



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE E TECNOLOGIE AGRARIE

CONTAMINAZIONE AMBIENTALE DA
ELEMENTI POTENZIALMENTE TOSSICI.
EFFETTI SULL'ATTIVITÀ ENZIMATICA NEI
LOMBRICHI
ENVIRONMENTAL CONTAMINATION BY
POTENTIALLY TOXIC ELEMENTS.
EFFECTS ON EARTHWORMS' ENZYME
ACTIVITY

TIPO TESI: compilativa

Studente:
Riccardo Frati

Relatore:
PROF. COSTANTINO VISCHETTI

Correlatore:
DOTT.SSA ARIANNA DE BERNARDI

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

SOMMARIO

ELENCO DELLE TABELLE.....	2
ELENCO DELLE FIGURE	3
PREMESSA E SCOPO DELLA TESI	4
CAPITOLO 1 . INTRODUZIONE.....	5
1.1 I PTE	5
1.1.1 I PTEs più diffusi e loro biodisponibilità.....	7
1.1.2 Principali fonti di provenienza dei PTEs	11
1.2 Ecotossicologia	14
1.2.1 Valutazione del rischio ecotossicologico.....	16
1.2.2 Bioaccumulo, biomagnificazione ed ecotossicologia dei PTEs.....	18
1.2.3 Invertebrati come bioindicatori.....	20
1.2.4 Enzimatica nei lombrichi come metodo di analisi della contaminazione da PTEs	25
CAPITOLO 2 ANALISI BIBLIOGRAFICA DEGLI STUDI ECOTOSSICOLOGICI-ENZIMATICI SU EFFETTI DI PTES NEI LOMBRICHI	28
2.1 Casi studio e rielaborazioni.....	28
2.1.1 Superossido dismutasi (SOD).....	30
2.1.2 Glutazione-S-transferasi (GST).....	32
2.1.3 Catalasi (CAT).....	33
2.1.4 Glutazione perossidasi (GPX)	34
2.1.5 Glutazione reduttasi (GR).....	35
2.1.6 AChE	36
2.1.7 Metallotioneine, un altro parametro come risposta ai PTEs nei lombrichi	36
CONCLUSIONI	38
BIBLIOGRAFIA	39

ELENCO DELLE TABELLE

Tabella 1 Fonti geologiche dei PTEs Fonte: Alloway, J. B. (2012).....	11
Tabella 2 Concentrazione di PTEs in letame di allevamenti Europei e Cinesi Fonte: Alloway, J. B. (2012)	12
Tabella 3 Contenuto medio di PTEs nei fanghi di depurazione di stati membri dell'UE Fonte: Alloway, J. B. (2012)	13
Tabella 4 Concentrazione di PTEs in fertilizzanti fosfatici e azotati, calcare e letame di tutto il mondo e concentrazione media nei fertilizzanti europei Fonte: Alloway, J. B. (2012).....	14
Tabella 5 Sunto dei parametri principali degli articoli esaminati.....	28

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1.1 Relazione tra ecotossicologia e altre discipline. Fonte: Newman C.M. (2009) ...	15
Figura 1.2 Determinazione di LC50. Fonte: Newman C.M. (2009).....	16
Figura 1.3 Analisi enzimatiche per PTEs.....	29

PREMESSA E SCOPO DELLA TESI

La contaminazione ambientale del suolo, da parte di elementi potenzialmente tossici (PTEs) è l'incipit di questo lavoro di tesi. Nell'introduzione questi elementi vengono descritti e caratterizzati insieme alle cause principali che spesso portano a fenomeni di inquinamento ambientale. Al fine di comprendere gli effetti dannosi che tali elementi possono comportare all'ecosistema suolo, vengono dunque riportati i concetti ecotossicologici di valutazione del rischio, bioaccumulo e biomagnificazione, con focus sugli invertebrati e specificatamente sui lombrichi quali importanti sentinelle dello stato di salute del suolo.

Questo lavoro di tesi si sviluppa poi, attraverso l'analisi di articoli recenti e rilevanti inerenti alle analisi enzimatiche condotte sui lombrichi, nella valutazione dell'impatto di elementi potenzialmente tossici, in quanto metodologie di detection dell'inquinamento estremamente sensibili. I risultati dello scrutinio bibliografico sono stati rielaborati in un grafico ed una tabella riassuntiva, allo scopo di confrontare le metodologie enzimatiche più diffuse e maggiormente promettenti per lo studio dell'impatto sulla salute dei lombrichi a seconda dell'elemento preso in esame.

La raccolta e rielaborazione di fonti scientifiche accreditate permette infine di ordinare in modo chiaro i numerosi enzimi impiegati nella valutazione precoce di eventuali effetti negativi o di risposta ecotossicologica causati da livelli di contaminazione non letale per i lombrichi, nell'ottica di sensibilizzare al delicato e complesso tema dell'inquinamento del suolo e della ricchezza di questa risorsa.

Capitolo 1. INTRODUZIONE

1.1 I PTE

I PTE, acronimo di “Potentially Toxic Elements”, sono elementi utilizzati in molte parti del mondo ormai da millenni. Il piombo, sfruttato dall’uomo da almeno 5000 anni, serviva a soddisfare importanti esigenze. La costruzione di tubi per trasportare acqua, di oggetti in generale e la decorazione di vasi sono stati i primi impieghi. I romani lo utilizzavano per ottenere utensili da cucina, merce in peltro, monete, equipaggiamento da pesca e casse da morto. Acetato e carbonato di piombo erano impiegati come dolcificanti, conservanti, medicine, pigmenti e cosmetici. Non a caso, la quantità di questo metallo che un cittadino romano ingeriva al giorno poteva arrivare anche ad un grammo. Il mercurio era utilizzato, sempre dai romani, come rimedio al mal di denti nei bambini. Tra il 1300 e il 1800 doveva invece costituire un rimedio alla sifilide. Un elemento come il cadmio era utilizzato dal pittore Claude Monet per ottenere pigmenti di colore giallo, rosso e arancione. (Jarup, 2003; Montgomery, Evans, Chenery, Pashley, & Killgrove, 2010) Non possiamo poi non parlare del rame. I primi utilizzi risalgono a circa 7000 anni fa, in Medio Oriente e in America. Il rame è un metallo raro assieme ad argento e oro, costituendo lo 0,006% della crosta terrestre. Nonostante ciò, è stato uno dei primi ad essere impiegato per la creazione di armi, oggetti decorativi o monete al posto di elementi come il ferro e l’alluminio, presenti invece in quantità assai meno limitate. Questo perché esso può apparire in natura sotto forma di pepita, in purezza, la quale veniva direttamente lavorata grazie alla sua estrema duttilità e malleabilità. Scoperte tecnologiche come la fusione e la formazione di leghe, hanno dato al rame la spinta per diventare uno degli elementi più significativi nella storia dell’umanità (Radetzki, 2009). L’arsenico veniva utilizzato dagli antichi egizi e dai cinesi, intorno al 3000 a.C., per formare una patina decorativa argentea su statue e specchi. Quasi tutte le leghe metalliche contengono una piccola percentuale di arsenico. I fabbri, in passato, selezionavano e preferivano leghe di metallo contenenti arsenico, le quali risultavano qualitativamente migliori. Solfuri di arsenico venivano considerati dei medicamenti da Ippocrate e dei rimedi contro i pidocchi, ulcere e ascessi, se mischiati con olio, da Dioscoride Pedanio (Nriagu, 2002). Il termine “metallo pesante”, ora sostituito dalla più corretta dicitura

“PTE”, è senza significato e addirittura confusionario, secondo un report tecnico pubblicato dalla IUPAC nel 2002. Spesso, è stato usato in letteratura per indicare un gruppo di metalli e metalloidi con la potenzialità di essere tossici e nocivi per l’ambiente. Tuttavia, le parole “metallo” e “pesante” non sono per nulla rappresentative. La prima indica l’elemento in forma pura, il quale sovente non è dannoso biologicamente. Potrebbero esserlo invece i composti derivati. Mentre la seconda indica la densità, poco emblematica del comportamento nei confronti dell’ecosistema. Nonostante ciò, nel corso della storia ci sono stati vari tentativi di trovare delle caratteristiche che accumulassero i cosiddetti “metalli pesanti”, per dare vita ad una definizione univoca. Le definizioni sono state create basandosi sulla densità, massa atomica, numero atomico o proprietà chimiche particolari. Tutte sono incorrette in quanto comprendono una varietà di elementi con proprietà chimiche molto diverse. Quindi, effetti biologici e tossicologici non prevedibili. La difficoltà di classificare i metalli pesanti nasce a monte, già nella definizione di metallo. I metalli, nonostante alcune proprietà comuni, possiedono ognuno aspetti fisico-chimici peculiari che rende ardua la catalogazione. A questo si aggiunge il fatto che essi possono presentarsi sotto forme assai differenti, con proprietà talvolta tanto variegate quanto quelle presenti nella moltitudine dei composti del carbonio. È importante che la classificazione di qualsiasi elemento chimico faccia riferimento alla tavola periodica degli elementi. Perciò, raggruppare un elemento e conseguentemente i suoi composti derivati sotto il nome di “metalli pesanti” con una connotazione nociva e tossica è errato. Ad esempio, lo stagno differisce molto dal suo composto derivato tributilstagno ossido. Il primo non è tossico, mentre il secondo lo è. Per categorizzare i metalli sulla base della loro tossicità sarebbe quindi preferibile togliere la parola “pesanti”, inappropriata, e prendere invece in considerazione la valenza di un elemento, sul fondamento della quale è già stata fatta una suddivisione nella tavola periodica. Così, la classificazione avrà sicuramente un fondamento scientifico in quanto le proprietà chimiche sono certamente predittive del comportamento biologico. Ovviamente essa sarà efficace in certi ambiti ma sarà limitata in altri. I metalli sono stati quindi distribuiti all’interno di quattro blocchi: s, p, d e f. Ogni blocco riunisce in sé quelli con la stessa valenza e quindi stesso comportamento chimico. Questa suddivisione, seppur limitata, se associata ai relativi effetti biologici, risulta essere scientifica e coerente. Un’altra classificazione dei metalli è stata creata considerandoli acidi di Lewis. Un acido di Lewis è una sostanza che possiede un orbitale molecolare a più bassa energia non occupato (LUMO). Esso avrà una carica positiva e si comporterà da accettore di elettroni. Questa caratteristica determina la formazione di composti. La differenziazione degli ioni metallici basata sulla

diversa acidità di Lewis ha permesso la suddivisione in: ioni metallici di classe A, B e borderline. I primi, non polarizzabili, formano composti con elementi altrettanto non polarizzabili. Donatore ed accettore risultano così uniti da un legame ionico. I secondi invece, polarizzabili, si legano in modo covalente a donatori anch'essi polarizzabili. Gli ioni metallici borderline sono molto più imprevedibili. Essi formano composti sia con elementi polarizzabili che non. L'ordine di stabilità di questi composti risulta però difficile da determinare. Ogni ione metallico con diverso stato di ossidazione di ogni elemento va considerato a sé in questa classificazione. Quelli con carica maggiore, essendo più piccoli e meno polarizzabili, avranno la tendenza a comportarsi come ioni di classe A. Gli ioni metallici di classe A, relativamente alla tossicità, non sono rilevanti. Difatti essi, trovandosi in legami ionici, risultano molto mobili nell'ambiente e negli organismi e di conseguenza facilmente smaltibili. Gli ioni metallici di classe B possono invece risultare tossici in quanto legati covalentemente e quindi poco mobili. C'è da specificare che questa classificazione, quando messa in atto, risulterà diversa per ogni stato di ossidazione di ciascuno ione metallico. Ad esempio, tra ioni dello stesso elemento, quello con carica maggiore, essendo più piccolo e meno polarizzabile, avrà un comportamento ascrivibile alla classe A. In generale, essa presenta delle limitazioni, già apprezzabili dalla presenza di un gruppo borderline di elementi con comportamento non nettamente prevedibile. Nonostante ciò, prevalgono gli accordi più che i disaccordi tra gli autori riguardo questa classificazione (Duffus, 2002); (Nieboer & H.S.Richardson, 1980). È importante educare le persone ad un abbandono della dicitura "metallo pesante". Il termine "Potentially Toxic Element", PTE, potrebbe rappresentare un'alternativa all'utilizzo dell'inappropriato termine "metallo pesante". Esso è meno ambiguo e raggruppa elementi su una più larga scala, senza rischiare di incombere in inesattezze (Pourret & Hursthouse, 2019).

1.1.1 *I PTEs più diffusi e loro biodisponibilità*

Il terreno e le piante sono i due pilastri della contaminazione ambientale. Il primo lo è in quanto serbatoio di accumulo dei PTEs, grazie alla sua capacità di ritenzione. Le seconde, invece, sono i vettori primari della catena alimentare. La quota biodisponibile di un qualsiasi PTE all'interno del suolo non corrisponderà quasi mai a quella totale. Negli studi riguardanti la valutazione della potenzialità nutritiva di un suolo viene considerata, di un elemento, la parte effettivamente assorbibile da una pianta. Stessa metodologia andrebbe applicata per valutare l'effettivo livello di contaminazione di un suolo. La quantità totale di una sostanza risulta essere quindi relativamente importante. (McLaughlin, Zarcinas, Stevens, & Cook, 2008); (Capri & Trevisan, 2002). I PTEs partecipano a equilibri di scambio che dipendono

dalle loro proprietà e da quelle del suolo in cui sono presenti. Capacità di scambio cationico, pH, tipo di argille, stato redox, sostanza organica, idrossidi di Al, Fe e Mn, chelanti solubili, anioni di acidi inorganici e temperatura sono tutti fattori che influenzano fortemente la biodisponibilità dei PTEs (Capri & Trevisan, 2002).

