



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA
(DiSIT)
SEDE DI ALESSANDRIA

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE AMBIENTALI
(ACQUE INTERNE E AGROECOSISTEMI)**

XXVI CICLO (2010-2013)

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

**Studio degli effetti indotti da contaminanti
ambientali sull'organismo modello *Eisenia andrei*:
meccanismi d'azione del Cr(VI) a livello molecolare,
cellulare e di organismo**

Coordinatore:

Prof. Giorgio MALACARNE

Responsabile scientifico:

Prof. Aldo VIARENGO

Candidata:

Dott.ssa Marta BOERI

Indice

1.Introduzione.....	1
1.1.L' inquinamento	2
1.2.Il suolo	4
1.3.I metalli pesanti.....	7
1.3.1.Il cromo.....	10
1.4.Monitoraggio chimico e biologico dei suoli.....	17
1.5.I biomarker.....	23
1.6.Gli organismi modello dei suoli.....	31
1.6.1.Il verme terrestre <i>Eisenia andrei</i>	32
2.Scopo del lavoro.....	41
3.Materiali e metodi	45
4.Risultati.....	63
4.1.Messa a punto di un metodo istochimico per valutare l' attività della Ca²⁺-ATPasi delle cellule del tessuto intestinale di <i>Eisenia andrei</i>.....	64
4.1.1 Risultati	67
4.1.2. Immunoistochimica	80
4.1.3. Discussione	83
4.2. Effetti di concentrazioni ambientalmente rilevanti di Cr (VI) sui vermi terrestri: ruolo dello stress ossidativo nelle alterazioni della fisiologia degli organismi	87
4.2.1.Risultati	89
Valutazione degli effetti di differenti concentrazioni di Cr(VI) in <i>E. andrei</i> utilizzando l'artificial soil test.....	89

Valutazione degli effetti di differenti concentrazioni di Cr(VI) in <i>E. andrei</i> utilizzando il filter paper test	96
4.2.2 Discussione	107
4.3.Valutazione degli effetti indotti in <i>E. andrei</i> esposti a suoli di campo contaminati da Cr(VI)	115
4.3.1.Risultati	117
4.3.2.Discussione	125
5.Conclusioni	127
Bibliografia	130
Ringraziamenti	154
Allegati	156

1. Introduzione

1.1. L'inquinamento

L'aumento della popolazione mondiale, la crescita dell'attività industriale, i trasporti e l'enorme sviluppo delle città sono le principali cause del rilascio nell'ambiente di sostanze inquinanti. Secondo il Comitato Ecologico Americano si definisce inquinamento "ogni modificazione sfavorevole di un ambiente naturale dovuta all'attività umana, che altera le caratteristiche chimiche e fisiche dei comparti ambientali e la struttura e l'abbondanza delle associazioni dei viventi". L'inquinamento è causato dall'introduzione nell'ambiente di energia o sostanze contaminanti che sono di per sé nocive o sono immesse in quantità eccedenti la normale capacità di autodepurazione degli ecosistemi. Con il termine "sito contaminato" si intende un'area geograficamente definita e delimitata in cui, a seguito di attività umane è stata accertata un'alterazione delle caratteristiche quali/quantitative dei terreni, delle acque superficiali e sotterranee, ove le concentrazioni di alcune sostanze superano quelle imposte dalla normativa. In Italia, il problema della contaminazione dei suoli e dei corpi idrici è stato affrontato attraverso l'emanazione di una serie di provvedimenti legislativi: con la Legge n.426 del 9 dicembre 1998, recante "Nuovi interventi in campo ambientale", si sono stabiliti i primi interventi per un programma nazionale di bonifica e di ripristino ambientale dei siti inquinati. Mediante il D.M. n.471 del 25 ottobre 1999 si definì il "Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati ai sensi dell'Art. 17 del Decreto Legislativo n.22 del 5 febbraio 1997 e successive modifiche ed integrazioni". Questo regolamento in seguito, è stato sostituito dal Titolo V della Parte Quarta del Decreto Legislativo n.152 del 2006 "Testo Unico in materia ambientale". Il D.Lgs. n.152 del 2006 è noto come Testo Unico Ambientale e prevede che vengano effettuate delle indagini (sondaggi, piezometri, analisi chimiche etc.) per la caratterizzazione del sito per definire l'assetto geologico e idrogeologico, verificare la

presenza o meno di contaminazione nei suoli e nelle acque al fine di sviluppare un modello concettuale del sito. Allo stato attuale in molti Paesi la valutazione del rischio ambientale dei siti contaminati si basa sul confronto tra il dato chimico derivante dall'analisi della matrice ambientale e il valore limite soglia previsto dalla normativa. In particolare, il D. Lgs. 152/06 definisce due parametri: il primo, rappresentato dalle concentrazioni soglia di contaminazione (CSC), ossia i livelli di contaminazione delle matrici ambientali al di sopra dei quali è necessaria la caratterizzazione del sito e l'analisi del rischio sito specifica; il secondo, definito concentrazioni soglia di rischio (CSR), sono quei livelli di contaminazione delle matrici ambientali, da determinare caso per caso con l'applicazione della procedura di analisi di rischio sito specifica, il cui superamento richiede la messa in sicurezza e la bonifica. Per tanto si potrebbero classificare i siti in tre diverse categorie, i siti potenzialmente contaminati sono quelli in cui uno o più valori di concentrazione delle sostanze inquinanti ambientalmente rilevanti nelle matrici ambientali risultino superiori ai valori di concentrazione soglia di contaminazione (CSC), viene definito "potenzialmente contaminato" in attesa di espletare le operazioni di caratterizzazione e di analisi di rischio sanitario e ambientale sito specifica, che ne permettano di determinare lo stato o meno di contaminazione sulla base delle concentrazioni soglia di rischio (CSR). Si ha un sito contaminato nel caso in cui i valori delle concentrazioni soglia di rischio (CSR) risultano superati. Infine viene definito sito non contaminato ove la contaminazione rilevata nella matrice ambientale risulti inferiore ai valori di concentrazione soglia di contaminazione (CSC) oppure, se superiore, risulti comunque inferiore ai valori di concentrazione soglia di rischio (CSR) determinate a seguito dell'analisi di rischio sanitario e ambientale sito specifica.

1.2. Il suolo

Il suolo, secondo la definizione proposta dalla Soil Conservation Society of America (1986) è un corpo naturale costituito da particelle minerali ed organiche che si forma dall'alterazione fisica e chimico-fisica della roccia e dalla trasformazione biologica e biochimica dei residui organici. E' capace di sostenere la vita delle piante, e presenta una flora e una fauna caratteristiche. Rappresenta il mezzo d'interazione dinamico tra atmosfera, litosfera, idrosfera e biosfera. Il suolo è, quindi, un sistema complesso in continuo divenire che comprende una matrice di materia organica e minerali con circolazione di aria ed acqua nei pori. Inoltre nel suolo vivono miliardi di microrganismi, che hanno concorso alla pedogenesi e ne regolano la fertilità, formando ed assicurando al terreno i requisiti di nutritivi idonei per la crescita della vegetazione.

L'inquinamento del suolo è un fenomeno di alterazione della composizione chimica principalmente causato da attività antropiche, che possono determinare l'accumulo di composti tossici persistenti, sostanze chimiche, sali, materiali radioattivi o agenti patogeni, che hanno effetti negativi sulla crescita e sulla salute di piante, animali e microrganismi; è stato preso in considerazione come problema ambientale solo negli ultimi decenni. Per molto tempo infatti questo fenomeno è stato poco considerato in nome della capacità del suolo di autodepurarsi, ossia la sua capacità di minimizzare gli effetti negativi derivanti dall'immissione di sostanze inquinanti. Questo può avvenire grazie al suo potere assorbente, alla capacità tampone e dall'attività biotica che in esso si svolge.

Grazie all'assorbimento degli inquinanti nel suolo, con meccanismi di tipo fisico e chimico, possono essere parzialmente sottratti all'ambiente circostante; questa capacità del suolo di limitare gli effetti negativi è dovuta oltre che alle sue caratteristiche chimico-fisico anche all'innumerabile quantità di organismi micro e macroscopici che popolano il terreno e che

intervengono attivamente con il loro metabolismo sulla composizione dello stesso, trasformandolo e rigenerandolo (Nappi, 2000). Tuttavia, la capacità autodepurativa del suolo ha un limite oltre il quale i danni divengono irreversibili. Infatti, l'accumulo di contaminati, causa al tempo stesso una perdita di qualità del suolo e costituisce un potenziale pericolo per gli altri comparti ambientali. Il rilascio degli inquinanti avviene quando il terreno non è più in grado di assorbirli o a seguito di variazioni delle condizioni ambientali (come variazioni di pH) o a dilavamento. L'inquinamento del suolo è un fenomeno particolarmente grave poiché può avere gravi conseguenze sugli ecosistemi, può portare all'alterazione dell'equilibrio chimico-fisico e biologico del suolo. Questi cambiamenti possono provocare modificazioni del metabolismo dei microrganismi e degli organismi edafici quali ad esempio gli artropodi che vivono in un dato ambiente e comportare l'ingresso di sostanze dannose nella catena alimentare fino all'uomo.

Le norme che regolano la tutela del suolo sono di recente attuazione, a livello internazionale l'importanza della protezione del suolo è cresciuta soprattutto negli ultimi 20 anni: dal vertice di Rio (1992), dove i paesi partecipanti hanno approvato il concetto di sviluppo sostenibile, alla convenzione del 1994 per la lotta contro la desertificazione e la prevenzione e riduzione il degrado del terreno, al Sesto programma di azione in materia di ambiente, pubblicato dalla Commissione Europea nel 2001, per proteggere il suolo dall'erosione e dall'inquinamento. Dal 2002 la Commissione Europea (Comunicazione 179/2002) ha introdotto una serie di misure ambientali per prevenire la contaminazione del suolo e promuovere l'integrazione della protezione del suolo in altre grandi politiche dell'UE; infatti, come affermato nella stessa "Comunicazione", il suolo "assicura una serie di funzioni chiave, a livello ambientale, sociale ed economico, indispensabili per la vita" ma ad oggi è soggetto a molte attività umane che possono determinare la perdita delle sue funzioni. I provvedimenti Europei emanati dal 2002 in avanti, rilevano il crescente interesse della politica comunitaria nei confronti del

suolo, quale terza ed importante matrice dell'ambiente a cui dedicare attenzione, dopo l'aria e l'acqua. Da questi documenti, tra cui i principali sono il Sesto Programma d'Azione per l'Ambiente ed una comunicazione specifica "verso una strategia tematica per la protezione del suolo COM n. 179 del 2002", l'inquinamento dei suoli viene correttamente affiancato ad altre tematiche relative alla difesa del suolo.

Le principali cause di inquinamento del suolo sono l'aumento delle attività industriali, la gestione dei rifiuti e la diffusione di pratiche agricole intensive che hanno influenzando direttamente la qualità dei suoli aumentando il numero delle potenziali sorgenti di contaminazione, e limitando molte importanti funzioni del terreno, inclusa la capacità di rimuovere i contaminanti dall'ambiente attraverso i processi di filtrazione ed assorbimento. Proprio questa capacità, assieme alla resilienza del suolo, sono caratteristiche che lo rendono assai diverso dalle altre matrici ambientali, come l'atmosfera e l'idrosfera, poiché i contaminanti che arrivano al suolo tendono ad accumularsi e permanervi per lunghi periodi di tempo facendo sì che, spesso, i danni al suolo vengano evidenziati solo quando sono in stato molto avanzato, a volte molto vicini alla fase di non reversibilità. E' possibile distinguere tra contaminazione del suolo derivante da fonti puntiformi, generalmente associata alle attività minerarie, industriali e allo smaltimento dei rifiuti (discariche o incenerimento), o contaminazione derivante da fonti diffuse, associata alla deposizione atmosferica, alle pratiche agricole e ad inadeguate operazioni di riciclo dei rifiuti e trattamento delle acque reflue. Tra le maggiori classi di inquinanti che è possibile ritrovare nel suolo si hanno metalli pesanti fitofarmaci, IPA, diossine, PCBs.

Tutte le specie del biota edafico sono strettamente legate dalle interazioni biotiche che avvengono nel suolo e svolgono un ruolo ecologico che ha anche un forte impatto sulla

qualità della vita umana, oltre ad avere un enorme potenziale per produrre benefici economici (Edwards et Bohlen, 1996).

1.3. I metalli pesanti

I metalli pesanti sono elementi con densità superiore ai $5,0 \text{ g/cm}^3$ e peso atomico maggiore di 20. In realtà vengono considerati tali anche alcuni metalli che presentano una densità inferiore e dei non metalli, come As, Mo, B e Se, che hanno simili origine e meccanismi di azione dei metalli pesanti veri e propri (Adriano, 1986; Alloway, 1995). Alcuni di questi elementi, in piccole concentrazioni, sono essenziali per la vita degli organismi viventi (micronutrienti come Cu, Mn, Zn essenziali per piante e animali e Co, Cr e Se essenziali per gli animali). I metalli pesanti, con l'eccezione del Fe e dell'Al, si trovano normalmente come elementi in traccia nell'ambiente, in concentrazioni molto basse (0,1%) dell'ordine delle parti per milione (ppm) e in alcuni casi parti per miliardo (ppb). In piccole concentrazioni sono essenziali per la vita delle piante, degli animali e dell'uomo, ma superate certe soglie, variabili da organismo ad organismo, possono rivelarsi tossici e in alcuni casi cancerogeni. Generalmente vengono considerati metalli pesanti l'Ag, il Ba, il Cd, il Co, il Cr, il Mn, il Hg, il Mo, il Ni, il Pb, il Cu, lo Sn, il Tl, il V, lo Zn, alcuni metalloidi, con proprietà simili a quelle dei metalli pesanti, quali l'As, l'Sb, il Bi ed il Se. Tra questi, gli elementi più significativi a livello tossico sono: As, Hg, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn, Zn e Se (Salomon et Förstner, 1984).

ELEMENTI DEI GRUPPI PRINCIPALI		ELEMENTI DI TRANSIZIONE										ELEMENTI DEI GRUPPI PRINCIPALI						
1A (1)												8A (18)						
1	1 H 1,008																	
2	3 Li 6,941	4 Be 9,012											5 B 10,81	6 C 12,01	7 N 14,01	8 O 16,00	9 F 19,00	10 Ne 20,18
3	11 Na 22,99	12 Mg 24,31	3B (3)	4B (4)	5B (5)	6B (6)	7B (7)	8B (8) (9) (10)			1B (11)	2B (12)	13 Al 26,98	14 Si 28,09	15 P 30,97	16 S 32,07	17 Cl 35,45	18 Ar 39,95
4	19 K 39,10	20 Ca 40,08	21 Sc 44,96	22 Ti 47,88	23 V 50,94	24 Cr 52,00	25 Mn 54,94	26 Fe 55,85	27 Co 58,93	28 Ni 58,69	29 Cu 63,55	30 Zn 65,39	31 Ga 69,72	32 Ge 72,61	33 As 74,92	34 Se 78,96	35 Br 79,90	36 Kr 83,80
5	37 Rb 85,47	38 Sr 87,62	39 Y 88,91	40 Zr 91,22	41 Nb 92,91	42 Mo 95,94	43 Tc (98)	44 Ru 101,1	45 Rh 102,9	46 Pd 106,4	47 Ag 107,9	48 Cd 112,4	49 In 114,8	50 Sn 118,7	51 Sb 121,8	52 Te 127,6	53 I 126,9	54 Xe 131,3
6	55 Cs 132,9	56 Ba 137,3	57 La 138,9	72 Hf 178,5	73 Ta 180,9	74 W 183,9	75 Re 186,2	76 Os 190,2	77 Ir 192,2	78 Pt 195,1	79 Au 197,0	80 Hg 200,6	81 Tl 204,4	82 Pb 207,2	83 Bi 209,0	84 Po (209)	85 At (210)	86 Rn (222)
7	87 Fr (223)	88 Ra (226)	89 Ac (227)	104 Rf (261)	105 Db (262)	106 Sg (266)	107 Bh (262)	108 Hs (265)	109 Mt (266)	110 Ds (269)	111 Uuu (272)	112 Uub (285)	113 Uut (284)	114 Uuq (299)	115 Uup (288)	116 Uuh (292)		
			ELEMENTI DI TRANSIZIONE INTERNA															
6	lantanidi	58 Ce 140,1	59 Pr 140,9	60 Nd 144,2	61 Pm (145)	62 Sm 150,4	63 Eu 152,0	64 Gd 157,3	65 Tb 158,9	66 Dy 162,5	67 Ho 164,9	68 Er 167,3	69 Tm 168,9	70 Yb 173,0	71 Lu 175,0			
7	attinidi	90 Th 232,0	91 Pa (231)	92 U 238,0	93 Np (237)	94 Pu (242)	95 Am (243)	96 Cm (247)	97 Bk (247)	98 Cf (251)	99 Es (252)	100 Fm (257)	101 Md (258)	102 No (259)	103 Lr (260)			

Fig. 1. Tavola periodica degli elementi

Le possibili sorgenti di contaminazione da metalli pesanti, nell'ambiente in generale e nella pedosfera in particolare, hanno due origini: naturale o antropica. La principale fonte naturale è il substrato geologico, mentre tra le sorgenti d'origine antropica le più rilevanti sono dovute alle attività civili ed industriali (sorgenti di emissione puntiforme o lineare) nonché alle pratiche agricole (sorgenti di emissione diffuse).

I metalli pesanti sono elementi normalmente presenti in natura; tuttavia alcuni metalli non essenziali possono risultare tossici anche a basse concentrazioni (come il cadmio, l'arsenico, il piombo o il mercurio) e la loro concentrazione nella matrice risulta fortemente correlata allo stato di salute dell'ambiente e dell'uomo. Il termine "metalli pesanti" identifica una serie di elementi, inquinanti o potenzialmente tossici, alcuni dei quali tuttavia, sono micronutrienti

essenziali per la vita di piante e animali, ma superate certe soglie, possono rivelarsi tossici e in alcuni casi cancerogeni. Le concentrazioni di metalli pesanti nelle diverse matrici ambientali hanno subito un netto incremento dovuto all'attività antropica nell'ultimo secolo raggiungendo a volte soglie critiche di tossicità per la flora, la fauna e l'uomo stesso (Alloway, 1990; Adriano, 1992). L'incremento delle concentrazioni di tale classe di sostanze è da imputare a varie sorgenti diffuse e puntiformi (Fig. 2), quali: industrie chimiche, metallurgiche e di trasformazione del petrolio, incenerimento dei rifiuti, impianti di riscaldamento domestico, traffico veicolare ecc.; non meno importanti sono alcune pratiche agricole le quali possono introdurre nell'ambiente notevoli quantitativi di queste sostanze attraverso l'utilizzo di fertilizzanti chimici, fanghi di depurazione e altri ammendanti organici, fitofarmaci (Battaglia et al., 2007) e l'utilizzo di acque con bassi requisiti di qualità.

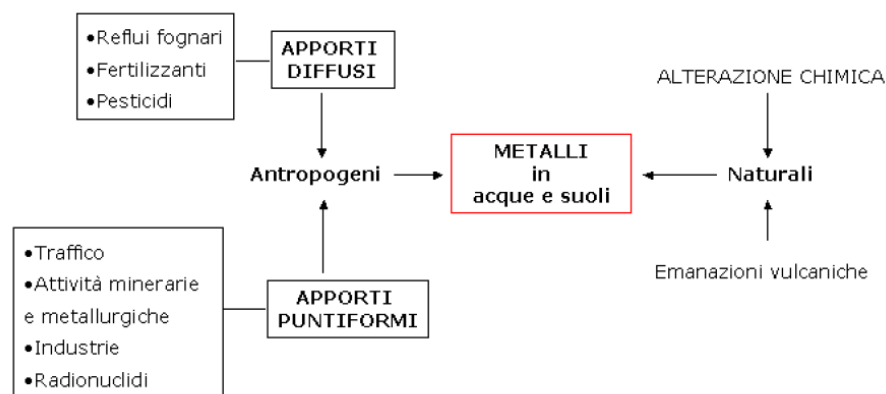


Fig. 2. Possibili apporti naturali (principalmente per alterazione delle rocce) ed antropici (attività umane di vario tipo) di metalli nelle acque e nei suoli. (www.igg.cnr.it).

La tossicità dei metalli pesanti non è semplicemente legata alla loro presenza nell'ambiente ed al loro possibile contatto con gli organismi viventi, ma è anche correlata allo stato di ossidazione. I metalli pesanti non sono particolarmente tossici in forma elementare, ma lo diventano come cationi ed in alcuni derivati organici. Si possono distinguere tre meccanismi molecolari di tossicità: produzione di specie reattive dell'ossigeno, interazione con gruppi funzionali di biomolecole, sostituzione di ioni (con funzioni di cofattori) nelle biomolecole. I

cationi dei metalli pesanti del gruppo B1 e B2 presentano alta affinità per i sulfidrilici di enzimi cellulari, e in generale per le proteine; questo legame può compromettere la funzionalità delle proteine, alcune forme interagendo con il DNA, causano effetti genotossici, che favoriscono l'insorgenza di tumori e cancro. Un altro importante problema legato all'accumulo di metalli pesanti nel suolo e nell'ambiente in generale è legato al fenomeno del bioaccumulo e della biomagnificazione, cioè l'aumento progressivo della concentrazione dell'inquinante negli organismi man mano che si sale di livello trofico e quindi lungo la catena alimentare, fino all'uomo.

1.3.1. Il cromo

Il cromo costituisce 0,1-0,3 mg/kg della crosta terrestre, esiste in diversi stati di ossidazione, che vanno dal Cr(II) al Cr(VI), ma nei terreni le forme più stabili e comuni sono la trivalente e l'esavalente (Fendorf, 1995). I rischi per la salute associati all'esposizione a cromo dipendono dal suo stato di ossidazione. La specie esavalente è predominante nelle falde acquifere naturali e la sua controparte trivalente è maggiormente presente nei reflui urbani ricchi di sostanze organiche (Fukai, 1967; Jan et Young, 1978). Il Cr(VI) è solubile in un'ampia scala di pH, mentre il Cr(III) tende ad essere adsorbito sulla superficie del suolo o a precipitare come idrossido di cromo in ambienti leggermente acidi o alcalini (Palmer et Wittbrodt, 1991; Sawyer et al, 1994).

Il Cr(VI) è utilizzato dall'industria metallurgica per la produzione di leghe contenenti cromo. E' molto utilizzato anche dall'industria chimica come agente ossidante e nella produzione di cromo composti. L'80-90 % della pelle è conciata con prodotti chimici a base di cromo (Papp, 2004). I Sali di Cr(III) sono meno utilizzati, vengono impiegati nell'industria tessile per le tinture, nelle industrie della ceramica e del vetro e nella fotografia. Della produzione totale di cromo il 90 % è usato in industrie metallurgiche per la produzione di acciaio e leghe, solo 5%

è utilizzato nell'industria dei materiali refrattari (ferro e acciaio, cemento, vetro, ceramica e macchinari) e chimica (conciaria, placcatura, la conservazione del legno e produzione di pigmenti) (Fig. 3).

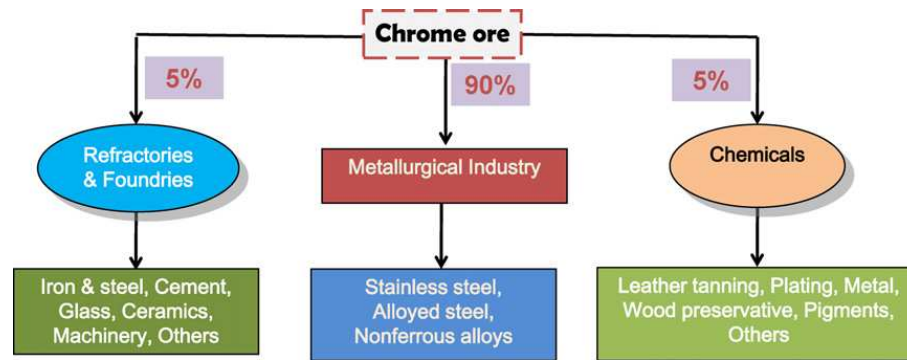


Fig. 3. Percentuale d'uso del cromo nelle diverse attività industriali (Dhal et al., 2013)

Il cromo è resistente agli agenti corrosivi a temperatura ambiente, per tanto è ampiamente utilizzato in galvanoplastica come rivestimento protettivo, viene inoltre utilizzato nella produzione di leghe ferrose, principalmente acciai inossidabili, la ghisa può contenere cromo dal 0,5 % al 30 % il che le fornisce durezza, resistenza alla corrosione e all'usura. Il cromo è anche utilizzato in leghe non ferrose in combinazione con nichel, ferro-nichel, cobalto, alluminio, titanio e rame (Bailar, 1997; U.S. EPA, 1998; Ryan et al., 2002; Bielicka et al., 2005).

Osservando il ciclo di cromo (Fig. 4) se ne deduce che il Cr (VI) è la forma più ossidata, reattiva e tossica del cromo (Bartlett, 1991); una piccola quantità può derivare dall'ossidazione naturale del Cr(III), ma la maggior parte generalmente è il risultato di inquinamento (Bartlett, 1991).

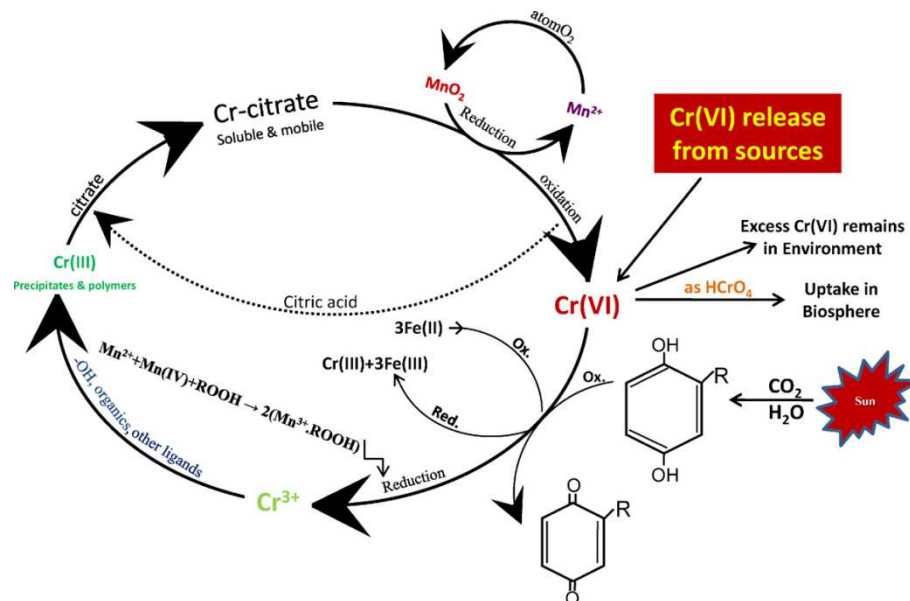


Fig. 4. Ciclo naturale del cromo nell'ambiente (Bartlett, 1991; Dhal et al., 2013)

Suoli e sedimenti contengono sia manganese ossidato sia carbonio ridotto. L'ossidazione del Cr(III) a Cr(VI) mediante ossidi manganese (Apte et al., 2005) e la riduzione di Cr(VI) a Cr(III) per interazione con composti del carbonio nel suolo sono reazioni termodinamicamente spontanee (James, 2001). Lo stato di ossidazione del cromo nel terreno dipende in parte dal potenziale redox e dal pH; nella maggior parte dei suoli, il cromo è presente prevalentemente come Cr(III), in condizioni riducenti, il Cr(VI) sarà ridotto a Cr(III) mediante reazioni redox per scambio di elettroni con le superfici dei minerali, per reazione con le sostanze organiche non umiche quali carboidrati e proteine, o riduzione di sostanze umiche del suolo. La riduzione del Cr(VI) a Cr(III) aumenta con la diminuzione del pH. In suoli aerobici, la riduzione dei Cr(VI) a Cr(III) è possibile anche a pH leggermente alcalino, se il terreno contiene appropriate fonti di energia per effettuare le reazioni redox (Bartlett et al., 1976). Nei Sub-suoli dove la sostanza organica è molto inferiore rispetto alla superficie del suolo, queste reazioni avvengono con meno facilità, in questi processi sono molto importanti il pH, la concentrazione di ossigeno, la presenza e la concentrazione di riduttori. Il cromo è un micronutriente essenziale nella dieta degli animali e degli esseri umani, in quanto è indispensabile per il normale metabolismo degli zuccheri, dei lipidi e delle proteine nei

mammiferi (Mordenti et Piva, 1997; Bailar, 1997). La sua carenza nella dieta provoca alterazione del metabolismo dei lipidi e del glucosio in animali ed esseri umani. Il cromo organico è anche coinvolto nel complesso denominato “fattore di tolleranza al glucosio” (FTG). Tuttavia, livelli elevati di cromo sono sempre tossici, anche se il livello di tossicità è legata allo stato di ossidazione. Il Cr(VI) desta grande interesse poiché è tossico, mutageno e cancerogeno, mentre nella sua forma trivalente (Cr(III)) è molto meno tossico ed è insolubile. Le fonti antropiche di cromo sono notevolmente aumentate a partire dalla rivoluzione industriale (Nriagu et Pacyna, 1988; Ayres, 1992).

L’U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) ha identificato il Cr(VI) come una delle 17 sostanze chimiche che rappresentano una minaccia per gli esseri umani (Marsh et McInerney, 2001). L’ente internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) ha classificato il cromo metallico ed i relativi composti trivalenti all’interno del gruppo 3 – l’agente non è classificabile quanto alla relativa cancerogenicità per gli esseri umani; mentre ha ritenuto che per il Cr(VI) e i suoi composti vi siano sufficienti evidenze di cancerogenicità e li ha per tanto inseriti nel gruppo 1.

Cr(VI) è solo altamente tossico (Petrilli et Flora, 1977; Sharma et al., 1995) per tutte le forme di organismi viventi, è mutageno nei batteri ed mutageno e cancerogeno nell’uomo e negli animali (Nishioka, 1975; Venitt et Levy, 1974; Losi et al., 1994), ma causa anche malformazioni e disfunzioni riproduttive (Kanojia et al., 1998). Il Cr(VI) può causare la morte di animali e esseri umani, se ingerito a dosi elevate (Zayed et Terry, 2003); la sua tossicità è legata alla facile diffusione attraverso la membrana cellulare e successiva riduzione a Cr(III) nelle cellule, che porta alla formazione di radicali liberi che possono direttamente causare alterazioni del DNA (Arslan et al., 1987; Kadiiska et al., 1994; Liu et al., 1995). Il Cr(III) è stato stimato essere da 10 a 100 volte meno tossico rispetto Cr(VI) (De flora et al., 1990), in

quanto le membrane cellulari risultano assai impermeabili alla maggior parte del Cr(III). Tuttavia, il Cr(III) intracellulare, che è il prodotto terminale della riduzione del Cr(VI), forma, *in vivo*, complessi con i nucleotidi, la cui potenzialità mutagena è non completamente noto (Roundhill et Koch, 2002).

Il Cr(VI) entra nelle cellule attraverso i canali di trasporto del solfato (Ohta et al., 1971; Ohtake et al., 1987; Cervantes et Silver, 1992; Silver et al., 2001); in condizioni fisiologiche reagisce spontaneamente con i riducenti intracellulari (es. ascorbato e glutatione) per generare intermedi poco stabili quali Cr(V) e/o Cr(IV), radicali liberi fino ad arrivare al prodotto finale Cr(III) (Costa, 2003; Xu et al., 2004, 2005). Il Cr(V) subisce un ciclo redox per rigenerare Cr(VI), trasferendo l'elettrone all'ossigeno. Il processo produce radicali dell'ossigeno (ROS) che reagiscono facilmente con i complessi DNA-proteina. Il Cr(IV) si lega a componenti cellulari e inibisce le loro normali funzioni fisiologiche (Pesti et al., 2000; Cervantes et al., 2001). Nell'ambiente la contaminazione da Cr(VI) altera la struttura delle comunità microbiche del suolo (Zhou et al., 2002; Turpeinen et al., 2004). Come risultato della crescita e attività microbica ridotte, la materia organica accumula Cr(VI) nei terreni (Mazierski, 1994; Shi et al., 2002). In Fig. 5 sono riportate le reazioni che subisce il Cr(VI) all'interno delle cellule.

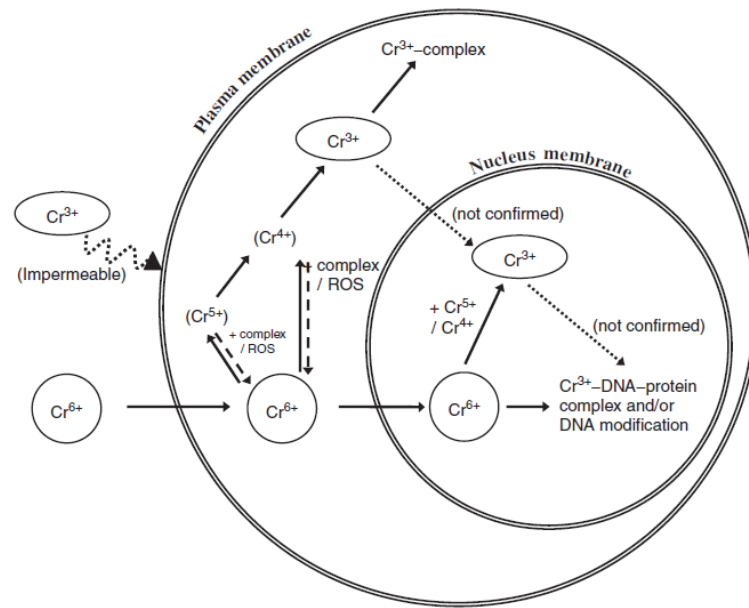


Fig. 5. Schema di tossicità e mutagenicità di Cr(VI) (Vincent, 1994; Cheung et Gu, 2007).

Gli effetti positivi e negativi del Cr(III) e Cr(VI) per l'uomo sono descritti da Bielicka et al. (2005). Gli effetti positivi comprendono la partecipazione del Cr(III) nel metabolismo del glucosio (fattore di tolleranza al glucosio), diminuendo il grasso corporeo, il colesterolo e i livelli di trigliceridi, attivando reazioni enzimatiche, e aumentando la massa muscolare. Del Cr(VI) sono ben noti i problemi che causa alla salute umana (De Flora, 2000) tra cui figurano effetti negativi sulla pelle che possono includere, dermatiti, reazioni cutanee allergiche e ulcere. Inoltre l'inalazione di composti del Cr(VI) può provocare ulcerazione e perforazione delle membrane mucose del setto nasale, irritazione di faringe e laringe, bronchiti asmatiche, broncospasmi ed edema. I sintomi respiratori possono includere tosse e asma, respiro breve, e prurito nasale. L'apparato respiratorio rappresenta il principale bersaglio dell'azione cancerogena del Cr(VI); l'esposizione professionale, acuta e cronica, avviene soprattutto per assorbimento mediante inalazione, per questa ragione è considerato una delle possibili cause di tumore al polmone. L'ingestione risulta meno critica, in quanto stomaco ed intestino hanno un'alta capacità riducente. I composti del Cr (quali anidride cromica, bicromato di potassio e cromato di potassio), se assorbiti, vengono eliminati dal rene, ove determinano degenerazioni

dei tubuli contorti, cui può conseguire nefrosi. Il cromo esavalente è inoltre un noto cancerogeno (De Flora, 2000).

1.4. Monitoraggio chimico e biologico dei suoli

Il problema dell'inquinamento ambientale è stato per anni affrontato valutando il tipo, la quantità e la tossicità teorica per l'uomo dei singoli composti chimici. Questa strategia fornisce informazioni qualitative e quantitative sulla distribuzione degli inquinanti nei vari comparti ambientali; inoltre consente l'identificazione e la valutazione di minime concentrazioni di sostanze tossiche, ma non consente, da sola, di esprimere valutazioni relative ai reali effetti che le sostanze chimiche alla concentrazione evidenziata essere presente nella matrice, inducono sugli organismi viventi che popolano l'ecosistema. Spesso, infatti, la concentrazione dei singoli contaminanti nell'ambiente si presenta al di sotto del valore soglia previsto dalla normativa, ma gli effetti additivi o sinergici risultanti dall'interazione dei singoli composti possono rappresentare, comunque, un pericolo per la salute degli organismi e, in ultima analisi, per dell'uomo. Le maggiori difficoltà nelle misurazioni dirette delle alterazioni ambientali si verificano in presenza di basse concentrazioni di inquinanti propagati da sorgenti puntiformi o diffuse, spesso discontinue, le cui sostanze immesse nell'ambiente subiscono trasformazioni ignote. E' necessario pertanto ricorrere ad un approccio ecologico ed ecotossicologico per una valutazione complessiva degli effetti di tali sostanze (Moore, 1985; Chapman, 1990; Viarengo et al., 2007). L'effetto biologico è legato alla frazione biodisponibile delle sostanze contaminanti che, a sua volta, dipende dalle sostanze chimiche presenti, dalle interazioni con le differenti matrici e dalle condizioni ambientali. Solo col biomonitoraggio, mediante organismi viventi, e la valutazione di parametri biologici, si riescono a conoscere gli effetti della contaminazione di una o più sostanze inquinanti presenti in un sito; integrando queste informazioni è possibile valutare gli effetti sinergici, additivi od antagonisti di miscele di sostanze inquinanti (Manning et Fender, 1980). Non si tratta della misurazione della quantità presente o immessa nell'ambiente di uno

o più inquinanti, ma della valutazione della qualità ambientale in funzione degli effetti biologici delle sostanze tossiche (Aitio et Kallio, 1999). Queste variazioni possono riflettersi sugli organismi, inducendo: modificazioni fisiologiche e morfologiche; variazioni della struttura e della composizione degli ecosistemi (Hopkin et al, 1993; Bickham et al., 2000; Dixon et al., 2002; Magni et al., 2006). Per questa ragione si è sviluppato un metodo di indagine che valuti gli effetti dell'inquinamento sulla componente biologica dell'ecosistema, il cui obiettivo è verificare lo stato fisiologico degli organismi che lo popolano (Gabrielides, 1997(a); Gabrielides, 1997(b)). Il biomonitoraggio, rispetto alle tecniche analitiche tradizionali, ha il vantaggio di essere facilmente applicabile e ha costi di gestione limitati. E' molto sensibile alle diverse tipologie di sostanze inquinanti, anche quelle che possono di norma non essere rilevabili con le semplici analisi chimico/fisiche; inoltre fornisce stime circa gli effetti combinati di più inquinanti sugli esseri viventi. Il monitoraggio biologico permette di coprire con relativa facilità vaste zone e territori diversificati, consentendo un'adeguata mappatura del territorio, e una valutazione del grado di contaminazione dell'area secondo una misura "integrata nel tempo" e non riferibile al solo momento in cui è stato effettuato il prelievo. Come già accennato, questa modalità di indagine, fornisce, inoltre, una stima della "biodisponibilità" delle sostanze tossiche presenti nell'ambiente e permette di valutare il rischio legato al trasferimento degli inquinanti attraverso le catene alimentari. L'entità dei danni provocati dai diversi contaminanti varia a seconda della concentrazione e della modalità di esposizione. Ad esempio nel caso di un sito con suolo contaminato la pericolosità per gli organismi dipende dalle molteplici vie di esposizione tra cui: ingestione di acqua di falda contaminata, contatto dermico con terreno inquinato, inalazione di polvere o vapori tossici o consumo di prodotti cresciuti su aree inquinate (Nathanail ey Earl, 2001). Il suolo, infatti, può agire sia da recettore che da sorgente secondaria di contaminanti (Birch et Snowdon, 2004).

Gli organismi utilizzati come strumenti di indagine nel biomonitoraggio devono presentare una specifica sensibilità verso determinati fattori di disturbo ambientale e vengono definiti a seconda delle specifiche caratteristiche, come bioindicatori o come bioaccumulatori (APAT, 2004). Attraverso l'utilizzo di organismi bioindicatori è possibile effettuare una valutazione precoce dello stress ambientale ed anticipare eventuali interventi prima che si manifestino problemi ad ampia scala. Un bioindicatore è un organismo o un sistema biologico che in presenza di inquinanti, subisce variazioni apprezzabili e rilevabili rispetto allo stato naturale (modificazioni morfologiche, fisiologiche e genetiche) (Nimis et al., 2000) che possono provocarne anche la morte (Bayne et al., 1985). Ovviamente, il tipo di risposta del bioindicatore varia in relazione sia alle caratteristiche proprie dell'organismo sia rispetto alla sua sensibilità agli inquinanti. Affinché un organismo possa essere definito un buon bioindicatore deve possedere alcune caratteristiche fondamentali (Zhou et al., 2008); esso, infatti, deve fornire informazioni integrate mettendo in evidenza alterazioni causate da diversi fattori. La risposta di un bioindicatore a una perturbazione deve essere interpretata e valutata in quanto sintetizza l'azione sinergica di tutte le componenti ambientali. Tali organismi devono avere ampia distribuzione nell'area di indagine, ed essere disponibili nell'arco di tutto l'anno. La loro facilità nell'allevamento e nella manipolazione, uniti alle ottime conoscenze sul loro ciclo vitale, li rendono ideali nelle campagne di biomonitoraggio. Al fine di poterne meglio valutare le variazioni dovute alla sindrome da stress ne devono essere note la biochimica e la fisiologia, oltre ad essere geneticamente uniformi.

Si definiscono, invece, bioaccumulatori gli organismi che riescono ad assorbire dall'ambiente determinate sostanze che vengono trattenute all'interno dei loro tessuti. Pertanto, un organismo bioaccumulatore è in grado di accumulare nel tempo specifiche sostanze inquinanti in quantità proporzionali sia alle concentrazioni ambientali, sia ai tempi di esposizione. I bioaccumulatori sono quindi, organismi in grado di sopravvivere alla presenza di un

determinato contaminante, assimilato dalle matrici ambientali (aria, acqua, suolo), accumulandolo e permettendone l'analisi sia qualitativa sia quantitativa. Un buon bioaccumulatore deve avere alta tolleranza e capacità di accumulare gli inquinanti oggetto di studio, e inoltre deve ampia distribuzione e scarsa mobilità.

Con l'utilizzo del monitoraggio biologico è possibile verificare lo stato fisiologico ("stato di salute") degli organismi che popolano un ecosistema, infatti le sostanze tossiche lo possono alterare provocando una "sindrome di stress", rendendo gli organismi più vulnerabili ad ulteriori variazioni ambientali. La valutazione del rischio ecologico (ERA) è stata definita come "la pratica di determinare la natura e la probabilità degli effetti delle azioni antropiche su animali, piante e sull'ambiente" (SETAC, 1997). Una corretta analisi delle complesse interazioni tra l'inquinamento causato dagli esseri umani e l'ambiente richiede l'applicazione di un approccio multidisciplinare per descrivere gli effetti negativi degli inquinanti sull'ambiente (Chapman, 1990; Dagnino et al., 2008). L'utilizzo di un approccio Triad permette di individuare i possibili effetti negativi delle sostanze chimiche tossiche a diversi livelli di organizzazione biologica, dal singolo organismo a popolazione e comunità (Chapman, 1990; Dagnino et al., 2008). L'approccio Triad permette la valutazione dei potenziali effetti pericolosi sugli ecosistemi integrando dati di chimica ambientale, per studiare il movimento, il trasporto e le modificazioni delle sostanze chimiche nell'ambiente, con i dati di tossicologia ambientale, per lo studio dei danni prodotti dalle sostanze inquinanti a livello di singolo organismo, di specie, di sistemi biologici complessi, per finire con l'ecologia per lo studio della struttura delle comunità, microbiche animali e vegetali. Le analisi chimiche sono in grado di rivelare la presenza di sostanze potenzialmente pericolose nei suoli, ma non possono essere utilizzate per quantificare le frazioni biodisponibili (Dickerson et al., 1994) che giocano un ruolo rilevante minacciando l'integrità degli ecosistemi (Ehlers et Luthy, 2003; Semple et al., 2004; Semenzin et al., 2007). I biomarker

descrivono gli effetti biologici (Spurgeon et al., 2005) e le diverse fasi di evoluzione della sindrome di stress in organismi modello (Dagnino et al., 2007; Viarengo et al., 2007; Dagnino et al., 2008). Queste variazioni o risposte possono essere individuate a livelli crescenti di complessità funzionale (Focardi et Leonzio, 2001). La tossicità di un contaminante si esercita, in linea generale, a livello biochimico-molecolare (modificazioni di attività enzimatiche, alterazioni a livello di DNA) e, solo successivamente, gli effetti si possono riscontrare, con un meccanismo a cascata, ai livelli superiori di organizzazione biologica ossia cellule, tessuti, organi, fino a giungere a livello di organismo e popolazione (Fossi, 1991; Spurgeon et al., 1994). L'analisi dei cambiamenti dei processi fisiologici di un organismo e della struttura di una comunità fornisce, quindi, informazioni qualitative e semiquantitative sulla natura del danno chimico provocato alla biocenosi (Colborn et al., 1993; NRC, 1991).

