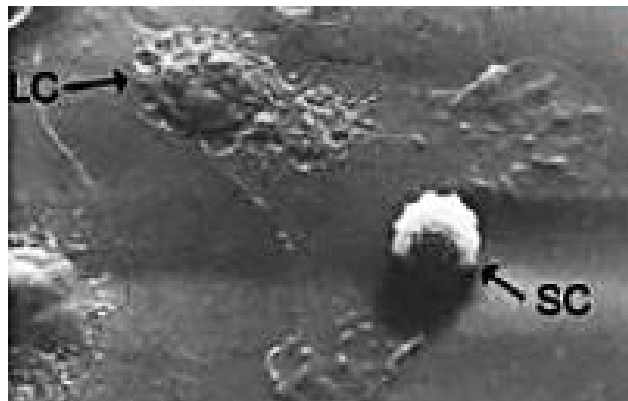


Figura 1-17: Scansione a microscopio SEM di immunociti di Eisenia. Con SC sono indicati piccoli celomociti mentre con LC grandi celomociti.

Fonte: Canesi et. al. (2013).

Capitolo 2 MATERIALI E METODI

2.1 Lombrichi

I lombrichi *Eisenia foetida* sono stati acquistati dall'azienda "Lombricoltura Bella Farnia", (Sabaudia, LT, Italia). Gli animali sono stati allevati in laboratorio mantenendoli in compost biologico in una stanza a temperatura di 20 ± 1 °C, a 70-80% di umidità (Robidoux et al., 2001; Cang et al., 2017) ed alimentati con avena e scarti vegetali biologici per 2 mesi prima dell'inizio dei test.

I lombrichi adulti con clitello ben sviluppato (massa umida compresa tra i 300 ed i 600 mg) sono stati selezionati ed acclimatati nello stesso substrato usato per i test una settimana prima di iniziare le prove (Li, et. al., 2018; Zou, et. al., 2018; Zhang, et. al., 2019). I lombrichi sono stati rimossi dal substrato 24 ore prima dei test e mantenuti in un piasta Petri con carta da filtro per permettere lo spurgo del tratto intestinale (Shi, et. al., 2007; Mincarelli, et. al., 2016).



Figura 2-1: Esempio adulto di Eisenia foetida.

2.2 Suolo

Il suolo agricolo utilizzato come substrato per i test è stato essiccato all'aria e setacciato a 2 mm. Detto suolo è stato prelevato dai primi 20 cm di profondità nel frutteto biologico presso l'azienda agricola sperimentale dell'Università Politecnica delle Marche (Agugliano, AN, Italia). Le principali caratteristiche del suolo sono riportate in tabella 1.

Tabella 1: Proprietà fisiche e chimiche del suolo utilizzato nei test.

Sabbia grossa	%	9
Sabbia fine	%	14
Limo	%	47
Argilla	%	30
pH	-	8.2
Sostanza organica	%	8
CEC	meq 100g ⁻¹	28.3
EC	ms cm ⁻¹	1.56

2.3 Insetticidi

I formulati commerciali utilizzati nei test sono: Laser 480 (principio attivo Spinosad) e Dursban 75 WG (principio attivo Chlorpyrifos). Gli insetticidi in questione sono stati forniti dalla ditta Dow Agrosciences (Milano, Italia), mentre gli standard analitici dei principi attivi (Spinosad purezza ≥ 95.0 % e Chlorpyrifos purezza ≥ 98.0 %) sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Le principali proprietà di queste sostanze sono riassunte nella tabella 2.



Figura 2-2: Dursban 75 WG e Laser 480 rispettivamente a base di Chlorpyrifos e Spinosad.

Tabella 2: Proprietà fisiche e chimiche dei due principi attivi Chlorpyrifos e Spinosad.

Fonte: le proprietà dei principi attivi sono state ottenute dal database PPDB.

Proprietà dei principi attivi		
	<u>Chlorpyrifos</u>	<u>Spinosad</u>
Classificazione	<i>Insetticida organofosforico</i>	<i>Insetticida naturale</i>
Modalità d'azione	<i>Inibizione dell'Acetylcholinesterasi</i>	<i>Inibizione dell'Acetylcholinesterasi</i>
Massa molecolare (g/mol)	350.58	731.98+745.98
Solubilità in acqua (mg/L)	1.05	7.6
Kow (Log P)	4.7	4.1
Koc (L/kg)	5509	34600
DT50 in suolo mantenuto in laboratorio (20°)	386	15
Pressione di vapore a 20 °C (mPa)	1.43	1.00 X 10 ⁻⁰⁵
Formulati commerciali		
	<u>Dursban 75 WG</u>	<u>Laser 480</u>
Principio attivo (%)	75	44
Formulazione	<i>Polvere</i>	<i>Liquido</i>
LC ₅₀ , <i>Eisenia fetida</i> , 14 giorni (mg/kg)	681	>1000
Concentrazioni di esposizione		
Test di riproduzione (mg/kg)	340,5 ; 476,7	735 ; 1575
Avoidance tests (mg/kg)	340,5 ; 476,7	735 -;1575
Test di tossicità (mg/kg)	476,7	735

2.4 Test di Riproduzione

Per stimare gli effetti di Laser 480 e Dursban 75WG nei confronti della performance riproduttiva dei lombrichi (ed eventuali altri endpoint ecotossicologici sub-letali), si è condotto un test riproduttivo seguendo le linee guida proposte dalla OECD 222 (OECD, 2016). Per ogni formulato sono state testate due differenti concentrazioni. Nello specifico, l'insetticida Dursban 75 WG, è stato aggiunto ad una dose del 50% (C₅₀E) e del 70% (C₇₀E) della LC₅₀

riportata corrispondente rispettivamente a 340,5 mg/Kg e 476,7 mg/Kg di Dursban 75 WG. Nel caso del Laser 480, le dosi sono state rispettivamente il 70% (S_{70E}) e 150% (S_{150E}) della LC₅₀ indicata corrispondente rispettivamente a 735 mg/Kg e 1575 mg/Kg.

Ogni prova ed il controllo non contaminato (ctrlE) è stata condotta in triplicato.

Una soluzione di ogni insetticida in H₂O deionizzata è stata preparata immediatamente prima dell'inizio del test, in una quantità necessaria al raggiungimento del contenuto di umidità finale (40±10 della massa secca di suolo). La soluzione è stata mescolata nel substrato ed ogni contenitore è stato riempito con 500 g di suolo essiccato.

I contenitori per i test sono realizzati in materiale plastico inerte (18x9x9 cm) e presentano apposite fessure sul coperchio che permettono lo scambio gassoso. Dieci lombrichi adulti provvisti di clitello sono stati aggiunti ad ogni contenitore. Tutte le prove sono state mantenute ad una temperatura controllata di 20 ±1°C per i 56 giorni di durata della prova.

L'alimentazione (5g di farina d'avena biologica) è stata fornita all'inizio della prova. Tutti i lombrichi adulti in ogni replica sono stati pesati, attentamente osservati e si sono registrate tutte le eventuali anomalie comportamentali e morfologiche.

Dopo 28 giorni, gli adulti sopravvissuti sono stati rimossi dai contenitori. Il substrato contenente giovani e *cocoons* è stato riposto nei contenitori per altri 28 giorni nelle stesse condizioni.

Il giorno 56, il numero di giovani nati dai *cocoons* ed i *cocoons* in ogni replica sono stati registrati. Il tasso di crescita dei lombrichi espresso in percentuale (%) è stato calcolato come segue:

$$\text{Tasso di Crescita} = [(P_t - P_0) / P_0] * 100\%$$

Dove P₀ è il peso medio iniziale dei lombrichi in ogni contenitore e P_t è il peso medio dei lombrichi al giorno 28. Un tasso di crescita positivo (+) indica un incremento di peso, un tasso negativo indica un'inibizione dello stesso (Xie, et. al., 2013).



Figura 2-3: Particolare di un Cocoon del genere Eisenia.

Fonte: Nature Picture Library.

2.5 Avoidance Test

Prima dell'inizio dell'avoidance test, è stato condotto un “*dual control test*” in 4 repliche, per appurare che i lombrichi non tendevano ad aggregarsi garantendo una distribuzione casuale tra le due sezioni quando queste sono riempite con lo stesso substrato (Yeardley, et. al., 1996; Hund-Rinke, et. al., 2001). La procedura adottata in tale test di controllo è la medesima descritta sotto per le prove di *avoidance*, con l'eccezione che ogni contenitore tester contiene lo stesso substrato in entrambe le sezioni.

La prova di *avoidance* è stata condotta per valutare l'abilità dei lombrichi di riconoscere ed evitare il substrato contaminato (García-Santos, et. al., 2011; Jordaan, et. al., 2012; Martínez Morcillo, et. al., 2013). Sono state impiegate le stesse concentrazioni dei due insetticidi riportate per il test di riproduzione nel precedente capitolo (C₅₀E, C₇₀E, S₇₀E, S₁₅₀E). Ogni concentrazione (n=4) per insetticida (n=2) è stata condotta in 5 repliche. Il test di avoidance è stato eseguito seguendo quanto descritto dal metodo ISO (ISO 17512-1, 2008) in contenitori in plastica di circa 18x9x9 cm.

All'inizio de test, i contenitori sono stati suddivisi in due sezioni di dimensioni uguali tramite l'introduzione di un divisore in plastica. Una sezione è stata riempita con 500 g di substrato essiccato contaminato (sezione A), nell'altra è stata deposta la stessa quantità di substrato senza insetticida (sezione B). Si è effettuata poi la rimozione del separatore collocando 10 lombrichi nella linea di separazione delle due sezioni. Successivamente, il contenitore è stato coperto con un coperchio perforato per permettere gli scambi gassosi, ma di dimensioni tali da evitare la fuoriuscita dei lombrichi.

Dopo 2 giorni, il divisore è stato inserito e i lombrichi su entrambi i lati sono stati contati.

Come suggerito dalla ISO (2008), i risultati della prova di avoidance sono espressi come Net Response (NR) percentuale:

$$NR = [(C - T) / N] * 100$$

Dove C e T rappresentano rispettivamente il numero di lombrichi osservati nel substrato di controllo e nel substrato trattato, mentre N è il numero totale di lombrichi in ogni contenitore. Una NR positiva (+) indica un comportamento di evitamento del substrato contaminato mentre un valore negativo (-) indica un'attrazione verso la sezione contaminata (Xu, et. al., 2020).

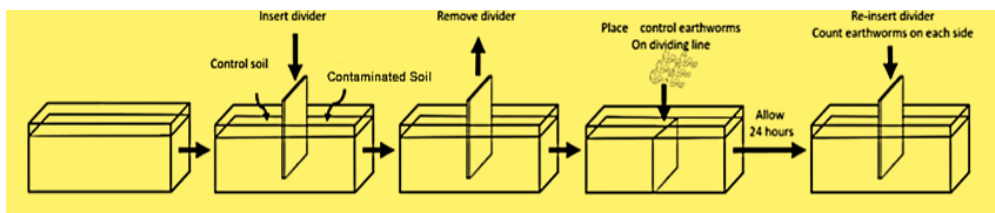


Figura 2-4: Schema di esecuzione dell'Avoidance test.

Fonte: riadattato da Stander et. al. (2019).

2.6 Test di Tossicità

Per valutare gli effetti dei due insetticidi sui lombrichi è stato condotto un test di tossicità applicando dosi sub-letali corrispondenti al 70% della LC_{50} indicata per ogni formulazione utilizzata (C_{70E} , S_{70E}). Ogni prova ed il controllo non contaminato (ctrlE) è stata condotta in triplicato. I contenitori e le condizioni (temperatura e umidità) sono gli stessi riportati per il test di riproduzione (ogni replica consiste in 10 lombrichi adulti e 500 g di peso secco equivalente di substrato). Tutti i lombrichi di ogni replica sono stati pesati e osservati a 1, 7, 14, 21 e 28 giorni di esposizione. Ad ogni tempo di prelievo, da ogni replica, sono stati prelevati: un'apposita aliquota di suolo, per lo svolgimento delle analisi dei residui degli insetticidi ed un lombrico. I lombrichi prelevati sono stati successivamente utilizzati per l'analisi di eventuale danneggiamenti del DNA tramite il *Comet Assay*. Dopo quattro settimane di esposizione, i lombrichi adulti sopravvissuti sono stati rimossi dai contenitori, ma il substrato con i giovani ed i *cocoons* è stato mantenuto nel recipiente per altre quattro settimane. Al giorno 56, il numero di giovani ed i *cocoons* sono stati contati.



Figura 2-5: Particolare della fase di prelievo e pesatura dei lombrichi dai suoli contaminati.

2.6.1 Estrazione ed Analisi dei Residui

2.6.1.1 Chlorpyrifos

Ad ogni tempo di prelievo precedentemente indicato (1, 7, 14, 21 e 28 giorni dall'avvenuta contaminazione dei suoli con i diversi formulati), sono stati campionati 25 g di suolo (peso asciutto) per ogni replica, estratti ed analizzati seguendo il protocollo descritto da Vischetti et. al. (2008). I campioni di substrato sono stati sottoposti a duplice estrazione con una soluzione di metanolo (CH_3OH) e H_2O (80:20) e posti su oscillatore da laboratorio per un'ora. Gli estratti sono stati centrifugati per 15 minuti e successivamente filtrati. Il filtrato così ottenuto è stato sottoposto per tre volte consecutive ad una separazione in 40 ml di cloroformio (CHCl_3) con successiva evaporazione fino a secchezza in rotavapor. Nella fase successiva si è operata una dissoluzione in metanolo e analisi tramite HPLC, usando uno Spectra System P 4000 equipaggiato con una colonna Supelcolil C18 (25 cm x 4.6 mm i.d.) e un detector UV con lunghezza d'onda di 230 nm. La portata del flusso è stata impostata a 1 ml min^{-1} operando un'eluizione con acetonitrile (CH_3CN) ed H_2O (70:30). Con queste condizioni, il tempo di ritenzione è pari a 6 minuti, con un limite di rilevamento di $0,67 \mu\text{g ml}^{-1}$.



Figura 2-6: Fase di estrazione del campione in soluzione Metanolo - H_2O .



Figura 2-7: Separazione delle fasi con Cloroformio.