La CSC è indice della potenzialità di adsorbimento di un suolo. Al suo aumentare diminuirà la mobilità dei PTEs. Essa dipende, a sua volta, dalla quantità e qualità di argilla e sostanza organica nel terreno. Possiamo quindi affermare che, in linea generale, la biodisponibilità dei PTEs è inversamente proporzionale alla CSC. Non sempre, però, si presenta questa casistica. A seguito di fenomeni di chelazione o interazioni con anioni organici e inorganici, la capacità di adsorbimento delle superfici colloidali potrebbe subire una diminuzione.

Il pH influenza in maniera determinante la biodisponibilità dei PTEs. Esso modula il potere di adsorbimento di un suolo. Tendenzialmente, la mobilità dei cationi diminuisce al suo aumentare. Terreni acidi presentano una frazione biodisponibile di PTEs più alta.

La sostanza organica è protagonista di due fenomeni antagonisti: complessazione e solubilizzazione dei PTEs. Essa può comportarsi in modo simile alle superfici colloidali argillose trattenendo i PTEs e quindi diminuendo la loro mobilità. Oppure, può renderli più biodisponibili formando con essi complessi organici solubili.

I fosfati possono complessarsi con i PTEs, rendendoli meno mobili. Questo fenomeno è facilitato da valori di pH alti e basse concentrazioni di carbonati.

Anche ossidi e idrossidi di alluminio, ferro e manganese hanno una loro importanza nella biodisponibilità di elementi potenzialmente tossici. Il loro potere di adsorbimento e la tipologia di ioni adsorbiti sono influenzati dal pH. A pH bassi è maggiore l'adsorbimento anionico. A pH alti, invece, prevale quello cationico.

I PTEs possono, inoltre, essere più o meno biodisponibili a seconda del loro stato di ossidazione. I principali sono: arsenico, cadmio, cromo, rame, mercurio, nichel, piombo e zinco (Capri & Trevisan, 2002).

Arsenico

L'arsenico si presenta nel terreno in due stati di ossidazione: III e V. È abbondante nei depositi di zolfo e si recupera come prodotto secondario dalla fusione di piombo e rame. La sua produzione mondiale è in netto calo già dal 1979, essendo considerato pericoloso. La concentrazione media in terreni agricoli incontaminati risulta essere 10mg/kg ed essendo poco mobile tende ad accumularsi in superficie. L'arsenico è influenzato dal pH in maniera differente rispetto agli altri PTEs. La sua mobilità è direttamente proporzionale al valore di pH, all'aumentare del quale arseniati di Fe e Al si solubilizzano liberandolo. Inoltre, la

presenza di Ca a pH alcalini è positiva per la sua solubilità. La CSC è di poco conto poiché l'arsenico si presenta spesso in forma anionica. Ambienti riducenti possono portare ad una maggiore disponibilità dell'arsenico per due motivi: i passaggi da As (V) ad As (III) e del Fe (III) a Fe (II). As (III) possiede una biodisponibilità più elevata, mentre alla formazione di Fe (II) consegue la solubilizzazione degli arseniati. La presenza di Fe e Al, a pH acidi, immobilizza l'arsenico insolubilizzandolo (Capri & Trevisan, 2002).

Cadmio

Il cadmio si presenta spesso in natura associato allo zolfo, come CdS. Risulta, inoltre, affine allo ione cianuro e ammonio. Con arseniati, fosfati, carbonati, ossalati e ferrocianuri forma dei sali altamente insolubili. I quantitativi medi trovati nei suoli agricoli di alcuni paesi sono stati inferiori a 1 mg/kg. La mobilità del cadmio nel terreno è influenzata più di tutti dal pH. La CSC è rilevante in terreni acidi, dove, se elevata, può immobilizzare buona parte di esso. Per quanto riguarda il discorso sull'influenza del potenziale redox del suolo è stato visto che ambienti riducenti diminuiscono la disponibilità di cadmio, che precipita sotto forma di CdS (Capri & Trevisan, 2002).

Cromo

Il cromo può presentarsi negli stati di ossidazione che vanno dallo 0 al VI. In natura, però, le forme presenti sono Cr (III) e Cr (VI), rispettivamente cromito e cromato. Il primo compare come catione, il secondo come ossianione. Cr (III) tende a precipitare, mentre il cromato risulta molto più mobile e reattivo con le altre specie presenti nel suolo. Condizioni di ambiente riducente sono favorevoli all'immobilizzazione del cromo, per il passaggio da Cr (VI) a Cr (III). Il cromo, inoltre, è influenzato notevolmente dal pH. Il cromito risulta meno adsorbito dai colloidi del suolo quando il pH è basso. Viceversa, accade per il cromato. La sostanza organica ha la capacità di ridurre Cr (VI) a Cr (III) e quindi di modulare la mobilità del PTE (Shahid, et al., 2017).

Rame

Nel suolo, il rame risulta per circa l'80% immobilizzato sotto forma di ossidi e solfuri. La restante parte forma idrossidi e carbonati, composti dove Cu possiede una discreta biodisponibilità. Il rame viene anche adsorbito dalle superfici colloidali argillose e interagisce con la sostanza organica con conseguente minore mobilità. Il suo comportamento è influenzato dal pH, che a valori altamente alcalini o acidi porta ad una sua maggiore biodisponibilità. La sostanza organica può formare sia chelati organo-metallici che mobilizzano il rame oppure può trattenerlo, grazie alla presenza di argille o ossidrossidi complessati con essa (Shabbir, et al., 2020)

Mercurio

Il mercurio è caratterizzato da elevata pressione di vapore e bassa solubilità. Si presenta in natura sotto tre stati di ossidazione: 0, I e II. Il contenuto medio nella crosta terrestre risulta essere di 50mg/kg. Può subire diverse trasformazioni nel suolo: biologiche, fisiche o chimiche. Le biologiche, tra cui la metilazione, sembrano essere quelle più rilevanti. A pH elevati le argille influenzano la mobilità del mercurio, mentre a valori bassi interviene la sostanza organica. La sostanza organica è fondamentale nel determinare la biodisponibilità di questo PTEs. Infatti, la quota associata ad essa, in alcuni esperimenti condotti con diversi estraenti, è risultata circa 200 volte superiore alla quota scambiabile. Inoltre, in ambiente riducente, si formano solfuri di mercurio determinanti la sua precipitazione. Non di meno importanza è la presenza di fosfati, carbonati e solfati nell'immobilizzare il mercurio (Capri & Trevisan, 2002).

Nichel

Il nichel si presenta in natura sotto gli stati di ossidazione 0 e II. Tende a legarsi con lo ione ossidrilico, solfato, cloruro e ammonio. La sua concentrazione media nei terreni è stabilita ad un valore di 30-50 mg/kg. Il 90-95% di esso è immobilizzato nei siti di scambio cationico del suolo, nei sesquiossidi, nei carbonati e nei fosfati. Il nichel è influenzato dal pH, che aumentando tende ad immobilizzarlo. La sostanza organica può avere un comportamento ambivalente: la forma più stabile tende a rendere questo PTE meno biodisponibile, mentre i suoi derivati chimici, gli acidi tricarbossilici, lo chelano aumentandone la solubilità. Gli idrossidi di alluminio e di ferro possono adsorbire il nichel, soprattutto a pH elevati (Capri & Trevisan, 2002).

Piombo

La concentrazione media di piombo nei terreni agrari può andare dai 5 ai 50 mg/kg. La sua mobilità è soggetta all'influenza della CSC, in particolare quella della frazione argillosa. Anche la sostanza organica sembra avere la capacità di trattenerlo. Il pH, però, è il fattore più determinante nella biodisponibilità. Al suo aumentare, infatti, la mobilità del piombo diminuisce. Questo PTE presenta una certa quota in forma cationica, Pb^{++} , a pH inferiori di 6, mentre a valori compresi tra 6 e 10 lo troviamo sotto forma di idrossido, il quale forma sali insolubili con gli anioni carbonato, cloruro e fosfato. Il catione interagisce anche con le superfici delle argille e della sostanza organica cariche negativamente, che lo immobilizzano. La sostanza organica, oltre che diminuire la biodisponibilità del piombo, può dare origine a chelati che ne aumentano la mobilità (Capri & Trevisan, 2002).

Zinco

Lo zinco si presenta con un solo stato di ossidazione nel suolo, Zn (II). La sua concentrazione media nei terreni agricoli risulta essere attorno ai 100mg/kg (Adriano, 1986). Il pH può determinare la disponibilità dell'elemento, in quanto valori sopra a 7 tendono a immobilizzarlo. Inoltre, abbondanti quantitativi di sostanza organica sono negativi per la sua biodisponibilità (Capri & Trevisan, 2002).

1.1.2 Principali fonti di provenienza dei PTEs

La concentrazione totale di PTEs all'interno del suolo può essere stimata con un'equazione. Questa è calcolata attraverso una semplice sottrazione di output da degli input, che sono di origine naturale e antropica.

$$M_t = (M_{pm} + M_{atm} + M_{sed} + M_f + M_{ac} + M_{tm} + M_{om} + M_{ic}) - (M_{cr} + M_e + M_l + M_v)$$

Il primo input nell'equazione risulta essere M_{pm} , cioè la concentrazione di PTEs litogenica, che è l'unica fonte naturale.

I PTEs vengono inclusi all'interno dei minerali formanti la roccia madre a seguito di sostituzioni isomorfe dei principali ioni come il ferro, alluminio e silicio. Essi possono quindi divenire disponibili grazie a fenomeni di degradazione del parent material. Il parent material, oltre a determinare la concentrazione di macronutrienti, micronutrienti e PTEs nel suolo, influenza fattori non di minor importanza: tessitura, proprietà fisiche e chimiche (Alloway, J. B., 2012). M_{pm} è incrementato dalla presenza di alcuni tipi rocce ignee come olivine, augiti e orneblenditi. Anche le rocce sedimentarie contengono PTEs, tra cui scisto, calcare e arenaria (Sharma & Agrawal, 2004).

Tabella 1 Fonti geologiche dei PTEs ($mg\ kg^{-1}$) Fonte: (Alloway, 2012)

Element	Upper crust	Granite, granodiorite	Gabbro, basalt	Ultramafic rocks	Sandstone	Shales	Black/Oil Shales	Limestones	Coal
Ag	0.07	0.04	0.1	0.06	0.25	0.07	1.9	0.12	-
As	2	3	0.7	0.7	0.5	13	<500	1.5	10
Ba	668	600	330	5	300	550	67	90	250
Cd	0.1	0.1	0.2	0.05	<0.04	0.25	<240	0.1	1
Co	12	4	45	110	0.3	20	67	0.1	10
Cr	35	10	250	2,300	35	100	<700	5	20
Cu	14	12	90	40	2	45	<300	6	20
Mn	527	400	1,500	1,200	100	850	-	15	40
Mo	1.4	1.5	1.2	0.3	0.3	2	<570	0.3	3
Ni	19	5	130	2,000	2	70	<300	5	20
Pb	17	20	4	0.05	10	22	<100	5	20
Sb	0.3	0.3	0.2	0.1	0.05	1	<10	0.15	2
Sn	2.5	3.6	0.9	0.3	0.6	5	<10	0.3	8
U	2.5	4	0.5	0.02	1.3	3.2	<1,250	1	2
V	53	70	260	80	20	130	<2,422	15	40
Zn	52	50	100	60	20	100	<2,314	40	50

È preferibile parlare di contaminazione ambientale e non di inquinamento quando ci si riferisce a suoli e paesaggi con presenza di PTEs di origine antropica. Gli elementi contaminanti devono essere trasportati dal luogo di origine alla destinazione, che poi potrà essere definita contaminata. La dislocazione può avvenire grazie a correnti aeree, flussi di acqua, per gravità o a seguito di trattamenti sulle colture. La contaminazione può essere estensiva o localizzata. Le deposizioni atmosferiche, rappresentanti un input nell'equazione precedentemente descritto <sotto la dicitura M_{atm} , sono estensive. Esse hanno la capacità di trasportare i PTEs in luoghi anche molto distanti dalla fonte di origine. Nonostante ciò, la maggior parte è rilevabile in contesti locali. Le inondazioni sono un'altra fonte di contaminazione possibilmente estensiva. Nell'equazione è un input indicato con M_{sed} . I sedimenti di minerali e gli scarti di minerali, derivati da miniere metallifere, sono trasportati in sospensione nei fiumi. Essi vanno poi a contribuire alla formazione dei suoli alluvionali. L'agricoltura è una delle principali cause antropiche di contaminazione del suolo localizzata.

Tabella 2 Concentrazione di PTEs in letame di allevamenti Europei e Cinesi ($mg\ kg^{-1}$ su peso secco) Fonte: (Alloway, 2012)

Manure		Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
Europe							
Cattle FYM	W. mean ^b	0.3	7.5	23	4.4	3.8	119
	Range	(0.04–3.1)	(0.1–170)	(0.3–191)	(0.2–28)	(0.1–92)	(9.6–691)
	No.	348	200	345	175	331	345
Cattle slurry	W. mean	0.4	6.9	42	6.2	5.6	207
	Range	(0.04–5.5)	(0.2–170)	(0.1–741)	(0.1–57)	(0.1–75)	(2.0–1,908)
	No.	680	431	720	475	679	721
Pig slurry	W. mean	0.3	9.4	193	12	3.0	934
	Range	(0.02–4.0)	(0.2–37)	(12–1802)	(0.1–50)	(0.3–112)	(5.0–5,832)
	No.	1,128	235	1,143	180	1,126	1,143
Broiler chicken and turkey FYM	W. mean	0.4	20	89	6.2	3.7	353
	Range	(0.1–1.2)	(1.3–80)	(8.4–760)	(2.2–21)	(1.0–24)	(52–790)
	No.	102	49	105	46	102	105
China (2003)							
Cattle manure (42 ^a)	Mean	3.4	15.2	46.5	14.1	15.7	152
Pig manure (61)	Mean	4.8	46.6	473	12.5	10.1	843
Chicken manure (70)	Mean	3.4	46	102	15.9	20.6	309

^aNumero di campioni

^bMedia ponderata

L'impiego di letame derivato da allevamenti può rappresentare un input di PTEs nel suolo. L'entità contributiva dipende dal regime alimentare degli animali. I fanghi di depurazione presentano anch'essi PTEs. Essi derivano dagli impianti di depurazione delle acque reflue, che trattano escrementi umani, acque grigie, acque di scolo di tetti e strade e acque di scarto industriali. Sono utilizzati in agricoltura per la loro potenzialità nutritiva, in quanto contengono buone quantità di azoto, fosforo e sostanza organica. M_{om} , nella suddetta equazione, è l'addendo che fa le veci della concentrazione di elementi potenzialmente tossici nella sostanza organica. Letame e fanghi di depurazione costituiscono quindi un unico input (Alloway, 2012).