Esistono diversi bioindicatori usati nei saggi ecotossicologici, diversi per ciascuna matrice ambientale oggetto di studio. Come organismi sentinella per le acque marine vengono utilizzate le alghe in particolare diatomee come *Phaeodactylum tricorutum* (ISO, 2006), i molluschi, in particolare i mitili *Mytilus* sp., i ricci di mare *Paracentrotus lividus*, il crostaceo *Corophium volutator* e i pesci *Mullus* sp., *Zoarces viviparus*, *Perca* sp. Il biomonitoraggio della qualità di acque dolci e sedimenti avviene mediante l'utilizzo di diversi organismi tra cui il batterio *Vibrio fischeri* (Microtox®) (ISO, 1998), l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (ISO, 2004), l'ameba *Dictyostelium discoideum* (Falugi et al., 2002, Dondero et al., 2006(a); Sforzini et al., 2008), il nematode *Caenorhabditis elegans* (Dondero et al., 2006(b); Sforzini et al., 2008), i crostacei *Heterocypris incongruens* (ISO/DIS 14371) e *Daphnia magna* (ISO, 1996), i molluschi tra cui *Unio* sp. e *Dreissena polymorpha* (de Lafontaine et al., 2000), il verme *Lumbriculus variegatus* (OECD, 2006), pesci come *Cyprinus carpio* (van der Oost et al., 1998). Gli studi di biomonitoraggio per la valutazione della qualità dei suoli avvengono mediante lo studio degli effetti, su diversi organismi modello, nelle acque interstiziali, negli

elutriati di suolo e sul suolo tal quale. Vengono usati il già citato batterio *Vibrio fischeri*, l'ameba *Dictyostelium discoideum*, l'alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, il crostaceo *Daphnia magna*, l'ostracode *Heterocypris incongruens*, il nematode *Caenorhabditis elegans*, e il collembolo *Falsomia candida* (ISO, 1999; Gastaldi et al., 2007), gli enchitreidi *Enchytraeus* sp. (ISO, 2004), gli anellidi *Lumbricus rubellus*, *Lumbricus terrestris* e *Eisenia andrei* (ISO, 1993; U.S. EPA, 1991; OECD, 1984, 2004). Inoltre vengono effettuati anche dei fitotest con semi quali ad esempio il sorgo (*Sorghum saccharatum* – UNICHIM, 2003), crescione (*Lepidium sativum* L. – UNICHIM, 2003). Su questi organismi, in taluni casi, oltre ai classici endpoint di alto livello quali mortalità e riproduzione vengono valutati gli effetti subletali (biomarker di effetto e di esposizione).

1.5. I biomarker

L'obiettivo dei monitoraggi ambientali è quello di stimare, prevedere e, di conseguenza, evitare eventi dannosi a livello ecologico, come l'insuccesso riproduttivo o l'incremento della mortalità in una popolazione, attraverso l'utilizzo di segnali precoci di esposizione o effetto delle sostanze tossiche negli organismi (*early warning system*). Nel settore delle indagini ecotossicologiche si valuta il rischio ambientale causato da contaminanti di origine antropica utilizzando "indici di stress" molecolari, biochimici e fisiologici (Bayne et al., 1976; Bayne, 1985), comunemente definiti "biomarker" (McCarty et Shugart, 1990). Gli studi iniziali sui biomarker mettevano in evidenza l'importanza di combinare i dati relativi all'inquinamento con i dati in grado di descrivere gli effetti biologici dei composti inquinanti (Goldberg et al., 1978; Goldberg, 1980). Bayne nel 1979 ha proposto di individuare gli specifici parametri biologici che riflettessero la sindrome da stress indotta nei mitili per accumulo di sostanze inquinanti presenti in mare. Questo approccio è stato poi esteso ad altri organismi, e ha portato all'identificazione di diversi parametri fisiologici, definiti, appunto, biomarker o indici di stress, (Moore, 1976; Bayne et al., 1979; Viarengo et Canesi, 1991; McCarthy et al., 1990; Depledge et Fossi, 1994, Viarengo et al., 2000). Un biomarker è un'alterazione a livello molecolare, cellulare o tissutale conseguente ad uno stato di stress (McCarthy et Shugart, 1990; Depledge et Fossi, 1994; Svendsen et al. 1996; Moore et al., 2004; Svendsen et al., 2004; Sforzini et al., 2011); è quindi un parametro biologico la cui variazione mette in evidenza uno stato di sofferenza o una risposta adattativa indotta dalle sostanze inquinanti presenti nell'ambiente e biodisponibili per l'organismo sentinella utilizzati nei programmi di biomonitoraggio. Un composto tossico xenobiotico può provocare una serie di alterazioni o danni a diversi livelli di complessità strutturale che vanno dal danno molecolare, fino ad alterazioni a livello di organismo, popolazione e comunità (Stebbing, 1985). La definizione

storica formulata dalla National Research Council (NRC, 1989) che descrive un biomarker come: “...quella variazione, indotta da un contaminante, a livello delle componenti biochimiche o cellulari di un processo, di una struttura o di una funzione, che può essere misurata in un sistema biologico”. Il concetto di biomarker si è però evoluto notevolmente in questi ultimi anni assumendo una valenza sempre più ampia. Depledge (1994), in accordo con la National Academy of Science, definisce come biomarker “quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo (individuo o popolazione) che dà evidenza di esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti (e/o radiazioni).”

Al fine di analizzare la misura dei disturbi di un sistema biologico è fondamentale l'integrazione dei biomarker a diversi livelli di organizzazione biologica (Bayne et al., 1985; McCarthy et Munkittrick, 1996; Attrill et Depledge, 1997; Allen et Moore, 2004; Broeg et al., 2005). La tossicità primaria di un contaminante si esercita, in linea generale, a livello biochimico molecolare (modificazioni di attività enzimatiche, alterazioni a livello del DNA, ecc.), e solo successivamente gli effetti si possono riscontrare, con un meccanismo a cascata, ai livelli successivi dell'organizzazione biologica, ossia dall'organello, cellula, tessuto, organismo, fino a giungere a livello di popolazione, comunità ed ecosistema. Ognuna delle risposte biochimiche e fisiologiche dell'organismo alle sostanze tossiche può essere definita come biomarker (Depledge, 1989).

In funzione del livello biologico della risposta, i biomarker di stress possono essere, quindi, suddivisi come in Fig. 6

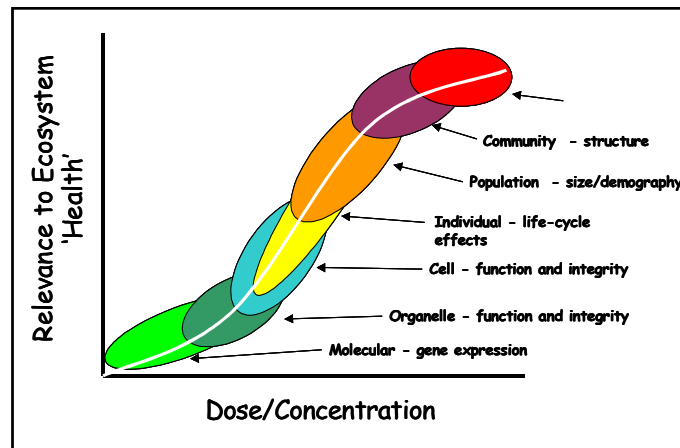


Fig. 6. Diversi livelli di organizzazione biologica che corrispondono a diversi livelli di risposta biologica ai contaminanti (Spurgeon et al., 2002).

Il ruolo dei biomarker nelle indagini ecotossicologiche non è, quindi, quello di dare informazioni quantitative sui livelli di esposizione di un organismo ad un determinato contaminante, ma è piuttosto quello di fornire indicazioni sul suo stato di salute, come segnale di rischio di alterazioni ai più alti livelli ecologici (Peakall et Shugart, 1993; Fossi et Leonzio, 1994; Fossi et al., 2007). Le caratteristiche principali dei biomarker sono: la sensibilità allo stress a livello sub-letale, la capacità di fornire risposte precoci agli effetti tossici da parte di agenti chimici sugli organismi; inoltre permettono di valutare il danno a livello cellulare e tissutale. Tali parametri possono fornire indicazioni a livello di organismo, incluse la capacità di sopravvivenza e le loro performance riproduttive. Inoltre, i biomarker forniscono un quadro completo della risposta biologica allo stress generato dagli effetti della miscela di contaminanti. In sintesi l'utilizzo di biomarker permette di considerare le diverse vie di assunzione ed il possibile destino di un contaminante nell'organismo mettendo in evidenza le alterazioni e danni a diversi livelli di complessità biologica e nello specifico dà la possibilità

di identificare il bersaglio primario dell'azione del contaminante e quindi studiare le risposte biologiche adattative.

I biomarker possono essere di effetto o di esposizione (Peakall et Shugart, 1993; Moore, 1985; Bayne et al., 1986), i primi indicano l'effetto di un composto tossico o di una miscela non correlato in maniera specifica ad un fattore di stress (ad esempio la stabilità delle membrane lisosomiali, l'accumulo di lipidi neutri e lipofuscine); i secondi includono le alterazioni, a diversi livelli di complessità strutturale, correlate in maniera specifica a fattori di stress o classi di inquinanti. Tra i biomarker di stress possiamo ricordare la stabilità della membrana lisosomiale, tra i più sensibili agli effetti dei contaminanti. I lisosomi sono organelli subcellulari circondati da una membrana semipermeabile che contiene numerosi enzimi idrolitici coinvolti in una serie di processi cellulari tra cui la digestione, e la difesa cellulare (Moore, 1976; Pipe, 1993; Ferreira et Dolder, 2003). In condizioni di attività catabolica avanzata si può verificare danno all'apparato lisosomiale, che vede come un ultimo effetto, la fuoriuscita di idrolasi acide nel citosol, ciò porta ad un grave danno che può spingersi fino alla morte cellulare (Koehler et al., 2002). La stabilità delle membrane lisosomiali è ampiamente utilizzato ed è in grado di evidenziare gli effetti di basse concentrazioni di xenobiotici organici e di metalli pesanti (Moore, 1985; Viarengo, 1989). Un altro biomarker altamente sensibile allo stress ambientale è la valutazione della funzionalità della Ca^{2+} -ATPasi, questo parametro è di particolare interesse considerato che una grande varietà di funzioni cellulari dipende dalla concentrazione del calcio libero citosolico [Ca^{2+}] (Rasmussen et Barret, 1984; Van Os, 1987). Grande rilevanza ha lo studio dei biomarker di stress ossidativo, infatti gli effetti tossici di alcune sostanze inquinanti spesso dipendono dalla loro capacità di aumentare i livelli cellulari di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Ciò può accadere sia con l'attivazione di processi che portano alla loro sintesi o indirettamente agendo sugli enzimi (tra cui la superossidodismutasi, catalasi, ecc.) e scavengers (sia idrofili come

GSH, ascorbato e MT, così come lipofili come la vitamina E e carotenoidi), e riducendo così le difese cellulari. Quando i livelli di ROS superano le difese antiossidanti, le cellule vanno incontro a stress ossidativo che causa, tra l'altro, perossidazione delle membrane lipoproteiche (Viarengo, 1989). I prodotti finali della perossidazione sono accumulati nei lisosomi come granuli insolubili contenenti pigmenti autofluorescenti che sono definite lipofuscine. La maggior parte dei granuli di lipofuscina è costituito da proteine modificate e prodotti della degradazione dei lipidi, insieme a carboidrati e metalli (George et Viarengo, 1985; Viarengo et Nott, 1993; Terman et Brunk, 2004). L'accumulo di questi pigmenti nel lisosoma rappresenta un'indicazione del livello di stress ossidativo nelle cellule ed è relativo al livello di perossidazione della membrana lipidica (Viarengo et Nott, 1993; Moore et Allen, 2002; Bocchetti et al., 2006; Viarengo et al., 2007), e il loro accumulo è facilmente rilevabile nelle cellule. Come già detto esistono altri biomarker atti a valutare lo stress ossidativo indotto dalle diverse sostanze inquinanti, il principio alla base della maggior parte di questi saggi è legato alla variazione dell'attività del sistema di difesa dai ROS. L'attività di catalasi, superossido dismutasi (SOD) e l'attività delle GSH transferasi (GST) risultano spesso modificate in risposta allo stress ossidativo cellulare (Viarengo et al., 1988; Orbea et al., 2002; Regoli et al., 2002; Geret et al., 2003; Orbea et Cajaraville, 2006). In particolare la valutazione delle catalasi e dell'attività della GST, sono facilmente effettuate mediante analisi enzimatiche (Romeo et al., 2000; Romeo et al., 2003(a),(b)). Queste analisi biochimiche sono ritenute essere adatte per monitorare gli effetti degli inquinanti sugli organismi sentinella; tuttavia è da ricordare che la risposta enzima mostra un andamento a campana che può fornire risultati falso-negativi (Dondero et al., 2006(a); Almeida et al., 2010); per questo motivo , i saggi enzimatici devono sempre essere utilizzati in associazione con altri biomarker quali ad esempio la stabilità della membrana lisosomiale e accumulo lisosomiale di lipofuscine e cioè biomarker che mostrano un trend sempre ascendente o discendente, per interpretare

correttamente il “significato fisiologico” dei cambiamenti osservati nell’attività enzimatica antiossidante. Allo stesso modo, la concentrazione di scavengers come GSH, può essere utilizzata come biomarker di stress ossidativo. In questo caso, una diminuzione della concentrazione di GSH è di solito associato a una maggiore quantità di processi di perossidazione nella membrana cellulare (Ziegler, 1985; Viarengo et al., 1990). Un altro biomarker di stress è l’accumulo lisosomiale di lipidi neutri, questo parametro mette in evidenza uno sbilanciato nel metabolismo degli acidi grassi e conseguente accumulo di lipidi neutri nel sistema lisosomiale vacuolare (Lüllman-Rauch, 1979). Il rapporto lisosomi/citoplasma è un parametro morfometrico che permette di valutare l’attività lisosomiale in base alle dimensioni di tali organuli rispetto al citoplasma cellulare. Le dimensioni dei lisosomi sono direttamente proporzionali all’attività lisosomiale, che come già detto è stimolata da numerosi inquinanti, e comporta processi autofagici, che, col tempo, portano ad una riduzione del citoplasma delle cellule e quindi ad una perdita della loro funzionalità (Moore et Viarengo, 1987; Cuervo, 2004; Marigómez et al., 2005; Viarengo et al., 2007; Moore et al., 2008). La dilatazione dei lisosomi è indotta dalla fusione delle vescicole di lisosomi primari con le vescicole citoplasmatiche, con conseguente formazione di lisosomi secondari di dimensioni maggiori. Nei lisosomi secondari le membrane risultano meno stabili e questo dato si correla ad una ridotta latenza degli enzimi lisosomiali, che si esplica in un aumento del catabolismo proteico nella cellula (Moore, 1985). Solo nel caso di cellule fortemente danneggiate si riscontra la perdita di enzimi idrolitici dei lisosomi nel citoplasma (Viarengo, 1985; Dondero et al., 2006(a)). Una importante categoria di biomarker è quella dei parametri che evidenziano genotossicità. Tra questi quelli più ampiamente usati nei programmi di biomanitoraggio sono il danno al DNA valutato mediante comet assay. Tale test permette di evidenziare alterazioni del DNA indotte da agenti chimici e fisici, evidenziando rotture del singolo e doppio filamento, basi alterate, cross-link DNA-DNA, e

DNA-proteina. Il danno al DNA può anche essere indotto indirettamente dall'interazione con radicali di ossigeno, o mediante l'azione di enzimi di riparazione (Eastman et Barry, 1992; Speit et Hartmann, 1995). La valutazione del danno cromosomico è valutata mediante il test dei micronuclei, che appaiono quando le cellule non riescono a includere cromosomi completi o frammenti di essi nei nuclei figli durante la divisione cellulare. I frammenti di cromosomi danneggiati sono invece inseriti in piccoli nuclei supplementari dove rimangono per tutto la vita della cellula. La presenza di micronuclei è un indicatore di rottura della cromatina che può essere causata da clastogeni, in ultima analisi, sono causati da composti tossici (Heddle et al., 1983; Carrano et Natarajan, 1988; Bolognesi et al., 1996, 1999; Hayashi et al., 1998; Bolognesi et al., 2004).

I biomarker di esposizione sono spesso utilizzati nei programmi di biomonitoraggio ambientale, tali parametri variano in seguito all'esposizione dell'organismo ad una specifica classe di inquinanti. Ad esempio le metallotionine (MT) sono proteine a basso peso molecolare ricche di gruppi -SH, con alta affinità per gli ioni metallici (Viarengo, 1989; Viarengo et al., 1999). Esse mostrano una particolare composizione aminoacidica caratterizzata da elevati livelli di cisteina (fino al 30% del contenuto totale di amminoacidi) e l'assenza di amminoacidi aromatici e istidina. Le metallotionine sono normalmente espresse in tessuti animali, e sono altamente sovraespresse in conseguenza all'esposizione a metalli pesanti (Bremner, 1987; Webb, 1987; Viarengo et al., 1999), la loro espressione nei tessuti è pertanto considerato un indicatore di contaminazione da metalli e ampiamente utilizzato nei programmi biomonitoraggio (Viarengo et al., 1999). Le colinesterasi (ChE) sono considerate enzimi ubiquitari la cui funzione fisiologica è rimuovere acetilcolina. L'aumento dell'uso di organofosfati (OP) e pesticidi carbammati (due classi di composti che sono inibitori noti di attività ChE anche a concentrazioni molto basse) ha posto il problema della possibile effetti di

questi composti neurotossici sulla fauna selvatica (Weiss, 1964; Bocquené et al., 1990; Sturm et al., 1999).

Benchè la batteria di biomarker sia molto ampia e in continua espansione è importante ricordare che un approccio che preveda l'utilizzo biomarker non sostituisce le strategie di controllo chimiche ed ecotossicologiche, ma le integra, fornendo un unico contributo nel determinare la tossicità delle sostanze inquinanti (Viarengo et al., 2007).

1.6. Gli organismi modello dei suoli

Tra i test ecotossicologici spesso utilizzati per valutare la qualità dei suoli, come già accennato, vi sono i vermi (Anellida, Oligochaete), essi, infatti, sono indicatori ideali per la valutazione degli effetti tossici di contaminanti presenti nella matrice suolo (Nahmani et al., 2007; Suthar et al., 2008). Questi invertebrati sono in diretto e costante contatto con il terreno attraverso le superfici corporee sia interne (mucosa intestinale) che esterne (epidermide) (Jager et al., 2003; Lanno et al., 2004). I vermi sono normalmente presenti nella maggior parte dei terreni in cui possono rappresentare il 60-80% della biomassa totale e per questa ragione risultano essere bioindicatori ottimali per la valutazione della qualità del suolo (Bouché, 1992). Inoltre, sono facilmente disponibili, sensibili alle sostanze tossiche, facilmente allevabili in condizioni controllate di laboratorio e con ciclo vitale sufficientemente breve.

Per queste loro caratteristiche, negli ultimi anni, si è consolidato l'utilizzo dei vermi oligocheti per valutare gli effetti di inquinanti presenti nel terreno (Goven et al., 1988; Spurgeon et al., 2003; Hendawi et al., 2004; Xiao et al. 2006; Li et al., 2009; Button et al., 2010).

Tra le diverse specie di vermi, l'OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) ed autorità a livello internazionale (ISO, EPA, etc.) hanno raccomandato l'utilizzo di *Eisenia andrei/foetida* (Oligochaete, Lumbricidae) quali organismi modello per la valutazione degli effetti tossici di contaminanti nei suoli. Conseguentemente sono stati sviluppati molti protocolli per valutare gli effetti delle sostanze chimiche su tali specie (ISO, 1993; U.S. EPA, 1991; OECD, 1984, 2004). In particolare *Eisenia fetida* ed *andrei* (Oligocheta, Lumbricidae) sono specie ampiamente utilizzate per effettuare test tossicità

(OECD, 1984; 2004; ISO, 2008) ed in studi di bioaccumulo ed ecotossicologici (Belfroid et al., 1993; van Gestel et al., 1993; Saint-Denis et al., 1998; Saxe et al., 2001).

Recentemente è stata sviluppata su *E. andrei* (Bouché, 1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) una batteria di biomarker in grado di evidenziare gli effetti tossici e genotossici indotti dai contaminanti ai diversi livelli di complessità funzionale (Scott-Fordsmand et Weeks, 2000; Spurgeon et al., 2002). Questi parametri fisiologici, valutati su diverse cellule e tessuti di tale organismo, si sono dimostrati utili ad evidenziare alterazioni provocate da sostanze tossiche alla fisiologia di *Eisenia andrei* (Spurgeon et al., 1994; Svendsen and Weeks, 1997; Spurgeon et al., 2004; Svendsen et al., 2004; Van Gestel and Weeks, 2004; Caselli et al., 2006; Gastaldi et al. 2007; Sforzini et al., 2011; Sforzini et al. 2012).

1.6.1. Il verme terrestre *Eisenia andrei*

Esistono circa 15000 specie di anellidi ripartite in 4 classi. I policheti sono vermi bentonici acquatici; gli irudinei e oligocheti che comprendono i lombrichi (o vermi di terra), e sono frequentemente abbondanti nel terreno umido e nell'acqua dolce, benché molte specie siano anche marine. La quarta classe appartenente al phylum annelida sono i branchiobdellidi, sono simbionti sulle superfici corporee di gamberi dolciacquicoli. Tutti gli anellidi sono animali celomati a simmetria bilaterale e metamerici. La classe Oligochaeta (oligocheti) comprende circa 3000 specie. Gli oligocheti terrestri, o vermi terrestri, sono frequentemente abbondanti nel terreno umido, ricco di sostanza organica. La loro azione di scavo aiuta a modellare il terreno e migliora notevolmente l'accrescimento delle piante. Gli oligocheti hanno relativamente poche setole sulla superficie corporea, hanno un capo ridotto generalmente privo di appendici formato da un prostomio e da un peristomio. Hanno anche una zona ghiandolare cospicua, detta clitello, formata dalla fusione di più metameri, atta a secernere bozzoli (o *cocoons*) per contenere e proteggere le uova. Il corpo degli anellidi è sostenuto in

gran parte dallo scheletro idrostatico, derivante dal fatto che il liquido celomantico è tenuto in pressione dalla parete del corpo. La parete corporea è costituita da una cuticola collagena, un'epidermide, e da due strati muscolari, circolari esterni e longitudinali interni. Negli oligocheti, tutti i metameri, fatta eccezione per il primo e l'ultimo, sono dotati di setole chitinose. Il movimento avviene per peristalsi. Contrazioni e rilassamenti ritmici della muscolatura della parete del corpo si propagano sotto forma di onde lungo tutto il corpo, con i muscoli longitudinali e quelli circolari agenti in ogni metamero in modo antagonistico. Nelle regioni del corpo in cui i muscoli si stanno contraendo il corpo si allunga e si assottiglia e i muscoli longitudinali rilassati si stirano; nello stesso tempo, le regioni in cui i muscoli longitudinali si stanno contraendo si accorciano e si ispessiscono, mentre i muscoli circolari rilassati si stirano. Il corpo del lombrico si sposta in avanti mentre l'onda di inspessimento del corpo si propaga all'indietro. Quando un lombrico scava una galleria lo slittamento all'indietro viene impedito dalla pressione dei metameri ispessiti contro la parete della galleria e dalle setole inserite nel terreno. Di conseguenza, soltanto i metameri situati nelle regioni sottili del verme avanzano realmente.

Il sistema digerente degli oligocheti consiste fondamentalmente di un tubo rettilineo diversamente specializzato, soprattutto nel primo tratto. I lombrichi sono consumatori non-selettivi di depositi. Dilatazioni e contrazioni alternate della faringe muscolosa di un lombrico pompano nella bocca una miscela di particelle inorganiche, vegetazione in decomposizione e sostanza animale, mentre il protostomio (primo segmento o segmento preorale), simile ad un labbro agisce come guida. Gli anellidi hanno tipicamente una faringe muscolosa la cui azione pompante succhia l'alimento attraverso una bocca anteriore convogliandolo nella cavità boccale e poi spingendolo nell'esofago; che nella porzione posteriore è spesso dotato di evaginazioni che formano un ingluvie in cui viene depositato il cibo. L'alimento può venire inumidito e rammollito con muco della faringe. I lombrichi e altri consumatori di depositi

hanno ghiandole calcifere (o organi di Morren), che eliminano il calcio in eccesso dal sangue (le diete dei consumatori di depositi sono frequentemente molto ricche di calcio) e lo secernono nell'esofago sottoforma di cristalli di carbonato di calcio. Alla fine, i cristalli vengono espulsi insieme alle feci. L'alimento che abbandona l'esofago entra nell'intestino dove avvengono la digestione e l'assorbimento. L'intestino si estende per circa l'80% della lunghezza del corpo del lombrico, assicurando una superficie digestiva-assorbente di area notevole. Il lombrico ha anche una profonda introflessione mediodorsale detta tiflosole (o typhlosolis), che estende l'area della superficie interna. Le cellule della mucosa intestinale producono enzimi digestivi che vengono rilasciati nel lume intestinale, facendo sì che la digestione avvenga extracellularmente; il cibo così digerito viene assorbito dalle cellule della parete intestinale e rilasciato nel sangue, mentre le frazioni non digerite vengono espulse attraverso l'ano. In molti oligocheti l'intestino è avvolto da tessuto cloragogeno. Questo tessuto svolge varie funzioni tra cui la sintesi di emoglobina; accumulo di nutrienti, prodotti di scarto del catabolismo cellulare, e di varie sostanze nocive. Inoltre partecipa all'omeostasi del sangue e del liquido celomatico; oltre che mantenimento del pH; per le sue funzioni caratteristiche viene sovente paragonato come funzioni al fegato dei vertebrati (Ireland et Richards, 1977; Prento, 1987; Morgan et Morgan, 1989).

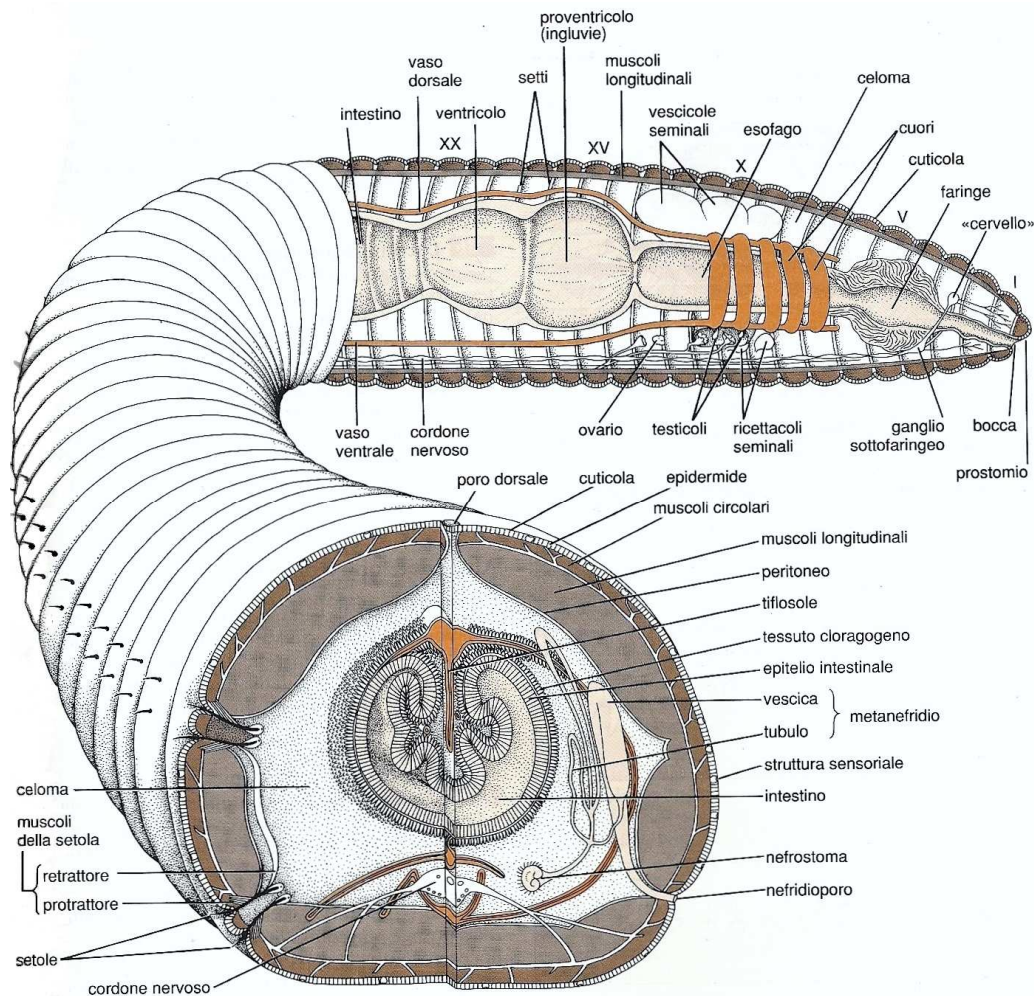


Fig.7. Anatomia di un lombrico. La vista longitudinale mostra le strutture anteriori; il canale alimentare e la parete del corpo sono tagliati secondo un piano mediano. La sezione trasversale mostra una sezione dell'intestino, della cavità celomatica e delle pareti del corpo (Mitchell et al., 1991).

In molti anellidi comprendenti nereis e i lombrichi il sangue fluisce attraverso una complicata rete di vasi e capillari che formano un apparato circolatorio chiuso. L'apparato circolatorio degli anellidi è importante negli scambi gassosi. Il sangue degli anellidi è un plasma relativamente limpido che può essere tinto di rosso da un tipo di emoglobina, pigmento che trasporta ossigeno. La maggior parte degli oligocheti possiede da due a cinque paia di cuori che garantiscono la circolazione del sangue tra la regione dorsale e quella ventrale. I lombrichi e altri anellidi privi di branchie si basano sulla diffusione attraverso l'intera superficie del corpo per la captazione di O_2 e l'eliminazione di CO_2 . Lo spessore totale della cuticola e dell'epidermide di un lombrico è circa $50 \mu m$ ma i capillari sanguigni

dell'epidermide penetrano fino a circa 30 μm dalla superficie. Perciò, l' O_2 deve diffondere solo per una breve distanza prima di entrare nel torrente circolatorio e viene trasportato a maggiore profondità nel corpo.

Come accennato in precedenza lo scheletro idrostatico degli oligocheti è costituito da liquido celomatico. Le cellule circolanti in questo liquido sono note come celomociti, la maggior parte delle quali è rappresentata da amebociti che svolgono importanti funzioni tra cui il trasporto e l'accumulo di sostanze nutritive, cicatrizzazione delle ferite, reazioni immunitarie, reazioni di difesa cellulare (fagocitosi) (Cooper, 1996; Adamowicz et Wojtaszek, 2001). Una frazione di cellule liberamente circolanti nel liquido celomatico è costituita da cloragociti, ossia cellule originatesi dal tessuto cloragogeno che, pare, si differenziano dalle cellule cloragogene e che partecipano ai processi immunitari (Valembois et al., 1982).

Gli anellidi, come molti altri animali, combinano il processo del osmoregolazione e quello dell'escrezione. Tipicamente l'apparato escretore/osmoregolatore è costituito da due metanefridi in ciascun metamero. Nella maggior parte dei policheti e degli oligocheti, un nefrostoma ciliato imbutiforme a un'estremità di ciascun tubulo metanefridiale sbocca nel celoma del metamero precedente. All'altra estremità del tubulo, un nefridioporo (o nefroporo o poro nefridiale) sbocca all'esterno. L'ammoniaca è il principale prodotto di rifiuto azotato nella maggior parte degli anellidi, ma le specie terrestri possono eliminare in prevalenza urea, meno tossica dell'ammoniaca e non deve essere altamente diluita. L'urea e l'ammoniaca vengono prodotte dal tessuto cloragogeno che, come il fegato dei vertebrati, sintetizza e immagazzina anche grassi e glicogeno.

Il sistema nervoso degli anellidi è cefalizzato e disposto metamericamente. I gangli cerebrali sono connessi a un cordone nervoso ventrale, provvisto di un paio di gangli per ogni metamero.

La maggior parte degli anellidi è molto sensibile agli stimoli chimici indicando che la chemiorecezione è una fonte particolarmente importante di informazioni ambientali. Gruppi di cellule sensoriali che sporgono attraverso la cuticola in alcuni lombrichi sono chemiorecettori, ma in molti anellidi non sono stati identificati chemiorecettori specifici.

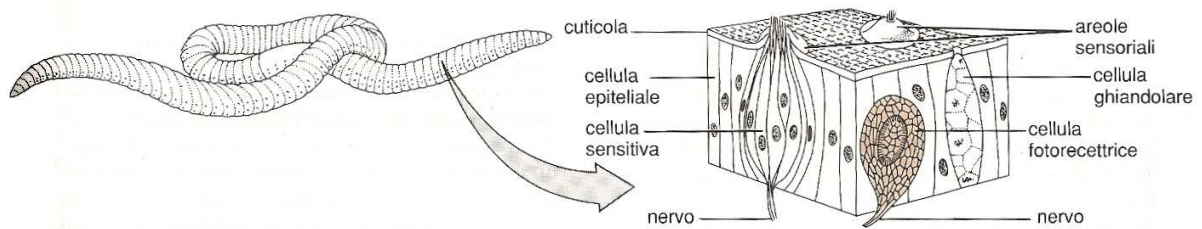


Fig. 8. Strutture sensoriali degli anellidi. Vista tridimensionale della cuticola e dell'epidermide di un verme. L'immagine mostra una cellula foto recettrice, un gruppo di cellule sensoriali e una cellula sensoriale (Mitchell et al., 1991).

Vivendo in gallerie oscure o nel fango del fondo di laghi e stagni la maggior parte degli oligocheti è priva di occhi distinti, ma ha cellule fotorectrici distribuite nell'epidermide. Tipicamente queste cellule sono concentrate all'estremità anteriore e posteriore del corpo. Nei lombrichi, i fotorecettori mediano l'attrazione verso la luce debole e la repulsione dalla luce intensa, ma sono incapaci di formare immagini. Gli anellidi hanno anche un tatto ben sviluppato, hanno molte terminazioni nervose libere sulla cuticola che svolgono, probabilmente, funzioni tattili.

Molti policheti e oligocheti si riproducono sia con mezzi sessuali sia con mezzi asessuali. Li irudinei hanno soltanto la riproduzione sessuale. A differenza della maggior parte dei policheti, gli oligocheti e gli irudinei sono ermafroditi e hanno gonadi soltanto in alcuni metameri, e la maggior parte delle specie copula. Nel lombrico ogni individuo ha sia un apparato riproduttore maschile sia uno femminile, situati ventralmente nei metameri IX–XV (Fig. 9).

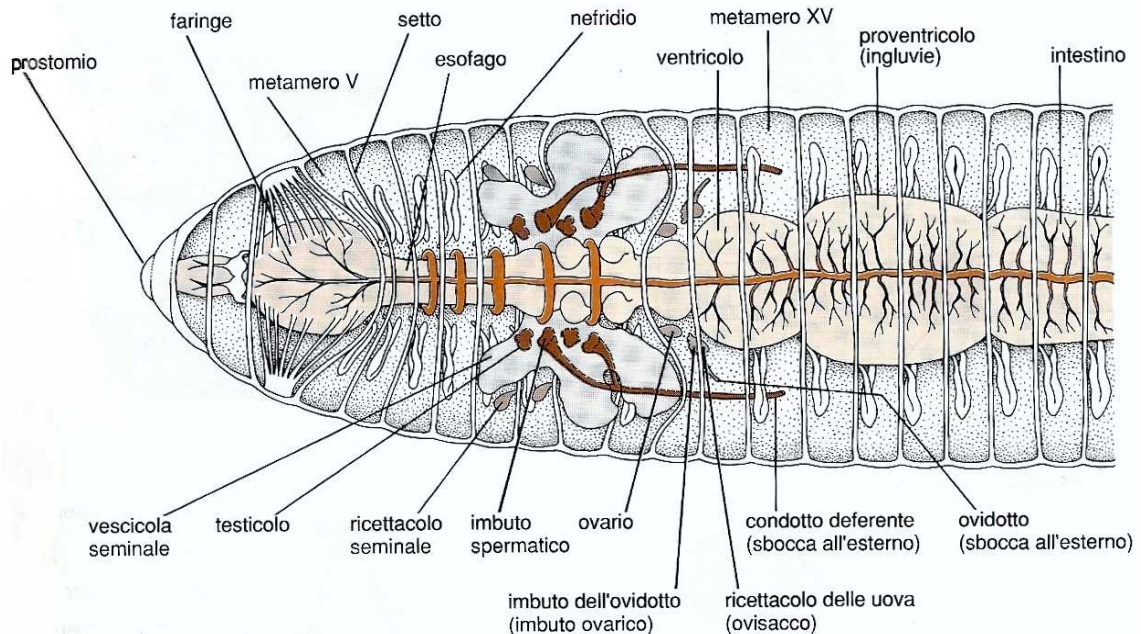


Fig. 9. Apparato riproduttore dei vermi terrestri. Le gonadi e le altre strutture riproduttrici sono situate nei metameri anteriori e qui sono presentate in relazione al canale alimentare, ai meta nefridi e ai setti intersegmentali (Mitchell et al., 1991).

L'apparato riproduttore maschile comprende due paia di testicoli, un paio in ciascuno dei metameri X–XI; due paia di imbuti spermatici connessi ad un condotto deferente che conduce a un poro genitale maschile sul metamero XV; due paia di vescicole seminali bulbose che avvolgono parzialmente l'esofago nei metameri IX–XIII e frequentemente avvolgono anche i testicoli e gli imbuti spermatici. Gli spermatozoi immaturi migrano dal testicolo e completano il differenziamento nelle vescicole seminali. Poi, durante la copulazione, gli spermatozoi maturi entrano negli imbuti spermatici e percorrono il condotto deferente raggiungendo il poro genitale maschile. L'apparato riproduttore femminile comprende un paio di ovari nel metamero XIII e immediatamente dietro ciascun ovario un imbuto dell'ovidotto, a cui è annesso un ricettacolo delle uova (o ovisacco). Un ovidotto conduce ad un poro genitale femminile sul metamero XIV. Durante la copulazione l'apparato riproduttore femminile riceve e immagazzina spermatozoi in due paia di ricettacoli seminali (o spermateche) situati nei metameri IX e X. In molti oligocheti i pori genitali maschili di un

verme giacciono contro gli orofizi dei ricettacoli seminali dell'altro, facilitando il trasferimento degli spermatozoi.

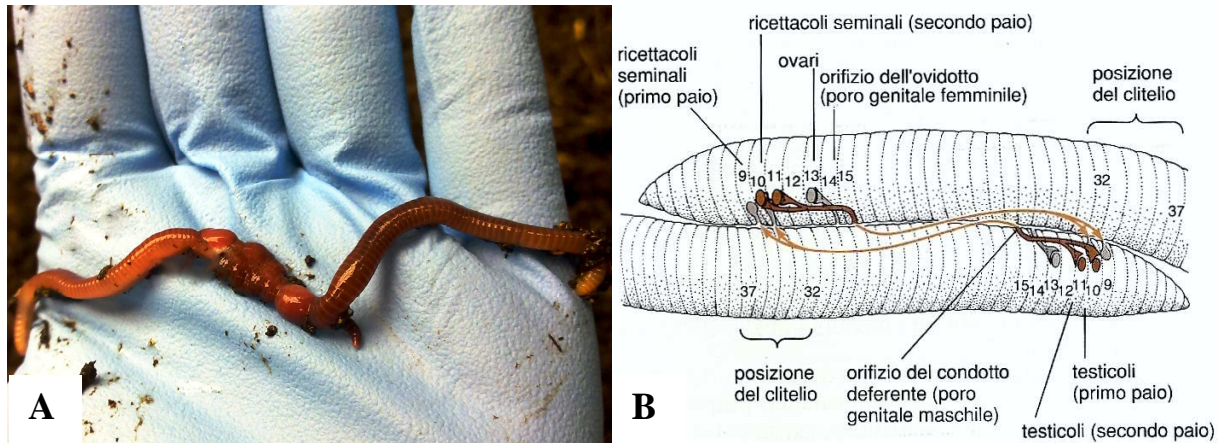


Fig. 10. Apparato riproduttore e copulazione dei lombrichi. L'immagine a) mostra due individui di *E. andrei* durante la copulazione. L'immagine b) mostra schematicamente il percorso degli spermatozoi durante l'accoppiamento (frece arancioni) (Mitchell et al., 1991).

Durante la copulazione i clitelli di entrambi i vermi si uniscono, aiutati dalle setole specializzate. I due sono uniti l'uno all'altro da un "tubo di muco" secreto dal clitello. Le cellule che costituiscono il clitello hanno diverse funzioni, e sono responsabili della secrezione delle diverse sostanze che prendono parte alla riproduzione, come la secrezione del muco che facilita la copula, la produzione di albumina e la sintesi del materiale che costituisce l'involucro dei *cocoons*.

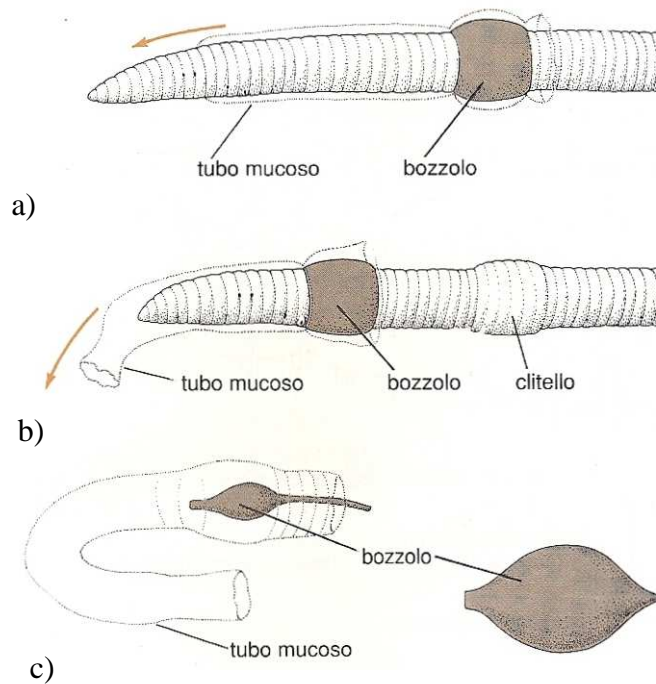


Fig. 11. Formazione del bozzolo dei lombrichi. a) Durante la produzione del bozzolo il clitello secerne un “tubo” mucoso, all’interno del quale vengono secrete le pareti del bozzolo. b) dopo che il clitello ha secreto le pareti del bozzolo e le sostanze nutritive necessarie allo sviluppo degli embrioni, il cocoon inizia a scorrere in avanti fino all’estremità anteriore del verme. Mentre il bozzolo passa sui pori genitali femminili e sugli orifici dei ricettacoli seminali, le uova e gli spermatozoi si depositano in esso. c) Quando il verme si ritrae dal bozzolo, questo si richiude alle due estremità. d) Immagine di cocoons di *E. andrei*.

Il tempo tra la deposizione e la schiusa dei bozzoli varia a seconda della specie e delle condizioni ambientali, ma dura da circa una settimana a qualche mese; in *Eisenia andrei* la schiusa delle uova avviene generalmente in circa quattro settimane, e in media ciascun cocoon contiene più individui.