2.6.1.2 Spinosad

Ad ogni tempo di prelievo, sono stati campionati 25 g di suolo (peso asciutto) da ogni replica che sono stati estratti ed analizzati seguendo il protocollo descritto da Sharma et al. (2007) con opportune modifiche. I campioni di substrato sono stati sottoposti ad estrazione in acetonitrile-H₂O (80:20) per 30 minuti su oscillatore da laboratorio. Si è eseguita una centrifugazione per 15 minuti con una filtrazione. Il filtrato è stato separato con 30 ml di diclorometano in imbuto separatore. La fase acquosa rimanente è stata ulteriormente soggetta a partizionamento con una soluzione di 10 ml di metanolo, 1 ml di idrossido di sodio 1 N e 30 ml di diclorometano. La fase organica depositata nella porzione bassa dell'imbuto separatore è stata portata a secchezza al rotavapor a 40°C, ed il residuo è stato dissolto in metanolo ed analizzato tramite l'HPLC. Come accennato in precedenza i residui dello Spinosad sono costituiti dalla somma della spinosina A e della spinosina D descritte da Telesiński et al. (2015). Le analisi sono state effettuate tramite HPLC usando uno Spectra System P 4000, equipaggiato con una colonna Supelcolil C18 (25 cm x 4.6 mm i.d.) e un detector UV con lunghezza d'onda di 250 nm. La portata del flusso è stata impostata a 2 ml min⁻¹ operando un'eluizione di acetonitrile e metanolo (65:35) (Akbar, et. al., 2010). Con queste condizioni, i tempi di ritenzione sono rispettivamente di 3 minuti e 5 minuti per la spinosina A e la spinosina D con un limite di rilevamento di 0,59 µg ml⁻¹.

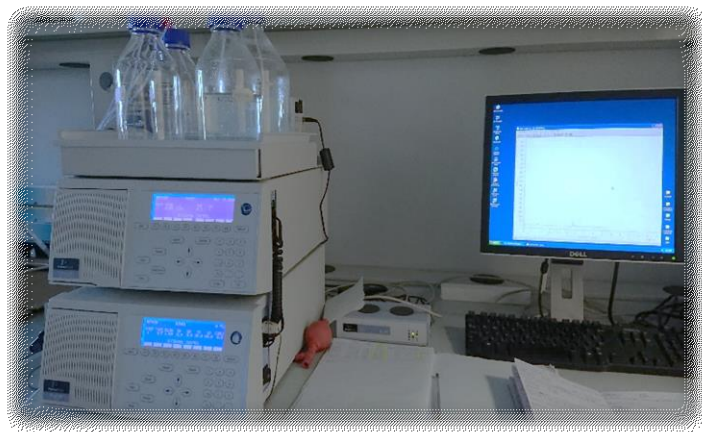


Figura 2-8: Sistema HPLC a due moduli in dotazione.

2.6.2 Comet assay

Per ogni giorno di prelievo stabilito, come riportato in precedenza si sono campionati tre lombrichi per prova in modo da accertare possibili danni al DNA delle cellule di celomociti da concentrazioni subletali degli insetticidi. Per le verifiche del caso si è utilizzato il test di mutagenesi dell'elettroforesi su singola cellula (*Comet assay* o *Single Cell Gel*

Electrophoresis, SCGE). Il Comet assay è un metodo semplice per la misura del livello di danneggiamento della doppia elica del DNA a livello di cellule eucariotiche (Collins, 2004). Nello specifico, il saggio è capace di esaminare le rotture della catena di DNA (*DNA Strand Breaks*) considerate un *biomarker* affidabile per l'identificazione e la quantificazione della genotossicità (Qiao, et. al., 2007).

Brevemente, ogni lombrico è stato immerso per 4 minuti a temperatura ambiente in 5 ml di *buffer* per l'estrusione costituita da 5% di etanolo, 95% PBS (fosfato salino), 2,5 mg/ml di sale disodico etilendiaminetetracetico diidrato ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$) e 10 mg/ml di guaicol gliceril etere con pH stabilizzato a 7,3 mediante NaOH. Una volta che il lombrico viene rimosso, si provvede ad una centrifugazione per raccogliere i celomociti (300 rpm, 10 minuti, 4°C). Quindi l'estrusione di pellet di celomociti avviene da 3 individui della stessa prova che vengono messi assieme e lavati due volte con PBS 1x. Le cellule lavate sono contaminate, risospese in agarosio (LMA 1%) a 37°C e stratificate su vetrini HT Trevigen pre-rivestite con 1% di agarosio (NMA 1%). Ogni spot è prodotto stratificando 35 μl di agarosio LMA contenente 3000 cellule; ogni campione è stato stratificato in 3 repliche. Dopo la solidificazione dell'agarosio (4°C, buio, 10 minuti) i vetrini sono stati immersi in una soluzione alcalina per lisi (pH 10) contenente NaCl (2,5 mol/L), sale disodio etilendiaminetetracetico diidrato (0,1 mol/l), Tris(idrossimetil)amminometano cloridrato o Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$) 10 mmol/L, dimetilsolfossido (DMSO) 10%, Triton X-100 1% (tensioattivo non ionico) e mantenuto a 4°C per almeno 1 ora (Mincarelli, et. al., 2016).

Successivamente i vetrini sono stati soggetti ad *unwinding* per 20 minuti, al buio, a 4°C, nel buffer elettroforetico alcalino (1 mmol/L EDTA e 300 mmol/L di NaOH, pH 13). L'elettroforesi è stata condotta a 11 V/cm per 20 minuti in una stanza refrigerata a 4°C.

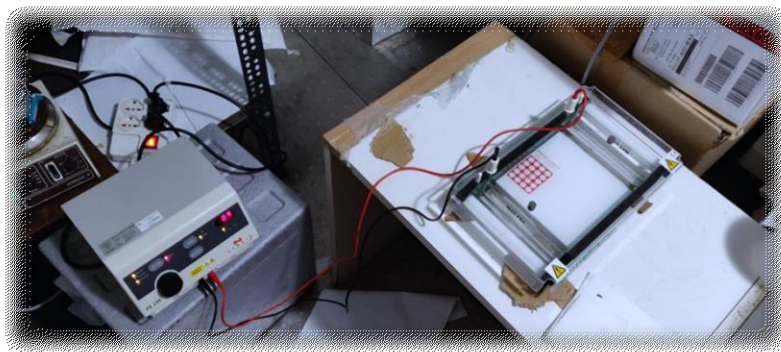


Figura 2-9: Elettroforesi in camera fredda.

Dopo l'elettroforesi, i vetrini sono stati lavati in H_2O per 10 secondi e in buffer di neutralizzazione (0,4 M Tris-HCl buffer stabilizzato a pH 7,5) per 5 minuti. Infine è stata

effettuata la disidratazione in metanolo al 75% per 10 secondi (Valverde, et. al., 1999; Mincarelli, et. al., 2016). Successivamente i vetrini stati colorati con Sybr Gold (10 µg/ml) e le immagini sono state acquisite automaticamente utilizzando un microscopio automatico Lionheart FX (Biotek, Winooski, Vermont, USA). Le osservazioni sono state eseguite ad un ingrandimento di 200x. 200 acquisizioni di comete per ogni trattamento ad ogni tempo di prelievo sono state acquisite in 3 repliche. Le immagini sono state elaborate tramite un software analitico appositamente creato capace di rilevare comete calcolando i principali indici di danneggiamento del DNA. Tra gli indici rilevati si riportano: lunghezza della coda della cometa (TL), momento della coda della cometa (TM), % d'intensità della coda (TI) (Tiano, et. al., 2005; Orlando, et. al., 2018).

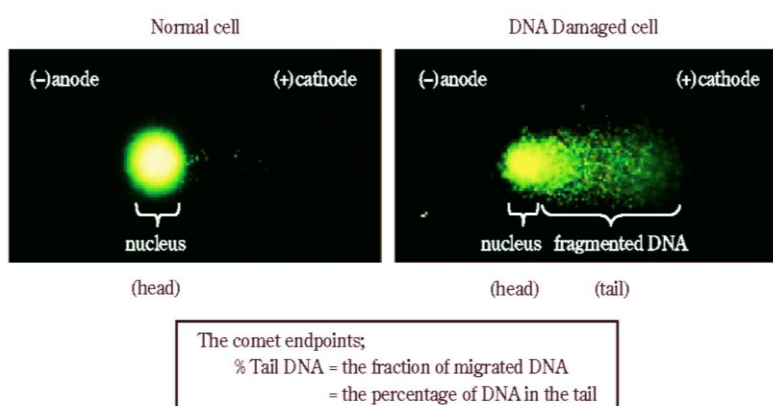


Figura 2-10: Esempi di cometa prodotti come output del Comet assay.

Fonte: Matsuyama et. al. (2009).

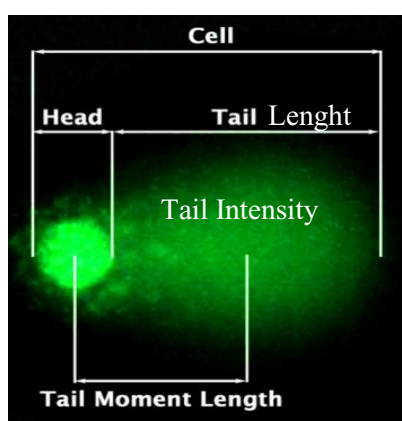


Figura 2-11: Indici di una cometa prodotta tramite Comet assay.

Fonte: riadattata da <https://www.cellbiolabs.com/comet-assay-kits-96-well>

Capitolo 3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Test di Riproduzione

3.1.1 Peso Medio dei Lombrichi

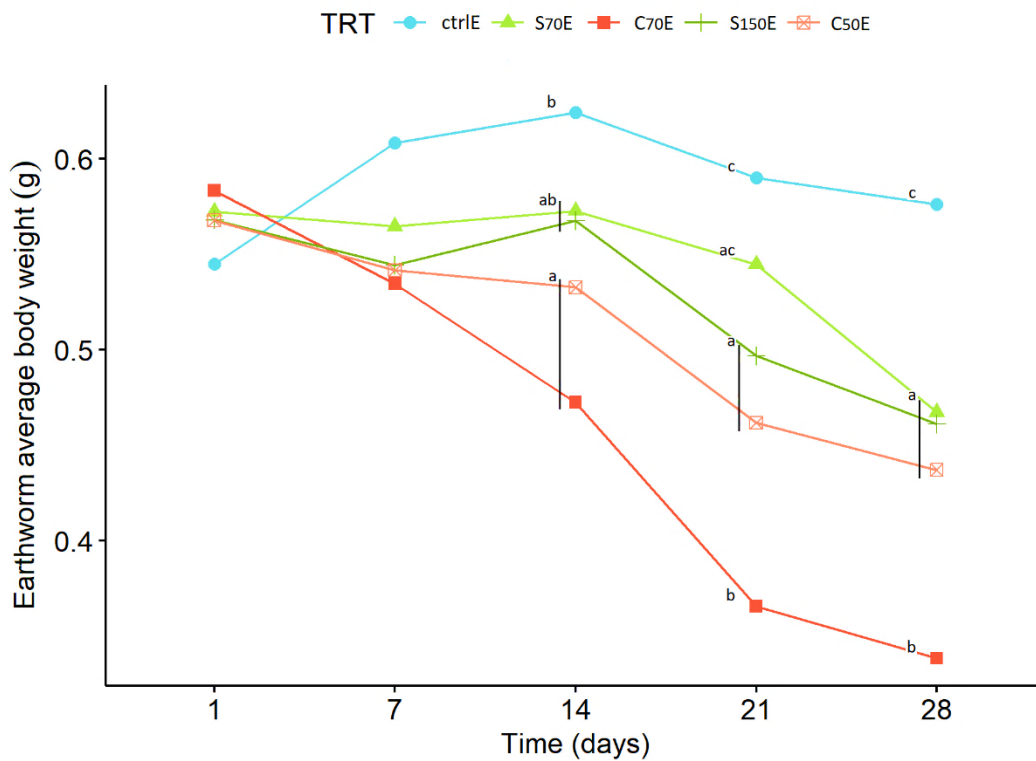


Figura 3-1: Andamento del peso durante il test di riproduzione.

Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore p , $\alpha = 0,05$); i diversi trattamenti relativamente ad uno stesso tempo di prelievo, risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

In figura 3.1 sono riportati gli andamenti del peso medio registrato per i lombrichi sopravvissuti ad ogni tempo di prelievo. Delle differenze significative tra le tesi sono state osservate a partire dal giorno 14, dove il peso dei lombrichi nei test con Chlorpyrifos è diminuito significativamente rispetto al controllo, ciò a dimostrare un effetto negativo

dell'insetticida sullo stato di salute dei lombrichi; differenze meno marcate sono state osservate ponendo a confronto il peso medio dei lombrichi nel controllo con quello medio registrato per quelli sottoposti all'esposizione con Spinosad. L'impatto negativo del Chlorpyrifos alla dose del 70% della LC₅₀ sul peso dei lombrichi è stato molto più pronunciato dal giorno 21, quando la prova C₇₀E ha evidenziato un valore di peso medio molto basso rispetto alle altre. Focalizzando l'attenzione sul Chlorpyrifos, si è registrata una perdita di peso significativa all'aumentare della concentrazione dell'insetticida, a conferma di quanto osservato in precedenza da De Silva et. al. (2010). Al giorno 21, la prova contenente Spinosad al dosaggio maggiore (S₁₅₀E) è risultata in un peso medio minore rispetto al controllo, mostrando un certo effetto tossico di questo insetticida, ma, tale perdita di peso è comunque molto minore rispetto alla prova con C₇₀E. Al termine dell'esperimento (giorno 28), anche nella prova con Spinosad al minor dosaggio (S₇₀E) si è registrata una perdita di peso medio dei lombrichi significativa.

Come dichiarato da Van Gestel et. al. (1995) e Frampton et. al. (2006), la perdita di peso, rappresenta un indice di stress fisiologico ed è dipendente sia dalla concentrazione di insetticida testato che dal tempo di esposizione allo stesso. I risultati emersi dal presente studio concordano con queste evidenze riportate dai due diversi autori.

In tabella 3 si mostra la differenza significativa nel tasso di crescita relativo dei lombrichi tra il gruppo esposto al Chlorpyrifos alla dose più concentrata (C₇₀E) ed il controllo dopo 28 giorni di esposizione.

Tabella 3: Tasso di crescita % ± RSD nel test di riproduzione.