Tabella 3 Contenuto medio di PTEs nei fanghi di depurazione di stati membri dell'UE
Fonte: (Alloway, 2012)

Sludges (mg kg ⁻¹ dry solids)					Soils (mg kg ⁻¹)					
Metal	EU weighted ^a mean	Range ^b	EU limits ^c	Current EU soil limits ^c pH 6-7	Proposed new soil limits 1 ^d					
					Moderate changes			More significant changes		
					pH5-6	6-7	>7	pH5-6	6-7	>7
Cd	2.0	0.4-3.8	20-40	1-3	0.5	1	1.5	0.5	1	1.5
Cr	73	16-275	1,000-1,750	-	50	75	100	50	75	100
Cu	330	39-641	1,000-1,750	50-140	30	50	100	30	50	100
Hg	-	0.3-3	16-25	1-1.5	0.1	0.5	1	0.1	0.5	1
Ni	36	9-90	300-400	30-75	30	50	70	30	50	70
Pb	104	13-221	750-1,200	50-300	70	70	100	70	70	100
Zn	811	142-2,000	2,500-4,000	15-300	100	150	200	20	20	200

Tutti i valori sono concentrazioni totali a seguito di trattamento in acqua regia

^aMedia ponderata per L'UE basata sull'analisi di fanghi derivanti dagli stati membri

^bRange del contenuto medio di PTEs per ogni stato membro UE

^cDirettiva 86/278/EEC

^dLimiti nel suolo proposti dal JRC Ispra

I fertilizzanti inorganici sono un fonte ubiquitaria di PTEs. Attraverso il loro impiego vengono forniti alle colture i principali macronutrienti: azoto, fosforo e potassio. Questi elementi possono essere dati singolarmente, inclusi in formule chimiche, oppure associati nei cosiddetti fertilizzanti composti, come il più famoso NPK. I concimi fosfatici contengono generalmente la concentrazione più elevata di elementi tossici, tra cui arsenico, cadmio, uranio, titanio e zinco. M_f presente nell'equazione è l'input riferito ai fertilizzanti inorganici.

Tabella 4 Concentrazione di PTEs in fertilizzanti fosfatici e azotati, calcare e letame di tutto il mondo e concentrazione media nei fertilizzanti europei ($mg\ kg^{-1}$) Fonte: (Alloway, 2012)

	Phosphatic fertilisers		Nitrogen fertilisers		Lime fertilisers		Manures
	World range	EU median	World range	EU median	World range	EU median	World range
As	2–1,200	–	1–120	–	0.1–24	–	3–150
Ba	200	–	–	–	120–250	–	270
Cd	0.1–170	13	0.05–8.5	0.9	0.04–0.1	0.2	0.3–0.8
Co	1–12	–	5–12	–	0.4–3.0	–	0.3–24
Cr	66–600	60	3–19	3.4	10–15	6.5	5.2–55
Cu	1–300	26	1–15	2.0	2–125	5.6	2–60
Hg	0.01–1.2	–	0.03–3	–	0.05	–	0.09–26
Mn	40–2,000	–	–	–	40–1,200	–	–
Mo	0.1–60	–	1–7	–	0.1–15	–	0.05–3
Ni	7–38	22	7–38	6.0	10–20	6.3	7.8–30
Pb	7–225	13	2–1,450	1.9	20–1,250	8.2	6.6–350
Se	0.5–25	–	–	–	0.08–0.1	–	2.4
Sn	3–19	–	100–5,420	–	0.5–4	–	3.8
U	10–800	–	–	–	–	–	–
V	2–1,600	–	–	–	20	–	–
Zn	50–1,450	236	1–42	5.0	10–450	22	15–250

Non di meno importanza sono fonti di PTEs derivanti dall'utilizzo di fungicidi. Arseniato di piombo, arsenito di rame e poltiglia bordolese sono composti utilizzati da sempre nella lotta ai patogeni fungini. I fungicidi al rame sono in utilizzo dal 1885. I PTEs nel suolo derivanti dall'utilizzo di queste sostanze chimiche sono racchiusi nell'input M_{ac} . Gli output sono le perdite in conseguenza a raccolta (M_{cr}), lisciviazione (M_l), erosione (M_e) e volatilizzazione (M_v) (Alloway, 2012).

1.2 Ecotossicologia

L'ecotossicologia è una scienza che unisce concetti di ecologia e tossicologia. È stata definita per la prima volta da Truhaut nel 1969 per necessità di comprendere gli effetti di sostanze contaminanti nei confronti degli ecosistemi. La già esistente tossicologia ambientale comprende, nella sua più ampia definizione, lo studio delle conseguenze degli inquinanti sugli ecosistemi. Nonostante ciò, essa si è sempre concentrata su un tema specifico riguardante gli effetti sulla specie umana. L'ecotossicologia è quindi una disciplina inclusa nella definizione di tossicologia ambientale, che studia gli effetti delle sostanze chimiche sugli ecosistemi partendo da test di tossicità svolti sui singoli individui. È importante ricordare che la presenza di sostanze chimiche nell'ambiente non è di recente comparsa e

non è attribuibile alla sola opera dell'uomo. Sostanze tossiche sono prodotte da piante che costituiscono alimento di alcuni animali, e questi nel tempo hanno sviluppato enzimi capaci di degradarle. Questa dinamica fa parte della cosiddetta corsa agli armamenti co-evoluzionaria tra piante e animali. Metilmercurio, composti dell'acido metilarsonico, idrocarburi policiclici aromatici e i PTEs sono altre sostanze chimiche naturalmente presenti da sempre e derivanti da fenomeni naturali e che possono risultare tossiche. L'ecotossicologia va quindi vista tenendo conto di una serie di sostanze chimiche potenzialmente tossiche già presenti naturalmente, che agiscono con una pressione selettiva sugli organismi viventi.

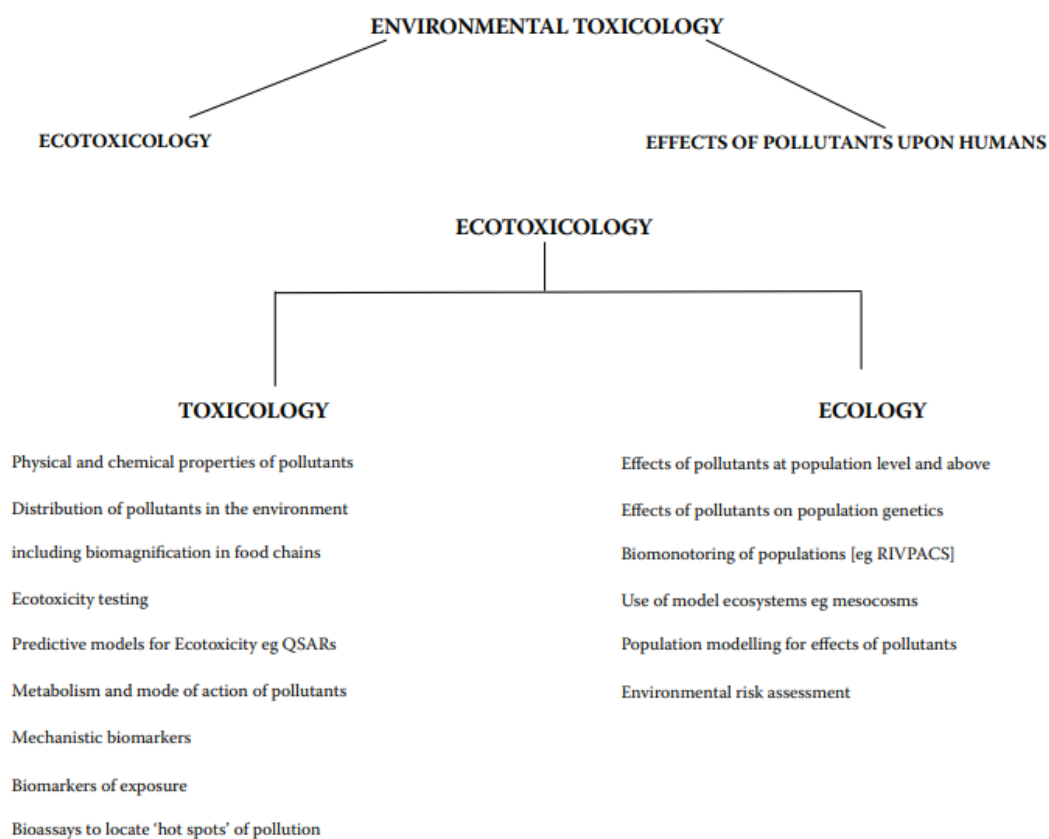


Figura 1.1 Relazione tra ecotossicologia e altre discipline. Fonte: (Newman, 2009)

Gli aspetti tossicologici importanti per l'ecotossicologia sono le proprietà chimiche e fisiche che determinano la mobilità delle sostanze chimiche, distribuzione e persistenza. Aspetti biochimici e fisiologici sono fondamentali per studiare gli effetti sugli organismi. Essi ci fanno comprendere il metabolismo e i meccanismi di tossicità degli inquinanti. Sviluppare test di ecotossicità è difficile in quanto spesso, per motivi etici e di costi, non è possibile testare direttamente sulle specie interessate. Si fa uso quindi di surrogati. I principali aspetti

ecologici sono invece gli effetti a livello di popolazione, comunità ed ecosistema, analisi delle popolazioni sul campo e costruzioni di modelli. Inoltre, sono importanti le conseguenze nella genetica di una popolazione. Ad esempio lo sviluppo di resistenze. Anche il biomonitoraggio degli inquinanti e la valutazione del rischio ambientale fanno parte degli aspetti ecologici importanti per l'ecotossicologia (Newman, 2009)

1.2.1 Valutazione del rischio ecotossicologico

Esistono due metodi di approccio nel valutare il rischio ecotossicologico. Uno è detto "prognosi", predittivo, l'altro "diagnosi". La prognosi mira a valutare il rischio ecotossicologico di una sostanza chimica attraverso test di laboratorio. Questi test tossicologici sono eseguiti su specie indicatrici per ottenere delle concentrazioni soglia di sicurezza sotto le quali la suddetta sostanza non costituisce un pericolo per l'ecosistema. Il parametro sul quale il rischio è basato è la tossicità. La tossicità viene valutata correlando la dose data alla risposta che si ottiene considerando determinati "endpoints", come la mortalità, tasso di crescita o di riproduzione. Si costruiscono delle curve dose-risposta. I parametri che quantificano la tossicità possono esprimere la dose necessaria ad uccidere il 10% o il 50% degli organismi esposti alla sostanza testata, come ad esempio LC_{10} e LC_{50} . Oppure, EC_{10} ed EC_{50} esprimono, rispettivamente, le concentrazioni necessarie a ridurre del 10% o del 50% un tipo di endpoint considerato. Ad esempio, il tasso di crescita o di riproduzione. Altri due parametri considerabili sono NOEC (no-observable effect concentration) e LOEC (lowest-observable effect concentration) (van Gestel, 2012).

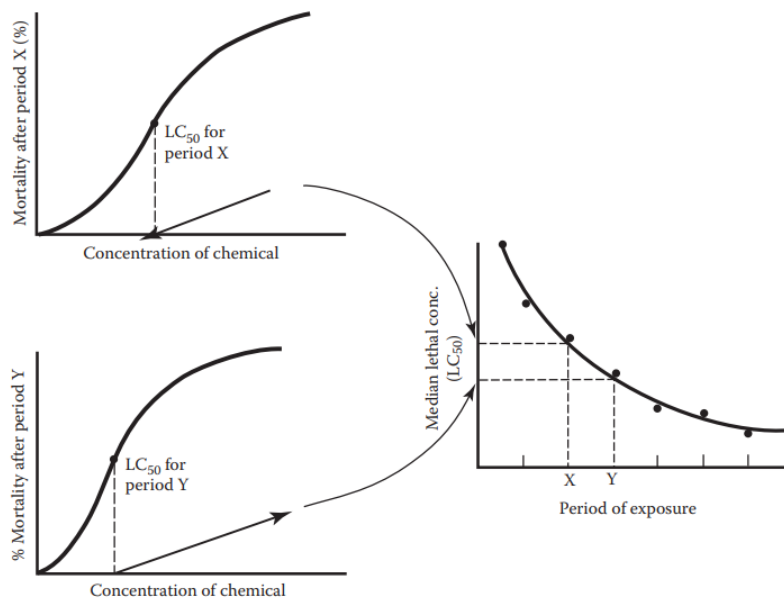


Figura 1.2 Determinazione di LC50. Fonte: (Newman, 2009)

Ottenere dei livelli di concentrazione definibili “sicuri” per le sostanze chimiche testate può risultare a volte difficile con la tecnica di prognosi. Quando sono disponibili dati tossicologici limitati si fa uso di fattori che ridimensionano la concentrazione ottenuta nei test di laboratorio. Questo per essere sicuri che l’ecosistema sia tutelato. Se sono accessibili solo uno o due valori di LC_{50} , un fattore di sicurezza 1000 è applicato all’ LC_{50} più basso. È considerato sufficiente un fattore di 10 sul valore più basso se sono disponibili dati riguardanti effetti sub-letali (NOEC o EC_{10}) testati su 3 o più specie. Quando invece sono disponibili molti dati di test tossicologici, preferibilmente più di 8, per specie rappresentanti diversi gruppi tassonomici si può procedere con un test statistico. Viene così ottenuta una distribuzione della sensibilità delle specie (SSD). Il limite inferiore al 95% rappresenta il livello al di sotto del quale almeno il 95% delle specie nell’ecosistema sono al sicuro. Il metodo di diagnosi può avvalersi degli stessi strumenti della prognosi, ma solitamente si fa uso dell’approccio TRIAD. L’approccio TRIAD è l’unione di saggi biologici, analisi chimiche e osservazioni ecologiche in campo per valutare il potenziale rischio di contaminazione del suolo.