2. Scopo del lavoro

Questa ricerca si propone di studiare alcuni aspetti degli effetti biologici provocati dal cromo esavalente (Cr(VI)) nel verme terrestre *Eisenia andrei*. E' importante infatti evidenziare che mentre ne sono note la tossicità e genotossicità e si discute ancora circa la cancerogenicità di tale contaminante nei vertebrati, in particolare nei mammiferi (Trzeciak et al., 2000; Danadevi et al., 2004; Lee et al., 2004), meno noti sono gli effetti del Cr(VI) sugli organismi edafici. Per poter meglio evidenziare gli effetti tossici e genotossici indotti da questo contaminante a differenti livelli di complessità funzionale, ossia dalle più sensibili risposte molecolari/cellulari a quelle di organismo è stata messa a punto un'ampia batteria di biomarker su *E. andrei*. Nella prima parte della ricerca è stato sviluppato un metodo citochimico su sezioni al criostato di tessuto fresco di *E. andrei* per valutare l'attività della Ca^{2+} -ATPasi in condizioni fisiologiche, ottimizzando diversi parametri tra cui temperatura, pH, forza ionica, specificità del substrato e la concentrazione ottimale di substrato e $[\text{Ca}^{2+}]$ citosolico. I risultati hanno evidenziato che l'attività enzimatica è chiaramente presente a livello della membrana plasmatica apicale delle cellule dell'intestino, ossia verso il lume intestinale. Un aspetto di particolare interesse e innovazione ha quindi riguardato lo sviluppo di una metodica immunoistochimica mediante l'utilizzo di anticorpi specifici per evidenziare la presenza della Ca^{2+} -ATPasi di plasmamembrana nelle cellule del tessuto intestinale dei vermi. I metodi citochimico e immunoistochimico sviluppati sono stati in seguito applicati su organismi esposti per 28 giorni a contaminanti sia inorganici (CrVI) che organici (B[a]P) mediante test con suolo artificiale (OECD, 2004).

Nella seconda parte della ricerca i vermi sono stati esposti a suolo standard artificiale contaminato con diverse concentrazioni di Cr(VI) per un periodo di 28 giorni. Al termine dell'incubazione è stata valutata una batteria di biomarker a diversi livelli di organizzazione biologica (quali stabilità delle membrane lisosomiali su celomociti, funzionalità della Ca^{2+} -ATPasi su cellule dell'epitelio intestinale, accumulo lisosomiale di lipofuscine, lipidi neutri e

rapporto lisosomi/citoplasma su cellule del tessuto cloragogeno) e di genotossicità (quali danno al DNA e frequenza dei micronuclei su celomociti). In questa fase oltre al Comet assay alcalino, normalmente utilizzato, è stato introdotto l'utilizzo di enzimi, quali endonucleasi III e formamido-pirimidin glicosilasi (Fpg), per valutare il danno ossidativo indotto sul DNA.

Al fine di evidenziare i primi effetti relativi al meccanismo di tossicità del Cr(VI) sui vermi si è deciso di utilizzare il filter paper test (OECD, 1984) a 1 e 3 giorni. Particolare rilevanza è stata data agli effetti tossici e genotossici provocati dall'inquinante sui celomociti ossia le cellule del liquido celomatico che rappresentano una componente fondamentale del sistema immunitario dei vermi.

Sui celomociti sono state messe a punto metodiche per individuare la presenza all'interno delle cellule di specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso l'utilizzo di sonde fluorescenti. Inoltre è stato messo a punto il metodo per la valutazione del contenuto lisosomiale di lipofuscine. Sono stati sviluppati anche due biomarker quali attività del lisozima e tasso di fagocitosi, per la valutazione dell'efficienza del sistema immunitario degli animali. Infine, è stato valutato il possibile danno dell'inquinante a livello delle membrane cellulari attraverso il dosaggio nel liquido extracellulare dell'enzima citosolico lattato deidrogenasi.

E' stata inoltre messa a punto una metodica che permette di valutare la funzionalità mitocondriale dei celomociti di *E. andrei* mediante l'utilizzo di una sonda fluorescente. Tale parametro implementa l'ampia batteria di biomarker sviluppata su queste cellule. Occorre ricordare che le cellule del liquido celomatico rivestono un ruolo molto importante nelle difese immunitarie dei vermi, ossia difesa antimicrobica, reazioni di incapsulamento, guarigione delle ferite, fagocitosi, meccanismi di difesa cellulare (Byzova, 1974; Cooper et Stein, 1981; Valembosis et al., 1982, 1992, 1994.; Cooper, 1996; Cossarizza et al., 1996;

Manerikar et al., 2008). L'attività dei mitocondri è stata valutata nei celomociti di vermi esposti 1 e 3 giorni a diverse concentrazioni di Cr(VI) mediante filter paper test.

Le metodiche sviluppate nelle diverse condizioni sperimentali di laboratorio sono state infine applicate in uno studio che prevedeva di valutare la potenziale tossicità di suoli di campo contaminati da cromo.

Parallelamente all'attività di ricerca descritta in precedenza si è collaborato alla messa a punto di una metodica immunoistochimica utilizzando anticorpi specifici anti-IPA e -diossine su sezioni di tessuto al criostato di *Eisenia andrei*. Le tecniche immunoistochimiche sviluppate hanno permesso la localizzazione di contaminanti biodisponibili all'interno di tessuti specifici, consentendo l'identificazione delle principali vie di assorbimento delle sostanze chimiche tossiche, nonché la loro destinazione in cellule/tessuti. Lo studio sulla localizzazione immunoistochimica è "Immunofluorescence detection and localization of B[a]P and TCDD in earthworm tissues" (Sforzini et al., 2014) in stampa sulla rivista scientifica Chemosphere (materiale riportato in allegato).

3. Materiali e metodi

Reagenti chimici

Sono stati utilizzati prodotti chimici di grado analitico acquistati da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), se non diversamente indicato.

Animali

Gli animali utilizzati per gli esperimenti, della specie *Eisenia andrei*, provengono da un allevamento allestito presso il nostro dipartimento seguendo le linee guida dell' OECD (1984, 2004). Per l'allevamento è stato utilizzato un substrato di torba e stallatico. La coltivazione è stata effettuata in una camera climatica a $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Gli animali sono stati nutriti settimanalmente con farina d'avena. Negli esperimenti vengono utilizzati individui adulti con clitello ben sviluppato, di dimensione e peso simile (da 400 a 500 mg) (Fig. 12).

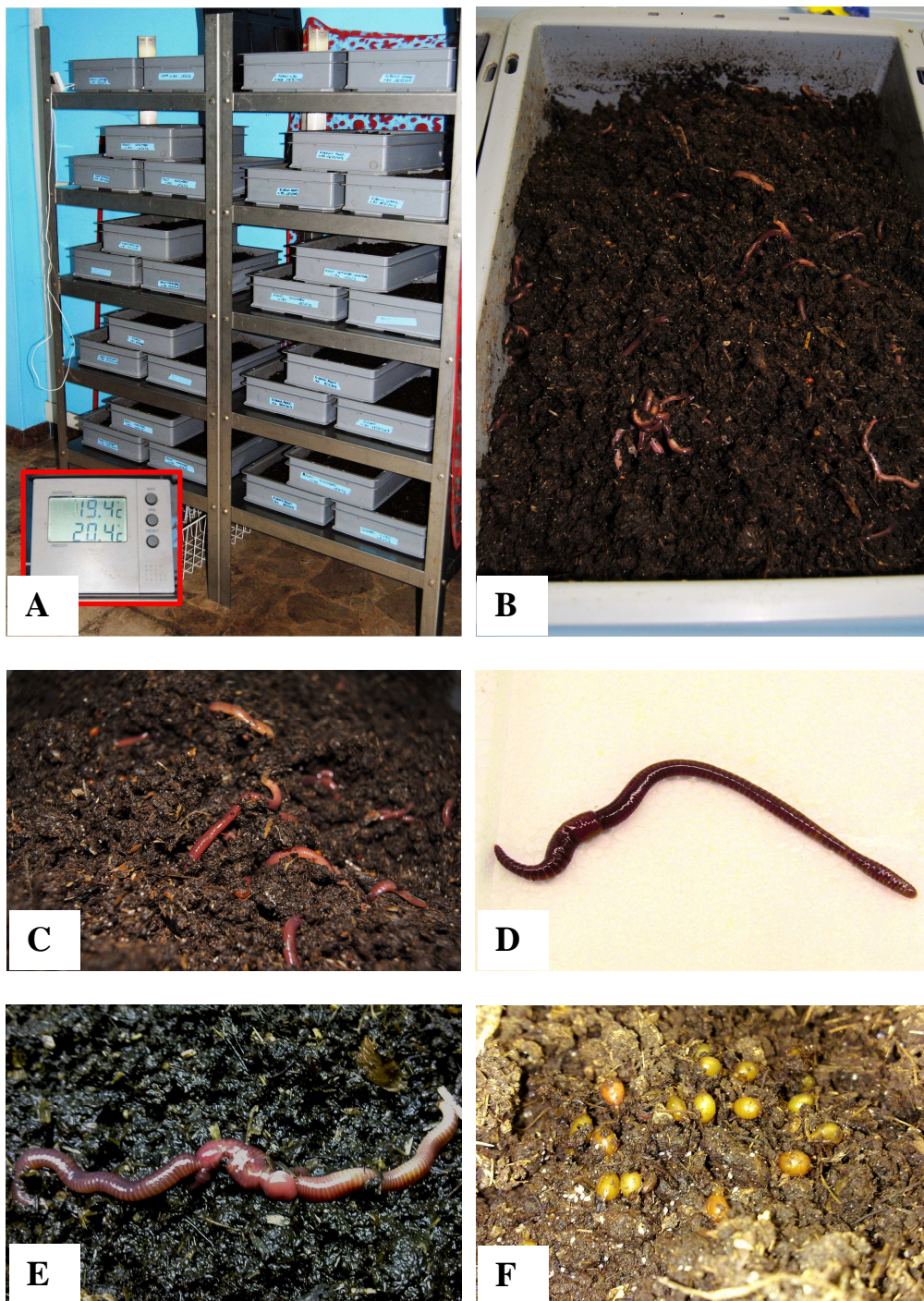


Fig. 12. Immagini rappresentative dell'allevamento di *E. andrei* in laboratorio. (A) Coltura mantenuta in condizioni controllate, (B) vaschette contenenti il substrato di crescita, (C) deggio individui nel mezzo di coltura. L'immagine (D) raffigura un individuo adulto, la freccia indica il clitello, nell'immagine (E) si possono osservare due individui adulti durante l'accoppiamento, infine nell'immagine (F) si possono osservare i *cocons*.

Paper contact toxicity test

Il filter paper test condotto su *E. andrei* è stato effettuato seguendo il metodo descritto nella linea guida OECD (1984). La soluzione di Cr(VI) è stata ottenuta sciogliendo dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) in acqua MilliQ in modo da ottenere le concentrazioni utilizzate nell'esperimento, ossia 2, 15, 30 $\mu\text{g/ml}$. Prima di essere esposti alla sostanza, i vermi sono stati posti per 3 h su carta da filtro umida per permettere l'eliminazione del contenuto intestinale. Gli animali sono stati quindi sciacquati con acqua deionizzata. 1 ml di ciascuna soluzione del contaminante è stato distribuito su carta da filtro (Whatman grade 1); dopo evaporazione del solvente, i filtri sono stati collocati su piastre Petri, e reidratati utilizzando 1 ml di Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS). Su ogni piastra è stato posto un solo animale. Le piastre sono state poste in una camera climatica ad una temperatura di $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Il test è stato condotto al buio e per un periodo di 1-3 giorni. Sono state effettuate almeno 4 repliche per trattamento. Gli animali sono stati pesati prima dell'inizio dell'incubazione ed alla fine degli esperimenti.

Test con suolo artificiale

Gli esperimenti condotti tramite incubazione di *E. andrei* in suolo standard artificiale trattato con la sostanza chimica in esame sono stati eseguiti seguendo il metodo descritto nella linea guida OECD (2004). Il benzo[*a*]pirene (B[*a*]P) e il dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$), sono stati disciolti in un piccolo volume di un opportuno solvente (rispettivamente dimetilsolfossido -DMSO- e acqua MilliQ). Le soluzioni sono state distribuite su una piccola quantità di sabbia di quarzo ultrafine. Dopo aver lasciato asciugare, la sabbia contaminata è stata miscelata con il suolo artificiale di composizione definita (10% torba di sfagno, 20% argilla caolinica, 70% sabbia di quarzo ultrafine) in modo da ottenere le concentrazioni finali di di B[*a*]P pari a 0,1, 10, 50 mg/kg, e di Cr(VI) pari a 1, 2, 15 mg/kg. Le concentrazioni 0,1 e

10 mg/Kg di B[a]P utilizzate rappresentano il limite di legge italiano per suoli residenziali e quello per suoli industriali, mentre 50 mg/Kg è pari a cinque volte il limite di legge per suoli industriali. Le concentrazioni utilizzate per il Cr(VI) sono state a partire dalla più bassa: metà della concentrazione ammessa dal limite di legge italiano per suoli residenziali, il limite di legge italiano per suoli residenziali, il limite di legge italiano per suoli industriali. I suoli sono stati umidificati con una quantità di acqua deionizzata pari a circa il 40% della massima capacità di ritenuta idrica e quindi, per ciascuna replica, sono stati incubati 12 vermi in 600 g di suolo posto in contenitori di vetro. Gli esperimenti riguardanti l'esposizione degli animali a ciascuna concentrazione dell'inquinante ed al suolo artificiale non contaminato (controllo) sono state eseguite almeno in 5 repliche. I contenitori sono stati posti in una camera climatica ad una temperatura di $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ed in condizioni costanti di umidità. I test sono stati effettuati secondo cicli di luce-buio (16 h luce e 8 h buio) e per un periodo di 28 giorni. Gli animali sono stati pesati prima dell'inizio dell'incubazione ed alla fine degli esperimenti. Al termine dei 28 giorni sono state contate le uova contenute in ciascuna vaschetta e sono state incubate per ulteriori 28 giorni nelle stesse condizioni. Sono stati quindi contati i piccoli nati durante tale periodo. In questo modo è stato possibile valutare il tasso di riproduzione degli organismi.

Test con suolo di campo

Per piano di campionamento in accordo con le procedure internazionali con le metodiche applicate dall'APAT, si è scelto di utilizzare un'unità fondamentale di campionamento costituita da cinque subcampioni, prelevati secondo standard ISPRA nei siti da analizzare. Tale metodica è volta a filtrare la variabilità delle concentrazioni alla scala del sub-campione. Circa 25 kg di suolo/sito è stato raccolto utilizzando una spatola di acciaio inossidabile a 0-20 cm ("top 30 soil") di profondità. Le cinque frazioni di suolo prelevate sono state omogeneizzate direttamente in situ tramite rimescolamento delle parti all'interno di un

contenitore in acciaio inossidabile, seguendo le direttive di APAT (2006). Successivamente, per garantire una completa essiccazione, i suoli sono stati distribuiti in appositi contenitori e conservati in locali allestiti a temperatura costante (27°C) e a ventilazione controllata per almeno una settimana. Infine, i campioni di suolo sono stati opportunamente vagliati a 2 mm (UNI 10802) per mezzo di una setacciatrice meccanica da laboratorio con matraccio conforme allo standard ISO. I campioni di suolo con pezzatura inferiore a 2mm è stato aliquotato in opportuni contenitori e stoccato a -20°C fino all'analisi. Prima dell'inizio dell'incubazione i suoli sono stati reidratati aggiungendo una quantità di acqua deionizzata pari a circa il 40% della massima capacità di ritenuta idrica di ciascun suolo (APAT 2002, 2006; OECD, 2004). Per ciascuna replica, sono stati incubati 10 vermi in 500 g di suolo posto in contenitori di vetro. Sono state utilizzate almeno cinque repliche per trattamento. I contenitori sono stati posti in una camera climatica ad una temperatura di $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Il test è stato effettuato secondo cicli controllati di luce-buio (16 h luce e 8 h buio) con illuminazione di 800 lux e per un periodo di 28 giorni. Gli animali sono stati pesati prima dell'inizio dell'incubazione ed alla fine degli esperimenti.

Preparazione dei tessuti per l'analisi citochimica/immunoistochimica

Ciascun individuo di *E.andrei* è stato tagliato posteriormente al clitello, in modo tale da ottenere delle sezioni trasversali di lunghezza di circa 5 mm da porre su apposito supporto in alluminio (chuck) per criostato. Successivamente il supporto con i frammenti viene posto per 40 s in un recipiente contenete N-esano, precedentemente raffreddato a -70 °C con azoto liquido. Il chuck è conservato a -65°C. Il congelamento con esano impedisce la formazione di cristalli di ghiaccio nel tessuto, evitando di conseguenza un eventuale danno strutturale ai componenti subcellulari. Al momento dell'analisi si procede al taglio per mezzo di un criostato CM3050 (LEICA) ad una temperatura di camera di -30°C, per ottenere sezioni di 10

μm di spessore. Le sezioni sono state quindi trasferite su vetrini tenuti a temperatura ambiente.

Attività della Ca^{2+} -ATPasi

Le sezioni trasversali di tessuto ($10\mu\text{m}$), ottenute al criostato come descritto in precedenza, sono state fissate in calcio-formolo per 15 min a 4°C , risciacquate in acqua MilliQ e poste nel mezzo contenente 0,5 M Tris - HCl, pH 7,4 , 250 μM ATP sale disodico, 500 nM CaCl_2 , 150 mM KCl, 8 mM levamisolo, 0,2 mM ouabaina, 3 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ed incubate a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ per 120 min. Come controllo negativo sono state utilizzate sezioni incubate in un mezzo privo di calcio contenente EGTA 2 mM.

Le sezioni sono state quindi risciacquate in PBS ed infine immerse in una soluzione di solfuro di ammonio al 2% per 3 min, è così ottenuto un precipitato marrone (solfuro di piombo) in corrispondenza dei siti di rilascio di $(\text{PO}_4)^{2-}$ da parte della Ca^{2+} -ATPasi. I vetrini sono stati sciacquati con PBS, lasciati asciugare, e montati con gelatina glicerinata. I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 200x utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in luce trasmessa; le immagini sono state analizzate mediante un sistema di analisi di immagine (ScionImage freeware) che ha permesso di quantificare che ha permesso di quantificare la quantità di precipitato, e quindi l'attività dell'enzima, nelle cellule dell'intestino degli organismi campionati.

Determinazione del contenuto di lipofuscine nei lisosomi

Il contenuto di lipofuscine è stato valutato utilizzando il metodo di Schmorl (Pearse, 1972; Moore, 1988). Le sezioni trasversali di tessuto ($10\mu\text{m}$), ottenute al criostato come descritto in precedenza, sono state fissate in calcio-formolo per 15 min a 4°C , risciacquate in acqua MilliQ e poste nel mezzo contenente cloruro di ferro 1% e potassio ferrocianuro 1% in rapporto

3:1 per 5 min. (Moore, 1988). Successivamente le sezioni sono state lavate in acido acetico all'1% per 1 min, risciacquate con acqua, e montate con gelatina glicerinata. Le sezioni così ottenute sono state osservate al microscopio ottico ed analizzate mediante un sistema d'analisi d'immagine per la determinazione del livello di colorazione dei lisosomi dovuta all'accumulo di lipofuscine.

Determinazione del contenuto di lipidi neutri nei lisosomi

Il contenuto lisosomiale di lipidi neutri è stato valutato mediante colorazione Oil red-O (ORO), come descritto da Moore (1985). Le sezioni trasversali di tessuto (10µm), ottenute al criostato come descritto in precedenza, sono state fissate in calcioformolo per 15 min a 4°C, risciacquate con acqua MilliQ, e incubate con trietilfosfato 60% (TEP) per 3 min. Successivamente le sezioni sono state colorate colorate con una soluzione di Oil red O 1% in trietilfosfato 60% a 20°C per 15 min, lavate in trietilfosfato 60% per 30 secondi, risciacquate con acqua deionizzata, fatte asciugare e montate con gelatina glicerinata (Moore, 1988). Le sezioni così ottenute sono state analizzate mediante un sistema d'analisi d'immagine al microscopio ottico per la quantificazione della colorazione dei lisosomi dovuta all'accumulo dei lipidi neutri.

Rapporto lisosomi/citoplasma

I lisosomi sono stati evidenziati nelle cellule mediante l'attività dell'enzima lisosomiale β -N-acetilesosaminidasi (NAH). Le sezioni trasversali di tessuto cloragogeno di 10µm, ottenute al criostato come descritto in precedenza, sono state incubate per 20 min a 37°C in una soluzione contenente naphthol-As-BI N-acetil Dglicosaminide (substrato per l'enzima lisosomiale), precedentemente disciolto in 2-metossietanolo, polipep e buffer Na-citrato (0.1M NaCl 2.5%, pH 4.5). I vetrini sono stati risciacquati con tampone sodio-fosfato (0.1M,

pH 7.4) per 2 min a 37°C, e quindi incubati al buio per 10 min a temperatura ambiente in una soluzione contenente il colorante Fast Violet B disciolto in tampone sodio-fosfato. I vetrini sono stati quindi lavati in acqua deionizzata per 5 min e infine montati con gelatina glicerinata. Le sezioni di tessuto sono state osservate utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) ad un ingrandimento di 400×, connesso ad una fotocamera digitale (Zeiss AxioCam). Le immagini ottenute sono state analizzate mediante un sistema di analisi d'immagine (Scion Image freeware), che ha permesso di determinare il rapporto lisosomi/citoplasma e che è stato espresso come variazione % rispetto ai controlli.

Estrusione dei celomociti

I celomociti sono stati ottenuti mediante metodo di estrusione proposto da Eyambe et al. (1991; e modificato da Fugère et al., 1996). I vermi sono stati lavati in una soluzione di NaCl (0.85 mg/ml) a 4°C, e massaggiati delicatamente per favorire l'esclusione del contenuto dell'ultima parte del lume intestinale. In ogni falcon sono stati posti due animali e addizionati 4 ml del mezzo di estrusione salino (EtOH 5%, EDTA 2.5 mg/ml, Guaiacol glycerol ether 10 mg/ml, NaOH 1N, pH 7.3) per 3 min. Alla sospensione contenente le cellule estruse sono stati aggiunti 2 ml di HBSS a 4°C. La sospensione è stata quindi centrifugata per 2 min a 150 g per eliminare muco e possibili rimanenze di terreno. Il surnatante è stato trasferito in falcon e centrifugato per 10 min a 150 g.

Stabilità delle membrane lisosomiali (SML)

La stabilità delle membrane lisosomiali dei celomociti è stata valutata utilizzando la metodica messa a punto da Sforzini et al. (2011). Il pellet ottenuto da ciascuna falcon è stato risospeso in un volume 1 ml. Su un vetrino polilisinato sono posti 40 µl di soluzione contenente celomociti; le cellule sono state lasciate aderire su vetrino per 15 min in camera umida alla

temperatura di $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono stati aggiunti 40 μl della soluzione di Neutral Red ottenuta diluendo 10 μl della soluzione madre di NR (20 mg di NR in 1 ml di DMSO) in 990 μl di HBSS (prodotto Sigma: H8264). Dopo l'incubazione in camera umida al buio per 5 min a $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, l'eccesso di colorante è stato eliminato e le cellule sono state risciacquate con HBSS. La ritenzione del Neutral Red nei lisosomi (NRRT) è stata valutata al tempo 1 h. I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 630 \times utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: rodamina). Le immagini sono state analizzate utilizzando un sistema di analisi d'immagine che ha permesso di quantificare il rilascio del neutral red dai lisosomi, che è stato espresso come variazione % di intensità di fluorescenza rispetto ai controlli.

Funzionalità mitocondriale dei celomociti

Il pellet ottenuto da ciascuna falcon è stato risospeso in un volume 1 ml. Su un vetrino polilisinato (3 μl di soluzione 1:10 w:v) sono stati posti 40 μl di sospensione contenente i celomociti; le cellule sono state lasciate aderire sul vetrino per 15 min in camera umida alla temperatura di $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono stati aggiunti 40 μl della soluzione della sonda fluorescente MitoTracker (1:20.000). Dopo l'incubazione in camera umida al buio per 30 min a $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, l'eccesso di sonda è stato eliminato e le cellule sono state risciacquate con HBSS. I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 630 \times utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: FITC). Le immagini sono state analizzate utilizzando un sistema di analisi d'immagine che ha permesso di quantificare il livello di fluorescenza cellulare relativo alla funzionalità mitocondriale.

Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Le specie reattive dell'ossigeno (anione superossido O_2^- , perossido d'idrogeno H_2O_2 , radicale idrossidrilico $\bullet OH$), come noto, sono in grado di produrre danni ossidativi a macromolecole quali proteine, acidi nucleici e lipidi, e possono provocare danni a diversi organelli cellulari (Sabatini et al., 2009). Su un vetrino polilisinato sono posti 40 μl di soluzione contenente celomociti; le cellule sono state lasciate aderire su vetrino per 15 min in camera umida alla temperatura di $20^\circ \pm 1^\circ C$. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono stati aggiunti 40 μl della soluzione delle sonde (TEMPO specifica per la rilevazione dei radicali idrossile e superossido -diluizione 1:500; Dihydrorhodamina in grado di evidenziare la generazione di perossido di idrogeno e perossinitrito -diluizione 1:1000). Dopo l'incubazione in camera umida al buio per 10 min a $20^\circ \pm 1^\circ C$, l'eccesso di sonda è stato eliminato e le cellule sono state risciacquate con HBSS. I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 630 \times utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: FITC). Le immagini sono state analizzate utilizzando un sistema di analisi d'immagine che ha permesso di quantificare il livello di fluorescenza cellulare.

Determinazione della formazione di lipoperossidi

Su un vetrino polilisinato sono posti 40 μl di soluzione contenente celomociti; le cellule sono state lasciate aderire su vetrino per 15 min in camera umida alla temperatura di $20^\circ \pm 1^\circ C$. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono stati aggiunti 40 μl della soluzione della sonda BODIPY specifica per lipoperossidi (diluizione 1:1000). Dopo l'incubazione in camera umida al buio per 10 min a $20^\circ \pm 1^\circ C$, l'eccesso di sonda è stato eliminato e le cellule sono state risciacquate con HBSS. I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 630 \times utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: FITC).

Le immagini sono state analizzate utilizzando un sistema di analisi d'immagine che ha permesso di quantificare il livello di fluorescenza cellulare.

Determinazione del contenuto di lipofuscine nei celomociti

Su un vetrino polilisinato sono stati posti 40 μ l di soluzione contenente celomociti (estrusi come descritto in precedenza); le cellule sono state lasciate aderire su vetrino per 15 min in camera umida alla temperatura di $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, le cellule sono state fissate in calcio-formolo per 10 min a 4°C , risciacquate in acqua MilliQ e poste nel mezzo contenente cloruro di ferro 1% e potassio ferrocianuro 1% in rapporto 3:1 per 5 min. (Moore, 1988). Successivamente i vetrini sono stati lavati in acido acetico all'1% per 30 s, risciacquati con acqua, e montate con gelatina glicerinata. Le sezioni così ottenute sono state analizzate mediante un sistema d'analisi d'immagine al microscopio ottico per la determinazione della percentuale di colorazione dei lisosomi dovuta all'accumulo di lipofuscine.

Accumulo lisosomiale di proteine

Su un vetrino polilisinato sono stati posti 40 μ l di soluzione contenente celomociti (estrusi come descritto in precedenza); le cellule sono state lasciate aderire su vetrino per 15 min in camera umida alla temperatura di $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dopo aver eliminato il liquido in eccesso, sono stati aggiunti 40 μ l della soluzione contenente la fluoresceina isotiocianato diacetato (FITC) (Sigma Aldrich) 30 μ g/ml in HBSS per 30 min a $20^{\circ} + 1^{\circ}\text{C}$. I vetrini sono stati osservati al tempo zero, ossia dopo l'incubazione e dopo 4 ore Dopo l'incubazione in camera umida al buio per 10 min a $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, l'eccesso di sonda è stato eliminato e le cellule sono state risciacquate con HBSS. I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 630 \times utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: FITC).

Le immagini sono state analizzate utilizzando un sistema di analisi d'immagine che ha permesso di quantificare il livello di fluorescenza cellulare.

Tasso di fagocitosi

Il pellet di celomociti, ottenuto come descritto in precedenza, è stato risospeso in un volume finale di 1 ml di liquido celomatico a cui sono stati aggiunti 10 μ L di *Escherichia coli* coniugata con BODIPY. Le falcon così preparate sono state incubate in termoincubatore a $20^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C per 3 h mantenendole in agitazione. Al termine dell'incubazione si effettua una centrifugata per 5' a 150 g e il pellet ottenuto viene fissato in metanolo per 20 min. Al termine della fissazione le cellule sono state gocciate su vetrino e si lascia asciugare al buio. I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 630 \times utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtro di emissione: FITC). Le immagini sono state analizzate utilizzando un sistema di analisi d'immagine che ha permesso di valutare la quantità di particelle fagocitate/numero di cellule.

Attività del lisozima

Per effettuare il dosaggio del lisozima sono state estruse le cellule da 4 animali. Sono state prelevati 4 ml di liquido celomatico dal sovrinatante della seconda centrifugata a 150 g per 10 min. Il liquido celomatico è stato agitato, e addizionato con 1 mg/ml di RNA quale coprecipitante (da soluzione madre di 10 mg/ml, stoccata a -20° C). Sono stati aggiunti 8 volumi di etanolo (-20° C). I campioni sono stati agitati e lasciati in incubazione per 1 h a -20° C. Successivamente i campioni sono stati centrifugati a 10000 g per 15 min a 4° C. Dopo aver eliminato il sovrinatante e aver lasciato asciugare il pellet per 30 min a temperatura ambiente, quest'ultimo è stato risospeso in 500 μ l di HBSS per ml di campione di partenza. Le letture allo spettrofotometro sono state effettuate alla lunghezza d'onda di 450 nm; quale bianco è stato utilizzato tampone fosfato come descritto da Chu and La Peyre (1989; Canesi et

al., 2003). Un'unità di attività enzimatica viene stimata come l'attività richiesta per determinare una diminuzione di O. D. (densità ottica) pari a 0,1% per minuto a 450 nm.

Determinazione della lattato deidrogenasi (LDH)

La LDH è stata determinata su campioni di liquido celomatico di *Eisenia andrei* utilizzando il Citotoxicity Detection Kit (LDH), La Roche. Ogni campione di liquido celomatico è stato ottenuto dall'estrusione tramite etanolo (Eyambe et al., 1991) di due animali, senza l'aggiunta finale di HBSS. Il Citotoxicity Detection Kit è un test colorimetrico basato sulla misurazione dell'attività della lattato deidrogenasi (LDH). La LDH è un enzima intracellulare che catalizza l'ossidazione reversibile dell'acido lattico ad acido piruvico, è uno dei più importanti marker proteici nel liquido extracellulare poiché la sua concentrazione varia in risposta a numerosi tipi di stress, in quanto le cellule danneggiate rilasciano l'enzima. Il kit contiene due soluzioni, la prima, il catalizzatore, è costituita da diaforasi/ NAD^+ e la seconda, il colorante, da cloruro di iodotetrazolio (INT) e lattato di sodio. Nel primo step della reazione, il rilascio della LDH dal campione riduce il NAD^+ a $\text{NADH}+\text{H}^+$ attraverso l'ossidazione del lattato a piruvato. Nel secondo step, 2 H^+ vengono trasferiti da $\text{NADH}+\text{H}^+$ al sale di tetrazolio (giallo) da un catalizzatore, con produzione di sale di formazano (rosso). Un incremento nel numero di cellule con membrana plasmatica danneggiata, si traduce in un aumento dell'attività della LDH nel liquido celomatico. L'incremento dell'attività è direttamente correlato con l'aumento di formazano prodotto nell'ultimo step della reazione, perciò l'aumento di colore rilevato è proporzionale al numero di cellule danneggiate. Per la reazione, 100 μl di reattivo (di cui la soluzione colorante deve essere 45 volte più concentrata del catalizzatore) sono stati aggiunti a 100 μl di campione, su piastra 96-well microplates, mantenuta a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ al buio. La lettura viene effettuata dopo 2 ore di reazione a 492 nm con Plate Reader.

Biomarker di genotossicità

Esistono vari livelli di interazione e danno a carico del genoma da parte delle sostanze chimiche. Si può quindi parlare di sostanze mutagene, cancerogene, teratogene; parallelamente il danno può esplicarsi a vari livelli quali i filamenti DNA e/o cromosomi. Il danno può essere provocato direttamente dai composti chimici, ma anche dai loro intermedi o dalle specie reattive dell'ossigeno che si originano durante le fasi metaboliche e i tentativi di detossificazione. Le lesioni possono essere riparate con efficienza e con tempi diversi a seconda del grado di specializzazione degli organismi coinvolti. Le alterazioni del DNA che non vengono riparate, o non vengono riparate correttamente, portano al persistere del danno sul genoma. I biomarker di genotossicità devono essere parte integrante della batteria di indicatori studiati, anche considerando che l'esposizione agli agenti genotossici può esercitare un danno sui gameti che può risultare evidente nella generazione successiva. Il danno cromosomico espresso dopo la replicazione cellulare rappresenta un effetto cumulativo associato con l'esposizione a lungo termine a situazioni genotossiche (Dixon et al., 2002; Magni et al., 2006).

Comet assay in soluzione alcalina: metodo “standard” e con enzimi (ENDOIII e Fpg)

I celomociti, ottenuti come descritto in precedenza, sono stati miscelati a low melting point agarose (LMA) a 37°C e quindi posti su vetrini precedentemente preparati con normal melting agarose (NMA). I vetrini sono stati posti per 5 min a 4°C in modo da permettere la solidificare dell'agarosio ed è stato quindi aggiunto uno strato finale di LMA. I vetrini sono stati incubati in una soluzione di lisi per 1 h (NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM, TRIS base 10 mM; TRITON X-100 1%; pH 10) a 4°C ed in seguito immersi in un buffer alcalino (300 mM

NaOH; 1 mM EDTA) (pH > 13) per 20 min a temperatura ambiente. L'elettroforesi è stata effettuata nello stesso buffer alcalino a 4°C la corsa è stata effettuata a 300mA per 10 min. Dopo l'elettroforesi, i vetrini sono stati sciacquati con PBS e fissati in etanolo (70%) per 5 min e quindi colorati con DAPI (1:30000). I vetrini sono stati osservati con un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza ad un ingrandimento di 400×. Per ciascun campione, sono state esaminate 100 cellule e le immagini acquisite sono state analizzate utilizzando il software di analisi d'immagine Comet Score freeware (TriTek Comet Score™). Il programma fornisce numerosi parametri e quello preso in considerazione nelle nostre analisi è il contenuto % di DNA nella coda.

Una versione del Comet assay modificata per rilevare il danno ossidativo al DNA è stata messa a punto da Collins et al. (1993) e si avvale di enzimi quali formamido-pirimidin glicosilasi (Fpg) ed endonucleasi III. L'Fpg riconosce specificamente e sottopone a clivaggio le basi puriniche ossidate del DNA, in particolare le 8-oxoguanine, producendo siti apurinici (Dušinská & Collins, 1996). Questi a loro volta sono convertiti in rotture del filamento, grazie all'attività endonucleasica associata all'enzima. La endonucleasi III converte in rotture del filamento i siti in cui sono presenti pirimidine ossidate (Collins et al., 1993).

La procedura di esecuzione del Comet assay modificato mediante l'uso dell'enzima Fpg è del tutto analoga a quella del test convenzionale, con l'unica differenza che la migrazione elettroforetica del lisato è preceduta dall'incubazione di quest'ultimo con l'enzima in oggetto. In particolare, la metodica messa a punto sulle cellule di *E. andrei* ha previsto l'incubazione delle cellule con EndoIII (diluizione 1/1500) per 30' mentre con Fpg (diluizione 1/4000) per 15'. Il numero di frammenti prodotti dal trattamento enzimatico risulta direttamente proporzionale al danno ossidativo al DNA, mentre le loro dimensioni sono inversamente proporzionali a quest'ultimo.

Il Comet assay è di rapida esecuzione, di relativamente semplice allestimento e richiede quantità ridotte di cellule (Kiskinis et al., 2002). Inoltre la sensibilità di tale test è considerata molto elevata (Tice et al., 2000; Grandi et al., 2006).

Test dei micronuclei

Il test dei micronuclei è una tecnica utilizzata per valutare gli effetti genotossici causati da fattori di stress ambientali. I micronuclei appaiono quando le cellule non riescono a includere interi cromosomi o parti di essi all'interno delle cellule figlie durante la divisione cellulare; queste frazioni di DNA rimangono isolate dal nucleo principale formando piccoli nuclei supplementari (Fenech, 2000; Viarengo et al., 2007). I celomociti, ottenuti come descritto in precedenza, sono stati fissati in metanolo per 20 min. Le cellule sono state gocciate su vetrini, che una volta asciutti sono stati per 3 min con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole), un fluorocromo specifico per il DNA, e montati con montante adatto alla fluorescenza contenente glicerolo e mowiol in Tris buffer. Per ciascun campione sono state analizzate almeno 2000 cellule con citoplasma integro e ben visibile, utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza ad un ingrandimento di 400-630×. I MNi sono stati identificati secondo criteri standardizzati a livello internazionale (Fenech, 2000). I MNi sono definiti come piccole strutture rotonde con dimensioni inferiori ad un terzo del diametro del nucleo principale. I MNi per essere identificati come tali devono avere colorazione analoga al nucleo principale, essere sullo stesso piano focale del nucleo, da cui devono essere nettamente separati.

Immunoistochimica

Sezioni trasversali di tessuto (10 μ m), ottenute al criostato come descritto in precedenza, sono state fissate in paraformaldeide al 4% per 20 min a temperatura ambiente e quindi incubate in una soluzione di permeabilizzazione e blocking (Triton X-100 0.5%, BSA 2% in PBS) per 1 h a temperatura ambiente. Successivamente è stato applicato l'anticorpo primario anti-PMCA ATPase (mouse monoclonal) opportunamente diluito in una soluzione di BSA 1% e Triton X-100 0.05% in PBS overnight a 4°C. In seguito, dopo aver effettuato tre lavaggi con PBS, è stato applicato l'anticorpo secondario (goat to mouse, DyLight) diluito in BSA 1% e Triton X-100 0.05% in PBS per 1 h al buio a temperatura ambiente. Per verificare l'assenza di colorazioni aspecifiche, sezioni di controllo sono state incubate sia con il solo anticorpo primario e sia con il solo anticorpo secondario. Le sezioni sono state lavate tre volte con PBS e infine sono stati colorate per 3 min con DAPI (1:30000). I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di 400 \times utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtri di emissione: rodamina, DAPI).

Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati condotti in almeno 5 repliche e l'analisi statistica dei dati è stata eseguita mediante il test nonn parametrico Mann-Whitney *U* test.

4. Risultati

4.1. Messa a punto di un metodo istochimico per valutare l'attività della Ca^{2+} -ATPasi delle cellule del tessuto intestinale di *Eisenia andrei*.

Questo studio si propone di implementare la batteria di biomarker esistenti nell'organismo modello *E. andrei*, mettendo a punto una nuova metodica che permetta di valutare l'attività della Ca^{2+} -ATPasi in condizioni "fisiologiche". Tale parametro è di particolare interesse considerato che una grande varietà di funzioni cellulari dipende dalla concentrazione del calcio libero citosolico $[\text{Ca}^{2+}]$ (Rasmussen et Barret, 1984; Van Os, 1987). In condizioni fisiologiche, il $[\text{Ca}^{2+}]$ citosolico è mantenuto a basse concentrazioni (intorno 10^{-7}M) da sistemi di omeostasi del $[\text{Ca}^{2+}]$ coinvolti in attività di estrusione e compartimentazione (Fig. 1)(Carafoli, 1987).

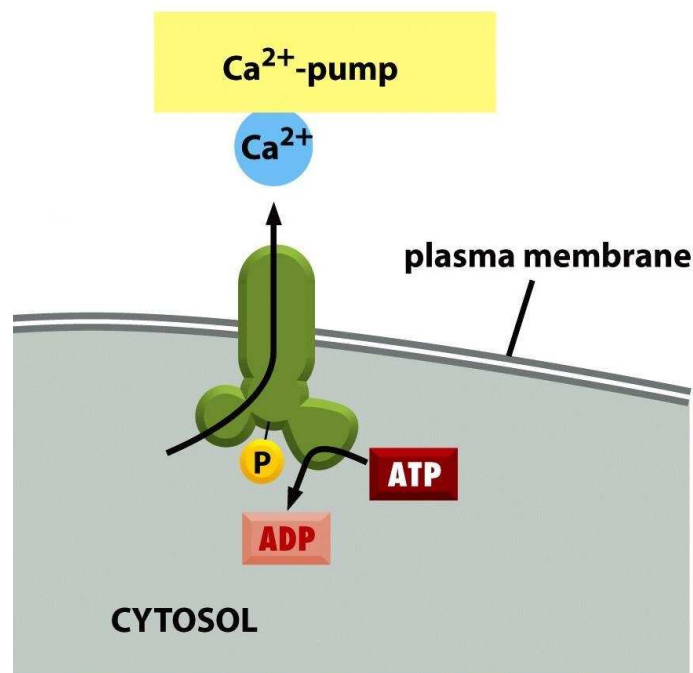


Fig. 1. Immagine schematica del funzionamento della pompa Ca^{2+} -ATPasi di plasma membrana (Alberts et al. 2009)

Aumenti prolungati di $[\text{Ca}^{2+}]$ nel citosol non sono ben tollerati dalle cellule e generalmente portano ad citotossicità e apoptosi o necrosi (Orrenius et al., 1989; Berridge, 1994). La concentrazione del calcio libero citosolico è una componente importante del meccanismo di

trasduzione del segnale cellulare. Aumenti transitori di $[Ca^{2+}]$ svolgono un ruolo essenziale nella regolazione di molti processi fisiologici nelle cellule (Berridge, 1997). I metalli sono in grado di inibire la Ca^{2+} e Na^+/K^+ -ATPasi presenti nella membrana plasmatica (Viarengo et al., 1993; Sheppard et Simkiss, 1978; Simkiss, 1984). Un meccanismo importante per l'estrusione del $[Ca^{2+}]$ è lo scambiatore Na^+/Ca^{2+} presente nella membrana plasmatica, il cui funzionamento dipende dall'attività della Na^+/K^+ -ATPasi che mantiene un adeguato gradiente transmembrana di Na^+ . Le Ca^{2+} -ATPasi presenti nel reticolo sarcoplasmatico (SERCA) sono importanti componenti coinvolte nei sistemi di omeostasi del calcio citosolico. Tuttavia uno dei principali meccanismi coinvolti nel processo di estrusione di questo ione al mezzo extracellulare è la Ca^{2+} -ATPasi di plasmamembrana (PMCA) (Rasmussen et Barret, 1984; Pederson et Carafoli, 1987, Carafoli, 1991(a)(b); Carafoli, 1994), che mostra alta affinità con $[Ca^{2+}]$ e ha le caratteristiche tipiche di una pompa ionica di tipo-P (Carafoli, 1991(a)) (Fig. 1). Le funzioni biochimiche e fisiologiche della Ca^{2+} -ATPasi sono state descritte sia nelle cellule dei vertebrati (Carafoli, 1987; Carafoli et Zurini, 1982; Enouf et al., 1989) sia degli invertebrati (Pietrobon et al., 1990; Viarengo et al., 1991). Diverse tecniche, che comportano la precipitazione mediante sali di piombo, sono state applicate in studi per valutare l'attività della Ca^{2+} -ATPasi, della Na^+/K^+ -ATPasi, delle fosfatasi alcaline, ecc. (Padykula et Herman, 1955; Ernst, 1972; Pons et al., 2003). Secondo la metodica sviluppata la quantità di solfuro di piombo precipitato è direttamente proporzionale all'attività della PMCA, ed è stata quantificata mediante un sistema di analisi delle immagini acquisite in microscopia ottica. In *E. andrei* è stato sviluppato un metodo per la valutazione dell'attività Ca^{2+} -ATPasica che si basa sullo stesso principio e viene applicato su sezioni di tessuto incluso in paraffina (Gastaldi et al., 2007), dove l'attività enzimatica è stata osservata principalmente a livello dell'intestino ed in particolare a livello della parte apicale delle cellule dell'epitelio intestinale. Questo studio si propone di sviluppare un metodo citochimico su sezioni di tessuto fresco, ottenute al

criostato, di *E. andrei* per valutare l'attività della Ca^{2+} -ATPasi in condizioni fisiologiche, considerando diversi parametri tra cui temperatura, pH, forza ionica, specificità del substrato e la sua concentrazione ottimale, nonché gli effetti del vanadato quale inibitore specifico delle ATPasi di trasporto cationico. Per la messa a punto del metodo sono state realizzate curve per ottimizzare diversi parametri, al fine di poter individuare le condizioni migliori per evidenziare l'attività dell'enzima. Un aspetto di particolare interesse e innovazione ha riguardato lo sviluppo di una metodica immunocitochimica mediante l'utilizzo di anticorpi specifici per evidenziare la presenza della Ca^{2+} -ATPasi e la sua localizzazione nella plasmamembrana delle cellule del tessuto intestinale dei vermi. I metodi citochimico e immunocitochimico sviluppati sono stati in seguito applicati su organismi esposti per 28 giorni a contaminanti sia inorganici (Cr(VI)) che organici (B[a]P) per valutare gli effetti di queste sostanze tossiche sull'attività enzimatica della Ca^{2+} -ATPasi e sulla quantità di enzima presente nelle plasmamembrane dell'epitelio intestinale degli animali.