Parametro	TRATTAMENTO (TRT)				
	CtrlE	S ₇₀ E	S ₁₅₀ E	C ₅₀ E	C ₇₀ E
Tasso di crescita (%±RSD; 56 giorni)	5,63±2,76 b	-18,79±0,82 ab	-19,95±0,52 ab	-23,96±0,07 ab	-42,40±0,08 a

Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore p, $\alpha = 0,05$); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

3.1.2 Stato di Salute dei lombrichi durante la prova

Tabella 4: Risposte riproduttive dei lombrichi durante i test di riproduzione.

Parametri	TRATTAMENTI (TRT)				
	ctrlE	S ₇₀ E	S ₁₅₀ E	C ₅₀ E	C ₇₀ E
Numero di cocoons/replica (± SD; 56 giorni)	72,67±11,24 b	70,00±9,00 b	59,00±2,00 ab	19,67±7,23 ab	4,67±8,08 a
Numero di giovani/replica(± SD; 56 giorni)	159,00±20,07 b	138,33±13,01 ab	68,00±37,27 ab	3,33±3,06 a	NA
Fertilità (%±RSD;56 giorni)	2,19±0,05 b	1,98±0,03 ab	1,14±0,52 ab	0,15±0,87 a	NA

Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore p, $\alpha = 0,05$); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

Tabella 5: Osservazioni fatte sui lombrichi ad ogni tempo di campionamento durante il test di riproduzione.

Tempo (giorni)	TRATTAMENTO														
	ctrlE			S ₇₀ E			S ₁₅₀ E			C ₅₀ E			C ₇₀ E		
	Ub	Ma	M	Ub	Ma	M	Ub	Ma	M	Ub	Ma	M	Ub	Ma	M
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	✓	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	✓	-	-	✓	-	3,33%±1,73
21	-	-	-	-	-	-	-	3,33%±1,73	✓	✓	3,33%±1,73	✓	✓	23,33%±0,65	
28	-	-	-	-	-	-	-	3,33%±1,73	✓	✓	10,00%±1,00	✓	✓	40%±0,25	

✓ presenza

- assenza

Ub: Comportamenti unusuali (*Unusual behaviour*) come bassa reattività a stimoli esterni, minore attività scavatoria, movimenti compulsivi.

Ma: Anomalie morfologiche (*Morphological anomalies*) come lesioni, miniaturizzazione, colorazioni anormali.

M: Variazione della percentuale di mortalità comparata al numero iniziale di lombrichi (*Mortality*) (%±RSD).

In tabella 5 si riporta il riepilogo delle osservazioni sullo stato di salute condotte sui lombrichi durante l'esperimento. L'assenza di mortalità è stata osservata sia nel controllo che nel campione S₇₀E (prova con Spinosad a concentrazione minore), una percentuale di mortalità del 3,33% è stata osservata nella prova S₁₅₀E dal giorno 21. Tuttavia quest'ultima percentuale non è significativamente rilevante.

In merito al Chlorpyrifos, nel caso della prova a concentrazione minore (C₅₀E), la mortalità inizia a manifestarsi dal giorno 21 e subisce un increment del 10% per la fine del test (giorno 28). La dose più alta di Chlorpyrifos (C₇₀E) presenta una mortalità già dal giorno 14 ma diventa ancora più marcata rispetto alle altre prove nella settimana successiva raggiungendo la percentuale del 23%, fino ad un 40% nel giorno 28.

Comportamenti inusuali sono assenti nel controllo e nei trattamenti a base di Spinosad, mentre si manifestano già dal giorno 7 nei lombrichi sottoposti a Chlorpyrifos. Come mostrato in tabella 5, anomalie morfologiche sono state osservate solo nelle prove con Chlorpyrifos. Tuttavia, queste si sono rese manifeste dal giorno 21, più tardivamente rispetto alle anomalie del comportamento. I risultati sono in linea con quanto riportato dallo studio di Rao et al. (2003) dove inizialmente i lombrichi si presentano agitati ed inquieti con scarsa coordinazione dovuta all'inibizione dell'AChE dall'organofosforico, poi, al fine di superare l'effetto tossico del Chlorpyrifos che richiede molta energia, i lombrichi presentano autolisi dei tessuti nella zona posteriore.



Figura 3-2: Particolare di lesioni, anomalie morfologiche e miniaturizzazioni manifestate dai lombrichi nella prova con Chlorpyrifos a 21 giorni.

In tabella 4, sono riportate le risposte relative alla riproduzione dei lombrichi a 56 giorni. La produzione di *cocoons* nei test con Spinosad non differisce in maniera significativa dal controllo, al contrario, è evidente una bassa produzione degli stessi in entrambi i trattamenti a

base di Chlorpyrifos. Tuttavia, è solo con la maggiore concentrazione di Chlorpyrifos (C₇₀E) che si rende visibile un decremento molto significativo se posto a confronto con il controllo. Inoltre, la produzione minima di giovani è stata registrata nella prova C₅₀E, mentre non c'è presenza di giovani nella C₇₀E. Uno studio precedente a quello riportato, condotto da Zhou et al. (2007), svolto con dosi di Chlorpyrifos più basse, non è stato capace di accertare l'influenza sull'attività riproduttiva dei lombrichi a causa della bassa produzione di *cocoons*. Per questo i risultati ottenuti dal presente studio confermano la tossicità del Chlorpyrifos che si rende manifesta anche sulla fertilità dei lombrichi.

Nelle prove con Spinosad, il numero di giovani, *cocoons*, e fertilità sono molto simili a quelle osservabili nel controllo, a dimostrazione di come la tossicità dell'insetticida non disturbi eccessivamente l'attività riproduttiva dei lombrichi. Questi risultati trovano conferma nel lavoro di Sekulić et al. (2020), sebbene sia stato svolto con dosi minori di Spinosad. Il valore del parametro di fertilità conferma un'attività tossica inferiore sulla fertilità dei lombrichi da parte dello Spinosad rispetto al Chlorpyrifos. Le analisi suggeriscono una corrispondenza tra lo stato di salute dei lombrichi adulti e la loro capacità riproduttiva, come precedentemente riportato da Robidoux et al. (2001).



Figura 3-3: Particolare dello sgusciamiento di una forma giovanile di Eisenia foetida da un cocoon.

Fonte: <https://peakd.com/biology/@quochuy/what-does-a-worm-cocoon-look-like>

3.2 Avoidance Test

I risultati del test preliminare di controllo hanno dimostrato sia la validità del criterio dell'avoidance test, considerato che nessun lombrico è morto o scappato, sia l'assenza di preferenza o comportamento di aggregazione quando uno stesso substrato è disposto su entrambi le sezioni del contenitore.

L'effetto dei due insetticidi sul comportamento di avoidance è mostrato in figura 3-4.

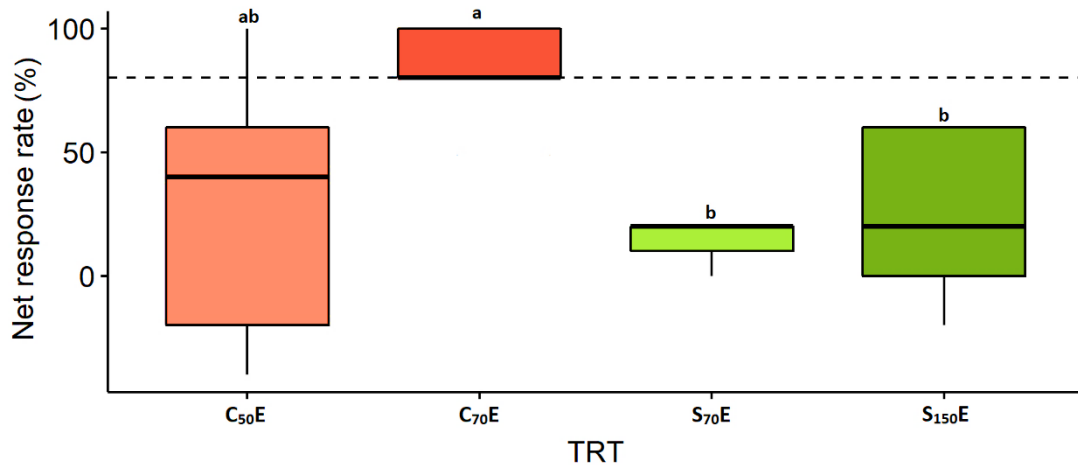


Figura 3-4: Risultati del test di avoidance con *Eisenia foetida* dopo 48 ore.

Comparazioni multiple di Dunn Kruskal-Wallis (con opportune correzione di Bonferroni del valore p, $\alpha = 0,05$); i trattamenti con differenti lettere sono significativamente diversi.

Come riportato in figura 3-4, tutti i test hanno un valore di NR positivo che indica la tendenza dei lombrichi ad evitare i suoli contaminati. Solo nella prova con C₇₀E, il valore NR eccede per un 80% (linea tratteggiata) indicando un ambiente estremamente sfavorevole per i lombrichi, che quindi tendono ad evitarlo (ISO, 2008; Li, et. al., 2015).

3.3 Test di Tossicità

3.3.1 Analisi dei residui degli insetticidi

I residui dei due insetticidi trovati nel suolo durante l'esperimento rappresentano la reale esposizione dei lombrichi all'effetto tossico. I dati sono mostrati nelle figure 3-5 (Chlorpyrifos) e 3-6 (Spinosad).

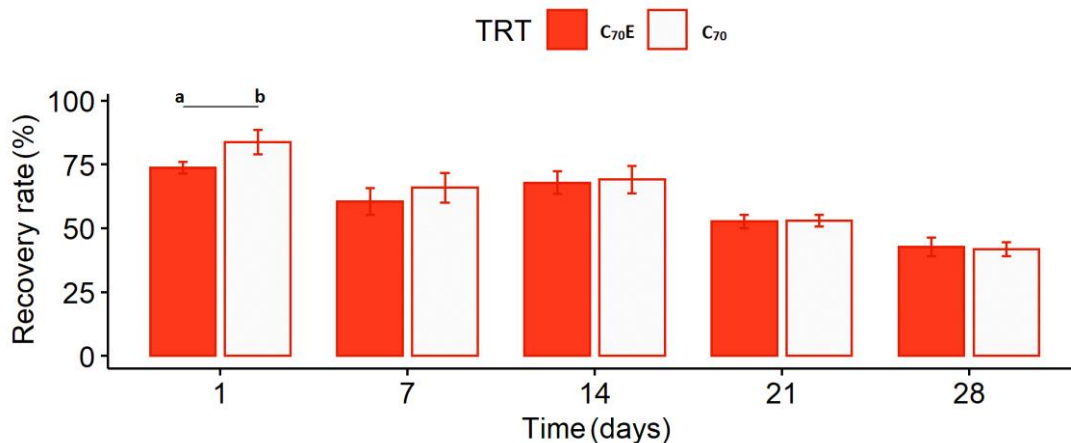


Figura 3-5: Recupero di Chlorpyrifos dal suolo per ogni periodo di campionamento.

I dati sono presentati come medie \pm RSD (n=3).
 I trattamenti con differenti lettere sono significativamente diversi secondo comparazioni multiple effettuate con modello Linear Mixed Effect (con opportune correzione di Bonferroni del valore p, $\alpha = 0,05$).

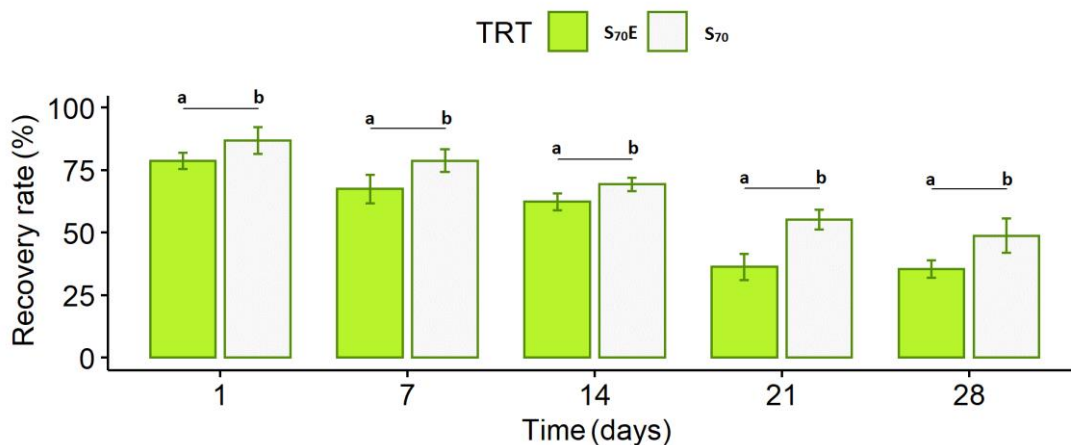


Figura 3-6: Recupero di Spinosad dal suolo per ogni periodo di campionamento.

I dati sono presentati come medie \pm RSD (n=3).
 I trattamenti con differenti lettere sono significativamente diversi secondo comparazioni multiple effettuate con modello Linear Mixed Effect (con opportune correzione di Bonferroni del valore p, $\alpha = 0,05$).

La degradazione degli insetticidi nel suolo procede similmente ai valori di emivita (*half-life*) calcolati mediante applicazione di una cinetica di primo ordine ai dati della degradazione. Il $t_{1/2}$ per C₇₀E risulta di 29,6 giorni, C₇₀ 26,5 giorni, 19,3 giorni per S₇₀E e 28,9 giorni per S₇₀. Come riportato da Sanchez-Hernandez et. al. (2018a), si evidenzia una più veloce

degradazione dello Spinosad nel suolo con lombrichi rispetto all'andamento registrato in assenza di lombrichi.

La spiegazione del comportamento del Chlorpyrifos è probabilmente dovuta al suo alto K_{oc} che indica un maggiore adsorbimento da parte della sostanza organica nel suolo (Mackay, et. al., 2006) rendendolo quindi scarsamente biodisponibile e biodegradabile (Megharaj, et. al., 2011).

Il tempo di emivita per il Chlorpyrifos trovato in questo esperimento è sempre risultato più basso rispetto a quelli riportati generalmente da altri fonti. All'interno del Pesticide Properties Data Base il Chlorpyrifos è classificato come insetticida molto persistente e/o persistente con un tempo di emivita nel suolo tipicamente di 386 giorni, con una variabilità dai 19,9 ai 1000 giorni a seconda dei differenti suoli.