Entrambi i metodi prognosi e diagnosi si avvalgono di test tossicologici, che sono formulati seguendo determinati criteri:

1. Praticabilità
2. Accettabilità
3. Significato ecologico
4. Rappresentatività per l’ecosistema da proteggere
5. Rappresentatività delle risposte
6. Uniformità

I test devono essere innanzitutto oggettivamente praticabili e avere un costo modesto. Fattori come standardizzazione, riproducibilità, validità statistica e reattività chimica rendono il test accettabile, cioè ammissibile. Sensibilità e realismo ecologico danno al test un valore traslabile al di fuori del laboratorio, nell’ecosistema. È importante poi che ci sia una certa rappresentatività dell’ecosistema introducendo, ad esempio, organismi con diversi background storici, vari gruppi tassonomici e differenti vie di contaminazione con la sostanza testata. Non di meno importanza sono la rappresentatività delle risposte, le quali devono avere una rilevanza per la protezione delle specie e dell’ecosistema presi in considerazione, e l’uniformità (van Gestel, 2012)

1.2.2 Bioaccumulo, biomagnificazione ed ecotossicologia dei PTEs

Lo studio dei PTEs risulta parte integrante della ricerca ambientale. Essi possono costituire un pericolo essendo tossici, persistenti e tendenti al bioaccumulo. Il bioaccumulo avviene quando una sostanza presente nell'ambiente penetra in un organismo dove viene stoccata sotto varie forme (Cortet, et al., 1999). La contaminazione delle acque risulta un esempio rappresentante un rischio per piante, animali e salute umana. Nel mondo l'inquinamento da PTEs è aumentato notevolmente negli ultimi anni, specialmente in Cina. È noto che questi elementi sono affini allo zolfo, presente negli enzimi, al quale si possono legare provocando malfunzionamenti e possibili interruzioni dell'attività biologica. Si ipotizza che il cadmio possa provocare danni ai reni. Concentrazioni elevate di piombo nel sangue hanno portato a livelli di emoglobina più bassi della media in bambini cinesi. L'esposizione a piombo e mercurio potrebbe portare allo sviluppo di malattie autoimmuni. Alcuni studi hanno riportato la correlazione tra possibile sviluppo di tumore e l'ingestione di arsenico inorganico. Inoltre, quando questi elementi sono presenti simultaneamente può presentarsi un effetto sinergico. I diversi gruppi tassonomici animali rispondono in maniera diversa alla presenza di PTEs. La più elevata o minore tossicità dipende dalla fisiologia dell'animale e dal comportamento, così come da caratteristiche del PTE come la distribuzione dell'elemento nelle sue diverse forme chimiche e la biodisponibilità (Ali, Khan, & Ilahi, 2019).

Nei pesci, i PTEs sono causa di cambiamenti biochimici, ematologici e istologici. Sono potenti neurotossine nei loro confronti. Studi effettuati sulla specie *Channa punctatus* hanno individuato stress indotto dalla presenza di PTEs con conseguente maggiore vulnerabilità alle malattie.

Negli uccelli, elevate concentrazioni di cadmio possono causare deficienze di calcio. Inoltre, il mercurio può influenzare la loro riproduzione.

Anfibi e rettili potrebbero essere messi a rischio dai PTEs. Studi effettuati confermano che la presenza di questi elementi nell'ambiente potrebbe essere un fattore determinante il declino della loro popolazione.

Il trasferimento trofico dei PTEs rappresenta un campo di studio fondamentale nella ricerca ambientale. Questi elementi passano dall'ambiente abiotico agli organismi viventi, accumulandosi e determinando una contaminazione delle catene alimentari. Per trasferimento trofico si intende il passaggio di un contaminante da un livello trofico ad un altro nelle catene alimentari. La bioconcentrazione si riferisce all'accumulo in un organismo derivato dall'ambiente abiotico. La bioaccumulazione è intesa come l'accumulazione da fonti sia abiotiche che biotiche. Biomagnificazione e biodiluizione si riferiscono

rispettivamente o ad un aumento di concentrazione di un contaminante su successivi livelli trofici all'interno di una catena alimentare o ad una diminuzione (Ali, Khan, & Ilahi, 2019). Quando si parla di queste dinamiche è importante introdurre una delle principali vie di entrata dei PTEs nelle catene alimentari, nonché primaria fonte di esposizione a questi contaminanti da parte dell'uomo: il trasferimento suolo-pianta dei PTEs. L'uso di acque reflue fognarie per irrigare terreni agricoli può portare ad un aumento di concentrazione di elementi potenzialmente tossici nel suolo. Oltre a ciò, l'uso prolungato per anni ha fatto riscontrare una diminuzione di pH e maggiore presenza di carbonio organico disciolto, che incrementano la fitodisponibilità dei PTEs. In effetti, l'assunzione giornaliera di PTEs è risultata più elevata per il consumo di vegetali coltivati su suoli irrigati con acque reflue rispetto a terreni di controllo. Questi elementi possono passare dall'ambiente alle piante anche per via fogliare, oltre che radicale, attraverso la cuticola e le aperture stomatiche (Ali, Khan, & Ilahi, 2019).

La ricerca riguardante il bioaccumulo di PTEs fa spesso affidamento agli invertebrati della famiglia Lumbricidae. La maggior parte dei dati si hanno per elementi come cadmio, rame, piombo e zinco (Heikens, Peijnenburg, & Hendriks, 2001). È noto e studiato il bioaccumulo nei pesci. Esso è importante per monitorare l'inquinamento delle acque e per valutare il rischio derivante dal consumo di pesce contaminato. Solitamente i pesci carnivori contengono una concentrazione più elevata di PTEs poiché sono all'apice delle catene trofiche. Le vie di ingresso possono essere le branchie, la pelle oppure attraverso la bocca. La frazione particolata di un PTE trova accesso attraverso il tratto alimentare, mentre quella solubile può accedere nel corpo del pesce anche per mezzo della pelle e branchie (Ali, Khan, & Ilahi, 2019).

La letteratura scientifica non è molto sviluppata per quanto riguarda il bioaccumulo in anfibi e rettili.

L'esposizione degli uccelli ai PTEs avviene tramite l'ingestione di cibo, acqua e particelle di suolo. La concentrazione è maggiore nei volatili carnivori, seguiti dagli onnivori e insettivori per trovare infine una quantità ancora minore nei granivori.

La biomagnificazione è calcolata attraverso dei fattori quantitativi. I due più importanti sono il BMF e il TMF. Il BMF (biomagnification factor), è il rapporto tra la concentrazione di un PTE in un organismo e quella trovata nella sua dieta.

$$BMF = \frac{\text{Concentrazione PTE nell'organismo}}{\text{Concentrazione PTE nella dieta dell'organismo}}$$

Il TMF (trophic magnification factor) è il coefficiente angolare della concentrazione del PTE trasformata logaritmicamente confrontata con i livelli trofici degli organismi nella trofica (Ali, Khan, & Ilahi, 2019).

1.2.3 *Invertebrati come bioindicatori*

Gli invertebrati sono a diretto contatto con le sostanze contaminanti il suolo. Inoltre, numerosi mammiferi e uccelli si cibano di essi. Per questi motivi, alcuni invertebrati vengono utilizzati come bioindicatori della salute del suolo. Un bioindicatore deve svolgere un ruolo importante nell'ecosistema del suolo, deve essere ben distribuito, comune e di facile reperimento. Altre caratteristiche imprescindibili sono la resistenza agli agenti inquinanti ed effetti misurabili e riproducibili. Gli studi possono essere condotti sulla microfauna, mesofauna e macrofauna che comprende gli organismi più grandi di 4 mm.

L'impiego di bioindicatori tossicologici permette di studiare la stretta relazione tra un contaminante e la reazione osservata in un organismo. Le informazioni ottenute possono rappresentare dei campanelli di allarme di contaminazione ambientale, ma hanno poco valore ecologico. L'utilizzo di bioindicatori ecologici, invece, rileva cambiamenti ma non da' informazioni sulle cause. Essi concernono variazioni a livello di popolazioni o comunità. Le specie bioindicatrici più studiate, tra gli invertebrati del suolo, sono: nematodi, enchitreidi, oligocheti, gasteropodi, collemboli, isopodi e aracnidi.

I nematodi sono gli invertebrati più comuni. Sono stati condotti test sulla specie *Caenorhabditis elegans*, tuttavia le condizioni di esposizione ai PTEs non sono abbastanza omogenee per fare delle comparazioni. Lumache e chioccioline appartenenti all'ordine degli *Stylommatophora* sono state usate per studiare gli effetti tossici dei PTEs. Questi organismi sono capaci di sopravvivere ad alte concentrazioni di contaminanti nel loro cibo. Nonostante ciò, la crescita e la riproduzione sono inibite in modi diversi nelle differenti specie. Il collembolo *F.candida* è il microartropodo più utilizzato per test ecotossicologici, sia letali che subletali. La maggior parte delle pubblicazioni su questa specie denotano grandi differenze nei risultati in dipendenza del ceppo utilizzato, età e contenuto di umidità del suolo. Le specie di isopodi più studiate sono invece *Porcellio scaber*, *Oniscus asellus*, *Trichoniscus pusillus* e *P. laevis*. Queste possono accumulare elevate quantità di PTEs e gli effetti letali si presentano solo quando la loro capacità cumulativa si satura. Infatti, sono poco sensibili se testati per effetti subletali. Tra gli aracnidi utilizzati come bioindicatori, *Platynothrus peltifer* ha dato risultati incoraggianti, anche se i metodi di studio risultano lunghi e difficili.

Il gruppo degli oligocheti è stato, ed è tutt'ora, soggetto di numerosi test letali e subletali. La specie *Eisenia fetida* (*E.fetida*) è generalmente impiegata testando gli effetti letali dei PTEs. Essa risulta geneticamente uniforme. Invece, le specie *Lumbricus terrestris* (*L.terrestris*) e *Allolobophora caliginosa* (*A.caliginosa*), anche se più sensibili, sono meno studiate per la difficoltà ad allevarle. Test condotti sulla fase giovanile degli oligocheti sono complicati da condurre poiché includono diversi parametri come la durata, il destino del PTE e la sua interazione con il substrato. Test subletali sono invece condotti sulla produzione dei bozzoli (Cortet, et al., 1999).

I lombrichi sono entità biologiche fondamentali per quanto riguarda la pedogenesi e il mantenimento della fertilità del suolo. Grazie alle loro dimensioni, considerabili elevate rispetto agli altri invertebrati del terreno, incidono molto sulla biomassa nonostante siano quantitativamente non rilevanti. Aristotele fu uno dei primi a riconoscerne l'importanza, definendoli "l'intestino della terra". Darwin, con la sua opera intitolata *The Formation of Vegetable Mould through the Action of Worms* pubblicata nel 1881, fu il primo a richiamare l'attenzione sull'importanza dei lombrichi. Egli descrisse la loro capacità di interagire con i residui organici di piante e animali morti e di modellare la struttura del suolo. Prima della sua pubblicazione i lombrichi erano considerati parassiti del suolo. I lombrichi appartengono all'ordine degli *Oligochaeta*, al quale fanno parte più di 8000 specie derivanti da circa 800 generi. Sono organismi ubiquitari presenti nelle praterie, foreste naturali e agroecosistemi di tutto il mondo. Tuttavia, condizioni climatiche estreme, ritrovabili nei deserti e in aree costantemente coperte da neve e ghiaccio non permettono la loro sussistenza. Le loro dimensioni possono andare da pochi millimetri fino a 2 metri di lunghezza. Possono pesare un minimo di circa 10 mg fino ad 1 kilogrammo e raggiungere uno spessore di 40 mm. Nessun altro invertebrato terrestre possiede un range di dimensioni così elevato. Le popolazioni di lombrichi rinvenibili nel suolo variano molto nella dimensione, che dipende da numerosi fattori come: il tipo di suolo, pH, capacità del suolo di trattenere l'umidità, precipitazioni, temperatura dell'ambiente e disponibilità di sostanza organica. In un metro quadrato di terreno è possibile ritrovare da pochi individui fino a più di 1000. Solitamente, in suoli coltivati, le popolazioni non superano i 100 individui. Nelle praterie si aggirano sui 400, così come nelle foreste, dove la presenza di sostanza organica è raramente limitante. I suoli acidi, come quelli delle foreste di conifere, ospitano una quantità più esigua di lombrichi. Il gran numero di specie di lombrichi esistenti porta ad una grande variabilità di coesistenza tra di esse, alcune delle quali risultano associate in dipendenza del tipo di suolo e dell'habitat. Nelle aree temperate prevale la famiglia dei *Lumbricidae* e risulta esserci una variabilità più

