



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento Agronomia Animale Alimenti Risorse Naturali e Ambiente

Corso di laurea triennale in Biotecnologie Agrarie

INQUINANTI ORGANICI E INORGANICI: RUOLO DELLE GLUTATIONE SULFO-  
TRANSFERASI NEI PROCESSI DI DETOSSIFICAZIONE DELLE PIANTE

Relatore

Prof. Rossella Ghisi

Laureanda

Ilenia Pianta

Matricola n. 596591

ANNO ACCADEMICO 2012-2013



## INDICE:

Riassunto

Abstract

1 Introduzione

1.2 Natura degli inquinanti

1.3 Inquinamento da idrocarburi policiclici aromatici

1.4 Tricloroetilene e acido tricloroacetico

1.5 Fitofarmaci

1.6 Metalli pesanti

2 Risanamento dei suoli e delle acque

2.1 Biorisanamento

2.2 Fitorimedio

3 risposta delle piante agli inquinanti

3.1 Fasi della detossificazione

3.1.1 Fase I : Le reazioni di ossidazione

3.1.2 Fase I : Le reazioni di idrolisi

3.1.3 Fase II: Le reazioni di coniugazione

4 Glutathione sulfo-transferasi (GST)

4.1 Il Glutathione e le GST

4.2 Trasporto e destino metabolico dei GSH- Coniugati

#### RIASSUNTO:

L'ambiente è ormai contaminato da una moltitudine di composti organici ed inorganici. Lo scopo di questa tesi è quello di studiare quali sono i meccanismi che le piante attivano in risposta agli inquinanti, con particolare riferimento all'attività ed espressione delle Glutazione sulfo-transferasi. Esse svolgono un ruolo nei normali processi metabolici della cellula vegetale e anche di detossificazione di una grande varietà di componenti xenobiotici.

**ABSTRACT:**

The environment is now contaminated with a multitude of organic and inorganic compounds. The purpose of this thesis is to study what are the mechanisms that plants activate in response to pollutants with particular reference to the activity and expression of Glutathione S- transferase. in plants it plays important roles in both normal cellular metabolism as well as in the detoxification of a wide variety of xenobiotic compounds.

## 1.INTRODUZIONE

L'inquinamento ambientale è stato definito come un'indesiderabile variazione delle caratteristiche dell'aria, dell'acqua, del suolo, che può influire negativamente sulla salute, sulla sopravvivenza, sulle attività degli uomini o degli altri organismi viventi . L'inquinamento può essere di tipo chimico, fisico (ad es. cambiamenti di temperatura), biologico (rilascio di microorganismi, tipicamente attraverso le fognature).Nel corso dei secoli, l'uomo attraverso le pratiche agronomiche, l'industria e le attività militari hanno contaminato grandi aree dei paesi industrializzati, con inquinanti organici e metalli pesanti. In passato la rapidità dei mutamenti nelle caratteristiche ambientali era collegata esclusivamente a fenomeni naturali legati ai processi endogeni ed esogeni della crosta terrestre. Oggi, invece, i cambiamenti si sono intensificati in maniera esponenziale con le attività umane che, con immissioni dirette ed indirette nell'ambiente di sostanze e/o energia, hanno provocato l'accumulo di sostanze in grado di provocare o favorire alterazioni più o meno persistenti o irreversibili delle caratteristiche chimico-fisiche e biologiche degli ecosistemi (Susarla et al., 2002). La rapida industrializzazione e la necessità di generare nuove fonti di energia sono la causa principale del continuo rilascio nella biosfera di sostanze inquinanti. Tali sostanze generano una forte pressione selettiva sulla capacità dell'ecosistema di autodepurarsi, danneggiando le biodiversità e mettendo in pericolo uno sviluppo naturale. Il destino degli inquinanti, una volta giunti nell'ambiente, può essere diverso. Essi possono avere vita relativamente breve, con effetti tossici transitori o, come i metalli pesanti e molti dei composti organici di sintesi, persistere nell'ambiente ed essere accumulati nei suoli, nelle acque fluviali, lacustri e marine, e negli organismi viventi (bioaccumulo, biomagnificazione) a seconda delle loro caratteristiche chimico-fisiche(*European Commission, 2002*). È stato visto, infatti, che i residui dei fitofarmaci persistenti, come ad esempio quelli contenenti cloro, dopo più di venti anni dalla loro messa al bando, possono essere ancora trovati nell'ambiente. Oltre al loro effetto

negativo sui vari ecosistemi e sulle altre risorse naturali, i siti inquinati sono anche dannosi per la salute pubblica poiché i composti tossici in essi presenti possono entrare nella catena alimentare attraverso le colture agrarie o l'acqua potabile. In Europa è stato stimato che 52 milioni di ettari, cioè più del 16% dell'area totale, sono interessati da una qualche forma di degradazione del suolo ( *Franco S., 2009*). Le aree più inquinate sono state trovate nei pressi delle zone industrializzate dell'Europa nord ovest, ma anche presso tutte le altre grandi città Europee . Nel corso degli anni, la regolamentazione per prevenire ulteriori contaminazioni ambientali è divenuta sempre più severa. Infatti molti paesi europei hanno iniziato ad adottare linee molto stringenti in campo ambientale contro la contaminazione del suoli ( *Chaudhry et al., 2005*).

## 1.2 NATURA DEGLI INQUINANTI

Gli inquinanti chimici possono essere divisi in due grosse categorie: inorganici ed organici.

Inquinanti inorganici: a parte il problema relativo all'eccessivo rilascio di nitrati da parte delle attività legate all'agricoltura, gli inquinanti inorganici sono essenzialmente rappresentati dai metalli pesanti, le cui fonti principali sono i rifiuti di miniere e altiforni ed i fanghi di depurazione. Questo tipo d'inquinante persiste all'interno dei vari ecosistemi per tempi molto lunghi e rende il processo di ripristino molto complesso.

Inquinanti organici: oggi più di 100.000 diverse sostanze chimiche organiche sono distribuite sul mercato europeo, e un terzo di loro superano quantità di una tonnellata l'anno ( *Information System (ESIS) 2001 e EEA 2007*): Molti di loro sono stati introdotti per il beneficio della vita quotidiana, la produzione alimentare e industriale, la medicina umana e veterinaria, scopi sperimentali. La maggior parte di questi composti ha una biodegradabilità piuttosto scarsa. Pertanto, le risorse

idriche ma anche i terreni risultano sempre più contaminati da questi artificiali “pollutants”. Inoltre, alcuni di questi inquinanti possono possedere la capacità indesiderabile di avere attività estrogenica in molti organismi superiori. Dobbiamo affrontare il problema che molti di loro creeranno sempre più disagi ambientali in tutte le regioni del nostro continente, e in tutto il mondo. Tra essi sono ben noti pesticidi, plastificanti, additivi per carburanti, medicinali, esplosivi, colori e profumi. Le acque reflue provenienti da processi industriali e scaricate in ecosistemi acquatici, possono ridurre notevolmente la qualità dell'acqua con l'aumento delle concentrazioni di inquinanti xenobiotici, causando in tal modo effetti negativi sulla salute umana e cambiamenti indesiderati nella composizione del biota acquatico. La loro produzione ha subito un forte incremento negli ultimi cinquant'anni. Si può senza dubbio affermare che l'uso indiscriminato di queste sostanze e quindi il conseguente rilascio nei diversi comparti ambientali, in seguito ad attività industriali, agricole ed urbane, è divenuto un problema gravissimo. Ciò rende sempre più necessaria ed urgente la ricerca di metodologie efficaci, a basso costo e di facile attuabilità, per il recupero della qualità dell'ambiente. In questo progetto di tesi l'attenzione è stata focalizzata sui composti organici xenobiotici. Uno dei problemi principali, insito nell'inquinamento da sostanze organiche di sintesi, è la limitata possibilità di quest'ultime di entrare nei normali cicli biodegradativi attuati dagli organismi viventi, in quanto possono essere considerate come strutture nuove non trovate in condizioni naturali. I composti xenobiotici, anche se presenti nell'ambiente in concentrazioni estremamente basse, possono creare seri problemi. Essi, infatti, non sempre sono biodegradabili e possono essere assimilati dagli organismi viventi, concentrandosi sulla catena alimentare e, secondo processi di bioaccumulo, diventare tossici per gli organismi superiori compreso l'uomo stesso. Tutto ciò ha reso sempre più necessaria ed urgente la ricerca di metodologie efficaci, di facile attuabilità ed a basso costo, per il recupero della qualità di ognuna delle matrici che può essere interessata. Negli ultimi decenni, l'accumulo di sostanze xenobiotiche risultante dalla produzione e dall'uso in larga scala di prodotti chimici come fitofarmaci, idrocarburi policiclici aromatici (IPA), esplosivi, saponi, detergenti, coloranti e sostanze aromatiche di natura