E' stato riportato come il Chlorpyrifos sia tossico per la microflora del suolo e che la sua persistenza è dovuta in particolare all'incapacità del principio attivo stesso di selezionare ceppi o linee di microrganismi capaci di degradarlo (Singh, et. al., 2002). Diversi autori (Racke, et. al., 1990; Coppola, et. al., 2007) spiegano come la causa di questa dinamica sia da ricercarsi nel TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinolo), principale metabolita del Chlorpyrifos con proprietà antimicrobiche. I valori di emivita nel presente studio potrebbero essere dovuti al buon contenuto in C organico del substrato, che ha sicuramente contribuito ad un adsorbimento del Chlorpyrifos a livello dei colloidi del suolo, permettendo in contemporanea un'attività di degradazione da parte dei microrganismi efficiente con diminuzione del residuo capace di sviluppare tossicità sugli organismi non-target (lombrichi).

La degradazione dello Spinosad nelle sue componenti naturali avviene tramite una combinazione di processi, tra tutti, fondamentali sono la fotodegradazione e la degradazione microbica (Tamez-Guerra, et. al., 2017). Il tempo di emivita di questo insetticida naturale è stato misurato tra i 9-10 giorni in caso della fotolisi del suolo o tra i 9-17 giorni nel caso il principio attivo sia soggetto a degradazione aerobica in assenza di luce (Thompson, et. al., 2000).

I valori trovati nel presente esperimento concordano con quanto riportato in letteratura, considerando che la prova con lo Spinosad è stata condotta in condizione controllata con assenza di luce, si è dimostrata una scarsa persistenza nel suolo con valori di recupero dei residui che hanno presentato un decremento consistente col passare del tempo (Barden, 1998; Mandal, 2013; Telesiński et al., 2015).

Differenze significative dei valori di recupero sono riportate tra il tasso di recupero di Spinosad nella prova S_{70E} (presenza di lombrichi) e S_{70} (assenza di lombrichi). Per cui è possibile

ipotizzare che la presenza di lombrichi contribuisca a metabolizzare l'insetticida. Molto probabilmente la stessa attività di scavo dei lombrichi permette una maggiore areazione del substrato, condizione che, come riportato da Thompson et. al. (2002) contribuisce ad una più rapida degradazione dell'insetticida.

3.3.2 Effetti dei Residui sui Lombrichi

3.3.2.1 Effetto sul Peso Medio dei Lombrichi

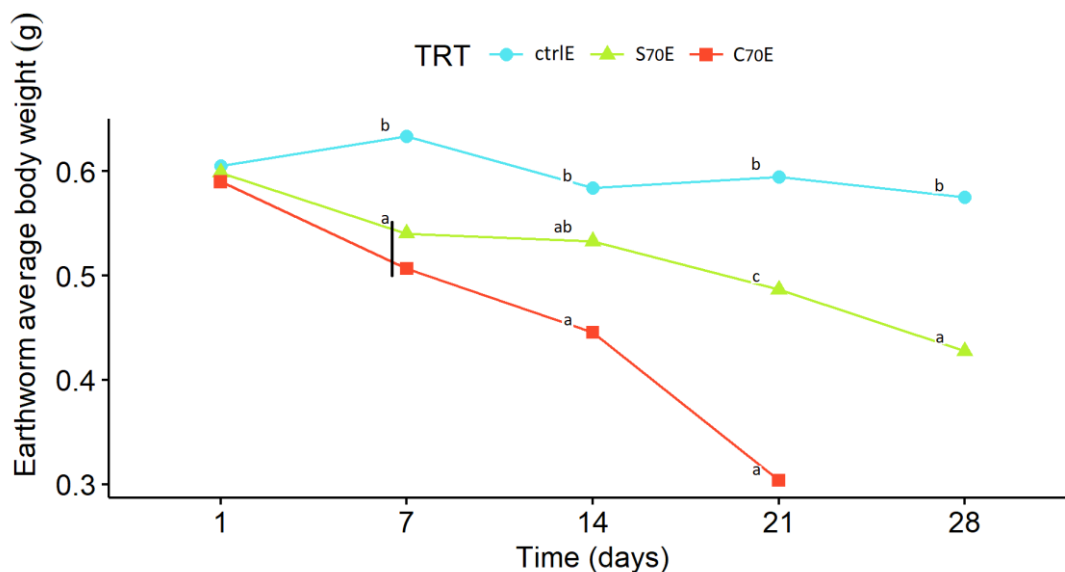


Figura 3-7: Andamento del peso durante il test di tossicità.

Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore p, $\alpha = 0,05$); i diversi trattamenti relativamente ad uno stesso tempo di prelievo, risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

Il peso medio dei lombrichi in vita durante i 28 giorni dell'esperimento è riportato in figura 3-7. Come si può notare, l'effetto dei due insetticidi è stato evidente e si hanno differenze significative rispetto al controllo al settimo giorno dall'esposizione. Il Chlorpyrifos mostra un effetto dannoso sul peso dei lombrichi significativamente maggiore rispetto al controllo in ogni tempo di prelievo. Si misura una riduzione di peso di almeno il 50% al giorno 21, con totale mortalità alla fine della prov (giorno 28) ad indicare una forte tossicità del Chlorpyrifos. Al contrario, lo Spinosad ha mostrato un effetto relativamente basso sul peso dei lombrichi, ma si è delineata una riduzione rispetto al controllo a partire dal giorno 21. Si è inoltre evidenziato un tasso di crescita negativo (Tabella 6) del 28% circa alla fine dell'esperimento.

Tabella 6: Tasso di crescita % \pm RSD nel test di tossicit .

Parametro	TRATTAMENTI		
	CtrlE	S ₇₀ E	C ₇₀ E
Tasso di crescita (% \pm RSD; 56 giorni)	-4,94 \pm 1,91 a	-28,48 \pm 0,22 ab	NA

Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore p , $\alpha = 0,05$); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

3.3.2.2 Stato di Salute dei Lombrichi durante l'Esperimento

Tabella 7: Risposta riproduttiva dei lombrichi al test di tossicit .

Parameters		TRATTAMENTI		
		ctrlE	S ₇₀ E	C ₇₀ E
Numero di cocooni/replica (\pm SD; 56 giorni)	di	29,33 \pm 6,51 a	28,00 \pm 4,0 0 a	3,33 \pm 5,77 b
Numero di giovani/replica (\pm SD; 56 giorni)	di	65,67 \pm 11,72 b	59,33 \pm 15, 31 ab	NA
Fertilit� (% \pm RSD;56 giorni)		2,26 \pm 0,09 b	2,10 \pm 0,14 ab	NA

Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore p , $\alpha = 0,05$); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

Tabella 8: Osservazioni fatte sui lombrichi ad ogni tempo di campionamento nel test di tossicità.

Tempo (giorni)	TRATTAMENTI								
	ctrE			S ₇₀ E			C ₇₀ E		
	Ub	Ma	M	Ub	Ma	M	Ub	Ma	M
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	✓	-	-
14	-	-	-	-	-	-	✓	✓	4,33%±1,73
21	-	-	-	-	-	-	✓	✓	60,33%±0,25
28	-	-	-	-	-	-	✓	✓	100%

✓ presenza

- assenza

Ub: Comportamenti unusuali (*Unusual behaviour*) come bassa reattività a stimoli esterni, minore attività scavatoria, movimenti compulsivi.

Ma: Anomalie morfologiche (*Morphological anomalies*) come lesioni, miniaturizzazione, colorazioni anormali.

M: Variazione della percentuale di mortalità comparata al numero iniziale di lombrichi (*Mortality*) (%±RSD).

Lo stato di salute generale dei lombrichi peggiora chiaramente nella prova con Chlorpyrifos, dove l'attività riproduttiva è nulla e si osservano numerosi segni di sofferenza. Un comportamento anormale è stato osservato nei lombrichi trattati con Chlorpyrifos già dal giorno 7 fino alla fine dell'esperimento. Allo stesso modo, per quanto riguarda le anomalie morfologiche che sono iniziate a comparire dal giorno 14. Una mortalità del 4% è stata registrata al giorno 14 ed è progressivamente aumentata fino al giorno 28 dove si è raggiunto il 100%. Al contrario, la prova con lo Spinosad ha mostrato una tendenza simile al controllo, con l'assenza di mortalità e di segni di sofferenza. Come mostrato in tabella 8, l'andamento della riproduzione dei lombrichi sottoposti allo Spinosad è stato comparabile con quello registrato nel controllo, indicando un basso effetto tossico di questo insetticida.

3.3.2.3 Effetto degli Insetticidi sul DNA delle Cellule - Comet assay

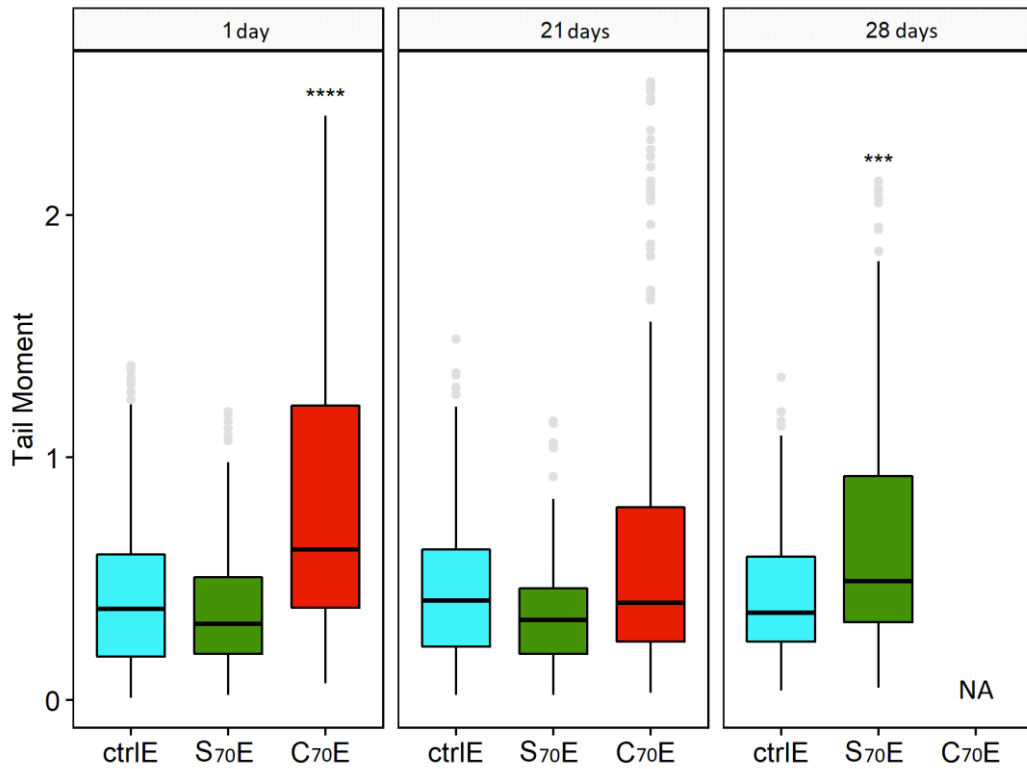


Figura 3-8: Momento della coda delle comete prodotte da Comet Assay (Tail Moment) nei celomociti di *Eisenia foetida* a 1, 21, 28 giorni dall'inizio delle prove.

Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore p , $\alpha = 0,05$); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

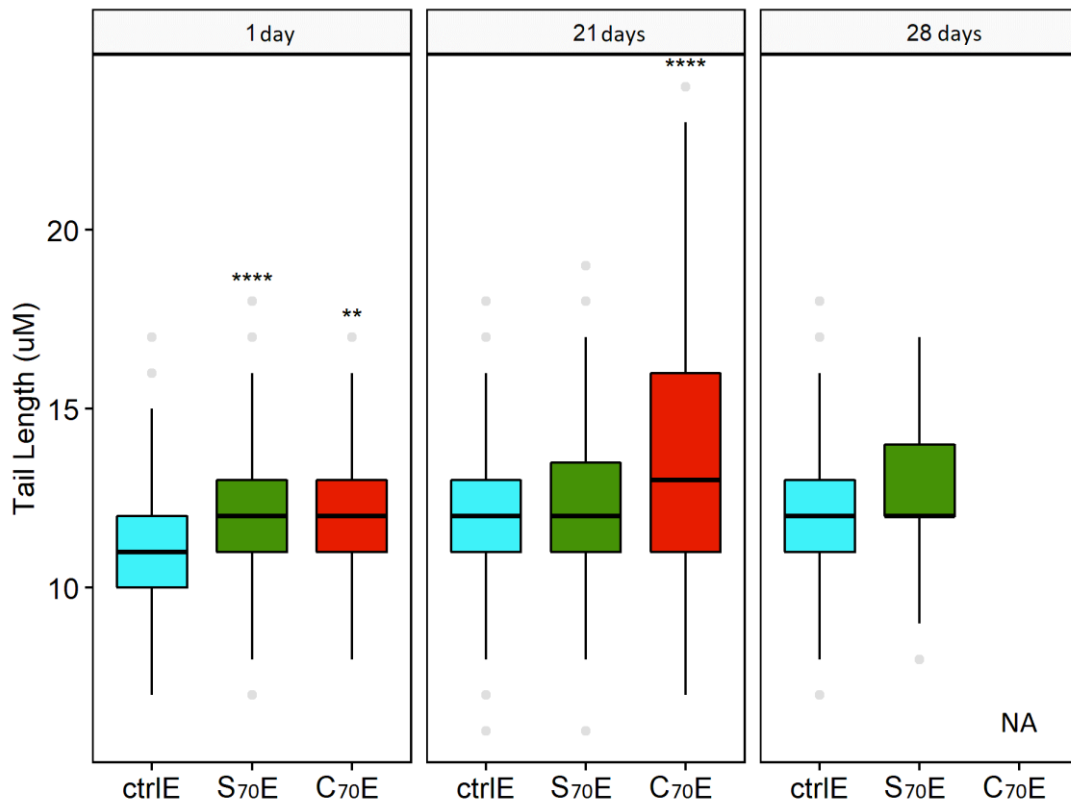


Figura 3-9: Lunghezza della coda delle comete prodotte da Comet Assay (Tail Length) nei celomociti di *Eisenia foetida* a 1, 21, 28 giorni dall'inizio delle prove.

Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore p, $\alpha = 0,05$); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

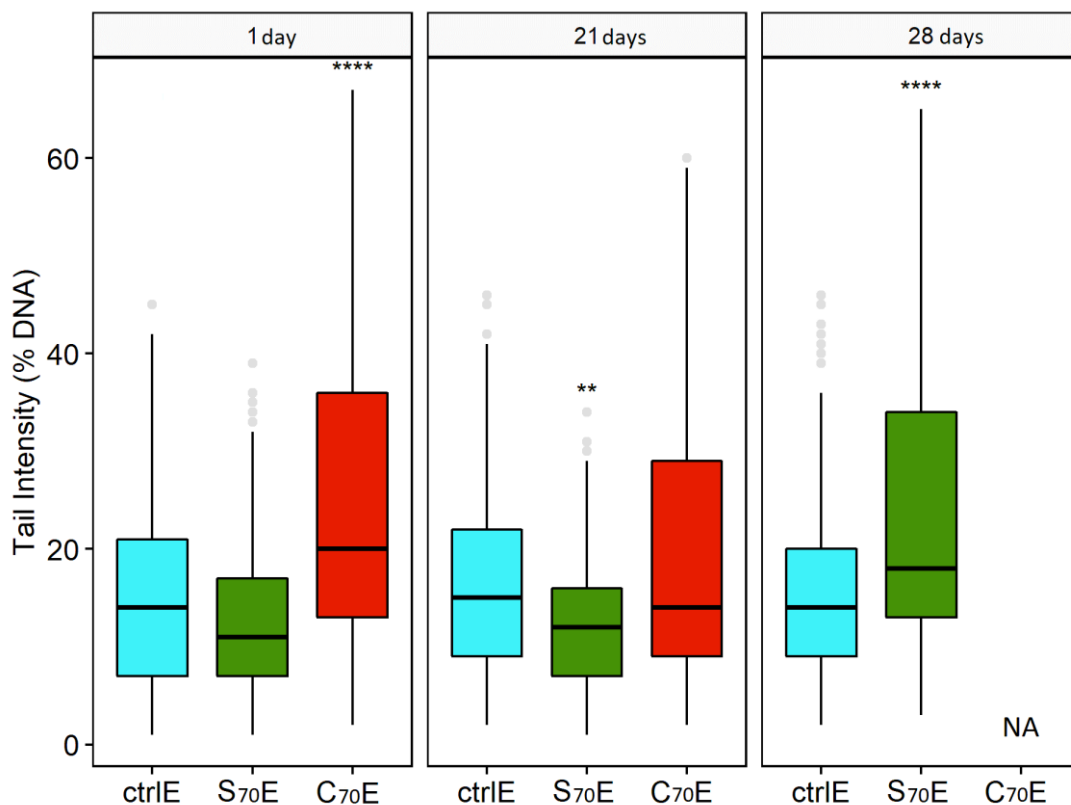


Figura 3-10: Intensità della coda delle comete prodotte da Comet Assay (Tail Intensity) nei celomociti di *Eisenia foetida* a 1, 21, 28 giorni dall'inizio delle prove.

Comparazioni multiple di Dunn Kruskal - Wallis (adottando la correzione di Bonferroni del valore $p, \alpha = 0,05$); i diversi trattamenti risultano significativamente differenti se riportano lettere diverse.

Le figure 3-8, 3-9, 3-10 mostrano rispettivamente gli indici: Tail moment (TM), Tail length (TL) e Tail intensity (TI) misurati nel test di tossicità.

Le analisi dell'andamento del controllo nel tempo mostrano, per tutti e tre i parametri, una variabilità significativa a 7 e 14 giorni se comparata con il giorno 1 dall'inizio dell'esperimento. Questa alterazione potrebbe essere dovuta a problemi metodologici e pertanto i risultati al giorno 7 e 14 sono stati omessi.

Rispetto al Chlorpyrifos, si evidenzia un significativo incremento nel danneggiamento del DNA già dopo un giorno dall'esposizione. A 21 giorni, è confermato un incremento in tutti e tre gli indici di danneggiamento del DNA. Nonostante questo, delle differenze significative nelle distribuzioni sono state registrate solo per il parametro TL. Tale indice è conosciuto per essere un miglior indicatore per la genotossicità a bassi livelli di danneggiamento del DNA (Collins, 2004; Kumaravel, et. al., 2009).

Nel complesso, questi risultati indicano un meccanismo adattativo o una selezione di celomociti resistenti che conducono ad un basso livello di tossicità in presenza di Chlorpyrifos dopo 21 giorni, mentre a 28 giorni si è rivelato l'effetto tossico con un decremento della vitalità dei lombrichi.

I dati dello studio sono in linea con il limitato numero di articoli scientifici esistenti, che presentano una descrizione di esperienze simili, volte ad accertare effetti genotossici del Chlorpyrifos sui lombrichi (Casabè, et. al., 2007; Piola, et. al., 2009; Curieses, et. al., 2018). Tali studi hanno messo in evidenza un significativo incremento dei danni al DNA nei celomociti del lombrico del genere *Eisenia* trattati con l'insetticida Chlorpyrifos.

Differentemente dal Chlorpyrifos, lo Spinosad sembra avere minore impatto sui celomociti. Infatti, gli indici di danno al DNA sono significativi solo a 28 giorni dopo l'esposizione.

Questi dati indicano una minore e bassa tossicità acuta dello Spinosad nei riguardi della vitalità degli organismi e degli effetti sub-letali di genotossicità a livello dei celomociti.

Capitolo 4 CONCLUSIONI

In questo studio si sono voluti valutare gli effetti dell'esposizione a dosaggi sub-letali del lombrico *Eisenia foetida* a due insetticidi. La scelta è stata operata allo scopo di confrontare la tossicità di un organofosforico di ampio utilizzo come il Chlorpyrifos con lo Spinosad, moderno bioinsetticida derivato dal metabolismo primario del *Saccharopolyspora spinosa* quale possibile alternativa naturale verso la progressiva sostituzione degli insetticidi sintetici.

Le osservazioni macroscopiche sul comportamento dei lombrichi e il loro stato di salute osservate durante il test avoidance e quello di riproduzione sono in linea con quello che abbiamo osservato nel test di tossicità. Il Chlorpyrifos determina sostanziale impoverimento morfologico ed anomalie funzionali ai lombrichi, che si evidenziano sin dai primi tempi di prelievo, mentre nelle prove con Spinosad gli effetti avversi sono stati blandi e non significativamente diversi rispetto ai trend del controllo negativo. Il Chlorpyrifos compromette l'integrità del DNA sin dai primi giorni e il trend degenerativo si conferma durante la prova e culmina con la morte degli individui al termine dei 28 giorni.

L'effetto genotossico dello Spinosad è meno impattante, tanto che è significativamente rilevante solo al ventottesimo giorno dall'esposizione.

Questo studio sottolinea come l'impiego di tecniche avanzate quali il Comet Assay e l'applicazione di test sul comportamento e l'attività dei lombrichi siano buoni protocolli per valutare danni precoci sugli organismi *non-target* del suolo.

La presenza dei residui di fitofarmaci nel suolo è ormai sotto l'attenzione pubblica visto che tali sostanze esplicano la loro attività tossica in maniera estesa con conseguenti danni sia per l'uomo che per gli organismi *non-target* (Vryzas, 2018, Singh, et. al., 2017; Brühl, et. al., 2019). Nonostante la regolamentazione che riguarda l'approvazione di pesticidi sia molto articolata, mancano *endpoint* per il *risk assessment* di tipo sub-letale che possano essere utilizzati efficacemente.

Come prospettiva futura sarebbe interessante l'applicazione di tecniche innovative che possano offrire una maggiore individuazione dei danni all'ecosistema negli stadi più precoci valutando la complessa interazione tra degradazione delle sostanze studiate ed effetti su specie *non-target*.

BIBLIOGRAFIA

Molinari, G. P., Magistrati, P., 2008. Agrofarmaci: generalità, classificazione e modo d'azione. In: Agrofarmaci - Conoscenze per un Uso Sostenibile. A cura di: Gennari, M., Trevisan, M., Gruppo italiano di Ricerca Fitofarmaci e Ambiente. Oasi Albero Perdisa. Gruppo Perdisa Editore, Bologna, capitolo 1, pp. 3-40.

Belli, G., 2012. La Protezione delle Piante dalle Malattie. Capitolo 8. In: Elementi di Patologia Vegetale. A cura di Belli, G., Piccin, Padova, pp. 177-214.

FAO, 2009. Global Agriculture towards 2050. How to Feed the World. High Level Expert Forum, pp 1-4.

Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J., Hollier, C., 2012. Crop Losses Due to Diseases and Their Implications for Global Food Production Losses and Food Security. Springer. Food Security, pp. 1-19.

Delgado, L., Schuster, M., Torero, M., 2020. Quantity and Quality Food Losses Across the Value Chain: A Comparative Analysis. Elsevier. Food Policy, pp. 1-16.

Carvalho, P. F., 2017. Pesticides, Environment, and Food Safety. Association of Applied Biologist. Food and Energy Security, 6(2): 48-60.

Utzeri, G., Verissimo, P. M. L., Ribeiro, C. A., Valente, M. J. A., 2021. Pesticides and Their Environment and Health Impact: An Approach to Remediation Using Hydrogels. In: Optical and Molecular Physics: Theoretical Principles and Experimental Methods. A cura di: Estes, M. A., Ribeiro, F. C. A., George, C. S., Abraham, R. A., Haghi, K. A., CRC Press. Taylor & Francis Group, capitolo 18, pp. 447-449.

Jondini, F., 2013. Legislazione sui Prodotti Fitosanitari. In: *Biopesticidi di Origine Naturale*. A cura di: Caboni, P., Angioni, A., Gruppo di Ricerca Italiano Fitofarmaci e Ambiente. Aracne Editrice I^a Edizione, Capitolo 3, pp. 125-194.

Bufo, A S., Scrano, L., Lelario, F., Braschi I., 2013. Metaboliti Secondari. In: *Biopesticidi di Origine Naturale*. A cura di: Caboni, P., Angioni, A., Gruppo di Ricerca Italiano Fitofarmaci e Ambiente. Aracne Editrice I^a Edizione, Capitolo 2, pp. 43-124.

Phillips, A. W. M., 2020. Agrochemical Industry Development, Trends in R&D and the Impact of Regulation. Wiley Online Library, *Pesticide Management Science*; 76, pp. 3348-336.

Gomes, O. H., Menezes, C. M. J., Da Costa, M. G. J., Coutinho, M. D. H., Teixeira, P. N. R., Nascimento, F. R., 2020. A Socio-Enviromental Perspective on Pesticide Use and Food Production. Elsevier. *Ecotoxicology and Enviromental Safety* 197, pp. 1-5.

Altomare, C., 2020. Stato dell'arte e Prospettive nell'Impiego di Metaboliti Microbici in Agricoltura. In: *I Microrganismi Utili in Agricoltura*. A cura di: Sellitto, M. V., Edagricole I^a Edizione, Capitolo 12, pp. 215-242.

Villaverde, J. J., Moràn, S. B., Sandìn, E. P., Goti, L. G., Prados, A. L. J., 2013. Biopesticides in the Framework of the European Pesticide Regulation (EC) N. 1107/2009. *Pest Management Science*, pp. 2-5.

Hawkins, J., N., Bass, C., Dixon, A., Neve, P., 2018. The Evolutionary Origins of Pesticide Resistance. Cambridge Philosophical Society. *Biological reviews*, pp. 1-21.

Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L., Stewart, A., 2012. Have Biopesticides come of Age? Elsevier. *Trends in Biotechnology*, vol. 30, n°5, pp. 1-9.

Fenibo, O. E., Ijoma, N. G., Matambo, T., 2020. Biopesticides in Sustainable Agriculture: Current Status and Future Prospects. Preprints, pp. 1-47.

Capasso, F., De Pasquale, R., Grandolini, G., 2011. Piante che Curano Altre Piante. In:

Farmacognosia. Botanica, chimica e farmacologia delle piante medicinali. II Edizione. Springer. Capitolo M4, pp. 353-360.

Molinari, 2013. Gli Insetticidi Naturali-Aspetti Tecnico Applicativi. In: Biopesticidi di Origine Naturale. A cura di: Caboni, P., Angioni, A., Gruppo di Ricerca Italiano Fitofarmaci e Ambiente. Aracne Editrice I^a Edizione, Capitolo 4, pp. 195-216.

Hazra, K. D., Purkait, A., 2019. Role of Pesticide Formulations for Sustainable crop Protection and Environment Management: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*; 8(2): 686-693.

Sfulcini, V., Gualco, A., 2008. Formulazione degli Agrofarmaci. In: Agrofarmaci - Conoscenze per un Uso Sostenibile. A cura di: Gennari, M., Trevisan, M., Gruppo italiano di Ricerca Fitofarmaci e Ambiente. Oasi Albero Perdisa. Gruppo Perdisa Editore, Bologna, capitolo 2, pp. 41-61.

Stephenson, R. G., Ferris, G. I., Holland, T. P., Nordbeg, M., 2006. Glossary of Terms Relating to Pesticides (IUPAC Recommendations 2006). IUPAC. *Pure Applied Chemistry*, Vol. 78, n°11, pp. 2075-2154.

Ferrari, M., Marcon, E., Menta, A., 2006. Fitoiatria. In: *Principi di Patologia Vegetale, Entomologia Agraria e Difesa delle Colture*. A cura di: Ferrari, M., Edagricole, capitolo 4, pp. 116-202.

Beck, B., Steurbaut, W., Spanoghe, P., 2012. How to Define Green Adjuvants. *Society of Chemical Industry. Pesticide Management Science*, pp. 1-4.

Ryckaert, B., Spanoghe, P., Haesaert, G., Heremans, B., Isebaert, S., Sterurbaut, W., 2007. Quantitative Determination of the Influence of Adjuvants on Foliar Fungicide Residues. Elsevier. *Crop Protection*, vol. 26, pp. 1589-1594.

E. Monaci, L. Coppola, C. Casucci, C. Viscetti, 2011. Losses and dissipation of penconazole in vineyard soil as affected by mid-row management system". *J. Environ. Sci. Health, Part B*, 46 (6): 461-468.