limitata rispetto ad aree tropicali, dove sono presenti altre famiglie. L'attività dei lombrichi è fortemente influenzata dalle stagioni. Durante l'inverno scavano nel suolo fino a raggiungere una profondità tale da trovare temperature compatibili con la loro sopravvivenza. Stessa cosa succede nei periodi estivi siccitosi, dove estivano in posizione arrotolata fino al ritorno di condizioni favorevoli. Il picco di attività risulta essere in primavera e in autunno. La produzione di bozzoli è anch'essa influenzata dalle stagioni. La maggior parte viene prodotta in primavera e all'inizio dell'estate, una quantità minore in autunno. Il numero di bozzoli derivante da ogni accoppiamento va da 1 a 20, in funzione della specie, e può avvenire anche per partenogenesi. Esso è correlato in maniera positiva all'aumento di temperatura, fino ad una certa soglia, così vale anche per la crescita dei lombrichi. Invece, il periodo di incubazione dei bozzoli, la percentuale di schiuse e il numero di piccoli nati per bozzolo sono parametri che non giovano di un aumento di temperatura. I lombrichi potrebbero potenzialmente vivere fino a 10-12 anni ma a causa della presenza di predatori, solitamente, non superano le due stagioni in ambienti naturali. Essi influenzano le proprietà fisiche del suolo ingerendolo ed espellendolo per costruire tane o semplicemente per nutrirsi. Ogni specie possiede differenti strategie ecologiche, che inducono diversi effetti sull'aggregazione e sulla porosità del suolo. È buona cosa quindi classificarli attraverso 3 gruppi ecologici: gli epigei, gli anecici e gli endogei. Gli epigei si ritrovano solitamente in superficie, dove si nutrono di sostanza organica. Raramente scavano e si nutrono di particelle di suolo. Gli habitat tipici sono le lettiere di foreste o cumuli di letame. Essi hanno poca influenza nel determinare la struttura della componente minerale del suolo. Gli anecici vivono all'interno di tunnel permanenti o semipermanenti. Si nutrono principalmente di sostanza organica in decomposizione presente sulla superficie del suolo. Essi formano una sorta di fanghiglia mescolando i loro escrementi con la sostanza organica (*cast*), facilitando la decomposizione di quest'ultima. Questa fanghiglia funge anche da copertura delle gallerie scavate. Gli endogei scavano in profondità nel suolo ottenendo nutrimento sia da particelle di suolo che di sostanza organica. Formano una rete di tunnel collegati, ramificati, e la loro attività è localizzata a circa 10-15 centimetri di profondità, dove la concentrazione di materia organica è più elevata. Anche gli endogei producono una fanghiglia, depositata all'interno delle gallerie o in superficie.

I lombrichi, essendo comuni in molti suoli, risultano vulnerabili agli impatti fisici e chimici che il suolo subisce. Anche se non sono gli unici invertebrati importanti ad abitare il terreno, vengono comunque selezionati per la valutazione del rischio ambientale. Questo perché sono piuttosto diffusi, costituiscono una fonte di cibo per diversi animali e sono facilmente

allevabili e utilizzabili per test ecotossicologici, sia in laboratorio che in campo. L'uso dei lombrichi per effettuare valutazioni ecotossicologiche ha subito notevoli progressi dal primo "International Workshop on Earthworm Ecotoxicology", che si è tenuto a Sheffield nel 1991. Nel tempo sono stati sviluppati nuovi approcci, che hanno perfezionato e semplificato le procedure che risultavano obsolete. Il risultato è stato un aumento di rilevanza dei dati ottenuti. Nonostante ciò, rimangono problemi relativi all'impiego di approcci ritenuti accettabili e quindi attendibili.

Per quanto detto fin'ora è chiaro che i lombrichi rappresentano una ricchezza per l'ecosistema suolo, considerato che grazie alla loro attività sono in grado di migliorare la tessitura, favorire la decomposizione della materia organica, promuovere il ciclo del carbonio e dell'azoto e mantenere la permeabilità del suolo e l'acqua. D'altro canto, le caratteristiche fisiologiche e biochimiche dei lombrichi possono riflettere la qualità del suolo. Esso è anche un indicatore dell'inquinamento da metalli pesanti grazie al suo comportamento di evitamento (Xu, Yang, Shu, & Zhu, 2021). I lombrichi sono frequentemente esposti ai contaminanti chimici del suolo (metalli pesanti, pesticidi, idrocarburi policiclici aromatici, ecc.) e accumulano nel loro organismo quantità significative di inquinanti inorganici e organici. Tuttavia, il bioaccumulo di un contaminante non sempre significa ambiente danneggiato o possibilità di danno. Al contrario, è necessaria un'adeguata manifestazione di risposte biologiche letali/subletali nei confronti dell'esposizione al contaminante (Maity, et al., 2017). Alcuni elementi chimici sono essenziali per i lombrichi, in particolare lo Zn è in grado di potenziare la crescita e la riproduzione; una quantità limitata di Zn può stimolare i processi metabolici dei lombrichi. Anche il Cu è un elemento essenziale per gli organismi viventi del suolo, ma al di sopra del livello consentito può generare diversi effetti deleteri (Yuvaraj, et al., 2021). Un eccesso di metalli nel suolo ha un effetto negativo sui processi metabolici che avvengono nei lombrichi. L'eccesso di rame nel suolo porta a gravi problemi ambientali e può causare diversi cambiamenti fisiologici e biochimici negli organismi viventi (Clasen, et al., 2021; De Bernardi, et al., 2022). Inoltre, poiché la biodisponibilità dei PTEs può essere influenzata dalle caratteristiche del suolo, nei lombrichi può riflettere la reale condizione di esposizione. I metodi chimici basati sull'analisi delle concentrazioni di metalli nel suolo non sono in grado di fornire valide informazioni sugli effetti deleteri dei contaminanti sul biota perché l'analisi chimica trascura la biodisponibilità dei metalli, che potrebbe essere influenzata dalle caratteristiche del suolo come il pH, il contenuto di materia organica e la capacità di scambio cationico (CEC). È importante quindi determinare i pattern di bioaccumulo e la

bioconcentrazione dei metalli nei lombrichi, per poter poi studiare le relazioni che intercorrono con le risposte dei biomarcatori (Cao, Bi, & Song, 2017).

I principali test ecotossicologici svolti sui lombrichi sono quello di tossicità acuta e cronica. Gli studi sulla tossicità acuta sono svolti per valutare il danno biologico totale ottenuto da una singola somministrazione, solitamente cospicua, di una sostanza chimica in un tempo finito. Otteniamo quindi la potenzialità tossica di un elemento espressa dal parametro LD50, cioè la dose che uccide il 50% degli individui della specie esposta al tossicante. Quando si parla di somministrazione indiretta la potenza della sostanza tossica viene descritta dall'LC50, che descrive una concentrazione piuttosto che una dose. L'LC50 risulta più utilizzato negli studi ecotossicologici utilizzando i lombrichi. I test sulla tossicità acuta sono eseguiti seguendo protocolli ben stabiliti e ottenendo valori di screening preliminari, così da fornire dati attendibili sulla tossicità relativa delle sostanze testate. Vari ricercatori hanno dimostrato la limitatezza di questi test, i quali risultati sono difficili da estrapolare dal laboratorio all'ambiente naturale vero e proprio. Probabilmente ciò sarà possibile in futuro. Tuttavia, le informazioni a nostra disposizione sono ancora scarse. I lombrichi nel suolo sono esposti per lungo periodo a dosi più basse di quelle letali di una sostanza. Per simulare ciò, sono stati sviluppati test sul breve e sul lungo periodo, rispettivamente subcronici e cronici. I primi sono condotti in un tempo di 14 giorni o più, i secondi richiedono 1 o 2 anni. La standardizzazione dei test cronici non è stata pienamente raggiunta a causa della grande variabilità delle procedure utilizzate. Inoltre, il significato ecologico dei risultati è ancora dubbio e la riproducibilità è limitata. Gli endpoints utilizzati per i test cronici sono:

- Crescita delle forme giovanili
- Variazioni di peso negli adulti
- Riproduzione: tasso di produzione dei bozzoli, numero di piccoli nati, percentuale di schiusa, periodo di incubazione, parametri relativi lo sperma.
- Comportamento
- Effetti morfologici
- Effetti fisiologici

È stato dimostrato da alcuni ricercatori che la crescita delle forme giovanili e la produzione di bozzoli rispondono in maniera particolarmente sensibile alla presenza di fungicidi contenenti rame, anche a concentrazione molto bassa. Il workshop sull'ecotossicologia tenutosi in Danimarca nel 2001 ha suggerito lo studio più approfondito del comportamento dei lombrichi in relazione all'esposizione a sostanze tossiche. Studi in campo hanno mostrato un possibile comportamento migratorio dei lombrichi in risposta a cambiamenti

ambientali. Altri studi hanno dimostrato l'esistenza di un comportamento di evitamento quando questi invertebrati sono esposti a suoli con elevato livello di contaminazione (Edwards, 2004).

1.2.4 Enzimatica nei lombrichi come metodo di analisi della contaminazione da PTEs

I marcatori biochimici utilizzati negli studi di ecotossicologia svolgono un ruolo essenziale nel monitoraggio della qualità del suolo. Lo studio dei cambiamenti fisiologici degli organismi viventi consente di prevedere i probabili cambiamenti negli ecosistemi (Clasen, et al., 2021).

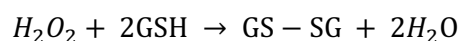
L'effetto di pesticidi e PTEs sull'attività enzimatica dei lombrichi può risultare un importante biondicatore dell'inquinamento di un suolo (Yatoo, et al., 2022). Le attività enzimatiche sono considerate degli indici veloci e prognostici di reazioni individuali in conseguenza ad uno stress ambientale, e possono aiutare a prevedere gli effetti a livello di popolazioni ed ecosistemi. Le relazioni che intercorrono tra la contaminazione da parte di PTEs negli organismi viventi e i processi riguardanti i radicali liberi, i loro scavengers e il metabolismo del glutatione sono considerati fondamentali (Laszczyca, et al., 2004). Gli scavengers dei radicali liberi impediscono la formazione di specie reattive dell'ossigeno o le eliminano prima che possano danneggiare i componenti vitali della cellula. Sono noti come antiossidanti preventivi e di rottura della catena. (Hatwalne, 2012)

L'esposizione di organismi viventi ai PTE può produrre alterazioni fisiologiche deleterie, tra cui: minore produzione di humus da parte dei lombrichi, perdita di energia, compromissione del metabolismo e comportamenti anomali. La natura ionica di questi elementi facilita la loro penetrazione all'interno delle membrane cellulari, danneggiandole, e portando alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) come l'idroperossido e radicale ossidrilico. La conseguenza è uno sbilanciamento tra pro-ossidanti e ossidanti, conosciuto come stress ossidativo.

Misurando le risposte biochimiche e cellulari degli organismi agli inquinanti, i biomarcatori sono stati largamente utilizzati per studiare la tossicità dei contaminanti a livelli inferiori nell'ambiente negli ultimi due decenni. I marcatori biochimici utilizzati negli studi di ecotossicologia svolgono un ruolo essenziale nel monitoraggio della qualità del suolo (Clasen, et al., 2021). Le attività enzimatiche sono considerate indici rapidi e prognostici di reazioni individuali allo stress ambientale, e consentono di prevedere le conseguenze dell'inquinamento a livello di popolazione e di ecosistema (Laszczyca, et al., 2004). L'analisi delle alterazioni dell'espressione genica in risposta a esposizioni chimiche è una tecnica consolidata che consente di quantificare gli effetti sub-letali dell'inquinante (Mincarelli,

Tiano, Craft, Marcheggiani, & Vischetti, 2019). Lo stress ossidativo è uno dei parametri utilizzati come biomarcatori, basati sulla valutazione dell'attività degli enzimi antiossidanti (Clasen, et al., 2021). Per i lombrichi, alcuni biomarcatori di risposta non specifici a livello cellulare possono essere il glicogeno e il contenuto di proteine tissutali (Pr), che rappresentano un'alterazione del metabolismo; le attività della catalasi (CAT), della superossido dismutasi (SOD) e della glutatione perossidasi (GPX) possono costituire parametri antiossidanti rappresentativi; specie reattive dell'ossigeno (ROS) riflettono i livelli di danno ossidativo; la concentrazione di metallotioneina (MT), acetilcolina esterasi (AChE) e glutatione S-transferasi (GST) sono noti come marcatori indicativi sensibili. I citocromi P450 sono enzimi distribuiti in modo ubiquitario, localizzati nel reticolo endoplasmatico, scoperti circa 50 anni fa, che presentano un'elevata complessità e un ampio campo di attività. Si tratta di emoproteine codificate da una superfamiglia di geni che convertono un'ampia varietà di substrati e catalizzano una serie di interessanti reazioni chimiche (Bernhardt, 2006). Il citocromo P450 (CYP), coinvolto nel processo di detossificazione, catalizza la conversione ossidativa degli xenobiotici lipofili in entità più solubili in acqua, e che quindi possono essere prontamente escreti e detossificati (Xu, Yang, Shu, & Zhu, 2021). Le perossidasi (POD, EC 1.11.1.7) appartengono ad una grande famiglia di enzimi in grado di ossidare numerosi substrati diversi in presenza di H₂O₂ (Fang & Kao, 2000). La glutatione reduttasi, nota anche come GSR o GR (EC 1.8.1.7), appartiene alla famiglia delle ossidoreduttasi NADPH-dipendenti. La GR svolge un ruolo centrale essenziale nella difesa delle cellule contro i metaboliti reattivi dell'ossigeno (Gill, et al., 2013).

