



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE, ALIMENTARI E AMBIENTALI

*Corso di Laurea Triennale in Scienze e Tecnologie Agrarie*

**EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI DEI BIOPESTICIDI  
SULLA DIVERSITA' MICROBICA DEL SUOLO**

**ECOTOXICOLOGICAL EFFECTS OF BIOPESTICIDES  
ON THE SOIL MICROBIAL DIVERSITY**

TIPO TESI: compilativa

**Laureando:**

ANTONELLO AMELI

**Relatore:**

*Chiar.mo Prof.*

COSTANTINO VISCHETTI

ANNO ACCADEMICO 2019/2020



<b>INDICE</b>		<b>Pag.</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>AGROFARMACI.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Composizione.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Sezioni d’impiego.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Tossicità degli agrofarmaci.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.4</b>	<b>Ecotossicologia.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1.5</b>	<b>Destino ambientale degli agrofarmaci.....</b>	<b>12</b>
<b>1.2</b>	<b>SUOLO COME SISTEMA BIOLOGICO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Fattori che influenzano l’impatto degli agrofarmaci sul microbiota del suolo.....</b>	<b>17</b>
<b>1.3</b>	<b>AGRICOLTURA BIOLOGICA.....</b>	<b>18</b>
<b>1.4</b>	<b>BIOPESTICIDI.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4.1</b>	<b>Biofungicidi.....</b>	<b>23</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Bioinsetticidi.....</b>	<b>25</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Bioerbicidi.....</b>	<b>27</b>
<b>2.</b>	<b>SCOPO DELLA TESI.....</b>	<b>28</b>
<b>3.</b>	<b>TECNICHE UTILIZZATE PER LA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEI PESTICIDI SULLE COMUNITA’MICROBICHE DEL SUOLO.....</b>	<b>29</b>
<b>4.</b>	<b>REPORT SCIENTIFICI SUGLI EFFETTI DEI BIOPESTICIDI SULLA DIVERSITA’ MICROBICA DEL SUOLO.....</b>	<b>36</b>

<b>4.1</b>	<b>EFFETTI DI BIOFUNGICIDI.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>EFFETTI DI BIOINSETTICIDI.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>EFFETTI DI BIOERBICIDI.....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....</b>	<b>53</b>
<b>6.1</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>53</b>
<b>6.2</b>	<b>SITOGRAFIA.....</b>	<b>63</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 AGROFARMACI

Per agrofarmaci, prodotti fitosanitari, fitofarmaci o pesticidi si definisce una categoria di sostanze a composizione chimica diversa. Tali composti inorganici, organici naturali e di sintesi, sono formulati commercialmente per combattere, prevenire e/o curare, attraverso diversi meccanismi di azione che dipendono dalle caratteristiche delle molecole chimiche impiegate e dal bersaglio che si vuole raggiungere, le infezioni causate ai vegetali da organismi nocivi, quali funghi o crittogame, batteri, insetti, acari, nematodi, virus, micoplasmi, molluschi, roditori, licheni, microalghe patogene, ecc. nonché a contrastare o eliminare specie vegetali indesiderate, cosiddette piante infestanti. L'uso di questi mezzi tecnici di protezione avviene sia in pieno campo, sia nella conservazione dei prodotti vegetali (frigoconservazione, ecc.) sia, come fisiofarmaci, per influire sui processi vitali dei vegetali (fitoregolatori e biostimolanti); senza fungere da fertilizzanti.

La sicurezza degli agrofarmaci in Italia è garantita attraverso tre livelli di controllo e di applicazione delle norme in materia di sicurezza alimentare: europeo, nazionale e territoriale. A livello europeo, l'obiettivo principale in materia di sicurezza alimentare è garantire un alto livello di protezione della salute dei consumatori comprendendo tutti i settori della catena alimentare. A livello nazionale, il Ministero della salute implementa sul proprio territorio gli indirizzi della Commissione europea recependo le direttive ed applicando i regolamenti comunitari in materia di fitofarmaci. In particolare, attraverso l'iter procedurale che porta all'autorizzazione per immissione in commercio di agrofarmaci, vengono garantiti aspetti fondamentali come sicurezza dell'operatore, degli alimenti, degli animali e dell'ambiente. Inoltre, la commissione consultiva presieduta dal Ministero della Salute deve fornire pareri tecnico-scientifici sugli aspetti relativi all'efficacia agronomica del prodotto, alle proprietà chimico-fisiche, alla tossicologia, all'esposizione dell'operatore, all'ecotossicologia e al destino ambientale per la registrazione di agrofarmaci. A livello regionale, gli assessorati alla sanità e le ASL attuano i piani di controllo ufficiale nel settore. Tali controlli riguardano sia i prodotti alimentari di origine vegetale, per monitorare i livelli di residui di agrofarmaci negli alimenti, sia i controlli sull'impiego e commercio degli agrofarmaci. L'immissione di questi prodotti sul mercato non è tuttavia affatto scontata, ciascun farmaco deve superare una serie di test ed iter di registrazione che può durare svariati anni. Gli agrofarmaci rappresentano però, un valido supporto per l'attività agricola, considerando che, riducendo il rischio di malattie, consentono di ottenere raccolti più abbondanti e soddisfare la grande domanda di alimenti.

Inoltre, salvaguardano la salute delle piante, svolgono un ruolo molto importante dal punto di vista dell'igiene alimentare, in quanto pongono le piante al riparo da contaminazioni di qualsiasi genere. Sono in grado di tutelare anche la salute dell'uomo, dal momento che i rischi di intossicazione più frequenti sono dovuti proprio a contaminazioni microbiologiche sulle colture, piuttosto che all'uso di sostanze chimiche o biologiche.

### **1.1.1 Composizione**

Gli agrofarmaci sono caratterizzato da diverse componenti. Tutte insieme costituiscono il prodotto commerciale (chiamato anche miscela o formulato), cioè il prodotto che viene acquistato per l'impiego.

Le componenti sono:

- sostanze attive*: sono sia le sostanze intese come elementi chimici e loro composti (allo stato naturale o sotto forma di prodotti industriali), sia i microrganismi, virus compresi, che possiedono un'attività nei confronti degli organismi nocivi o dei vegetali. La sostanza attiva è, quindi, la parte del PF che agisce contro il parassita che si vuole controllare è la sostanza tossica che, in base alla pericolosità e alla concentrazione nel PF, concorre a determinare la classe di tossicità e, quindi, di pericolosità soprattutto per chi lo impiega;
- -*antidoti agronomici*: sostanze o preparati aggiunti per eliminare o ridurre gli effetti fitotossici del PF su certi vegetali;
- -*sinergizzanti*: sostanze o preparati che possono potenziare l'attività della sostanza attiva o delle sostanze attive contenute in un PF;
- -*coformulati*: sostanze o preparati che non sono né sostanze attive, né antidoti agronomici o sinergizzanti; riducono la concentrazione della sostanza attiva, come ad esempio sostanze inerti e diluenti, e completano il PF;
- -*coadiuvanti*: sostanze o preparati costituiti da coformulati o da preparati contenenti uno o più coformulanti che l'utilizzatore miscela ad un PF, di cui rafforzano l'efficacia *altri*: solventi, sospensivanti, emulsionanti, bagnanti, adesivanti, antievaporanti, antischiuma. Tutte queste sostanze possono essere contenute all'interno degli agrofarmaci e quindi essere autorizzate insieme alla sostanza attiva. I coadiuvanti possono essere autorizzati anche come prodotti a sé stanti.

### 1.1.2 Sezioni d'impiego

Tabella 1: Classificazione degli agrofarmaci in base alle sezioni di impiego

<b>Insetticidi</b>	Sostanze la cui tossicità verso gli Insetti è tale da provocarne la morte. Il loro uso rappresenta pertanto il più comune metodo di lotta ( <i>lotta chimica</i> ) contro gli Insetti nocivi.
<b>Acaricidi</b>	Prodotti adottati contro gli acari (ragnetto rosso, giallo, ecc..). Questa classe è molto estesa e racchiude carbamati, formamidine, regolatori di crescita, composti organofosfati e molti altri.
<b>Anticrittogamici o fungicidi</b>	Sostanze chimiche impiegate a combattere le crittogame parassite delle piante. Il principio attivo può essere preventivo, curativo o antisporulante (inibisce la riproduzione). L'azione può essere specifica (nei confronti di un solo patogeno) o a largo spettro (più patogeni). In base alla funzione della capacità di penetrazione nella pianta e alla loro traslocazione al suo interno si dividono in: fungicidi da contatto, sistemici, citotropici, translaminari.
<b>Diserbanti o erbicidi</b>	Sostanze utilizzate per il controllo delle malerbe o piante infestanti. In base alla loro modalità d'azione vengono classificati in totali (colpiscono tutte le specie vegetali) o selettivi (colpiscono solo determinate essenze trattate).
<b>Fitormoni o fitoregolatori</b>	Sono sostanze di sintesi che vanno a promuovere, inibire o comunque a modificare determinati processi fisiologici delle piante.
<b>Nematocidi</b>	Contro i nematodi.
<b>Rodenticidi</b>	Contro i roditori.

### **1.1.3 Tossicità degli agrofarmaci**

La valutazione delle proprietà tossicologiche degli agrofarmaci tiene conto di tre tutele principali:

- tutela della salute dell'uomo;
- tutela della sicurezza dell'uomo e degli ambienti di vita e di lavoro;
- tutela dell'ambiente esterno, inteso come ambiente di vita e di lavoro in cui vi possono essere interazioni avverse con l'acqua ed il suolo (con gli organismi che vi abitano), con l'atmosfera e l'ozono stratosferico.

Pertanto, la valutazione di pericolosità di un prodotto fitosanitario si basa sulla determinazione di tre tipologie di proprietà pericolose:

- -proprietà tossicologiche relative alla salute dell'uomo;
- -proprietà chimico-fisiche relative essenzialmente alla sicurezza dell'uomo;
- -proprietà ecotossicologiche relative all'ambiente.

Gli effetti tossici degli agrofarmaci sulla salute variano in relazione a diversi fattori quali le caratteristiche chimiche del principio attivo presente nell'agrofarmaco, la sua formulazione e concentrazione, la modalità e la durata dell'esposizione, le caratteristiche biologiche del soggetto esposto (predisposizione ad allergie, età, sesso). La pericolosità intrinseca degli agenti chimici è connessa alla relativa classificazione. Si distinguono infatti agenti:

- Tossici acuti e tossici in caso di aspirazione: in caso di ingestione, assorbimento cutaneo, inalazione o penetrazione nelle vie respiratorie producono effetti nocivi acuti o cronici a carico di diversi organi.
- Corrosivi: in caso di contatto, possono causare lesioni irreversibili e gravi alla pelle e agli occhi.
- Irritanti: in caso di contatto diretto, prolungato o ripetuto con la pelle o le mucose, si può avere una reazione infiammatoria.
- Sensibilizzanti: in caso di inalazione o assorbimento cutaneo, si può avere una reazione di ipersensibilizzazione per cui una successiva esposizione alla sostanza o al preparato produce le reazioni tipiche delle allergie.
- Cancerogeni, mutageni, tossici per la riproduzione (CMR): in caso di inalazione, ingestione o assorbimento cutaneo, possono provocare il cancro o aumentarne la frequenza, oppure produrre mutazioni nei geni del soggetto.



Una sostanza chimica, in base alle caratteristiche tossicologiche, alla durata e alla modalità di esposizione, può espletare due tipi di effetti:

- Tossicità Acuta: si riferisce agli effetti causati dall'esposizione, in tempi relativamente brevi, ad una sostanza tossica in una singola dose o a dosi ripetute, ad elevate concentrazioni. I sintomi che si manifestano possono essere immediati o ritardati.
- Tossicità cronica: si riferisce agli effetti causati da una graduale e continua esposizione, ripetuta nel tempo, a basse dosi della sostanza tossica, con accumulo della stessa nell'organismo. Gli effetti si manifestano dopo mesi o anni dall'esposizione e possono essere di diversa natura (sensibilizzazione, patologie specifiche, mutagenicità, sulla riproduzione, ecc.).

Ad esempio, i criteri di classificazione europei degli agrofarmaci per gli effetti acuti letali, che sono quelli più conosciuti, si basano:

- sulla Dose Letale 50 (DL 50), la dose di prodotto, espressa in milligrammi di prodotto per chilogrammo di peso dell'animale (ppm), che provoca la morte del 50% degli animali da laboratorio esposti al prodotto.
- sulla Concentrazione Letale 50 (CL 50), che rappresenta la concentrazione in aria o acqua del prodotto che agisce allo stato di gas o di vapore e che ottiene lo stesso effetto della Dose Letale 50.

Questi due parametri esprimono la tossicità acuta del prodotto fitosanitario.

È inoltre opportuno tenere presente che una stessa sostanza attiva può essere contenuta in formulati commerciali aventi diversa etichettatura e classificazione di pericolosità; questo può dipendere dalla diversa concentrazione della sostanza attiva, dalla tipologia, pericolosità e concentrazione dei diversi coadiuvanti e coformulanti contenuti oppure dal diverso tipo di formulazione.

### **1.1.4 Ecotossicologia**

Gli effetti negativi dovuti alla persistenza dei pesticidi nel terreno si possono esprimere in forma sintetica come ecotossicologia. L'ecotossicologia è la scienza che, utilizzando metodi e concetti propri della tossicologia, applica i principi dell'ecologia e della chimica ambientale allo studio degli effetti delle sostanze tossiche sugli ecosistemi (APAT, 2004).

Con l'ecotossicologia l'obiettivo diviene non più la semplice protezione dello stato di salute dell'individuo secondo i criteri igienico-sanitari (tossicologia classica) ma piuttosto la conservazione dell'integrità funzionale degli ecosistemi.

I compiti dell'ecotossicologia sono quelli di:

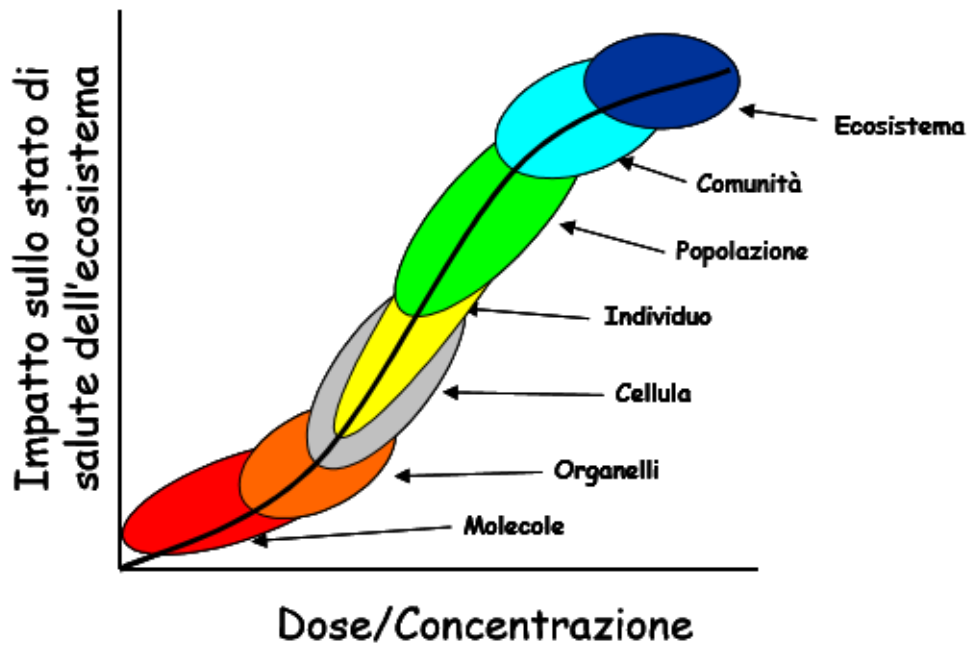
- misurare la ecotossicità di campioni ambientali, tramite batterie di test che utilizzano una serie di organismi bersaglio, con lo scopo di verificare eventuali superamenti dei limiti imposti dalle norme di legge;
- prevedere l'eventuale impatto del campione ambientale sull'ecosistema;
- ricercare e rimuovere le eventuali cause di tossicità.

Inizialmente l'utilizzo di "test biologici" era rivolto unicamente alla definizione di quanto già accaduto; attualmente, la prospettiva nella quale si inseriscono i test biologici include l'approccio predittivo, utilizzando le analisi come strumento previsionale per la valutazione del rischio ambientale. La caratterizzazione chimica del suolo non consente, da sola, di esprimere valutazioni relative al pericolo per gli organismi viventi né di determinare la tossicità della matrice. A tal proposito, si può ricorrere agli strumenti ecotossicologici che forniscono informazioni importanti sulla biodisponibilità ed eventuali azioni sinergiche degli inquinanti verso i sistemi biologici. L'effetto biologico è legato alla frazione biodisponibile delle sostanze contaminanti che, a sua volta, dipende dalle sostanze chimiche presenti e dalle condizioni ambientali. Risulta pertanto necessario utilizzare il "monitoraggio biologico" per una corretta valutazione del pericolo derivante dalla contaminazione del suolo.

I saggi ecotossicologici sono quindi impiegati sia nella valutazione della qualità dei suoli sottoposti a rischi di contaminazione, sia nel valutare l'efficacia della bonifica biologica del suolo nel tempo (biomonitoraggio).

*-Test ecotossicologici*

Un “test ecotossicologico” è un saggio di durata variabile e con un protocollo definito in cui si misura l’effetto di sostanze su molecole, cellule, organismi, popolazioni e comunità (Fig. 1). Gli organismi possono essere utilizzati in laboratorio nelle prove di tossicità oppure osservati nel loro ambiente naturale e rappresentare gli indicatori delle condizioni ambientali.



*Figura 1 – Livelli di azione dei contaminanti*

In genere il test prevede l’esposizione di un organismo vivente per un certo periodo alla sostanza in esame e la valutazione della risposta mostrata dall’organismo (Maffiotti et al., 1997).

### **1.1.5 Destino ambientale degli agrofarmaci**

Durante o dopo l'applicazione dei diversi agrofarmaci, essendo operazioni che immettono sostanze estranee nell'ambiente, interferiscono sul complesso aria, acqua, suolo e organismi biotici (piante, organismi del suolo, animali). Quando si esegue un trattamento fitosanitario soltanto una parte della miscela irrorata contenente la sostanza attiva raggiunge il "bersaglio", mentre il resto viene disperso nell'ambiente, e può venire a contatto con altri organismi diversi con la possibilità di interferire, direttamente o indirettamente, sulla loro vita. Tutti i ricercatori sono comunque concordi nel ritenere che il problema principale posto dall'uso dei pesticidi, in relazione alla vita degli esseri viventi dell'ecosistema, non è tanto di natura tossicologica quanto ecologica; l'impiego sistematico ed esteso dei diserbanti porterebbe infatti a modificazioni dell'ambiente naturale, sia per la riduzione della flora e delle piante fornitrici di cibo che per l'eliminazione dei rifugi. Un altro effetto molto importante nel quadro della valutazione della ecotossicità dei prodotti è quello sui microrganismi del terreno. La valutazione sull'attività della microflora è ovviamente fondamentale per i pesticidi a carica residuale per i quali il contatto con il terreno è di lunga durata. Per i prodotti di più recente immissione sul mercato si può dire, comunque che essi sono senza influenza sui microrganismi del terreno e quindi anche sulla fertilità del terreno. Infatti, accade, il più delle volte, che i microrganismi utilizzino le molecole chimiche e organiche come fonte di carbonio per i processi vitali.