Krogh, A. K., Halling-Sørensen, B., Mogensen, B. B., Vejrup, V. K., 2003. Environmental Properties and Effects of Nonionic Surfactant Adjuvants in Pesticides: A Review. Elsevier. Chemosphere, vol. 50, pp. 871-901.

Cox, C., Sorgan, M., 2006. Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: Implications for Human and Environmental Health. Environmental Health Perspectives, vol. 114, n°12, pp-1-5.

Mullin, C., Fine, J., Reynolds, D. R., Frazier, T. M., 2016. Toxicological Risks of Agrochemical Spray Adjuvants: Organosilicone Surfactants May Not Be Safe. Frontiers in Public Health, vol. 4, articolo 92, pp. 1-8.

EU, Parliament & Council, 2009. Regulation Concerning the Placing of Plant Protection Products on the Market and Repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC, pp. 1-70.

Panizzi, S., Suci, A. N., Trevisan, M., 2016. Combined Ecotoxicological Risk Assessment in the Frame of European Authorization of Pesticides. Elsevier. Science of the Total Environment, pp. 1-11.

Robinson, C., Portier, J. C., Čavoski, A., Mesnage, R., Roger, A. Clausen, P., Whaley, P., Muilerman, H., Lyssimachou, A., 2020. Achieving a High Level of Protection from Pesticides in Europe: Problems with the Current Risk Assessment Procedure and Solutions. European Journal of Risk Regulation, pp. 1-31.

Mesnage, R. Antoniou, N. M., 2018. Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. Frontiers in Public Health, pp. 1-8.

World Health Organization, 2019. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. Geneva: World Health Organization; 2020.

United Nations, 2019. Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). 8th revised edition.

EU, Parliament & Council, 2008. Regulation (EC) n° 1272/2008 on Classification, Labelling and Packaging of Substances and Mixtures, Amending and Repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) n° 1907/2006.

Carletti, L., Massantini, R., Cecchini, M., 2015. Fitofarmaci in Agricoltura: Caso Studio della Filiera della Patata del Viterbese. Università degli Studi della Tuscia. Dipartimento di Scienze e Tecnologie per l'Agricoltura, le Foreste, la Natura e l'Energia. Tesi di Dottorato di Ricerca in Ingegneria dei Sistemi Agrarie Forestali - XXVII Ciclo, pp. 1-100.

Basaglia, M., Sellitto, M. V., Favaro, L., Casella, S., 2020. Introduzione ai Microrganismi Benefici del Suolo. In: I Microrganismi Utili in Agricoltura. A cura di: Sellitto, M. V., Edagricole I^a Edizione, Capitolo 1, pp. 1-22.

Caboni, P., 2013. Pesticidi di Origine Naturale. In: Biopesticidi di Origine Naturale. A cura di: Caboni, P., Angioni, A., Gruppo di Ricerca Italiano Fitofarmaci e Ambiente. Aracne Editrice I^a Edizione, Capitolo 1, pp. 17-41.

Arianna De Bernardi, Enrica Marini, Sonia Silvestri, Cristiano Casucci, Francesca Comitini, Luca Tiano, Maurizio Ciani, Costantino Vischetti (2019). Effect of synthetic and natural pesticides on the soil microbial biomass and on earthworm *Eisenia foetida*. In: Advances in Risk Assessment and Management. p. 148, FIDENZA: Mattioli 1885, ISBN: 978-88-6261-717-8, Piacenza, Italy., September 3-5, 2019.

Miglani, R., Bisht, S. S., 2019. World of Earthworms with Pesticides and Insecticides. *Interdisciplinary Toxicology* 12 (2), pp. 71-82.

Carriger, J. F., Rand, G. M., Gardinali, P. R., Perry, W. B., Tompkins, M. S., & Fernandez, A. M. (2006). Pesticides of potential ecological concern in sediment from South Florida canals: an ecological risk prioritization for aquatic arthropods. *Soil & Sediment Contamination*, 15(1), 21-45.

Mahmood, I., Imadi, R. S., Shazadi, K., Gul, A., Hakeem, R. K., 2016. Effects of Pesticides on Environment. Springer, pp. 1-17.

Aktar, W. Md., Sengupta, D., Chowdhury, A., 2009. Impact of Pesticide Use in Agriculture: Their Benefits and Hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, vol. 2(1), pp. 1-12.

Gupta, C. R., 2006. Classification and Uses of Organophosphate and Carbamate. In: *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. A cura di: Gupta, C. R., Elsevier, sezione 1, capitolo 2, pp. 5-24.

Costa, G. L., 2006. Current Issues in Organophosphate Toxicology. Elsevier. *Clinica Chimica Acta* 366, pp. 1-13.

Dedek, W., Lohs, Kh., Fischer, W. G., Schmidt, R., 1976. Alkylation of Guanine in Mice in Vivo by Organophosphorous Insecticides. I. Trichlorphone and Butonate. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 6, 101-110.

Axelrad, C. J., Howard, V. C., McLean, G. W., 2002. Interactions between pesticides and components of pesticide formulations in an in vitro neurotoxicity test. Elsevier. *Toxicology* 173, 259-268.

Sultatos, G. L., 1994. Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides. Taylor & Francis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues*, 43:3, 271-289.

Jokanović, M., 2001. Biotransformation of Organophosphorus Compounds. Elsevier. *Toxicology* 166, 139-160.

Wooder, F. M., Wright, S. A., 1981. Alkylation of DNA by Organophosphorus Pesticides. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 49, suppl. V, 51-55.

Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2018. The Link of Organophosphorus Pesticides with Neurodegenerative and Neurodevelopmental Diseases Based on Evidence and Mechanisms. Elsevier. *Toxicology*. 1-36.

Tsiaoussis, J., Hatzidaki, E., Docea, O. A., Nikolouzakis, K. T., Petrakis, D., Burykina, T., Mamoulakis, C., Makrigiannakis, A., Tsatsakis, A., 2018. Molecular and Clinical Aspects of Embryotoxicity induced by Acetylcholinesterase Inhibitors. Elsevier. Toxicology, 1-26.

Thimchalk, C., 2006. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Organophosphorus and Carbamate Pesticides. A cura di: Gupta, C. R., Elsevier, sezione 2, capitolo 9, pp. 103-126.

Eddleston, M., Street, M. J., Self, I., Thompson, A., King, T., Williams, N., Naredo, G., Dissanayake, K., Yu, L., Worek, F., John, H., Smith, S., Thiermann, H., Harris, B. J., Clutton, E. R., 2012. A Role for Solvents in Toxicity of Agricultural Organophosphorus Pesticides. Elsevier. Toxicology 294, pp. 94-103.

Talesa, N. V., Antognelli, C., Mezzasoma, L., 2012. Ruolo delle Colinesterasi nella Resistenza agli Insetticidi. In: Nuove Strategie di Difesa delle Piante e Resistenza di Insetti ed Acari agli Agrofarmaci. Tavole Rotonde sui Maggiori Problemi Riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia. Atti Accademia Nazionale Italiana Entomologia, Rendiconto Anno LX, pp. 215-220.

Pollini, A., 2006. Parte Generale - Sistema Nervoso. In: Manuale di Entomologia Applicata. A cura di: Pollini, A., Il Sole 24 Ore, Edagricole, pp.19-22.

Olson, S., 2015. An Analysis of the Biopesticide Market Now and Where it is Going. Research Information. Outlooks on Pest Management, vol. 26, pp. 203-206(4).

Denholm, I., 2012. Recent Advances in Understanding and Combating Insecticide Resistance. In: Nuove Strategie di Difesa delle Piante e Resistenza di Insetti ed Acari agli Agrofarmaci. Tavole Rotonde sui Maggiori Problemi Riguardanti l'Entomologia Agraria in Italia. Atti Accademia Nazionale Italiana Entomologia, Rendiconto Anno LX, pp. 193-195.

Hanley, T. R., Breslin, J. W., Quast, F. J., 2002. Evaluation of Spinosad in a Two-Generation Dietary Reproduction Study Using Sprague-Dawley Rats. Toxicological Sciences 67(1), pp.144-152.

Whitney, K. D., Seidler, F. J., Slotkin, T. A., 1995. Developmental Neurotoxicity of Chlorpyrifos: Cellular Mechanisms. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol. 134, Issue 1, pp. 53-62.

Zhou, S., Duan, C. Fu, H., Chen, Y., Wang, X. Yu, Z., 2007. Toxicity Assessment for Chlorpyrifos-Contaminated Soil With Three Different Earthworm Test Methods. *Journal of Environmental Sciences* 19, pp. 1-5.

Hou, K., Yang, Y., Zhu, L., Wu, R., Juhasz, A., Wang, Ju., Wang Ji., Zhongkun, D., Bing, L., Lunsheng, Z., 2021. Toxicity Evaluation of Chlorpyrifos Metabolite 3,5,6-trichloro-2-pyridinol to *Eisenia fetida* in Different Soils. *Research Square*, pp. 1-19.

Testai, E., Buratti, M. F., Di Consiglio, E., 2010. Chlorpyrifos. In: *Haye's Handbook of Pesticide Toxicology*. A cura di: Krieger, R., Elsevier. Academic Press. 3rd edition, pp. 1505-1526.

Varghese, M. E., Aswani, P., Jisha, M. S., 2021. Strategies in Microbial Degradation Enhancement of Chlorpyrifos - A Review Based on the Primary Approaches in Soil Bioremediation. *Taylor & Francis. Biocatalysis and Biotransformation*.

Dutta, M., Sardar, D., Pal, R., Kole, R. K., 2010. Effect of Chlorpyrifos on Microbial Biomass and Activities in Tropical Clay Loam Soil. *Environmental Monitoring and Assessment* 160 (1-4), pp. 385-391.

Costa, E., Gambardella, C., Piazza, V., Greco, G., Lavorano, S., Beltrandi, M., Bongiovanni, E., Gnone, G., Faimali, M., Garaventa, F., 2015. Effect of Neurotoxic Compounds on Ephyrae of *Aurelia aurita* Jellyfish. *Hydrobiologia* 759(1), pp. 75-84.

Bassey, Y. I., Effiong E. B., Archibong, U. D., Ita, W. I., 2015. Germination and Root Nodule Formation of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in Ridomil and Chlorpyrifos Treated Soil. *American Journal of Environmental Protection* 4(1), pp. 17-22.

Monaci, E., Coppola, L., Casucci, C., Vischetti, C., 2011. Losses and Dissipation of Penconazole in Vineyard Soil as Affected by Mid-Row Management System. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, Vol. 46, pp. 461-468.

Ali, D., Nagpure, N. S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B. and Lakra, W. S., 2009. Assessment of Genotoxic and Mutagenic Effects of Chlorpyrifos in Freshwater Fish *Channa punctatus* (Bloch) Using Micronucleus Assay and Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology* 47(3), pp. 650-656.

Bonifacio, A. F., Ballesteros, M. L., Bonansea, R. I., Filippi, I., Ame, M. V., Hued, A. C., 2017. Environmental Relevant Concentrations of a Chlorpyrifos Commercial Formulation Affect Two Neotropical Fish Species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere* 188, pp. 486-493.

Orts, A., Cabrera, S., Gómez, I., Parrado, J., Rodriguez-Morgado, B., Tejada, M., 2017. Use of Okara in the Bioremediation of Chlorpyrifos in Soil: Effects on Soil Biochemical Properties. *Applied Soil Ecology* 121, pp. 172-176.

Garcia-Gomez, C., Babin, M., Garcia, S., Almendros, P., Perez, R.A., Fernandez, M.D., 2019. Joint Effects of Zinc Oxide Nanoparticles and Chlorpyrifos on the Reproduction and Cellular Stress Responses of the Earthworm *Eisenia andrei*. *Science of The Total Environment* 688, pp. 199-207.

Sandal, S., Yilmaz, B., 2011. Genotoxic Effects of Chlorpyrifos, Cypermethrin, Endosulfan and 2,4-D on Human Peripheral Lymphocytes Cultured from Smokers and Nonsmokers. *Environmental Toxicology* 26(5), pp. 433-442.

Wang, J.H., Zhu, L.S., Liu, W., Wang, J., Xie, H., 2012. Biochemical Responses of Earthworm (*Eisenia foetida*) to the pesticides Chlorpyrifos and Fenvalerate. *Toxicology Mechanisms and Methods* 22(3), pp. 236-241.

Ojha, A., Yaduvanshi, S. K., Pant, S. C., Lomash, V., Srivastava, N., 2013. Evaluation of DNA Damage and Cytotoxicity Induced by Three Commonly Used Organophosphate

Pesticides Individually and in Mixture, in Rat Tissues. *Environmental Toxicology* 28(10), pp. 543-552.

Zhu, L., Li, B., Wu, R. L., Li, W. X., Wang, J., Wang, J. H., Du, Z. K., Juhasz, A., Zhu, L. S., 2020. Acute toxicity, Oxidative Stress and DNA Damage of Chlorpyrifos to Earthworms (*Eisenia fetida*): The Difference Between Artificial and Natural Soils. *Chemosphere*.

Cavoski, I., Miano, T., 2013. I Biopesticidi nel Suolo. In: *Biopesticidi di Origine Naturale*. A cura di: Caboni, P., Angioni, A., Gruppo di Ricerca Italiano Fitofarmaci e Ambiente. Aracne Editrice I^a Edizione, Capitolo 7, pp. 285-361.

Cáceres, T., He, W., Naidu, R., Megharaj, M., 2007. Toxicity of Chlorpyrifos and TCP Alone and in Combination to *Daphnia carinata*: The Influence of microbial degradation in Natural Water. Elsevier. *Water Research*, Vol. 41, Issue 19, pp. 4497-4503.

Wang, J., Zhu, L., Xie, H., Shao, B., Hou, X., 2014. The Enzyme Toxicity and Genotoxicity of Chlorpyrifos and Its Toxic Metabolite TCP to Zebrafish *Danio rerio*. Springer. *Ecotoxicology* 23, pp. 1858-1869.

Bose, S., Kumar, S. P., Vo, DN., 2021. A Review on the Microbial Degradation of Chlorpyrifos and its Metabolite TCP. *Chemosphere*,

Baskaran S., Kookana R. S., Naidu R., 2003. Contrasting Behaviour of Chlorpyrifos and its Primary Metabolite, TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), with Depth in Soil Profiles. Csiro publishing. *Soil Research* 41, pp. 749-760.