fenolica, in ambienti come il suolo, i laghi, i fiumi, i sedimenti e gli ambienti marini in generale, è diventato un problema di sempre maggiore rilievo. Gli IPA, così come altri composti aromatici, si trovano nell'ambiente essenzialmente come residui nei reflui di diverse attività industriali, quali la lavorazione del petrolio e delle pelli (concerie), la produzione di: acciaio, sostanze plastiche, resine, tessuti e carta. Si trovano nell'ambiente anche come residui della combustione dei derivati del petrolio o di materia organica, per perdite accidentali o dovute ad eventi naturali come le infiltrazioni di olii per fenomeni geologici (Escalante- Espinosa et al., 2005). Anche l'industria alimentare può produrre reflui di difficile depurazione, come ad esempio le acque di vegetazione dei processi di molitura delle olive caratterizzati da alte concentrazioni di fenoli. Per le loro caratteristiche di tossicità i fenoli, così come gli IPA, che in più mostrano anche elevata recalcitranza nell'ambiente, sono inquinanti da tenere in massima considerazione per i loro effetti sull'ecosistema (Abhilash PC., Jamil S., Singh N., 2009).

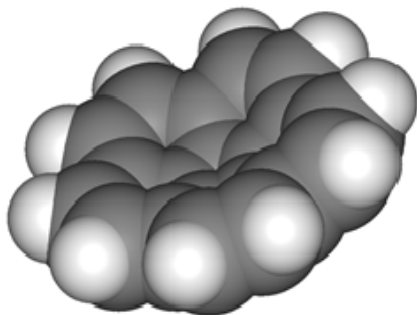


In figura: percentuale dei vari contaminanti ritrovati in suoli e acque.

### 1.3 INQUINAMENTO DA IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI

Tra i composti tossici gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono particolarmente pericolosi per la loro intrinseca stabilità chimica e l'elevata resistenza alla degradazione a cui associano un'elevata tossicità e cancerogenicità (*Baldrian et al., 2000*). Gli IPA sono sostanze inquinanti di tipo organico costituite da due o più anelli aromatici condensati. Le loro caratteristiche chimiche come la solubilità, l'idrofobicità, il punto di fusione e d'ebollizione e la pressione di vapore variano all'aumentare del numero degli anelli aromatici e quindi del loro peso molecolare. C'è un elevato interesse dal punto di vista ecotossicologico riguardo la presenza degli IPA nell'ambiente dato che essi hanno dimostrato avere proprietà tossiche, mutagene e cancerogene (*Goldman et al., 2001*). Gli effetti tossici degli IPA sembrano essere legati al numero d'anelli aromatici. Numerosi studi hanno mostrato come composti ad uno, due e tre anelli sono molto tossici; quelli con quattro o più anelli sono considerati genotossici. L'importanza ecotossicologica degli idrocarburi policiclici aromatici e la frequenza con cui si riscontrano nell'ambiente ha spinto l'Environmental Protection Agency (EPA) degli Stati Uniti ad inserire gli IPA tra gli inquinanti più rilevanti ed a definire la rimozione di tali inquinanti dal suolo e dall'acqua una priorità per la salute umana. Effetti di bioaccumulo degli inquinanti sono stati riscontrati in organismi sia terrestri che marini. Anche qui una discriminante importante è il numero degli anelli aromatici degli IPA coinvolti in tali processi. Quando gli IPA contaminano il suolo, il rapporto carbonio/azoto (C/N) è alterato poiché l'aggiunta di carbonio stimola la crescita microbica. Lo squilibrio del rapporto C/N può provocare un'immobilizzazione dell'azoto nel suolo, limitando così la crescita delle piante superiori. Gli IPA sono composti idrofobici poco solubili in acqua e quindi, nel suolo, la loro biodisponibilità può essere ridotta o perché adsorbiti su colloidali organici ed inorganici o perché presenti in fasi liquide non acquose (NALP). Per la degradazione è necessario però che questi composti vengano trasferiti in fase acquosa. Quando si determinano casi d'inquinamento da IPA presenti in forma di

NAPL, ci può essere un interessamento del suolo, delle falde acquifere nonché del mare. Anche i fenoli hanno un elevato impatto ambientale sulle acque superficiali dal momento che essi consumano l'ossigeno disciolto, chinonizzandosi e rendendo in tal modo anossico l'ambiente per la flora e la fauna acquatica. A quest'azione diretta se ne aggiunge una indiretta antimicrobica dovuta alla diminuzione della tensione superficiale indotta dai fenoli, che danneggia le membrane cellulari e provoca la denaturazione delle proteine. In aree prossime a raffinerie è stata riscontrata una concentrazione di IPA di  $1,7 \times 10^6$  ng/g contro quella di 5 ng/g di aree poco sviluppate. Ad esempio, nelle acque reflue di raffinerie petrolifere, la concentrazione di fenoli può variare da 10 a 216 mg ml<sup>-1</sup>. Il problema dell'inquinamento da IPA invece è legato alla limitata biodisponibilità di questi inquinanti, dovuta alla loro bassa solubilità in acqua, (fase in cui avvengono la maggior parte delle reazioni biologiche) ed a fenomeni d'assorbimento, stazionamento nel suolo e nel sedimento. In queste condizioni, poi, il tempo contribuisce ad aumentarne la loro recalcitranza nell'ambiente. Le fasi iniziali di degradazione di molecole di fenantrene e di altri IPA prevedono l'idrossilazione della molecola e l'incorporazione di una molecola di ossigeno. Nel processo di degradazione di molti policiclici aromatici si forma poi un intermedio chiave quale il catecolo. Tali composti sono simili ai prodotti di degradazione della lignina, quindi, la maggior parte degli studi per la bonifica dei siti contaminati da composti aromatici o dalle acque di vegetazione si è focalizzata sui funghi ligninolitici (Aggelis et al., 2003).