La catalasi (CAT) svolge un ruolo cruciale nella risposta adattativa all'H₂O₂. È stato suggerito che il suo ruolo sia in qualche modo ausiliario a quello del GPX. Questi enzimi risiedono nel secondo livello di difesa contro le specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Tehrani & Moosavi-Movahedi, 2018). Le SOD, ubiquitarie, catalizzano la disproporzionazione del superossido all'ossigeno molecolare e al perossido. Sono quindi fondamentali per proteggere la cellula dai prodotti tossici della respirazione (Perry, Shin, Getzoff, & Tainer, 2010). GPX sono una famiglia di isoenzimi multipli che catalizzano la riduzione di H₂O₂ o di idroperossidi organici ad acqua o agli alcoli corrispondenti, utilizzando il glutatione ridotto (GSH) come donatore di elettroni (Margis, Dunand, Teixeira, & Margis-Pinheiro, 2008).



Le GST sono una famiglia di enzimi dimerici che catalizzano la coniugazione di glutatione a una varietà di elettrofili. La loro importanza è suggerita dalla scoperta che gli enzimi GST

sono espressi probabilmente in tutte le forme di vita (Strange, Jones, & Fryer, 2000). I radicali liberi generano il processo di perossidazione lipidica in un organismo. La MDA è uno dei prodotti finali della perossidazione degli acidi grassi polinsaturi nelle cellule. Un aumento dei radicali liberi causa una sovrapproduzione di MDA. Il livello di malondialdeide è comunemente noto come marcatore di stress ossidativo (Gawel, Wardas, Nieworok, & Wardas, 2004). Le MT sono proteine intracellulari a basso peso molecolare e ricche di cisteina, ubiquitarie negli eucarioti, e hanno caratteristiche strutturali uniche che conferiscono forti capacità di legame con i metalli e di ossidoriduzione. Le MT degli invertebrati terrestri aiutano a comprendere le proteine e la loro evoluzione nel regno animale, attraggono ioni di metalli pesanti e accumulano un'ampia varietà di ioni metallici. I metalli non essenziali accumulati vengono così detossificati in modo efficiente (Coyle, Philcox, Carey, & Rofe, 2001). L'AChE termina la neurotrasmissione nelle sinapsi colinergiche scindendo il neurotrasmettitore acetilcolina. La natura e la distribuzione dell'enzima sono state ampiamente studiate in molti invertebrati e vertebrati, compreso l'uomo, dal punto di vista istochimico e biochimico.

Capitolo 2 ANALISI BIBLIOGRAFICA DEGLI STUDI ECOTOSSICOLOGICI-ENZIMATICI SU EFFETTI DI PTEs NEI LOMBRICHI

2.1 Casi studio e rielaborazioni

I dieci articoli presi in esame sono brevemente sintetizzati nella tabella che segue (Tabella 5).

Tabella 5 Sunto dei parametri principali degli articoli esaminati

Fonte	PTEs	Enzimi	Specie
Clasen, B. et al., 2021	Cu	AChE, GST	<i>Eisenia andrei</i>
Dedeke, A.G., 2017	Cd, Cr, Cu, Pb, Zn	GST, SOD	<i>Alma millsoni</i> , <i>Libyodrilus violaceus</i>
Laszczyca, P. et al., 2004	Cd, Cu, Pb, Zn	AChE, CAT, GPX, GR, GST, SOD	<i>Aporrectodea caliginosa</i> , <i>Eisenia fetida</i> , <i>Lumbricus terrestris</i>
Maity, S. et al., 2017	As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn	GPX, GR, GST, MT	<i>Aporrectodea caliginosa</i>
Maity, S. et al., 2018	Cd	CAT, GPX, GR, GST, SOD	<i>Eisenia fetida</i> , <i>Eutyphoeus waltoni</i>
Mincarelli, L. et al., 2019	Cu	CAT, MT, SOD	<i>Eisenia andrei</i>
Sharma, S. et al., 2020	Cu, Sn	CAT, GPX, SOD	<i>Eisenia fetida</i>
Xu, Z. et al., 2021	Cd, Sb	CAT, GPX, GST, MT, SOD	<i>Eisenia fetida</i>
Yang, X. et al., 2012	Cd	CAT, GST, SOD	<i>Eisenia fetida</i>
Zhou, C.-F. et al., 2013	Cu	CAT, SOD	<i>Eisenia fetida</i>

Nel presente lavoro di tesi si è deciso di affrontare nella discussione le attività enzimatiche e gli elementi che comparivano in almeno due articoli tra quelli presi in esame, sulla base di tale accorgimento è stata creato un grafico radar che permette di osservare la frequenza maggiore delle attività enzimatiche studiate a seconda del PTEs studiato (Figura 1.3)

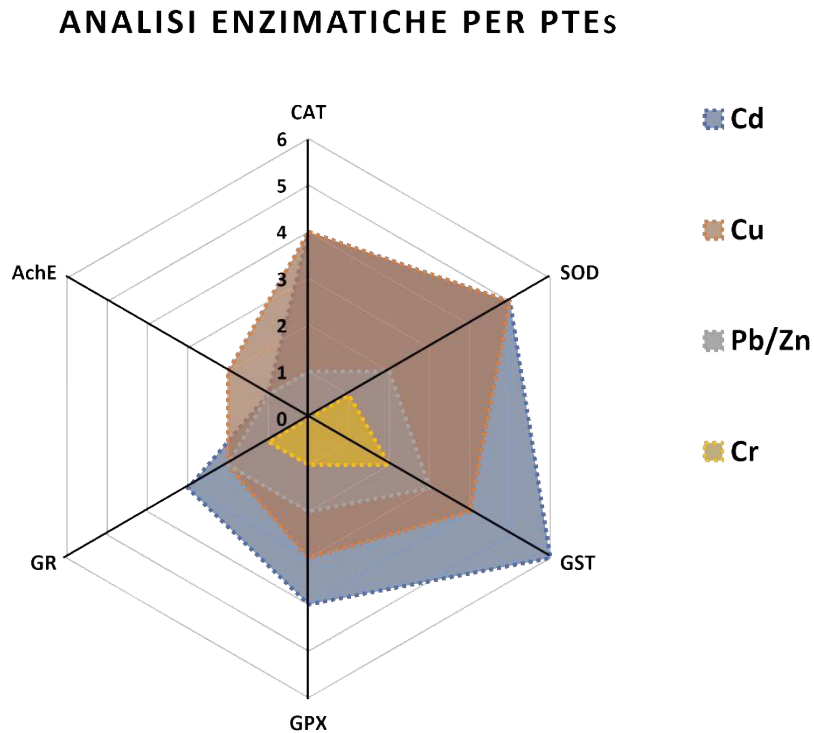


Figura 1.3 Distribuzione delle analisi enzimatiche condotte a seconda del PTEs studiato tra gli articoli presi in esame

Dalla figura 1.3, descrivente la distribuzione delle analisi enzimatiche a seconda del PTE studiato tra gli articoli presi in esame, è evidente che SOD, CAT, GST e GPX sono comparse più frequentemente. Come riportato in tabella 5, la SOD è stata studiata in otto articoli sui dieci totali, ed è stata impiegata principalmente per l'indagine degli effetti avversi a seguito di esposizione a Cd e Cu (cinque articoli). Lo stesso enzima è stato misurato anche per la detection di effetti avversi in caso di substrati contaminati da Pb e Zn (due papers) e Cr (un solo lavoro). La CAT, anch'essa molto frequente, è apparsa in ben sette studi su dieci, di questi molti (quattro) si sono concentrati, anche per questa attività enzimatica, verso l'inquinamento del suolo da Cd e Cu. Un solo articolo l'ha studiata in rapporto a Pb e Zn, mentre non è stato trovato alcun dato riguardante l'influenza del Cr sulla sua attività. La GST è stata presa in considerazione in sette studi, in sei sperimentazioni è stata rapportata a contaminazione da Cd,

quattro a Cu, tre a Pb e Zn e solo due a Cr. La GPX è l'ultimo degli enzimi facente parte dei quattro più significativamente impiegati nella bibliografia esaminata in questo lavoro. È apparsa in cinque studi su dieci. La sua attività, correlata alla contaminazione da Cd, Cu e Pb/Zn, Cr è stata studiata rispettivamente in quattro, tre, due e un articolo.

Eisenia fetida è risultata la specie di lombrico più utilizzata per il monitoraggio di queste attività enzimatiche.

Gli ultimi due enzimi, i meno studiati, sono GR e AChE. La GR è comparsa in tre articoli tutti incentrati sugli effetti della presenza di Cd o da solo o con altri PTEs (Cu, Pb, Zn e Cr). L'enzima meno studiato tra i sette elencati è l'AChE, questo viene misurato in due lavori soltanto. La sua attività è stata analizzata in conseguenza di esposizione a Cu in entrambi gli articoli, mentre solo uno l'ha osservata con altri PTEs (Cd, Pb e Zn). Le specie di lombrico monitorate per l'attività dell'AChE sono state: *A.caliginosa*, *E.andrei*, *E.fetida* e *L.terrestris*. Degno di nota è un altro parametro adottato come risposta ai PTEs (principalmente Cd e Cu) nei lombrichi ovvero la misurazione delle metallotioneine, che sono state valutate in diversi studi e su numerose specie *A.caliginosa*, *E.andrei* e *E.fetida*.

Di seguito vengono analizzate e confrontate le risposte enzimatiche misurate negli articoli oggetto di studio della presente tesi.

2.1.1 Superossido dismutasi (SOD)

Per quanto riguarda l'enzima SOD, Yang et al. (2012) hanno riportato un generale aumento (130%, 33.5 %, 82.5 % e 156%) a seguito di esposizione al cadmio a diverse concentrazioni (1.25, 2.50, 5.00 e 10 mg $Cd^{2+}Kg^{-1}$). L'incremento è stato più condizionato dal tempo che dalla dose. L'esperimento è durato 8 settimane e l'aumento significativo della SOD si è registrato dalla sesta settimana nei lombrichi esposti al Cd rispetto al controllo.

Anche nello studio condotto da Dedeke et al. (2018) sui lombrichi limicoli *Alma millsoni* e *Libyodrilus violaceus* è stato osservato che l'attività della superossido dismutasi è un biomarcatore sensibile il cui elevato sviluppo quale risposta alla contaminazione da Cd, Pb, Cr, Cu e Zn, lo identifica come maggiore antiossidante protettivo rispetto ad altre attività enzimatiche analizzate quali GST e perossidasi.

Un interessante andamento di questa attività enzimatica è stata osservata da Laszczyca et al. (2004) nella specie terrestre *A.caliginosa* in suoli contaminati da Zn, Pb, Cd e Cu alle dosi rispettive di 10.500, 2600, 82 e 47 mg/kg. Gli autori hanno riscontrato una risposta di tipo ormetico bifasico utile come indicatore biochimico in quanto il punto di cambiamento ormetico viene identificato quale soglia tra il pericolo al danno irreversibile e un range in cui

invece intervengono meccanismi compensatori che potrebbero controbilanciare gli effetti dell'inquinamento.

Anche Xu et al. (2021) hanno registrato un aumento significativo della SOD nella specie *E.fetida* in una prova di 7 giorni con esposizione a Cd e Sb, sia singolarmente che combinati. Nello studio è stata individuata una soglia di Cd (40 mg/kg) oltre la quale l'attività della superossidasi ha subito un'inibizione considerevole, considerando che questo livello di contaminazione rappresenta un decimo della concentrazione indicata come LC50 per questa specie, si conferma l'idoneità della misurazione della SOD come biomarcatore precoce degli effetti tossici del Cd.

Sempre su *E.fetida* un altro studio molto più duraturo (90 giorni) è stato condotto da Sharma et al. (2020) esponendo i lombrichi a diverse concentrazioni di rame e stagno (Sn) singolarmente o combinati fra loro. Anche in questo lavoro, sono stati registrati incrementi dell'attività della SOD generalmente dose-dipendenti, nello specifico gli aumenti di attività enzimatica più rilevanti sono stati il 31.92% e il 23.78% rispettivamente per esposizioni a Cu e Sn combinati e solo Cu.

Maity et al. (2018) hanno condotto un esperimento sulle specie *E.fetida* ed *Eutyphoeus waltoni* (*E.waltoni*) esposte per 28 giorni a suoli contaminati da Cd, analizzando diversi marcatori biochimici. Le dosi di Cd sono state 30, 60 e 120 mg kg⁻¹. Nella prima specie, la SOD ha subito un incremento direttamente proporzionale alle dosi fino al giorno quattordici. Il giorno ventuno ha registrato un drastico calo. Qui, l'attività della SOD è risultata inversamente proporzionale alle concentrazioni di Cd. Al giorno ventotto, si è potuto osservare un ritorno ai livelli del controllo. Nella specie *E.waltoni*, la SOD si è comportata diversamente. E' rimasta inalterata al giorno due per tutte le dosi. Poi, è stata caratterizzata da un'induzione statisticamente significativa, dose-dipendente, fino al giorno ventuno. Alla fine dell'esperimento, c'è stato un cambio di risposta. L'attività della SOD ha risposto in maniera positiva a basse dosi (30 e 60 mg kg⁻¹) e negativa alla dose più alta (120 mg kg⁻¹).

Zhou, et al. (2013), hanno studiato la risposta enzimatica di *E.fetida* a seguito di esposizione a diversi dosaggi di Cu (25, 50, 100 e 200 mg kg⁻¹). L'esperimento è durato ventotto giorni. L'attività dell'enzima SOD, a fine prova, è risultata essere diminuita per tutte le concentrazioni di Cu tranne la più bassa (25 mg kg⁻¹). Il decremento è risultato drastico per la concentrazione più alta di Cd (200 mg kg⁻¹). La SOD, sotto normali condizioni fisiologiche, mantiene un equilibrio dinamico utile ad eliminare i superossidi. La ragione del

calo finale di attività potrebbe essere legata alla saturazione del naturale sistema antiossidante a causa delle troppe specie reattive dell'ossigeno prodotte.