La parte di miscela che viene dispersa nell'ambiente dipende anche e soprattutto dalle misure che l'agricoltore può mettere in atto per ridurre tale fenomeno.

Le modalità attraverso le quali gli agrofarmaci si disperdono nell'ambiente sono riportate nella Figura 2:

- deriva - nella irrorazione della miscela sulla coltura si forma una massa nebbiosa, composta da piccole goccioline che vengono trasportate più o meno lontano dal punto di applicazione, principalmente per influenza del vento o del tipo di macchina irroratrice: una parte della miscela irrorata ricade sul terreno e sulla vegetazione circostanti la coltura o su un eventuale corpo d'acqua che si trova nelle vicinanze;
- volatilità - la miscela, durante il trattamento o dopo aver raggiunto la coltura o il terreno, può evaporare in aria ed essere trasportata lontano con il vento;
- ruscellamento - la miscela, una volta raggiunto il suolo dopo il trattamento, può essere trasportata lungo la superficie del terreno, a seguito di un evento piovoso o con l'irrigazione. Allo stesso modo, la sostanza attiva presente nella miscela può aderire

fortemente alle particelle di terreno ed essere trasportata con esse quando, durante piogge intense, si verificano fenomeni di erosione del terreno. In questo modo la sostanza attiva può raggiungere un corpo d'acqua superficiale;

- lisciviazione - a seguito di una pioggia la sostanza attiva che ha raggiunto il terreno, può penetrare attraverso il suolo, disciolta nell'acqua di percolazione, e per questa via raggiungere le acque di falda.



Figura 2: Destino degli agrofarmaci nell'ambiente.

L'intensità di ciascuno di questi fenomeni dipende dalle caratteristiche proprie della sostanza attiva (es. struttura della molecola, solubilità in acqua, tendenza a legarsi al terreno, ecc.), ma anche dalle caratteristiche dell'ambiente (es. tessitura del suolo, conformazione del terreno, presenza di corpi d'acqua, clima, ecc.).

Gli agrofarmaci, una volta dispersi nell'ambiente, sono soggetti:

- a processi di degradazione (trasformazioni) con la formazione di una o più sostanze chimiche (metaboliti) diverse da quella di partenza a seguito di degradazione microbica, di degradazione chimica (processi chimici quali idrolisi, ossidazione, riduzione, ecc., che comportano una rottura e un cambiamento dei legami molecolari creando nuovi composti), di fotodecomposizione o fotolitica (rottura dei legami chimici per azione della luce solare);
- a variazioni di concentrazione sia della sostanza attiva che dei metaboliti nei diversi comparti ambientali (suolo, aria, acqua) per i processi di degradazione e di dispersione ambientale.

Tutti questi fenomeni influenzano la persistenza e la biodisponibilità del principio attivo.

Al termine dei vari processi quindi, gli agrofarmaci distribuiti possono:

- essere degradati in sostanze non più tossiche;
- essere trattenuti dal terreno;
- essere assorbiti dalla vegetazione e quindi immessi nella catena alimentare, sia umana e sia animale;
- raggiungere le falde sotterranee.

I maggiori effetti negativi si evidenziano in caso di monocoltura, nella quale si ha un impiego ripetuto e costante degli stessi agrofarmaci; le conseguenze primarie sono l'accumulo dei residui nel terreno e la selezione di erbe resistenti; l'uso di antigerminanti residuali, accumulati nel terreno, può poi interferire sulla coltura che segue.

## 1.2 SUOLO COME SISTEMA BIOLOGICO

Il suolo rappresenta lo strato più esterno della crosta terrestre formato da particelle minerali, materia organica, acqua, aria e organismi viventi. Costituisce il substrato nutritivo principale per le piante, in cui le strutture radicali penetrano trovandovi sostegno fisico ed un adeguato rifornimento di nutrienti organici e acqua. È una matrice estremamente complessa, forse la più complessa in natura, e contiene la più grande quantità di biomassa vivente dell'intero pianeta con i livelli più elevati di biodiversità.

I microorganismi del suolo sono vitali per la vita e la salute degli uomini e delle piante. Lo studio delle interazioni tra le piante e le loro comunità microbiche nella rizosfera è importante per lo sviluppo di pratiche di gestione sostenibile e prodotti agricoli come i biopesticidi. Le radici delle piante rilasciano un'ampia varietà di composti chimici per attrarre e selezionare i microorganismi nella rizosfera. A loro volta, questi microorganismi associati alle piante, attraverso meccanismi diversi, influenzano la salute e la crescita delle piante. Inoltre, operano nel suolo una rete di trasformazioni dalle quali dipende il funzionamento dell'intero ecosistema. Sono, infatti, coinvolti nel ciclo dell'azoto come i batteri nitrificanti (che trasformano l'ammonio in nitrato) e i batteri denitrificanti (che riducono il nitrato ad azoto gassoso), oppure nel ciclo del carbonio, nella decomposizione della sostanza organica, nella metanogenesi e nella fissazione della CO<sub>2</sub>. Con le loro attività metaboliche, i microorganismi del suolo sono fra gli attori principali dei cosiddetti servizi ecosistemici che comprendono il ciclo della sostanza organica, la regolazione della disponibilità degli elementi nutritivi e della loro asportazione da parte delle colture, lo sviluppo delle piante, il controllo dei patogeni, la difesa da fattori di stress biotici e abiotici, il mantenimento della struttura del suolo e la regolazione dei processi idrologici, gli scambi gassosi e il sequestro del carbonio, riciclaggio dei rifiuti, disintossicazione degli inquinanti ambientali. I microorganismi del suolo rappresentano una componente di fondamentale importanza per la fertilità dei terreni e svolgono un ruolo insostituibile, in mancanza del quale il terreno rappresenterebbe semplicemente un inerte supporto meccanico.

Questi microorganismi rappresentano la parte più rilevante della biomassa del suolo.

In un grammo di suolo vivono dai 10 milioni al miliardo di batteri; tuttavia, la maggior parte di questi microorganismi rimane sconosciuto perché non può essere coltivato sui terreni di coltura di laboratorio. Con il termine "Microbioma" si intende l'insieme di microorganismi (batteri, funghi e virus), dei loro genomi e delle interazioni che questi stabiliscono in un determinato ambiente, come il suolo. Comprendere l'impatto dei pesticidi e dei biopesticidi sulle comunità microbiche del suolo è di primaria importanza dato il ruolo centrale dei microbi

nel funzionamento degli ecosistemi del suolo.

L'impatto negativo dei pesticidi sui microbi del suolo può quindi, ridurre la fertilità del suolo e la produzione agricola.

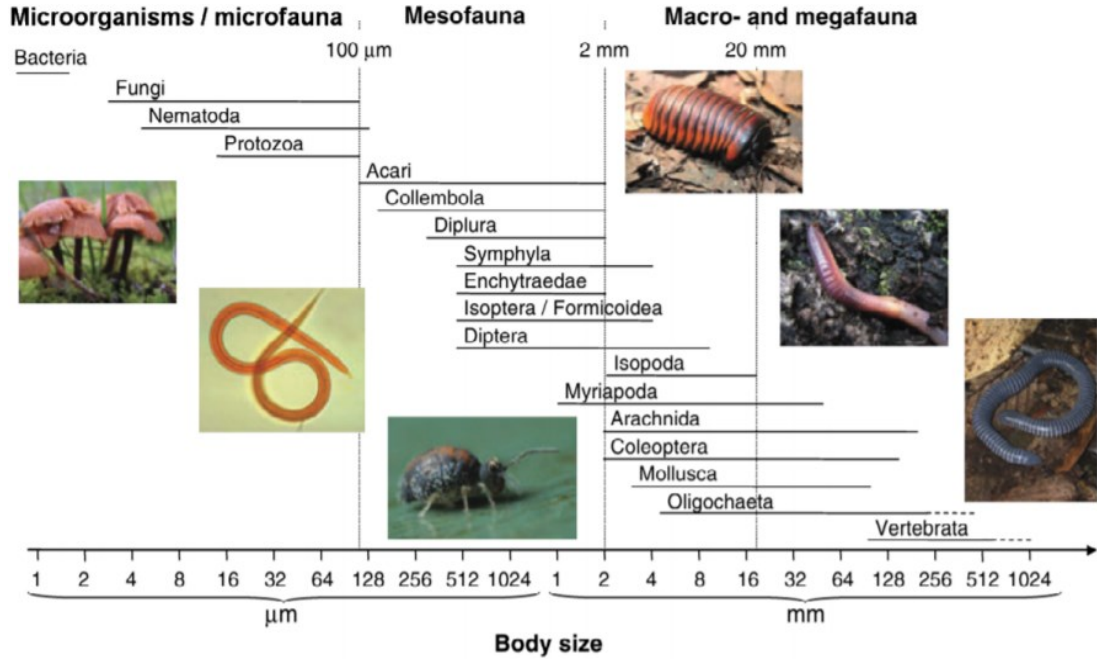


Figura 3: Rappresentazione dei principali gruppi tassonomici di organismi del suolo in base alla larghezza del corpo

Il suolo è un sistema biologico in precario equilibrio, ed ogni disturbo dell'ambiente può determinare modificazioni dell'attività della microflora e conseguentemente della fertilità del suolo. Il crescente uso dei fitofarmaci, sebbene con l'intento di proteggere le colture, altera per azione diretta o indiretta, questo equilibrio per tempi brevi, medi o lunghi, in dipendenza se il prodotto agisce rapidamente o persiste per molto tempo nella sua forma iniziale o nelle sue forme metaboliche. Una volta introdotta nell'ambiente, la molecola del fitofarmaco è sottoposta a processi di degradazione abiotica (fotolitica o chimica) e biotica o biologica. La degradazione fotolitica generalmente ha luogo quando la molecola del fitofarmaco è irradiata dalla luce solare, la degradazione chimica avviene quando la molecola è chimicamente instabile nelle condizioni ambientali in cui si trova, mentre la degradazione biotica, definita con il termine "biodegradazione", è quella dovuta alle trasformazioni ad opera degli organismi viventi. Pertanto, i microrganismi sono agenti chiave nella degradazione di una vasta gamma di molecole organiche in ecosistemi terrestri ed acquatici in seguito a processi aerobici, anaerobici e metabolismo chemiolitotrofico.



### **1.2.1 Fattori che influenzano l'impatto dei pesticidi sui microrganismi del suolo**

La dissipazione dei pesticidi nel suolo può essere attribuita a una serie di fattori abiotici (adsorbimento, trasformazione chimica, idrolisi e fotolisi), trasferimenti (lisciviazione e deflusso) e processi biotici (adsorbimento, trasformazione biologica e degradazione microbica), non solo a seconda della proprietà fisico-chimiche del pesticida e del suolo, ma anche condizioni ambientali e pratiche di gestione. L'effetto di un pesticida sui microrganismi del suolo è controllato da numerosi fattori ambientali, dalla consistenza del suolo, presenza di materia organica e del tipo di vegetazione; oltre alla persistenza, concentrazione, ecotossicità del pesticida applicato e la sua biodisponibilità che rappresenta uno dei principali fattori che contribuiscono all'impatto netto sui microbi del suolo. Adsorbimento e desorbimento regolano la concentrazione di un contaminante nella soluzione del suolo e quindi la sua biodisponibilità, bioattività e degradabilità nell'ambiente del suolo. Aggiunta di fonti di carbonio, tra cui glucosio, acetato e alcuni aminoacidi (glutammina, arginina, serina e triptofano), migliora la struttura dei suoli e aumenta la loro resilienza anche in termini di resistenza alla tossicità dei pesticidi. Tali effetti sono soggetti a variazioni anche in basalle pratiche agricole che si svolgono sui suoli. In condizioni di terreno non coltivato, si ha una maggiore ritenzione di sostanza organica che si osserva con una maggiore aggregazione di particelle, che si traduce in una migliore resilienza dei suoli. Questi fenomeni influenzano il destino della materia organica e influenzano il ciclo della biomassa microbica. Pertanto, l'uso di pesticidi sotto uno di questi sistemi può avere un impatto diverso sulla diversità microbica del suolo e sulla biomassa. Un altro problema può essere la coesistenza di diversi pesticidi e altri contaminanti che alterano maggiormente l'attività microbica e la loro diversità.

### **1.3 AGRICOLTURA BIOLOGICA**

L'agricoltura biologica comprende la necessità di un rapporto equilibrato tra i tre aspetti del suolo, vale a dire fisico, chimico e biologico per sostenere la vita. Tutto viene dal suolo e ritorna al suolo, è un sistema vivente vivo con trilioni di organismi che riciclano i nutrienti e sostengono la vita. Il modo in cui gestiamo il suolo e la vita microbica determina non solo la salute e la vitalità del cibo, ma anche la salute della società in cui viviamo. La crescente epidemia di malattie come il cancro e le malattie mentali, nonché il continuo degrado del nostro ambiente, possono essere ricondotti alla cattiva gestione dell'ecosistema. Una maggiore consapevolezza del danno causato dalle pratiche passate mostra quanto sia critico l'equilibrio tra natura, agricoltura e società. Ci stiamo rapidamente rendendo conto che queste pratiche passate non sono redditizie e non sono sostenibili.

Agricoltura biologica significa sviluppare un modello di produzione che eviti lo sfruttamento eccessivo delle risorse naturali, in particolare del suolo, dell'acqua e dell'aria, utilizzando invece tali risorse all'interno di un modello di sviluppo che possa durare nel tempo. Rappresenta un metodo di coltivazione dove l'ecosistema agricolo viene considerato come modello equilibrato per lo sviluppo delle piante coltivate. E per questo è anche fondamentale nella lotta ai cambiamenti climatici minimizzando il più possibile l'impatto antropogenico. Può efficacemente coniugare produttività e salvaguardia dell'ambiente, oltre a fornire alimenti privi di residui tossici e più ricchi sia di sapore che di sostanze nutritive.

Per salvaguardare la fertilità naturale di un terreno gli agricoltori biologici utilizzano materiale organico, come il letame e, ricorrendo ad appropriate tecniche agricole, non lo sfruttano in modo intensivo. In agricoltura biologica, non si utilizzano sostanze chimiche di sintesi (concimi, diserbanti, anticrittogamici, insetticidi, pesticidi in genere). Alla difesa delle colture si provvede innanzitutto in via preventiva, selezionando specie resistenti alle malattie e adattate all'ambiente, intervenendo con tecniche di coltivazione appropriate, quali rotazioni, pacciamatura, sovescio, ecc. Si usano anche tecniche come la salvaguardia degli insetti utili, antagonisti dei parassiti.

Il ricorso a tecniche di coltivazione biologiche ricostruisce l'equilibrio nelle aziende agricole; qualora, comunque, si rendesse necessario intervenire per la difesa delle coltivazioni da parassiti ed altre avversità, l'agricoltore può fare ricorso esclusivamente alle sostanze di origine naturale, i cosiddetti biopesticidi, espressamente autorizzate e dettagliate dal Regolamento Europeo (con il criterio della così detta "lista positiva").

L'agricoltura biologica mira a raggiungere l'equilibrio tra i nutrienti fisici, chimici e le sfaccettature biologiche del suolo aidate dal miglioramento del contenuto di carbonio organico. Misurare, pianificare il cambiamento e assumere il controllo di questi tre aspetti offre una visione più completa della fertilità del suolo e un maggior grado di controllo sull'ambiente di coltivazione. Questo, insieme alle pratiche di gestione sostenibile, garantisce la stabilizzazione dei nostri suoli fragili in modo simile al modo in cui una spugna raccoglie l'acqua. Questa "spugna" immagazzina e rende disponibili alimenti vegetali, ha una maggiore capacità di trattenere l'acqua e migliora la vigorosa crescita delle radici. Molti agricoltori si sforzano di bilanciare i nutrienti chimici del suolo, ma i risultati non sono sufficienti senza che loro sappiano davvero il perché.

La biologia del suolo è fondamentale per rendere disponibili questi nutrienti applicati alla pianta e mettere in gioco le interrelazioni con la chimica del suolo (nutrizione) e le proprietà fisiche. Negli ultimi 50 anni le nostre pratiche agricole passate hanno decimato la biologia del suolo benefica, lasciando i nostri terreni senza vita.

Oggi l'agricoltura sta tornando ai principi di base dell'equilibrio di *Albrecht* dopo aver riconosciuto che l'agricoltura "convenzionale chimica" non è la soluzione. Le piante crescono sull'energia rilasciata dall'interazione dei nutrienti, questi nutrienti devono essere in un rapporto equilibrato per la massima crescita delle piante. L'equilibrio minerale è al centro di una fertilità equilibrata, che influisce sulla struttura del suolo, sulla pressione delle infestanti, sull'utilizzo dei nutrienti e sull'attività microbica. Quest'ultima rappresenta il centro dei cicli vegetali, in quanto basti pensare che esistono milioni e milioni di microrganismi nel suolo che aiutano a liberare e riciclare le sostanze nutritive dal suolo, rendendo le piante più sane e protette da eventuali patogeni. Questa vastissima gamma di microbi abbatte la materia organica e ed è responsabile della produzione di carbonio, fosforo, zolfo e molti altri cicli nutrizionali.

## 1.4 BIOPESTICIDI

Il termine Biopesticida nasce dalla contrazione di *biological based control agent* (agenti di lotta biologica) e nella sua definizione più ampia comprende tutti gli organismi viventi, o prodotti naturali derivati da tali organismi, in grado di contenere patogeni vegetali (Thakore, 2006; Kiewnick, 2007). Essi consistono pertanto in prodotti naturali, feromoni, geni, insetti predatori, microrganismi antagonisti, estratti vegetali e derivati di prodotti naturali.

Attualmente, nel campo della protezione vegetale, la definizione più appropriata di biopesticida consiste in un prodotto contenente molecole di origine biologica in grado di esercitare un'azione di controllo verso organismi patogeni.

Biopesticidi è un termine che comprende molti aspetti del controllo dei parassiti come:

- Organismi microbici (virali, batterici e fungini);
- Nematodi entomofori;
- Pesticidi di origine vegetale (botanici);
- Metaboliti secondari da microrganismi (antibiotici);
- Feromoni di insetti applicati per l'interruzione dell'accoppiamento, il monitoraggio o le strategie di richiamo e uccisione;
- I geni utilizzati per trasformare le colture per esprimere resistenza agli attacchi di insetti, funghi e virus o per renderli tolleranti all'applicazione di diserbanti.

L'*Environmental Protection Agency* (EPA) riconosce infatti tre classi di biopesticidi: biochimici, microrganismi e plant-incorporated protectants (derivati da tecnologia transgenica).