4.1.1 Risultati

Le sezioni trasversali di tessuto (10 μm) di vermi di controllo, ottenute al criostato come descritto in precedenza (vedi “Materiali e Metodi”), sono state fissate in calcio-formolo per 15 min a 4°C, risciacquate in acqua MilliQ e poste nel mezzo di reazione. Come controllo negativo sono state utilizzate sezioni incubate in un mezzo privo di calcio contenente EGTA 2 mM (Fig. X). Al termine di ciascuna prova le sezioni sono state risciacquate in PBS ed immerse in una soluzione di solfuro di ammonio al 2% per 3 min, si è così ottenuto un precipitato marrone in corrispondenza del sito di rilascio degli ioni fosfato generatesi dall'idrolisi dell'ATP. I vetrini sono stati sciacquati con PBS, lasciati asciugare, e montati con gelatina glicerinata. L'acquisizione delle immagini è stata eseguita ad un ingrandimento di 200x utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in luce trasmessa; le immagini sono state analizzate mediante un sistema di analisi di immagine (ScionImage freeware) che ha permesso di quantificare la quantità di precipitato, e quindi l'attività dell'enzima, nelle cellule dell'intestino degli organismi in esame.

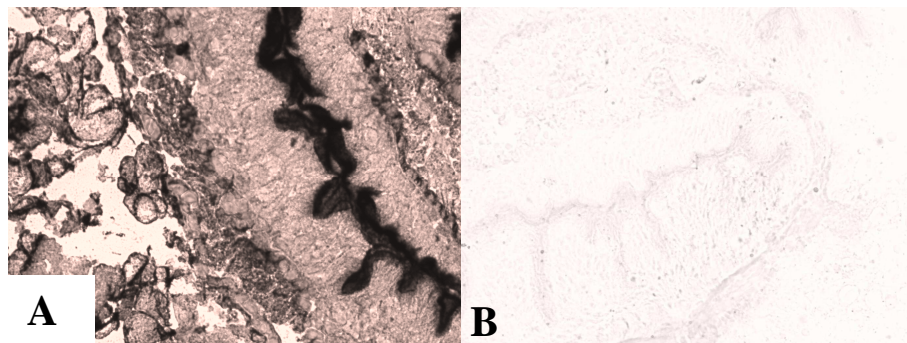


Fig. 2. Immagini rappresentative di colorazione citochimica per evidenziare l'attività della Ca^{2+} -ATPasi. Le immagini riportano sezioni di vermi di coltura incubati (A) in un mezzo di reazione standard, a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 2 h; (B) in un mezzo di reazione non contenente calcio, ma 2mM di EGTA.

Per la valutazione del tempo di incubazione ottimale, sono stati testati 5 tempi diversi: 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min. Le sezioni sono state incubate in un mezzo contenente 0,5 M Tris - HCl, pH 7,4 , 250 μ M ATP sale disodico, 500 nM CaCl_2 , 150 mM KCl, 8mM levamisolo, 0,2 mM ouabaina, 3 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$., ed incubate a $20^\circ \pm 1^\circ \text{C}$.

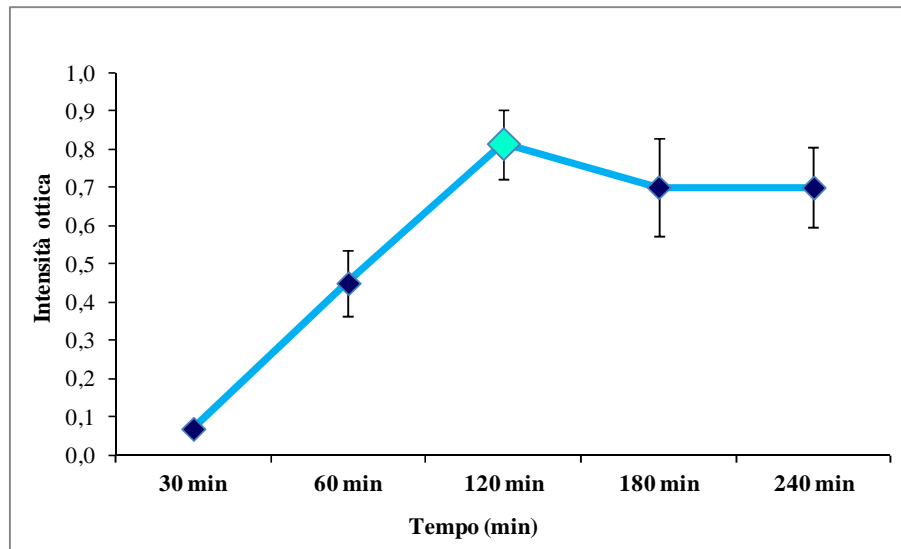


Fig. 3. Variazione nel tempo dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei*. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il mezzo di reazione standard contenente 500 nM di CaCl_2 . I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche.

L'andamento nel tempo dell'attività Ca^{2+} -ATPasica nel tessuto intestinale del verme terrestre *E.andrei* in presenza di una miscela di reazione standard, ha mostrato un andamento lineare fino a 120 min, seguito da un plateau (Fig. 3). L'indicatore celeste indica il valore del parametro per cui è massima l'attività enzimatica.

Al fine di verificare la temperatura ottimale per condurre l'analisi le sezioni sono state incubate in un mezzo contenente 0,5 M Tris - HCl, pH 7,4 , 250 μ M ATP sale disodico, 500 nM CaCl_2 , 150 mM KCl, 8mM levamisolo, 0,2 mM ouabaina, 3 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ed incubate per 120 min a 4°C, 17°C, 20°C, 23°C, 30°C.

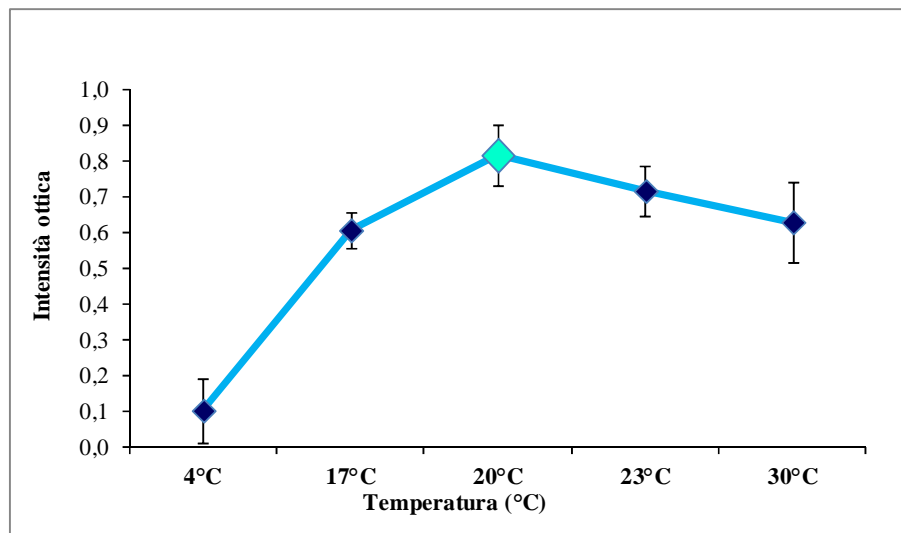


Fig. 4. Dipendenza dalla temperatura dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei*. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il mezzo di reazione standard contenente 500 nM di CaCl_2 . I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche.

Il saggio citochimico ha mostrato una buona risposta della Ca^{2+} -ATPasi alle variazioni di temperatura da 4°C a 30°C con un picco di colorazione a 20°C seguita da una diminuzione dell'intensità di colorazione (Fig. 4). L'indicatore celeste indica il valore del parametro per cui è massima l'attività enzimatica.

Per garantire la forza ionica necessaria alla reazione sono state ottimizzate le concentrazioni del tampone Tris-HCl e della soluzione di KCl. Le concentrazioni utilizzate sono state rispettivamente: 0,02 M, 0,05 M, 0,1 M, 0,2 M e 0,5 M per il tampone, e 0, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 350 mM per il KCl. Le sezioni sono state incubate in un mezzo contenete diverse di soluzione tampone Tris - HCl, a pH 7,4, 250 μ M ATP sale disodico, 500 nM CaCl_2 , 8mM levamisolo, 0,2 mM ouabaina, 3 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ed incubate a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 120 min.

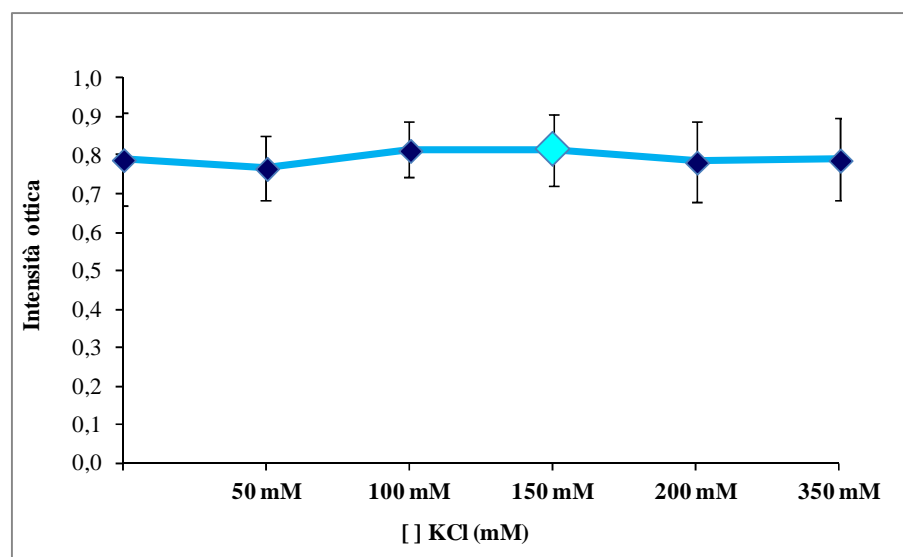


Fig. 5. Variazione dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei* al variare della concentrazione di KCl. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il mezzo di reazione standard contenete 500 nM di CaCl_2 . L'indicatore celeste indica il parametro scelto per condurre l'esperimento. I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche.

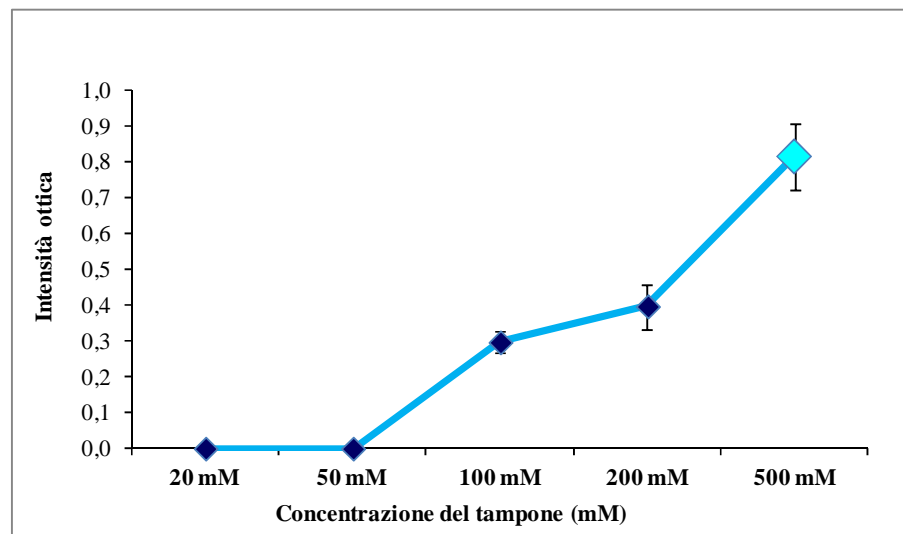


Fig. 6. Variazione dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei* al variare della forza ionica nella soluzione di reazione. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il mezzo di reazione standard contenete 500 nM di CaCl_2 . I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche.

È stato misurato l'effetto della forza ionica sull'attività della Ca^{2+} -ATPasi in presenza di una miscela di reazione standard, contenente 250 μM ATP e 500 nM di CaCl_2 , valutata in presenza di diverse concentrazioni tampone TRIS-HCl (Fig. 6) e di una soluzione di KCl (Fig. 5). Gli effetti dell'incremento della concentrazione del tampone TRIS-HCl sull'attività della Ca^{2+} -ATPasi ha mostrato un progressivo aumento nella colorazione all'aumentare della concentrazione del tampone (Fig. 6). L'indicatore celeste indica il valore del parametro per cui è massima l'attività enzimatica. Per quel che riguarda il KCl (Fig. 5) la curva non mostra variazioni poiché, probabilmente, il solo tampone contenuto nella miscela di reazione riesce a garantire la forza ionica necessaria; il valore scelto è stato 150 mM di KCl.

Un altro importante parametro è il pH. Le sezioni sono state incubate in un mezzo contenente 0,5 M Tris - maleato, a diversi valori di pH (5,5 – 6,5 – 7,0 - 7,2 - 7,4 – 8,0), 250 μ M ATP sale disodico, 500 nM CaCl_2 , 150 mM KCl, 8mM levamisolo, 0,2 mM ouabaina, 3 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ed incubate a $20^\circ\pm 1^\circ\text{C}$ per 120 min. La sensibilità dell'enzima alle variazioni di pH non poteva essere verificata con l'utilizzo del tampone Tris -HCl (range 7–9), al fine di valutare l'attività enzimatica si è provveduto ad utilizzare un tampone con un range di pH più ampio, in particolare si è utilizzato un tampone Tris-maleato (range 5–8,6)

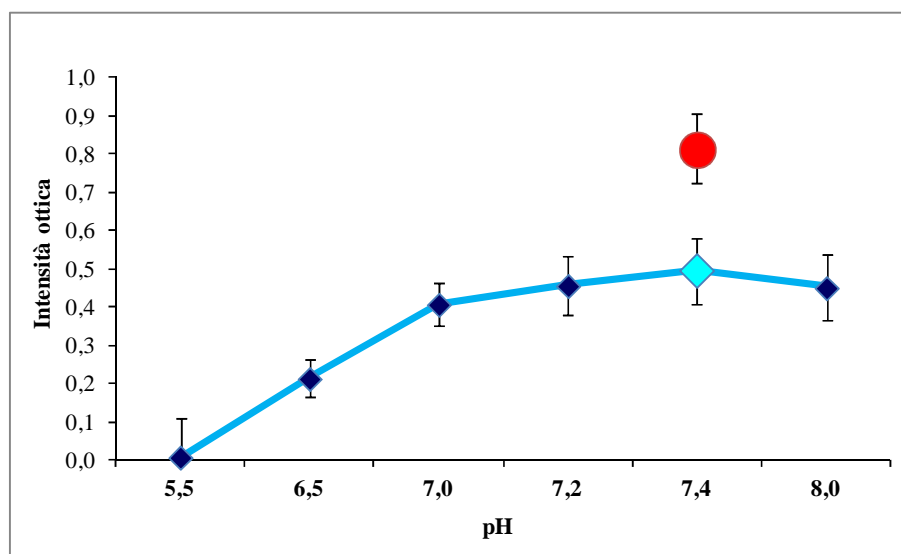


Fig. 7. Dipendenza dal pH dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei*. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il mezzo di reazione standard contenente 500 nM di CaCl_2 (in rosso è riportato il valore corrispondente pH 7,4 con ma con tampone TRIS -HCl). I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche.

Gli effetti sull'attività della Ca^{2+} -ATPasi al variare del pH in presenza di una miscela di reazione contenente 250 μ M di ATP e 500 nM di CaCl_2 , ma che prevedeva l'utilizzo di un tampone TRIS-MALEATO, ha mostrato un progressivo aumento nella colorazione all'aumentare del pH del mezzo di reazione fino a pH 7,4. L'indicatore celeste indica il valore del parametro per cui è massima l'attività enzimatica (Fig. 7). Le sezioni di tessuto incubate nel mezzo di reazione contenente TRIS-MALEATO, che ha un range di pH più ampio rispetto al TRIS-HCl, presentano una minore colorazione rispetto a quelle incubate in tampone TRIS-

HCl, per le quali, ad un pH pari a 7,4 la densità ottica è risultata superiore del 60% (pallino rosso).

Dopo l'ottimizzazione dei parametri fisico/chimici necessari per condurre in condizioni ottimali il test, si è proceduto alla valutazione del substrato ideale per il funzionamento della pompa; essendo noto che si tratta di una ATPasi il substrato ottimale dovrebbe essere l'ATP; al fine di confermare tale ipotesi i substrati studiati sono stati adenosina trifosfato, l'adenosina difosfato e il glucosio-6-fosfato. Le sezioni sono state incubate in un mezzo contenete 0,5 M Tris - HCl, pH 7,4 , 250 μ M di tre substrati diversi: ATP, ADP, G6P, 500 nM CaCl_2 , 150 mM KCl, 8mM levamisolo, 0,2 mM ouabaina, 3 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ed incubate a $20^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ per 120 min.

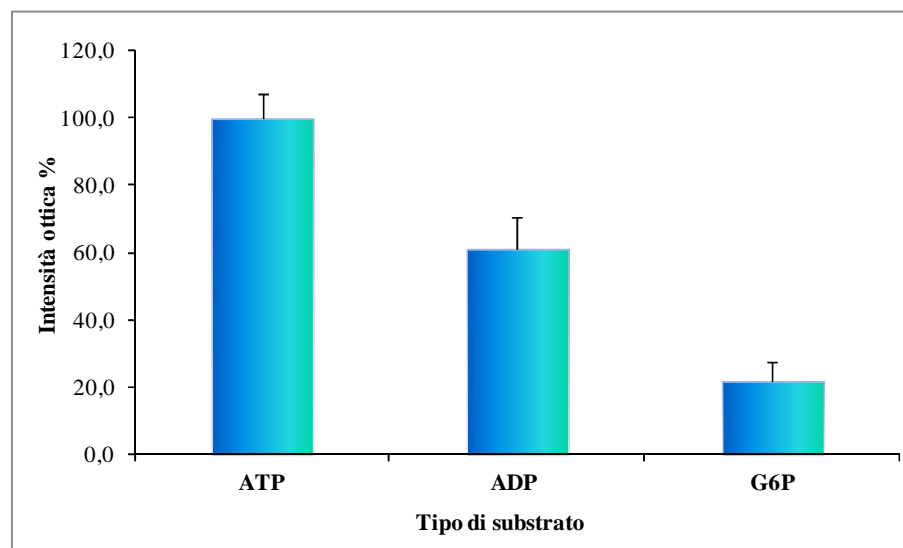


Fig. 8. Specificità del substrato per la Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei*. I dati sono espressi come percentuale di idrolisi dei differenti substrati rispetto all'ATP. I diversi substrati sono stati aggiunti al mezzo di reazione standard alle stesse concentrazioni dell'ATP. I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche.

L'analisi è stata condotta in presenza di diversi substrati quali ATP, ADP, G6P (in concentrazioni equimolari). L'ATP è risultato essere il substrato ottimale (Fig. 8) seguito dall'ADP che è anch'esso idrolizzato ma con un'efficienza del 40% in meno rispetto all'ATP. Diversamente, il G6P è risultato scarsamente idrolizzato.

Dopo aver identificato l'ATP come substrato ideale per far avvenire la reazione si è proceduto individuandone la concentrazione ottimale nel mezzo di reazione. Le sezioni sono state incubate in un mezzo contenente 0,5 M Tris-HCl, pH 7,4, la concentrazione di ATP è stata fatta variare tra 0 e 5 mM (0, 0,02 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,35 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 5 mM), 500 nM CaCl₂, 150 mM KCl, 8 mM levamisolo, 0,2 mM ouabaina, 3 mM Pb(NO₃)₂, ed incubate a 20°±1°C per 120 min.

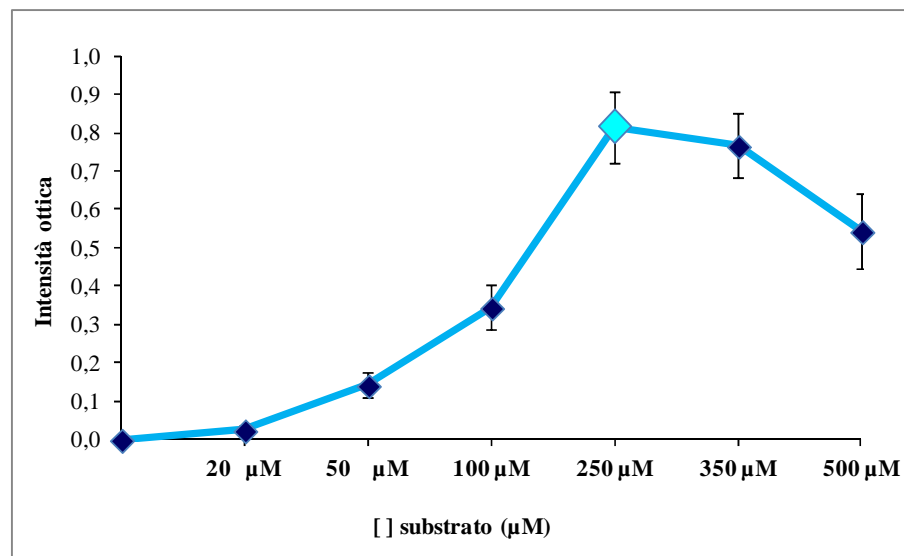


Fig. 9. Variazione dell'attività della Ca²⁺-ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei* al variare della concentrazione di substrato. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il mezzo di reazione standard contenente 500 nM di CaCl₂. I dati rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche.

L'effetto dell'aumento della concentrazione dell'ATP sull'attività della Ca²⁺-ATPasi, ha mostrato un picco, corrispondente al valore di saturazione del substrato, a 250 μM di ATP.

L'indicatore celeste indica il valore del parametro per cui è massima l'attività enzimatica (Fig. 9).

Parametro fondamentale per la corretta ottimizzazione di questo saggio citochimico è il corretto dosaggio del calcio nel mezzo di reazione. Per tale ragione le sezioni sono state incubate in un mezzo contenete 0,5 M Tris - HCl, pH 7,4 , 250 μ M ATP sale disodico, la concentrazione di CaCl_2 è stata fatta variare tra 0 e 2000 mM (0, 0,5 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 900 μ M, 2000 μ M), 150 mM KCl, 8 mM levamisolo, 0,2 mM ouabaina, 3 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, ed incubate a $20^\circ \pm 1^\circ \text{C}$ per 120 min.

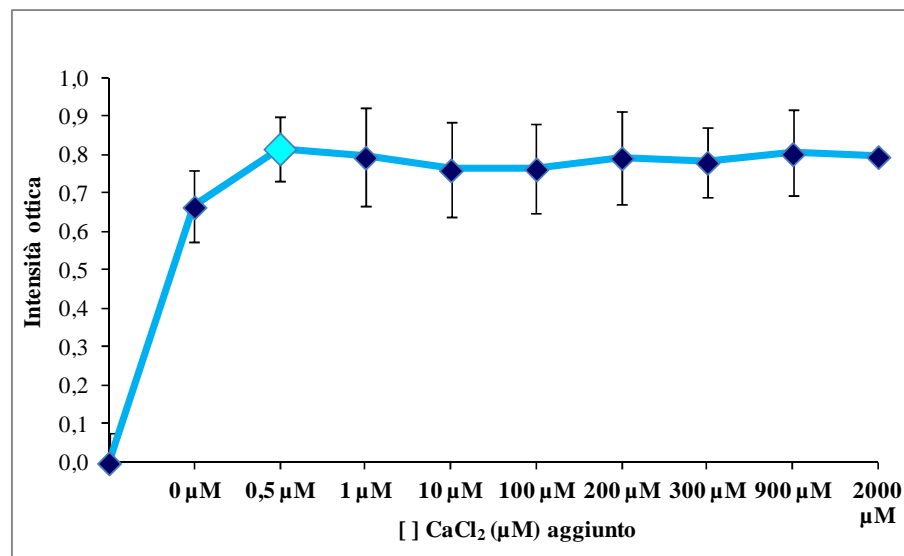


Fig. 10. Variazione dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei* al variare della concentrazione di $[\text{Ca}^{2+}]$ libero. I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche.

L'attività della Ca^{2+} -ATPasi in funzione della concentrazione di CaCl_2 , ha mostrato un andamento crescente fino a 500 nM seguito da un plateau (Fig. 10). L'indicatore celeste indica il valore del parametro per cui è massima l'attività enzimatica.

Le sezioni sono state incubate in un mezzo contenente 0,5 M Tris - HCl, pH 7,4 , 250 μ M ATP sale disodico, 500 nM CaCl_2 , 500 nM, 150 mM KCl, 8 mM levamisolo, 0,2 mM ouabaina, la concentrazione di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ è stata fatta variare tra 0 e 20 mM (0, 0,5 mM, 1 mM, 3 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). I vetrini sono stati incubati a $20^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ per 120 min.

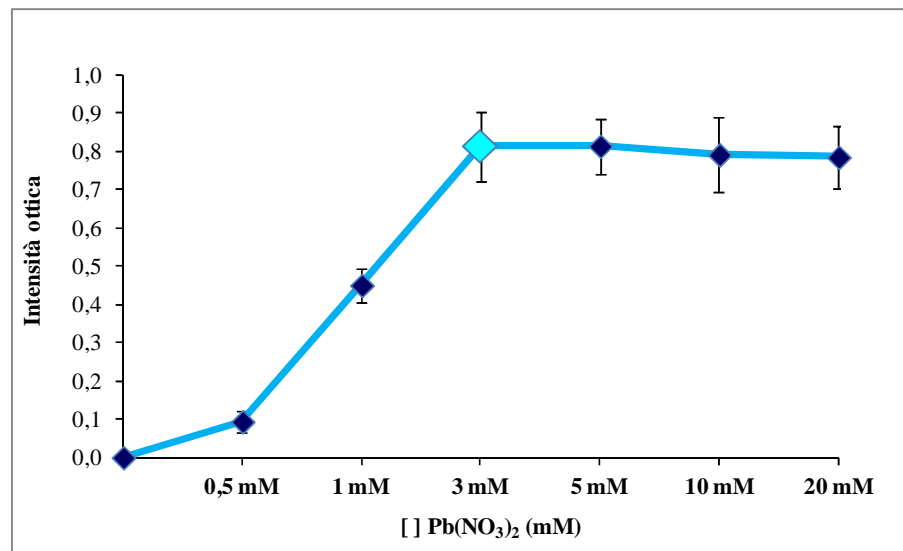


Fig. 11. Variazione dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei* al variare della concentrazione di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il mezzo di reazione standard contenente 500 nM di CaCl_2 . I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche.

L'analisi è stato condotto in presenza di diverse concentrazioni di $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. I valori ottenuti mostrano un aumento lineare dell'attività enzimatica fino alla concentrazione di 3 mM, seguito da un plateau. L'indicatore celeste indica il valore del parametro per cui è massima l'attività enzimatica.

Al fine di accertarsi che l'attività osservata fosse attribuibile ad un'ATPasi di trasporto cationico le sezioni sono state, infine, incubate in un mezzo di reazione contenete orto-vanadato di sodio, un noto inibitore della Ca^{2+} e Na^+/K^+ -ATPasi (Carafoli, 1987). La concentrazione dell' orto-vanadato di sodio è stata fatta variare tra 0 e 2 mM (0, 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM). I vetrini sono stati incubati a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 120 min.

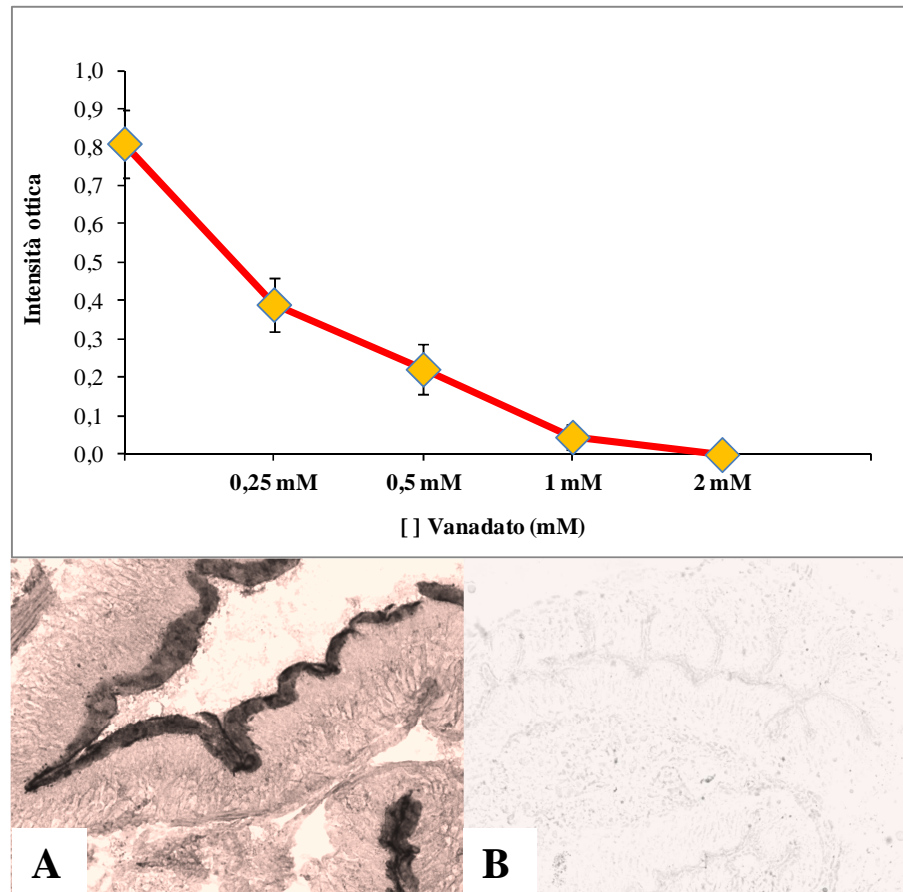


Fig. 12. Inibizione dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei* all'aumentare della concentrazione di vanadato. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando il mezzo di reazione standard contenete 500 nM di CaCl_2 . I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. Immagini rappresentative di colorazione citochimica per evidenziare l'attività della Ca^{2+} -ATPasi. Le immagini riportano sezioni di vermi di coltura incubati (A) in un mezzo di reazione standard, a $20^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 2 h; (B) in un mezzo di reazione contenete 2mM di orto-vanadato di sodio.

La Fig. 12 mostra che l'attività della Ca^{2+} -ATPasi nel tessuto intestinale del verme terrestre *E. andrei* decresce all'aumentare della concentrazione del vanadato, risultando totalmente inibita a 2 mM.

Valutazione degli effetti sull'attività della Ca^{2+} -ATPasi di differenti concentrazioni di Cr(VI) e B[a]P in *E. andrei* utilizzando il test con suolo artificiale

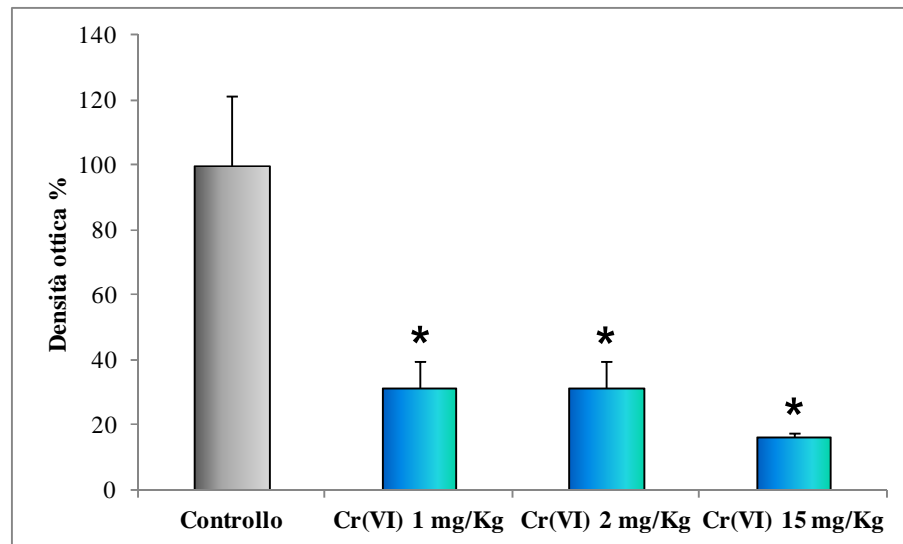


Fig. 13. Effetti indotti da Cr(VI) (1, 2, 15 mg/kg) in suolo artificiale standard, sull'attività Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei* dopo esposizione per 28 giorni. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0.05$ (Mann-Whitney *U* test).

L'attività della Ca^{2+} -ATPasi dopo esposizione di *E. andrei* per 28 giorni a diverse concentrazioni subletali di Cr(VI) ha presentato una forte riduzione rispetto ai controlli a tutte le concentrazioni utilizzate, in particolare a quella più alta, ossia 15 mg/Kg (-83% rispetto ai controlli) (Fig. 13).

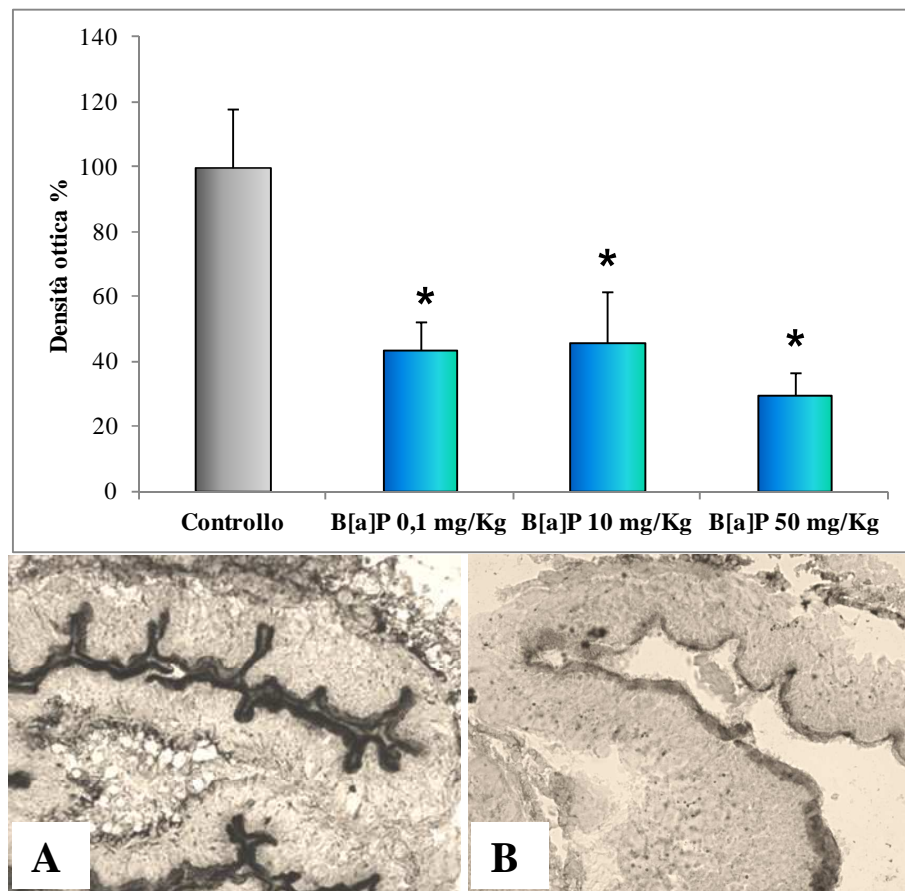


Fig. 14. Effetti indotti da B[a]P (0,1, 10, 50 mg/kg) in suolo artificiale standard, sull'attività Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei* dopo esposizione per 28 giorni. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0.05$ (Mann-Whitney *U* test). Immagini rappresentative dell'epitelio intestinale di un verme di controllo (A) e dopo esposizione per 28 giorni a un suolo contaminato da 50 mg/Kg di B[a]P (B).

La valutazione della Ca^{2+} -ATPasi in *E.andrei* dopo esposizione degli organismi a differenti concentrazioni subletali di B[a]P ha evidenziato una forte riduzione dell'attività enzimatica rispetto ai controlli a tutte le concentrazioni utilizzate, ossia 0,1 e 10 mg/Kg (-56% e -54% rispetto ai controlli) e 50 mg/Kg (-70% rispetto ai controlli) (Fig. 14).

4.1.2. Immunoistochimica

Per confermare che la colorazione citochimica osservata fosse effettivamente attribuibile alla Ca^{2+} -ATPasi di plasma membrana (PMCA) le sezioni sono state trattate con un anticorpo specifico per tale proteina. La PMCA è una proteina integrale di membrana conservata in tutta la scala evolutiva caratterizzata da un dominio catalitico e un dominio C-terminale più piccolo che serve a regolare l'attività della pompa. Sezioni trasversali di tessuto ($10\mu\text{m}$), ottenute al criostato come descritto in precedenza (vedi "Materiali e Metodi"), sono state fissate in paraformaldeide al 4% per 20 min a temperatura ambiente e quindi incubate in una soluzione di permeabilizzazione e blocking (Triton X-100 0.5%, BSA 2% in PBS) per 1 h a temperatura ambiente. Successivamente è stato applicato l'anticorpo primario anti-PMCA ATPase (mouse monoclonal) opportunamente diluito in una soluzione di BSA 1% e Triton X-100 0,05% in PBS overnight a 4°C . In seguito, dopo aver effettuato tre lavaggi con PBS, è stato applicato l'anticorpo secondario (goat to mouse, DyLight) diluito in BSA 1% e Triton X-100 0.05% in PBS per 1 h al buio a temperatura ambiente. Per verificare l'assenza di colorazioni aspecifiche, sezioni di controllo sono state incubate sia con il solo anticorpo primario e sia con il solo anticorpo secondario. Le sezioni sono state lavate tre volte con PBS e infine sono stati colorate per 3 min con DAPI. I vetrini sono stati osservati ad un ingrandimento di $400\times$ utilizzando un microscopio invertito (Zeiss Axiovert 100M) in fluorescenza (filtri di emissione: rodamina, DAPI).

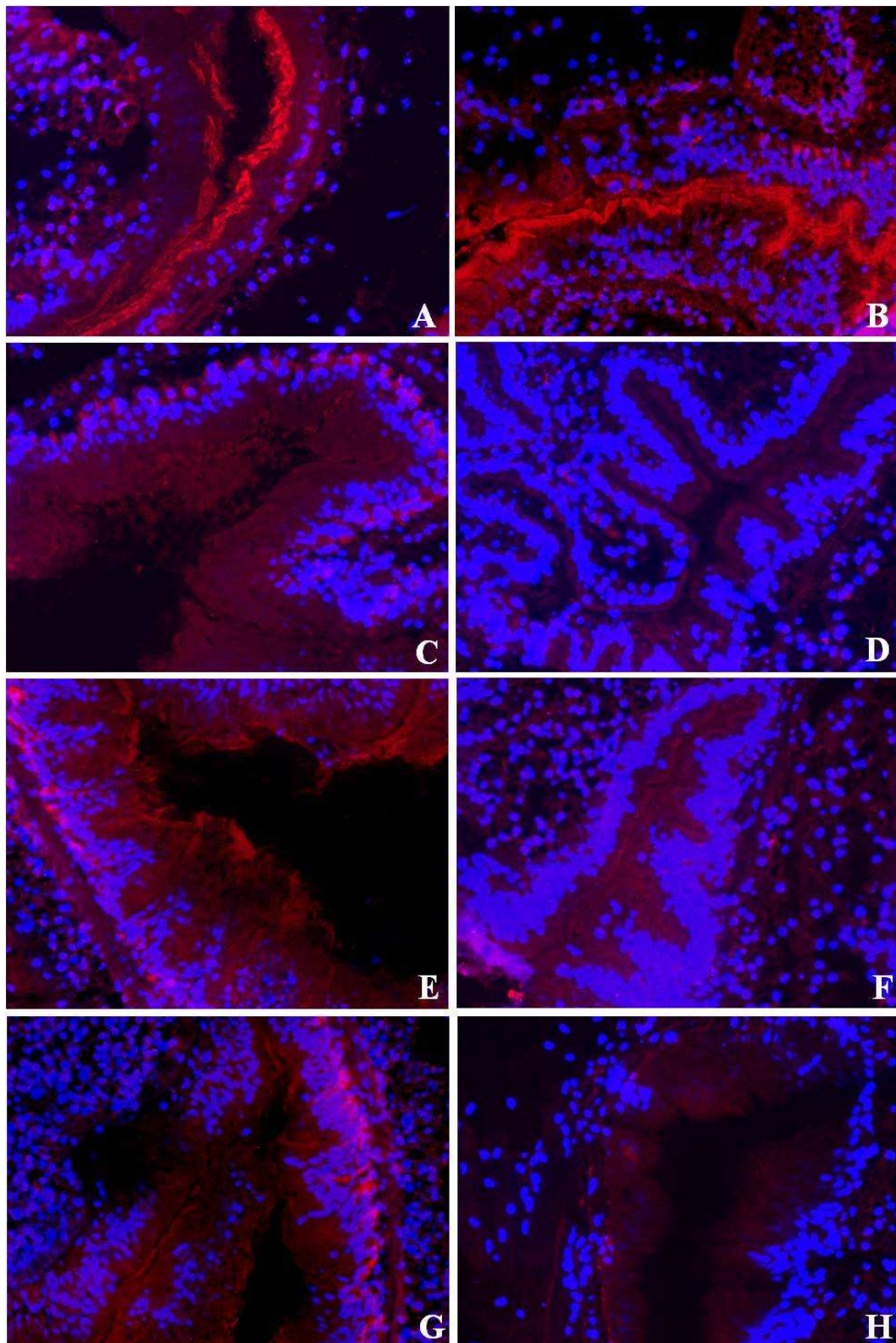


Fig. 15. Immagini rappresentative della colorazione immunohistochimica con anticorpo anti-PMCA in sezioni al criostato di tessuto di vermi di controllo (A, B), dopo esposizione per 28 giorni a B[a]P (0,1 - 10 - 50 mg/kg che corrispondono rispettivamente alle foto C, E, G), e dopo esposizione per 28 giorni a Cr(VI) (1 - 2 - 15 mg/kg che corrispondono rispettivamente alle foto D, F, H) (rosso: anticorpo anti-PMCA; blu: DAPI -fluorocromo specifico per il DNA).

La tecnica immunohistochimica mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico anti-PMCA ha permesso di evidenziare, in sezioni di tessuto al criostato di *E. andrei*, la presenza dell'enzima in particolare nella membrana plasmatica apicale delle cellule dell'intestino, ossia verso il lume intestinale (Fig. 15. A-B) nella stessa posizione in cui era stato evidenziata la formazione di fosfato rilasciato durante l'attività dell'enzima Ca^{2+} -ATPasi. La marcatura fluorescente del tessuto intestinale, molto intensa nei vermi di controllo (Fig. 15. A-B), è apparsa decisamente ridotta nei vermi esposti alle diverse concentrazioni subletali di entrambi i contaminanti (sia B[a]P che Cr(VI) (Fig. 15. C-H)), risultando minima negli organismi trattati con Cr(VI) (Fig. 15. D-F-H).