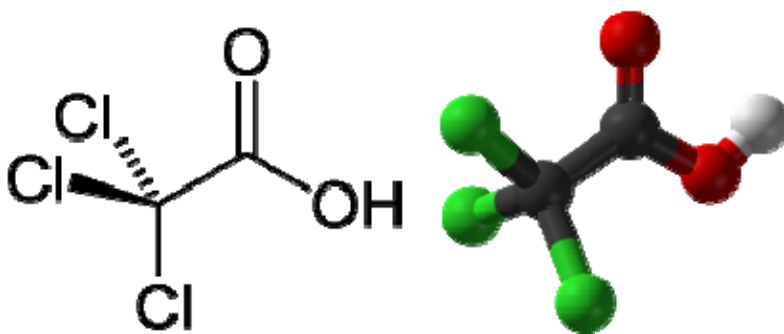


*In figura: struttura tridimensionale del corannulene, IPA strutturalmente formato dalla condensazione di 5 anelli benzenici e un anello centrale di ciclo pentano.*

#### 1.4 TRICLOROETILENE

Il tricloroetilene (TCE) è uno dei più comuni inquinanti dei suoli e delle falde acquifere dovuto al suo utilizzo negli anni nelle industrie, al versamento accidentale e al deliberato scarico (*Halsey et al., 2005*). Il tricloroetilene è un idrocarburo clorurato usato come solvente nelle industrie e presente in alcuni prodotti d'utilizzo domestico come pitture, smalti e detersivi. Il TCE è una neurotossina, un'epatossina e un sospetto cancerogeno (*Brown et al., 1990*). È stato visto inoltre che il tricloroetilene ha anche l'abilità di attraversare facilmente la barriera placentale degli umani; una volta che l'esposizione al TCE è avvenuta i mammiferi possono respirare o metabolizzare l'inquinante. Il tricloroetilene è maggiormente metabolizzato nel fegato di mammiferi grazie a due enzimi, il CYP2E1 e l'ALDH1. Il principale prodotto che si produce dal metabolismo del tricloroetilene nei mammiferi è l'acido tricloroacetico (TCAA) (*Brown et al., 1990*). Il TCE è un liquido denso ( $d = 1,46 \text{ g/cm}^3$ ), se si trova in condizioni dove è incapace di volatilizzare esso migra sul fondo dello strato acquifero. Quando il tricloroetilene penetra nello strato acquifero rimarrà lì a lungo tempo come fonte secondaria di contaminazione. Così il tricloroetilene persiste nella falda acquifera e può migrare all'interno dello strato acquifero e nell'acqua potabile cittadina e da qui può essere assorbita e consumata dall'uomo. Ci sono molte comuni e convenzionali pratiche usate per rimuovere il tricloroetilene e altri composti volatili dall'ambiente. Queste tecnologie includono il pump-and-treat, tecniche di insufflazione d'aria e sistemi d'estrazione del suolo a vapore (*Bayer et Finkel, 2006*). Purtroppo queste tecniche sono costose e impiegano molto tempo per pulire un'area contaminata. Quindi, recentemente il fitorisanamento è stato studiato come un possibile strumento per rimuovere economicamente ed efficientemente il TCE dall'ambiente. L'acido tricloroacetico (TCA) è un acido carbossilico scoperto per la prima volta da Jean Baptiste Dumas nel 1839. Esso si presenta come il maggiore composto ottenuto dal metabolismo del tricloroetilene nei mammiferi.

La sua struttura è assimilabile a quella di una molecola di acido acetico in cui tre atomi di idrogeno non acidi sono stati sostituiti da altrettanti atomi di cloro. Questi tre atomi sostituiti attirano la carica elettronica del carbonio  $\alpha$  verso sé stessi, determinando una condizione di parziale elettrone-deficienza sul carbonio sopraindicato, il quale richiama a sua volta la carica elettronica del carbonio carbossilico e quindi dell'ossigeno, che tenderà a dissociare in maniera più significativa il protone (se posto in ambiente acquoso), determinando un valore di  $K_a$  di  $10^{-1}$ , cioè molto maggiore rispetto all'acido acetico (che ha una  $K_a$  pari a  $10^{-4}$ ). A temperatura ambiente è un solido incolore dall'odore pungente e come il TCE, il TCA può essere dannoso per l'ambiente e per la salute pubblica. L'acido tricloroacetico è comunemente trovato nell'ambiente e principalmente in acque come prodotto della clorazione e nell'ambiente perché usato come erbicida. Dato il suo diffuso uso e le sue potenziali origini naturali, il TCAA può essere trovato in quantità misurabili nel suolo, nelle falde acquifere, sulla superficie dell'acqua, nell'atmosfera e nelle precipitazioni. L'acido tricloroacetico ha un ampio intervallo di tossicità nell'ambiente e la specie terrestre testata più sensibile è il cane.

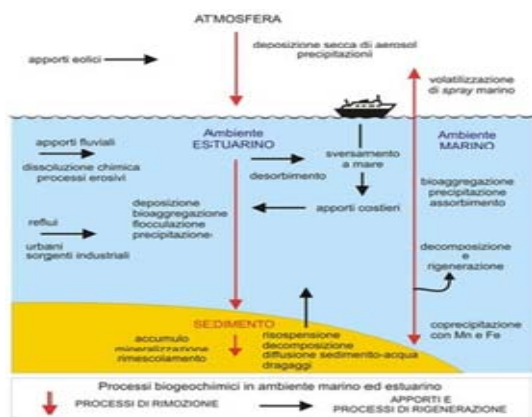


*In figure: acido tricloroacetico; struttura chimica e tridimensionale.*

## 1.6 METALLI PESANTI

Un metallo pesante è un membro di un insieme vagamente definito di elementi che presentano proprietà metalliche. Esso comprende principalmente i metalli di transizione, alcuni metalloidi, lantanidi ed attinidi. Molte definizioni differenti sono state proposte: alcune basate sulla densità, alcune sul numero o peso atomico ed altre su proprietà chimiche o di tossicità. I metalli pesanti sono componenti naturali della crosta terrestre che non sono degradati dall'attività biologica e fotochimica e quindi non possono venire smaltiti; se rilasciati nell'ambiente possono restare biodisponibili per centinaia di anni. Essi sono introdotti nei sistemi acquatici come conseguenza dell'erosione di terre e rocce e da diverse attività umane che spaziano dall'estrazione mineraria all'uso di tubature in piombo per l'acqua potabile. Certi fenomeni naturali come le eruzioni vulcaniche, gli incendi boschivi e le maree contribuiscono al ciclo naturale dei metalli; l'uomo però gioca un ruolo altrettanto importante e a volte maggiore di quello ambientale: alterando il ritmo di rilascio e di trasporto dei metalli pesanti nell'ambiente esso è riuscito ad aumentarne di alcuni ordini di grandezza le emissioni. I metalli pesanti possono entrare nel nostro corpo attraverso l'acqua, l'aria, il cibo, e in passato, attraverso le pratiche odontoiatriche (Hg): È stato stimato che nelle esalazioni della bocca delle persone che hanno elevate otturazioni dentarie con amalgama al mercurio vi è una percentuale di vapori di mercurio superiore al massimale consentito per gli operai dell'industria. Alcuni di questi elementi in tracce fanno naturalmente parte di noi come: ferro, rame, selenio, zinco, cromo. Essi sono essenziali per mantenere un corretto metabolismo, tuttavia in concentrazioni maggiori sono tossici. Tra le varie sostanze inquinanti al giorno d'oggi diffuse in massa nell'ambiente, i metalli pesanti sono i composti più dannosi perché si legano con le strutture cellulari in cui si depositano, ostacolando lo svolgimento di determinate funzioni vitali. I gruppi sulfidrici (SH), normalmente presenti nelle proteine enzimatiche si legano facilmente ai metalli pesanti ed il complesso metallo-zolfo risultante lo porta ad una ridotta attività catalitica. L'eliminazione di tali metalli avviene solo in minima

parte, per salivazione, traspirazione, allattamento portando a fenomeni di bioaccumulo. Questo corrisponde nel tempo ad un aumento nella concentrazione di un prodotto chimico in un organismo rispetto la sua concentrazione del prodotto chimico nell'ambiente. I residui si accumulano negli esseri viventi ogni volta che sono assimilati ed immagazzinati piu' velocemente di quanto sono scomposti (metabolizzati) o espulsi. I metalli si concentrano in particolare in alcuni organi quali fegato e reni, ma anche nel cervello (Hg), nelle ossa (Hb, Cd). , e spesso sono un fattore aggravante o determinante di numerose malattie croniche. I bambini sono i soggetti piu' a rischio da esposizione al piombo, al mercurio e agli altri agenti tossici, poichè per unita' di peso, mangiano, bevono e respirano tre-quattro volte di piu' degli adulti. Se si considera inoltre che la linea di demarcazione fra carenza alimentare di tali sostanze e tossicita' e' molto sottile, risulta evidente quanto sia importante conoscere la presenza e l'utilizzo di tali elementi all'interno della vita quotidiana.