1. I pesticidi biochimici sono sostanze presenti in natura che controllano i parassiti mediante meccanismi non tossici per l'ecosistema. Essi includono sostanze che interferiscono con l'accoppiamento, come i feromoni sessuali di insetti, nonché vari estratti di piante profumate che attirano i parassiti degli insetti nelle trappole. A volte è difficile determinare se una sostanza soddisfa i criteri per la classificazione come pesticida biochimico.
2. I pesticidi microbici sono costituiti da un microrganismo (ad es. un batterio, un fungo, un virus o un protozoo) come ingrediente attivo. I pesticidi microbici possono controllare molti tipi di parassiti, sebbene ciascun ingrediente attivo

separato sia relativamente specifico per i suoi parassiti bersaglio. Ad esempio, ci sono funghi che controllano determinate malerbe e altri funghi che uccidono insetti specifici. I pesticidi microbici più utilizzati sono la sottospecie e i ceppi di *Bacillus thuringiensis* o BT. Ogni ceppo di questo batterio produce un diverso mix di proteine e uccide specificamente una o alcune specie correlate di larve di insetti. Mentre alcuni ingredienti Bt controllano le larve di falena presenti sulle piante, altri ingredienti Bt sono specifici per le larve di mosche e zanzare. Le specie di insetti bersaglio sono determinate dal fatto che il particolare Bt produca una proteina che può legarsi a un recettore intestinale larvale, causando così la fame delle larve di insetti.

3. Plant-Incorporated-Protectants (PIPs) sono sostanze pesticide che le piante producono da materiale genetico che è stato aggiunto alla pianta. Ad esempio, gli scienziati possono prendere il gene per la proteina pesticida Bt e introdurlo nel materiale genetico della pianta. Quindi la pianta, anziché il batterio Bt, produce la sostanza che distrugge il parassita.

I biopesticidi presentano diversi vantaggi: sono, di solito, intrinsecamente meno tossici dei pesticidi convenzionali e generalmente colpiscono solo i parassiti bersaglio (maggior selettività) e gli organismi strettamente correlati, a differenza dei pesticidi convenzionali ad ampio spettro che possono colpire organismi diversi come uccelli, insetti e mammiferi.

Inoltre, sono spesso efficaci in quantità molto ridotte e spesso si decompongono rapidamente, con conseguenti esposizioni più basse ed evitando in gran parte i problemi di inquinamento causati dai pesticidi convenzionali. Se utilizzati come componente dei programmi di gestione integrata dei parassiti (IPM), i biopesticidi possono ridurre notevolmente l'uso di pesticidi convenzionali.

Il mercato dei biopesticidi è in continua crescita nell'ultimo decennio (Figura 4); nel frattempo, nonostante il fatturato si mantenga comunque alto, si nota un costante calo delle vendite dei prodotti agrochimici. La motivazione di questa opposta tendenza risiede nei problemi di tossicità ambientale e sviluppo di resistenze da parte degli organismi patogeni a seguito dell'utilizzo persistente dei prodotti di sintesi. Per queste ragioni, all'interno delle serre di alcuni paesi Europei (come Olanda e Spagna) l'impiego della lotta biologica rappresenta ormai il più comune metodo di difesa contro i patogeni delle piante.

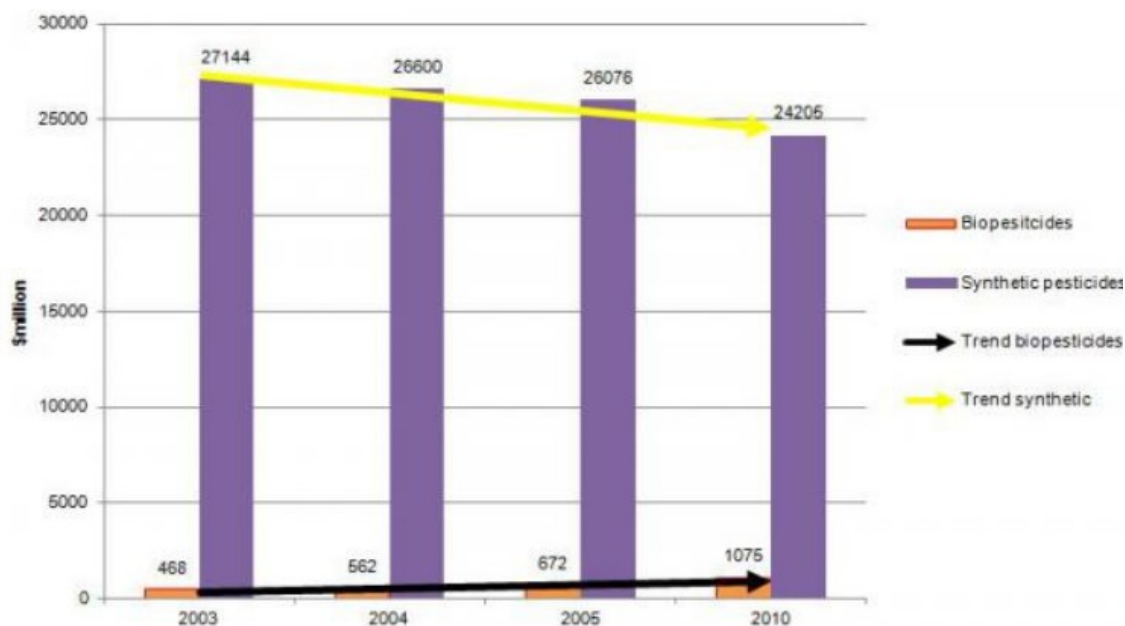


Figura 4: Andamento vendite di biopesticidi e di pesticidi di sintesi (2003 – 2010)

Oltre a quanto sopra illustrato vi sono altri aspetti emergenti che incidono sulla riduzione dell'utilizzo dei pesticidi. In primo luogo, si osserva una maggior attenzione da parte dei consumatori che manifestano sempre più preferenze verso prodotti con un presunto basso residuo di pesticidi e con ridotto impatto ambientale. In secondo luogo, le nuove correnti di pensiero relative alla difesa tendono ad evidenziare come l'attuazione di una protezione delle piante sostenibile sia sempre più rivolta a mettere in pratica meccanismi rivolti a contenere il patogeno, ma piuttosto a contenerlo (Cowen et al. 1996). Secondo questo approccio ogni organismo, anche se patogeno, svolgerebbe una funzione all'interno dell'ecosistema per cui la sua eradicazione dall'ambiente determinerebbe degli squilibri tra le popolazioni esistenti.

Un altro aspetto da porre in evidenza rappresenta l'importanza dei biopesticidi come strumento fondamentale per l'attuazione della lotta integrata (*Integrated Pest Management*). L'Unione Europea, nella sua Direttiva 2009/128/EC, richiede agli Stati membri l'implementazione della lotta integrata; in Italia venne recepito dal decreto legislativo 14 agosto 2012, n. 150 recante: «Attuazione della direttiva 2009/128/CE che istituisce un quadro per l'azione comunitaria ai fini dell'utilizzo sostenibile dei pesticidi». Tale decreto legislativo è stato recepito anche all'interno dei Programmi di Sviluppo Rurale di alcune Regioni italiane. Esiste pertanto una significativa tendenza, anche determinata dalle *policy*, verso un ridotto impiego degli agrofarmaci convenzionali a favore dell'utilizzo di metodi a basso impatto ambientale.

### 1.4.1 Biofungicidi

Tabella 2: Alcuni fungicidi naturali e loro modalità d'azione.

<b>Organismo</b>	<b>Modalità d'azione</b>
<i>Ampelomyces quisqualis</i>	<p>Microrganismo fungino, antioidico, impiegato per la difesa biologica della vite e di altre colture fra cui fragola, solanacee ed ornamentali. È un fungo comunemente presente in natura che vive a spese di tutti gli oidi.</p> <p>Le spore di <i>A. quisqualis</i>, distribuite con il trattamento, una volta giunte a contatto con il micelio dell'ospite, germinano e danno origine ad un tubetto che parassitizza il micelio dell'oidio penetrando al suo interno.</p>
<i>Trichoderma harzianum</i> , <i>t. viride</i> , <i>t. asperellum</i>	Attivi contro diversi patogeni tellurici tra cui <i>Rhizoctonia</i> spp, <i>sclerotium rolfsii</i> , <i>verticillium</i> spp, <i>phytophthora</i> caspici, ecc
<i>Coniothyrium minitans</i>	Efficace contro le varie specie di sclerotinie di numerose orticole ed altre colture. Il prodotto deve essere applicato al terreno o sui residui della coltura precedente. Una volta incorporato nel suolo, attacca gli sclerozi del patogeno che sono strutture del fungo patogeno atte alla sua proliferazione.
<i>Bacillus subtilis</i>	Batterio ubiquitario che agisce nei confronti di diverse crittogame e batteriosi, con modalità preventive, sottraendo sostanze nutritive e spazio ai microrganismi patogeni.
<b>Blasticidin</b>	È un fungicida di contatto con azione protettiva e curativa e presenta una vasta gamma di attività inibitorie sulla crescita di cellule batteriche e fungine. La blasticidina impedisce la crescita di cellule eucariotiche e procariotiche. Funziona inibendo la fase di terminazione della traduzione e la formazione del legame peptidico da parte del ribosoma. Ciò significa che le cellule non possono più produrre nuove proteine attraverso la traduzione di mRNA.

<b>Natamicina</b>	un metabolita secondario degli <i>Actinomycetes Streptomyces natalensis</i> e <i>S. chattanoogensis</i> . Controlla le malattie fungine, in particolare marciumi causati da <i>Fusarium osisporum</i>
<b>Poliossine</b>	Sono fungicidi sistemici con azione protettiva. Particolarmente efficace contro la macchia nera di pera e la macchia di sughero di mele ( <i>Alternaria spp</i> ), <i>Botrytis cinerea</i> <i>Pers</i> e altri patogeni vegetali.
<b>Cantaridina e Norcantaridina</b>	Biofungicidi utilizzati per il controllo di <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Botryosphaeria berengeriana</i> , <i>Glomerella cingulate</i> , <i>Alternaria solani</i> e <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
<b><i>Clonostachys rosea</i> f. <i>Catenulata</i></b>	E' un agente biologico fungino Viene utilizzato contro Pythium, Rhizoctonia, Fusarium e Botrytis sulle culture.



## 1.4.2 Bioinsetticidi

Tabella 3: Alcuni insetticidi naturali e loro modalità d'azione.

<b>Organismo</b>	<b>Modalità d'azione</b>
<b>Nicotina e nornicotina</b>	Estrate dal tabacco, e sono state i primi insetticidi di origine naturale ad essere utilizzate. Il loro utilizzo si presta bene alla concia delle sementi, a trattamenti fogliari e trattamenti granulari.
<b>Piretro</b>	Valida capacità antisettica grazie alla presenza di metaboliti secondari prodotti da una pianta del genere " <i>Chrysanthemum</i> ", appartenente alla famiglia delle <i>Asteraceae</i> . Queste sostanze sono contenute in maggior modo nei fiori.
<b>Rotenone</b>	Insetticida naturale, viene estratto dalle radici delle piante <i>Derris e Lonchocarpus</i> , dalle foglie e dai semi della pianta <i>Tephrosia</i> della famiglia delle <i>Fabaceae</i> . Il rotenone è un insetticida attivo per contatto che per ingestione.
<b>Azadiractina</b>	Insetticida naturale estratto dall'albero tropicale del <i>Neem</i> (albero originario dell'India). Esso agisce per ingestione e secondariamente per contatto.
<b>Rianodina</b>	Viene estratta dalle radici della <i>Ryania speciosa</i> , appartenente alla famiglia delle <i>Flacourtiaceae</i> ,
<b>Spinosad</b>	Sviluppata come alternativa naturale contro gli insetticidi di sintesi, è ottenuta dalla fermentazione del batterio <i>Sacharopolyspora spinosa</i> . Il suo modo d'azione avviene sia per ingestione che per contatto.
<b><i>Bacillus thuringiensis</i></b>	Batterio sporigeno che vive nel terreno, la sua modalità d'azione è per ingestione, il quale una volta dentro l'insetto danneggia il tratto digerente portandolo alla morte.
<b><i>Verticillium lecanii</i></b>	Si utilizzano due ceppi di questo fungo per il controllo degli afidi e dei tripidi.

<b><i>Metarhizium anisopliae Sorok</i></b>	Fungo efficace contro Coleotteri e Lepidotteri in diverse colture ornamentali. Attacca l'insetto bersaglio penetrando nella sua cuticola e invadendo l'emolinfa. Quando viene applicato come spray fogliare alle colture infestate, l'entomopatogeno invade e immobilizza l'insetto entro 2 giorni, con la morte che si verifica dopo 7-10 giorni.
<b><i>Paecilomyces fumosoroseu</i></b>	Fungo entomopatogeno utilizzato per il controllo di diversi afidi, tripidi e acari su colture ornamentali e alimentari sia in campo che in serra. Efficace anche contro l'oidio del cetriolo.
<b><i>Steinernema e Heterorhabditis</i></b>	Generi di nematodi entomopatogeni che si nutrono di molti insetti dannosi alle colture, quali: larve di coleotteri, lepidotteri, punteruolo rosso, grillotalpe, ecc.
<b><i>Beauveria bassiana</i></b>	Fungo entomopatogeno le cui spore entrano in contatto con il corpo di un insetto suscettibile, si introducono nel corpo, germinano e vi si sviluppano, uccidendo l'insetto ed utilizzandolo come fonte di nutrimento. Agisce contro baco da seta, termiti e anche zanzare portatrici di malaria.
<b><i>Beauveria brongniari</i></b>	Fungo entomopatogeno isolato in Madagascar. Agisce contro le larve bianche, scarabeo delle patate, ecc.

### **1.4.3 Bioerbicidi**

Tabella 4: Alcuni erbicidi naturali e loro modalità d'azione.

<b>Organismo</b>	<b>Modalità d'azione</b>
<b>Bilanafos</b>	È stata originariamente isolata dall' <i>Actinomycete Streptomyces hygroscopicus</i> . Bilanafos-sodium è un erbicida totale usato in post-emergenza nelle viti, melo, cucurbitacee, azalee, gelsi; anche altre erbacce annuali in situazioni di coltura e il controllo delle erbacce annuali e perenni in terreni incolti.
<b>Acido Pelargonico</b>	Utilizzato come erbicida naturale totale.
<b><i>Pseudomonas gladioli</i> pv <i>gladioli</i></b>	Batterio commercializzato come erbicida biologico, per il controllo di <i>Poa annua L.</i> in un tappeto erboso.
<b><i>Purpureum chondrostereum</i></b>	Fungo utilizzato come micoerbicida nelle foreste per prevenire la ricrescita di alberi di parassiti indesiderati come la ciliegia nera americana la betulla gialla e il pioppo.
<b>Leptospermone</b>	Erbicida $\beta$ -triketone naturale, isolato dall'olio essenziale distillato dall'albero di Manuka ( <i>Leptospermum scoparium</i> ), è stato utilizzato come erbicida per controllare diverse infestanti a foglia larga ed erbacee in diverse colture.
<b><i>Phytophthora palmivora</i></b>	È un fungo patogeno del suolo naturale utilizzato per controllare la vite strangolatore (vite di alghe) in agrumi e altre colture perenni, invadendo la vite strangolatore attraverso le radici.

## 2. SCOPO DELLA TESI

L'effetto di pesticidi di sintesi sulla microflora dei suoli è ben noto e riportato in una grande quantità di ricerche e sperimentazioni considerando che oltre il 99,7% persiste e si accumula nell'ambiente, subendo vari processi di catabolismo fisico-chimico e biodegradazione che sono strettamente associati alla composizione e all'attività della comunità microbica del suolo. I microrganismi del suolo svolgono funzioni chiave in molti processi vitali del suolo, come la decomposizione della sostanza organica e il ciclo dei nutrienti, e sono responsabili in larga misura della funzione degli ecosistemi del suolo. Pertanto, qualsiasi perdita della struttura della comunità microbica del suolo potrebbe comportare cambiamenti significativi nella sua fertilità che rappresenta un pre-requisito per la crescita delle piante.

La presente tesi prende in rassegna le attuali conclusioni della ricerca scientifica e della sperimentazione in merito agli effetti dei pesticidi di origine naturale sulla componente microbica del suolo.

Grazie alla origine naturale (vegetali, animali, microorganismi), i biopesticidi sono sempre più utilizzati per sostituire i pesticidi sintetici nel controllo dei parassiti; è comunque necessario valutare gli effetti che questi possono avere sulla componente microbica del suolo.

La tesi ha lo scopo principale di valutare alcuni report scientifici che prendono in esame gli effetti dei biopesticidi sulle comunità microbiche del suolo, effettuando anche comparazioni dirette tra pesticidi naturali e di sintesi, descrivendo le tecniche analitiche utilizzate, che nel tempo hanno subito notevoli miglioramenti, passando da analisi di tipo quantitativo come la misura del carbonio-biomassa e della respirazione basale ad analisi di tipo qualitativo e specifico come i saggi enzimatici e più di recente le tecniche biomolecolari come la DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e le NGS (*Next-Generation Sequencing*).

### 3. TECNICHE UTILIZZATE PER LA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEI PESTICIDI SULLE COMUNITÀ MICROBICHE DEL SUOLO

In passato, tra le tecniche analitiche più diffuse per la valutazione dei pesticidi sulla microflora del suolo sono stati utilizzati differenti metodi, per una valutazione di tipo quantitativo, mirati alla valutazione della crescita e dell'attività della biomassa microbica, che sono descritti di seguito.

- Carbonio Organico Totale (TOC): misura diretta della concentrazione di carbonio organico totale nel campione di suolo (Springer & Klee, 1954). È stato determinato per combustione mediante *Carbon Analyzer* LECO RC612; il campione viene riscaldato in una corrente di ossigeno fino a circa a 600°C, e tutto il carbonio presente viene ossidato a CO<sub>2</sub>. La quantità di CO<sub>2</sub> rilasciata è misurata mediante spettroscopia ad assorbimento infrarosso e convertita in TOC, previa calibrazione.

- La biomassa microbica (Cmic), un'analisi di tipo quantitativo che consiste nella misurazione della quantità di biomassa microbica rimasta nel suolo in seguito al trattamento con pesticidi. Esprime la quantità di carbonio microbico presente nel suolo in mg C kg<sup>-1</sup> suolo, è stata determinata secondo il metodo della fumigazione-estrazione con cloroformio per avere lisi cellulare e successiva estrazione (Vance et al., 1987) su campioni di suolo secco ricondizionati per 10 giorni alla capacità di campo e incubati al buio a 30°C. Sui campioni fumigati e non fumigati si estrae il materiale cellulare con una soluzione di K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Sugli estratti così ottenuti si procede alla determinazione del carbonio organico totale della biomassa mediante ossidazione con bicromato di potassio in ambiente acido. La biomassa microbica è data dalla differenza tra la quantità di C nei campioni non fumigati e fumigati.

La biomassa microbica è un indicatore molto sensibile di cambiamento delle condizioni del suolo. Le variazioni quantitative della biomassa microbica e della sua attività costituiscono un preallarme dei cambiamenti della microflora.