4.1.3. Discussione

Data la notevole importanza rivestita dalla valutazione dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi nella biologia delle cellule e quale parametro altamente sensibile agli stress ambientali, si è ritenuto importante modificare il metodo precedentemente sviluppato per determinare l'attività enzimatica su tessuti inclusi in paraffina (Gastaldi et al., 2007), in modo tale da permettere di evidenziare l'attività della PMCA in condizioni fisiologiche su sezioni di tessuto fresco, ottenute al criostato. Per la messa a punto del metodo, sono state costruite curve di ottimizzazione di diversi parametri quali temperatura, pH, forza ionica, specificità del substrato e la sua concentrazione ottimale, al fine di poter individuare le condizioni migliori per valutare l'attività dell'enzima. La procedura citochimica è stata condotta su sezioni di tessuto ottenute al criostato, utilizzando come fissativo il calcio-formolo per preservarne la morfologia. I dati ottenuti indicano che la Ca^{2+} -ATPasi coinvolta nel trasporto di $[\text{Ca}^{2+}]$ dal citosol al liquido extracellulare ha il suo massimo di attività ad un pH pari a 7,4 e ad una temperatura di 20°C, valori che corrispondono alle condizioni fisiologiche di vita dei vermi. Molti studi citochimici finora impiegati per rilevare la funzionalità della Ca^{2+} -ATPasi utilizzano buffer alcalini con valori di pH variabili l'8 e 9 (Padykula et Herman, 1955; Ando et al., 1981). Ciò è principalmente dovuto al fatto che i sali di $[\text{Pb}^{2+}]$ (Ando et al., 1982; Chayen et al., 1981; Ernst, 1972; Mayahara et al., 1980 ; Wachstein et Meisel; 1957) utilizzati per intrappolare lo ione $(\text{PO}_4)^{2-}$ rilasciato dall'idrolisi dell'ATP, precipitano con maggiore efficienza a pH alcalino. Tuttavia, i dati biochimici indicano chiaramente che l'attività dell'ATPasi $[\text{Ca}^{2+}]$ -dipendenti, coinvolte nella trasporto dei cationi calcio dal citosol al mezzo esterno, è ottimale tra pH 7.2-7.4 ed è estremamente bassa per valori di pH superiore a 8 (Stauffer et al., 1995). In particolare, i risultati hanno evidenziato che l'attività enzimatica è presente principalmente a livello della membrana plasmatica apicale delle cellule

dell'intestino, ossia verso il lume intestinale. Alla concentrazione di CaCl_2 pari a 500nM si è evidenziata la massima attività enzimatica. Il $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ è stato usato come “agente di cattura” per rilevare l'attività dell'enzima; tale tecnica si basa sulla teoria che gli ioni fosfato, derivanti dall'idrolisi enzimatica di fosfati organici, vengono intrappolati nel loro sito di formazione da cationi di $[\text{Pb}^{2+}]$ per formare un precipitato altamente insolubile. Inoltre, in condizioni ottimali di saggio (500 nM CaCl_2 , 150 mM KCl, 250 μM ATP, pH 7,4) è stato rilevato un aumento lineare nel tempo dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi fino a 120 min. Per quanto riguarda il substrato, l'ATP è risultato il più utilizzato dall'enzima sia rispetto all'ADP che al G6P. Analogamente ad altri traslocatori cationici descritti in cellule di vertebrati e invertebrati, l'enzima è fortemente inibito da concentrazioni millimolari di vanadato, uno specifico inibitore di pompe di cationi.

Come menzionato in precedenza, l'attività Ca^{2+} -ATPasica è risultata evidente a livello della membrana plasmatica apicale delle cellule dell'intestino. Per verificare se questa attività enzimatica potesse corrispondere alla Ca^{2+} -ATPasi di plasmamembrana (PMCA) è stata messa a punto una metodica immunocitochimica mediante l'utilizzo di anticorpi specifici su sezioni di tessuto di *E. andrei*. La tecnica sviluppata ha permesso di evidenziare la presenza della PMCA nella parte apicale delle cellule del tessuto intestinale, dato che corrisponde a quanto evidenziato mediante il metodo citochimico. Questa localizzazione della Ca^{2+} -ATPasi ne spiega l'alta sensibilità ai fattori di stress ambientali in *E. andrei*. Infatti, l'assorbimento di nutrienti e inquinanti si verifica inizialmente e soprattutto nella parte apicale delle cellule dell'intestino e per tanto questa area della cellula (ovvero la membrana apicale) può essere considerata il primo obiettivo per le sostanze chimiche tossiche che entrano nella cellula. Questo fatto potrebbe rendere l'organismo più sensibile a fattori di stress ambientali.

Diversi studi hanno dimostrato che sostanze tossiche possono alterare l'omeostasi del $[Ca^{2+}]$ agendo sui sistemi endocellulari di omeostasi del catione ed in particolare inibendo l'attività della PMCA e/o riducendo la quantità dell'enzima (Viarengo et Nicotera, 1991), con conseguente aumento del livello intracellulare di $[Ca^{2+}]$.

I metodi citochimico e immunoistochimico sviluppati sono stati quindi utilizzati per evidenziare gli effetti provocati da cromo esavalente (CrVI) e benzo[*a*]pirene (B[*a*]P) sull'attività e sulla presenza dell'enzima nel verme *E. andrei* dopo 28 giorni di esposizione degli animali a diverse concentrazioni subletali di tali inquinanti miscelati in suoli artificiali standard (OECD, 2004).

In particolare, le concentrazioni di B[*a*]P utilizzate sono state, a partire dalla più bassa, i) il limite di legge per i suoli residenziali (0,1 mg/kg), ii) il limite di legge per i suoli industriali (10 mg/kg), iii) il valore corrispondente a cinque volte il limite di legge italiano per suoli industriali (50 mg/kg). I dati citochimici hanno evidenziato una forte diminuzione dell'attività enzimatica a tutte le concentrazioni di B[*a*]P utilizzate; la tecnica immunoistochimica ha permesso di rilevare una diminuzione della colorazione della regione apicale delle cellule della mucosa intestinale dei vermi trattati rispetto ai controlli.

Per quanto riguarda il test con suolo artificiale contaminato da Cr(VI), le concentrazioni utilizzate sono state, a partire dalla più bassa, i) il valore corrispondente alla metà del limite di legge italiano per suoli residenziali (1 mg/kg), ii) il limite di legge per i suoli residenziali (2 mg/kg), iii) il limite di legge per i suoli industriali (15 mg/kg). I risultati relativi all'attività della Ca^{2+} -ATPasi valutata nelle cellule del tessuto intestinale dei vermi trattati hanno indicato effetti significativi a tutte le concentrazioni utilizzate; la marcatura fluorescente dell'anticorpo anti-PMCA è risultata minore nel tessuto intestinale dei vermi esposti alle diverse dosi dell'inquinante rispetto ai controlli.

E' importante evidenziare che entrambe le tecniche hanno indicato un'alterazione enzimatica superiore negli organismi esposti a Cr(VI) rispetto al B[a]P.

Mentre il metodo citochimico permette di rilevare l'attività enzimatica, il metodo immunostochimico mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico anti-PMCA evidenzia la presenza e la quantità dell'enzima nel tessuto degli organismi; occorre comunque tenere in considerazione, per l'interpretazione dei risultati, che eventuali modificazioni di tipo ossidativo della struttura dell'enzima potrebbero interferire sulla specificità del riconoscimento tra antigene e anticorpo.

Il metodo citochimico messo a punto, vista la sua alta sensibilità agli inquinanti, sia organici che inorganici e consentendo la quantificazione dell'attività della PMCA, risulta di grande importanza per valutare gli effetti dello stress ambientale sui sistemi di trasduzione del segnale Ca^{2+} -dipendenti. Di conseguenza, risulta essere un ottimo biomarker di “*early warning*” da utilizzare nei programmi di biomonitoraggio dei suoli.

4.2. Effetti di concentrazioni ambientalmente rilevanti di Cr(VI) sui vermi terrestri: ruolo dello stress ossidativo nelle alterazioni della fisiologia degli organismi

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare le alterazioni fisiologiche indotte da Cr(VI) a diverse concentrazioni ambientalmente rilevanti sui lombrichi. E' importante infatti evidenziare che mentre è nota la tossicità e genotossicità e si discute ancora circa la cancerogenicità di tale contaminante nei vertebrati, in particolare nei mammiferi (Trzeciak et al., 2000; Danadevi et al., 2004; Lee et al., 2004), meno noti sono gli effetti del Cr(VI) sugli organismi edafici.

L'organismo modello *Eisenia andrei* è stato esposto a differenti concentrazioni Cr(VI) (1, 2, 15 mg/kg) per 28 giorni in suolo artificiale standard. Al termine dell'incubazione è stata valutata una batteria di biomarker a diversi livelli di complessità funzionale su cellule e tessuti (quali stabilità delle membrane lisosomiali su celomociti, accumulo lisosomiale di lipofuscine, lipidi neutri e rapporto lisosomi/citoplasma su cellule del tessuto cloragogeno) e di genotossicità (quali danno al DNA e frequenza dei micronuclei su celomociti). In questa fase oltre al Comet assay alcalino, normalmente utilizzato, è stato introdotto l'utilizzo di enzimi, quali endonucleasi III e formamido-pirimidin glicosilasi (Fpg), per valutare il danno ossidativo indotto sul DNA. Cambiamenti biologici rilevanti sono stati osservati negli animali esposti sebbene le concentrazioni di Cr(VI) utilizzate siano risultate senza effetti sulla vitalità e la riproduzione.

Sulla base dei risultati ottenuti dopo l'incubazione degli organismi in suolo artificiale si è ritenuto opportuno approfondire alcuni aspetti relativi ai primi effetti del Cr(VI) sul verme terrestre *E. andrei*. Gli animali sono stati esposti per 1 e 3 giorni a concentrazioni subletali di Cr(VI) (2, 15, 30 mg/ml) mediante filter paper test. Lo studio ha incluso la valutazione di

diversi parametri, dalla generazione di specie reattive dell'ossidativo, con conseguenti effetti causati dallo stress ossidativo, alle alterazioni della fisiologia e funzionalità cellulare.

Gli effetti del Cr(VI) sono stati studiati sui celomociti ossia le cellule del liquido celomatico che rivestono un ruolo molto importante nelle difese immunitarie dei vermi, ossia difesa antimicrobica, reazioni di incapsulamento, guarigione delle ferite, fagocitosi, meccanismi di difesa cellulare (Byzova, 1974; Cooper et Stein, 1981; Valembosis et al., 1982, 1992, 1994; Cooper, 1996; Cossarizza et al., 1996; Manerikar et al., 2008). Sui celomociti sono state messe a punto metodiche per individuare la presenza all'interno delle cellule di specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso l'utilizzo di sonde fluorescenti. Inoltre è stato messo a punto il metodo per la valutazione del contenuto lisosomiale di lipofuscine. Un altro parametro che risulta essenziale a livello cellulare è la funzionalità mitocondriale. I mitocondri come noto, svolgono funzioni vitali per la cellula, mediante il ciclo di Krebs e la catena di trasporto degli elettroni, in questi organelli viene prodotto l'ATP, la principale fonte di energia della cellula. Per tanto è stata messa a punto una metodica che permette di valutare la funzionalità mitocondriale dei celomociti di *E. andrei* mediante l'utilizzo di una sonda fluorescente. Sono stati sviluppati anche due biomarker quali attività del lisozima e tasso di fagocitosi, per la valutazione dell'efficienza del sistema immunitario degli animali. Infine, è stato valutato il possibile danno dell'inquinante a livello delle plasmamembrane cellulari attraverso la valutazione del rilascio nel mezzo extracelulare dell'enzima lattato deidrogenasi.

4.2.1. Risultati

Valutazione degli effetti di differenti concentrazioni di Cr(VI) in *E. andrei* utilizzando l'artificial soil test

I risultati hanno dimostrato che l'esposizione di *E. andrei* per 28 giorni a differenti concentrazioni di Cr(VI) in suolo standard artificiale, in senza di effetti sulla mortalità, sul peso e sul tasso di riproduzione degli animali, vi sono stati cambiamenti nei diversi biomarker analizzati (Fig. 1-8),

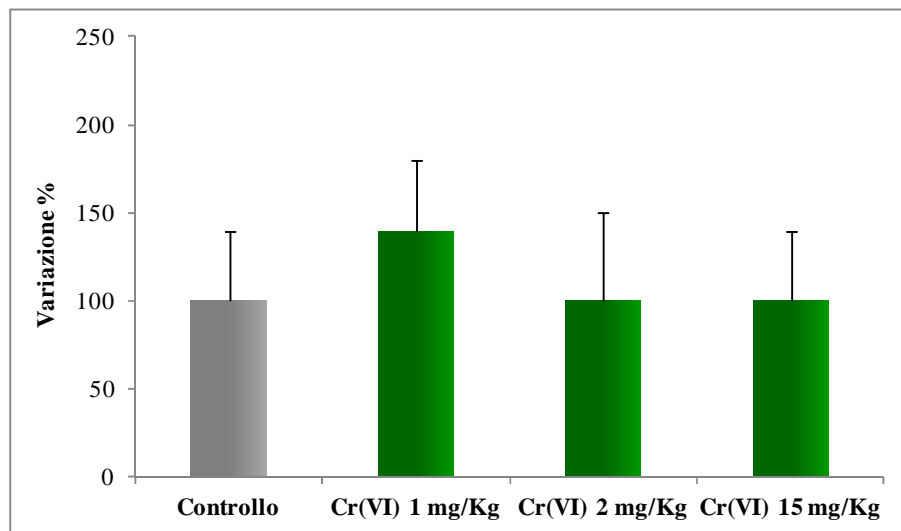


Fig. 1. Effetti indotti da Cr(VI) (1, 2, 15 mg/kg) in suolo artificiale standard, sul contenuto lisosomiale di lipofuscine nelle cellule del tessuto cloragogeno di *E. andrei*, dopo esposizione per 28 giorni. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

I risultati ottenuti dalla valutazione dell'accumulo lisosomiale di lipofuscine nelle cellule del tessuto cloragogeno non hanno indicato alcun incremento del contenuto di lipofuscine nei vermi esposti alle diverse concentrazioni di Cr(VI) (Fig. 1).

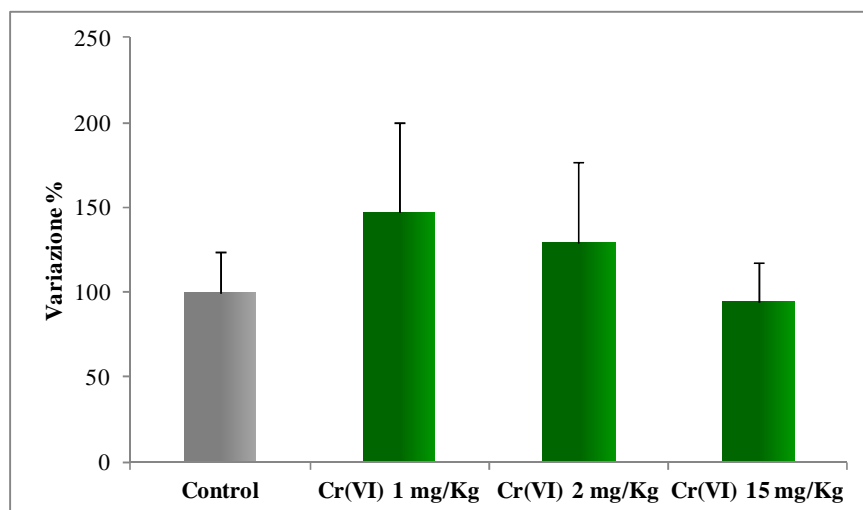


Fig. 2. Effetti indotti da Cr(VI) (1, 2, 15 mg/kg) in suolo artificiale standard, sul contenuto lisosomiale di lipidi neutri nelle cellule del tessuto cloragogeno di *E. andrei* dopo esposizione per 28 giorni. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

I risultati ottenuti dalla valutazione dell'accumulo lisosomiale di lipidi neutri nelle cellule del tessuto cloragogeno non hanno indicato alcun incremento del contenuto di lipofuscine nei vermi esposti alle diverse concentrazioni di Cr(VI) (Fig. 2).

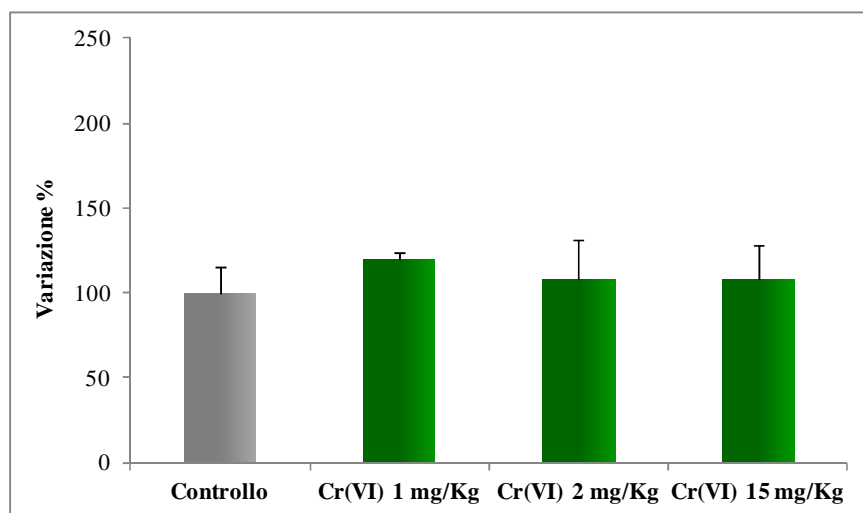


Fig. 3. Effetti indotti da Cr(VI) (1, 2, 15 mg/kg) in suolo artificiale standard, sul rapporto lisosomi/citoplasma del tessuto cloragogeno di *E. andrei* dopo esposizione per 28 giorni. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

Anche i risultati relativi al rapporto lisosomi/citoplasma (biomarker di danno tissutale) valutato nel tessuto cloragogeno non hanno evidenziato nei vermi esposti al Cr(VI) effetti significativi rispetto al controllo. (Fig. 3).

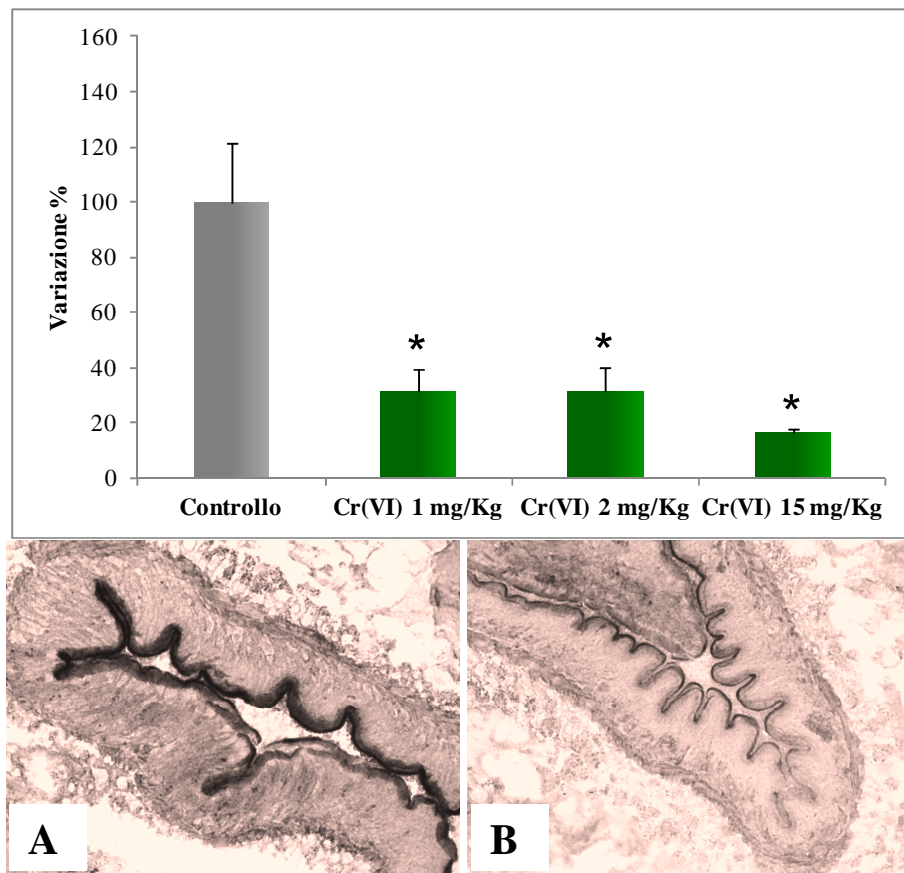


Fig. 4. Effetti indotti da Cr(VI) (1, 2, 15 mg/kg) in suolo artificiale standard, sulla funzionalità della Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei* dopo esposizione per 28 giorni. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test). Immagini rappresentative dell'epitelio intestinale di un verme di controllo (A) e dopo esposizione per 28 giorni a un suolo contaminato da 2 mg/Kg di Cr(VI) (B).

L'attività della Ca^{2+} -ATPasi dopo esposizione di *E. andrei* per 28 giorni a diverse concentrazioni subletali di Cr(VI) ha presentato una forte riduzione rispetto ai controlli a tutte le concentrazioni utilizzate, in particolare a quella più alta, ossia 15 mg/Kg (-83% rispetto ai controlli) (Fig. 4).

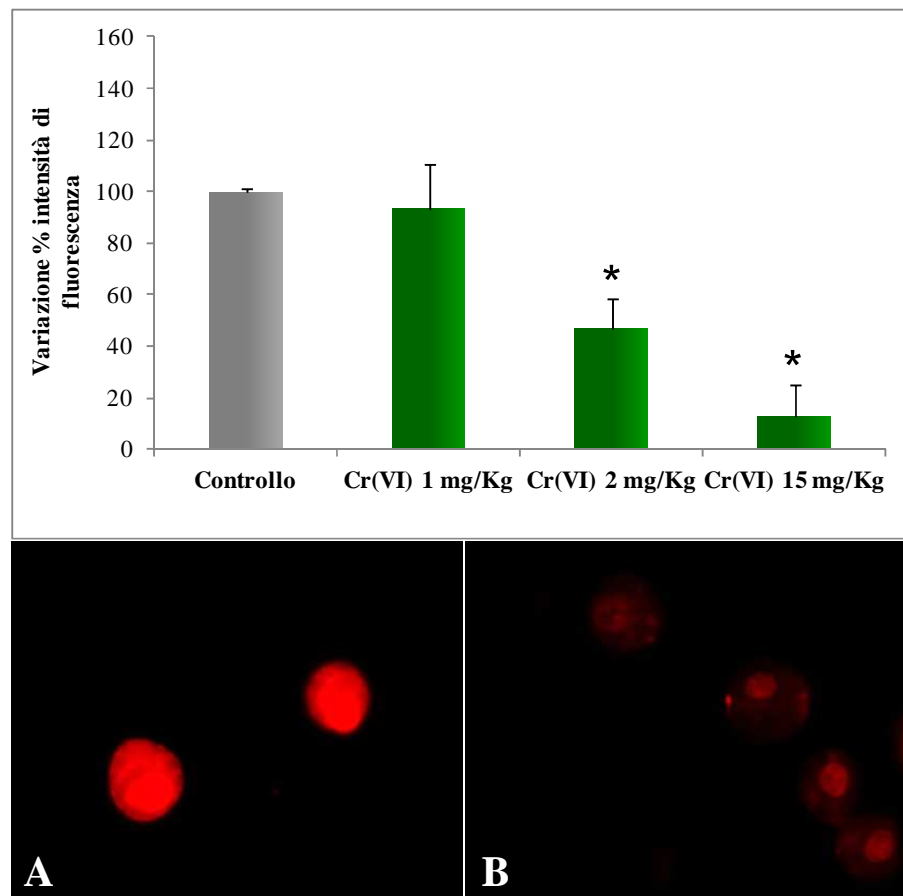


Fig. 5. Effetti indotti da Cr(VI) (1, 2, 15 mg/kg) in suolo artificiale standard, sulla stabilità delle membrane lisosomiali dei celomociti di *E. andrei*, valutato mediante neutral red retention time assay (NRRT) con osservazione in microscopia a fluorescenza, dopo esposizione per 28 giorni. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test). Immagini rappresentative della colorazione con NR in cellule provenienti da vermi di controllo (A) e dopo esposizione a Cr(VI) (B) (15 mg/Kg).

La stabilità delle membrane lisosomiali dei celomociti, valutata con il metodo del Neutral Red Retention Time con osservazione in microscopia a fluorescenza, ha presentato una forte riduzione rispetto al controllo alle due più alte concentrazioni di Cr(VI), ossia 2 mg/Kg (-53% rispetto al controllo) e 15 mg/Kg (-87% rispetto al controllo) (Fig.X).

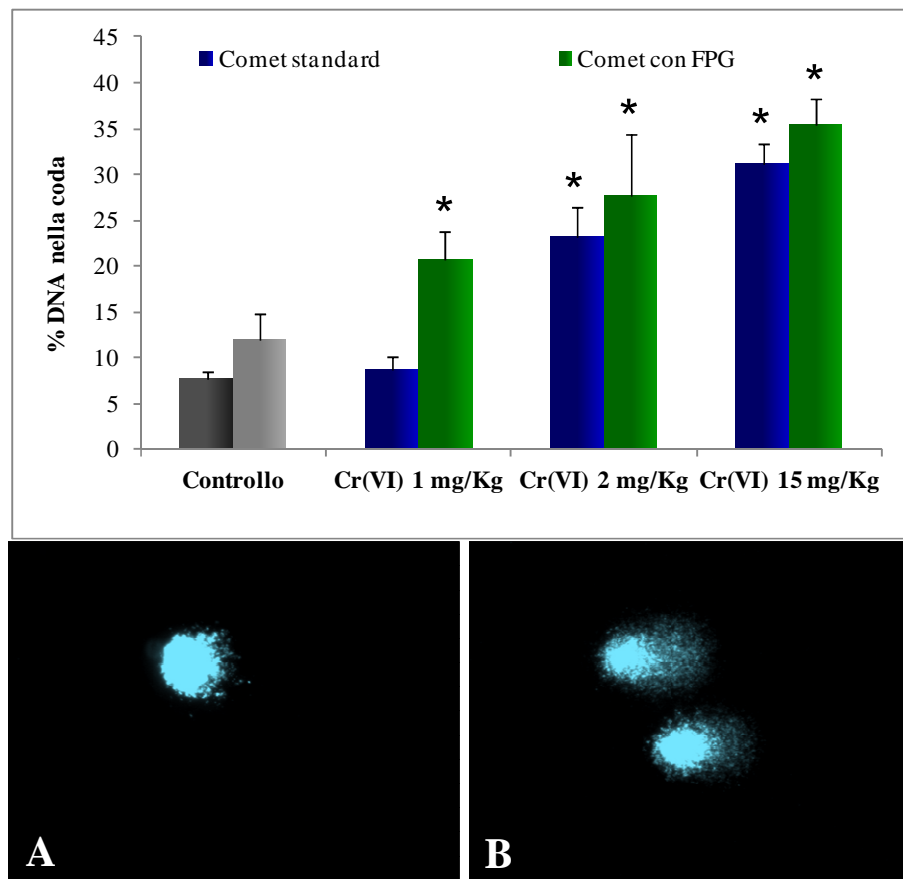


Fig. 6. Effetti indotti da Cr(VI) (1, 2, 15 mg/kg) in suolo artificiale standard, sul danno al DNA valutato mediante Comet assay alcalino (barre blu) e con l'utilizzo dell'enzima Fpg (barre verdi) nei celomociti di *E. andrei* dopo esposizione per 28 giorni. I dati, espressi come percentuale di DNA presente nella coda, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test). Immagini rappresentative del Comet assay condotto in condizioni standard su cellule provenienti da vermi di controllo (A) e dopo esposizione a Cr(VI) (B) (15 mg / Kg).

Il danno al DNA, studiato utilizzando il Comet assay alcalino, ha evidenziato effetti significativi alle due più alte concentrazioni; ossia 2 mg/Kg (+15% rispetto al controllo) e 15 mg/Kg (+23% rispetto ai controlli) (Fig. 6). Il Comet assay alcalino modificato per rilevare il danno ossidativo mediante utilizzo dell'enzima Fpg, ha evidenziato effetti significativi a tutte le concentrazioni di Cr(VI) utilizzate; evidenziano in particolare un incremento del danno al DNA quale danno ossidativo alla più bassa concentrazione (circa +8%).

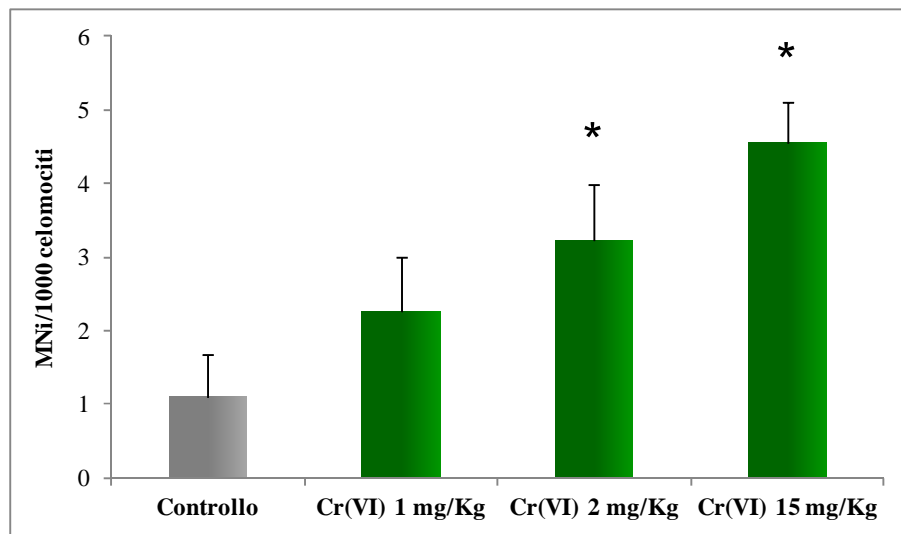


Fig. 7. Effetti indotti da Cr(VI) (1, 2, 15 mg/kg) in suolo artificiale standard sulla frequenza dei micronuclei nei celomociti di *E. andrei*, valutato su almeno 1000 cellule, dopo esposizione per 28 giorni. I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche.* = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test). (A) – (B) – (C) sono immagini rappresentative di celomociti micro nucleati (freccia gialla).

I risultati del test del MN nei celomociti dei vermi esposti al Cr(VI) hanno indicato effetti significativi rispetto ai controlli alle due più alte concentrazioni utilizzate ossia 2 mg/Kg e 15 mg/Kg (rispettivamente 3‰ e 5‰)(Fig. 7).

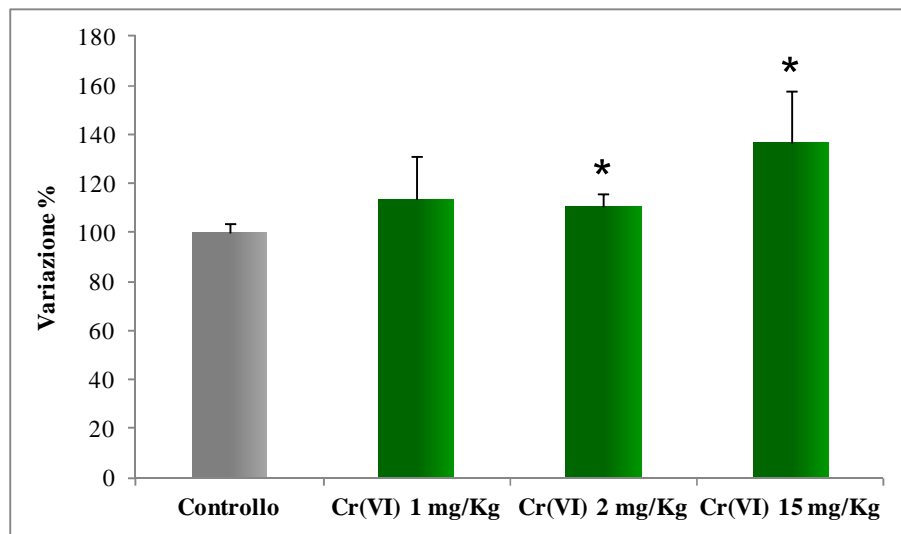


Fig. 8. Effetti indotti da Cr(VI) (1, 2, 15 mg/kg) in suolo artificiale standard, sul rilascio di lattato deidrogenasi nel liquido celomatico di *E. andrei*, dopo esposizione per 28 giorni. I dati, espressi come variazione percentuale di assorbanza, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

I dati relativi al rilascio di lattato deidrogenasi nel liquido celomatico hanno presentato un significativo aumento rispetto al controllo alle due più alte concentrazioni di Cr(VI), in particolare a quella maggiore ossia 15 mg/Kg (+36% rispetto al controllo) (Fig. 8).

Valutazione degli effetti di differenti concentrazioni di Cr(VI) in *E. andrei* utilizzando il filter paper test

I risultati hanno dimostrato che l'esposizione di *E. andrei* per 1 e 3 giorni a differenti concentrazioni di Cr(VI) mediante filter paper test ha indotto notevoli alterazioni dei diversi parametri studiati (Fig. 9-19), sebbene non siano stati evidenziati effetti sul tasso di sopravvivenza e sul peso degli animali.

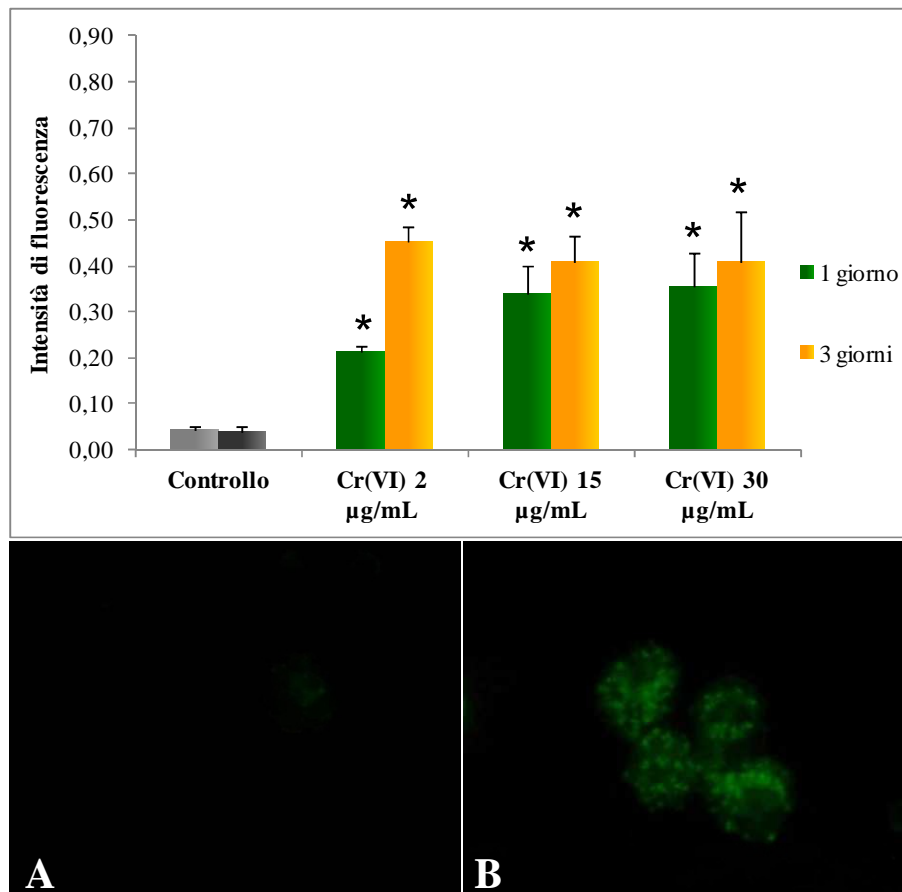


Fig. 9. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml), dopo esposizione di 1giorno (barre verdi) e 3 giorni (barre gialle), sulla produzione di radicale idrossile e anione superossido nei celomociti di *E. andrei* valutato mediante l'utilizzo della sonda TEMPO con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney U test). Immagini rappresentative della colorazione con la sonda fluorescente TEMPO-9-AC in cellule provenienti da vermi di controllo (A) e dopo esposizione a Cr(VI) (B) (30 µg/ml per 3 giorni).

L'utilizzo della sonda fluorescente TEMPO-9-AC, in grado di evidenziare la produzione di radicali ossidrilici e superossido (OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$), ha evidenziato un significativo aumento

dell'intensità di fluorescenza delle cellule dei vermi esposti per 1 giorno a tutte le concentrazioni utilizzate, in modo particolare a quelle maggiori. Dopo 3 giorni di esposizione, la fluorescenza cellulare è risultata più intensa rispetto al 1 giorno, raggiungendo un plateau (Fig. 9).

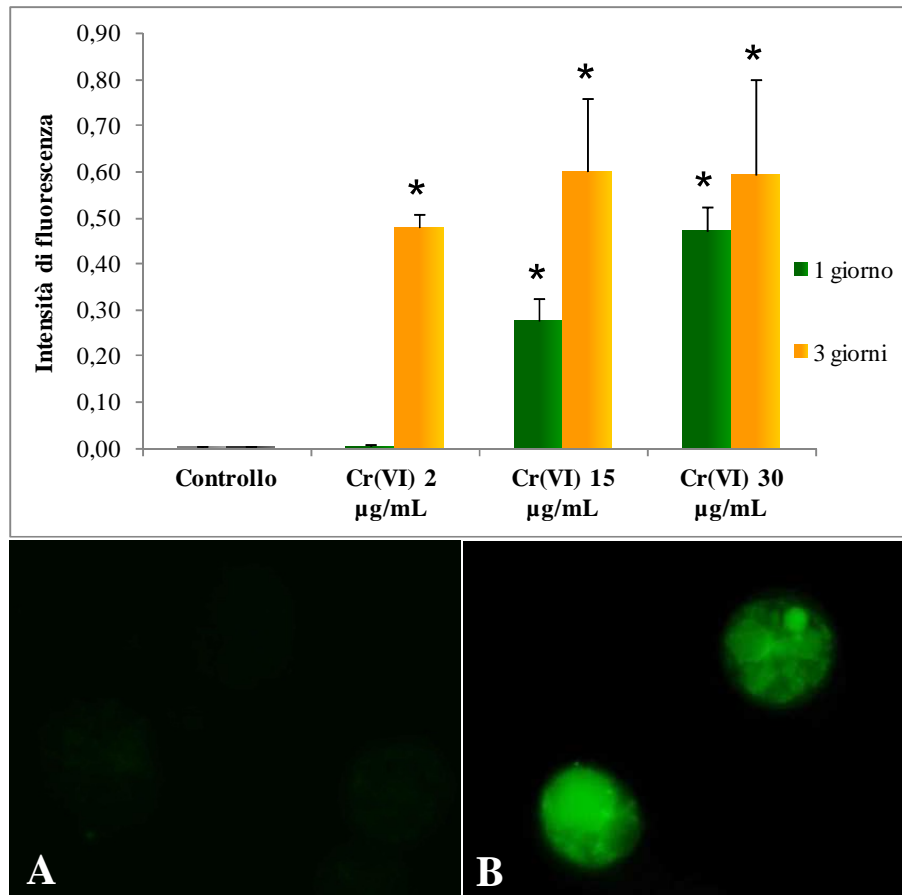


Fig. 10. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml), dopo esposizione di 1 giorno (barre verdi) e 3 giorni (barre gialle), sulla produzione di H₂O₂ e ONOO⁻ nei celomociti di *E. andrei* valutato mediante utilizzo della sonda DHR con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche. * = p < 0,05 (Mann-Whitney U test). Immagini rappresentative della colorazione con la sonda fluorescente DHR in cellule provenienti da vermi di controllo (A) e dopo esposizione a Cr(VI) (B) (15 µg/ml per 3 giorni).

La sonda DHR in grado di evidenziare la produzione di perossido di idrogeno e perossinitrito (H₂O₂ e ONOO⁻), ha indicato, dopo 1 giorno, un significativo incremento della fluorescenza dei celomociti dei vermi esposti alle due più alte concentrazioni, raggiungendo valori massimi dopo 3 giorni (Fig. 10).

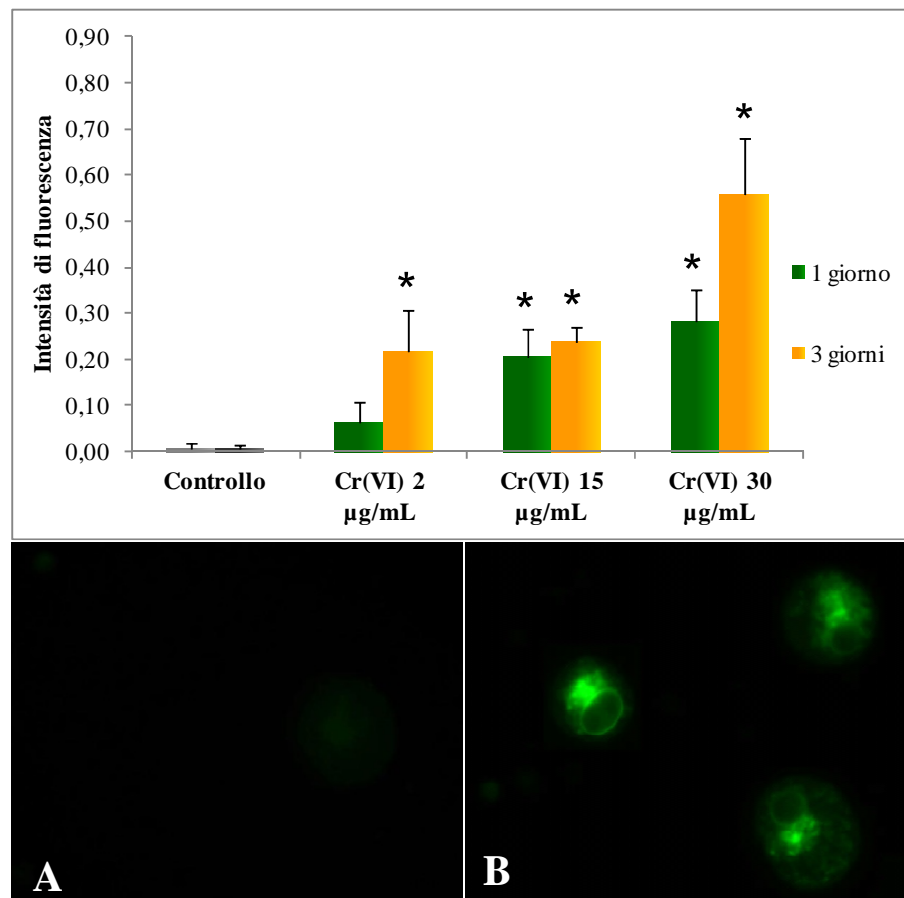


Fig. 11. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml), dopo esposizione di 1 giorno (barre verdi) e 3 giorni (barre gialle) sulla produzione di lipoperossidi nei celomociti di *E. andrei*. valutato mediante utilizzo della sonda Bodipy con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test). Immagini rappresentative della colorazione con la sonda fluorescente BODIPY in cellule provenienti da vermi di controllo (A) e dopo esposizione a Cr(VI) (B) (30 µg/ml per 3 giorni).

La sonda BODIPY, in grado di evidenziare la produzione di lipoperossidi, ha evidenziato un significativo aumento della fluorescenza dei celomociti dei vermi esposti per 1 giorno alle due più alte concentrazioni. Dopo 3 giorni di esposizione, i valori misurati sono risultati significativi a tutte le concentrazioni e superiori rispetto al tempo più breve di esposizione, raggiungendo un valore massimo alla più alta concentrazione (30µg/ml) (Fig. 11).