Uno studio differente preso in esame è quello di Mincarelli et al 2019 in cui l'attività enzimatica è stata misurata attraverso l'espressione genica, in questo caso la superossido dismutasi non ha subito alcun incremento quando i lombrichi *Eisenia andrei* (*E.andrei*) sono stati esposti a diverse concentrazioni di Cu (30, 60 e 120 mg Cu kg⁻¹) durante 9 giorni di sperimentazione, suggerendo una risposta adattativa per questo elemento come riportato da altri autori (Bernard et al., 2015; Unrine, Tsyusko, Hunyadi, Judy, & Bertsch, 2010; Zheng, Liu, Li, Cui, & Li, 2013; Gaete, Hidalgo, Neaman, & Avila, 2010).

Una elevata concentrazione di SOD può essere correlata al fatto che quest'enzima viene prodotto già in quantità modeste durante processi metabolici come la catena di trasporto degli elettroni. Poi, a seguito di un bioaccumulo di PTEs, la concentrazione può diventare ancora più elevata.

Un aumento graduale di SOD potrebbe essere spiegato dal fatto che il lombrico riesce a tenere a bada lo stress ossidativo entro un certo limite di tempo, superato il quale è necessario l'incremento dell'attività antiossidante con i relativi enzimi (Yang, Song, Ackland, Liu, & Cao, 2012). Una mancata attivazione di SOD, invece, sarebbe causata o da un eccessivo danno ossidativo oppure dall'utilizzo di altri mezzi di detossificazione, come le proteine leganti i metalli come strategia di adattamento e sopravvivenza più consona nell'immediato arco temporale (Mincarelli, Tiano, Craft, Marcheggiani, & Vischetti, 2019).

2.1.2 *Glutathione-S-transferasi (GST)*

L'attività della glutathione-S-transferasi nello studio di Yang et al. (2020), è aumentata significativamente già dalla quarta settimana di esposizione al Cd (prima rispetto agli altri enzimi SOD e CAT). Dallo studio emerge che le variazioni sono dipese soprattutto dal tempo di esposizione, oltre che dalla dose. Gli autori mettono in correlazione l'aumento di attività enzimatica dalla quarta settimana con lo stop del bioaccumulo del Cd da parte di *E.fetida* spiegando che l'attivazione significativa della GST potrebbe essere il risultato dell'interazione tra i radicali liberi e le proteine leganti i metalli, che sequestrano quest'ultimi rendendoli biologicamente inattivi.

Una correlazione dose dipendente positiva è stata trovata anche da Maity et al. (2017), dove sono stati misurate diverse attività enzimatiche sul lombrico *A.caliginosa* in risposta a suoli della Repubblica Slovacca con contaminazioni multiple di As, Cd, Pb, Cr, Hg, Mn, Fe, Co, Ni, Cu e Zn. Per quanto riguarda la GST gli elementi che sembrano aver sortito effetto stimolante maggiore sono Mn, Hg e Cu, in modo più moderato Cd e Pb, mentre il Ni sembra

stimolare l'aumento di quest'attività enzimatica soprattutto quando in combinazione con altri elementi. Anche nello studio di Xu et al., (2021) la GST ha avuto un pattern chiaramente dose-risposta a concentrazioni crescenti di Sb e Cd, inoltre è risultato il biomarcatore più sensibile (rispetto agli altri in esame: CAT, SOD, MT, GPX) un incremento fino al 2277%.

Nello studio di Clasen et al., (2021) l'andamento del GST in una prova con esposizioni a diverse concentrazioni di Cu (0, 35, 70, 105, 140, 175 ppm) non ha dato risultati chiari; se si osservano i cambiamenti significativi dell'attività enzimatica in questione tra inizio (3 giorni) e fine esperimento (28 giorni) solo in due tesi questa è risultata significativamente diminuita (105 ppm) e aumentata (175 ppm), se si confronta la misura dopo 3 giorni di esposizione con le diverse dosi di Cu è stato osservato decremento lineare della GST rispetto all'aumentare della dose somministrata. Un altro studio che osserva la GST su lombrichi esposti a suoli contaminati da rame, ma anche altri elementi quali Pb, Cd, Cr e Zn riporta misurazioni di GST poco rilevanti (Dedeke et al. 2018).

Una risposta ormetica è stata spiegata da Laszczyca et al. (2004) (come per l'enzima SOD) rappresentata da una graduale stimolazione in risposta a basse dosi di contaminazione fino al valore di picco e successiva inibizione a causa di dosi più elevate, gli autori hanno anche rilevato che quest'attività enzimatica sembra avere un comportamento inversamente proporzionale alle GR.

Secondo Maity et al. (2018), la GST, nella specie *E.fetida*, è risultata correlata positivamente alle concentrazioni di Cd. La sua attività è aumentata all'aumentare delle dosi. E' rimasta ai livelli del controllo al giorno due, per tutte le dosi, ed ha raggiunto il picco al giorno ventuno. Per quanto riguarda *E.waltoni*, già al secondo giorno c'è stato un aumento di attività. Il picco è stato raggiunto al giorno ventuno. L'attività della GST, anche qui, è risultata correlata positivamente con le dosi, tranne che al giorno ventotto, dove è diminuita all'aumentare della concentrazione di Cd. Inoltre, per questa specie, è stato registrato un aumento significativo di GST in relazione al tempo di esposizione.

2.1.3 Catalasi (CAT)

L'attività dell'enzima CAT ha subito variazioni in tutti gli articoli analizzati in questo lavoro di tesi tranne che in quello di Mincarelli et al. (2019). Nello studio di Yang et al. (2012), la CAT è aumentata da metà esperimento in poi per raggiungere il picco a fine esperimento di otto settimane, seguendo lo stesso trend osservato e riportato precedentemente per la SOD, anche se gli incrementi della CAT a fine dell'esperimento (50.4%, 53.3%, 54.9% e 65%,

rispettivamente per le esposizioni al Cd di 1.25, 2.50, 5.00 and 10.00 mg/kg) sono risultati leggermente più contenuti rispetto a quelli della superossido dismutasi.

Zhou, et al. (2013), riportano un'attività della CAT significativamente più bassa rispetto al controllo al ventottesimo giorno di sperimentazione. Questo è accaduto per tutte le dosi di Cu a cui *E.fetida* è stata esposta.

Maity et al. (2018), hanno riportato, studiando la specie *E.fetida*, un aumento dose-dipendente di CAT fino al giorno quattordici di sperimentazione, per poi osservare una diminuzione, sempre dose-dipendente, al giorno ventuno. A fine esperimento, l'enzima è tornato ai valori di controllo. L'attività della CAT di *E.waltoni*, invece, si è comportata in modo piuttosto differente. C'è stata un'induzione dose-dipendente fino al settimo giorno, poi un ritorno ai livelli del controllo fino al giorno ventuno. Tuttavia, al giorno ventotto si è registrata una debole correlazione dose-dipendente negativa, con induzione a basse dosi (30-60 mg kg⁻¹) e inibizione alla dose più alta (mg kg⁻¹).

Anche negli studi di Xu et al. (2021) e Sharma et al. (2020), l'attività di CAT è aumentata nei lombrichi esposti a Sb e Cd nel primo studio e Sn e Cu nel secondo lavoro, in quest'ultimo è stato evidenziato un chiaro andamento di tipo dose-tempo dipendente con un incremento del 21.10% e 18.70% rispettivamente per l'esposizione al solo rame e all'accoppiata rame e stagno. Come osservato per la superossido dismutasi, anche se per la CAT non è statisticamente significativo, nell'articolo di Laszczyca et al. (2004), non si parla di semplice incremento, ma di risposta bifasica ormometrica. Inoltre l'attività della catalasi è risultata inversamente correlata all'attività della GPX, gli autori, in linea con quanto riscontrato in studi precedenti (Allen, Toy, Newton, Farmer, & Sohal, 1985; Burk, Nishiki, Lawrence, & Chance, 1978; Ji, Stratman, & Lardy, 1992; Lin, J., & Girotti, 1993; Olsson, et al., 1993; Olsson, 1986; Martins, Chubatsu, & Meneghini, 1991; Laszczyca, Kawka-Serwecinska, Chrascina, & Migula, 1993; Łaszczyca, 1999) ne deducono un meccanismo compensatorio.

2.1.4 Glutazione perossidasi (GPX)

Anche la glutazione perossidasi nello studio di Laszczyca et al. (2004) ha riportato un comportamento ormetico bifasico, e come anticipato, risulta più elevata laddove la CAT era risultata bassa. Questi meccanismi di tipo compensatorio, tra GPX e CAT è stato ritrovato anche tra GPX e GR. Un comportamento opposto è stato invece notato da Maity et al. (2017), dove l'induzione di GPX è stata sempre accompagnata da un aumento di GR. Sempre in questo studio è stata confermata una correlazione positiva tra presenza di PTEs e induzione di GPX. Sempre Maity et al. (2018), in un altro lavoro successivo, hanno rivelato

lo stesso incremento di GPX accoppiato con un'induzione anche di GR. L'attività della GPX, in *E.fetida*, ha registrato una correlazione positiva con le dosi fino al giorno quattordici, e negativa al ventunesimo. Tuttavia, a fine esperimento c'è stata un'induzione dose-dipendente. Su *E.waltoni* è stata registrata la più elevata attività di GPX nel giorno due, a seguito di esposizione alla massima concentrazione di Cd (120 mg kg^{-1}). Poi, dal giorno sette al ventuno c'è stata una correlazione positiva tra attività dell'enzima e concentrazione di Cd, statisticamente significativa. A fine esperimento è stata osservata una risposta differente. Una debole correlazione negativa tra le dosi e l'attività enzimatica. L'aumento di GPX, accoppiato a quello di GR, servirebbe all'eliminazione dei radicali ossidrilici e gli idroperossidi formati a seguito della presenza dei PTEs. (Maity, Banerjee, Goswami, Chakrabarti, & Mukherjee, 2018)

L'attività di GPX è stata studiata su *E.fetida* in due articoli tra quelli presi in esame, nel primo (Xu et al. 2021) veniva analizzato in risposta ad esposizione da Cd e Sb mentre il secondo (Sharma et al. 2020) da Cu e Sn.

Quest'attività enzimatica in entrambi gli studi è risultata stimolata dalla presenza di PTEs nel suolo, più nello specifico, per quanto riguarda lo studio di Xu et al. (2021), è chiaro un pattern dose-effetto, sia nell'esposizione singola a cadmio e antimonio che in quella combinata, in Sharma et al. (2020), la GPX è però, stata inibita nella tesi in cui era massima la dose di Cd.

2.1.5 *Glutathione reduttasi (GR)*

Laszczyca et al. (2004) hanno riportato un comportamento ormetico di GR, una risposta bifasica significativa simile agli altri enzimi del glutathione analizzati. Le analisi condotte su lombrichi campionati in campo hanno appurato che quest'attività enzimatica non è risultata influenzata dagli andamenti stagionali (lo stesso comportamento era stato misurato per la GST), inoltre la più alta attività di GR è stata registrata dove c'erano basse concentrazioni di GPX e GST. Anche nel lavoro di Maity et al, (2018) viene studiata la glutathione reduttasi in risposta a Cd, Pb, Cu, Zn (e molti altri elementi), in questo caso però gli autori misurano andamenti di GR e GPX simili e non di compensazione, in generale la GR è risultata stimolata dalla presenza dei PTEs. Lo stesso è risultato in un successivo studio, sempre condotto da Maity et al. (2018), per la specie *E.fetida*. L'attività della GR ha subito un'induzione dose-dipendente statisticamente significativa al settimo, quattordicesimo e ventottesimo giorno. Al giorno ventuno si è registrato un ritorno della GR ai livelli di controllo. Anche in questo caso, GR e GPX sono incrementati simultaneamente. Per la specie *E.waltoni*, al giorno due, è stata riportata la più alta attività della GR a seguito di

esposizione alla più elevata concentrazione di Cd (120 mg kg^{-1}). Tuttavia, dal giorno sette in poi, l'attività della GR non ha subito alcuna variazione.

2.1.6 Acetilcolinesterasi (AChE)

L'attività dell'acetilcolinesterasi ha avuto un comportamento ormetico nello studio di Laszczyca et al. (2004), una risposta bifasica, tuttavia statisticamente non significativa, questo viene riscontrato anche nello studio di Clasen et al (2021) in cui le variazioni enzimatiche in questione aumentano in corrispondenza di basse dosi di Cu e lunghi tempi di esposizione e diminuiscono se questo elemento è presente in concentrazioni elevate, questo è stato ricondotto all'apoptosi cellulare dovuta ad una prolungata ed intensa esposizione al rame.