- La respirazione basale (Cbas, mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> suolo d<sup>-1</sup>) e la respirazione cumulativa (Ccum, mg C-CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> suolo) rappresentano rispettivamente l'emissione oraria di CO<sub>2</sub> in assenza di substrato organico all'ultimo giorno di incubazione e quella totale emessa durante tutto l'arco di incubazione (Isermayer et al., 1952). I campioni di suolo secco sono riportati alla capacità di campo e incubati al buio a 30°C in contenitori di vetro a chiusura ermetica, insieme a un becker contenente una soluzione di idrossido di sodio. Durante l'incubazione si determina la

CO<sub>2</sub> emessa mediante titolazione con acido cloridrico dopo l'aggiunta di cloruro di bario e di un indicatore per titolazione acido-base (fenolfaleina) ad intervalli di tempo prefissati (1, 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21 e 28 giorni), da cui si ricava la curva di respirazione potenziale mediante la formula  $C_t = C_0(1 - e^{-kt})$ , dove t è il tempo di incubazione, C<sub>t</sub> è la CO<sub>2</sub> emessa al tempo t e k la costante cinetica della respirazione (Riffaldi et al., 1996).

A volte può succedere che la respirazione potrebbe aumentare non perché la popolazione microbica sia elevata, bensì perché è in stress, quindi aumenta la respirazione basale per condizioni di "stress" microbico.

La respirazione sia aerobica che anaerobica, produce energia a partire da composti organici e inorganici ridotti che fungono da donatori primari di elettroni mentre composti ossidati servono da accettori terminali di elettroni. L'energia contenuta nei composti ridotti si sposta attraverso una catena di reazioni redox a cascata facenti parte di importanti vie metaboliche quali la glicolisi, il ciclo di Krebs e la catena di trasporto degli elettroni. La respirazione basale del suolo, misurata come evoluzione di CO<sub>2</sub>, rappresenta una stima del metabolismo degli organismi edafici; più ricca e più attiva è la comunità edafica, maggiore è l'evoluzione di anidride carbonica. Secondo Parker e Doxtader (1983) l'attività microbica è responsabile del 71% dell'evoluzione totale di CO<sub>2</sub> dal suolo e può essere considerato come una misura dell'attività di decomposizione microbica. Il naturale utilizzo di substrati organici da parte della comunità microbica del suolo produce anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), che viene stoccata nei pori del suolo ed emessa in atmosfera tramite processo diffusivo dovuto al gradiente di concentrazione. Data l'immensa variabilità della risposta degli indici microbici ad una moltitudine di ambientali, potrebbe essere complicato mettere in relazione queste misure con la qualità del suolo. Valori più elevati di quoziente metabolico (qCO<sub>2</sub>) implicano un'attività microbica maggiore, in pratica i microrganismi richiedono più carbonio e spendono più energia per la respirazione piuttosto che aumentare la biomassa. Il quoziente metabolico (qCO<sub>2</sub>) rappresenta l'attività dei microrganismi del suolo, precisamente il tasso di respirazione specifica su base oraria espresso dal rapporto tra respirazione basale e biomassa microbica ( $\text{mg C-CO}_2/\text{mg Cmic}/24 \cdot 100$ , dove 24 sono le ore di un giorno (Anderson and Domsch, 1990; 1993). Il quoziente di mineralizzazione (qM) esprime su base percentuale la quantità di C respirato (ovvero mineralizzato) rispetto a quello iniziale nel suolo, si calcola quindi come  $(C_{\text{cum}}/\text{TOC}) \cdot 100$  (Dommergues et al. 1960). Il qM indica l'efficienza con cui i microrganismi metabolizzano la sostanza organica del suolo, espressa in % dal rapporto tra respirazione cumulativa e carbonio organico totale.

Tra gli indicatori biochimici dell'attività della biomassa microbica abbiamo anche :

- Azoto potenzialmente mineralizzabile (No) Viene stimato dosando analiticamente l'N inorganico prodotto, senza aggiunta di substrati, in esperimenti di laboratorio in un intervallo di tempo definito ed in condizioni controllate. Incubazioni di breve periodo (a 30 °C per 15 giorni) ed estrazione con 2M KCl (Bremner et al. 1965). Incubazioni di lungo periodo (a 35 °C per 30 settimane) ed estrazione con 0.01 M CaCl<sub>2</sub> (Stanford e Smith, 1972).
- Determinazione del potenziale nitrificante/ammonizzante, si utilizzano substrati degradabili che stimolano l'attività dei microrganismi del suolo, quali (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, caseina lattica, arginina.
- Il rapporto C/N è un indice della disponibilità di azoto delle colture in funzione della quantità di carbonio presente nella sostanza organica del suolo.

Più recentemente, sono stati utilizzati analisi di tipo qualitativo e specifico come i saggi enzimatici, mirati soprattutto a determinare l'attività della biomassa microbica di un suolo.

- L'idrolisi del diacetato di fluoresceina (FDA); un indicatore alternativo dell'attività idrolitica complessiva del suolo, che riassume l'attività di numerosi enzimi quali: proteasi, lipasi, esterasi. L'attività di questi enzimi si traduce nella scissione idrolitica della FDA (incolore) in fluorescina (giallo-verde fluorescente) rilevata utilizzando uno spettrofluorometro.

Gli organismi che degradano le piante e altri residui organici sono stati identificati come i principali contributori dell'attività enzimatica del suolo. Pertanto, poiché l'idrolisi della FDA è un saggio ad ampio raggio delle attività dell'idrolasi del suolo, dovrebbe rappresentare l'attività microbica e avere un ruolo importante nell'ecologia microbica del suolo.

Attualmente, la ricerca è basata su diverse tecniche biomolecolari che vengono utilizzate per studiare il cambiamento nella struttura e determinare la composizione in generi e specie, oltre a valutare l'attività e le funzioni della comunità microbica in risposta all'applicazione di pesticidi sia naturali che di sintesi.

Sono state introdotte nuove metodologie utilizzando nuovi approcci che coinvolgono l'estrazione del DNA e sequenziamento, per caratterizzare la popolazione microbica e il danno al DNA per determinare l'effetto degli invertebrati sul suolo.

Negli ultimi anni, vengono utilizzate tecniche di *fingerprinting* molecolare basate su PCR (*Polymerase Chain Reaction*), fornendo un confronto diretto sulla panoramica della composizione e diversità del microbiota del suolo, sostituendo la maggior parte dei metodi analitici.

Tra i più utilizzati c'è *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) e più recentemente *Next Generation Sequencing* (NGS), che utilizzano geni biomarcatori di DNA e RNA come strumenti molecolari per valutare i cambiamenti nella comunità microbica.

- Elettroforesi su gel a gradiente denaturante (DGGE): è una tecnica di separazione di acidi nucleici applicata per l'identificazione di specie microbiche in ecosistemi complessi, che rappresenta un esempio specifico di monitoraggio molecolare diretto per la microbiologia del suolo. La DGGE si basa sulla separazione di frammenti di DNA amplificati via PCR (con un primer con GC-clamp in 5') parzialmente denaturati con la stessa lunghezza ma con una differente sequenza mediante elettroforesi su gel di poliacrilamide contenente un gradiente lineare di agenti denaturanti di tipo chimico (urea e formaldeide). Rispetto alle altre tecniche molecolari basate sul *fingerprinting* degli acidi nucleici, la tecnica DGGE offre il vantaggio di fornire una analisi qualitativa (*richness*) e semiquantitativa (*evenness*) della comunità microbica (Muyzer et al., 1993).

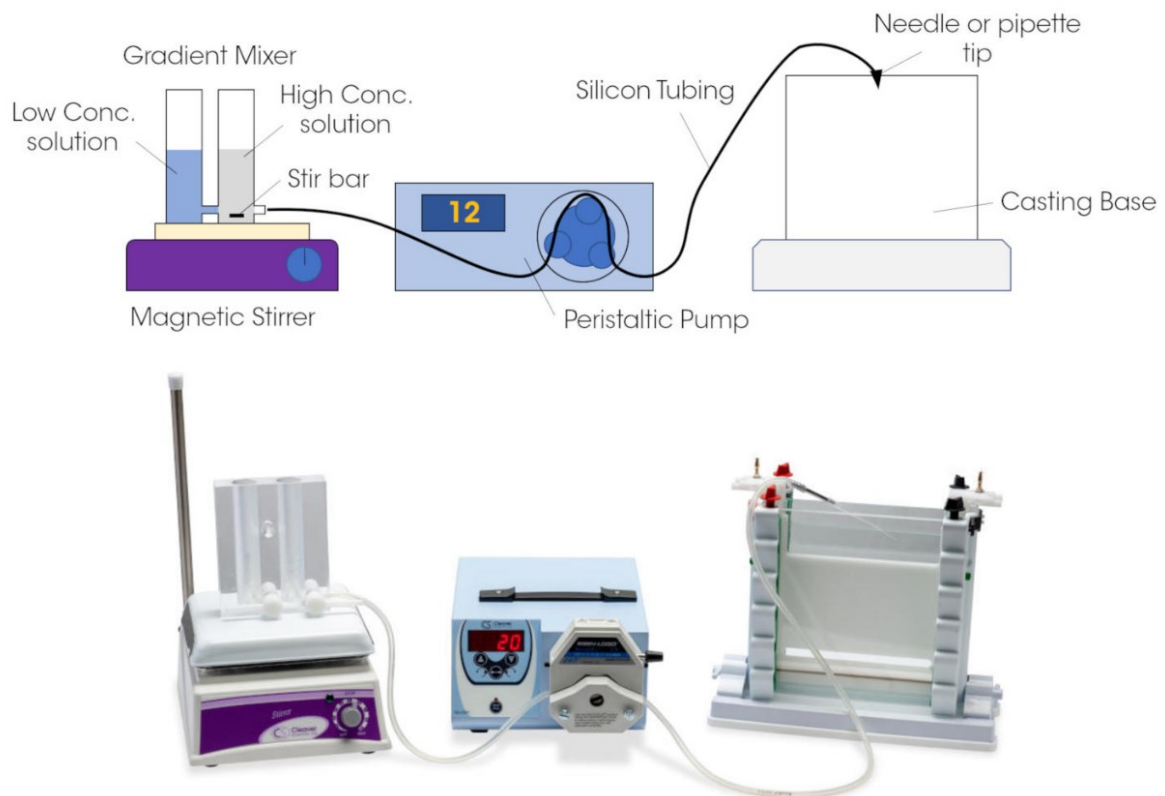


Figura 5: Rappresentazione del sistema DGGE

Per ottenere risultati ottimali in analisi DGGE, il primo aspetto pratico riguarda l'estrazione di alta qualità del DNA totale dai campioni e quindi il controllo dell'amplificazione tramite PCR



selezionando primer universali destinati a una parte delle sequenze di rRNA 16S o 18S rispettivamente per batteri e funghi. DGGE è stata originariamente sviluppata per rilevare piccoli cambiamenti di mutazione nelle sequenze di DNA, ma la tecnica è stata applicata per analisi microbiche trasversali grazie ad evidenti vantaggi, quali: la rapidità, l'alta riproducibilità e i bassi costi. DGGE è comunemente impiegato per studi di ecologia microbica del suolo al fine di monitorare la struttura e le dinamiche della popolazione nel tempo, soprattutto per la sua capacità di fornire un profilo rappresentativo della diversità microbica nei suoli. Risulta uno strumento utile per la valutazione rapida dei profili microbici in complessi ecosistemi.

I protocolli DGGE ottimizzati per l'uso con il DNA del suolo costituiscono un metodo consolidato e affidabile che può essere utilizzato per ottenere un quadro completo della diversità e dinamica dei microbi (Vischetti et al., 2020).

Altre tecniche sono: DGGT (Elettroforesi su gel con gradiente di temperatura), T-RFLP (polimorfismo della lunghezza del frammento di restrizione terminale), LH-PCR (PCR dell'eterogeneità della lunghezza).

(Gao et al., 2012) hanno confrontato le tecniche DGGE e T-RFLP per monitorare l'effetto di un pesticida naturale, *Pseudomonas fluorescens* 2P24, sulla comunità fungina del suolo nella rizosfera dei cetrioli. In questo caso, i risultati della DGGE hanno indicato che la comunità fungina era scioccata all'inizio dello studio, ma è migliorata gradualmente dopo un mese, con il calo di *P. fluorescens* 2P24. Questo studio ha rivelato l'effetto transitorio degli agenti di controllo biologico contro le popolazioni microbiche. Analogamente, hanno studiato l'effetto del *Bacillus subtilis* B579, un altro naturale pesticida biologico, sulla struttura della comunità dei rizobatteri, utilizzando l'analisi basata sulla coltivazione accoppiata con DGGE per profilare i cambiamenti della struttura della comunità batterica. Come previsto, anche in questo caso l'analisi ha rivelato un effetto minimo e transitorio sulle popolazioni microbiche.

DGGE è una tecnica preliminare per evidenziare velocemente le principali differenze nella composizione della comunità microbica, in grado di dare ulteriori informazioni se accoppiate con approcci microbiologici dipendenti dalla coltura; mentre, si possono ottenere valutazioni più approfondite con tecniche ad alto rendimento come con NGS.

- Next Generation Sequencing (NGS): fino a pochi anni fa i metodi utilizzati per il sequenziamento si basavano sul metodo di *Sanger*, il quale però risulta avere notevoli svantaggi soprattutto per quanto riguarda la necessità di utilizzare gel per la corsa elettroforetica dei frammenti, il basso numero di campioni analizzabile in parallelo e la difficoltà di automatizzazione del processo. Oggi le tre piattaforme di sequenziamento di nuova generazione che stanno avendo maggiore impatto sul mondo scientifico sono il 454 della *Roche*, il *Solexa* dell'*Illumina* ed il *Solid* dell'*Applied Biosystem*. Rispetto alle tecniche basate sul metodo di *Sanger*, queste nuove tecniche di sequenziamento sono caratterizzate da una più alta velocità ed elevate prestazioni che permettono di ridurre drasticamente i tempi ed i costi di sequenziamento.

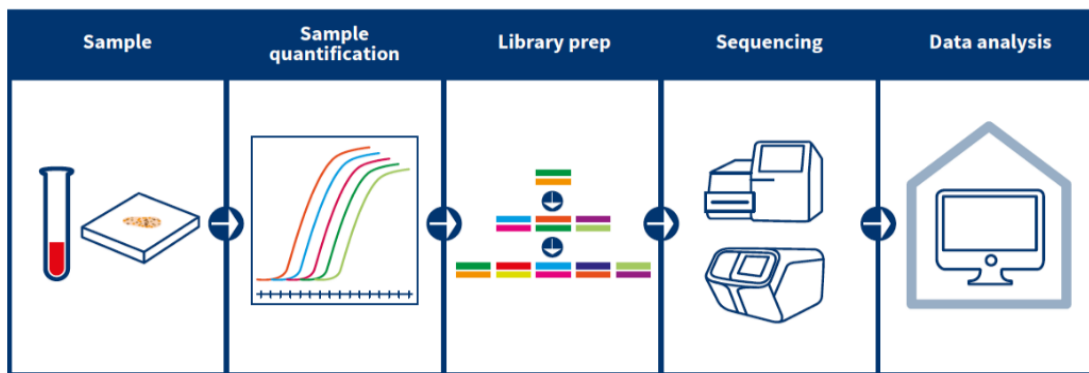


Figura 6: Schema del funzionamento di un sistema NGS

NGS sono metodi di sequenziamento avanzati che consentono il sequenziamento nucleotidico ad alta velocità di milioni di filamenti di DNA in parallelo che permette di ottenere in poco tempo una grande mole di dati; è infatti necessario il ricorso ad avanzati sistemi bioinformatica per la gestione dell'informazione ottenuta dal sequenziamento. Il principale svantaggio delle nuove tecniche è la ridotta lunghezza dei *reads*; ciò comporta, nella fase di allineamento e assemblaggio, la generazione di errori, dei quali, seppur presenti in numero piuttosto basso, bisogna tener conto. Anche se le prestazioni delle varie tecnologie sono in continua evoluzione, e i dati a disposizione sono perciò molto spesso discordanti, è possibile fare comunque un confronto tra esse.

I diversi metodi NGS utilizzano diversi processi biochimici, esistono tuttavia delle linee guida comuni. Il primo passo consiste nella preparazione della libreria da andare poi a sequenziare; dopodiché si opera un meccanismo amplificazione, in modo da aumentare di parecchio il numero di copie, con la generazione di cluster. È proprio questa operazione a imporre delle

limitazioni riguardo alla lunghezza dei *reads*: infatti ciascuna copia dello stesso frammento deve crescere alla stessa velocità delle altre, in modo tale che non ci siano disparità di lunghezza tra esse, fatto che ne comporterebbe una diversificazione, introducendo un errore nel *sequencing*. Infine, c'è il processo di sequenziamento vero e proprio, il quale è fatto solitamente via sintesi, e il conseguente immagazzinamento dei dati (Wiedmann et al., 2019). È un metodo utile per comprendere l'impatto dei pesticidi sui microrganismi del suolo, anche nella rizosfera, sia a breve che a lungo termine. NGS, oltre a rivelare l'efficacia del pesticida applicato sul suo obiettivo, può anche rivelare un impatto non intenzionale del pesticida attraverso lo screening di gruppi non bersaglio presenti nel suolo (Shokralla et al., 2012).