*In figura: processi biogeochimici dei metalli pesanti nell'ambiente marino.*

I primi casi accertati di avvelenamento da metalli pesanti risalgono al 1952; fin dal 1932 scorie contenenti mercurio furono ritrovate nella baia di Minimata in Giappone. Il mercurio accumulato dalle creature marine si trasmise attraverso la catena alimentare agli abitanti della baia. Nel 1952 apparve il primo caso di avvelenamento con decesso dovuto al mercurio. In totale negli anni '50 ne furono accertati 500 tutti conclusi con la morte dei pazienti. Da quel momento il

Giappone emanò leggi severe riguardo l'emissione di metalli pesanti nell'ambiente per fronteggiare quella che prese il nome di "Sindrome di Minimata". Fra le 80 sostanze inquinanti a cui L'Agenzia per la Protezione Ambientale degli Stati Uniti d'America pone maggiore attenzione ci sono 10 metalli pesanti. Le miniere d'oro della Nova Scotia in funzione dal 1860 al 1945 hanno prodotto circa tre milioni di tonnellate di scorie minerarie contenenti mercurio, arsenico, cadmio, rame, ferro e tallio. Gli scienziati hanno da poco esaminato i sedimenti dei laghi a valle della miniera, concludendo che non c'è ancora "alcuna evidenza di calo" nei livelli di contaminazione, malgrado siano passati 50 anni dalla chiusura delle miniere. All'interno della comunità europea gli elementi presenti in quantità maggiore sono arsenico, cadmio, cobalto, cromo, rame, mercurio, manganese, nichel, piombo, stagno e tallio, le cui emissioni sono monitorate principalmente negli inceneritori di rifiuti. Galvanotecnica è la fonte primaria di cromo e cadmio. Cadmio, piombo e zinco vengono rilasciati in minuscole particelle come polvere di pneumatici sul manto stradale; la piccola dimensione permette a questi metalli tossici di salire col vento per essere inalati o trasportato su piante o terriccio. A differenza di inquinanti organici, i metalli pesanti non decadono e quindi costituiscono un diverso tipo di sfida per la bonifica. Le piante, funghi o microrganismi sono a volte utilizzati con successo per rimuovere alcuni metalli pesanti come il mercurio. Uno dei più grandi problemi connessi con la persistenza di metalli pesanti è il potenziale di bioaccumulo causando l'esposizione più pesante per alcuni organismi presenti nell'ambiente. Pesci costieri (come il toadfish liscio) e uccelli marini (come il pulcinella di mare) sono spesso monitorati per la presenza di tali contaminanti.



## 1.8- FITOFARMACI

I fitofarmaci sono tutti quei prodotti, di sintesi (quali composti chimici xenobiotici) o naturali, che vengono utilizzati in agricoltura per combattere le principali avversità delle piante; esistono pertanto molecole attive contro erbe infestanti (erbicidi), funghi patogeni (fungicidi), insetti (insetticidi) ed altri agenti parassitari. L'efficacia dei fitofarmaci è essenzialmente la risultante di due parametri: la biodisponibilità e la tossicità intrinseca. La biodisponibilità consiste nella capacità di un fitofarmaco di penetrare nella cellula e di pervenire in contatto con il sito attivo dell'organismo bersaglio ad una concentrazione sufficiente per esplicare l'azione tossica. La tossicità intrinseca riguarda la capacità del fitofarmaco, una volta raggiunto il sito d'azione, di svolgere il suo effetto tossico tramite un meccanismo che è peculiare di ogni classe di composti ed è in stretta relazione con l'organismo vegetale o animale bersaglio (*Scarponi L., 2003*). In genere l'azione tossica di un fitofarmaco consiste nell'interferenza con precise attività metaboliche dell'organismo bersaglio. Come risultato, l'inibizione anche di una sola funzione può alterare un intero processo metabolico con conseguenze talvolta letali. L'azione dei fitofarmaci, sia di origine naturale che di sintesi, può anche essere di tipo aspecifico sottraendo molecole o ioni essenziali. Esistono anche dei casi in cui il meccanismo d'azione del fitofarmaco è di tipo fisico anziché chimico. Tale tipo di interazione è riferibile a tutti quei composti di natura inorganica (arseniati, clorati, cianati) che agiscono per contatto sulla superficie cellulare provocando causticazione, coagulazione del protoplasma, rottura delle membrane cellulari con conseguente fuoriuscita di nutrienti e metaboliti. Esistono anche composti organici che provocano alterazioni a livello delle membrane. Precisando che per recettore o sito bersaglio si intende una limitata area chimicamente reattiva di un organismo che è in grado di combinarsi con gruppi funzionali del fitofarmaco, esso può essere qualsiasi componente funzionale esistente nelle biomolecole dell'organismo, più o meno specializzato, ossia coinvolto in funzioni comuni alle cellule di altri organismi. Un'alterazione di tipo specifico comporta, invece, un

cambiamento conformazionale e/o funzionale della molecola bersaglio, con conseguente alterazione del suo normale ruolo fisiologico (Scarponi L., 2003).

Erbicida	Sostanza attiva	Quantità erogata/ha
Roundup® Ultra Max	Glifosate	2,0 l
Roundup® Ultra Max + Flexidor®	Glifosate + Isoxaben	2,0 l + 0,75 l
Roundup® Ultra Max + Butisan® SC (+ Acqua)	Glifosate + Metazachlor	2,0 l + 2,0 l (+ 1,0 l)
Roundup® Ultra Max + Katana® (+ Acqua)	Glifosate + Flazasulfuron	2,0 l + 150 g (+ 1,0 l)
Roundup® Ultra Max + U 46® M-Fluid	Glifosate + MCPA	2,0 l + 1,5 l

*In figura: fitofarmaci contenenti glifosato maggiormente utilizzati*

## 2. RISANAMENTO DEI SUOLI E DELLE ACQUE

La bonifica dei suoli e delle acque contaminate da sostanze xenobiotiche è volta a ripristinare quanto più possibile una qualità del sistema compatibile con le esigenze degli organismi viventi. I costi di bonifica del suolo sono molto elevati. È stato calcolato che per risanare i siti contaminati in Europa servirebbero tra i 59 ed i 109 milioni di Euro ( *European Commission, 2002*). Gli enormi costi per la bonifica portano, qualche volta, ad evitare la decontaminazione e ad attuare tecniche che prevedono la riduzione della carica contaminante, utilizzando lo spargimento come avviene per le acque reflue prodotte dalla lavorazione dell'olio di oliva ( *Chaudhry et al., 2005*). Prima di poter individuare la metodologia più adatta per la decontaminazione ed il ripristino del sito