Jia, W., Shen, D., Yu, K., Zhong, J., Li, Z., Ye, Q., Jiang, J., Wang, W., 2021. Reducing the Environmental Risk of Chlorpyrifos Application through Appropriate Agricultural Management: Evidence from Carbon-14 Tracking. American Chemical Society Publications. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 69, 26, pp. 7324-7333.

EFSA, 2019. Updated Statement on the Available Outcomes of the Human Health Assessment in the Context of the Pesticides Peer-Review of the Active Substance Chlorpyrifos-methyl. EFSA Statement, pp. 1-21.

EU, 2020 [1]. Commission Regulation (EU) 2020/1085 of 23 July 2020 amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as regards maximum residue levels for chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl in or on certain products. Official Journal of the European Union, pp. 1-2.

EU, 2020 [2]. Corrigendum to Commission Regulation (EU) 2020/1085 of 23 July 2020 amending Annexes II and V to Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council as Regards Maximum Residue Levels for Chlorpyrifos and Chlorpyrifos-methyl in or on certain products. Official Journal of the European Union, pp. 1-12.

Galon, L., Bragagnolo, L., Korf, P. E., Dos Santos, B. J., Barroso, M. G., Ribeiro, V. H. V., 2021. Mobility and Environmental Monitoring of Pesticides in the Atmosphere - a review. Springer Nature. Environmental Science and Pollution Research, 1-20.

EPA, 2021. Tolerance Revocations: Chlorpyrifos. Final Rule. (86 FR 48315) (FRL-5993-04-OSCPP) EPA-HQ-OPP-2021-0523.

Tudi, M., Ruan, D.H., Wang, L., Lyu, J., Sadler, R., Connell, D., Chu, C., Phung, T. D., 2021. Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment. MDPI. International Journal of Environmental Research and Public Health, 18, 1112.

Tang, M. H. F., Lenzen, M., McBratney, A., Maggi, F., 2021. Risk of Pesticide Pollution at the Global Scale. Nature Geoscience vol. 14, pp. 206-210.

Sannino, F., Braschi, I., 2008. Assorbimento e Desorbimento degli Agrofarmaci nel Suolo. In: Agrofarmaci - Conoscenze per un Uso Sostenibile. A cura di: Gennari, M., Trevisan, M., Gruppo italiano di Ricerca Fitofarmaci e Ambiente. Oasi Albero Perdisa. Gruppo Perdisa Editore, Bologna, pp. 171-206.

Braschi, I., Gessa, E. C., 2008. Degradazione di Agrofarmaci nel Suolo. In: Agrofarmaci - Conoscenze per un Uso Sostenibile. A cura di: Gennari, M., Trevisan, M., Gruppo italiano di Ricerca Fitofarmaci e Ambiente. Oasi Albero Perdisa. Gruppo Perdisa Editore, Bologna, pp. 207-244.

Vischetti, C., 2008. Trasporto di Agrofarmaci nel Suolo. In: Agrofarmaci - Conoscenze per un Uso Sostenibile. A cura di: Gennari, M., Trevisan, M., Gruppo italiano di Ricerca Fitofarmaci e Ambiente. Oasi Albero Perdisa. Gruppo Perdisa Editore, Bologna, pp. 245-267.

Ferrari, F., Trevisan, M., Capri, E., 2008. Dissipazione di Agrofarmaci nell'Aria. In: Agrofarmaci - Conoscenze per un Uso Sostenibile. A cura di: Gennari, M., Trevisan, M., Gruppo italiano di Ricerca Fitofarmaci e Ambiente. Oasi Albero Perdisa. Gruppo Perdisa Editore, Bologna, pp. 299-318.

Mansour, M., 2018. Fate and Prediction of Environmental Chemicals in Soils, Plants, and Aquatic Systems. CRC Revivals. CRC Press. Taylor & Francis Group, pp. ---

Beulke, S., Brown, D. C., 2001. Evaluation of Methods to Derive Pesticide Degradation Parameters for Regulatory Modelling. Springer. Biology and Fertility of Soils 33, pp. 558-564.

Merli, A, Capri, E., 2008. Ecotossicologia: Cenni, Effetti, Misure e Indicatori. A cura di: Gennari, M., Trevisan, M., Gruppo italiano di Ricerca Fitofarmaci e Ambiente. Oasi Albero Perdisa. Gruppo Perdisa Editore, Bologna, pp. 459-484.

Sekulić, J., Stojanović, M., Trakić, T., Popović, F., Tsekova, R., 2020. Effects of the Modern Biorational Insecticide Spinosad on the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Annelida: Clitellata). Acta Zoologica Bulgarica, supplement 15, pp. 71-77.

Schaefer, M., Behavioural Endpoints in Earthworm Ecotoxicology. Evaluation of Different Test Systems in Soil Toxicity Assessment, Journal Soil & Sediments 3 (2), pp. 79-84

Mincarelli, L, T., L, Craft, J., Marcheggiani, F., Vischetti, C., 2019. Evaluation of Gene Expression of Different Molecular Biomarkers of Stress Response ad an Effect of Copper Exposure on the Earthworm *Eisenia andrei*. Ecotoxicology 28, pp. 938-948.

Mincarelli, L., Vischetti, C., Craft, J., Tiano, L., 2016. DNA damage in different *Eisenia andrei* coelomocytes sub-populations after in vitro exposure to hydrogen peroxide. *SpringerPlus* 5:302.

Wang, Y., Lai, A., Latino, D., Fenner, K., Helbing, E., D., 2018. Evaluating the Environmental Parameters that Determine Aerobic Biodegradation Half-Lives of Pesticides in Soil with a Multivariable Approach. *Elsevier. Chemosphere*, Vol. 209, pp. 430-438.

Aronson, D., Boethling, R. S., Howard, P. H., Stiteler, W., 2006. Estimating Biodegradation Half-Lives for Use in Chemical Screening. *Chemosphere* 63, pp. 1953-1960.

Boethling, R. S., Fenner, K., Howard, P. H., Klecka, G., Madsen, T., Snape, J. R., Whelan, M.J., 2009. Environmental Persistence of Organic Pollutants: Guidance for Development and Review of POP Risk Profiles. *Integrate Environmental Assessment Management* 5, pp. 539-556.

Fenner, K., Lanz, V. A., Scheringer, M., Borsuk, M. E., 2007. Relating Atrazine Degradation Rate in Soil to Environmental Conditions: Implications for Global Fate Modelling. *Environmental Science Technology*, Vol. 41, pp. 2840- 2846.

Mclachlan, M. S., Zou, H., Guin, T., 2016. Using Benchmarking to Strengthen the Assessment of Persistence. *Environmental Science Technology*, Vol. 51, pp. 4-11.

FOCUS EU, 2006. Guidance Document on Estimating Persistence and Degradation Kinetics from Environmental Fate Studies on Pesticides in EU Registration. Report of the FOCUS Work Group on Degradation Kinetics, EC Document Reference Sanco/10058/2005 Version 2.0, pp. 1-434.

Elias, D., Wang, L., Jacinthe, A. P., 2018. A Meta-analysis of Pesticide Loss in Runoff Under Conventional Tillage and No-till Management. *Springer. Environmental Monitoring Assessment* 190:79, pp. 1-17.

Newcomb, C. J., Qafoku, P. N., Grate, W. J., Bailey, L. V., Yoreo, J. D., 2017. Developing a Molecular Picture of Soil Organic Matter-Mineral Interactions by Quantifying Organo-Mineral Binding. *Nature Communications*, pp. 1-8.

Carter, A. (2000). How Pesticides get Into Water-and Proposed Reduction Measures. *Pesticide Outlook*, 11(4), pp. 149–156.

Rice, P. J., McConnell, L. L., Heighton, L. P., Sadeghi, A. M., Isensee, A. R., Teasdale, J. R., Abdul-Baki, A. A., Harman-Fetcho, J. A., Hapeman, C. J. (2001). Runoff Loss of Pesticides and Soil. *Journal of Environmental Quality*, 30 (5), pp. 1808–1821.

McMahon, T. A., Halstead, N. T., Johnson, S., Raffel, T. R., Romansic, J. M., Crumrine, P. W., Rohr, J. R. (2012). Fungicide-induced Declines of Freshwater Biodiversity Modify Ecosystem Functions and Services. *Ecology Letters*, 15(7), 714–722.

Elias, D., Bernot, M. J. (2014). Effects of atrazine, Metolachlor, Carbaryl and Chlorothalonil on Benthic Microbes and their Nutrient Dynamics. *PloS one*, 9(10), pe109190.

Hayes, T. B., Stuart, A. A., Mendoza, M., Collins, A., Noriega, N., Vonk, A., Johnston, G., Liu, R., & Kpodzo, D. (2006). Characterization of Atrazine-induced Gonadal Malformations in African Clawed frogs (*Xenopus laevis*) and Comparisons with Effects of an Androgen Antagonist (Cyproterone acetate) and Exogenous Estrogen (17-beta-estradiol): Support for the Demasculinization/Feminization Hypothesis. *Environmental Health Perspectives*, 114(Suppl 1), pp. 134.

Rinsky, J. L., Hopenhayn, C., Golla, V., Browning, S., & Bush, H.M. (2012). Atrazine Exposure in Public Drinking Water and Preterm Birth. *Public Health Reports*, 127(1), 72–80.

Borpatragohain, B., Sahoo, S., Rai, A., 2019. An Overview on the Impact, Interaction and Fate of Xenobiotic-Soil Organic Matter Complexes. *International Journal of Chemical Studies*.

Pinna, V. M., Pusino, A., 2008. Fototrasformazione nell’Ambiente. In: *Agrofarmaci - Conoscenze per un Uso Sostenibile*. A cura di: Gennari, M., Trevisan, M., Gruppo italiano di

Ricerca Fitofarmaci e Ambiente. Oasi Albero Perdisa. Gruppo Perdisa Editore, Bologna, pp. 151-170.

Mamy, L., Gonod, V. L., Mougín, C., Barriuso, E., 2011. Fate of Pesticides in Soils: Toward an Integrated Approach Influential Factors. Research Gate Publications, pp. 1-27.

Anogwih, J. A., Behavioural and Ultrastructural Alterations in *Peocilia reticulata* Exposed to Spinosad and Chlorpyrifos. University of Lagos Journal of Basic Medical Sciences, Vol. 4, n° 7, pp. 1-5.

Rice, J. P., Drewes, D. C., Klubertanz, M, T, Bradbury, P. S., Coats, R. J., 1997. Acute Toxicity and Behavioral Effects of Chlorpyrifos, Permethrin, Phenol, Strychnine, and 2,4-Dinitrophenol to 30-Day-Old Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 16, n° 4, pp. 696-704.

Vischetti, C., Casucci, C., De Bernardi, A, Monaci, E., Tiano, L., Marcheggiani, F., Ciani, M., Comitini, F., Marini, E., Taskin, E., Puglisi, E., 2020. Sub-Lethal Effects of Pesticides on the DNA of Soil Organisms as Early Ecotoxicological Biomarkers. Frontiers in Microbiology, pp. 1-16.

Castillo, M. P., Torstensson, L., and Stenström, J. (2008). Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Use - A Review. Journal of Agricultural Food Chemistry, vol. 56, pp. 6206–6219.

Katagi, T. (2013). Soil Column Leaching of Pesticides. In: Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol. 221. A cura di: D. Whitacre (New York, NY: Springer).

Dënoel, M., D’Hooghe, B., Ficetola, F. G., Brasseur, C., De Pauw, E., Thomé, P. J., Kestemont, P., 2012. Using Setof Behavioral Biomarkers to Assess Short-Term Effects of Pesticide: A Study Case with Endosulfan on Frog Tadpoles. Ecotoxicology, pp. 1-11.

Spurgeon, D., Lahive, E., Robinson, A., Short, S., Kille, P., 2020. Species Sensitivity to Toxic Substances: Evolution, Ecology and Applications. *Frontiers in Environmental Science*, pp. 1-25.

OECD (2004). Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*).

OECD (2016a). Test No. 226: Predatory Mite (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) Reproduction Test in Soil.

OECD (2016b). Test No. 232: Collembolan Reproduction Test in Soil.

Gunstone, T., Cornelisse, T., Klein, K., Dubey, A., Donley, N., 2021. Pesticides and Soil Invertebrates: A Hazard Assessment. *Frontiers in Environmental Science*, pp. 1-21.

Bardgett, R. D., Van der Putten, W. H., 2014. Belowground Biodiversity and Ecosystem Functioning. *Nature* 515, 505-511.

Singh, J., Schädler, M., Demetrio, W., Brown, G. G., Eisenhauer, N., 2019. Climate Change Effects on Earthworms - A Review. *Soil Org.*, Vol 91, pp. 114-138.

Blouin, M., Hodson, M. E., Delgado, E. A., Baker, G., Brussaard, L., Butt, K. R., 2013. A Review of Earthworm Impact on Soil Function and Ecosystem Services: Earthworm Impact on Ecosystem Services. *European Journal of Soil Science*, Vol. 64, pp. 161–182.

Gaupp-Berghausen, M., Hofer, M., Rewald, B., and Zaller, J. G. 2015. Glyphosate Based Herbicides Reduce the Activity and Reproduction of Earthworms and Lead to Increased Soil Nutrient Concentrations. *Scientific Reports*, vol. 5, pp. 1-9.

Møller, P., 2005. Genotoxicity of Environmental Agents Assessed by the Alkaline Comet Assay. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, Vol. 96, Suppl. 1, pp. 1-42.

Araldi, P. R., De Melo, C. T., Mendes, B. T., De Sa Júnior, L. P., Nozima, N. H. B., Ito, T. E., De Carvalho, F. R., De Souza, B. E., Stocco D. R., 2015. Using the Comet and Micronucleus Assays for Genotoxicity Studies: A Review. Elsevier. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Vol. 72, pp. 74-82.

Stander, H. A., Le Roux, A., Otomo, V. P., 2019. Can Local Enhancement in Earthworms Affect the Outcome of the Standard Earthworm Avoidance Test? *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 103 (6), pp. 776-782.

Collins, R. A., 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*, 26 (3): 249-61.

Matsuyama, R., Ogata, K., Oota, M., 2009. Comet Assay, a New in Vivo Mutagenicity Test-Regulatory Significance and Scientific Development. Sumitomo Chemical Co., Engineering, pp. 1-10.