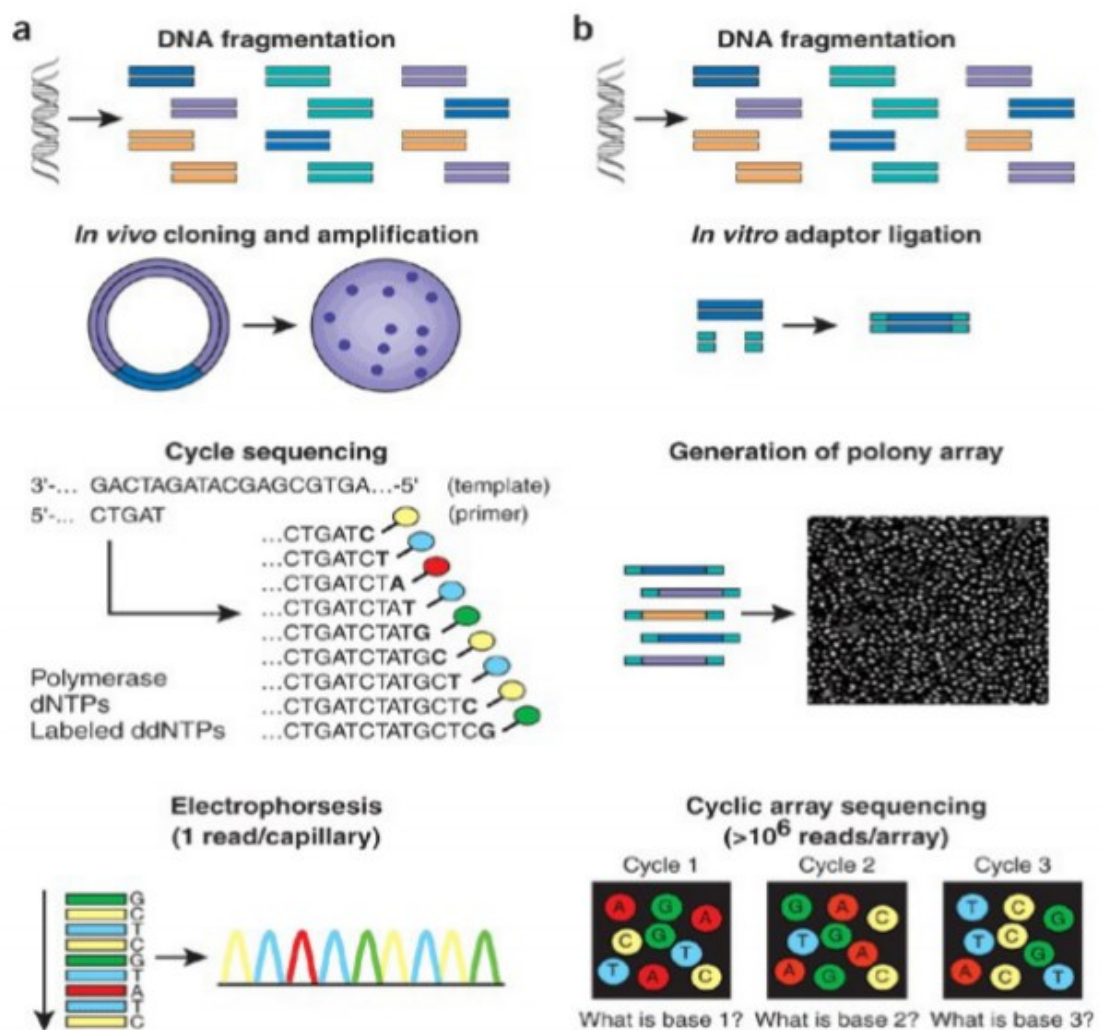


Figura 7: Flusso di lavoro tipico dei metodi NGS (b) rapportato al metodo Sanger (a). È possibile notare il processo di creazione di cluster, o polony (polymerase colony).

#### **4. REPORT SCIENTIFICI SUGLI EFFETTI DEI BIOPESCIDI SULLA DIVERSITA' MICROBICA DEL SUOLO**

Nonostante una spinta mondiale verso una produzione agricola sostenibile, la gestione dei parassiti si basa fortemente sull'uso di diversi tipi di pesticidi. L'uso di questi prodotti sintetici in agricoltura è sempre più dibattuto. Ad esempio, in Europa vengono vendute circa 380.000 tonnellate di pesticidi sintetici e inorganici (media tra il 2011 e il 2017 per 28 paesi europei). Sono spesso presentati come essenziali per la sicurezza alimentare, però il loro uso rimane una questione controversa in prima linea nella regolamentazione nella maggior parte dei paesi. In effetti, i pesticidi possono anche colpire organismi non bersaglio, contaminare il suolo e l'acqua, e costituiscono un rischio per la salute umana. Possono persistere nell'ambiente e raggiungere gli ecosistemi vicini; avendo un impatto sulla biodiversità locale, comprese piante e animali selvatici, nonché gli organismi acquatici (Puglisi et al., 2012). Inoltre, la degradazione dei pesticidi può portare alla produzione di metaboliti dannosi.

Tra i diversi agrofarmaci è sempre più diffuso l'uso di biopesticidi, per sopprimere direttamente o indirettamente la densità della popolazione e quindi l'impatto di un organismo nocivo specifico. Grazie della loro origine naturale e della loro specificità, si presume spesso che siano più sicuri per l'uomo e l'ambiente rispetto ai prodotti di controllo chimico. Tuttavia, la manipolazione della biodiversità microbica può influire sulla dimensione della popolazione di determinati taxa, sulle sue interazioni con altri taxa e quindi sulla struttura delle comunità microbiche.

Pochi studi hanno confrontato l'impatto dei pesticidi sintetici e dei biopesticidi alternativi sui microrganismi del suolo non bersaglio che svolgono importanti funzioni ecosistemiche, ricoprendo un ruolo centrale sulla fertilità del suolo.

È comunque importante studiare gli effetti che questi nuovi prodotti possono avere sulla componente microbica dei suoli e confrontarli, dove possibile, con quelli operati dai pesticidi di sintesi.

Nei prossimi paragrafi vengono descritti i lavori scientifici svolti sugli effetti dei biopesticidi sulle comunità microbiche del suolo.

#### 4.1 EFFETTI DI BIOFUNGICIDI

L'applicazione diretta o indiretta di fungicidi naturali e di sintesi possono avere un impatto negativo sulle popolazioni microbiche del suolo, interferendo anche con specifici enzimi e reazioni biochimiche.

Fournier et al., (2020) hanno effettuato uno studio per confrontare l'impatto di un biopesticida microbico *Clonostachys rosea f. Catenulata* e un fungicida sintetico costituito da Fosetyl-Al e Propamocarb-hydrochloride sulla diversità tassonomica, composizione funzionale e sulla presenza relativa nel tempo delle comunità microbiche del suolo (batteri, funghi e protisti) in mesocosmi di suolo, utilizzando diversi substrati ed effettuando il sequenziamento di ampliconi ad alto rendimento. *Clonostachys rosea f. Catenulata* è un agente biologico fungino attivo del biopesticida PRESTOP® (prodotto da Lallemand), è un iperparassita delle pareti cellulari dei patogeni delle piante che colonizza le radici e le foglie. Viene utilizzato contro *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Fusarium* e *Botrytis* sulle culture. Il suolo utilizzato è rappresentato da terreno argilloso caratterizzato da 37,4% di sabbia, 43,1% di limo e 19,5% di argilla, un pH di 7,8, 2,2% di sostanza organica e 5,5% di carbonati. I trattamenti effettuati includevano un controllo (C) con aggiunta di sola acqua distillata, un'applicazione del fungicida sintetico a dose standard a 3 gr a m<sup>2</sup> (P), un'applicazione del biopesticida a dose standard (B1), tre applicazioni del biopesticida alla dose standard (B3) e tre applicazioni successive del biopesticida a una dose 10 volte superiore alla dose standard (B10). Sono stati principalmente studiati con metodi indiretti o dipendenti dalla cultura, tra cui misurazioni del carbonio microbico e dell'azoto conteggio delle unità formanti colonie, misurazioni generali dell'attività microbica come attività enzimatica o respirazione del suolo e metodi di impronte digitali. Gli estratti di DNA sono stati quantificati utilizzando uno spettrofotometro *Quawell* q9000, per l'amplificazione PCR e il sequenziamento *MiSeq Illumina*.

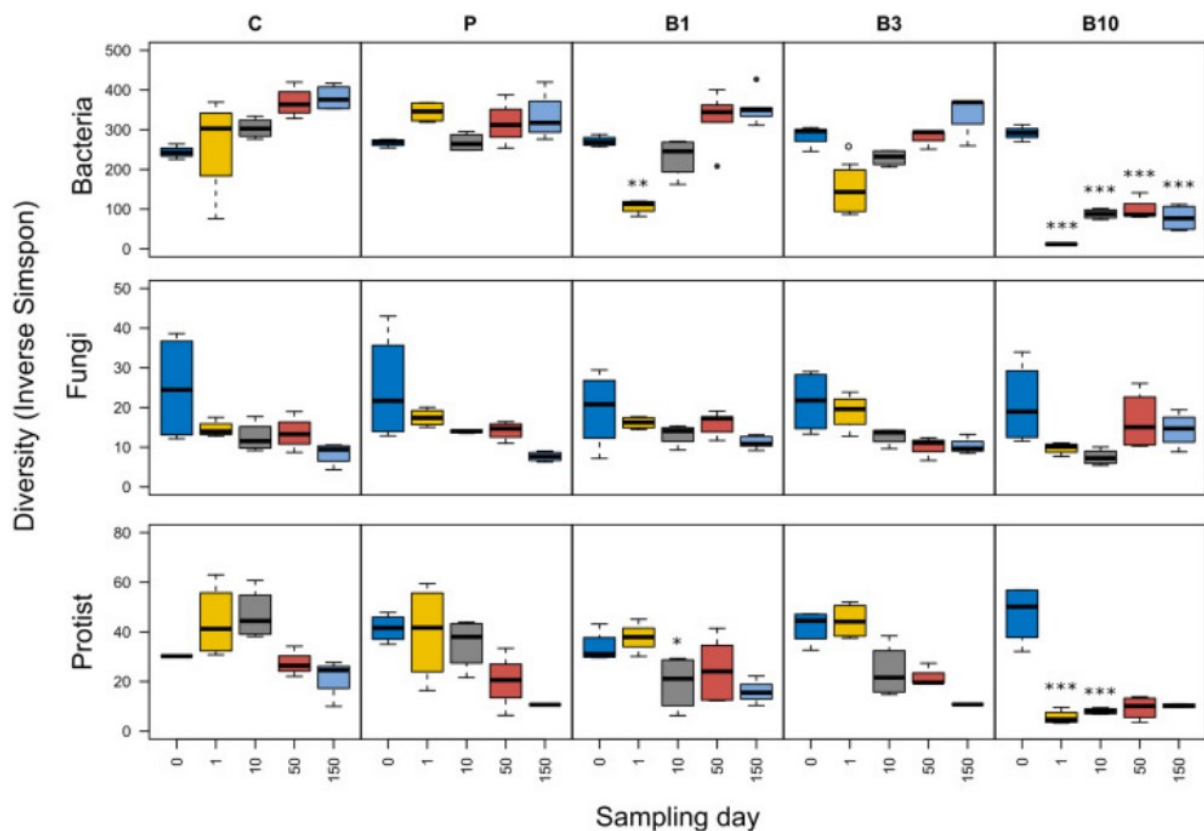


Figura 8: Cambiamenti della diversità (Simpson) nelle comunità microbiche del suolo indotti da Fosetyl-Al e Propamocarb-hydrochloride (P) e da diverse dosi di *Clonostachys rosea* f. *Catenulata* (B1, B3, B10).

I risultati (Fig. 8) mostrano che né il pesticida sintetico, né il biopesticida hanno un effetto significativo sulla diversità microbica. In particolare, l'applicazione del biopesticida (B1, B3 e B10) riduce la diversità batterica soltanto durante i primi 10 giorni, in particolar modo il giorno 1. Dal giorno 10 al 150, la composizione della comunità batterica è stata influenzata solo dall'applicazione di dosi più elevate di biopesticida (B10); mentre, in B1 e B3 la diversità torna simile al controllo. La diversità fungina e protista tende a diminuire nel tempo. La composizione della comunità fungina in B10 differiva da quella del controllo, mentre non sono stati osservati cambiamenti significativi in tutti gli altri trattamenti. La composizione della comunità protista differiva dal controllo attraverso l'esperimento in B10 e P; mentre, nessun effetto è stato rilevato in B1 e B3.

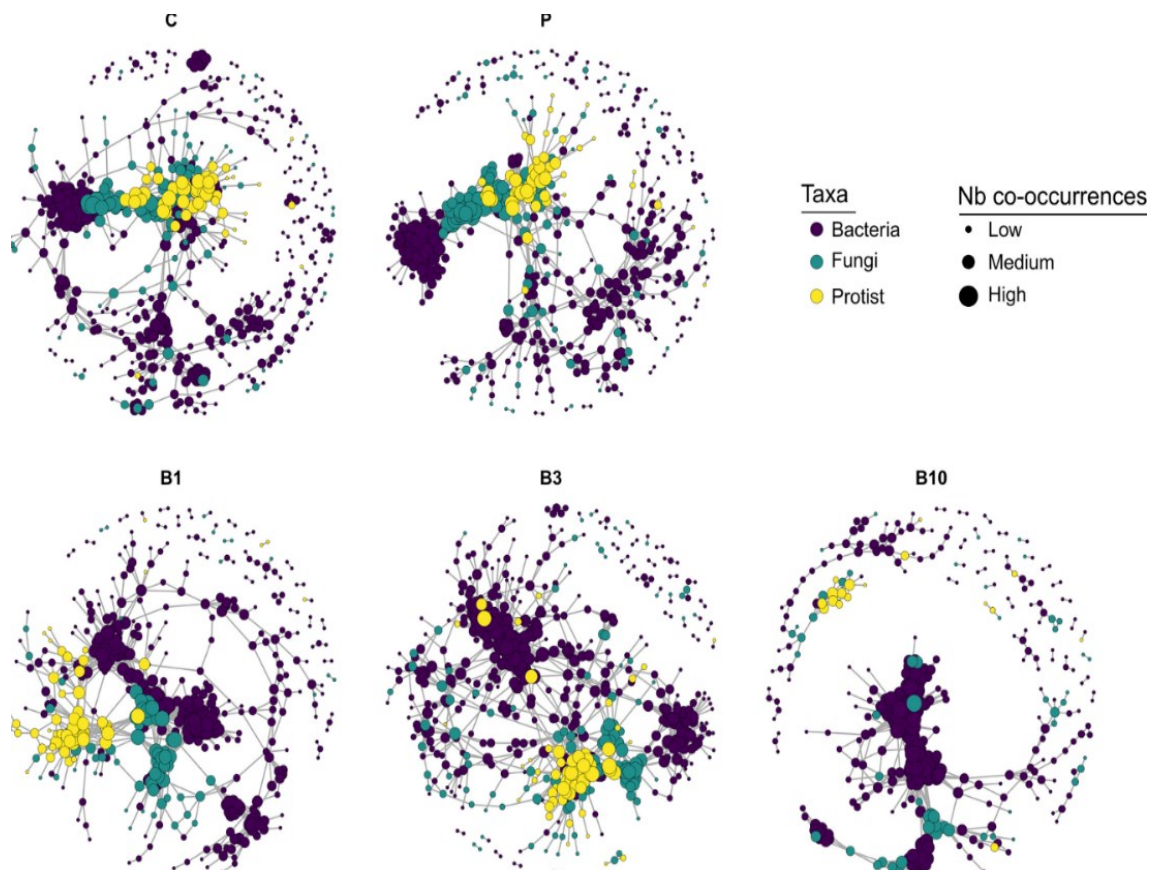


Figura 9: Reti di co-occorrenza di microrganismi del suolo, trattato con Fosetyl-Al e Propamocarb-hydrochloride (P) e da diverse dosi di *Clonostachys rosea* f. *Catenulata* (B1, B3, B10).

Nella figura viene illustrata l'analisi della rete microbica e i risultati mostrano che i due pesticidi hanno avuto impatti contrastanti sulla composizione delle comunità microbiche e sull'identità dei taxa chiave. Il biopesticida ha influenzato i taxa keystone che hanno strutturato la rete microbica del suolo, soprattutto in B10; mentre, il pesticida sintetico ha modificato le interazioni biotiche favorendo i taxa che sono meno efficienti nel degradare i composti organici. Ciò suggerisce che i biopesticidi e il pesticida sintetico hanno un impatto diverso sul funzionamento del suolo. Inoltre, i cambiamenti nei keystone e nei taxa degli indicatori possono fornire alcune informazioni meccanicistiche sul funzionamento della rete microbica del suolo, in quanto possono influire su altri taxa nella rete attraverso effetti a cascata e interrompere importanti processi ecosistemici tra cui decomposizione e ciclo dei nutrienti. Sulla base dell'analisi dei keystone e dei taxa indicatori, è stato ipotizzato che due principali fenomeni correlati abbiano causato i cambiamenti osservati nelle comunità microbiche: l'applicazione del biopesticida ha cambiato le caratteristiche fisico-chimiche del suolo, che a

loro volta hanno influenzato i microrganismi del suolo, mentre l'applicazione del pesticida sintetico ha direttamente alterato le interazioni biotiche tra funghi e protisti. Il biofungicida può influenzare le proprietà fisico-chimiche del suolo, anche con una sola applicazione, e alterare la distribuzione e le funzioni delle comunità microbiche, i cambiamenti della sostanza organica del suolo, lo stato dei nutrienti e il pH. Lo studio mostra che i prodotti per la gestione dei parassiti possono avere impatti funzionalmente significativi sul microbioma del suolo anche se la diversità  $\alpha$  microbica non è influenzata. Inoltre, questo studio illustra il potenziale delle analisi di sequenziamento ad alto rendimento per migliorare la valutazione del rischio ecotossicologico di pesticidi su microrganismi del suolo non bersaglio. Nel complesso, l'impatto del biopesticida sulla diversità microbica dipende dalla dose e dalla frequenza. In particolare, i risultati evidenziano un basso impatto sia del pesticida sintetico che del biopesticida sulla biodiversità microbica a dosi standard. Nel trattamento a dosi maggiori, al contrario, è stato osservato un impatto forte e duraturo sulla biodiversità.

Shao et al., (2017) hanno valutato gli effetti del pesticida sintetico Carbendazim e dei biopesticidi Cantaridina e Norcantaridina sui parametri microbici del suolo in un terreno limoso. Il carbendazim è un fungicida benzimidazolico sistemico utilizzato per controllare un'ampia gamma di malattie sui seminativi (Es. *Fusarium graminearum* e *Rhizoctonia solani*), frutta (Es., *Botryosphaeria berengeriana* e *glomerella cingulate*), ortaggi (Es. *Alternaria solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*), piante ornamentali ed erbe medicinali. Applicazioni ripetitive ed estese di Carbendazim hanno portato alla comparsa e alla prevalenza della resistenza al fungicida nella maggior parte dei patogeni delle piante (Zhang et al. 2019). I biopesticidi, a Cantaridina e la Norcantaridina, essendo due composti di origine animale, mostrano una modalità di azione fungicida simile: entrambi possono inibire la proteina serina/treonina fosfatasi (PSP) *in vivo* (Chen et al. 2014). In questo studio, viene offerta una comprensione completa dei potenziali rischi ecologici di questi pesticidi sull'ecosistema del suolo, mediante analisi sia quantitative che qualitative. Sono state svolte analisi per la determinazione della respirazione basale del suolo, l'elettroforesi su gel con gradiente denaturante per PCR 18S rRNA (PCR-DGGE), ed inoltre, vengono valutate le attività enzimatiche di importanti cicli di nutrienti. È stato rilevato che i funghi del suolo sono particolarmente sensibili alla Cantaridina e alla Norcantaridina con una significativa riduzione dell'abbondanza di funghi anche ai livelli più bassi di pesticidi nel suolo.

Alcuni studi (Chen et al., 2014; Bertini et al., 2009), hanno dimostrato che la Cantaridina e la Norcantaridina possono inibire significativamente l'attività delle proteine serina/treonina



fosfatasi nelle cellule eucariotiche *in vitro* e le proteine serina/treonina fosfatasi sono ampiamente espresse e relativamente conservate tra gli eucarioti. Pertanto, si ipotizza che l'effetto dannoso della Cantaridina e della Norcantaridina sui funghi del suolo potrebbe essere attribuito a un effetto inibitorio sulla proteina serina/treonina fosfatasi, interrompendo il metabolismo e la trasduzione del segnale. Nei terreni trattati con questi due fungicidi biologici è stata osservata una marcata riduzione della popolazione fungina nei giorni 3 e 7 (Fig.10). Hanno indotto alterazioni significative sia a livello di diversità che a livello funzionale.