inquinato, è necessario conoscere la storia del sito, la sequenza di eventi inquinanti che si sono verificati, le varie attività che sono avvenute nel sito e disporre quindi di una ampia raccolta di dati analitici su campioni di acqua, suolo e sedimenti che accertino la qualità e la quantità dell'inquinamento. Indipendentemente dal tipo di processo scelto, le metodologie si dividono in: trattamenti ex situ ed in situ. I trattamenti ex situ consistono nella rimozione del terreno inquinato, nel suo trattamento e decontaminazione in modo da renderlo riutilizzabile. Essi, secondo una classificazione usualmente adottata a livello internazionale, si suddividono in trattamenti on site e off site. Nel primo caso il terreno rimosso viene trattato in un impianto mobile disponibile sul posto; nel secondo caso, invece, il terreno asportato viene trasferito e trattato in un impianto ubicato in un luogo distante dalla zona di intervento. Questa pratica deve però supportare le spese del trasporto del suolo inquinato ed è perciò molto più costosa di quella in situ che risulta essere più conveniente. Le tecniche on site e off site sono caratterizzate, generalmente, da un elevato costo e da difficoltà insite con il trasferimento di grandi quantità di materiale e/o di complesse attrezzature da una località all'altra. I metodi di bonifica on site prevedono invece il trattamento del terreno inquinato direttamente sul posto senza la sua rimozione. Alla luce dei numerosi vantaggi molti studi cercano nuovi approcci di risanamento in situ (*Chaudhry et al., 2005*). Esistono molte tecniche di disinquinamento che si basano su metodi di natura diversa che possono essere di tipo fisico, chimico o biologico:

- Metodi fisici: adsorbimento, separazione, flottazione e separazione per densità, rimozione con aria a vapore, solidificazione e trattamento termico;
- Metodi chimici: Estrazione, ossidazione, uso di resine scambiatrici e di catalizzatori ;
- Metodi biologici: Biodegradazione.

In Italia la normativa di riferimento sulla bonifica dei siti contaminati è entrata in vigore con il decreto ministeriale n° 471 dell'ottobre 1999. In esso sono stati

fissati i limiti di concentrazione di elementi e molecole inquinanti e viene fatto obbligo alle Regioni di predisporre un censimento dei siti contaminati allo scopo di valutare la priorità degli interventi di bonifica. Tra gli indirizzi generali relativi alla scelta della metodologia da applicare per la bonifica dei siti contaminati viene chiaramente suggerito (art. 5) di privilegiare le tecniche a basso costo, di minimizzare la movimentazione del suolo ed il suo riutilizzo al termine dell'operazione di bonifica. I trattamenti di bonifica di suoli contaminati condotti con i tradizionali metodi di tipo fisico e chimico richiedono però elevati investimenti finanziari e tecnologici e causano sensibili alterazioni delle caratteristiche biologiche del suolo, essendo tecnologie distruttive per l'ambiente che depauperano ed erodono il suolo. Le correnti tecniche di risanamento, fino ad oggi applicate, non sono comunque del tutto efficaci. Per esempio, è stato stimato che in Germania solo il 30% del suolo dei siti contaminati e trattati risulta effettivamente bonificato, il suolo rimanente viene solo trasportato e conservato in siti a ciò predisposti. Naturalmente questo non risolve il problema, semplicemente lo sposta e lo procrastina nel tempo, lasciandolo alle future generazioni. Si sente quindi urgentemente il bisogno di tecniche alternative, che siano economiche ed efficienti, per bonificare le aree industrializzate fortemente inquinate. Questo potrebbe essere raggiunto con le tecnologie relativamente nuove che prevedono l'utilizzo di organismi viventi per la bonifica dei siti contaminati. Le tecniche di biodegradazione rappresentano quindi una valida alternativa.

## 2.1. BIORISANAMENTO

Il biorisanamento si basa sulla capacità degli esseri viventi di trasformare il materiale organico inquinante in biomassa, anidride carbonica ed acqua (*Alexander et al., 2000*). Questa tecnologia consente di decontaminare un suolo inquinato, stimolando le proprietà degradative di organismi indigeni, già adattati al suolo inquinato, che di microrganismi alloctoni. I meccanismi attraverso cui le

sostanze inquinanti possono essere trasformate dagli organismi viventi, sono essenzialmente di tipo diretto, come conseguenza diretta del loro metabolismo, o di tipo indiretto, dovuti ad effetti indiretti degli organismi sull'ambiente chimico-fisico che si traducono in una trasformazione secondaria. I principali fattori che influenzano la riuscita di un processo di biodegradazione sono legati alle proprietà dell'inquinante (struttura molecolare, concentrazione, solubilità, etc.) alle proprietà del suolo (presenza di ossigeno, contenuto d'acqua, valore di pH, temperatura, contenuto di nutrienti), alla biodisponibilità della molecola in questione nel sito specifico. In passato sono stati condotti numerosi studi per la ricerca di microrganismi in grado di degradare i composti organici. Vari ceppi batterici hanno mostrato buone capacità degradative, tra questi molti attinomiceti e molte varietà di *Pseudomonas* ( *Samanta et al., 2002*). Alcuni funghi, come il genere *Pleurotus*, si sono mostrati in grado di degradare i composti aromatici. Sebbene i microrganismi che degradano gli inquinanti mostrano buone capacità degradative in laboratorio, presentano numerose limitazioni:

- sono spesso poco competitivi con i microrganismi indigeni, ciò comporta la risultante riduzione della biomassa dei batteri introdotti per il risanamento;
- possono influire negativamente sulla capacità risanatrice di tali microrganismi le avverse condizioni metereologiche con drastici cambiamenti del clima;
- necessitano di numerosi nutrienti che ne supportino la crescita;
- hanno un tasso di degradazione imprevedibile;
- hanno un'azione ridotta ai primi 10-15 cm di suolo.

## 2.2. FITORIMEDIO

I processi di biorisanamento includono anche l'utilizzo delle piante. Tale meccanismo è detto fitorimediazione: l'uso delle piante e dei microrganismi a loro associati per il risanamento ambientale (*Raskin et al., 1994*). In tale tecnica rientrano quegli interventi di bonifica di suoli inquinati in grado di rimuovere, contenere o rendere meno pericolosi elementi o sostanze inquinanti grazie alla opportuna combinazione degli effetti della vegetazione e delle pratiche agronomiche. Questa tecnologia utilizza i naturali processi con cui le piante ed i microrganismi della rizosfera degradano e sequestrano i contaminanti. Sin dai primi lavori di Brooks et al (1977) e Jaffre (1976), il fitorimediazione aveva fatto intuire le sue diverse potenzialità. Grazie ai suoi innumerevoli pregi ed alla possibilità di trattare aree molto estese, il fitorimediazione ha ricevuto grande attenzione da parte della comunità scientifica. Tale tecnica è un efficiente metodica per il risanamento di contaminanti sia organici che inorganici. Il fitorimediazione può essere usato per inquinanti solidi, liquidi o gassosi. Esso è stato utilizzato nel trattamento di: siti militari (TNT, metalli) campi agricoli ( fitofarmaci, metalli, selenio) siti industriali (metalli, arsenico, organici) miniere (metalli) ed industrie del legname (PAHs). Alcuni biotecnologi hanno ipotizzato anche interventi di bonifica di siti contaminati da radionuclidi. Le piante, inoltre, giocano un ruolo importante nel trattamento dell'aria da: ozono, gas nervino, NO<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> o alogenati ed idrocarburi volatili (*Jeffers et al., 2003*). Il fitorimediazione ha acquistato negli ultimi 10 anni popolarità presso i governi e le industrie. Questo è dovuto in parte al costo relativamente basso del fitorimediazione ed in parte agli scarsi fondi disponibili per il risanamento ambientale. Attualmente negli USA vengono spesi da 6 a 8 milioni di dollari l'anno e nel mondo da 25 a 50 milioni di dollari l'anno per la bonifica dei siti contaminati. Siccome le piante sono autotrofe e quindi i loro processi biologici sfruttano l'energia solare, il fitorimediazione è considerato in media 10 volte più economico delle altre tecniche di risanamento classico come l'escavamento, il lavaggio dei suoli o l'incenerimento. Nel 1999 è stato stimato che il costo del fitorimediazione poteva variare dai 5.000 ai 30.000 dollari per acro di terreno, tra 25 e 100 dollari

per tonnellata di suolo e tra 1 e 3 dollari per litro di liquami trattati. I costi comprendono:

- l'installazione delle colture, come la preparazione del sito, la preparazione del terreno, le infrastrutture necessarie, le tecniche di contenimento necessarie quali la permeabilizzazione dei bacini in caso di liquami, la costruzione di barriere in caso di suoli pendenti e l'impianto della coltura;
- la progettazione, in cui rientrano le spese per la caratterizzazione del sito e dei test pilota;
- il mantenimento dell'impianto e del monitoraggio ambientale (*Flathman et al., 1999*).

