

METODI BIOLOGICI

PER LA RIVELAZIONE DEI RESIDUI DI FUNGICIDI

Rispetto alle tecniche di rivelazione biologica dei residui di fungicidi da noi descritte (Foschi, Cesari, Olmo, 1967) sono stati attuati alcuni perfezionamenti di cui si dà atto con la presente nota.

Oltre all'ulteriore messa a punto della tecnica di «diffusione in agar» che ancor oggi è ampiamente adottata, soprattutto per la sua semplicità e rapidità di esecuzione, si è indagato sulla possibilità d'impiego della cromatografia su «strato sottile» per la rivelazione di residui anche molto limitati di fungicidi su vegetali. La variazione più interessante, apportata alla tecnica della «diffusione in agar», riguarda l'impiego di uno stratificatore da cromatografia che permette di ottenere uno spessore uniforme di 500 micron dell'agar malto al 2%, in cui è inseminata una sospensione di spore del fungo test.

Questa modifica permette di migliorare sia i limiti di sensibilità di questi microrganismi ai prodotti tossici, sia di ridurre il «tempo di incubazione» (vedi istogramma n. 1) e di esecuzione delle analisi. I microrganismi tests che vengono da noi utilizzati con tale tecnica sono: *Saccharomyces cerevisiae* Mejen, *Torulopsis candida pulcherrima* (Lindn) Sacc., *Aspergillus niger* Van Tiegh e *Neurospora sitophila* Shear.

Nel ricercare l'eventuale presenza di residui di fungicidi nelle derrate ortofrutticole con tale metodo di analisi è consigliabile l'impiego di tutti i biotests sopra citati, i quali, essendo dotati di un diverso grado di

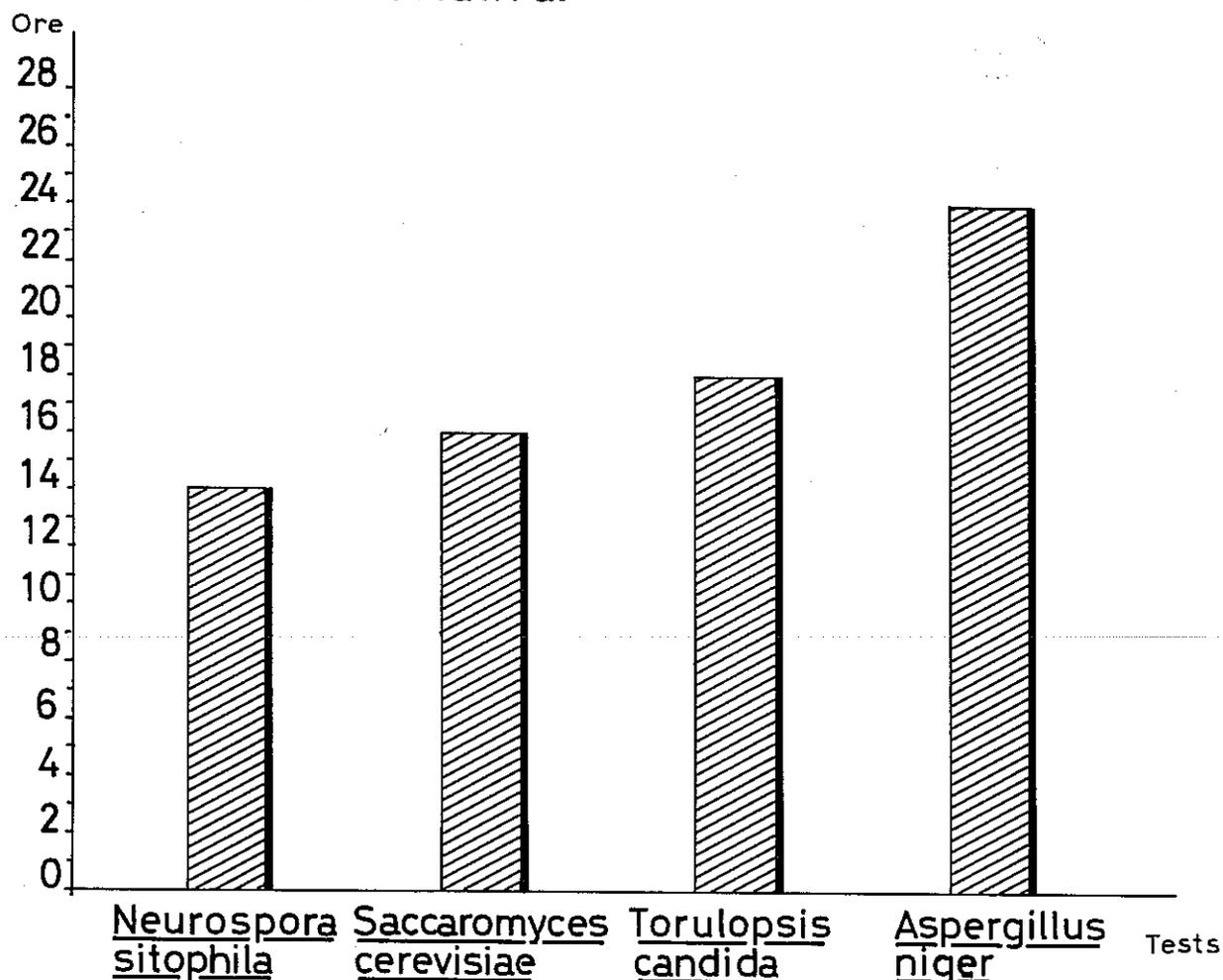
sensibilità ai diversi principi attivi consentono di rilevare la presenza di un'ampia gamma di questi ultimi consentendo di effettuare, nel contempo, un'analisi differenziata da un punto di vista qualitativo.