Maggiore è la concentrazione, più evidente è l'effetto. Tuttavia, la diversità della microflora del suolo è aumentata gradualmente dopo 15 giorni di incubazione ed è stata paragonabile o addirittura superiore ai valori dei campioni non trattati al giorno 35; quindi l'effetto inibitorio si è gradualmente indebolito insieme al tempo di incubazione. L'impronta digitale PCR-DGGE con vari parametri ha dimostrato che i cambiamenti nelle comunità microbiche dei suoli trattati e non trattati erano diversi a seconda dell'uso di pesticidi.

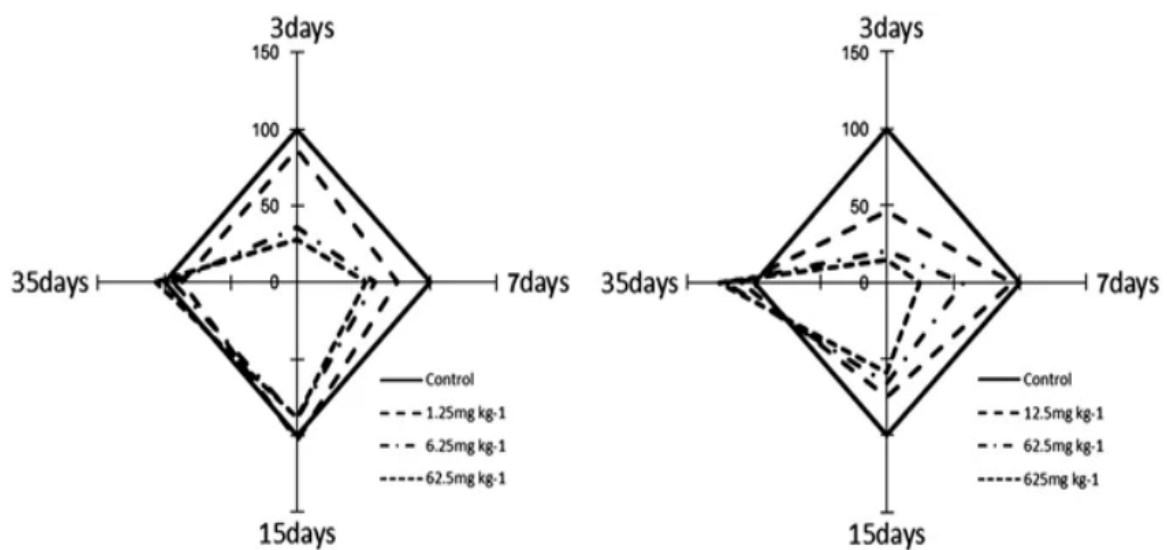


Figura 10: Effetto della Cantaridina (a 1,25, 6,25 e 62,5 mg kg di terreno<sup>-1</sup> DW) e Norcantaridina (a 12,5, 62,5 e 625 mg kg<sup>-1</sup> di terreno DW) sulla diversità della popolazione fungina (come riflesso dall'H' della PCR-DGGE).

Questi biopesticidi hanno influenzato anche l'attività enzimatica del suolo. Gli enzimi del suolo svolgono un ruolo chiave nella trasformazione della sostanza organica e si combinano anche con i microrganismi per degradare gli xenobiotici (Bowles et al. 2014).

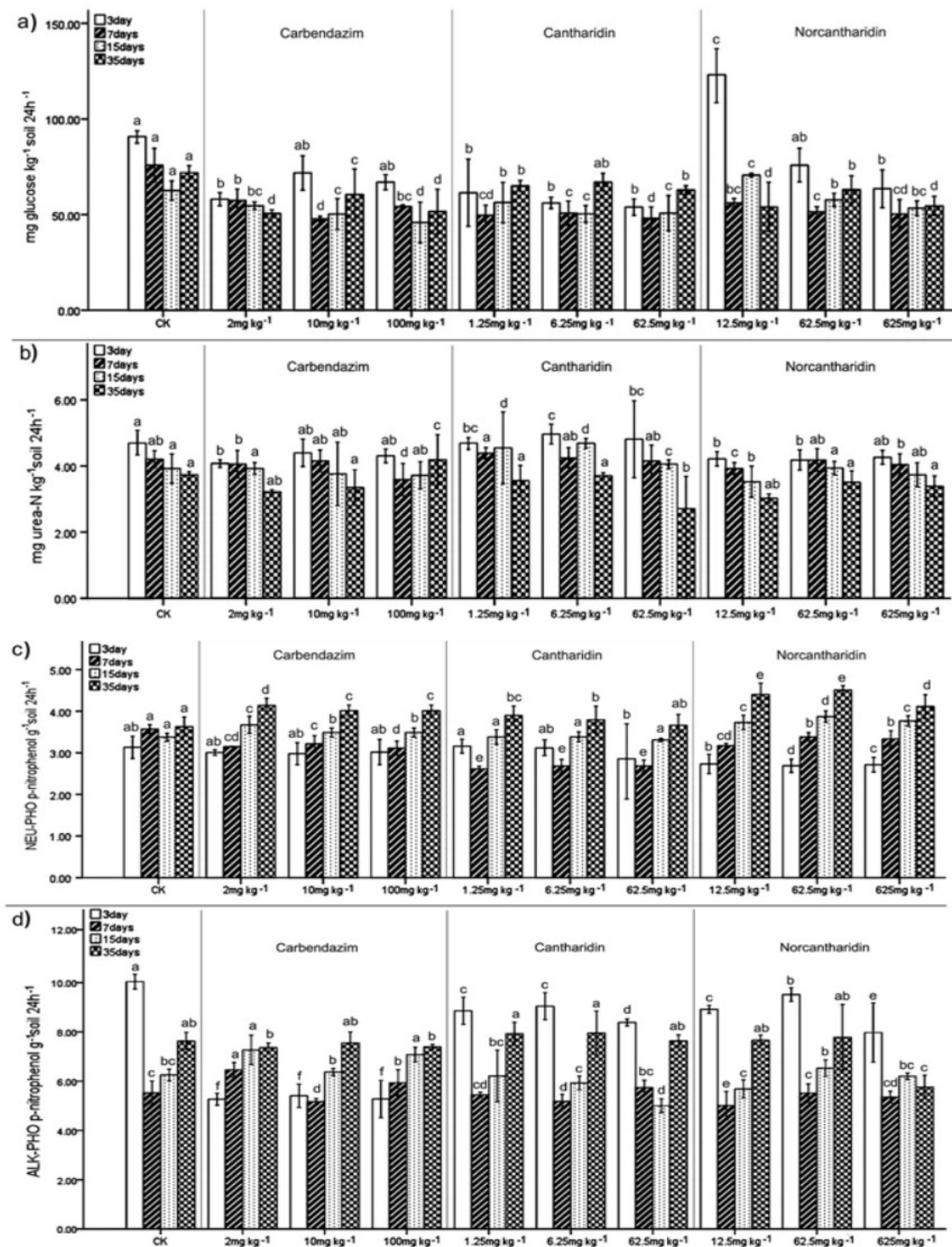


Figura 11: Effetto dei pesticidi Cantaridina, Norcantaridina e Carbendazim sulle attività enzimatiche del suolo. Le formulazioni commerciali erano alla dose raccomandata e a dosi più elevate (cinque e cinquanta volte la dose raccomandata).

Nella figura sono riportati i valori medi delle attività delle invertasi (a), attività ureasica (b), attività fosfato neutra (c) e attività fosfatasi alcalina (d).

È evidente una riduzione generale dell'attività delle invertasi. Sono stati trovati valori considerevolmente più bassi dell'attività delle invertasi il giorno 7 per i terreni trattati con i due biopesticidi, anche in seguito all'esposizione alle concentrazioni più basse rispetto ai terreni non trattati; analogamente, nei suoli trattati con Norcantaridina e Carbendazim a cinquanta volte la dose raccomandata, sono state rilevate riduzioni significative dell'attività delle invertasi (in media, rispettivamente del 39,4% e del 32,0% in meno) a tutti i tempi di incubazione rispetto alle controparti del controllo. L'effetto dannoso dovuto all'applicazione di pesticidi sull'invertasi del suolo si è gradualmente indebolito nel tempo. Cantaridina e Norcantaridina hanno manifestato effetti sulle attività della fosfatasi alcalina e della fosfatasi neutra. Rispetto ai terreni non trattati, è stato osservato un notevole comportamento dose-dipendente. L'attività della fosfatasi neutra è stata significativamente inibita nei terreni trattati con i biopesticidi nei giorni 3 e 7, mentre il Carbendazim non ha avuto effetti chiari sull'attività neutra della fosfatasi. L'effetto di inibizione della Cantaridina e della Norcantaridina è aumentato con l'aumentare delle concentrazioni. Infine, nessuno dei tre pesticidi ha causato cambiamenti significativi nell'attività delle ureasi.

Il suolo contiene enzimi liberi, enzimi extracellulari immobilizzati ed enzimi all'interno delle cellule microbiche e cambiamenti nello stato biologico del suolo a causa dell'inquinamento.

Il ruolo degli enzimi del suolo e le loro attività sono definiti dalle loro relazioni con il suolo e da altri fattori ambientali (ad es. piogge acide, metalli pesanti, pesticidi e altre sostanze chimiche industriali) che influenzano le loro attività. I pesticidi che raggiungono il suolo possono disturbare il metabolismo locale o le attività enzimatiche. Vi sono anche prove che le attività enzimatiche del suolo e il contenuto di ATP sono aumentati da alcuni pesticidi. I contenuti degli ATP sono correlati alle specifiche attività degli enzimi del suolo e possono fornire preziose informazioni sulle tendenze nella trasformazione dei pesticidi nei suoli.

Una serie di fattori, ad esempio la natura chimica o biologica dei pesticidi, la concentrazione utilizzata, la struttura della comunità microbica, il tipo di suolo e le condizioni del suolo (come il contenuto di materia organica, umidità e temperatura) possono contribuire sui risultati di tali prodotti sugli enzimi del suolo. Gli effetti possono essere attribuiti anche al duplice comportamento dei pesticidi (sia nocivi che benefici per gli enzimi del suolo), alla diversità e alle varie fasi dei processi che si svolgono nel suolo che sono spesso sovrapposti. L'attività enzimatica nei suoli riflette non solo gli enzimi nella soluzione del suolo e nei tessuti viventi, ma anche gli enzimi legati ai colloidi del suolo e alle sostanze umiche.

Il ruolo dei protisti è parte integrante delle reti ecologiche del suolo. Spesso sono una componente trascurata del microbioma del suolo, però rappresentano un hub centrale di quest'ultimo, collegando diverse popolazioni batteriche e fungine. Data la loro risposta dinamica alle pratiche di gestione del suolo e la posizione chiave nel collegare le reti microbiche del suolo, i protisti possono fornire l'effetto leva tra la gestione del suolo e il potenziamento del microbiota batterico e fungino al servizio di una migliore salute del suolo. Sono abbondanti ed estremamente diversi nel suolo, dove svolgono una serie di funzioni. Sono tra i principali consumatori di batteri e funghi del suolo, ma anche alghe e nematodi. L'attività dei protisti aumenta direttamente le prestazioni delle piante migliorando il ciclo microbico e stimolando i rizobatteri che favoriscono la crescita delle piante.

Xiong et al., (2018) in uno studio condotto per valutare gli effetti di fertilizzanti, organici e di sintesi, sulla composizione tassonomica e funzionale dei protisti, nonché le loro interazioni all'interno del microbioma del suolo, hanno osservato che aggiungendo il batterio *Bacillus amyloliquefaciens* o il fungo *Trichoderma guizhouense* (due agenti di biocontrollo), ai fertilizzanti organici, si ha un'alterazione della composizione della comunità dei protisti del suolo, in particolar modo il batterio *Bacillus amyloliquefaciens* ha ridotto significativamente i protisti saprofiti (che si nutrono di sostanze in decomposizione) e fototrofici (capaci di produrre energia a partire dalla luce).

Sameh et al., (2007) hanno studiato l'effetto della Paenimyxin, un nuovo biopesticida prodotto da *Paenibacillus* sp. il ceppo B2, sulla densità delle comunità batteriche del suolo, è stato valutato mediante conteggio delle colonie e dalla reazione a catena quantitativa della polimerasi quantitativa *nRK* 16S e PCR. Questo prodotto ha un'attività antagonista contro i batteri gram-positivi e gram-negativi e anche contro molti importanti patogeni fungini presenti nel suolo.

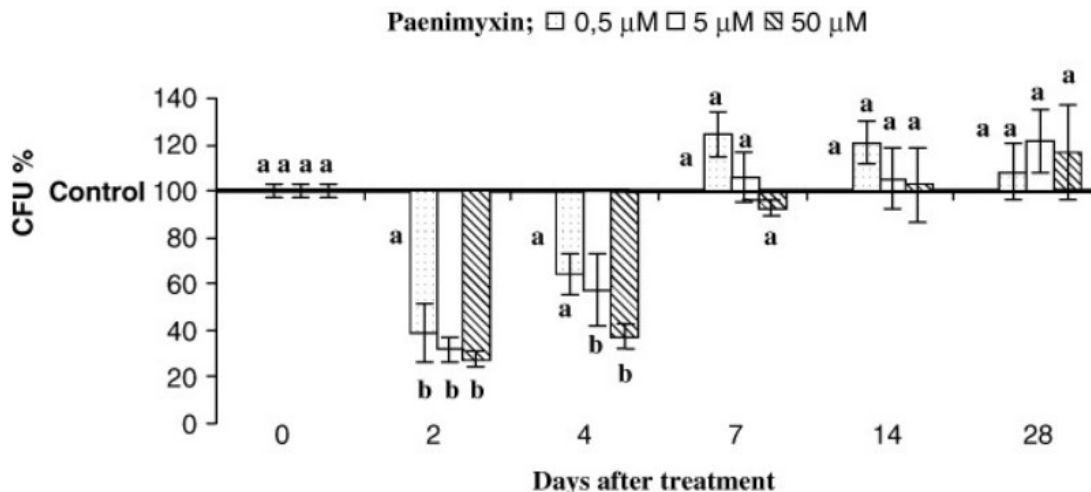


Figura 12: Rapporto tra il numero di unità formanti colonie (CFU) da campioni di terreno trattati con diverse concentrazioni di Paenimyxin (0,5, 5 o 50  $\mu$  M) e il numero di CFU da campioni di controllo raccolti dopo 2, 4, 7, 14 e 28 giorni di incubazione.

La Paenimyxin ha avuto un effetto negativo sul numero di unità batteriche formanti colonie (CFU), che è stato significativamente ridotto 2 e 4 giorni dopo il trattamento. L'effetto della Paenimyxin sui batteri coltivabili è stato trascurabile 7 giorni dopo il trattamento.

Il biopesticida non ha influenzato la quantificazione dell'rDNA 16S o della comunità batterica denitrificante. Inoltre, le impronte digitali RISA hanno mostrato che la struttura genetica delle comunità batteriche è stata significativamente modificata 2 giorni dopo l'applicazione della Paenimyxin a 50  $\mu$  M e 4 giorni dopo il trattamento a concentrazioni più basse (0,5 e 5  $\mu$  M). Nel complesso l'impatto del trattamento con Paenimyxin sulla struttura genetica delle comunità batteriche del suolo è stato transitorio, in quanto non è stato osservato alcun effetto dopo 7, 14 e 28 giorni rispetto al controllo non trattato.

## 4.2 EFFETTI DI BIOINSETTICIDI

Tra i principali bioinsetticidi studiati abbiamo l'Azadiractina (Morgan et al., 2009), un composto organico naturale (limonoide), estratto dai semi dell'albero di *Neem* (*Azadirachta indica*), composto da una complessa miscela di molecole, inclusi idrocarburi normali, composti fenolici, terpenoidi, alcaloidi e glicosidi (Hossain et al., 2013); viene impiegato in agricoltura come insetticida, acaricida e nematocida biologico. Possiede diverse attività bioinsetticida contro importanti insetti nocivi, quali: *Helicoverpa armigera*, *Spodoptera litura*, *Plutella xylostella*, *Sitophilus, zeamis Sitophilus*, *Earis vitella*, *Aphis gossypii*, *Bemisia tabaci*,

Gopal et al., (2006) hanno studiato l'effetto del 10% di granuli di Azadiractina (estratto alcolico di semi di *Neem* miscelati con argilla cinese) sulla popolazione di batteri, actinomiceti, funghi, *Azotobacter* e batteri nitrificanti; sulla deidrogenasi, fosfatasi e attività respiratorie a 0, 15, 30, 60 e 90 giorni dopo l'applicazione della dose raccomandata, di due e cinque volte la dose raccomandata e di un controllo, effettuato in un terreno argilloso-sabbioso. Studi interni hanno stabilito che la dose raccomandata di azadiractina per l'applicazione era di 20 kg/Ha. L'enumerazione della microflora del suolo è stata effettuata con il metodo della piastra di diluizione (Nair e Subba Rao, 1977), mentre le attività enzimatiche sono state misurate attraverso specifici saggi enzimatici.

Azadiractina a tutte le dosi ha esercitato un effetto soppressivo sulla comunità microbiche e sulle attività enzimatiche nei primi 15 giorni; ad eccezione di *Azotobacter* spp. dove è stato osservato che la dose raccomandata del bioinsetticida ha stimolato la proliferazione di queste popolazioni batteriche. Mentre, i batteri nitrificanti chemoautotrofi, *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*, sono stati fortemente soppressi dall'azadiractina a tutte le dosi. Questi batteri, insieme alle popolazioni fungine sono risultate le più sensibili, poiché il loro numero si è ridotto significativamente.

La popolazione di batteri, gli actinomiceti, le fosfatasi e le attività respiratorie si sono riprese dopo il 60° giorno e successivamente, la loro concentrazione è aumentata in modo significativo. L'applicazione di dosi elevate di azadiractina, per due e per dieci volte la dose raccomandata, ha avuto effetti biocidi molto elevati sui microrganismi del suolo e sulle loro attività. L'attività della fosfatasi è stata notevolmente potenziata dalla dose raccomandata del pesticida botanico, mentre il dosaggio di cinque volte ha fortemente frenato questa attività enzimatica. Inoltre, si è verificato un aumento dell'attività respiratoria alla dose raccomandata; questo fenomeno potrebbe essere attribuito all'aumento delle popolazioni batteriche che si nutrono di fonti di carbonio depositate a causa della morte delle altre comunità microbiche

uccise dall'allelochimico, che erano metabolizzatori attivi.

Tuttavia, l'analisi dei dati è stata effettuata mediante l'indice statistico Shannon Weaver che ha mostrato che azadiractina riduce sia la forma che la diversità microbica funzionale a tutte le dosi (Fig.13).