Il fatto che il fitorimediazione sia una tecnica che venga utilizzata principalmente in situ contribuisce alla sua convenienza economica, riduce l'erosione del suolo e può ridurre l'esposizione dell'uomo ai contaminanti. Il fitorimediazione gode anche dei consensi della opinione pubblica che preferisce le così dette "tecniche verdi" alle ruspe delle tecniche ex situ. Inoltre i governi gradiscono includere nei loro programmi di decontaminazione il fitorimediazione per distribuire i fondi; le industrie lo prediligono per pubblicizzare il loro coinvolgimento in una tecnologia amica dell'ambiente. Il supporto del governo con fondi speciali e l'interessamento dell'opinione pubblica fanno degli USA il paese in cui la quasi totalità delle agenzie che si occupano di risanamento prevedono tra le tecnologie offerte il fitorimediazione. Tra le fitotecnologie proposte ci sono la rizofiltrazione dei liquami, l'assorbimento dei metalli pesanti o dei radionuclidi. Il mercato del risanamento che utilizza le piante ora è circa lo 0,5% del totale degli interventi di bonifica ed il biorisanamento circa il 2% del totale. Il fitorimediazione per l'80% riguarda i composti organici ed il restante 20% quelli inorganici. L'uso delle piante per la bonifica dei siti contaminanti è iniziato negli USA con progetti di piccola o media dimensione. L'interesse economico che gira intorno a questo mercato negli USA è cresciuto negli ultimi 5 anni di 2 o 3 volte, passando dai 30-40 milioni di dollari del 1999 ai 100-150 milioni di dollari nel 2003 e se ne prevede una crescita esponenziale nei prossimi anni. Per il 2006 l'incremento dovrebbe arrivare ai 200-370 milioni di dollari (*Shoeder et al., 2002*). In Europa il fitorimediazione non è molto presente ma dovrebbe svilupparsi nel prossimo futuro poiché gli interessi ed i fondi della

ricerca su tale processo sono in forte crescita. Tale tecnica potrebbe anche diventare un'opportunità per i paesi in via di sviluppo sia per la sua economicità che per la facile installazione. Sebbene negli ultimi anni l'interesse della ricerca inerente tale argomento sia in continua crescita e le conoscenze dei meccanismi coinvolti nei processi di assorbimento, trasporto e detossificazione degli inquinanti siano un po' più chiari, il fitorimediazione è ancora limitato dalla mancanza di conoscenze dei meccanismi alla base di molti processi vegetali e dell'interazione pianta-microorganismo. Riassumendo, quindi, il fitorimediazione presenta il vantaggio di: essere economico ed ecologicamente compatibile; sfruttare l'energia solare; essere una tecnica in situ; essere molto versatile; avere bisogno di poca manutenzione ed avere i consensi della opinione pubblica. Il fitorimediazione presenta però anche degli svantaggi e dei limiti: le piante devono essere coltivate sul sito inquinato che deve perciò presentare un livello di tossicità tale da non risultare dannoso per le piante che devono effettuare il risanamento; il clima e le proprietà del suolo devono essere idonei alla crescita della specie adottata. A seconda del processo impiegato, il fitorimediazione può essere, inoltre, molto più lento delle tecniche tradizionali, quali l'incenerimento o l'escavamento. Per esempio i processi che prevedono l'assorbimento da parte della pianta del contaminante possono richiedere anni (come ad esempio per i metalli pesanti). Per quanto riguarda i processi di trasformazione di composti organici il tempo richiesto, può invece essere notevolmente inferiore da giorni a mesi, rendendo quindi questa tecnica di più facile attuazione. Il fitorimediazione è influenzato dalla biodisponibilità del polluento in caso di alta idrofobicità o stabilità chimica rendendo disponibile solo in parte il "polluento" alla fitorimediazione; gli IPA ne sono un esempio. Tale tecnica non può, quindi, essere utilizzata o deve essere supportata da tecniche tradizionali se la bonifica prevede la rimozione totale del contaminante. Nel 2001 Watanabe ha formulato alcuni dubbi sull'utilizzo del fitorimediazione; sia nei confronti della tecnica che sfrutta le specie selvatiche e sia in quello che prevede l'uso della biologia molecolare. Ha ipotizzato che gli organismi geneticamente modificati e la loro massiva coltivazione potrebbero influire sulla biodiversità, riducendola. Ha inoltre esplicitato che gli inquinanti o i loro prodotti di degradazione potrebbero entrare



nella catena alimentare e che la tecnica di rizofiltrazione potrebbe non solo decontaminare ma anche depauperare le risorse nutritive. *Clements et al. (2002)* hanno proposto delle strategie da seguire per evitare tali problematiche: aumentare e diversificare il numero dei siti trattati; ridurre l'uso di specie che possono entrare nella catena alimentare; alterare la specificità dei meccanismi di assorbimento per ridurre la competizione con gli ioni non desiderati; aumentare il numero dei siti di legame intracellulare o il tasso di trasporto negli organelli per incrementare la capacità di sequestro da parte delle piante. Il bio/fitorimediale e le tecniche non biologiche non sono mutuamente esclusive. Si sta, infatti, affermando la possibilità di accoppiare differenti tecnologie come per esempio la rimozione del suolo maggiormente inquinato e l'uso delle piante per la bonifica della restante parte o la costituzione di trattamenti integrati in quei casi in cui si debba intervenire su matrici multicontaminate. In questo modo si possono combinare le tecniche tradizionali più efficienti e le innovative più economiche (*Smits, 2004*). Le piante ed i microrganismi della rizosfera possono essere utilizzati per il fitorimediale in diversi modi. Possono funzionare come filtri nella costruzione di "Paludes" o nel risanamento di liquami, sfruttando la così detta rizofiltrazione. Tale tecnica può essere utilizzata maggiormente su paludi o liquami contaminati da metalli pesanti e radionuclidi. Possono essere impiegate come barriere per evitare lo scivolamento delle acque o semplicemente per evitare l'erosione dei suoli o per convertire gli inquinanti in forme meno biodisponibili, sfruttando la fitostabilizzazione. Tale tecnica può essere utilizzata maggiormente sui terreni, i sedimenti o le paludi contaminate da metalli pesanti. Le piante possono anche essere usate per estrarre ed accumulare nei loro tessuti i inquinanti in modo da rimuoverli poi con la raccolta delle piante, sfruttando la tecnologia chiamata fitoestrazione. Questa tecnica può essere utilizzata maggiormente sui terreni, i sedimenti o le paludi contaminate da metalli pesanti. Il materiale raccolto dopo la fitoestrazione può a sua volta essere bruciato e, se il contaminante è di un qualche valore come i metalli pesanti, può essere estratto dalle ceneri e riciclato. Le piante possono anche agire sinergicamente con la flora delle rizosfera, facilitando la biodegradazione, tecnica che può essere utilizzata maggiormente sui terreni, i sedimenti, le paludi o i liquami contaminati

da composti organici. La fitovolatilizzazione invece è quel meccanismo per il quale alcuni contaminanti dopo essere stati assorbiti dalle piante vengono rilasciati sotto forma di composti volatili. Questa tecnica può essere utilizzata maggiormente sui terreni, i sedimenti, le paludi o i liquami contaminati da solventi organici ed alcuni metalli come Hg, Se, As. Naturalmente tutti questi processi non sono mutuamente esclusivi ma possono agire contemporaneamente. A conferma del successo di tali tecniche di bonifica ci sono i numerosi brevetti che sono stati dedicati alle metodiche di bonifica ambientale. Vari sono stati i progetti di bonifica ambientale che hanno previsto l'uso delle piante. Ricordiamo la bonifica degli esplosivi attuata dagli USA, degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), utilizzando la Cannabis sativa o del tricloroetilene (TCE), utilizzando una leguminosa tropicale (Campbell et al., 2002).