2.1.7 Metallotioneine, un altro parametro come risposta ai PTEs nei lombrichi

Dall'analisi degli articoli in esame nel presente lavoro di tesi è emerso che anche la quantificazione delle metallotioneine è un parametro misurato e spesso affiancato alle attività enzimatiche nel valutare i danni su metabolismo dei lombrichi a seguito dell'esposizione a substrati contaminati da PTEs. L'impatto del rame su *E.andrei* in termini di espressione genica nelle cellule immunitarie delle metallotioneine ha dimostrato che queste aumentano in risposta al Cu, provando il ruolo di queste proteine nell'omeostasi e nella protezione contro lo stress ossidativo (Mincarelli et al. 2019). Da questo studio si è evinto anche che la mancata attivazione di SOD e CAT potrebbe proprio essere stata causata da una strategia di adattamento e sopravvivenza adottata dal lombrico, schierando come prima difesa le metallotioneine. Anche nel lavoro di Xu et al. (2021) per tutte le dosi di Cd e Sb, hanno visto l'aumento delle MT con un chiaro andamento dose-risposta. Maity et al. (2018) hanno dedotto che una minore attività degli enzimi del glutatione sarebbe compensata dall'attivazione dei meccanismi di detossificazione delle proteine leganti i metalli, come le MT. Yuvaraj et al. (2021) hanno anch'essi riportato un incremento di MT a seguito di esposizione a Cd, Cu, Cr, Pb e Zn. La concentrazione di PTEs nel suolo andava da 0.01 a $326.42 \text{ mg kg}^{-1}$. È stato visto che la biodisponibilità di questi elementi e il loro stress indotto possono portare alla produzione di MT che neutralizzerebbero la loro tossicità proteggendo le cellule interne. In particolare, Cd, Cr e Cu si legherebbero in maniera efficace alle MT, rispetto a Zn. Inoltre, è stato osservato che la specie epigea studiata (*Drawida sulcata*) ha accumulato livelli elevati di PTEs rispetto a quella anecica (*Lampito mauritii*). Conseguenza di ciò è stata una maggiore produzione di MT da parte della prima.

CONCLUSIONI

La disamina della bibliografia condotta nel presente lavoro di tesi mostra risultati non sempre confrontabili a causa dell'eterogeneità delle specie studiate e dei diversi design sperimentali (tipologia di substrato, tempi di prelievo, tipo di contaminazione, metodi di analisi ed espressione dei risultati).

In base agli articoli selezionati le attività di SOD, GST, CAT e GPX sembrano essere inizialmente stimolate e successivamente inibite dalla concentrazione dei PTEs e dal passare del tempo di esposizione. In alcuni lavori il trend di queste attività enzimatiche viene identificato nel meccanismo di risposta ormetica bifasica caratterizzata da un aumento delle attività enzimatiche alle basse dosi e da una diminuzione in corrispondenza di più elevate concentrazioni.

L'andamento simile di queste quattro attività enzimatiche nella maggior parte degli studi analizzati, conferma un processo di detossificazione sinergico, primo meccanismo di difesa dei lombrichi nei confronti della contaminazione da PTEs.

Nel complesso si evince che i PTEs prevalentemente presi in considerazione negli studi sono Cu>Cd>Pb/Zn. Infine, tra le specie di lombrichi utilizzate per le sperimentazioni *E.fetida* è stata la più significativa per frequenza.

Sarebbe interessante spostare l'attenzione verso specie di lombrichi endemiche campionate direttamente nei siti contaminati che risultano in genere maggiormente sensibili ed effettuare analisi in diversi periodi dell'anno, considerato che le attività enzimatiche, variano anche a seconda delle condizioni stagionali. Sebbene questo comporti sicuramente un maggiore dispendio di energia sembra essere la strada migliore in termini di ricerca sul rischio ambientale da PTEs. Infatti le attività enzimatiche si confermano biomarcatori affidabili nel monitoraggio dell'inquinamento da elementi potenzialmente tossici nel suolo in quanto permettono di misurare risposte precoci e in relazione a esposizioni con dosi sub-letali.

Combinare test condotti su lombrichi campionati e mesocosmi in laboratorio con concentrazioni simulate e singole di ogni PTEs permetterebbe di ottenere un quadro più realistico e più chiaro riguardo le complesse dinamiche delle risposte alla contaminazione da parte di questi importanti organismi del suolo.

BIBLIOGRAFIA

- Ali, H., Khan, E., & Ilahi, I. (2019). Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity, and Bioaccumulation. *Journal of Chemistry*, 14.
- Allen, R. G., Toy, P. L., Newton, R. K., Farmer, K. J., & Sohal, R. S. (1985). Effects of experimentally altered glutathione levels on life span, metabolic rate, superoxide dismutase, catalase and inorganic peroxides in the adult housefly, *Musca domestica*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 399-402.
- Alloway, B. J. (2012). Sources of Heavy Metals and Metalloids in Soils. In B. J. Alloway, *Heavy Metals in Soils* (p. 11-50).
- Bernard, F., Brulle, F., Dumez, S., Lemiere, S., Platel, A., Nesslany, F., . . . Vandebulcke, F. (2015). Antioxidant responses of Annelids, Brassicaceae and Fabaceae to pollutants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 273-303.
- Bernhardt, R. (2006). Cytochromes P450 as versatile biocatalysts. *Journal of Biotechnology*, 128-145.
- Bianchi, G., Verdi, G., & Rossi, M. (2018). Titolo dell'articolo. *Journal Name*, 48(3), 11-15.
- Burk, R. F., Nishiki, K., Lawrence, R. A., & Chance, B. (1978). Peroxide removal by selenium-dependent and selenium-independent glutathione peroxidases in hemoglobin-free perfused rat liver. *J Biol Chem*, 43-6.
- Cao, X., Bi, R., & Song, Y. (2017). Toxic responses of cytochrome P450 sub-enzyme activities to heavy metals exposure in soil and correlation with their bioaccumulation in *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 158-165.
- Capri, E., & Trevisan, M. (2002). *I metalli pesanti di origine agricola nei suoli e nelle acque sotterranee*. Pitagora.

- Clasen, B., Ferreira, T., Santana, N. A., Portela, V. O., Loro, V. L., Murussi, C. R., . . . Antonioli, Z. I. (2021). Eisenia andrei Behavioral and Antioxidative Responses. *Water Air Soil Pollut.*
- Cortet, J., Gomot-De Vaufleury, A., Poinso-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., & Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, 115-134.
- Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., & Rofe, A. M. (2001). Metallothionein: The multipurpose protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 627-647.
- Dedeke, G. A., Iwuchukwu, P. O., Aladesida, A. A., Afolabi, T. A., & Ayanda, I. O. (2018). Impact of heavy metal bioaccumulation on antioxidant activities and DNA profile in two earthworm species and freshwater prawn from Ogun River. *Science of the Total Environment*, 576-585.
- Duffus, J. H. (2002). "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 793-807.
- Edwards, C. A. (2004). *Earthworms Ecology*. Edwards, Clive A.
- EvertNieboer, & H.S.Richardson, D. (1980). The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 3-26.
- Fang, W.-C., & Kao, C. H. (2000). Enhanced peroxidase activity in rice leaves in response to excess iron, copper and zinc. *Plant Science*, 71-76.
- Gaete, H., Hidalgo, M. E., Neaman, A., & Avila, A. (2010). Assessment of copper toxicity in soils using biomarkers of oxidative stress in Eisenia foetida. *Quim Nova*, 566-570.
- Gawel, S., Wardas, M., Nieworok, E., & Wardas, P. (2004). Malondialdehyde (MDA) as lipid peroxidation marker. *Wiadomosci Lekarskie*, 453-455.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., . . . Tuteja, N. (2013). Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry*, 204-212.
- Hatwalne, M. S. (2012). Free radical scavengers in anaesthesiology and critical care. *Indiana Journal of Anaesthesia*, 227-233.
- Heikens, A., Peijnenburg, W., & Hendriks, A. J. (2001). Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution*, 385-393.

- Jarup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 167-182.
- Ji, L. L., Stratman, F. W., & Lardy, H. A. (1992). Antioxidant enzyme response to selenium deficiency in rat myocardium. *Journal of the American College of Nutrition*, 79-86.
- Łaszczyca, P. (1999). *Relationships among indices of antioxidative activity in animals treated with selected prooxidants and antioxidants*.
- Łaszczyca, P., Augustyniak, M., Babczyn'ska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula, P., . . . Witas, I. (2004). Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium. *Environment International*, 901-910.
- Łaszczyca, P., Kawka-Serwecinska, E., Chrascina, M., & Migula, P. (1993). Selenite and selenium enriched yeast in experimental cadmium intoxication in rats. *Acta Biologica Silesiana*, 55-65.
- Lin, F. B., J., P. T., & Girotti, A. W. (1993). Hyperexpression of Catalase in Selenium-Deprived Murine L1210 Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 176-185.
- Maity, S., Poráčová, J., Dey, P., Vašková, J., Vaško, L., Sedlák, V., & Blaščáková, M. M. (2017). Antioxidant responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* of eastern Slovakia: application of principal component analysis as a tool to identify metal contaminated areas. *Springer Nature*.
- Maity, S., Banerjee, R., Goswami, P., Chakrabarti, M., & Mukherjee, A. (2018). Oxidative stress responses of two different ecophysiological species of earthworms (*Eutyphoeus waltoni* and *Eisenia fetida*) exposed to Cd-contaminated soil. *Chemosphere*, 307-317.
- Margis, R., Dunand, C., Teixeira, F. K., & Margis-Pinheiro, M. (2008). Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *the FEBS Journal*.
- Martins, E. A., Chubatsu, L. S., & Meneghini, R. (1991). Role of antioxidants in protecting cellular DNA from damage by oxidative stress. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 95-101.
- McLaughlin, M. J., Zarcinas, B. A., Stevens, D. P., & Cook, N. (2008). Soil testing for heavy metals. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 1661-1700.
- Mincarelli, L., Tiano, L., Craft, J., Marcheggiani, F., & Vischetti, C. (2019). Evaluation of gene expression of different molecular biomarkers of stress response as an effect of copper exposure on the earthworm *Eisenia Andrei*. *Ecotoxicology*, 938-948.

- Montgomery, J., Evans, A., Chenery, R. S., Pashley, V., & Killgrove, K. (2010). 'Gleaming, white and deadly': using lead to track human exposure and geographic origins in the Roman period in Britain. *Journal of Roman archaeology*, 199-226.
- Newman, M. C. (2009). *Fundamentals of Ecotoxicology*.
- Nieboer, E., & H.S. Richardson, D. (1980). The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical*, 3-26.
- Nriagu, J. O. (2002). Arsenic Poisoning Through the Ages. *Environmental Chemistry of Arsenic*.
- Olsson, U. (1986). Selenium deficiency and detoxication functions in the rat: short-term effects of cadmium. *Drug-nutrient Interactions*, 309-319.
- Olsson, U., Lundgren, B., Segura-Aguilar, J., Messing-Eriksson, A., Andersson, K., Becedas, L., & De Pierre, J. (1993). Effects of selenium deficiency on xenobiotic-metabolizing and other enzymes in rat liver. *International Journal for Vitamin and Nutrition research*, 31-37.
- Perry, J., Shin, D. S., Getzoff, E. D., & Tainer, J. A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 245-262.
- Pourret, O., & Hursthouse, A. (2019). It's Time to Replace the Term "Heavy Metals" with. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16-22.
- Radetzki, M. (2009). Seven thousand years in the service of humanity-the history of copper, the red metal. *Resources Policy*, 176-184.
- Rossi, M., Bianchi, G., & Verdi, G. (2018). Titolo dell'articolo. *Journal Name*, 10-15.
- Shabbir, Z., Sardar, A., Shabbir, A., Abbas, G., Shamshad, S., Khalid, S., . . . Shahid, M. (2020). Copper uptake, essentiality, toxicity, detoxification and risk assessment in soil-plant environment. *Chemosphere*, 259.
- Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I., Niazi, N. K., . . . Rashid, M. I. (2017). Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: A review. *Chemosphere*, 178, 513-533.
- Sharma, R. K., & Agrawal, M. (2004). Biological effects of heavy metals: An overview . *Journal of Environmental Biology*, 301-313.

- Sharma, S., Gupta, R., Singh, D., Mahima, & Anshu. (2020). Super oxide dismutase, Catalase and glutathione peroxidase activity in heavy metals contaminated earthworm, *Eisenia fetida*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 1909-1913.
- Strange, R. C., Jones, P. W., & Fryer, A. A. (2000). Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. *Toxicology Letters*, 357-363.
- Tehrani, H. S., & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Catalase and its mysteries. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 5-12.
- Unrine, J. M., Tsyusko, O. V., Hunyadi, S. E., Judy, J. D., & Bertsch, P. M. (2010). Effects of Particle Size on Chemical Speciation and Bioavailability of Copper to Earthworms (*Eisenia fetida*) Exposed to Copper Nanoparticles. *Journal of Environmental Quality*, 1942-1953.
- van Gestel, C. A. (2012). Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. *ZooKeys*, 275-296.
- Verdi, G. (2017). Titolo del capitolo. In R. Cristiano (A cura di), *Titolo del libro* (p. 10-20). Ancona: CasaEditrice.
- Xu, Z., Yang, Z., Shu, W., & Zhu, T. (2021). Combined toxicity of soil antimony and cadmium on earthworm *Eisenia fetida*: Accumulation, biomarker responses and joint effect. *Journal of Hazardous Materials Letters*.
- Yang, X., Song, Y., Ackland, M. L., Liu, Y., & Cao, X. (2012). Biochemical Responses of Earthworm *Eisenia fetida* Exposed to Cadmium-Contaminated Soil with Long Duration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1148-1153.
- Yatoo, A. M., Ali, M. N., Zaheen, Z., Baba, Z. A., Ali, S., Rasool, S., . . . Hamid, B. (2022). Assessment of pesticide toxicity on earthworms using multiple . *Environmental Chemistry Letters*, 2573-2596.
- Yuvaraj, A., Govarathanan, M., Karmegam, N., Biruntha, M., Kumar, D. S., Arthanari, M., . . . Thangaraj, R. (2021). Metallothionein dependent-detoxification of heavy metals in the agricultural field soil of industrial area: Earthworm as field experimental model system. *Chemosphere*.
- Zheng, K., Liu, Z., Li, Y., Cui, Y., & Li, M. (2013). Toxicological responses of earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to metal-contaminated soils. *Environmental Science and Pollution Research*, 8382-8390.

Zhou, C.-F., Wang, Y.-J., Li, C.-C., Sun, R.-J., Yu, Y.-C., & Zhou, D.-M. (2013). Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution*, 71-77.