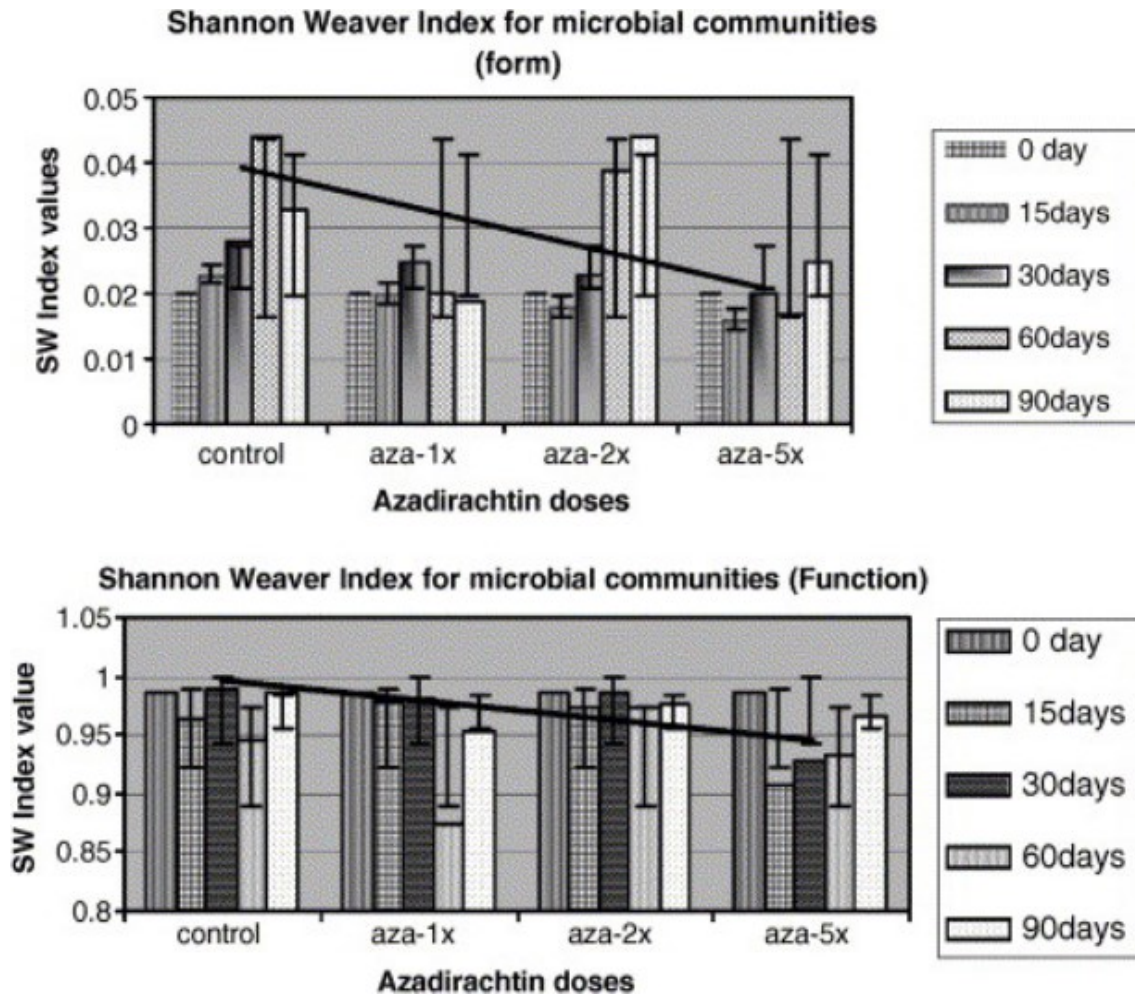


Figura 13: Trasformazione dei dati microbici nell'indice statistico SW per valutare l'effetto di Azadiractina sulla diversità microbica a livello di forma e funzionale.

Inoltre, è stata osservata una inibizione e riduzione dell'attività dei batteri nitrificanti del suolo, provocando quindi, interferenze nel processo di nitrificazione. Anche se, la capacità di sopprimere l'attività dei batteri nitrificanti da parte di azadiractina sia vista come un punto vantaggioso nelle colture che richiedono azoto ammoniacale, l'accumulo di  $\text{NH}_4^+$  gli ioni nel suolo in un ecosistema naturale sono considerati tossici. In questo aspetto, azadiractina potrebbe

diventare il colpevole per prevenire la nitrificazione nei suoli. Tuttavia, allo stesso tempo, diventa utile nei terreni in cui la concentrazione di ioni  $\text{NH}_4^+$  è elevata e le colture non ne ottengono una fonte stabile e sostenibile di nutrizione azotata. ( $\text{NO}_3^{2-}$ ).

Una caratteristica saliente osservata in questo studio è stata che gli "attivi" del *Neem* hanno iniziato ad affermare la loro natura soppressiva sui funghi e sui batteri nitrificanti entro il primo mese di incubazione. Tuttavia, un miglioramento della popolazione di batteri, actinomiceti, *Azotobacter* e attività enzimatica e respiratoria è stato osservato solo intorno al 60 ° giorno e successivamente. Quindi, si potrebbe presumere che una volta che una parte della popolazione microbica fosse stata soppressa, la competizione per le facilitazioni nutrizionali consentisse la proliferazione dell'altra microflora. L'intera gamma di influenza degli "attivi" del *Neem* sulla microflora è stata osservata vistosamente entro un periodo di due mesi anche se il DT 50 (tempo impiegato per la scomparsa del 50% della concentrazione iniziale) per l'azadiractina A e B è stato osservato essere 20 giorni a 25°C (Stark e Walter, 1995) e dipendevano dal contenuto di sostanza organica e dalla temperatura del suolo (Agyarko et al., 2006).

Antonious et al., (2003) hanno visto che l'applicazione di insetticida Neemix-4E a base di azadiractina ha avuto alcuni effetti transitori sull'attività dell'enzima ureasi, che non era né drastica né prolungata abbastanza da essere considerata deleteria per i microrganismi del suolo e le loro attività importanti per la fertilità del suolo.

Anche in un altro studio (Sarawaneeyaruk et al., 2015), sono stati valutati gli effetti dell'estratto di neem e dell'azadiractina sull'attività dei microbi del suolo e dei microrganismi della rizosfera. In questo studio le foglie di *Neem* (*Azadirachta indica* var. *Siamensis*) sono state sterilizzate in superficie con NaOCl al 5% per poi essere macinate, poi è stata aggiunta acqua sterile per ottenere la concentrazione desiderata. Vengono utilizzati due tipi di terreno, un suolo commerciale e il suolo naturale del fiume Bangpakong (Thailandia). Batteri e funghi sono stati identificati rispettivamente tramite sequenziamento di nuova generazione del gene rRNA 16S e 18S. È stato scoperto che 0,1 e 0,4  $\text{gmL}^{-1}$  dell'estratto e 1,25 e 2,5  $\mu\text{gmL}^{-1}$  di azadiractina inibiscono l'attività dei microrganismi del suolo *in vitro*. Il trattamento del suolo con azadiractina per due mesi ha ridotto il numero di microrganismi presenti, mentre due mesi di trattamento con estratto di *Neem* hanno aumentato il numero di microrganismi sia nel suolo che nella rizosfera. Il batterio fitopatogeno *Pectobacterium carotovorum* era più resistente all'azadiractina rispetto a *Rhizobium* sp. Inoltre, il trattamento con estratto di *Neem* e azadiractina ha ridotto il numero di noduli radicali e *Trichoderma asperellum* nella rizosfera, rispetto al controllo.



### 4.3 EFFETTI DI BIOERBICIDI

Gli erbicidi naturali commercializzati al giorno d'oggi sono ben pochi, vista la scarsa diffusione a livello mondiale rispetto alle altre categorie di biopesticidi; per cui, gli effetti ecotossicologici di tali prodotti sono ancora poco studiati. Tra i primi studi è presente la ricerca condotta da Romdhane et al., (2019) che riporta per la prima volta il confronto tra il destino nel suolo e l'effetto ecotossicologico dei triketoni naturali e sintetici (leptospermone vs. sulcotrione) sulla diversità della comunità batterica e sull'attività di un suolo agricolo. Leptospermone, un erbicida  $\beta$ -triketone naturale, e il sulcotrione, uno sintetico, sono stati applicati ai microcosmi del suolo a  $0 \times$  (controllo),  $1 \times$  o  $10 \times$  dose di campo raccomandata. Il leptospermone, isolato dall'olio essenziale distillato dall'albero di Manuka (*Leptospermum scoparium*), è stato utilizzato come erbicida naturale per controllare diverse infestanti a foglia larga ed erbacee in diverse colture. Essendo non ottimizzato chimicamente, il leptospermone è noto per essere meno efficiente dei triketoni sintetici. Quindi, per ottenere un'efficacia identica nel controllo delle infestanti, il leptospermone deve essere applicato a una dose tre volte superiore a quella del sulcotrione.

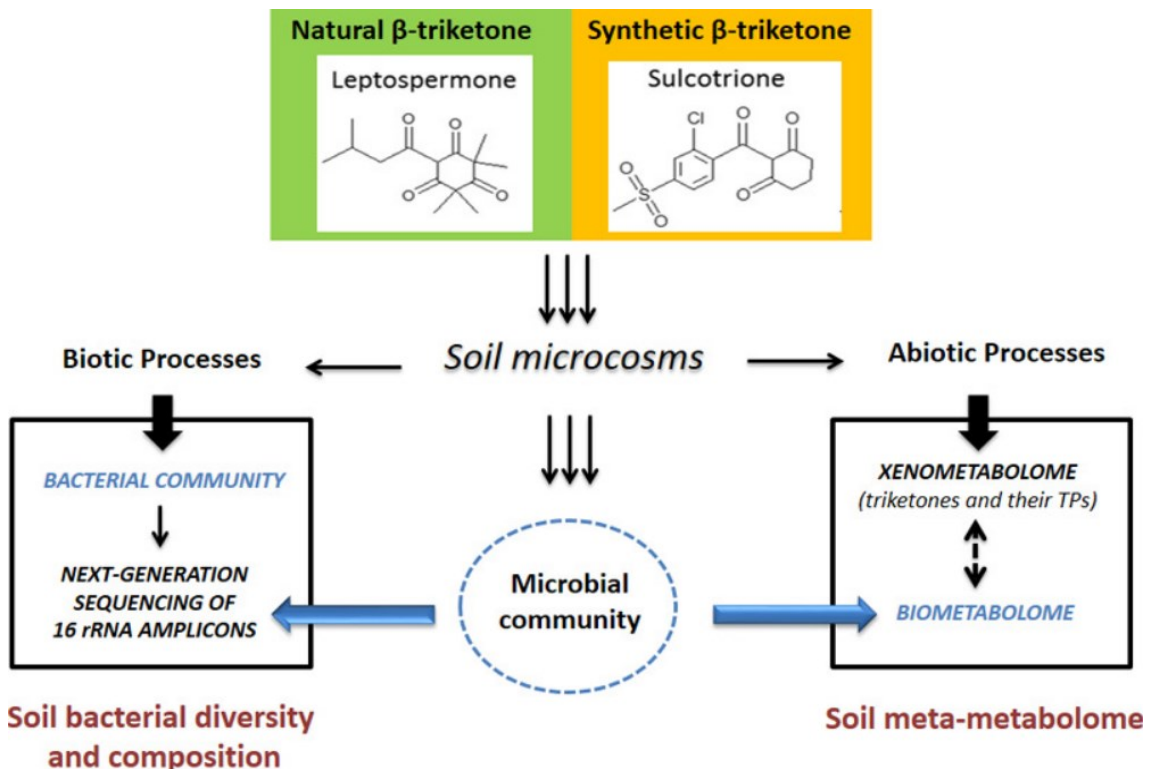


Fig.14 Valutazione dell'impatto ecotossicologico degli erbicidi  $\beta$ -triketone naturali e sintetici sulla diversità e sull'attività della comunità batterica del suolo utilizzando approcci omici.

Il destino di questi due erbicidi (cioè dissipazione e formazione di prodotti di trasformazione) è stato monitorato per valutare lo scenario di esposizione dei microrganismi del suolo agli erbicidi naturali e sintetici. L'impatto ecotossicologico di entrambi gli erbicidi è stato esplorato monitorando la diversità e l'attività batterica del suolo utilizzando il sequenziamento di nuova generazione degli ampliconi del gene 16S rRNA e la metabolomica del suolo.

Sia il leptospermone che il sulcotrione si sono completamente dissipati durante il periodo di incubazione. I risultati hanno mostrato che alla dose agronomica sia i trichetoni naturali che quelli sintetici inducevano lievi modifiche delle diversità  $\alpha$  e  $\beta$  della comunità batterica del suolo, mentre a dose dieci volte superiore la dose agronomica, il leptospermone causava modifiche più forti della diversità batterica del suolo rispetto al sulcotrione. È stato scoperto che l'impatto ecotossicologico dei trichetoni naturali e sintetici sulla struttura batterica del suolo e sul meta-metaboloma era resistente alla dose agronomica, ma non a una dose dieci volte superiore. L'effetto ecotossicologico di entrambi può essere spiegato dalla loro identica modalità di azione. Infatti, entrambe le molecole prendono di mira l'enzima HPPD (idrossifenil piruvato-diossigenasi) che è ampiamente distribuito tra i batteri.

La tossicità del triketone naturale e sintetico nei confronti dei batteri del suolo può essere dovuta alla formazione dei loro metaboliti, rispettivamente idrossi-leptospermone e CMBA. Inoltre, si potrebbe ipotizzare che i triketoni possano portare alla selezione di popolazioni batteriche tolleranti e degradanti.

Mallet et al., (2019) dimostra l'impatto del leptospermone, sulla comunità fungina, che supporta importanti funzioni ecologiche del suolo come la decomposizione della materia organica e il riciclaggio dei nutrienti. Questo studio è stato condotto in un esperimento di microcosmo utilizzando due terreni francesi, Perpignan (P) e Saint-Jean-de-Fos (SJF), che differiscono per le loro proprietà fisico-chimiche e per il trattamento della storia con  $\beta$ -triketoni sintetici. I microcosmi del suolo sono stati trattati con leptospermone alla dose raccomandata e incubati in condizioni controllate per 45 giorni. Come controllo sono stati utilizzati microcosmi non trattati.

È stato riscontrato che il leptospermone ha causato cambiamenti significativi nella struttura e nella diversità nelle comunità fungine dei suoli utilizzati nel loro esperimento. A partire dall'inizio degli esperimenti, sono state riscontrate differenze significative nella diversità  $\alpha$  della comunità fungina tra tipi di suolo e controlli. Durante gli esperimenti, l'impatto del trattamento con erbicidi ha portato a ulteriori differenze significative sia tra tipi di suolo che controlli. Gli autori hanno riscontrato anche una significativa diminuzione della diversità microbica complessiva, osservata dopo soli 4 giorni; in particolare, i cambiamenti nella

composizione della comunità fungina in uno dei terreni utilizzati. Anche se l'impatto dell'erbicida sull' $\alpha$ -diversità era diverso sui diversi terreni usati in questo esperimento, la  $\beta$ -diversità della comunità fungina è cambiata indipendentemente dal tipo di suolo. È stato dimostrato che, anche dopo la completa degradazione dell'erbicida utilizzato, il recupero della comunità fungina era possibile. Tuttavia, il recupero è stato possibile solo per il suolo in cui la comunità fungina è autoctona e prima degli esperimenti era già varia e ricca.

I risultati indicano l'importanza di valutare l'impatto sui vari tipi di suolo non solo dal punto di vista fisico-chimico, ma anche dal punto di vista della comunità indigena per la loro resilienza.

## 5. CONCLUSIONI

L'effetto di pesticidi di sintesi sulla microflora dei suoli è ben noto e riportato in una grande quantità di ricerche e sperimentazioni. I microrganismi del suolo svolgono funzioni chiave in molti processi vitali, come la decomposizione della sostanza organica e il ciclo dei nutrienti, e sono responsabili in larga misura del buon funzionamento dell'ecosistema. Pertanto, qualsiasi perdita della struttura della comunità microbica del suolo potrebbe comportare cambiamenti significativi nella sua fertilità che rappresenta un pre-requisito per la crescita delle piante.

Grazie alla loro origine naturale (vegetali, animali, microorganismi), i biopesticidi sono sempre più utilizzati per sostituire i pesticidi sintetici nel controllo dei parassiti; è comunque necessario valutare gli effetti che questi possono avere sulla componente microbica del suolo. La tesi ha valutato alcuni report scientifici che prendono in esame gli effetti dei biopesticidi sulle comunità microbiche del suolo, effettuando anche comparazioni dirette tra pesticidi naturali e di sintesi, con l'applicazione di tecniche analitiche innovative.

L'effetto dei biopesticidi sulla microflora non è lo stesso per le tre categorie ed i biofungicidi sembrano essere quelli con maggior impatto negativo portando ad una riduzione soprattutto a carico dei taxa fungini, a volte anche maggiore rispetto ai fungicidi di sintesi.

I bioinsetticidi mostrano effetto inibente sulla microflora già alle normali dosi di applicazione, che aumenta progressivamente all'aumentare della dose e che si risolve in una inibizione di molte attività enzimatiche della microflora, soprattutto per i batteri del ciclo dell'azoto. L'effetto risulta comunque sempre temporaneo e limitato ai primi giorni 10-15 dal trattamento. I bioerbicidi sono ancora poco studiati, vista la scarsa diffusione a livello mondiale. Le prime osservazioni mostrano comunque che anche questi prodotti hanno un notevole effetto inibente sulla microflora del suolo, comparabile a quello di erbicidi sintetici, visto che i meccanismi di azione sono molto simili.

In generale, l'effetto inibente risulta comunque sempre temporaneo e legato alla persistenza delle sostanze naturali che subiscono una degradazione più veloce rispetto ai pesticidi di sintesi e che quindi, risultano sempre meno impattanti sugli ecosistemi e con rischio eco-tossicologico ed ambientale decisamente inferiore.

## 6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

### 6.1 BIBLIOGRAFIA

- Anderson TH, Domsch KH, 1990. *Soil Biol. Biochem.* 10:251-255. Application of eco-physiological quotients (qCO<sub>2</sub> and qD) on microbial biomass from soils of different cropping histories.
  
- Anderson TH, Domsch KH, 1993. *Soil Biol. Biochem.* 25:393-395. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils.
  
- Anne E. Osbourn. (2009). *Virginia editors. Springer.* Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application.
  
- Antonio Graniti, Richard D. Durbin, Alessandro Ballio. (29 giugno 2013). *Springer Science & Business Media.* Capri. Phytotoxins and Plant Pathogenesis..
  
- ANPA, 2000. Indicatori ed indici ecotossicologici e biologici applicati al suolo. RTI CTN-SSC 3/2000.
  
- APAT, 2001. Elementi per la caratterizzazione fisicochimica biologica ed ecotossicologica dei parametri addizionali (D.Lgs. 152/99) nella matrice acquosa, nel sedimento e nel biota. RTI CTN-AIM 4/2001
  
- APAT, 2004. Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati: utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici. RTI CTN-TES 1/2004.
  