* * *

La cromatografia su strato sottile adottata si rifà al metodo di Shiffer e Kovacs (1959), successivamente modificato da Foschi e Coll. (1967). Le lastre di vetro, cm 20 × 20, sono stratificate con Gel di Silice G-MN ed attivate per 30' a 105° C. Su di esse sono deposte quantità di prodotto comprese fra 0,04 e 0,40 gamma, ed il tutto è sottoposto ad eluizione in vasche opportunamente saturate con miscele di solventi costituite da: acetone + metanolo (1 : 1); etere di petrolio + acetone (90-10); etere di petrolio + metanolo (93:7) (v. tabella 1).

Dopo l'eluizione del prodotto e l'evaporazione del solvente si procede alla rivelazione irrorando una soluzione costituita da 50 cc. di acqua sterile contenente una sospensione di 150 mila - 200 mila conidi per cc., 50 cc. di succo di frutta centrifugato ed 1 gr. di malto «PIAM Vit.». La fase di rivelazione dei prodotti prevede un periodo di incubazione delle cromatoplastre che avviene in termostato a 26° C ed al 70% di umidità relativa, e richiede un tempo variabile dalle 14 alle 24 ore perché il fungo-test si sviluppi uniformemente su tutta la superficie, escluse naturalmente le zone nelle quali si è eluito

Tempi medi d'incubazione dei biotests su lastra di agar malto 2% a 26°C ed al 70% di umidità relativa.



il principio attivo. Il rilievo delle aree di inibizione viene facilitato inviando un raggio di luce radente sulla cromatoplastra.

Le lastre vengono successivamente poste a disseccare in stufa, indi si procede alla misura dell'R.F. e delle suddette aree di inibizione; mediante questi dati è possibile con ottima approssimazione, risalire sia alla natura del fungicida, sia alla quantità di sostanza tossica riscontrata. Risulta inoltre possibile, in alcuni casi, evidenziare la presenza di metaboliti, purché essi risultino attivi nei confronti del test impiegato nella rivelazione. Ciò è chiaramente dimostrato per il Benlate della Du-Pont (v. fig. 1).

I biotests più impiegati nelle indagini in

C.S.S. sono la *Neurospora sitophila* Shear e il *Penicillium notatum* West., entrambi caratterizzati da una notevole rapidità di sviluppo, variabile dalle 14 alle 24 ore, e dalla tendenza ad emettere un micelio aereo che facilita notevolmente l'evidenziazione delle zone di inibizione.

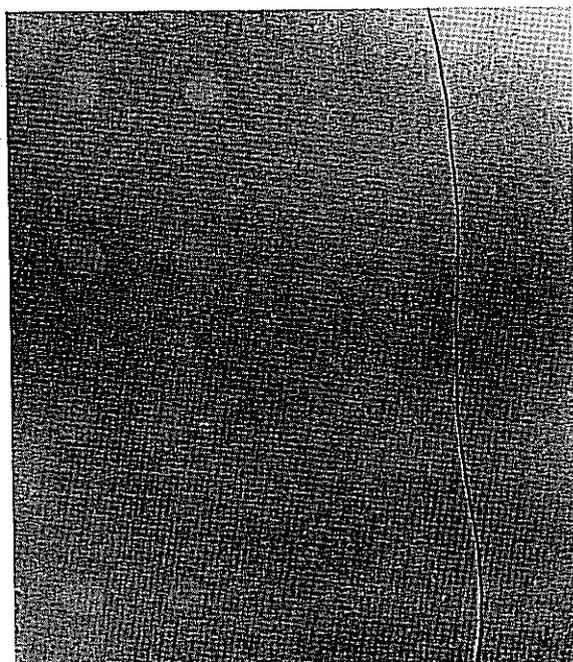
* * *

Per l'estrazione dei fungicidi dalla matrice vegetale si è adottata la tecnica di A. Constance e Mc. Kinley (1960), modificandola allo scopo di diminuire le perdite di prodotto tossico, perdite che si verificano durante i vari passaggi, e per ridurre il tempo

TABELLA N. 1 - Valori di R.F. in prova di confronto di diverse miscele di eluenti

Elementi	Etere di Petrolio + Metanolo (97:3)	Etere di Petrolio + acetone (90:10)	Acetone + metanolo (1:1)
FITOFARMACI			
Faltano	0,39	0,42	0,88
Diclofluanide	0,04	0,98	0,86
Captano	0,20	0,94	0,80
Thiram	0,08	0,06	0,82

di estrazione a sole 2 ore. La modificazione, che potremo meglio definire una semplificazione, consiste in due omogeneizzazioni con 100 cc. di alcool isopropilico e 200 cc. di benzene neutralizzati, un lavaggio dell'omogenato con 50 cc. di benzene neutro, due lavaggi dell'estratto con 200 cc. di acqua saturata di cloruro di sodio, una filtrazione in



Aree di inibizione determinate dal Benlate su piastra cromatografica.