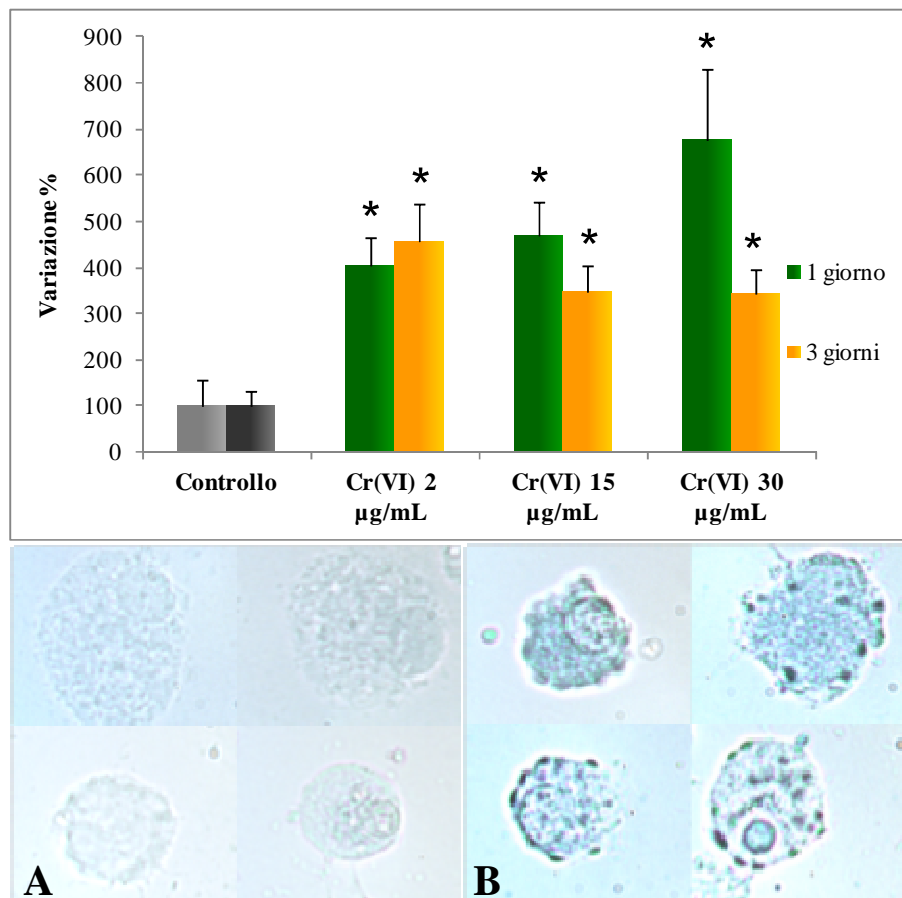


Fig. 12. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml), dopo esposizione di 1 giorno (barre verdi) e 3 giorni (barre gialle), sul contenuto lisosomiale di lipofuscine nei celomociti di *E. andrei*. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test). Immagini rappresentative di cellule provenienti da vermi di controllo (A) e dopo esposizione a Cr(VI) (B) (30 µg/ml per 1 giorno).

Le lipofuscine rappresentano il prodotto finale della perossidazione lipidica (Viarengo, 1989), e si accumulano sottoforma di granuli insolubili all'interno dei lisosomi. I risultati relativi alla valutazione dell'accumulo lisosomiale di lipofuscine nei celomociti ha evidenziato, dopo 1 giorno di esposizione, un aumento statisticamente significativo nel contenuto di lipofuscine alle diverse concentrazioni di Cr(VI). Anche dopo 3 giorni si è misurato un significativo incremento rispetto al controllo, sebbene si sia osservata alle due più alte concentrazioni una certa riduzione dei valori rispetto al tempo più breve di esposizione (Fig. 12).

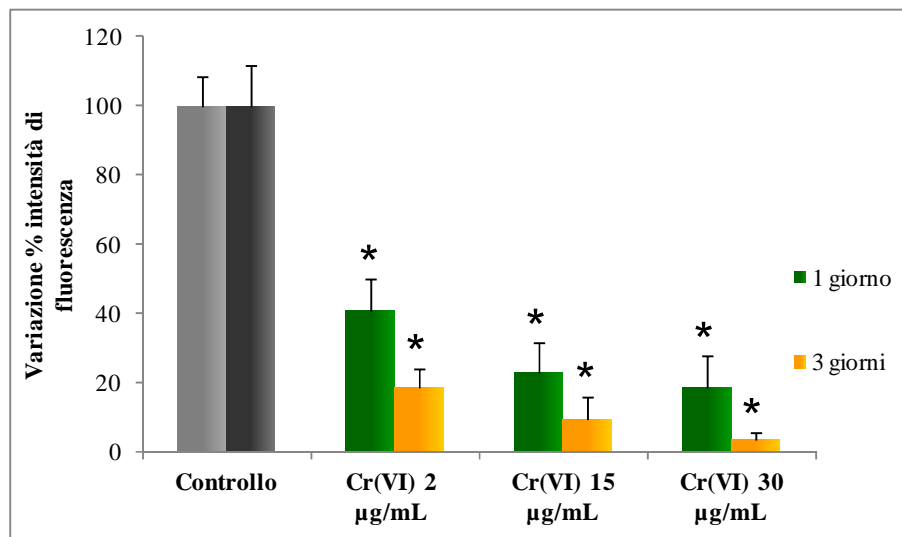


Fig. 13. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml), dopo esposizione di 1 giorno (barre verdi) e 3 giorni (barre gialle), sulla stabilità delle membrane lisosomiali dei celomociti di *E. andrei*, valutata mediante neutral red retention time assay (NRRT) con osservazione in microscopia a fluorescenza. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

La stabilità delle membrane lisosomiali, che, come dimostrato in studi precedenti, rappresenta un indice estremamente sensibile degli effetti indotti dai contaminanti sulle membrane lisosomiali, è un'analisi in grado di evidenziare in *E. andrei* i primi effetti biologici di sostanze tossiche, valutata con il metodo del Neutral Red Retention Time con osservazione in microscopia a fluorescenza, ha presentato una forte riduzione rispetto ai controlli a tutte le concentrazioni utilizzate, già dopo 1 giorno di esposizione (Fig. 13).

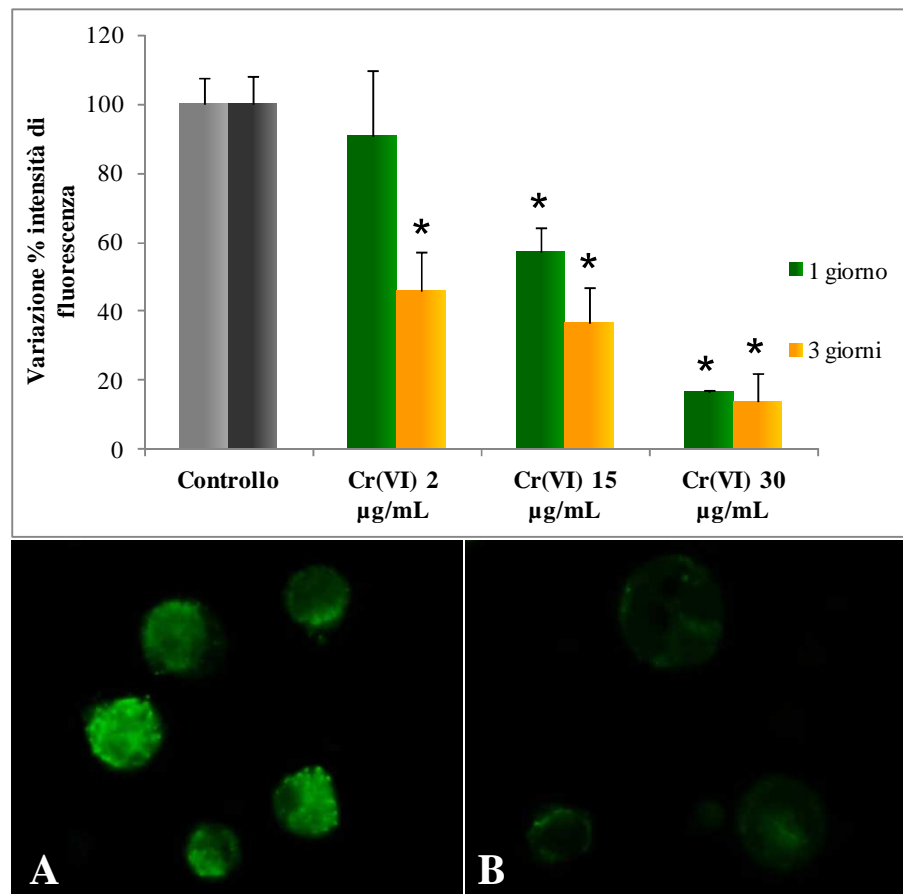


Fig. 14. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml) sull'attività mitocondriale dei celomociti di *E. andrei* dopo esposizione per 1 giorno (barre verdi) e 3 giorni (barre gialle). I dati rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche (* = $p < 0,05$ Mann-Whitney *U* test). Immagini rappresentative della colorazione fluorescente ottenuta mediante utilizzo della sonda Mitotracker dei mitocondri dei celomociti di organismi di controllo (A) e dopo esposizione a Cr(VI) (B) (15 µg/ml per 3 giorni).

I dati relativi alla funzionalità mitocondriale dei celomociti di *E. andrei* dopo esposizione per 1 e 3 giorni a differenti concentrazioni di Cr(VI) mediante filter paper test, sono stati ottenuti utilizzando della sonda fluorescente MitoTracker, l'utilizzo di tale sonda evidenzia la diminuzione del potenziale della membrana mitocondriale interna. I mitocondri svolgono un ruolo molto importante nella generazione di energia metabolica nelle cellule eucariotiche, producono la per la maggior parte dell'energia che viene prodotto dalla disgregazione dei carboidrati e acidi grassi, e viene convertita in ATP dal processo di fosforilazione ossidativa. I risultati ottenuti (Fig. 14) hanno evidenziato, dopo 1 giorno di esposizione, un decremento di tale parametro proporzionale alla dose di esposizione al Cr(VI), che è risultato significativo alle due più alte concentrazioni. Nelle cellule dei vermi esposti al Cr(VI) per 3 giorni, si è

osservato, rispetto al tempo più breve di esposizione, una ulteriore riduzione dell'attività mitocondriale, che è risultata significativa a tutte le concentrazioni utilizzate.

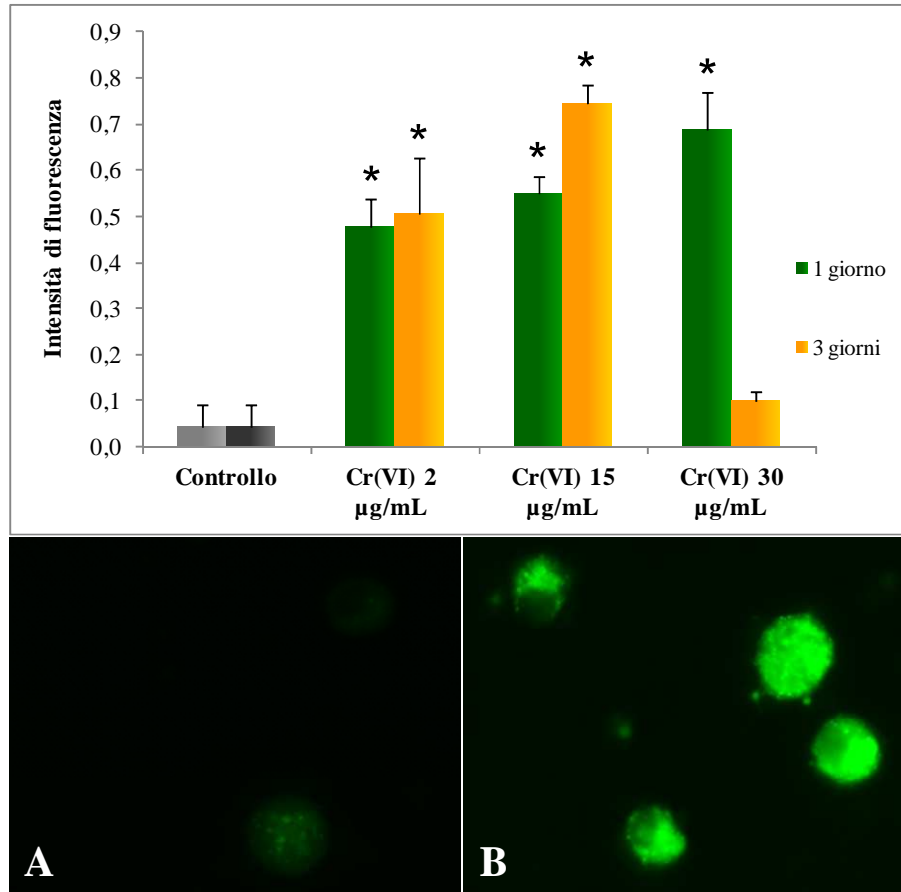


Fig. 15. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml) sull'accumulo lisosomiale di proteine nei celomociti di *E. andrei* esposti per 1 giorno (barre verdi) e 3 giorni (barre gialle). I dati, espressi come intensità di fluorescenza rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test. Immagini rappresentative della colorazione fluorescente ottenuta mediante utilizzo della sonda FITC dei mitocondri dei celomociti di organismi di controllo (A) e dopo esposizione a Cr(VI) (B) (30 µg/ml per 1 giorno).

L'utilizzo della sonda fluorescente FITC, per la valutazione dell'accumulo di proteine nei lisosomi, ha evidenziato un significativo aumento dell'intensità di fluorescenza delle cellule dei vermi esposti per 1 giorno a tutte le concentrazioni utilizzate, in modo particolare a quelle maggiori. Dopo 3 giorni di esposizione, la fluorescenza cellulare è risultata più intensa rispetto al 1 giorno, alle due più basse concentrazioni, mentre alla più alta concentrazione vi è stato un decremento di tale valore, che ha raggiunto valori simili al controllo (Fig. 15).

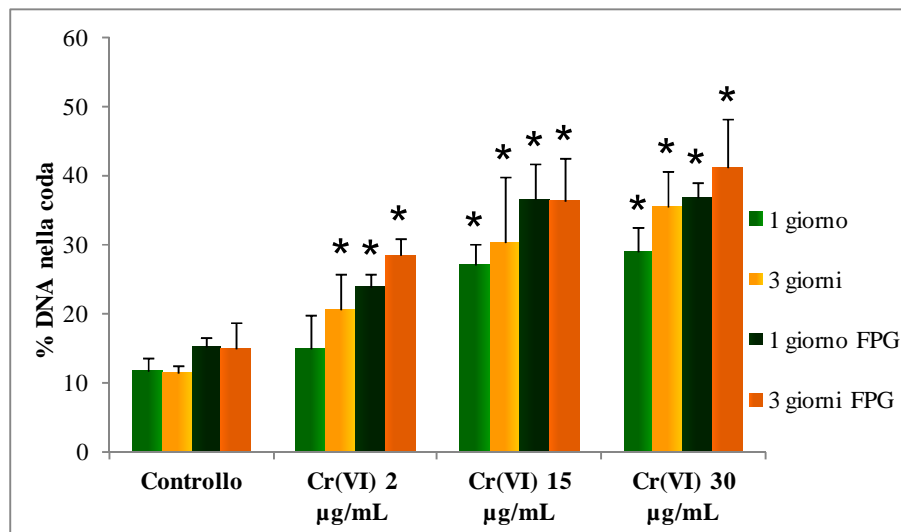


Fig. 16. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml), sul danno al DNA valutato mediante Comet assay alcalino condotto secondo il metodo standar e con l'utilizzo dell' enzima Fpg nei celomociti di *E. andrei* dopo esposizione di 1giorno (barre verdi chiaro e verde scuro) e 3 giorni (barre gialle e arancioni). I dati, espressi come percentuale di DNA presente nella coda, rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

Sia il Comet assay alcalino standard sia quello modificato per evidenziare il danno ossidativo hanno indicato un incremento statisticamente significativo del livello del danno al DNA a tutte le concentrazioni di Cr(VI), sia dopo 1 che dopo 3 giorni di esposizione (Fig. 16). Al tempo più breve di esposizione si è osservato un maggiore incremento tra l'analisi condotta con metodo standard e quella condotta mediante l'utilizzo dell'enzima Fpg; in particolare l'analisi statistica ha mostrato incrementi statisticamente significativi a tutte le concentrazioni dopo 1 giorno di esposizione tra il Comet assay standar e quello con Fpg. Dopo 3 giorni di esposizione i livelli di danno al DNA risultano maggiori che ad 1 giorno, ma le differenze tra comet assay standard ed con Fpg non risultano statisticamente significative, questo dato potrebbe essere interpretato come una maggiore conversione in rotture del filamento dei siti con basi ossidate a causa dello stress ossidativo.

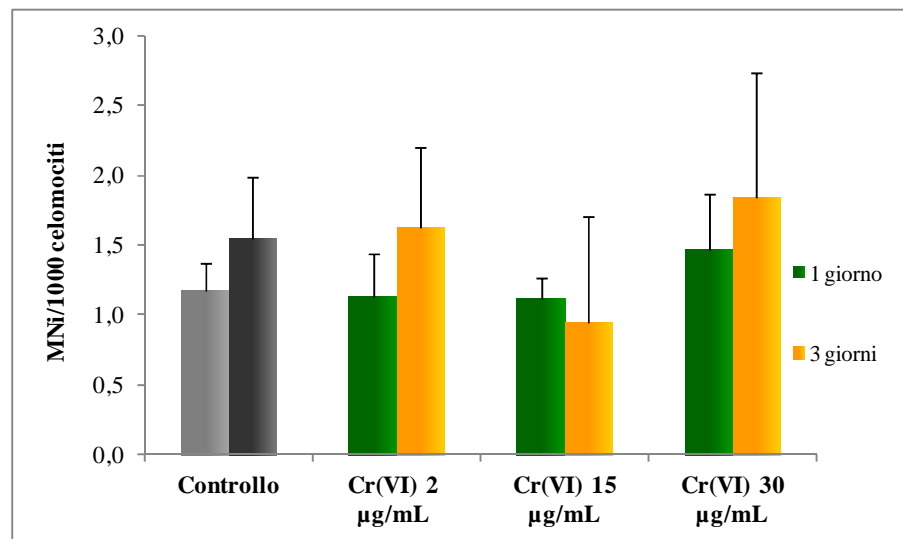


Fig. 17. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml), dopo esposizione di 1 giorno (barre verdi) e 3 giorni (barre gialle), sulla frequenza dei micronuclei nei celomociti di *E. andrei*, valutato su almeno 2000 cellule. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

I risultati del test del MN nei celomociti dei vermi esposti al Cr(VI) per 1 e 3 giorni non hanno indicato effetti significativi rispetto ai controlli (Fig. 17).

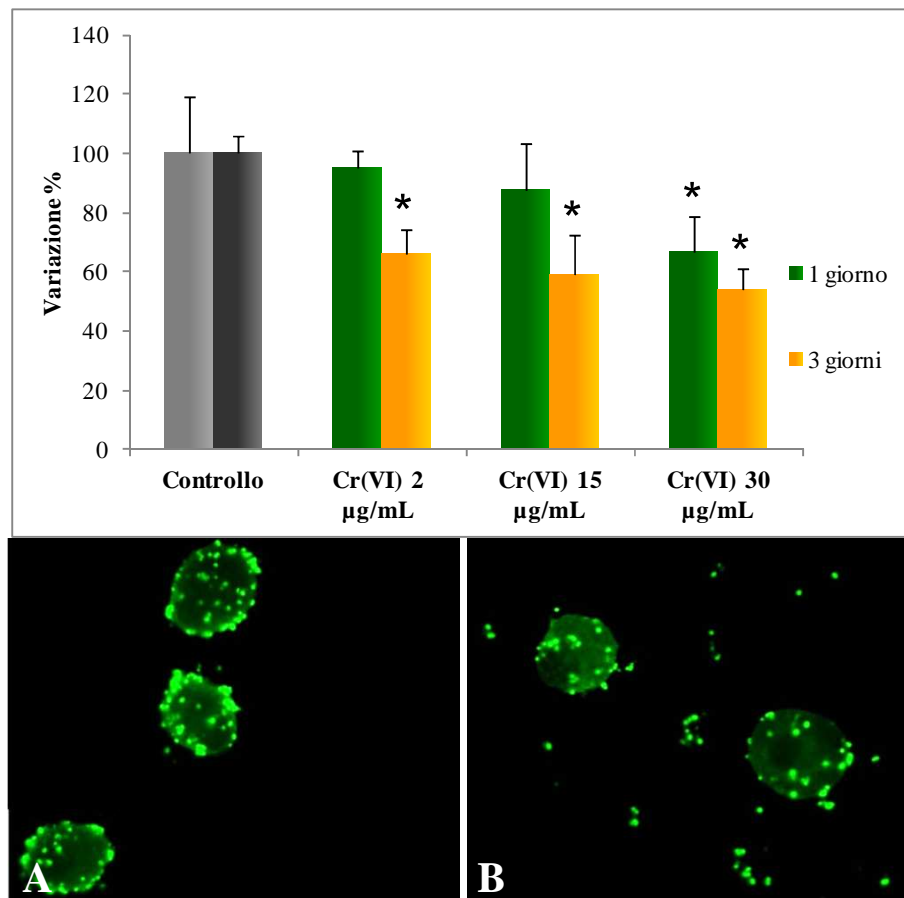


Fig. 18. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml), dopo esposizione di 1 giorno (barre verdi) e 3 giorni (barre gialle), sul tasso di fagocitosi. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney U test). Immagini rappresentative di celomociti di controllo (A) e dopo esposizione a Cr(VI) (30 µg/ml per 1 giorno).

Il tasso di fagocitosi ha presentato, dopo 1 giorno di esposizione, una significativa riduzione rispetto ai controlli alla più alta concentrazione. L'esposizione degli animali al Cr(VI) per 3 giorni, è risultato in significativo decremento a tutte le concentrazioni utilizzate (Fig. 18).

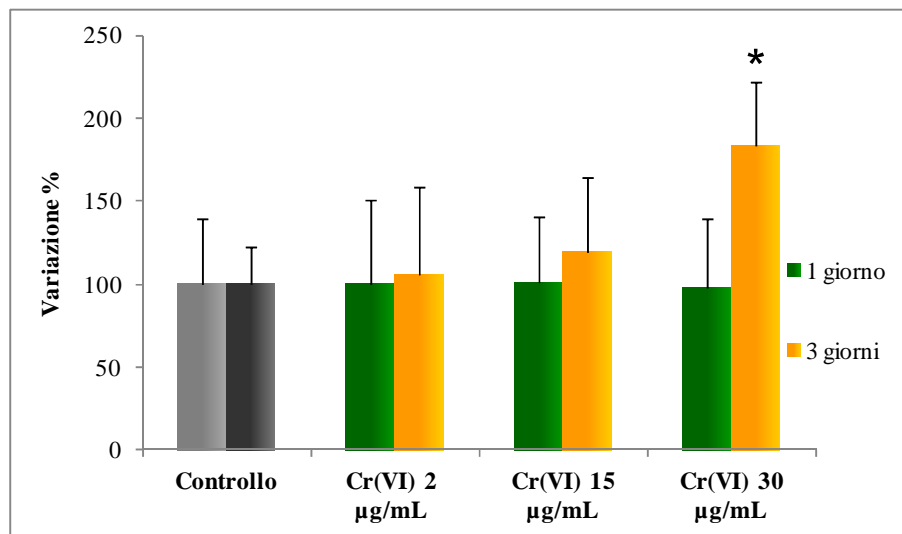


Fig. 19. Effetti indotti dal Cr(VI) (2, 15, 30 µg/ml), dopo esposizione di 1giorno (barre verdi) e 3 giorni (barre gialle), sul rilascio lattato deidrogenasi nel liquido celomatico. I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media±DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

I dati relativi al rilascio dell'enzima lattato deidrogenasi, normalmente presente nel citosol dei celomociti, nel liquido celomatico hanno presentato un incremento statisticamente significativo rispetto al controllo nei vermi esposti per 3 giorni alla più alta concentrazione di Cr(VI) ossia 30 µg/ml (+77% rispetto al controllo) (Fig. 19).

4.2.2 Discussione

In questo studio sono stati condotti esperimenti per valutare gli effetti indotti da concentrazioni ambientalmente rilevanti di cromo esavalente nel verme *E. andrei*; per tanto sono state valutate le risposte di differenti parametri fisiologici dopo 28 giorni di esposizione degli animali a diverse concentrazioni di tale inquinante miscelato a suolo standard artificiale (OECD, 2004). Le concentrazioni di Cr(VI) utilizzate sono state, a partire dalla più bassa, i) il valore corrispondente alla metà del limite di legge italiano per suoli residenziali (1 mg/kg), ii) il limite di legge per i suoli residenziali (2 mg/kg), iii) il limite di legge per i suoli industriali (15 mg/kg). In assenza di effetti sulla mortalità e sul tasso di riproduzione degli animali, i biomarker utilizzati hanno permesso di evidenziare alterazioni significative di diversi parametri. I risultati relativi all'accumulo lisosomiale di lipofuscine e di lipidi neutri valutati nelle cellule del tessuto cloragogeno dei vermi esposti alle diverse concentrazioni di Cr(VI) non hanno indicato effetti significativi rispetto al controllo. Nelle cellule di questo tessuto, non si sono evidenziati effetti anche per quanto riguarda il rapporto lisosomi/citoplasma, un parametro in grado di rilevare un danno a livello tissutale. Nei vermi, il tessuto cloragogeno è deputato all'accumulo di nutrienti e prodotti di scarto del catabolismo cellulare ed assunzione e detossificazione di sostanze tossiche (Ireland et Richards, 1977; Morgan et Morgan, 1988). Diversi autori indicano che le cellule danneggiate di questo tessuto possono essere eliminate attraverso i pori siti lungo l'epidermide e attraverso il celoma permettendo la formazione di nuove cellule (Honeycutt et al., 1995). I risultati ottenuti potrebbero essere interpretati non solo come assenza di effetti tossici del Cr(VI) nei vermi, ma anche come eliminazione di cellule danneggiate dall'accumulo di sostanze tossiche e rigenerazione del tessuto cloragogeno nei vermi trattati. Diversi studi hanno indicato che l'eliminazione di cellule dal tessuto cloragogeno può verificarsi nei vermi quale meccanismo per eliminare scorie e

sostanze tossiche (Fischer et Molnár, 1992; Cancio et al., 1995). Tale interpretazione potrebbe risultare plausibile anche considerando che, studi precedenti, hanno chiaramente indicato che l'accumulo lisosomiale di lipofuscine e lipidi neutri nei vermi hanno un andamento a campana. Tenendo conto dei dati ottenuti sulla valutazione della stabilità delle membrane lisosomiali e sulla valutazione dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi si può ipotizzare che sia in atto una sindrome da stress. Dopo 28 giorni di esposizione degli animali al Cr(VI), nuovi clorogociti potrebbero pertanto essersi rigenerati portando alla formazione di tessuto nuovo che, come indicato dai risultati del rapporto lisosomi/citoplasma, che non presenta nessuna alterazione statisticamente significativa.

Tutte le concentrazioni di Cr(VI) utilizzate hanno fortemente inibito la attività della Ca^{2+} -ATPasi a livello dell'epitelio intestinale. E' importante sottolineare come anche alle più basse concentrazioni vi è stato un forte decremento della funzionalità dell'enzima (circa 69%), che arriva fino ad un -83% alla più alta concentrazione. E' noto che la tossicità degli inquinanti a livello cellulare agisce primariamente sulle membrane biologiche, coinvolgendo i meccanismi di omeostasi dei vari ioni (Moore, 1985; Viarengo, 1989). Le Ca^{2+} -ATPasi sono fondamentali per regolare la concentrazione del $[\text{Ca}^{2+}]$ nelle cellule eucariote (Rasmussen et Barret, 1984; Pederson et Carafoli, 1987; Carafoli, 1991(b); Di Leva et al., 2008), pertanto una riduzione della loro funzionalità, indotta da inquinanti, può comportare un aumento del calcio nel citosol che può causare citotossicità ed eventualmente nei casi più estremi morte cellulare (Nicotera et al., 1988; Viarengo et Nicotera, 1991; Burlando et al., 2004). Studi precedenti condotti sul verme *E. andrei*, esposto a concentrazioni subletali di metalli pesanti e di idrocarburi policiclici aromatici, hanno prodotto effetti sulla funzionalità della Ca^{2+} -ATPasi (Gastaldi et al., 2007).

I biomarker valutati sui celomociti di *E. andrei* hanno messo in evidenza variazioni significative rispetto al controllo. In particolare, si è osservato una forte riduzione della stabilità delle membrane lisosomiali alle due più alte concentrazioni di Cr(VI) (rispettivamente -53% e -87%). E' stato dimostrato in studi precedenti che tale parametro, valutato mediante Neutral Red retention time con osservazione in microscopia a fluorescenza, rappresenta un indice estremamente sensibile della condizione cellulare, in grado di evidenziare in *E. andrei* i primi effetti biologici di sostanze tossiche (Moore, 1985; Viarengo, 1989; Köhler et al., 2002; Sforzini et al., 2011).

Anche i risultati relativi ai biomarker di genotossicità ossia Comet assay alcalino e test dei micronuclei hanno evidenziato effetti significativi nei vermi esposti rispetto agli organismi di controllo. In particolare, alle due più alte concentrazioni, è stato misurato un aumento statisticamente significativo del livello del danno al DNA. Il Comet assay è un test di genotossicità ampiamente utilizzato, in grado di evidenziare il danno al DNA in singole cellule sia nei vertebrati che negli invertebrati (Singh et al., 1988; Fairbairn et al., 1995; Lee et Steinert, 2003; Faust et al., 2004; Siu et al., 2004). Il Comet assay condotto con metodo alcalino standard (Singh et al., 1988), permette di rilevare rotture del singolo e del doppio filamento, e mette in evidenza i siti alcali-labili. Sono stati condotti numerosi studi i per determinare i meccanismi attraverso cui i metalli pesanti provocano i loro effetti genotossici e cancerogeni; è ormai noto che molti metalli pesanti compreso il cromo sono in grado di alterare la struttura e l'integrità del DNA, sia direttamente che indirettamente ad esempio inducendo la produzione di ROS. Considerati i meccanismi di tossicità dell'inquinante nelle cellule dei mammiferi (riduzione del Cr(VI) a Cr(III) con la formazione di intermedi reattivi (Cr(V)/Cr(IV)) e specie reattive dell'ossigeno -ROS) si è deciso di introdurre nella metodica del Comet assay alcalino l'utilizzo di enzimi specifici per la rilevazione anche del danno ossidativo al DNA. Sono stati messi a punto due metodi: uno prevede l'utilizzo della

formamidopyrimidine DNA glicosilasi (Fpg), un enzima specifico per le purine ossidate, tra cui 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua), 2,6-diammino-4-idrossi-5-formamidopyrimidine e 4,6-diammino-5-formamidopyrimidine ed altre purine (Dusinska et Collins, 1996). L'altro metodo prevede l'utilizzo dell'enzima endonucleasi III (ENDOIII) che riconosce le pirimidine ossidate, tra cui timina glicole e uracile glicole (Collins et al., 1993). Considerato che diversi studi su cellule umane hanno evidenziato la formazione della 8-oxoGua dopo esposizione a Cr(VI) (Hodges et al., 2001), in questo lavoro è stato utilizzato il Comet assay alcalino con Fpg. I risultati hanno evidenziato un significativo aumento del danno ossidativo al DNA in particolare alla più bassa concentrazione di Cr(VI) utilizzata. L'esposizione per 28 giorni a Cr(VI) ha indotto effetti significativi sulla frequenza dei micronuclei alle due più alte concentrazioni, ossia quelle corrispondenti rispettivamente al limite di legge italiano per i suoli residenziali e quello per i suoli industriali. Diversi studi hanno dimostrato che i celomociti sono cellule sensibili nel rilevare alterazioni al DNA indotte da composti genotossici (Manerikar et al., 2008; Bonnard et al., 2009; Song et al., 2009; Bigorgne et al., 2010; Lourenço et al., 2010; Sforzini et al., 2012). Il Comet assay evidenzia lesioni primarie al DNA, che tuttavia possono essere bilanciate dai meccanismi di riparo, mentre il test dei micronuclei rileva il danno genotossico accumulato durante la vita cellulare (Fenech, 1993; Bolognesi et al., 2004; Bolognesi and Hayashi, 2011). I micronuclei, infatti, derivano da frammenti di cromosomi e/o interi cromosomi che non sono incorporati nei nuclei figli durante la mitosi (Heddle et al., 1983; Fenech, 2000). Pertanto, le diverse informazioni provenienti dalle due prove - il Comet test e il test dei micronuclei - giustifica la loro applicazione combinata in *E. andrei* per individuare gli effetti genotossici indotti in questi invertebrati da contaminanti ambientali (Sforzini et al., 2012).

Inoltre negli organismi esposti mediante test con suolo artificiale alle diverse concentrazioni di Cr(VI) è evidenziato un incremento statisticamente significativo del rilascio di LDH alle

due più alte concentrazioni; la lattatodeidrogenasi è un enzima intracellulare che catalizza l'ossidazione reversibile dell'acido lattico ad acido piruvico; è uno dei più importanti biomarker proteici nei liquidi extracellulari, poiché la sua concentrazione varia in risposta a numerosi tipi di stress, in quanto le cellule con plasmamembrane danneggiate rilasciano l'enzima. Questa nuova metodica è stata ideata per valutare la citotossicità determinata da sostanze xenobiotiche di diverso tipo. Complessivamente, i risultati ottenuti in questa prima parte dello studio, hanno indicato che le concentrazioni di Cr(VI) utilizzate, che rappresentano i) la metà del limite di legge italiano per suoli residenziali, ii) il limite di legge per i suoli residenziali, iii) il limite di legge per i suoli industriali hanno provocato in *E. andrei* effetti tossici subletali e genotossici, come evidenziato, in particolare, nelle cellule del liquido celomatico.

Al fine di approfondire alcuni aspetti relativi ai primi effetti indotti da tale elemento nei vermi, e tenuto conto dei risultati ottenuti nello studio mediante test con suolo artificiale, nella seconda parte di questo studio si è deciso di valutare alcune risposte provocate dal Cr(VI) nei celomociti di *E. andrei* dopo 1 e 3 giorni di esposizione degli animali a differenti concentrazioni di tale inquinante mediante filter paper test (OECD, 1984). Le concentrazioni di Cr(VI) utilizzate sono state: 2 µg/ml, 15 µg/ml e 30 µg/ml. Le cellule del liquido celomatico rivestono un ruolo molto importante nelle difese immunitarie dei vermi, ossia difesa antimicrobica, reazioni di incapsulamento, guarigione delle ferite, fagocitosi, meccanismi di difesa cellulare (Byzova, 1974; Cooper et Stein, 1981; Valembosis et al., 1982, 1992, 1994.; Cooper, 1996; Cossarizza et al., 1996; Dhainaut et Scaps, 2001; Plytycz et al., 2006; Manerikar et al., 2008). Su queste cellule sono stati sviluppati numerosi biomarker che permettono di evidenziare sensibili risposte fisiologiche indotte negli animali da sostanze tossiche quali, ad esempio, la stabilità delle membrane lisosomiali (Sforzini et al., 2011), fagocitosi (Goven et al., 1993; Hankard et al., 2004) e rilascio di LDH per la valutazione della

funzionalità di tali cellule. Quale parametro in grado di evidenziare alterazioni della fisiologia cellulare è stata messa a punto una nuova metodica per valutare la funzionalità mitocondriale. Inoltre, durante questo studio è stato indagato lo stress ossidativo indotto dal Cr(VI) valutando la produzione radicalica mediante sonde fluorescenti, per valutare le variazioni della produzione intracellulare di specie reattive dell'ossigeno quali ROS, l'accumulo lisosomiale di lipofuscine e il danno al DNA di tipo ossidativo. Come accennato in precedenza la tossicità del Cr(VI) dipende dalla produzione intracellulare di ROS. Arillo e Melodia(1991), hanno osservato che, diversi sistemi metabolici in *E. fetida* sono competenti per ottenere una riduzione intracellulare Cr(VI). Infatti è noto il Cr (VI) attraversa rapidamente le membrane cellulari attraverso i canali anionici non specifici quali $(\text{SO}_4)^{2-}$ e $(\text{HPO}_4)^{2-}$ ed entra nel citoplasma (Codd et al., 2001). Processi cellulari riducenti presenti all'interno delle cellule sono in grado di ridurre Cr(VI) a Cr(V) (Shi et al., 1999; Manerikar et al., 2008). Durante il processo di riduzione, molecolare vengono prodotti: radicale superossido ($\text{O}_2 \bullet$), H_2O_2 , e radicale idrossile ($\bullet \text{OH}$) (Shi et al., 1999; Manerikar et al., 2008). Lo stress ossidativo indotto, causa rotture del filamento di DNA, modificazione di basi, la perossidazione dei lipidi e le alterazioni delle proteine (Liu et al., 2001) che portano fino ad apoptosi e morte cellulare (Singh et al., 1988; Kasprzak , 2002; Manerikar et al., 2008). Si ha quindi una riduzione del Cr (VI) a Cr (III), la forma più stabile tra i diversi stati di ossidazione, attraverso la formazione di intermedi reattivi quali Cr (V) e Cr (IV) (Shi et al., 1999; Manerikar et al., 2008). I risultati ottenuti hanno evidenziato, in assenza di effetti sulla vitalità cellulare, variazioni dose- e tempo-dipendenti dei diversi parametri valutati sui celomociti dei vermi trattati. In assenza di effetti sulla sopravvivenza degli animali e sulla vitalità delle cellule utilizzate negli esperimenti, l'utilizzo dei diversi parametri valutati sui celomociti di *E. andrei* ha permesso di evidenziare effetti biologici nei vermi esposti alle diverse concentrazioni subletali di Cr(VI). Dai risultati ottenuti si deduce che l'esposizione degli animali per 1 e 3

giorni alle minime concentrazioni del contaminante utilizzato in questi esperimenti ha provocato un aumento dei livelli cellulari di ROS. Alle concentrazioni più alte, già dopo 1 giorno di esposizione, è stato possibile evidenziare un incremento dei livelli cellulari di ROS. Inoltre, dopo 3 giorni, il Cr(VI) ha provocato rilevanti alterazioni funzionali ed ha indotto un aumento del contenuto lisosomiale di lipofuscine e del danno ossidativo al DNA, messo in evidenza con l'utilizzo dell'enzima Fpg. L'accumulo lisosomiale di lipofuscine e il danno ossidativo al DNA hanno confermato i dati ottenuti sulla produzione radicalica, infatti entrambi i biomarker mostrano incrementi statisticamente significativi a tutte le concentrazioni testate a 1 e 3 giorni, inoltre le condizioni di stress ossidativo generatosi nelle cellule ha determinato il verificarsi di diversi effetti tra cui perossidazione lipidica delle membrane. E' importante evidenziare che lo stress ossidativo ha rappresentato un fattore importante nella tossicità e genotossicità di tale contaminante nei celomociti dei vermi, ma non esclusivo. La stabilità delle membrane lisosomiali (biomarker di stress) e il danno al DNA, valutato mediante Comet assay alcalino standard (ossia senza l'utilizzo dell'enzima Fpg) nelle cellule dei vermi trattati hanno presentato valori fortemente alterati rispetto al controllo.

E' stata inoltre messa a punto una nuova metodica che prevede l'utilizzo di una sonda fluorescente per la valutazione della funzionalità mitocondriale. I risultati ottenuti hanno indicato una riduzione di tale parametro già dopo un giorno di esposizione degli animali alle dosi maggiori, mentre dopo tre giorni si è osservato, rispetto al tempo più breve di esposizione, una ulteriore riduzione del potenziale della membrana mitocondriale interna, che è risultata significativa a tutte le concentrazioni utilizzate. La valutazione dell'accumulo di proteine nei lisosomi è una nuova metodica ed è stata realizzata mediante l'utilizzo della sonda fluorescente FICH. I dati raccolti mostrano un aumento statisticamente significativo di tale parametro a tutte le concentrazioni e i tempi studiati, fatta eccezione per la più alta

concentrazione a 3 giorni. L'autofagia è un processo che svolge un ruolo importante nella degradazione delle proteine intracellulari, soprattutto in condizioni di stress o danno cellulare (Moore et al., 2008). Numerosi studi suggeriscono che l'autofagia sia indotta da stress in cellule animali, compresi quelle di invertebrati, pesci e mammiferi (Klionsky et al., 2007; Moore et al., 2007). In particolare, l'esposizione di animali a sostanze chimiche inquinanti (metalli e xenobiotici organici) è nota per indurre nelle cellule alterazioni patologiche, che coinvolgono frequentemente alterazioni lisosomiali ed autofagia (Moore, 1990; Lowe et al., 1995(a), (b)). Questi ultimi comprendono una maggiore fragilità della membrana lisosomiale, l'aumento delle dimensioni dei lisosomi e in alcuni casi lipidosi. L'esposizione per 1 e 3 giorni al Cr(VI) ha causato una riduzione del tasso di fagocitosi, in particolare dopo 1 giorno alla concentrazione più alta e dopo 3 giorni la riduzione è stata significativa a tutte le concentrazioni studiate. I risultati relativi alla valutazione della frequenza dei micronuclei non hanno indicato effetti significativi rispetto al controllo; ciò non sorprende in quanto, come evidenziato in studi precedenti utilizzando diverse sostanze, il periodo di esposizione degli animali per 1-3 giorni non sembra sufficiente per la replicazione cellulare che, come accennato in precedenza, è essenziale per la rilevazione del danno cromosomico.

Il dosaggio della lattato deidrogenasi (LDH) nel liquido celomatico risulta aumentata dopo 3 giorni di incubazione degli organismi alla più alta concentrazione. Come accennato in precedenza si ha un danno alle membrane cellulari vi è rilascio di LDH nel liquido celomatico. I dati raccolti sembrano supportare l'ipotesi di una azione tossica e genotossica diretta del contaminante (Cr(VI) e intermedi reattivi) sui differenti componenti intracellulari, dove si sono evidenziate alterazioni a carico dei lisosomi, ma anche il comparto mitocondriale, e pertanto la sintesi di ATP, risulta in parte compromessa.

4.3. Valutazione degli effetti indotti in *E. andrei* esposti a suoli di campo contaminati da Cr(VI)

La contaminazione da metalli pesanti è un grave problema per l'ambiente, in quanto le attività antropiche di estrazione mineraria, di lavorazione e l'utilizzo di questi metalli sono aumentati enormemente nel corso degli ultimi decenni e pertanto i metalli sono diventati fonti di inquinamento (Dhal et al., 2013). L'uso diffuso di cromo nelle industrie ha portato a numerosi casi di contaminazione ambientale da questo elemento. Il cromo è uno dei contaminanti metallici utilizzati più frequentemente ed è considerato uno tra i 20 contaminanti presenti nell'elenco delle priorità delle sostanze pericolose per i 15 anni passati (Chrysochoou et al., 2012) . Il cromo è presente in diversi stati di ossidazione , che vanno dal Cr(II) al Cr(VI) , ma nel suolo le forme più stabili e comuni sono il Cr (III) e il Cr (VI) (Fendorf, 1995). Il cromo esavalente è solubile in acqua, mentre il cromo trivalente tende ad essere adsorbito sulla superficie del suolo o a precipitare come idrossido di cromo. Nella sua forma esavalente, la U.S. Environmental Protection Agency (EPA) ha classificato il cromo come appartenente al gruppo "A" cancerogeno per l'uomo ed è uno dei principali inquinanti. Il cromato [Cr(VI)] è presente nei rifiuti liquidi/solidi dovuti alle attività umane, attività minerarie, produzione di acciaio, parti di automobili , del cemento, di pigmenti di vernice e coloranti, lavorazione di metalli e del cuoio (Kamaludeen et al., 2003). Il cromo esavalente è un contaminante pericoloso perché si diffonde facilmente oltre il sito di contaminazione iniziale attraverso sistemi acquatici superficiali e delle acque sotterranee. In questo studio è stata valutata la qualità di un suolo contaminato prevalentemente da Cr(VI). La qualità del suolo è stata valutata mediante l'utilizzo del verme terrestre *E. andrei* esposto per 28 giorni al suolo di campo opportunamente preparato. Le analisi chimiche hanno evidenziato una contaminazione prevalentemente dovuta a Cr(VI) ivi presente ad una concentrazione

relativamente elevata pari a 175mg/Kg. Tale valore risulta essere più di 11 volte la concentrazione del Cr(VI) previsto dalla normativa come limite di legge per i suoli industriali (15 mg/Kg). Al termine dell'incubazione, in assenza di effetti sulla mortalità sono stati valutati parametri fisiologici a diversi livelli di complessità funzionale, partendo dal livello molecolare fino a quello cellulare e di tessuto/organismo

4.3.1. Risultati

I risultati hanno dimostrato che l'esposizione di *E. andrei* per 28 giorni ad un suolo di campo contaminato in prevalenza da Cr(VI) ha indotto cambiamenti nei diversi biomarker analizzati (Fig. 1-9), pur senza mostrare effetti sul tasso di sopravvivenza degli organismi.