Pelosi, C., Joimel, S., Makowski, D., 2013. Searching for a more Sensitive Earthworm Species to be Used in Pesticide Homologation Tests - A Meta-Analysis. *Chemosphere* 90, pp. 895-900.

Van Gestel, M. A. C., 2012. Soil Ecotoxicology: State of the Art and Future Directions. *ZooKeys* 176: 275-96.

Wen, S., Liu, C., Wang, Y., Xue, Y., Wang, X., Wang, J., Xia, X., Kim, M. Y., 2021. Oxidative Stress and DNA Damage in Earthworm (*Eisenia fetida*) Induced by Triflumezopyrim Exposure. Elsevier. *Chemosphere*, 264, pp. 1-9.

Qiao, M., Chen, Y., Chun-Xia, W., Wang, Z., Zhu, Y. G., 2007. DNA Damage and Repair Process in Earthworm after in-vivo and in-vitro Exposure to Soils Irrigated by Wastewaters. Elsevier, *Environmental Pollution*, 148, pp. 141-147.

Römbke, J., Jänsch, S., Didden, W., 2005. The Use of Earthworms in Ecological Soil Classification and Assessment Concepts. Elsevier, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, pp. 249-265.

Hund-Rinke, K., Wiechering, H., 2001. Earthworm Avoidance Test for Soil Assessments. An Alternative for Acute and Reproduction Tests. Springer. *Journal of Soils and Sediments*, 1, pp. 15-20.

Garg, P., Gupta, A., Satya, S., 2006. Vermicomposting of Different Types of Waste Using *Eisenia foetida*: A Comparative Study. *Bioresource Technology*, Vol. 97, Issue 3, pp. 391-395.

Mitchell, A., 1997. Production of *Eisenia fetida* and Vermicompost from Feed-Lot Cattle Manure. Elsevier. *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 29, Issue 3-4, pp. 763-766.

Sharma, K., Garg, K. V., 2018. Comparative Analysis of Vermicompost Quality Produced from Rice Straw and Paper Waste Employing Earthworm *Eisenia fetida* (Sav.). Elsevier. *Bioresource Technology*, Vol. 250, pp. 708-715.

Aira, M, Monroy, F., Dominguez, J., 2007. *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Lumbricidae) Modifies the Structure and Physiological Capabilities of Microbial Communities Improving Carbon Mineralization During Vermicomposting of Pig Manure. *Microbial Ecology*, Vol. 54, pp. 662-671.

Srivastava, V., Squartini, A., Masi, A., Sarkar, A., Singh, P. R., 2021. Metabarcoding Analysis of the Bacterial Succession During Vermicomposting of Municipal Solid Waste Employing the Earthworm *Eisenia fetida*. Elsevier. *Science of the Total Environment*, Vol. 766.

Xu, Z., Yang, Z., Zhu, T., Shu, W., Geng, L., 2021. Ecological Improvement of Antimony and Cadmium Contaminated Soil by Earthworm *Eisenia fetida*: Soil Enzyme and Microorganism Diversity. Elsevier. *Chemosphere*, Vol. 273.

Wang, K., Pang, S., Mu, X., Qi, S., Cui, F., Wang, C., 2015. Biological Response of Earthworm, *Eisenia fetida*, to Five Neonicotinoid Insecticides. Elsevier. *Chemosphere*, Vol. 132.

Rao, V. J., Pavan, S. Y., Madhavendra, S. S., 2003. Toxic Effects of Chlorpyrifos on Morphology and Acetylcholinesterase Activity in the Earthworm, *Eisenia foetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 54, pp. 296-301.

Wang, Z., Li, C., Shao, Y, Xue, W., Wang, N., Xu, X., Zhang, Z., 2021. Antioxidant Defense System Responses, Lysosomal Membrane Stability and DNA Damage in Earthworms (*Eisenia fetida*) Exposed to Perfluorooctanoic Acid: An Integrated Biomarker Approach to Evaluating Toxicity. *Royal Society of Chemistry*, pp. 1-12.

Singh, D. A., Mahima, G. P., Sharma, S., Sakshi S., 2020. Impact of Glyphosate and Pendimethalin Herbicides on Qualitative and Quantitative Parameters Coelomocytes in Earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 8(5), pp. 1-6.

Canesi, L., Prochazkova, P., 2013. *The Invertebrate System as a Model for Investigating the Environmental Impact of Nanoparticles*. AP Publishing.

Hendawi, M., Sauv e, S., Ashour, M., Brosseau, P., Fournier, M., 2004. A New Ultrasound Protocol for Extrusion of Coelomocyte Cells from the Earthworm *Eisenia fetida*. *Elsevier. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, pp. 17-22.

Griffith, M. C., Thai, C., A., Larive, K. C., 2019. Metabolite Biomarkers of Chlorothalonil Exposure in Earthworms, Coelomic Fluid, and Coelomocytes. *Science of the Total Environment*, Vol. 681, pp. 435-443.

Schuijt, M. L., Peng, J. F., Den Berg, P. J. S., Dingemans, L. M. M., Van den Brink, J. P., 2021. (Eco)Toxicological Tests for Assessing Impacts of Chemical Stress to Aquatic Ecosystems: Facts, Challenges, and Future. *Science of the Total Environment*, Vol. 795, pp.

Vryzas, Z., 2018. Pesticide Fate in Soil-Sediment-Water Environment in Relation to Contamination Preventing Actions. *Elsevier. Current Opinion in Environmental Science & Health*, Vol. 4, pp. 5-9.

Singh, S. N., Sharma, R., Parween, T., Patanjali, K. P., 2017. Pesticide Contamination and Human Health Risk Factor. Springer. Modern Age Environmental Problems and their Remediation, pp. 49-68.

Brühl, A. C., Zaller, G. J., 2019. Biodiversity Decline as a Consequence of an Inappropriate Environmental Risk Assessment of Pesticides. *Frontiers in Environmental Science. Toxicology, Pollution and the Environment*.

Robidoux, P. Y., Hawari, J., Thiboutot, S., Ampleman, G., and Sunahara, G. I., 2001. Chronic toxicity of octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX) in soil determined using the earthworm (*Eisenia andrei*) reproduction test. *Environ. Pollut.* 111, 283–292.

Cang, T., Dai, D., Yang, G., Yu, Y., Lv, L., and Cai, L., 2017. Combined toxicity of imidacloprid and three insecticides to the earthworm, *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). 8722–8730.

Li, X., Zhu, L., Du, Z., Li, B., Wang, J., Wang, J., et al., 2018. Mesotrione-induced oxidative stress and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*). *Ecol. Indic.* 95, 436–443.

Zou, X., Xiao, X., Zhou, H., Chen, F., Zeng, J., and Wang, W., 2018. Effects of soil acidification on the toxicity of organophosphorus pesticide on *Eisenia fetida* and its mechanism. 359, 365–372.

Zhang, Q., Saleem, M., and Wang, C., 2019. Effects of biochar on the earthworm (*Eisenia foetida*) in soil contaminated with and / or without pesticide mesotrione. *Sci. Total Environ.* 671, 52–58.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), 2016. Test 222: Earthworms reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia andrei*). *Guidel. Test. Chem.*

Yeardley, R. B., Lazorchak, J. M., and Gast, L. C., 1996. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1532–1537.

Hund-Rinke, K., and Wiechering, H., 2001. Earthworm avoidance test for soil assessments. *J. Soils Sediments* 1, 15–20.

García-Santos, G., and Keller-Forrer, K., 2011. Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere* 84, 651–656.

Jordaan, M. S., Reinecke, S. A., and Reinecke, A. J., 2012. Acute and sublethal effects of sequential exposure to the pesticide azinphos-methyl on juvenile earthworms (*Eisenia andrei*). *Ecotoxicology* 21, 649–661.

Martínez Morcillo, S., Yela, J. L., Capowiez, Y., Mazzia, C., Rault, M., and Sanchez-Hernandez, J. C., 2013. Avoidance behaviour response and esterase inhibition in the earthworm, *Lumbricus terrestris*, after exposure to chlorpyrifos. *Ecotoxicology* 22, 597–607.

International standard ISO 17512-1, 2008. Soil quality — Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour — Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).

Xu, Z., Yang, Z., Zhu, T., and Shu, W., 2020. Toxicity of soil antimony to earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) before and after the aging process. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 207, 111278.

Vischetti, C., Monaci, E., Cardinali, A., Casucci, C., and Perucci, P., 2008. The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a biobed mixture. *Chemosphere* 72, 1739–1743.

Sharma, A., Srivastava, A., Ram, B., and Srivastava, P. C., 2007. Dissipation behaviour of spinosad insecticide in soil, cabbage and cauliflower under subtropical conditions. 1145, 1141–1145.

Akbar, M. F., Haq, M. A., Yasmin, N., and Farhan Ullah Khan, M., 2010. Degradation analysis of some synthetic and bio-insecticides sprayed on okra crop using HPLC. *J. Chem. Soc. Pakistan* 32.

Valverde, M., Ostrosky-wegman, P., Ph, D., Rojas, E., Ph, D., Fortoul, T., et al., 1999. The application of single cell gel electrophoresis or comet assay to human monitoring studies. 41, 109–113.

Tiano, L., Littarru, G. P., Principi, F., Orlandi, M., Santoro, L., Carnevali, P., et al., 2005. Assessment of DNA damage in Down Syndrome patients by means of a new, optimised single cell gel electrophoresis technique. *BioFactors* 25, 187–195.

Orlando, P., Silvestri, S., Galeazzi, R., Antonicelli, R., Marcheggiani, F., Cirilli, I., et al., 2018. Effect of ubiquinol supplementation on biochemical and oxidative stress indexes after intense exercise in young athletes. *Redox Rep.* 23, 136–145.

Silva, P. M. C. S. De, Pathiratne, A., and Gestel, C. A. M. Van, 2010. Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavatus*. *Appl. Soil Ecol.* 44, 56–60.

Van Gestel, C. A. M., Zaal, J., and Dirven-Van Breemen, E. M., Baerselman, R., 1995. Comparison of two test methods for determining the effects of pesticides on earthworm reproduction. *Acta Zoologica Fennica*, 196, 278-283. *Acta Zool. Fenn.* 196, 278-283.

Frampton, G. K., Jänsch, S., Scott-Fordsmand, J. J., Römbke, J., and Van den Brink, P. J., 2006. Effects of Pesticides on Soil Invertebrates in Model Ecos. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2490–2501.

Zhou, S., Duan, C., F U, H., Chen, Y., Wang, X., and Y U, Z., 2007. Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with three different earthworm test methods. *J. Environ. Sci.* 19, 854–858.

Li, J., Zhang, W., Chen, L., Liang, J., and Lin, K., 2015. Biological effects of decabromodiphenyl ether (BDE209) and Pb on earthworm (*Eisenia fetida*) in a soil system. *Environ. Pollut.* 207, 220–225.

- Sanchez-Hernandez, J. C., Notario del Pino, J., Capowiez, Y., Mazzia, C., and Rault, M., 2018a. Soil enzyme dynamics in chlorpyrifos-treated soils under the influence of earthworms. *Sci. Total Environ.* 612, 1407–1416.
- Mackay, D., Shiu, W. Y., and Lee, S. C., 2006. *Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals*. CRC press. second. CRC Press.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., and Naidu, R., 2011. Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environ. Int.* 37, 1362–1375.
- Singh, B. K., Walker, A., and Wright, D. J., 2002. Degradation of chlorpyrifos alone and in combination with chlorothalonil and their effects on soil microbial populations. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2600–2605.
- Racke, K. D., Laskowski, D. A., and Schultz, M. R., 1990. Resistance of Chlorpyrifos to Enhanced Biodegradation in Soil. *J. Agric. Food Chem.* 38, 1430–1436.
- Coppola, L., Castillo, M. D. P., Monaci, E., and Vischetti, C., 2007. Adaptation of the biobed composition for chlorpyrifos degradation to Southern Europe conditions. *J. Agric. Food Chem.* 55, 396–401.
- Tamez-Guerra, P., Tamayo-Mejía, F., Gomez-Flores, R., Rodríguez-Padilla, C., Damas, G., Tamez-Guerra, R. S., et al., 2017. Increased efficacy and extended shelf life of spinosad formulated in phagostimulant granules against *Spodoptera frugiperda*. *Pest Manag. Sci.* 74, 100–110.
- Thompson, G. D., Dutton, R., and Sparks, T. C., 2000. Spinosad – a case study: an example from a natural products discovery programme †. 702.
- Barden, G., 1998. Evaluation of the new active SPINOSAD in the products Laser Naturalyte Insect Control Tracer Naturalyte Insect Control.

Mandal, K., and Singh, S., 2013. An Overview of Persistence of Spinosad in Biotic and Abiotic Components of the Environment and Advances in Its Estimation Techniques. 405–413.

Telesiński, A., Michalcewicz, W., Płatkowski, M., Streck, M., Onyszko, M., and Wiśniewska, J., 2015. The side-effect of organic insecticide spinosad on biochemical and microbiological properties of clay soil. *J. Ecol. Eng.* 16, 191–197.

Thompson, D. G., Harris, B. J., Lanteigne, L. J., Buscarini, T. M., and Chartrand, D. T., 2002. Fate of spinosad in litter and soils of a mixed conifer stand in the Acadian forest region of New Brunswick. *J. Agric. Food Chem.* 50, 790–795.

Collins, A. R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol.* 26, 249–261.

Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., and Jha, A. N., 2009. Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biol. Toxicol.* 25, 53–64.

Casabé, N., Piola, L., Fuchs, J., Oneto, L. M., Pamparato, L., Basack, S., Giménez, R., Massaro, R., Papa, C. J., Kesten, E., 2007. Ecotoxicological Assessment of the Effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine Soya Field. Springer. *Journal of Soils and Sediments*, Vol. 7, 232-239.

Piola, L., Fuchs, J., Oneto, L. M., Basack, S., Kesten, E., Casabé, N., 2013. Comparative Toxicity of Two Glyphosate-Based Formulations to *Eisenia andrei* Under Laboratory Conditions, Vol. 91, Issue 4, pp. 545-551.

Curieses, S. P., Sáenz, M. E., Alberdi, J. L., Martínez, R. S., Larramendy, M. L., Di Marzio, W. D., 2018. Genotoxic Evidences of Glyphosate and Chlorpyrifos on *Eisenia fetida* Coelomocytes.