- Atta-ur- Rahman. 3 settembre 2012, *Elsevier.* Volume 38. Studies in Natural Products Chemistry.

- Banerjee, F. Walder , L. Büchi , M. Meyer , AY Held , A. Gattinger , T. Keller , R. Charles, MGA van der Heijden. L'intensificazione dell'agricoltura riduce la complessità della rete microbica e l'abbondanza di taxa chiave nelle radici.

-Benedetti A., Dell'Abate MT., Mocali S., Pompili L., 2006. Indicatori microbiologici e biochimici della qualità del suolo. In: ATLAS – Atlante di Indicatori della Qualità del Suolo. Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali, Osservatorio Nazionale Pedologico. Edizioni Delta Grafica, Città di Castello (Perugia).

- Bertini, I., Calderone, V., Fragai, M., Luchinat, C. & Talluri, E. J. Med. Chem. 52 4838–4843 (2009). Basi strutturali dell'inibizione della serina/treonina fosfatasi da parte delle piccole molecole archetipiche Cantaridina e Norcantaridina.

- Bertrand Fournier, Sofia Pereira Dos Santos, Julia A. Gustavsenc, Gwenaël Imfeldd, Frédéric Lamy, Edward AD Mitchell, Matteo Mota, Dorothea Noll, Chantal Planchamp, Thierry J. Heger. Editore: Ewa Korzeniewska. 2020. Impatto di un fungicida sintetico (fosetil-Al e propamocarb-cloridrato) e un biopesticida (*Clonostachys rosea*) su comunità batteriche, fungine e protiste del suolo.

- Bloem, J., et al. 2006 (Eds.), *Microbiological Methods for Assessing Soil Quality*. CABI, Wallingford, UK.

- Borneman et al., 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1935-1943. Molecular Microbial Diversity of an Agricultural Soil in Wisconsin.

- Bowles, TM, Acosta-Martínez, V., Calderón, F. & Jackson. *Soil Biol. Biochem.* 252–262 (2014). Le Attività degli enzimi del suolo, comunità microbiche e disponibilità di carbonio e azoto negli agroecosistemi organici in un paesaggio agricolo a gestione intensiva.

- Bremner, J.M. et al. (1965). *Methods of Soil Analysis, Part 2*, Agronomy Monograph No. 9, ASA and SSSA, Madison, 1179-1237. Inorganic Forms of Nitrogen.

- Burns, RG et al. *Soil Biol. Biochem.* 58, 216-234 (2013). Enzimi del suolo in un ambiente in evoluzione: conoscenze attuali e direzioni future.
  
- Chen, F., Wang, M., Zheng, Y., Li, S., Wang, H., Han, et al. (2013). *Current microbiology*, 67(2), 177-182. The effect of biocontrol bacteria on rhizosphere bacterial communities analyzed by plating and PCR-DGGE.
  
- Chen, XE, Liu, J. & Zhang, Y. *Mol. BioSyst.* 10, 240–250 (2014). Cantharidin impedisce l'attività della proteina serina / treonina fosfatasi in *Plutella xylostella*.
  
- Clarisse Mallet, Sana Romdhane, Camille Loiseau, Jérémie Béguet, Fabrice Martin-Laurent, Christophe Calvayrac, Lise Barthelmebs. *Microbiol anteriore.* (2019). Impatto del leptospermone, un erbicida  $\beta$ -triketone naturale, sulla composizione fungina e sulla diversità di due terreni coltivabili.
  
- Costantino Vischetti, Cristiano Casucci, Arianna De Bernardi, Elga Monaci, Luca Tiano, Fabio Marcheggiani, Maurizio Ciani, Francesca Comitini, Enrica Marini, Eren Taskin, Edoardo Puglisi. *Frontiers in Microbiology*, 2020. Sub-Lethal Effect of Pesticides on DNA of Soil Organisms as Early Ecotoxicology Biomarkers.
  
- Coventry E, Allan EJ, (2001). *Phytoparasitica* 29: 441–450. Analisi microbica e chimica del Neem (*Azadirachta indica*): note sull'attività antimicrobica.
  
- C. Rousidou, E.S. Papadopoulou, M. Kortsinidou, I.O. Giannakou, B.K. Singh, U. Menkissoglu-Spiroudi, D.G. Karpouzas. *Biologia e biochimica del suolo.* Volume 67, dicembre 2013, pagine 98-105. Bio-pesticidi: nocivi o innocui per i microrganismi ossidanti l'ammoniaca? Il caso di un nematocida a base di *Paecilomyces lilacinus*.
  
- Dommergues Y, 1960. *Agronomie Tropicale* La notion de coefficient de minéralisation du carbone dans le sols.

- De Lapuente, J., Lourenço, J., Mendo, S.A., Borràs, M., Martins, M.G., Costa, P. M., et al. (2015). *Frontiers in genetics*, 6, 180. The Comet Assay and its applications in the field of ecotoxicology: a mature tool that continues to expand its perspectives.
  
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F.T., Reich, P.B., Jeffries, T.C., Gaitan, J.J., Encinar, D., et al. (2016). *Nature communications*, 7, 10541. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems.
  
- E. Barrios. *Ecol. Econ.*, 64 (2007), pp. 269 – 285. Biota del suolo, servizi ecosistemici e produttività del suolo.
  
- EFSA Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR). 22 Febbraio 2017. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms.
  
- Ercolini, D. (2004). *Journal of microbiological methods*, 56(3), 297-314. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food.
  
- E. Topp. *Può. J. Soil Sci.* 83 (2003), pp. 303 – 309. Batteri nei suoli agricoli: diversità, ruolo e prospettive future.
  
- Eva Masciarelli, Barbara Ficociello, Elisabetta Bemporada, Emma Incocciati. Inail- 2018, Collana salute e sicurezza. Uso in sicurezza dei prodotti fitosanitari.
  
- F. Geiger, J. Bengtsson , F. Berendse , WW Weisser , M. Emmerson , MB Morales , P. Ceryngier , J. Liira , T. Tschardtke , C. Winqvist , S. Eggers , R. Bommarco , T. Pärt , V. Bretagnolle , M. Plantegenest , LW Clement , C. Dennis, C. Palmer , JJ Oñate , I. Guerrero , V. Hawro , T. Aavik , C. Thies , A. Flohre , S. Hanke , C. Fischer , PW Goedhart , pag Inchausti. *Basic Appl. Ecol.*, 11 (2010), pp. 97 – 105. Persistenti effetti negativi dei pesticidi sulla biodiversità e sul potenziale di controllo biologico sui terreni agricoli europei.



- Francesca Minarelli, Meri Raggi, Davide Viaggi. Oxford. Agriregionieuropa anno 11 n°42, Settembre 2015. Il mercato dei biopesticidi: stato dell'arte e prospettive di studio.
  
- Gao, G., Yin, D., Chen, S., Xia, F., Yang, J., Li, Q., et al. (2012). Effect of biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2P24 on soil fungal community in cucumber rhizosphere using T-RFLP and DGGE.
  
- GD Bending, MS Rodriguez-Cruz, SD Lincoln. *Chemosphere*, 69 (2007), pp. 82 – 88. Impatti fungicidi sulle comunità microbiche nei suoli con storie di gestione contrastanti.
  
- G.F. Antonious. *J. Environ. Sci. Health B.*, 38 (2003), pp. 479-488. Impact of soil management and two botanical insecticides on urease and invertase activity.
  
- Gil SV, Pastor S, March GJ, (2009). *Microbiol Res* 164: 196–205. Isolamento quantitativo degli agenti di biocontrollo *Trichoderma spp.*, *Gliocladium spp.* e actinomiceti dal suolo con terreni di coltura.
  
- G. Imfeld, S. Vuilleumier. *Euro. J. Soil Biol.* 49 (2012), pp. 22 - il 30. Misurare gli effetti dei pesticidi sulle comunità batteriche nel suolo: una revisione critica.
  
- Gwenaël Imfeld, Stéphane Vuilleumier. *European Journal of Soil Biology.* (22-30), (2012). Misurazione degli effetti dei pesticidi sulle comunità batteriche nel suolo: una revisione critica.
  
- Hainan Shao, Yalin Zhang. 2017. Non-target effects on soil microbial parameters of the synthetic pesticide carbendazim with the biopesticides cantharidin and norcantharidin.

- Heuer, H., and Smalla, K. (1997). *Modern Soil Microbiology* “Application of denaturing gradient gel electrophoreses (DGGE) and temperature gradient gel electrophoreses (TGGE) for studying soil microbial communities”.
  
- Hossain, MA, Al-Toubi, WAS, Weli, AM, Al-Riyami, QA, Al-Sabahi, 2013. *J. Taibah. Univ. Sci.* 7, 181–188. Identificazione e caratterizzazione di composti chimici in diversi estratti grezzi da foglie di neem dell'Oman.
  
- Isermeyer H, 1952. Eine einfache Methode sur Bestimmung der Bodenatmung und de Karbonate im Boden.
  
- JA Stark, JF Walter. *J. Environ. Sci. Salute B*, 30 (1995), pp. 685 – 698. Persistenza di azadiractina A e B nel suolo: effetti della temperatura e dell'attività microbica.
  
- J. Eilenberg. *Springer* (2006), pp. 1 – 11. Concetti e visioni del controllo biologico. Un approccio ecologico e sociale al controllo biologico.
  
- K. Agyarko, PK Kwakye, M. Bonsu, PA Osei, N. Asare Donkor, E. Amanor. *Pedosphere*, 16 (2006), pagg. 230 – 236. Ripartizione dell'Azadiractina nei suoli tropicali modificata con foglie di Neem e letame animale.
  
- Leonard G Copping and Julius J Menn, LGC Consultants, Saxon Way, Saffron Walden, Essex CB11 4EG, UK; Department of Agriculture and Extension, Penn State Univ, University Park, PA 16802, USA. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy.
  
- LG Copping, JJ Menn. *Pest Manag. Sci.*, 56 (2000), pp. 651 – 676. Biopesticidi: una rassegna della loro azione, applicazioni ed efficacia.
  
- Maffiotti A., Bona F., Volterra L. 1997. Introduzione all'ecotossicologia. Quaderni di Tecniche di Protezione Ambientale. Pitagora, Bologna Ed. Analisi e recupero dei sedimenti marini.

- MC Rillig, M. Ryo, A. Lehmann, CA Aguilar-Trigueros, S. Buchert, A. Wulf, A. Iwasaki, J. Roy, G. Yang. *Science*, 366 (2019), pp. 886 – 890. Il ruolo di molteplici fattori di cambiamento globale nel guidare le funzioni del suolo e la biodiversità microbica.
  
- Michelle Hubbard, Russell K Hynes, Martin Erlandson, Karen L Bailey. *Processi chimici sostenibili volume 2*, Numero articolo:18 (2014). - La biochimica alla base dell'efficacia dei biopesticidi.
  
- Muñoz-Leoz, B. et al. *Sci. Total Environ.* 449, 345–354 (2013). Effetti non target di tre pesticidi formulati sui processi mediati da microbi in un terreno argilloso.
  
- Murali Gopala, Alka Gupta, V. Arunachalama, Magub. Impatto di Azadirachtin, un allelochemical insetticida del Neem sulla microflora del suolo, sugli enzimi e sulle attività respiratorie.
  
- Muyzer, G., and Smalla, K. (1998) in *Microbial Ecology*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(1), 127-141. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE).
  
- Parker L.W., Doxtader K.G., 1983. *Journal of Environmental Quality in press*. Kinetics of microbial degradation of 2,4-D in soil: effects of temperature and moisture.
  
- Patrizia Cinquina, 2011. Maggiori Editore. Sicurezza e prevenzione in agricoltura.
  
- PG Falkowski, T. Fenchel, EF Delong. *Science*, 320 (2008), pp. 1034 – 1039. I motori microbici che guidano i cicli biogeochimici della terra.
  
- Prashar e Shah, 2016. *Agricoltura sostenibile Recensioni*, 19, *Springer Publishing internazionale*, pp. 331 – 361. Impatto di fertilizzanti e pesticidi sulla microflora del suolo in agricoltura.

- Puglisi, E. (2012). EFSA *Supporting Publications* 9(11), 359E. Response of microbial organisms (aquatic and terrestrial) to pesticides.

-Rapporti 17/2002 ANPA - Dipartimento Rischio Tecnologico e Naturale - I prodotti fitosanitari in agricoltura.

- Riffaldi, R., Saviozzi, A. & Levi-Minzi, R. *Biol Fertil Soils* 22, 293–298 (1996). Cinetica di mineralizzazione del carbonio come influenzata dalle proprietà del suolo.

- Rosa Francaviglia, Maria Teresa Dell'Abate, Anna Benedetti, Stefano Mocali Metodologie per la determinazione dei parametri chimici, biochimici e microbiologici del suolo.

- Rosa Pino-Otín, Jonatan Val, Diego Ballester, Enrique Navarro, Esther Sánchez, Azucena González-Coloma, Ana M. Mainar. Ecotossicità di un nuovo biopesticida prodotto da *Lavandula luisieri* su organismi del suolo non bersaglio da diversi livelli trofici.

- Sameh Selim, Fabrice Martin-Laurent, Nadine Rouard , Silvio Gianinazzi , Diederik van Tuinen. *Pest Manag Sci.* (2007). Impatto di un nuovo biopesticida prodotto da *Paenibacillus* sp. sforzo B2 sulla struttura genetica e la densità delle comunità batteriche del suolo.

-Sana Romdhane, Marion Devers-Lamrani, Jérémie Beguet, Cédric Bertrand, Christophe Calvayrac, Marie-Virginie Salvia, Amani Ben Jrad, Frank E. Dayan, Aymé, Lise Barthelmebs, Fabrice Martin-Laurent. *Science of The Total Environment.* 2019. Valutazione dell'impatto ecotossicologico degli erbicidi  $\beta$ -triketone naturali e sintetici sulla diversità e sull'attività della comunità batterica del suolo utilizzando approcci omici.

- Sarfraz Hussain, Tariq Siddique, Muhammad Saleem, Muhammad Arshad, and Azeem Khalid. Impact of Pesticides on Soil Microbial Diversity, Enzymes, and Biochemical Reactions.

- Sethi, Sonia; Gupta, Saksham. *Universal Journal of Environmental Research & Technology*. Apr2013, Vol. 3 Edizione 2, p326-330. 5p. Impatto di pesticidi e biopesticidi sul carbonio da biomassa microbica del suolo.
  
- Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., and Hajibabaei, M. (2012). *Molecular ecology*, 21(8), 1794-1805. Next Generation technologies for environmental DNA research.
  
- SK Nair, NS Subba Rao. *Terreno piante*, 46 (1977), pp. 511 – 519. Microbiologia della regione delle radici di cocco e cacao in coltura mista.
  
- S. Sarawaneeyaruk, S. Krajangsang, O. Pringsulaka. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 15 (2015), pp. 1071 – 1083. Gli effetti dell'estratto di neem e dell'azadiractina sui microrganismi del suolo.
  
- Springer, U., Klee, J., 1954. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 64, 1- 26. Esame dell'efficienza di alcuni importanti metodi per la determinazione del carbonio.
  
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, MC, Seoane, S. & Gil-Sotres, F. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1867–1875 (2000). Limitazioni degli enzimi del suolo come indicatori dell'inquinamento del suolo.
  
- Umar, A., Tahir, F. and Agbo, E. (2017). *Advances in Microbiology*, 7, 480-486. Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) Profile of Bacterial Community from Agricultural Soils in 1Bauchi, North-East Nigeria.
  
- Vance, ED, Brookes, PC e Jenkinson, DS 1987. *Biologia e biochimica del suolo*. 19 (6), pagg. 703-707. Un metodo di estrazione per misurare la biomassa microbica del suolo C.
  
- Van Elsas, J.D., and Boersma, F.G.H. (2011). *European Journal of Soil Biology*, 47(2), 77-87. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere.
  
- Wiedmann, M., and Carroll, L.M. (2019). "Next-Generation Sequencing," in *Encyclopedia*

of *Food Chemistry*, eds. L. Melton, F. Shahidi & P. Varelis. (Oxford: Academic Press), 376-383.

- Xiong, W., Jousset, A., Guo, S. et al. *ISME J* 12, 634–638 (2018). Le comunità protiste del suolo formano un hub dinamico nel microbioma del suolo.

- Yan-Jun Zhang, Jun-Jie Yu, Yan-Nan Zhang, Xiao Zhang, Chang-Jun Cheng, Jan-Xin Wang, Derek W. Hollomon, Ping-Sheng, Ming-Guo Zhou. 2009. Effetto della resistenza ai Carbendazim sulla produzione di tricoteceni e sull'aggressività del *Fusarium graminearum*.

- Yatin Thakore. *Bioteχνologie Industriali*, 2006. Il mercato dei biopesticidi per uso agricolo globale.

## 6.2 SITOGRAFIA

[www.ambienteterritorio.coldiretti.it/tematiche/Agrofarmaci/Pagine/Cosasonoifitofarmaci.asp](http://www.ambienteterritorio.coldiretti.it/tematiche/Agrofarmaci/Pagine/Cosasonoifitofarmaci.asp)

[x](#) Agrofarmaci. Ambiente e Territorio.

[www.ambienteterritorio.coldiretti.it/tematiche/Ogm/Documents/beloukha.pdf](http://www.ambienteterritorio.coldiretti.it/tematiche/Ogm/Documents/beloukha.pdf).

Beloukha.

[www.dinamicafp.it/docs/guidapatentini/Modulo02/MOD2\\_UD1\\_pericolosita.pdf](http://www.dinamicafp.it/docs/guidapatentini/Modulo02/MOD2_UD1_pericolosita.pdf)

Il Corretto Impiego Dei Prodotti Fitosanitari.

[www.scienzaegoverno.org/content/131-destino-ambientale-dei-prodotti-fitosanitari](http://www.scienzaegoverno.org/content/131-destino-ambientale-dei-prodotti-fitosanitari)

Desino ambientale dei prodotti fitosanitari.

[www.treccani.it/enciclopedia/ricerca/erbicidi/](http://www.treccani.it/enciclopedia/ricerca/erbicidi/)

[www.treccani.it/enciclopedia/ricerca/fungicidi/](http://www.treccani.it/enciclopedia/ricerca/fungicidi/)

[www.treccani.it/enciclopedia/insettici/](http://www.treccani.it/enciclopedia/insettici/)

[www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

[www.microbiologiaitalia.it/didattica/biopesticidi](http://www.microbiologiaitalia.it/didattica/biopesticidi)

[www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides](http://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/what-are-biopesticides)

<http://www.efsa.europa.eu/it>

<https://link.springer.com/>

<http://www.yladlivingsoils.com.au/AboutUs/biologicalagriculture.html>

What is Biological Agriculture.

[https://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/rapporti/R\\_216\\_15.pdf](https://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/rapporti/R_216_15.pdf)

Valutazione del rischio potenziale dei prodotti fitosanitari nelle Aree Natura 2000

ISPRA - Istituto superiore per la Protezione e Ricerca Ambientale.

<https://www.cleaverscientific.com>

<https://www.diatechpharmacogenetics.com>