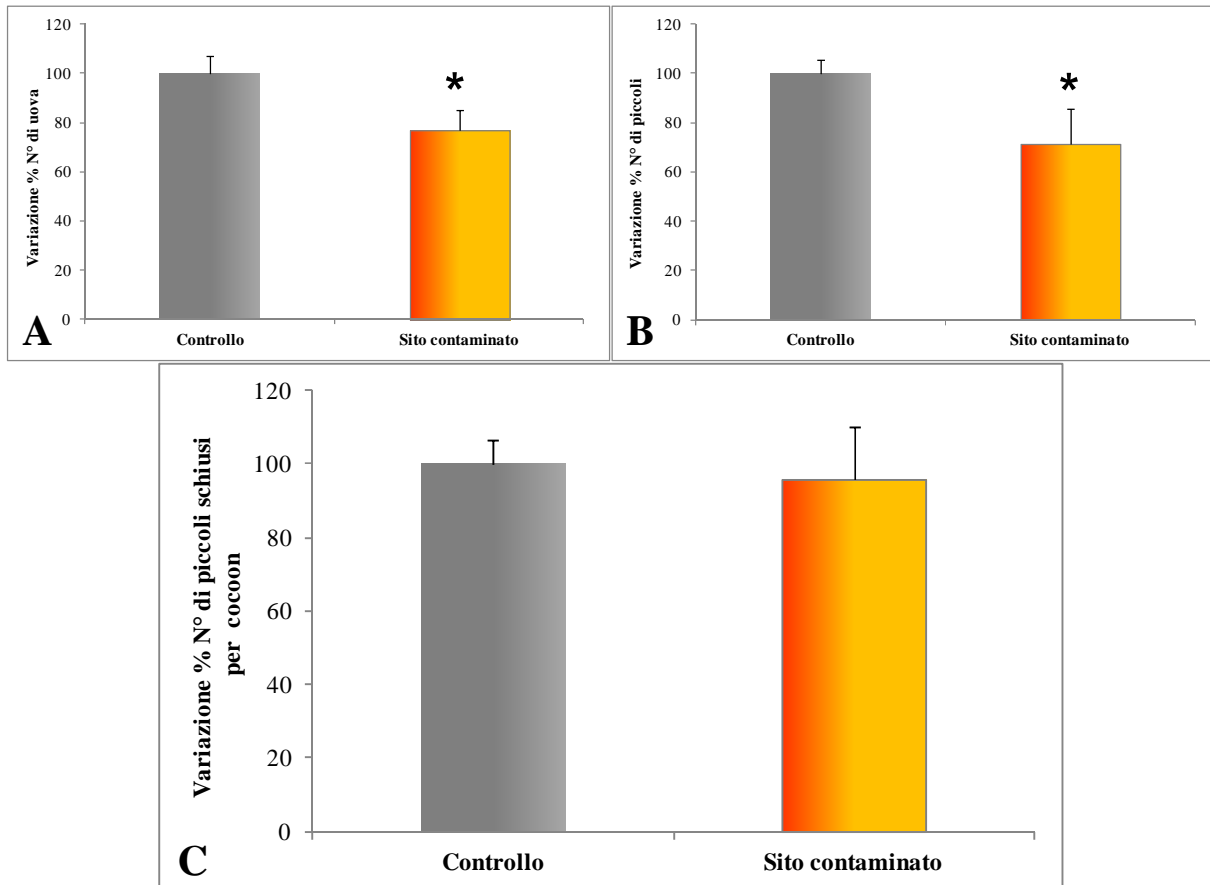


Fig. 1. Effetti indotti sulla riproduzione di *E. andrei*, dopo esposizione per 28 giorni rispettivamente ad suolo di controllo e ad uno proveniente da un sito inquinato da Cr(VI). I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

I risultati ottenuti dal conteggio del numero di uova di *E. andrei* deposte dagli organismi nei 28 giorni di incubazione nel suolo contaminato hanno mostrato un decremento statisticamente significativo rispetto al controllo (Fig. 1–A). Anche il conteggio del numero di piccoli dopo successivi 28 giorni ha mostrato un decremento statisticamente significativo rispetto al

controllo (Fig. 1–B). Il grafico in Fig. 1–C mostra come il rapporto tra il numero di piccoli nati e il numero di uova prodotte non mostri variazioni rispetto al controllo.

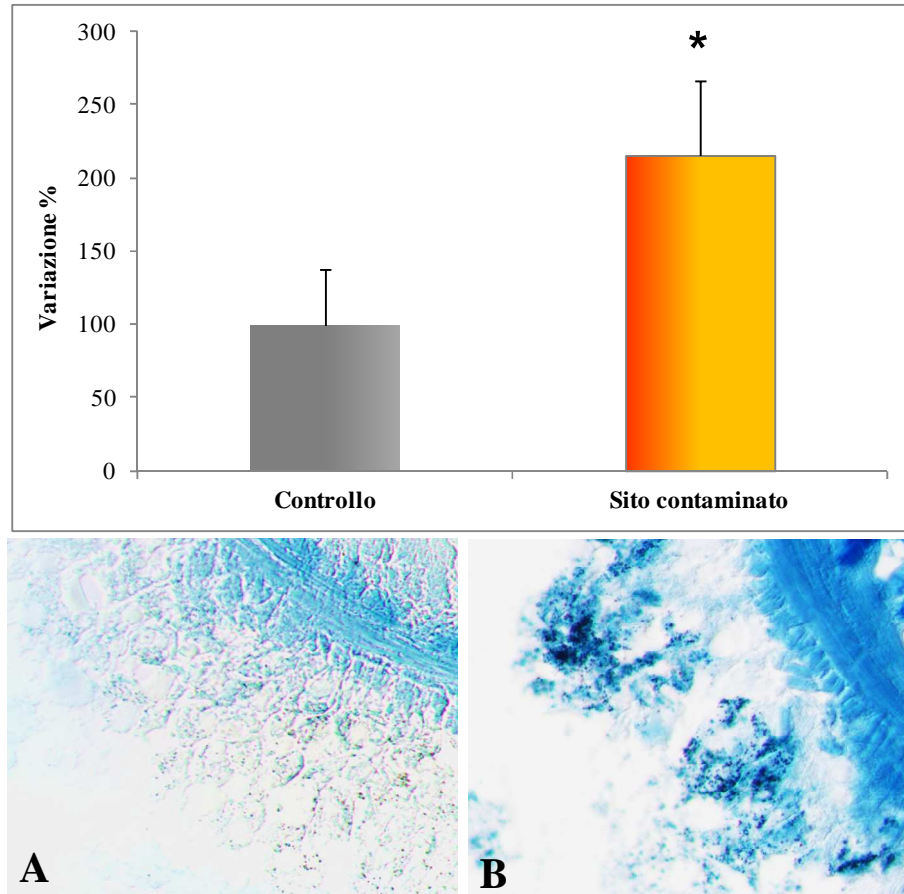


Fig. 2. Effetti indotti sul contenuto lisosomiale di lipofuscine nelle cellule del tessuto cloragogeno di *E. andrei*, dopo esposizione per 28 giorni rispettivamente ad suolo di controllo e ad uno proveniente da un sito inquinato da Cr(VI). I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test). Immagini rappresentative del tessuto cloragogeno di un organismo di controllo (A) ed esposti al sito contaminato (B).

I risultati ottenuti dalla valutazione dell'accumulo lisosomiale di lipofuscine nelle cellule del tessuto cloragogeno mostrato incremento statisticamente significativo del contenuto di lipofuscine nei vermi esposti al suolo di campo (Fig. 2).

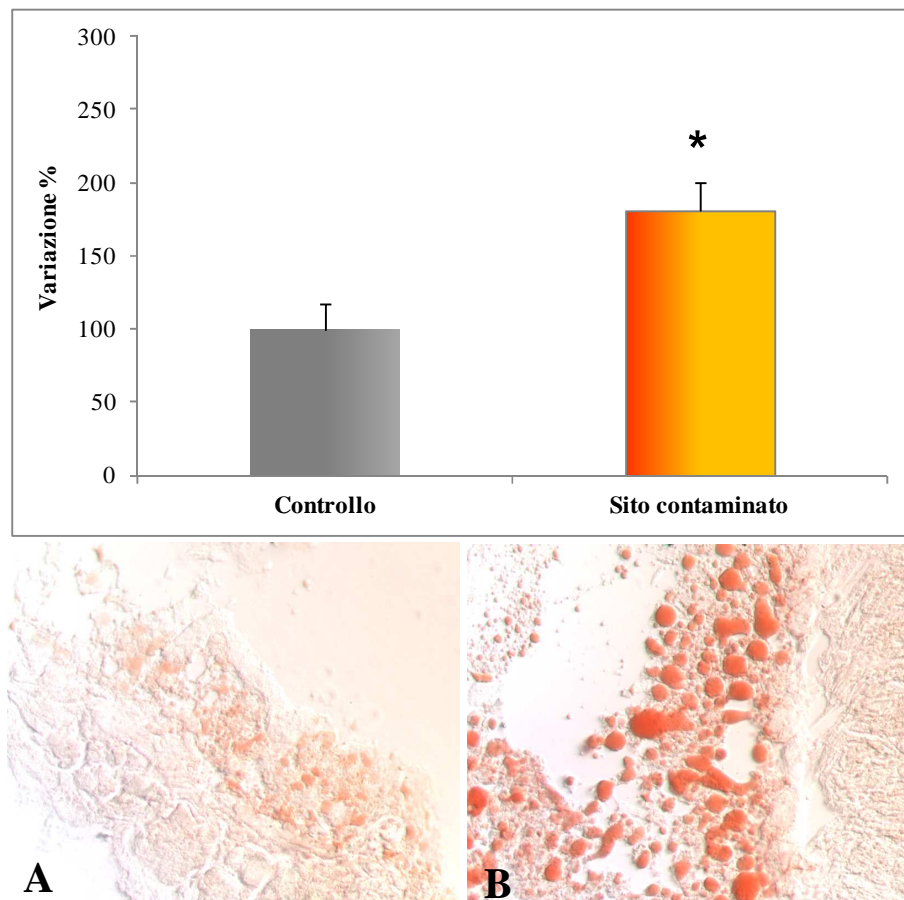


Fig. 3. Effetti indotti sul contenuto lisosomiale di lipidi neutri nelle cellule del tessuto cloragogeno di *E. andrei* dopo esposizione per 28 giorni rispettivamente ad suolo di controllo e ad uno proveniente da un sito inquinato da Cr(VI). I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test). Immagini rappresentative del tessuto cloragogeno di un organismo di controllo (A) ed esposti al sito contaminato (B).

I risultati ottenuti dalla valutazione dell'accumulo lisosomiale di lipidi neutri nelle cellule del tessuto cloragogeno hanno indicato un incremento statisticamente significativo del contenuto di lipofuscine nei vermi esposti al suolo di campo rispetto al controllo (Fig. 3).

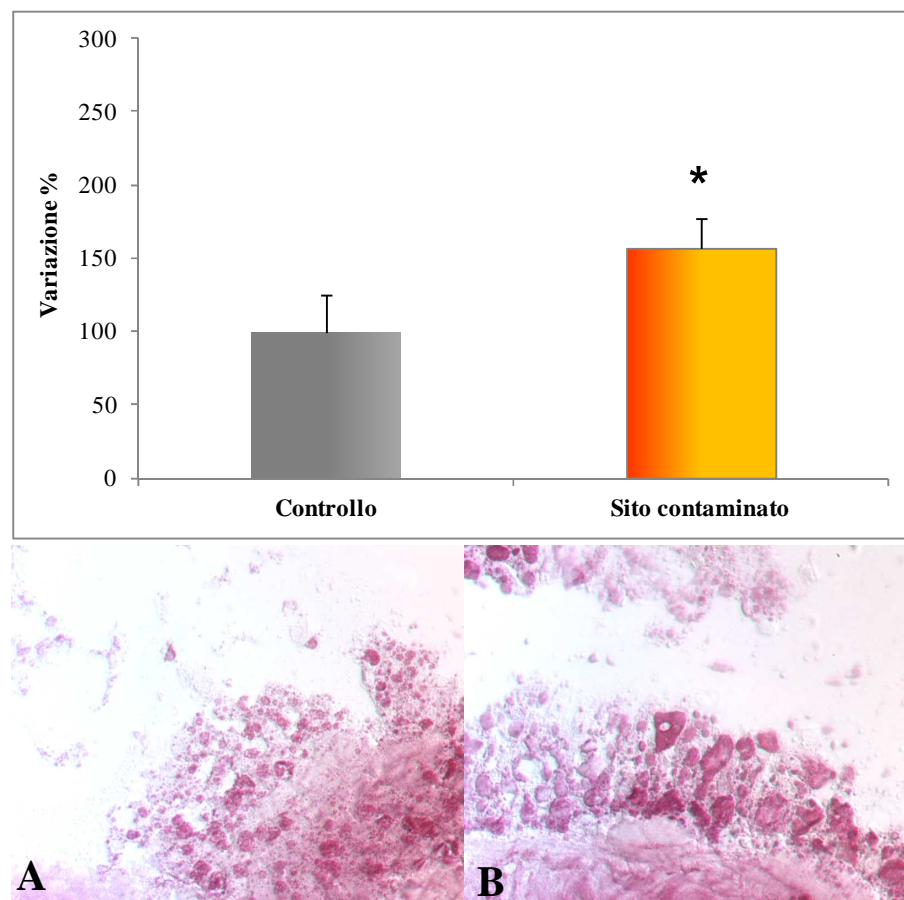


Fig. 4. Effetti indotti sul rapporto lisosomi/citoplasma del tessuto cloragogeno di *E. andrei* dopo esposizione per 28 giorni rispettivamente ad suolo di controllo e ad uno proveniente da un sito inquinato da Cr(VI). I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney U test). Immagini rappresentative del tessuto cloragogeno di un organismo di controllo (A) ed esposti al sito contaminato (B).

I risultati relativi al rapporto lisosomi/citoplasma (biomarker di danno tissutale) valutato nel tessuto cloragogeno hanno evidenziato nei vermi esposti al suolo di campo contaminato da Cr(VI) una significativa diminuzione rispetto al controllo (Fig. 4).

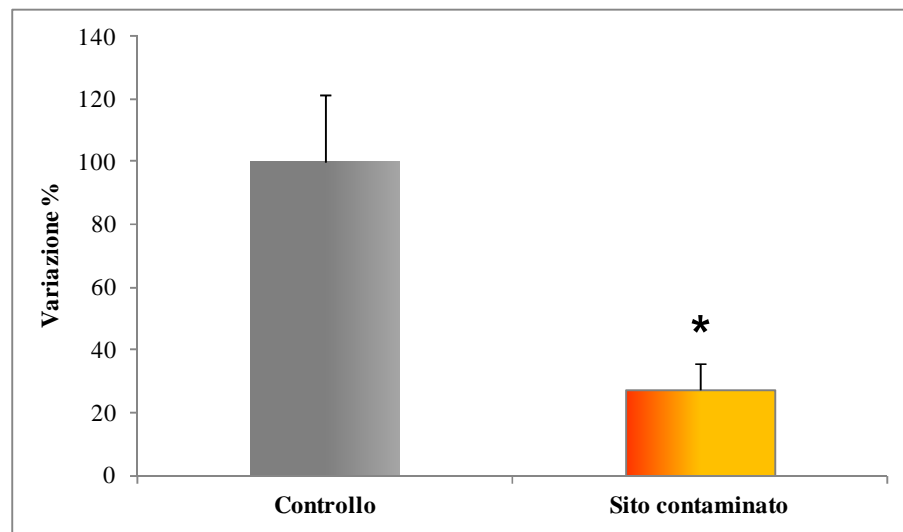


Fig. 5. Effetti indotti sulla funzionalità della Ca^{2+} -ATPasi nelle cellule del tessuto intestinale di *E. andrei* dopo esposizione per 28 giorni rispettivamente ad suolo di controllo e ad uno proveniente da un sito inquinato da Cr(VI). I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

L'attività della Ca^{2+} -ATPasi dopo esposizione di *E. andrei* per 28 giorni al suolo di campo ha presentato una forte riduzione rispetto al controllo (-72% rispetto al controllo) (Fig. 5).

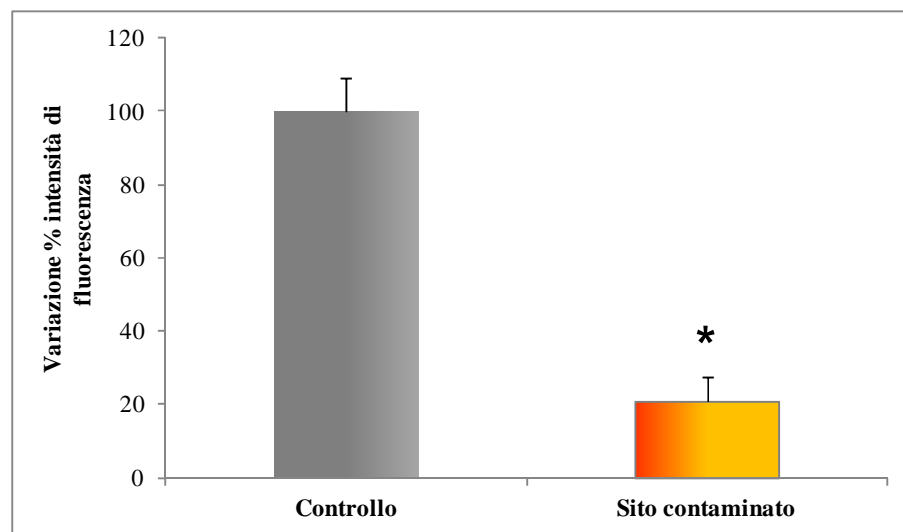


Fig. 6. Effetti indotti sulla stabilità delle membrane lisosomiali dei celomociti di *E. andrei*, valutato mediante neutral red retention time assay (NRRT) con osservazione in microscopia a fluorescenza, dopo esposizione per 28 giorni rispettivamente ad suolo di controllo e ad uno proveniente da un sito inquinato da Cr(VI). I dati, espressi come variazione percentuale rispetto ai valori di controllo, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

La stabilità delle membrane lisosomiali dei celomociti, valutata con il metodo del Neutral Red Retention Time con osservazione in microscopia a fluorescenza, ha presentato nei lombrichi esposti per 28 giorni al suolo del sito contaminato una forte riduzione rispetto al controllo (-79%) (Fig.6).

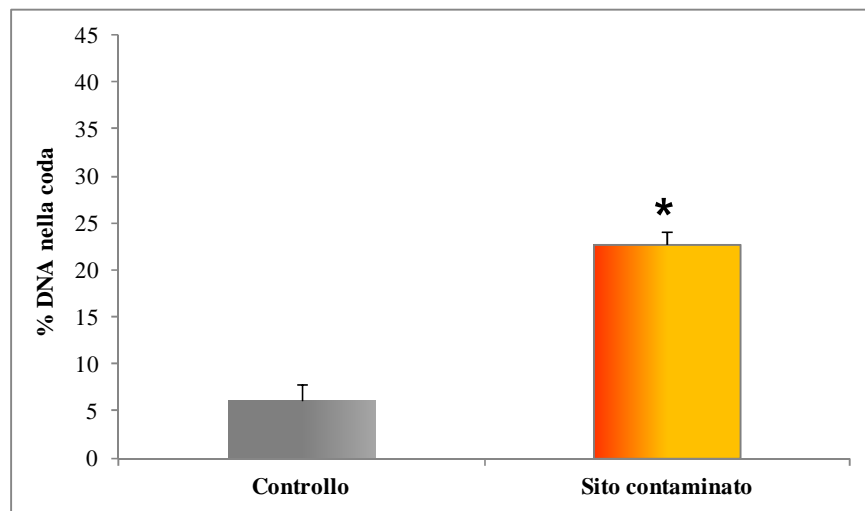


Fig. 7. Effetti indotti sul danno al DNA valutato mediante Comet assay alcalino nei celomociti di *E. andrei* dopo esposizione per 28 giorni rispettivamente ad suolo di controllo e ad uno proveniente da un sito inquinato da Cr(VI). I dati, espressi come percentuale di DNA presente nella coda, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

Il danno al DNA valutato nei celomociti mediante Comet assay alcalino, ha evidenziato effetti significativi nei vermi oligocheti esposti al suolo del sito contaminato rispetto al controllo (+16%) (Fig. 7).

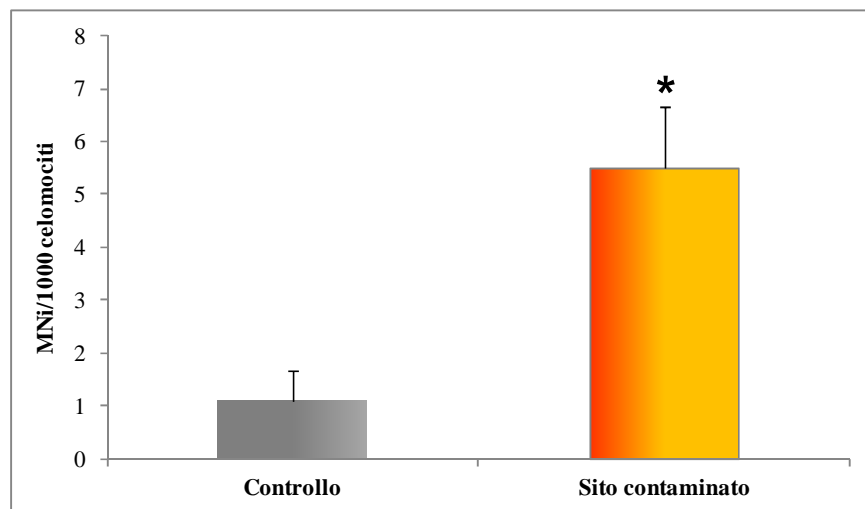


Fig. 8. Effetti indotti sulla frequenza dei micronuclei nei celomociti di *E. andrei*, valutato su almeno 1000 cellule, dopo esposizione per 28 giorni rispettivamente ad suolo di controllo e ad uno proveniente da un sito inquinato da Cr(VI). I dati rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

I risultati del test del MN nei celomociti dei vermi esposti al suolo contaminato da Cr(VI) hanno mostrato rilevanti effetti rispetto al controllo nel sito contaminato (rispettivamente 6%) (Fig. 8).

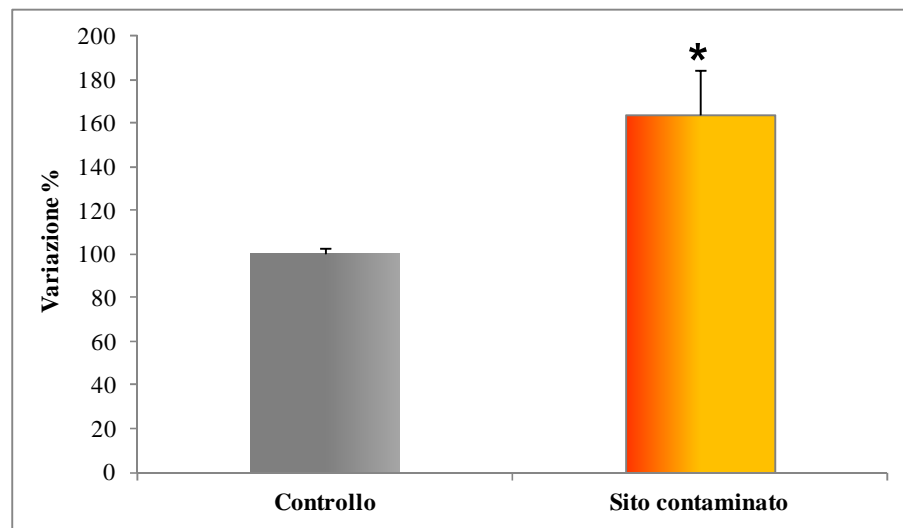


Fig. 9. Effetti indotti attività del lisozima nel liquido celomatico di *E. andrei*, dopo esposizione per 28 giorni rispettivamente ad suolo di controllo e ad uno proveniente da un sito inquinato da Cr(VI). I dati, espressi come variazione percentuale di assorbanza, rappresentano la media \pm DS di almeno cinque repliche. * = $p < 0,05$ (Mann-Whitney *U* test).

I dati relativi all'attività dell'enzima lisozima presente nel liquido celomatico hanno dimostrato che l'attività enzimatica è significativamente aumentata rispetto al controllo negli organismi incubati nel suolo contaminato da Cr(VI), in particolare +64% rispetto al controllo) (Fig. 9).

4.3.2. Discussione

Varie attività industriali e pratiche di smaltimento dei rifiuti provocano la contaminazione del suolo e delle acque sotterranee da cromo (U.S. EPA, 2000) E' stato dimostrato che il cromo è tossico per la fauna e la flora (Nriagu et al., 1988; Shanker et al., 2005), nell'ambiente si trova comunemente in due stati di ossidazione, cioè Cr(III) e Cr(VI). Il cromo (VI) esercita diversi effetti tossici sui sistemi biologici a causa della libera diffusione attraverso le membrane cellulari e a causa della sua capacità di produrre ROS (Kota et Stasicka, 2000). Il Cr (VI) è altamente solubile e biodisponibile ed agisce come agente ossidante all'interno della cellula . Ciò porta alla formazione di radicali liberi, comprese le specie reattive dell'ossigeno (ROS) , durante la riduzione di Cr(VI) a Cr(III). Questi ROS a loro volta hanno gravi effetti sulla fisiologia delle cellule e sono in grado di provocare anche danni al DNA e possono pertanto alterare le attività cellulari (Manerikar et al., 2008). In questo lavoro sono presentati i risultati ottenuti dopo l'esposizione degli organismi ad un suolo contaminato prevalentemente da cromo. Le analisi chimiche condotte sui campioni di suolo hanno evidenziato che la concentrazione di Cr(VI) è di 175 mg/Kg, circa 12 volte quella prevista dalla normativa italiana per aree a destinazione d'uso industriale. Dopo 28 giorni di esposizione dei vermi in condizioni standard ai terreni di campo, non sono stati registrati effetti sulla mortalità. Sono stati osservati alcuni effetti sulla riproduzione, infatti, anche se non vi è effetto sul numero dei piccoli nati da ogni bozzolo, il numero di bozzoli e, il numero di piccoli totali è significativamente ridotto rispetto al controllo. L'esposizione al suolo inquinato ha causato variazioni significative sui biomarker lisosomiali studiati; in particolare nelle cellule del tessuto cloragogeno. L'accumulo lisosomiale di lipofuscine ha subito un incremento del +115% negli organismi esposti al suolo del sito contaminato rispetto a quello di controllo. In condizioni di stress ossidativo, come quelle generate dall'esposizione a Cr(VI), si può

verificare perossidazione delle membrane lipidiche, i cui prodotti finali sono accumulati nei lisosomi come granuli insolubili noti come lipofuscine (Sohal et Brunk, 1989; Viarengo et Nott, 1993; Terman et Brunk, 2004). La valutazione dell'accumulo lisosomiale di lipidi neutri ha mostrato un forte incremento nel sito contaminato rispetto al sito di controllo. Gli effetti degli inquinanti sono spesso associati ad una alterazione del metabolismo degli acidi grassi e all'accumulo di lipidi neutri insaturi nel sistema lisosomiale, (Lüllman-Rauch, 1979; Moore, 1988; Köhler, 1991). I risultati ottenuti dalla valutazione del rapporto lisosoma/citoplasma hanno mostrato un incremento statisticamente significativo (+57%) rispetto al sito di controllo; questo parametro è un biomarker a livello tissutale, infatti l'aumento del rapporto lisosomi/citoplasma indica che le cellule stanno diventando cataboliche, vi è quindi una riduzione del citoplasma delle cellule che tendono nel tempo a perdere le loro funzionalità (Moore et Viarengo, 1987; Marigómez et al., 2005; Viarengo et al., 2007). La valutazione dell'attività della Ca^{2+} -ATPasi ha mostrato un decremento del 72% negli organismi esposti al suolo contaminato. I parametri cellulari valutati sui celomociti dei vermi esposti al suolo di campo hanno mostrato una drastica diminuzione della stabilità della membrana lisosomiale (-79%); si sono evidenziati anche significativi effetti genotossici in termini di danno al DNA (+16%) e frequenza di micronuclei (5‰) nel sito contaminato rispetto al controllo. Sono state osservate anche alterazioni del sistema immunitario dei vermi esposti, mediante valutazione dell'attività del lisozima nel liquido celomatico; questo parametro valuta l'attività di un enzima antibatterico ampiamente distribuito in organismi dai batteriofagi agli umani. (Jollès et al., 1996).

5. Conclusioni

In questo studio la batteria di biomarker su *E. andrei* è stata arricchita con numerosi nuovi parametri atti a valutare molteplici parametri fisiologici.

L'attività della Ca^{2+} -ATPasi su sezioni di tessuto fresco è risultata essere un biomarker livello cellulare altamente sensibile per la valutazione degli effetti di minime concentrazioni di inquinanti sia inorganici che organici (B[a]P) a carico dei sistemi di omeostasi del $[\text{Ca}^{2+}]$. Inoltre è stato ideato un ricco set di biomarker atto a valutare lo stress ossidativo indotto dagli inquinanti sui celomociti, in particolare, al fine di mettere in evidenza la produzione intracellulare di ROS sono state utilizzate sonde fluorescenti, tale dato è stato affiancato alla valutazione dei livelli di lipoperossidi nelle membrane cellulari e all'accumulo lisosomiale di lipofuscine nelle cellule del liquido celomatico. Anche il danno al DNA valutato mediante Comet assay è stato implementato introducendo nella metodica l'uso di enzimi per evidenziare il danno di tipo ossidativo. Endonucleasi (Endo) III e formamidopyrimidine-N-glicosilasi (Fpg) sono due enzimi idrolitici che identificano il danno ossidativo alle basi. Endo III è generalmente più attivo verso pirimidine ossidate, mentre Fpg è più attivo nei confronti purine ossidate (Schalow et al., 2011). Nel set di nuovi parametri è stata inserita la valutazione della funzionalità mitocondriale quale indice essenziale per valutare il corretto funzionamento dei mitocondri che come noto svolgono funzioni vitali per la cellula, tra cui la produzione di ATP. La valutazione del tasso di fagocitosi, così come dell'attività del lisozima sono parametri che possono essere utilizzati per valutare le funzioni immunitarie dei celomociti del verme *E. andrei*, tali parametri, in condizioni di stress risultano spesso alterati. Infatti nei casi in cui le alterazioni della capacità delle cellule di realizzare processi di endocitosi e fagocitosi, legati alla funzionalità delle membrane esterne delle cellule, la sindrome da stress può portare alla rottura delle plasmamembrane cellulari e conseguente rilascio degli enzimi citosolici nel mezzo extracellulare, quale indice di danno alle membrane si è pertanto dosata la lattato deidrogenasi rilasciata nel liquido celomatico.

I risultati ottenuti dallo studio condotto sugli effetti di diverse concentrazioni subletali di Cr(VI) hanno evidenziato che minime concentrazioni di inquinanti sono in grado di generare una sindrome di stress a vari livelli di complessità funzionale. In particolare i biomarker di genotossicità hanno confermato che il Comet assay e il test del MN sui celomociti dei vermi permettono di evidenziare effetti genotossici indotti negli animali esposti a Cr(VI). Tale dato va sempre interpretato tenendo conto che il test del MN fornisce un indice di danno genotossico accumulato nel tempo, mentre la valutazione del danno al DNA permette di evidenziare eventi genotossici recenti (Bolognesi et al., 2004). Quindi, appare opportuno suggerire che vengano entrambi applicati in *E. andrei* per rilevare gli effetti genotossici indotti da contaminanti ambientali. Inoltre è rilevante osservare come le concentrazioni indicate dalla normativa italiana come limiti soglia per i suoli residenziali e i suoli industriali generino negli organismi esposti al suolo contaminato notevoli effetti a livello molecolare e cellulare, provocando anche effetti genotossici.

I risultati ottenuti nello studio di campo confermano l'importanza di utilizzare parametri fisiologici subletali sensibili per valutare la potenziale tossicità e genotossicità della matrice suolo. In assenza di effetti sulla mortalità, la batteria di biomarker utilizzata ha infatti permesso di evidenziare uno stato di stress degli animali associato alla presenza di Cr(VI). La valutazione di questi parametri biologici subletali può essere particolarmente rilevante nella valutazione del rischio ambientale (ERA) dei suoli inquinati nel determinare il livello di vulnerabilità raggiunto dalle risorse biotiche nei casi in cui non vengono rilevati cambiamenti evidenti degli end-point di alto livello (cioè tasso di mortalità e di riproduzione) (WHO, 1993; Smith et al., 2005; Dagnino et al., 2008, Sforzini et al., 2011).

Bibliografia

- Adamowicz, A., Wojtaszek, J., 2001. Morphology and phagocytotic activity of coelomocytes in *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae). Zool. Pol. 46, 91-104.
- Adriano, D.C., 1986. Trace Elements in the Terrestrial Environment. Springer, New York, pp.533.
- Adriano, D.C., 1992. Biogeochemistry of Trace Metals - Lewis Publisher.
- Agency for toxic substances and disease registry, settembre 2008. CHROMIUM Division of Toxicology and Environmental Medicine.
- Aitio, A., Kallio, A., 1999. Exposure and effect monitoring: a critical appraisal of their practical application. Toxicology Letters Vol. 108, 137-147.
- Allen, J.I., Moore, M.N., 2004. Environmental prognostics: is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? Mar. Environ. Res. 58, 227-232.
- Alloway, B.J., 1990/1995. Heavy metals in soil – Blackie and Halsted Press.
- Almeida, J.R., Oliveira, C., Gravato, C., Guilhermino, L., 2010. Linking behavioural alterations with biomarkers responses in the European seabass *Dicentrarchus labrax L.* exposed to the organophosphate pesticide fenitrothion. Ecotoxicol.
- Ando, T., Fujimoto, K., Mayahara, H., Miyajima, H., Ogawa, K., 1981. A new one-step method for the histochemistry and cytochemistry of Ca²⁺-ATPase activity. Acta Histochem. Cytochem. 14, 707-726.
- APAT, 2002. Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati utilizzo di indicatori ecotossicologici e biologici. RTI CTN_SSC 2/2002.
- APAT, 2004. Proposta di guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici. RTI CTN_TES 1/2004.
- APAT, 2006. Manuale per le indagini ambientali nei siti contaminati. 43/2006.
- Apte, A.D., Verma, S., Tare, V., Bose, P., 2005. Oxidation of Cr(III) in tannery sludge to Cr(VI): Field observations and theoretical assessment. J. Hazard. Mater. 121, 215-222.
- Arillo, A., Melodia, F., 1991. Reduction of hexavalent chromium by the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny). Ecotox. and Envir. Saf. Vol. 21, 92-100.
- Arslan, P., Beltrame, M., Tomasi, A., 1987. Intracellular chromium reduction. Biochem. Biophys. Acta 931, 10-15.
- Attrill, M.J., Depledge, M.H., 1997. Community and population indicators of ecosystem health: targeting links between levels of biological organization. Aquat. Toxicol. 38, 183-197.

- Ayres, R.U., 1992. Toxic heavy metals: materials cycle optimization. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 89, 815-820.
- Bailar, J.C., 1997. Chromium. In: Parker, S.P. (Ed.), McGraw-Hill Encycl. of Sci. and Tech., eighth ed. vol. 3. McGraw- Hill, New York.
- Bartlett, R.J., 1991. Chromium cycling in soils and water: links, gaps and methods, Environ. Health Pers. 91, 17-24.
- Bartlett, R.J., Kimble. J.M., 1976. Behavior of chromium in soils. II. Hexavalent forms. J. Environ. Qual. 5, 383-386.
- Battaglia, A., Calace, N., Nardi, E., Petronio, B.M., Pietroletti, M., 2007. Reduction of Pb and Zn bioavailable forms in metal polluted soils due to paper mill sludge addition: Effects on Pb and Zn transferability to barley. Biores. Tech. Vol 98, 2993-2999.
- Bayne, B.L., Livingstone, D.R., Moore, M.N., Widdws, J., 1976. A cytochemical and biochemical index of stress in *Mytilus edulis*. Mar. Poll. Bull. 7, 221-224.
- Bayne. B.L., Moore, M.N., Widdows, J., Livingstone, D.R., Salked, P., 1979. Measurement of the response of individuals to environmental stress and pollution: studies with bivalve molluscs. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 286, 563-581.
- Bayne, B.L., Clarke, K.R., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., Widdows, J., 1985. The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger Scientific, New York, 384.
- Bayne, B.L., Brown, D.A., Burns, K., Dixon, D.R., Ivanovici, A., Livingstone, D.R., Lowe, D.M., Moore, M.N., Stebbing, A.R.D., Widdows, J., 1986. The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger Scientific.
- Belfroid, A., Vanwezel, A., Sikkenk, M., Vangestel, K., Seinen, W., Hermens, J., 1993. The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): experiments in water. Ecotoxicol. Environ. Saf. 25, 154-165.
- Berridge, M.J., 1994. The biology and medicine of calcium signalling. Mol. Cell. Endocrinol.
- Berridge, M.J., 1997. Elementary and global aspects of calcium signalling. J. Physiol. 499, 291-306.
- Bickham, J.W., Sandhu, S., Hebert, P.D.N., Chikhi, L., Athwal, R., 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. Mutat. Res. 463, 33-51.
- Bielicka, A., Bojanowska, I., Wiśniewski, A., 2005. Two Faces of Chromium - pollutant and bioelement. Polish J. Environ. Stud. 14, 5-10.

- Bigorgne, E., Cossu-Leguille, C., Bonnard, M., Nahmani, J., 2010. Genotoxic effects of nickel, trivalent and hexavalent chromium on the *Eisenia fetida* earthworm. *Chemosphere* 80, 1109-1112.
- Birch, G.F., Snowdon, R.T., 2004. The use of Size-normalisation techniques in interpretation of soil contaminant distributions. *Water, Air, and Soil Pollution Vol.* 157, 1-12.
- Bocchetti, R., Regoli, F., 2006. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea. *Chemosphere* 65, 913-921.
- Bocquené, G., Galgani, F., Truquet, P., 1990. Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 30, 75-89.
- Bolognesi, C., Hayashi, M., 2011. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 26, 205-213.
- Bolognesi, C., Rabboni, R., Roggieri, P., 1996. Genotoxicity biomarkers in *M.galloprovincialis* as indicator of marine pollutants. *Comp. Biochem. Physiol.* 113, 319-323.
- Bolognesi, C., Landini, E., Roggieri, P., Fabbri, R., Viarengo, A., 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 287-292.
- Bolognesi, C., Frenzilli, G., Lasagna, C., Perrone, E., Roggieri, P., 2004. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. *Mutat. Res.* 552, 153-162.
- Bonnard, M., Eom, I.C., Morel, J.L., Vasseur, P., 2009. Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Molec. Mutagen.* 50, 60-67.
- Bouché, M.B., 1972. Lombriciens de France. *Écologie et Systématique*. I.N.R.A. Publ. Ann. Zool. Ecol. Anim. (no horse-serie) 72 (2), 671 pp.
- Bouché, M.B., 1992. Earthworm species and ecotoxicological studies. In: Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. (Eds.), *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept Ltd., UK, pp. 20-35.
- Bremner, I., 1987. Interactions between metallothionein and trace elements. *Prog. Food Nutr. Sci.* 11, 1-37.
- Broeg, K., Westernhagen, H.v., Zander, S., Körting, W., Koehler, A., 2005. The “bioeffect assessment index” (BAI) A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin* 50, 495-503.

- Burlando, B., Bonomo, M., Capri, F., Mancinelli, G., Pons, G., Viarengo, A., 2004. Different effects of Hg^{2+} and Cu^{2+} on mussel (*Mytilus galloprovincialis*) plasma membrane Ca^{2+} -ATPase: Hg^{2+} induction of protein expression. *Comp. Biochem. Physiol. C* 139, 201-207.
- Button, M., Jenkinb, G.R.T., Bowmanc, K.J., Harringtond, C.F., Brewerb, T.S., Jonesc, G.D.D., Wattsa,, M.J., 2010. DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: Assessing resistance to arsenic toxicity by use of the Comet assay. *Mutat. Res.* 696, 95-100.
- Byzova, J.B., 1974. The dynamics of some blood indices in earthworm (Oligochaeta, Lumbricidae). *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 11, 325.
- Cancio, I., ap Gwynn, I., Ireland, M.P., Cajaraville, M.P., 1995. The effect of sublethal exposure on the ultrastructure and on the distribution of acid phosphatase activity in chloragocytes of earthworms (Annelida, Oligochaeta). *Histochem. J.* 27, 965-973.
- Canesi, L., Ciacci, C., Betti, M., Scarpato, A., Citterio, B., Pruzzo, C., Gallo, G., 2003. Effects of PCB congeners on the immune function of *Mytilus* hemocytes: alterations of tyrosine kinase-mediated cell signaling. *Aquat. Toxicol.* 63, 293-306.
- Carafoli, E., 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 395-433.
- Carafoli, E., 1991 (a). Calcium pump of the plasma membrane. *Physiol. Rev.* 71, 129-153.
- Carafoli, E., 1991 (b). The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Annu. Rev. Physiol.* 53, 531-547.
- Carafoli, E., 1994. Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J.* 8(13), 993-1002.
- Carafoli, E., Zurini, M., 1982. The Ca^{2+} -pumping ATPase of plasma membranes. Purification, reconstitution and properties. *Biochim. Biophys. Acta* 31, 683(3-4), 279-301.
- Carrano, A.V., Natarajan, A.T., 1988. Consideration for populations monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat. Res.* 204, 379-406.
- Caselli, F., Gastaldi, L., Gambi, N., Fabbri, E., 2006. In vitro characterization of cholinesterases in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 143, 416-421.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J.C., Moreno-Sanchez, R., 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 335-347.
- Cervantes, C., Silver, S., 1992. Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid* 27, 65-71.

- Chapman, P.M., 1990. The sediment quality Triad approach to determining pollution-induced degradation. *Sci. Total Environ.* 97-98, 815-825.
- Cheunga, K.H., Gu, Ji-Dong, 2007. Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *Int. Biodeter. Biodegr.* 59, 8-15.
- Chrysochoou, M., Johnston, C.P., 2012. Reduction of chromium (VI) in saturated zone sediments by calcium polysulfide and nanoscale zerovalent iron derived from green tea extract. In: R.D. Hryciw, A. Athanasopoulos-Zekkos, N. Yesiller (Eds.), *GeoCongress: State of the Art and Practice in Geotechnical Engineering*, 3959-3967.
- Codd, R., Dillon, C., Levina, A., Lay, P.A., 2001. Studies on the genotoxicity of chromium: from the test tube to the cell. *Coordin. Chem. Rev.* 216/217, 537.
- Colborn, T., vom Saal, F.S., Soto, A.M. 1993. Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans. *Environ. Health Persp.* v.101, n.5.
- Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L., 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733-1735.
- Cooper, E.L., 1996. Earthworm immunity. In: Rincevich, B., and Müller, W.E.G. (eds.) *Invertebrate Immunology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- Cooper, E.L., Stein, E.A., 1981. Oligochaetes. In: Ratcliffe, N.A., Rowley, A.F. (Eds.), *Invertebrate Blood Cells*. Academic Press, London, p. 75.
- Cossarizza, A., Cooper, E.L., Suzuki, M.M., Salvioli, S., Capri, M., Gri, G., Quaglino, D., Franceschi, C., 1996. Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react with several human epitopes can kill human tumor cell lines. *Exp. Cell. Res.* 224, 174.
- Costa, M., 2003. Potential hazards of hexavalent chromium in our drinking water. *Toxicol. Appl. Pharm.* 188, 1-5.
- Cuervo, A.M., 2004. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 14, 70-77.
- Dagnino, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Broeg, K., Canesi, L., Viarengo, A., 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12, 155-172.
- Dagnino, A., Sforzini, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Bona, E., Jensen, J., Viarengo, A., 2008. A “weight of evidence” approach for the integration of environmental “TRIAD” data to assess ecological risk and biological vulnerability. *Int. Environ. Assess. Manage.* 4, 314-326.