TABELLA N. 2 - Limiti medi di sensibilità, con diverse tecniche, dei biotests fungini agli anticrittogamici

PRODOTTI	Limiti di tolleranza CEE-FAO	Sensibilità dei biotests espressi in ppm.					
		Diffusione in agar				C. S. S.	
		<i>Sacc. cerevisiae</i>	<i>Neur. sitophila</i>	<i>Asper. Niger</i>	<i>Torul. C. pulch.</i>	<i>Neur. sitophila</i>	<i>Penicill. notatum</i>
Ziram	3-7	5	5	5	3	2	2
Thiram (TMTD)	3-5	5	3	3	3	1	1
Antracol	7	—	—	—	7	—	—
Zineb	3-7	3	—	—	—	10	—
Zireb	7	—	—	—	7	—	—
Maneb	3-7	3	—	—	—	3	8
Mancozeb	3-7	3	—	—	—	—	—
Faltano	20	—	5	—	—	1	0,5
Difolatan	—	1	1	3	1	1	0,5
Captano	10	1	3	3	3	3	0,5
Diclofluanide	4	3	4	—	—	1	1
Dodina	1	—	—	—	—	5	—
Brestan	0	1	—	3	—	8	—
Du-Ter	0	1	—	3	—	8	—
Karatano	1	—	—	—	—	1	8
Allisan	10	5	—	—	—	—	—
PCNB	—	3	—	—	—	—	—
1991 (Benlate)	—	3	—	—	—	—	1
Ossicloruro di rame	15	—	—	—	5	5	—

Nella tabella non sono riportati i limiti di sensibilità superiori alle 10 ppm.

buchner con 50 gr. di solfato di sodio anidro e concentrazione in evaporatore rotante. Si ottiene così un estratto le cui impurezze, non influiscono sull'attività dei biotests e quindi sulla rivelazione del fungicida.

I solventi impiegati sono portati a valori di pH compresi fra 7,2 - 7,4, mediante aggiunta controllata di idrossido d'ammonio al 25%, onde evitare rapidi fenomeni di degradazione specialmente per alcuni ditiocarbammati fungicidi i quali, secondo ricerche condotte da Goksoyr (1955), e da noi riprese, risultano decomporsi molto rapidamente a pH inferiore a 6.

Dai risultati riportati in tab. 2 si può constatare che impiegando contemporaneamente la tecnica di «diff. in agar» e la «C.S.S.» è possibile rivelare la presenza dei residui di gran parte di fungicidi oggi utilizzati in un tempo di 24-26 ore e per quantità rientranti nei «limiti di tolleranza», fatta eccezione per i derivati stannorganici.

BIBLIOGRAFIA

- COSTANCE A., MCKINLEY W. P., *Procedure for Cleanup of Plant Extrat Prior to Analyses for DDT and related Pesticides*, «J. Agr. Food. Chem.», 1960, 8, 186.
- FOSCHI S., CESARI A., OLMO E., *Metodi biologici per la rivelazione di residui di antiparassitari*, «Atti delle Giornate Fitopatologiche 1967», 91, 102.
- GOKSOYR J., *The Influence of pH Redox Potential*, «Nature», 1955, 175, 820.

SHIFFER A. P., KOVACS A., *Tetragonin: a Yeast Growth-regulating Substance from Tetragonia expansa*, «Nature», 1959, 183, 988-989.

RIASSUNTO

Gli autori, nell'ambito della messa a punto di metodi di analisi dei residui di antiparassitari presenti su derrate agricole, hanno descritto i perfezionamenti che sono stati apportati per ciò che concerne l'analisi qualitativa e quantitativa dei residui di fungicidi. Sono indicate le modifiche apportate alla «Diffusione in agar» e la tecnica di analisi dei fungicidi mediante la «Cromatografia su strato sottile». È inoltre descritta una tecnica di estrazione rapida per analizzare i prodotti tossici.

Questi metodi permettono di compiere una analisi di tali residui in un tempo di 24-26 ore per quantità rientranti nei limiti di tolleranza, fatta eccezione per i derivati stannorganici.

SUMMARY

The authors, while preparing methods of analysis of residues of antiparasites present in deratized crops, have described the improvements that were brought about by this method, which concerns qualitative and quantitative analysis of fungicides. Indicated are modifications to «Agar Diffusion» and «Thin Layer Chromatography». Also described is a technique of rapid extraction to analyze these toxic products.

They are able to complete an analysis of such residues within 24-26 hours for quantities within the limits of tolerance, the only exception being for stannorganic derivatives.