La pianta ideale usata nel fitorimediale dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- rapido sviluppo vegetativo, elevata produzione di biomassa;
- radici profonde e ben sviluppate;
- possibilità di gestire la pianta come una coltura agraria;
- facilità di raccolta della biomassa;
- adattabilità alle diverse condizioni ambientali;
- alta competitività.

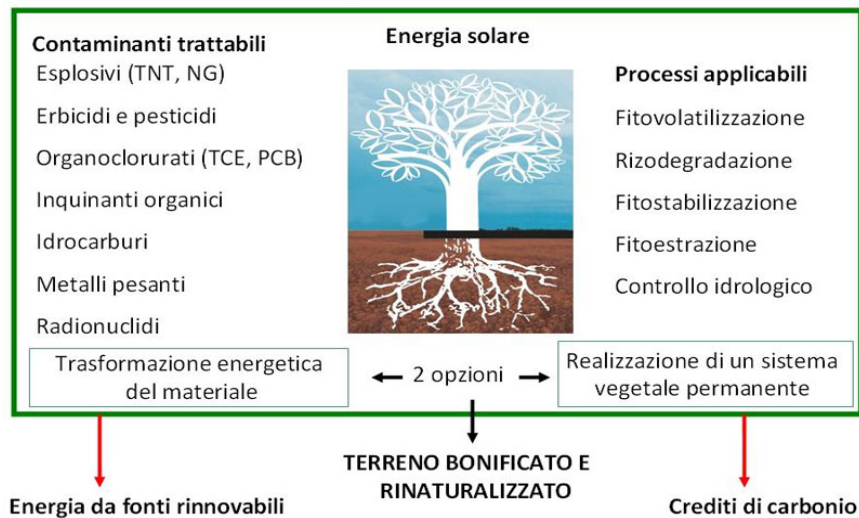
Ad oggi non sono state individuate specie vegetali con capacità fitorisanatrici in grado di soddisfare tutti i requisiti necessari per il risanamento. Alcuni composti, inoltre, sono più recalcitranti, poiché risultano fortemente adesi ai colloidali del suolo, rendendo quasi del tutto inefficiente il biorisanamento. In Olanda si sono trovati di fronte a tale problema quando, utilizzando le piante per un intervento di bonifica, non è stata ottenuta, al contrario delle previsioni, alcuna riduzione nella contaminazione poiché gli inquinanti erano fortemente adesi ai colloidali del suolo. Sembra che le piante abbiano, infatti, delle limitate capacità di degradazione dei composti organici in special modo dei composti contenenti più cicli aromatici. Si può quindi affermare che, al contrario delle enormi promesse, il biorisanamento soffre di limitazioni per la bonifica dei suoli contaminati. Le biotecnologie stanno trasformando il mondo dell'agricoltura, aggiungendo nuove

caratteristiche alle piante. Oltre ai programmi tradizionali di miglioramento genetico volto ad aumentare la produzione, migliorare la qualità della specie ed altro, la biologia molecolare apre le porte al cosiddetto valore aggiunto di cui fa parte anche il fitorimediazione. La biologia molecolare è stata già utilizzata con successo per molti anni in agricoltura. Tra i primi transgeni ricordiamo la soia "Roundup" della Monsanto in grado di tollerare l'erbicida glifosato. Le piante transgeniche offrono numerosi potenziali anche per il biorisanamento: basso costo di produzione, stabilità del prodotto, velocità ed ecocompatibilità. La biologia molecolare è già stata utilizzata nel fitorimediazione: oltre agli innumerevoli esempi volti ad incrementare l'assorbimento di metalli pesanti, ci sono anche esempi per la bonifica di suoli contaminati con xenobiotici organici (Singh e Jain, 2003). Sono state ottenute piante geneticamente modificate esprimenti geni eterologhi. Un esempio è l'espressione del gene umano P450, tali piante erano capaci di metabolizzare il TCE 640 volte di più del controllo. Esprimendo, invece, un enzima batterico (pentaeritritolo tetranitrato reductasi), sono state ottenute piante in grado di degradare il trinitrotoluene (TNT). Questi precedenti dimostrano che l'approccio biotecnologico può essere utilmente sfruttato nel fitorimediazione di composti organici attirando l'attenzione ed i favori dell'opinione pubblica. Comunque a tutto oggi, nella quasi totalità dei casi, queste piante, a causa dello scetticismo dell'opinione pubblica verso il rilascio nell'ambiente di organismi geneticamente modificati, sono state testate solo in laboratorio, valutandone quindi l'efficacia su substrati artificiali in condizioni controllate. Sembra però che le cose stiano cambiando. Infatti in alcuni casi si è potuto giungere alle prove in campo, testando l'effettiva capacità fitorisanatrice in condizioni non controllate: Un esempio sono le piante transgeniche che esprimono la glutathione S transferasi per l'accumulo di solfati e di seleniti.

Tra i diversi processi del fitorimediazione, il più interessante è la fitodegradazione, cioè la degradazione dei contaminanti, che può avvenire ad opera di enzimi interni alle piante o da esse escreti nella rizosfera. La fitodegradazione può riguardare solo contaminanti organici, gli inorganici infatti possono solo essere rimossi, stabilizzati o conservati. I composti organici possono essere alterati dagli enzimi delle piante fino alla mineralizzazione completa o degradati parzialmente

ad intermedi stabili che possono essere poi trattenuti nelle piante stesse (McCutcheon et al., 2003). La degradazione enzimatica può avvenire sia a livello radicale sia nei tessuti e può coinvolgere anche l'attività microbica. La fitodegradazione riguarda enzimi quali: dealogenasi, nitrilasi, fosfatasi ed altri che, aggiungendo gruppi laterali, incrementano la solubilità dell'inquinante e ne rendono possibile la coniugazione, che è la fase iniziale in alcuni tipi di fitodegradazione. Tale tecnica può essere ottimizzata selezionando specie che già producono enzimi per la fitodegradazione oppure ottenendo, attraverso l'ingegneria genetica, piante in grado di produrre alti livelli di specifici enzimi. Oltre a questo la presenza delle piante è importante per il rilascio di biomolecole che favoriscono l'attività microbica. L'uso delle piante per la decontaminazione degli acquitrini contaminati da inquinanti organici ed inorganici è conosciuto da centinaia di anni ed è alla base dello sviluppo delle "Paludes" per il trattamento delle acque reflue municipali o degli scarichi industriali. L'idea di utilizzare le piante per la bonifica dei suoli contaminati da composti organici xenobiotici è molto recente. Il concetto si è sviluppato in seguito all'osservazione che nei suoli coltivati i composti organici erano degradati più facilmente che in quelli incolti. Oltre ai meccanismi diretti di assorbimento e degradazione degli inquinanti organici, le piante possiedono anche un altro strumento di azione ossia sono in grado di rilasciare nella rizosfera enzimi potenzialmente utilizzabili nel fitorimedio. Questo meccanismo è noto come fitorimedio ex planta. Tra gli enzimi rilasciati dalle piante ci sono le dealogenasi, le nitririduttasi, le perossidasi e le laccasi. Tali enzimi sono stati efficientemente testati su numerosi contaminanti organici spaziando dai solventi agli esplosivi (Sonoki et al., 2005).