- Danadevi, K., Rozati, R., Banu, B., Grover, P., 2004. Genotoxic evaluation of welders exposed to chromium and nickel using the comet and micronucleus assays. *Mutagenesis* 19 (1), 35.
- De Flora S., 2000. Threshold Mechanisms and Site Specificity in Chromium(VI) Carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 533-541.
- De flora, S., M. Bagnasco, D. Serra, P. Zancchi, 1990. Genotoxicity of chromium compounds - a review. *Mutat. Res.* 238, 99-172.
- de Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., Chan, H. M., 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50, 51-71.
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 e s.m.i. Norme in materia ambientale. Pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 88 del 14 aprile 2006 - suppl. ord. n. 96.
- Depledge, M.H., 1989. The rational basis for detection of the early effects of marine pollutants using physiological indicators. *AMBIO*, 18, 301-302.
- Depledge, M.H., 1994. Non-destructive Biomarkers in Vertebrates In: M.C. Fossi and C. Leonzio, Editors. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 271-295.
- Depledge, M.H., Fossi, M.C., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment. 2. *Invertebr. Ecotox.* 3, 161-172.
- Dhainaut, A., Scaps, P., 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Can. J. Zool.* 79, 233-253.
- Dhal, B., Thatoi, H.N., Das, N.N., Pandey B.D., 2013. Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *J. Hard. Mater.* 250-251, 272-291.
- Di Leva, F., Domi, T., Fedrizzi, L., Lim, D., Carafoli, E., 2008. The plasma membrane Ca^{2+} -ATPase of animal cells: Structure, function and regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 476, 65-74.
- Dickerson, R.L., Hooper, M.J., Gard, N.W., Cobb, G.P., Kendall, R.J., 1994. Toxicological foundations of ecological risk assessment: Biomarker development and interpretation based on laboratory and wildlife species. *Environ Health Perspect* 102:65-69.
- Dixon, D.R., Prusky, A.M., Dixon, L.R.J., Jha, A.N., 2002. Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17, 495-507.

- Dondero, F., Dagnino, A., Jonsson, H., Caprì, F., Gastaldi, L., Viarengo, A., 2006 (b). Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussel (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/gene expression approach. *Aquat. Toxicol.* 78, 13-24.
- Dondero, F., Jonsson, H., Rebelo, M., Pesce, G., Berti, E., Pons, G., Viarengo, A., 2006 (a). Cellular responses to environmental contaminants in amoebic cells of the slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 43, 150-7.
- Dusinska, M., Collins, A., 1996. Detection of oxidised purines and UV-induced photoproducts in DNA of single cells, by inclusion of lesion-specific enzymes in the comet assay. *Alter. Lab. Anim.*, 24, 405-411.
- Eastman, A., Barry, M.A., 1992. The origin of DNA breaks: a consequence of DNA damage. DNA repair or apoptosis? *Cancer Investig.* 10, 229-240.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman and Hall, London, U.K. pp. 426.
- Ehlers, L.J., Luthy, R.G., 2003. Contaminant bioavailability in soil and sediment. *Environ Sci Technol* 37:295A-302A.
- Enouf, J., Bredoux, R., Bordeau, N., Sarkadi, B., and Levy- Toledano S., 1989. Further characterization of the plasma membrane- and intracellular membrane-associated platelet Ca²⁺ transport systems. *Biochem. J.* 15, 263(2), 547-52.
- Ernst, S.A., 1972. Transport adenosine triphosphatase cytochemistry. II. Cytochemical localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent phosphatase activity in the secretory epithelium of the avian salt gland. *J. Histochem. Cytochem.* 20(1), 23-28.
- Eyambe, G.S., Goven, A.J., Fitzpatrick, L.C., Venables, B.J., Cooper, E.L., 1991. A noninvasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Lab. Anim.* 25, 61-67.
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- Falugi, C., Amaroli, A., Evangelisti, V., Viarengo, A., Delmonte C.M.U., 2002. Cholinesterase activity and effects of its inhibition by neurotoxic drugs in *Dictyostelium discoideum*. *Chemosphere* 48, 407-14.
- Faust, F., Kassie, F., Knasmüller, S., Boedecker, R.H., Mann, M., Mersch-Sundermann, V., 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 566, 209-229.
- Fendorf, S.E., 1995. Surface reactions of chromium in soils and waters, *Geoderma* 67 (1-2), 55-71.

- Fenech, M., 1993. The Cytokinesis-Block Micronucleus Technique and Its Application to Genotoxicity Studies in Human Populations. *Environ. Health Perspect. Suppl.* 101, 101-107.
- Fenech, M., 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455, 81-95.
- Ferreira, A., Dolder, H., 2003. Cytochemical study of spermiogenesis and mature spermatozoa in the lizard *Tropidurus itambere* (Reptilia, Squamata). *Acta Histochemica* Vol. 105, 339-352.
- Fischer, E., Molnár, L., 1992. Environmental aspects of the chloragogenous tissue of earthworms. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1723-1727.
- Focardi, S., Leonzio, C., 2001. I bioindicatori nel monitoraggio costiero. *Biol. Mar. Medit.*, 8 (2): 136-145.
- Fossi, M.C., Leonzio, C., 1994. *Non-Destructive Biomarkers in Vertebrates*. Lewis, Boca Raton, FL, USA, p. 345.
- Fossi, M.C., Casini, S., Marsili, L., 2007. Potential toxicological hazard due to endocrine-disrupting chemicals on Mediterranean top predators: State of art, gender differences and methodological tools. *Environ. Res.* Vol. 104, 174-182.
- Fugère, N., Brousseau, P., Krzystyniak, K., Coderre, D., Fournier, M., 1996. Heavy metalspecific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology* 109, 157-166.
- Fukai, R., 1967. Valency state of chromium in seawater. *Nature (London)* 213, 901.
- Gabrielides, G., (ed), 1997 (a). *The MED POL Biomonitoring Programme Concerning the Effects of Pollutants on Marine Organisms along the Mediterranean Coasts*. UNEP(OCA)/MED WG 132/3, Athens.
- Gabrielides, G., (ed), 1997 (b). *Report of the Meeting of Experts to Review the MED POL Biomonitoring Programme*. UNEP-(OCA)/MED WG 132/3, Athens.
- Gastaldi, L., Ranzato, E., Capri, F., Hankard, P., Pérès, G., Canesi, L., Viarengo, A., Pons, G., 2007. Application of a biomarker battery for the evaluation of the sublethal effects of pollutants in the earthworm *Eisenia andrei*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 398-405.
- George, S.G., Viarengo, A., 1985. A model for heavy metal homeostasis and detoxication in mussel. *Mar. Pollut. Physiol.: Recent Advances* 125-143.
- Geret, F., Serafim, A., Bebianno, M.J., 2003. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarkers in *Ruditapes decussatus*? *Ecotoxicology* 12, 417-426.

- Goldberg, E.D., 1980. The International Mussel Watch. Report of the International Mussel Watch work-shop, commission on natural resources. Washington, DC: National Academy of Sciences.
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 1978. The Mussel Watch. In Environmental conservation. The Foundation of Environmental Conservation, La Jolla, CA, 5, 101-105.
- Goven, A.J., Venables, B.J., Fitzpatrick, L.C., Cooper, E.L., 1988. An invertebrate model for analyzing effects of environmental xenobiotics on immunity. Clin. Ecol. 4, 150-154.
- Goven, A.J., Fitzpatrick, L.C., Eyambe, G.S., Venables, B.J., Cooper, E.L., 1993. Cellular biomarkers for measuring toxicity of xenobiotics: Effects of polychlorinated biphenyls on earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocytes. Environ. Toxicol. Chem. 12, 863-870.
- Grandi, C., D'Ovidio, M.C., Tomao, P., 2006. Impiego del comet test in medicina del lavoro e tossicologia industriale: considerazioni e prospettive. G. Ital. Med. Lav. Erg. 28 (1), 5-13.
- Hankard, P.K., Svendsen, C., Wright, J., Wienberg, C., Fishwick, S.K., Spurgeon, D.J., 2004. Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis. Sci. Total Environ. 330, 9-20.
- Hayashi, M., Ueda, K., Uyeno, K., Wada, K., Kinae, N., Saotome, K., Tanaka, M., Takai, A., Sasaki, Y.F., Asano, N., Safuni, T., Ojima, Y., 1998. Development of genotoxicity assay system that use aquatic organisms. Mutat. Res. 399, 125-133.
- Heddle, J.A., Hite, M., Kirkhart, B., Mavoumin, K., Mac Gregor, J.T., Newell, G.T., Salamone, M.F., 1983. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. environmental protection agency genotox program. Mutat. Res. 123, 61-118.
- Hendawi, M., Sauvè, S., Ashour, M., Brousseau, P., Fourniera, M., 2004. A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotox. and Envir. Safety 59, 17-22.
- Hodges, N.J., Adam, B., Lee, A.J., Cross, H.J., Chipman, J.K., 2001. Induction of DNA-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and A549 lung cells by sodium dichromate: association with 8-oxo-2-deoxyguanosine formation and inter-individual variability. Mutagenesis 16, 467-474.
- Honeycutt, M.E., Roberts, B.L., Roane D.S., 1995. Cadmium Disposition in the Earthworm *Eisenia fetida*. Ecotox. and Envir. Saf. 30, (2), 143-150.

- Hopkin, S.P., Jones, D.T., Dietrich, D., 1993. The isopod *Porcellio scaber* as a monitor of the bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: towards a global “woodlouse watch” scheme. *Sci. Tot. Envir.*, Vol. 134, (1), 357-365
- International Agency for Researchon Cancer (IARC), 1990. Chromium, Nickel and Welding. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, vol. 51. IARC, Lyon, pp. 49-256.
- Ireland, M.P., Richards, K.S., 1977 The occurrence and localization of heavy metals and glycogen in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena rubida* from a heavy metal site. *Histochem.* 51, 153-166.
- ISO, 1993. Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth. ISO 11269-1. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 1996. Water quality-determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna Straus* (Cladocera, Crustacea)-acute toxicity test. ISO 6341. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 1998. Water quality-determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test)-part 3: method using freezedried bacteria. ISO 11348-3. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 1999. Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. ISO 11267. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2004 (a). Water quality-freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae; 2004. ISO 8692. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2004 (b). Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.). Determination of effectson reproduction and survival. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2005. Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2006. Water quality - Marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* and *Phaeodactylum tricorutum* (ISO 10253:2006). International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO, 2008. Soil quality—avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour—part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia*

- andrei*), ISO 17512-1, International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
- ISO/DIS 14371, Water quality - Determination of fresh water sediment subchronic toxicity to *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda).
- Jager, T., Fleuren, R.H.L.J., Hogendoorn, E.A., De Korte, G., 2003. Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37, 3399-3404.
- James, B.R., 2001. Remediation by reduction strategies for chromate contaminated soils. Environ. Geochem. Health 23, 175-179.
- Jan, T.K., Young, D.R., 1978. Chromium speciation in municipal wastewaters and seawater. Journal of Water Pollution Control Federation 50, 2327-2336.
- Jollès, P., 1996. Lysozymes: Model enzymes in biochemistry and biology. Birkhäuser, Basel
- Kadiiska, M.B., Xiang, Q.H., Mason, R.P., 1994. In vivo free radical generation by chromium (VI): an electron spin resonance spin-trapping investigation, Chem. Res. Toxicol. 7, 800-805.
- Kamaludeen, S.P.B., M. Megharaj, A.L. Juhasz, N. Sethunathan, R. Naidu, 2003. Chromium microorganism interactions in soils: remediation implications, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 178, 93-164.
- Kanojia, R.K., M. Junaid, R.C. Murthy, 1998. Embryo and fetotoxicity of hexavalent chromium: a long-term study, Toxicol. Lett. 95, 165-172.
- Kasprzak, K.S., 1995. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. Cancer Invest. 13 (4), 411.
- Kiskinis, E., Suter, W., Hartmann, A., 2002. High-throughput Comet assay using 96-well plates. Mutagen 17, 37-43.
- Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., Seglen, P.O., 2007. Methods for monitoring autophagy from yeasts to human. Autophagy 3, 181-206.
- Koehler, A., Wahl, E., Söffker, K., 2002. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus L.*). Environ. Toxicol. Chem. 21 (11), 2434-2444.
- Köhler, A., 1991. Lysosomal perturbations in fish liver as indicators for toxic effects of environmental pollution. Comp. Biochem. Physiol. C 100, 123-127.

- Köhler, A., Wahl, E., Söffker, K., 2002. Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus L.*). Environ. Toxicol. Chem. 21, 2434-2444.
- Kota, J., Stasicka, Z., 2000. Chromium Occurrence in the Environment and Methods of Its Speciation. Environmental Pollution, Vol. 107, 263-283.
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. Ecotox. Environ. Saf. 57, 39-47.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutat. Res. 544, 43-64.
- Lee, A.J., Hodges, N.J., Chipman, J.K., 2004. Modified comet assay as a biomarker of sodium dichromate-induced oxidative DNA damage: optimization and reproducibility. Biomarkers 9 (2), 103.
- Li, M., Liu, Z., Xu, Z., Cui, Y., Li, D., Kong, Z., 2009. Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). Chemosphere 74, 621-625
- Liu, K.J., Jiang, J.J., Shi, X.L., Gabrys, H., Walczak, T., Swartz, H.M., 1995. Low frequency EPR study of chromium (V) formation from chromium (VI) in living plants, Biochem. Biophys. Res. Commun. 206, 829-834.
- Losi, M.E., Amrhein, C., Frankenberger Jr., W.T., 1994. Environmental biochemistry of chromium, Rev. Environ. Contam. Toxicol. 136, 91-131.
- Lourenço, J.I., Pereira, R.O., Silva, A.C., Morgado, J.M., Carvalho, F.P., Oliveira, J.M., Malta, M.P., Paiva, A.A., Mendo, S.A., Gonçalves, F.J., 2010. Genotoxic endpoints in the earthworms sub-lethal assay to evaluate natural soils contaminated by metals and radionuclides. J. Hazard. Mat.
- Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H., 1995 (a). Contaminant induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: An in vitro study. Mar. Ecol. Prog. Ser. 129, 189-196.
- Lowe, D.M., Soverchia, C., Moore, M.N., 1995 (b). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. Aquatic. Toxicol. 33, 105-112.
- Lüllman-Rauch, R., 1979. Drug-induced lysosomal storage disorders. Lysosomes in Biology and Pathology, 6, pp. 49-130.
- Magni, P., De Falco, G., Falugi, C., Franzoni, M., Monteverde, M., Perrone, E., Sgro, M., Bolognesi, C., 2006. Genotoxicity biomarkers and acetylcholinesterase activity in natural

- populations of *Mytilus galloprovincialis* along a pollution gradient in the Gulf of Oristano (Sardinia, western Mediterranean). *Environ. Pol.* 142, 65-72.
- Manerikar, R.S., Apte, A.A., Ghole, V.S., 2008. In vitro and in vivo genotoxicity assessment of Cr(VI) using comet assay in earthworm coelomocytes. *Envir. Tox. and Pharm.* 25, 63-68.
- Manning, W.J., Feder, W.A., 1980. Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Pub. Ltd, London, UK, pp. 142.
- Marigómez, I., Izagirre, U., Lekube, X., 2005. Lysosomal enlargement in digestive cells of mussels exposed to cadmium, benzo[*a*]pyrene and their combination. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141, 188-193.
- Marsh, T.L., McInerney, M.J., 2001. Relationship of hydrogen bioavailability to chromate reduction in aquifer sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 1517-1521.
- Mayahara, H., Fujimoto, K., Ando, T., Ogawa, K., 1980. A new one-step method for the cytochemical localization of ouabain-sensitive potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity. *Histochemistry* 67, 125-138.
- Mazierski, J., 1994. Effect of chromium (CrVI) on the growth rate of denitrifying bacteria. *Water Research* 28, 1981-1985.
- McCarty, L.S., Shugart, 1990. Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publishers. Printed in the United States.
- McCarthy, L.S., Munkittrick, K.R., 1996. Environmental biomarkers in aquatic ecology: fiction, fantasy or functional? *Human Ecol. Risk Assess* 2, 268-274.
- McCarthy, I.F., Halbrook, S., Shugart, L.R., 1990. Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker based biomonitoring capability. Draft of Oak. Ridge National Laboratory.
- Mitchell, L.G., Mutchmor, J.A., Dolphin W.D., 1991. *Zoologia*. Ed. Zanichelli.
- Moore, M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive gland cells of the common mussel *Mytilus edulis*, and changes induced by thermal stress. *Cell Tissue Res.* 175, 279-287.
- Moore, M.N., 1985. Cellular response to pollutants. *Marine Pollution Bulletin*, 16 (4), 134-139.
- Moore, M.N., 1988. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure xenobiotics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 46 (1-3), 81-89.

- Moore, M.N., Viarengo, A., 1987. Lysosomal membrane fragility and catabolism of cytosolic proteins: evidence for a direct relationship. *Experientia* 43, 320-323.
- Moore, M.N., Allen, J.I., 2002. A computational model of the digestive gland epithelial cell of marine mussels and its simulated responses to oil-derived aromatic hydrocarbons. *Mar. Envir. Res.*, 54, 579-584.
- Moore, M.N., Depledge, M.H., Readman, J.W., Leonard, P., 2004. An integrated biomarkerbased strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat. Res.* 552, 247-268.
- Moore, M.N., Köhler, A., Lowe, D., Viarengo, A., 2008. Lysosomes and Autophagy in Aquatic Animals. In: Klionsky, D.J. (Ed.), *Methods in Enzymology, Part A. Autophagy in lower eucaryotes and non-mammalian systems*, Elsevier Inc. Academic Press, Burlington, Vol. 451, 581-620.
- Mordenti, A., Piva, G., 1997. Chromium in animal nutrition and possible effects on human health, in: S. Canali, F. Tittarelli, P. Sequi (Eds.), *Chromium Environmental Issues*, Franco Angeli s.r.l., Milan, pp. 131–151.
- Morgan, J.E., Morgan, A.J., 1988. Calcium-lead interactions involving earthworms. Part 2: The effect of accumulated lead on endogenous calcium in *Lumbricus rubellus*. Original Research Article. *Envir. Poll.*, 55 (1), 41-54.
- Morgan, J.E., Morgan, A.J., 1989 The effect of lead incorporation on the elemental composition of earthworm (Annelida, Oligochaeta) chloragosome granule. *Histochem. Cell Biol.* 92, 237-241.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environ. Pollut.* 145, 402-424.
- Nappi, P., 2000. L'utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici per valutare la qualità del suolo: stato dell'arte. Seminario internazionale indicatori biologici ed ecotossicologici applicati al suolo e ai siti contaminati.
- Nathanail, C.P., Earl, N., 2001. Human health risk assessment: guideline values and magic numbers. In: Hester RE, Harrison RM (eds) *Assessment and reclamation of contaminated land*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 85-102.
- National Research Council (NRC), 1989. *Biologic markers in reproductive toxicology*. Washington, DC: National Academy Press.
- National Research Council (NRC), 1991. *Ending Mandatory Retirement for Tenured Faculty*. Washington, DC: National Academy Press

- Nicotera, P., McConkey, D., Svensson, S.A., Bellomo, G., Orrenius, S., 1988. Correlation between cytosolic Ca^{2+} concentration and cytotoxicity in hepatocytes exposed to oxidative stress. *Toxicology* 52, 55-63.
- Nimis, P.L, Lazzarin, G., Lazzarin, A, Skerta N., 2000. Biomonitoring of trace elements with lichens in Veneto (NE Italy) *Science of The Total Environment* Volume 255, Issues 1-3, 97-111
- Nishioka, H., 1975. Mutagenic activities of metal compounds in bacteria. *Mutation Research* 31, 185-189.
- Nriagu, J.O., Pacyna, J.M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature (London)* 333, 134-139.
- OECD, 1984 (a). Guideline for testing of chemicals. No 207. Earthworm acute toxicity tests. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD, 1984 (b). Guideline for testing of chemicals. No 208. Terrestrial plants, growth test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD, 2004. Guideline for testing of chemicals. No 222. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/andrei*). Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- OECD, 2006. Guideline for testing of chemicals. Sediment-water *Lumbriculus* toxicity test using spiked sediment. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris.
- Ohta, N., Galsworthy, P.R., Pardee, A.B., 1971. Genetics of sulfate transport by *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology* 105, 1053-1062.
- Ohtake, H., Cervantes, C., Silver, S., 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *Journal of Bacteriology* 169, 3853-3856.
- Orbea, A., Cajaraville, M.P., 2006. Peroxisome proliferation and antioxidant enzymes in transplanted mussels of four basque estuaries with different levels of polycyclic aromatic hydrocarbon and polychlorinated biphenyl pollution. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 1616-1626.
- Orbea, A., Ortiz-Zarragoitia, M., Cajaraville, M.P., 2002. Interactive effects of benzo(a)pyrene and cadmium and effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on antioxidant and peroxisomal enzymes and peroxisomal volume density in the digestive gland of mussel *Mytilus galloprovincialis* Lmk. *Biomarkers* 7, 33-48.
- Orrenius, S., McConkey, D.J., Bellomo, G., Nicotera, P., 1989. Role of Ca^{2+} in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.* 7, 281-285.

- Padykula, H.A., Herman, E., 1955. Factors affecting the activity of adenosine triphosphatase and other phosphatases as measured by histochemical techniques. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 375-380.
- Palmer, C.D., Wittbrodt, P.R., 1991. Processes affecting the remediation of chromium-contaminated sites. *Environmental Health Perspectives* 92, 25-40.
- Papp, J.F., 2004. Chromium use by market in the United States, in: 10th International Ferroalloys Congress, Cape Town, South Africa, pp. 770-778.
- Peakall, D.B., Shugart, L.R., 1993. *Research And Application In The Assessment Of Environmental Health*. Springer-verlag
- Pearse, A.G.E., 1972. *Histochemistry Theoretical and Applied*, Vol. II, 3rd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh and London, pp. 1518.
- Pederson, P.L., Carafoli, E., 1987. Ion motive ATPases: I. Ubiquity, properties, and significance for cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12, 146-150.
- Pesti, M., Gazdag, Z., Belàgyi, J., 2000. In vivo interaction of trivalent chromium with yeast plasma membrane as revealed by EPR spectroscopy. *FEMS Microbiology Letters* 182, 375-380.
- Petrilli, F.L., Flora, S.D., 1977. Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 805-809.
- Pietrobon, D., Di Virgilio, F., Pozzan, T., 1990. Structural and functional aspects of calcium homeostasis in eukaryotic cells. *ur. J. Biochem.* 193(3), 599-622.
- Pipe, R.K., 1993. The generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 111-122.
- Plytycz, B., Homa, J., Koziol, B., Rózanowska, M., Morgan, A.J., 2006. Riboflavin contentin autofluorescent earthworm coelomocytes is species-specific. *Folia Histochem. Cytobiol.* 44, 275-280.
- Pons, G., Evangelisti, V., Caprì, F., Mozzone, S., and Viarengo, A., 2003. Cytochemical localization and quantification of plasma membrane Ca²⁺-ATPase activity in mollusc digestive gland cells. *Eur. J. Histochem.* 46, 31-40.
- Prento, P., 1987. Distribution of 20 enzymes in the midgut region of the earthworm, *Lumbricus terrestris L.*, with particular emphasis on the physiological role of the chloragog tissue. *Comp. Biochem. Physiol. A* 87, 135-142.
- Rasmussen, H., Barret, P.Q., 1984. Calcium messenger system: an integrated view. *Physiol. Rev.* 64, 938-984.

- Regoli, F., Pellegrini, D., Winston, G.W., Gorbi, S., Giuliani, S., Virno- Lamberti, C., Bompadre, S., 2002. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*). Mar. Pollut. Bull. 44, 912-922.
- Riffardi, R., 2005. Controllo dell'inquinamento da agenti inorganici in Fondamenti di Chimica del Suolo, Sequi P. Patron Editore
- Romeo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girare, J.P., 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. Aquat. Toxicol. 48, 185-194.
- Romeo, M., Hoarau, P., Garello, G., Gnassia-Barelli, M., Girard, J.P., 2003 (a). Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean. Environ. Pollut. 122, 369-378.
- Romeo, M., Mourgaud, Y., Geffard, A., Gnassia-Barelli, M., Amiard, J.C., Budzinski, H., 2003 (b). Multimarker approach in transplanted mussels for evaluating water quality in Charentes, France, coast areas exposed to different anthropogenic conditions. Environ. Toxicol. 18, 295-305.
- Roundhill, D.M., Koch, H.F., 2002. Methods and techniques for the selective extraction and recovery of oxoanions, Chem. Soc. Rev. 31, 60-67.
- Ryan, M.P., Williams, D.E., Chater, R.J., Hutton, B.M., McPhail, D.S., 2002. Why stainless steel corrodes? Nature (London) 415, 770-774.
- Saint-Denis, M., Labrot, F., Narbonne, J.F., Ribera, D., 1998. Glutathione glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35, 602-614.
- Salomons, W., Forstner, U. 1984. Metals in the hydrocycle.. Sci. Total Environ. 181, 187-200.
- Sawyer, C.N., McCarty, P.L., Parkin, G.F., 1994. Chemistry for Environmental Engineering, fourth ed. McGraw-Hill, New York.
- Saxe, J.K., Impellitteri, C.A., Peijnenburg, W.J.G.M. , Allen, H.E., 2001. Novel model describing heavy metal concentrations in the earthworm, *Eisenia andrei*. Environ. Sci. Technol. 35, 4522-4529.
- Schalow, B.J., Courcelle, T., Courcelle, J., 2011. Escherichia coli Fpg Glycosylase Is Nonredundant and Required for the Rapid Global Repair of Oxidized Purine and Pyrimidine Damage In Vivo. J. Mol. Biol. Vol. 410, 183-193.

- Scott-Fordsmand, J.J., Weeks, J.M., 2000. Biomarkers in earthworms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 165, 117-159.
- Semenzin, E., Temminghoff, E.J.M., Marcomini, A., 2007. Improving ecological risk assessment by including bioavailability into species sensitivity distributions: An example for plants exposed to nickel in soil. *Environ Pollut* 148, 642-647.
- Semple, K.T., Doick, K.J., Jones, K.C., Burauel, P., Craven, A., Harms, H., 2004. Defining bioavailability and bioaccessibility of contaminated soil and sediment is complicated. *Environ Sci Technol* 38, 228A-231A.
- SETAC - Society of Environmental toxicology and chemistry. 1997. Technical issue paper: Ecological risk assessment. Pensacola (FL): SETAC, p. 4.
- Sforzini, S., Dagnino, A., Torrielli, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Negri, A., Boatti, L., Viarengo, A., 2008. Use of highly sensitive sublethal stress responses in the social amoeba *Dictyostelium discoideum* for an assessment of freshwater quality. *Sci. Total Environ.* 395, 101-108.
- Sforzini, S., Dagnino, A., Oliveri, L., Canesi, L., Viarengo, A., 2011. Effects of dioxin exposure in *Eisenia andrei*: integration of biomarker data by an Expert System to rank the development of pollutant-induced stress syndrome in earthworms. *Chemos.* 85, 934-942.
- Sforzini, S., Boeri, M., Dagnino, A., Oliveri, L., Bolognesi, C., Viarengo, A., 2012. Genotoxicity assessment in *Eisenia andrei* coelomocytes: A study of the induction of DNA damage and micronuclei in earthworms exposed to B[a]P- and TCDD-spiked soils. *Mut. Res.* 746, 35-41.
- Sforzini, S., Moore, M.N., Boeri, M., Benfenati, E., Colombo, A., Viarengo, A., 2014. Immunofluorescence detection and localization of B[a]P and TCDD in earthworm tissues. *Chemos.*, *article in press*.
- Shanker, A.K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S., 2005. Review article: chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 739-753.
- Sharma, D.C., Chatterjee, C., Sharma, C.P., 1995. Chromium accumulation and its effects on wheat (*Triticum aestivum* L. cv. HD 2204) metabolism. *Plant Science* 111, 145-151.
- Shepard, K., Simkiss, K., 1978. The effects of heavy metals ions on Ca²⁺-ATPase extracted from fish gill. *Comp. Biochem. Physiol.* 61B, 69-72.
- Shi, W., Becker, J., Bischoff, M., Turco, R.F., Konopka, A.E., 2002. Association of microbial community composition and activity with lead, chromium, and hydrocarbon contamination. *Appl. Envir. Microbiol.* 68, 3859-3866.

- Shi, X., Dong, Z., Huang, C., Ma, W., Liu, K., Ye, J., Chen, F., Leonard, S.S., Ding, M., Castranova, V., Vallyathan, V., 1999. The role of hydroxyl radical as a messenger in the activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Mol. Cell. Biochem.* 194, 63.
- Silver, S., Schottel, J., Weiss, A., 2001. Bacterial resistance to toxic metals determined by extrachromosomal R factors. *International Biodeterioration and Biodegradation* 48, 263-281.
- Simkiss, K., 1984. Effects of Metal Ions on respiratory structures, in *Toxine, Drugs and Pollutants in Marine Animals* (Bolis, L., Zadunaisky, J., and Gilles, R., eds.), Springer Verlag, Berlin, pp 138-145.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Siu, W.H.L., Cao, J., Jack, R.W., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., Xu, L., Lam, P.K.S., 2004. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquat. Toxicol.* 66, 381-392.
- Smith, R., Pollard, S.J.T., Weeks, J.M., Nathanail, C.P., 2005. Assessing significant harm to terrestrial ecosystems from contaminated land. *Soil Use Man.* 21, 527-540.
- Sohal, R.S., Brunk, U.T., 1989. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. *Adv. Exp. Med. Biol.* 266, 17-29.
- Song, Y., Zhu, L.S., Wang, J., Wang, J.H., Liu, W., Xie, H., 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia foetida*) induced by atrazine. *Soil Biol. Biochem.* 41, 905-909.
- Speit, G., Hartmann, A., 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10, 555-559.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., Jones, D.T., 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* 84, 123-130.
- Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Van Gestel, C.A.M., 2003. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia* 47, 588-606.
- Spurgeon, D. J., Svendsen, C., Hankard, P. K., Weeks, J. M., Kille, P., Fishwick, S. K., 2002. Review of Sublethal Ecotoxicological Tests for Measuring Harm in Terrestrial Ecosystems. R&D Technical Report P5-063/TR1, Environment Agency, Bristol.

- Spurgeon, D.J., Sturzenbaum, S.R., Svendsen, C., Hankard, P.K., Morgan, A.J., Weeks, J.M., Kille, P., 2004. Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol. C* 138, 11-21.
- Spurgeon, D.J., Ricketts, H., Svendsen, C., Morgan, A.J., Kille, P., 2005. Hierarchical responses of soil invertebrates (earthworms) to toxic metal stress. *Environ. Sci. Technol.* 39, 5327-5334.
- Stauffer, T.P., Guerini, D., Carafoli, E., 1995. Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca^{2+} pump. A study using specific antibodies. *J. Biol. Chem.* 270(20), 12184-90.
- Stebbing, A.R.D., 1985. A possible synthesis. The effects of stress and pollution on marine animals, Praeger Scientific. Edited by Bayne B.L., Brown D.A., Burns K., Dixon D.R., Ivanovici A., Livingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Stebbing A.R.D. and Widdows J.
- Sturm, A., da Silva de Assis, H.C., Hansen, P.D., 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Mar. Environ. Res.* 47, 389-398.
- Suthar, S., Singh, S., Dhawan, S., 2008. Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: is metal bioaccumulation affected by their ecological category? *Ecol. Eng.* 32, 99-107.
- Svendsen, C., Weeks, J.M., 1997. Relevance and applicability of a simple biomarker of copper exposure. I. Links to ecological effects in a laboratory study with *Eisenia andrei*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 36, 72-79.
- Svendsen, C., Meharg, A.A., Freestone, P., Weeks, J.M., 1996. Use of an earthworm lysosomal biomarker for the ecological assessment of pollution from an industrial plastics fire. *Appl. Soil Ecol.* 3, 99-107.
- Svendsen, C., Spurgeon, D.J., Hankard, P.K., Weeks, J.M., 2004. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotox. and Environ. Safety* 57, 20-29
- Terman, A., Brunk, U.T., 2004. Lipofuscin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36, 1400-1404.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/Comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.
- Trzeciak, A., Kowalik, J., Malecka-Panas, E., Drezewoski, J., Wojewodzka, M., Iwanenko, T., Blasiak, J., 2000. Genotoxicity of chromium in human gastric mucosa cells and

- peripheral blood lymphocytes evaluated by the single cell gel electrophoresis (Comet assay). *Med. Sci. Monit.* 6 (1), 24.
- Turpeinen, R., Kairesalo, T., Häggblom, M.M., 2004. Microbial community structure and activity in arsenic-, chromium- and coppercontaminated soils. *FEMS Microbiology Ecology* 47, 39-50.
- U.S. EPA 1998. *HEXAVALENT CHROMIUM*. Washington, DC.
- U.S. EPA, 1991. Risk Assessment Guidance for Superfund (RAGS): Volume I – Human Health Evaluation Manual (HHEM) (Part B, Development of Risk-Based Preliminary Remediation Goals). Office of Emergency and Remedial Response, Washington, DC, EPA/540/R-92/003, OSWER Directive 9285.7-01B, NTIS PB92-963333.
- U.S. EPA, 2000. Clean Water Action Plan: The Second Year Report: Progress Through Partnerships. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- UNICHIM, 2003. Metodo UNICHIM 1651. Qualità dell'acqua. Determinazione dell'inibizione della germinazione e dell'allungamento radicale in *Cucumis sativus* L. (cetriolo), *Lepidium sativum* L. (crescione), *Sorghum saccharatum* Moench (sorgo). Saggio di tossicità cronica breve. UNICHIM, pp.22
- Valembois, P., Roch, P., Lassegues, M., 1982 (a). Bacteriostatic activity of a chloragogen cell secretion. *Pedobiologia* 24, 191.
- Valembois, P., Lassègues, M., Roch, P., 1992. Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. *Dev. Comp. Immunol.* 16, 95.
- Valembois, P., Seymour, J., Lassègues, M., 1994. Evidence of lipofuscin and melanin in the brown body of the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Cell Tissue Res.* 227, 183.
- Valembois, P., Roch, P., Lassegues, M., Davant, N., 1982 (b). Bacteriostatic activity of a chloragogen cell secretion. *Pedobiol.* 24, 191-195.
- van der Oost, R., Lopes, S.C.C., Komen, H., Satumalay, K., van den Bos, R., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1998. Assessment of environmental quality and inland water pollution using biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*): Use of a bioactivation:detoxication ratio as a Biotransformation Index (BTI). *Mar. Environ. Res.* 46, 315-319.
- van Gestel, C.A.M., Weeks, J.M., 2004. Recommendations of the Third International Workshop on Earthworm Ecotoxicology, Aarhus, Denmark, August 2001. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 100-105.

- van Gestel, C.A.M., Dirven-van Breemen, E. M., Baerselman, R., 1993. Accumulation and elimination of cadmium, chromium and zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Annelida). *Sci. Total Environ.* 134, 585-597.
- Van Os, C.H., 1987. Transcellular calcium transport in intestinal and renal epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 906, 195-222.
- Venitt, S., Levy, L.S., 1974. Mutagenicity of chromates in bacteria and its relevance to chromate carcinogenesis. *Nature (London)* 250, 493-495.
- Viarengo, A., 1985. Biochemical effects of trace metals. *Mar. Poll. Bull.* 16 (4), 153-158.
- Viarengo, A., 1989. Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci. Review* 1, 295-317.
- Viarengo, A., Canesi, L., 1991 (a). Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, 94, 225-243.
- Viarengo, A., Nicotera, P., 1991 (b). Possible role of Ca^{2+} in heavy metal cytotoxicity. *Comp. Biochem. Physiol. C* 100, 81-84.
- Viarengo, A., Nott, J.A., 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. C, Comp. Pharmacol. Toxicol.* 104, 355-372.
- Viarengo, A., Pertica, M., Canesi, L., Biasi, F., Cecchini, G., Orunesu, M., 1988. Effects of heavy metals on lipid peroxidation in mussel tissues. *Mar. Environ. Res.* 24, 354.
- Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Poli, G., Moore, M.N., Orunesu, M., 1990. Heavy metal effects on lipid peroxidation in the tissues of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Comp. Biochem. Physiol. C* 97, 37-42.
- Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Damonte, G., Orunesu, M., 1991. Biochemical characterization of the plasma membrane Ca^{2+} pumping ATPase activity present in the gill cells of *Mytilus galloprovincialis* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B, 753-758.
- Viarengo, A., Mancinelli, G., Pertica, M., Fabbri, R., Orunesu, M., 1993. Effects of heavy metals on the Ca^{2+} -ATPase activity present in gill cell plasma-membrane of mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) *Compar. Biochem. Physiol.* 106C, 660-665.
- Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marrò, A., Fabbri, R., 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 4, 455-466.
- Viarengo, A., Burlando, B., Giordana, A., Bolognesi, C., Gabrielides, G.P., 2000 (a). Networking and expert-system analysis: next frontier in biomonitoring. *Marine Environmental Research* 49, 483-486.

- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146, 281-300.
- Vincent, J.B., 1994. Chromium: biological relevance. In: King, R.B. (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Second ed. vol. 2. Wiley, New York.
- Wachstein, M., Meisel, E., 1957. Histochemistry of hepatic phosphatases at physiologic pH. With special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin. Pathol.* 27, 13.
- Webb, M., 1987. Toxicological significance of metallothionein. *EXS* 52, 109-134.
- Weiss, C.M., 1964. Detection of pesticides in water by biochemical assay. *J. Water Pollut. Control Fed.* 36, 240-253.
- World Health Organization (WHO), 1993. *Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Xiao, N.W., Song, Y, Ge, F., Liu, X.H., Ou-Yang, Z.Y., 2006. Biomarkers responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere* 65, 907-912.
- Xu, X.R., Li, H.B., Gu, J.D., 2004. Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid in aqueous solutions. *Chemosphere* 57, 609-613.
- Xu, X.R., Li, H.B., Gu, J.D., Li, X.Y., 2005. Kinetics of the reduction of chromium (VI) by vitamin C. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1310-1314.
- Zayed, A.M., N. Terry, 2003. Chromium in the environment: factors affecting biological remediation, *Plant Soil.* 249, 139-156.
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D.S., Wu, L.-Y., Marsh, T.L., O'Neill, R.V., Palumbo, A.V., Tiedje, J.M., 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 326-334.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal Chim Acta* 606, 135-150.
- Ziegler, D.M., 1985. Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiolsdisulphides in metabolic regulation. *Annu. Rev. Biochem. Allied Res. India* 54, 305.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Prof. Aldo Viarengo per l'aiuto nella ricerca e le revisioni di tutte le parti della tesi. Un sincero ringraziamento va alle mie colleghe

Dott.ssa Susanna Sforzini, Dott.ssa Laura Oliveri, Dott.ssa Caterina Oliveri, e colleghi Dott. Alessandro Dagnino e Dott. Alessio Gomiero che, in momenti diversi e in vari modi, mi hanno prestato il loro aiuto e la loro assistenza durante il mio lavoro. Un ringraziamento speciale va alla mia collega Dott.ssa Daniela Governa che con me ha condiviso l'esperienza del Dottorato. Infine ringrazio la mia famiglia e tutti gli amici che mi hanno seguito, con pazienza, da vicino e da lontano, durante l'intero corso di studi.

Allegati

Articoli

Sforzini, S., Governa, D., **Boeri, M.**, Oliveri, L., Congiu, A., Oldani, A., Vago, F., Cucchetti, D., Borrelli, R., Cesti, P., Viarengo, A. New insight on the molecular effects of DDT and its metabolites on *Dictyostelium discoideum*: relevance for environmental risk assessment. *Article in preparation*.

Sforzini, S., Moore, M.N., **Boeri, M.**, Benfenati, E., Colombo, A., Viarengo, A., 2014. Immunofluorescence detection and localization of B[a]P and TCDD in earthworm tissues. *Chemos.*, *article in press*.

Sforzini, S., **Boeri, M.**, Dagnino, A., Oliveri, L., Bolognesi, C., Viarengo, A., 2012. Genotoxicity assessment in *Eisenia andrei* coelomocytes: A study of the induction of DNA damage and micronuclei in earthworms exposed to B[a]P- and TCDD-spiked soils. *Mut. Res.* 746, 35-41.

Partecipazione a congressi

Sforzini, S., **Boeri, M.**, Governa, D., Oliveri, L., Viarengo, A. Alterazioni fisiologiche provocate dal Cr(VI) nel verme terrestre *Eisenia andrei*: dagli effetti a livello molecolare/cellulare alle risposte a livello di organismo (XXIII Congresso SiTE, 16-18 settembre 2013, Ancona – *oral presentation*).

Sforzini, S., Governa, D., **Boeri, M.**, Gomiero, A., Oliveri, L., Viarengo, A. Uso di fitofarmaci nella coltura del riso: valutazione degli effetti biologici in differenti organismi modello (XXIII Congresso SiTE, 16-18 settembre 2013, Ancona – *oral presentation*).

Sforzini S., **Boeri M.**, Olivieri S., Viarengo A. A study of the effects of Cr(VI) on the earthworm *Eisenia andrei*: from molecular/cellular changes to whole organism responses (23rd Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry - SETAC Europe, 12-16 May 2013, Glasgow – *oral presentation*).

Viarengo, A., **Boeri, M.**, Governa, D., Olivieri, S., Oldani, A., Vago, F., Borrelli, R., Chiaberge, S., Fiorani, T., Cesti, P., Zaninetta, L., Sforzini, S. Accumulation of chemicals in caged molluscs (*Unio pictorum*) and evaluation of their effects using a multilevel biomarkers approach (23rd Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, SETAC Europe, 12-16 May 2013, Glasgow – *poster*).

Sforzini, S., Olivieri, S., Oldani, A., Vago, F., Borrelli, R., Chiaberge, S., Fiorani, T., Cesti, P., **Boeri, M.**, Zaninetta, L., Viarengo, A. Valutazione della qualità dei suoli ripariali mediante il verme del suolo *Eisenia andrei*: utilizzo di parametri fisiologici a diversi livelli di complessità funzionale (XXII Congresso SiTE, 10-13 settembre 2012, Alessandria – *oral presentation*).

Boeri, M., Governa, D., Olivieri, S., Oldani, A., Vago, F., Borrelli, R., Chiaberge, S., Fiorani, T., Cesti, P., Zaninetta, L., Viarengo, A., Sforzini, S. Biodisponibilità di inquinanti organici e inorganici nelle acque di un corpo idrico lentico: utilizzo di *Unio pictorum* per la determinazione del bioaccumulo e dei conseguenti effetti biologici (XXII Congresso SiTE, 10-13 settembre 2012, Alessandria – *poster*).

Governa, D., **Boeri, M.**, Congiu, A., Oldani, A., Vago, F., Cucchetti, D., Borrelli, R., Cesti, P., Viarengo, A., Sforzini, S. Use of *Dictyostelium discoideum* as model organism for the evaluation of biological effects due to DDT and mercury in field and laboratory studies (28th ESCPB September 2-5, 2012, Bilbao- *oral presentation*).

Sforzini, S., **Boeri, M.**, Olivieri, S., Viarengo, A. Effects of environmentally relevant concentrations of Cr(VI) on earthworms: role of oxidative stress in physiological alterations (28th ESCPB September 2-5, 2012, Bilbao - *Poster*).

Sforzini, S., **Boeri, M.**, Olivieri, S., Viarengo, A. Methodological improvements in the study of pollutant-induced toxicity on the earthworm *Eisenia andrei*: the effects of chromium(VI) on coelomocytes physiology (6th SETAC World Congress/SETAC Europe 22nd , 20-24 May 2012, Berlin - *poster*).

Sforzini S., **Boeri, M.** , Olivieri, S., and Viarengo, A. Ruolo dello stress ossidativo nell'alterazione della fisiologia dei celomociti di *Eisenia andrei* dopo esposizione dei vermi a cromo esavalente (XXI SiTE, 3-6 ottobre 2011, Palermo - *oral presentation*).

Sforzini, S., Boeri, M., Saggese, I., Oliveri, L., Bolognesi, C., Viarengo, A. Use of the Comet and micronucleus assays in the detection of genotoxic effects in *Eisenia andrei* coelomocytes after exposure of the earthworms to dioxin and B[a]P-spiked soils (21st SETAC EUROPE ANNUAL MEETING, 15-19 May 2011, Milan - *oral presentation*)