## Modello applicativo del fitorimedia



*In figura: esempio applicativo del fitorimedia*

### **3.RISPOSTA DELLE PIANTE AGLI INQUINANTI**

C'è una dualità insita nella risposta delle piante a inquinanti organici ed inorganici. Alcuni tipi di composti se presenti a basse concentrazioni possono anche essere di beneficio per le piante (metalli essenziali, composti secondari, ROS come segnali, ecc) e in questo modo diventare vantaggiosi per tutti gli organismi viventi della catena alimentare. Al contrario, gli stessi composti esercitano effetti dannosi se assorbiti in grandi quantità anche se, nel corso dell'evoluzione, le piante stesse hanno sviluppato dei sistemi endogeni di detossificazione.. Le piante assorbono, traslocano, metabolizzano e detossificano molti dei composti organici e inorganici tossici, seppur con una grande variabilità di risposta . Tra i meccanismi di difesa troviamo la produzione di riducenti, ma anche di molecole scavenger come ascorbato e glutazione, l'espressione del sistema difensivo P-450 e di superfamiglie degli enzimi glutazione e glucosil-transferasi. Con tali meccanismi di detossificazione la pianta può bene proteggere le proprie funzioni vitali ed evitare l'iper

contaminazione di tessuti, ma potrebbe anche produrre composti con un certo potenziale deleterio per altri organismi. Nell'uomo, con il termine detossificazione viene definita la capacità dell'organismo di rendere inoffensive sostanze nocive prodotte durante i normali processi del metabolismo cellulare, provenienti dalla biotrasformazione degli alimenti, dei medicinali oppure assorbite dall'ambiente. Tale processo è svolto da un complesso sistema enzimatico e si svolge principalmente in due fasi. Il primo passo consiste nell'attivazione delle sostanze tossiche da parte di enzimi della Fase 1 della detossificazione, in gran parte appartenenti alla famiglia del Citocromo P450, che vengono poi inattivate o trasformate dagli enzimi della Fase 2. I prodotti della Fase 1 che possono essere più aggressivi e nocivi delle sostanze da cui originano, motivo per cui è essenziale una veloce detossificazione da parte degli enzimi della Fase 2, rappresentati in gran parte dalle multifunzionali glutatione S-transferasi (GSTs), accanto a transferasi (per esempio N-acetil transferasi (NAT)) ed epossido idrolasi, come la epossido idrolasi microsomiale (EPX1). Il loro compito principale consiste nel coniugare sostanze potenzialmente mutagene e citotossiche con il glutatione, rendendole così idrofile e facilmente eliminabili dalle cellule. Durante i processi di detossificazione possono essere prodotti anche radicali liberi che devono essere catturati da enzimi quali superossido dismutasi (SOD). Metalli pesanti come Cd, Fe e Zn sono facilmente assorbiti dalle piante e traslocati ai germogli. Il cadmio è considerato come uno delle minacce più gravi per l'uomo a causa del suo accumulo a lungo termine nel suolo che può portare alla contaminazione dell'intera catena alimentare. Tuttavia anche ferro e zinco, indispensabili per la sopravvivenza degli esseri viventi, se somministrati in eccesso, potrebbero divenire anche loro una minaccia se accumulati in grandi quantità (Verkleij et al., 2009). Per quanto riguarda gli inquinanti organici quali i pesticidi possono esercitare tossicità o indurre stress se in grado di penetrare dalla radice o superficie fogliare giungendo sino ai tessuti più interni. Tale affermazione vale sia per gli erbicidi, che per altri inquinanti organici quali gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e il TCE. Per le reazioni di difesa e di detossificazione il glutatione è una biomolecola di centrale importanza.

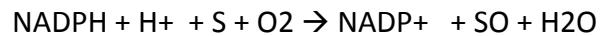
### 3.1 FASI DELLA DETOSSIFICAZIONE

La detossificazione delle sostanze inquinanti organiche ed inorganiche si svolge generalmente attraverso più stadi che comportano innumerevoli trasformazioni chimiche e l'intervento di vari enzimi. La prima fase consiste in reazioni di ossidazione, riduzione o idrolisi che trasformano l'inquinante che di solito è un composto mobile e tossico, in un derivato meno mobile e meno tossico. La seconda fase consiste in reazioni nelle quali i derivati della prima fase sono coniugati con composti organici endogeni, con i quali formano derivati meno tossici o non tossici, più idrofilici, più mobili e pertanto suscettibili di eliminazione tramite escrezione. Nei vegetali però tale possibilità di eliminazione è preticamente inesistente, per cui i coniugati o vengono trasferiti e depositati nei vacuoli o vengono sottoposti ad una terza fase in cui sono soggetti ad ulteriori reazioni di coniugazione. I prodotti terminali sono rilasciati negli spazi extracellulari dove i residui degli inquinanti sono immobilizzati fino al termine del ciclo vegetativo. In definitiva, per tale metabolizzazione degli inquinanti è necessario considerare due aspetti: il primo consiste nel fatto che si tratta di sistemi che si debbono adattare a substrati esogeni per i quali non dovrebbero avere grande specificità; nel secondo caso la presenza dell'inquinante può indurre la formazione di forme isoenzimatiche più adatte ai nuovi substrati (Scarponi, L., 2003).

#### 3.1.1 FASE I : LE REAZIONI DI OSSIDAZIONE

Il metabolismo degli inquinanti nelle piante solitamente inizia con processi ossidativi. L'ossidazione normalmente produce un aumento di polarità e/o la formazione di un gruppo funzionale utile per l'azione successiva di altri enzimi. Una gran parte dei processi di ossidazione ritrovati a carico degli inquinanti organici ed inorganici è data dall'azione di monossigenasi, presenti in tutti gli

organismi aerobici, che utilizzano il citocromo P-450, come ossidasi terminale. Tali ossigenasi sono anche dette ossidasi a funzione mista perché utilizzano l'ossigeno molecolare ossidando contemporaneamente un substrato (S) e un donatore d'elettroni (NADH) secondo il seguente schema di reazione:



Nelle piante esse si presentano come proteine ancorate alle membrane del reticolo endoplasmatico. Il ruolo enzimato vero e proprio è attribuito al citocromo P450 poiché esso si lega contemporaneamente al substrato organico e all'ossigeno molecolare e diviene attivo solo se associato alla NADPH- ciocromo P450 Reduttasi, una flavoproteina agganciata alle membrane microsomiali, che possiede due gruppi flavinici (FAD e FMN). Questi sembrano esercitare un effetto tampone tra il NADPH che cede uno ione idruro, cioè un protone e due elettroni, ed il citocromo P -450 che accetta un elettrone alla volta. I processi suddetti hanno una notevole importanza se svolti a carico di inquinanti quali erbicidi od altri inquinanti xenobiotici perché generalmente li trasformano in derivati meno tossici, meno mobili e spesso in composti suscettibili di ulteriori reazioni di idrolisi, coniugazione, come si vedrà in seguito.

### 3.1.2 FASE I: LE REAZIONI DI IDROLISI

Data la grande quantità di enzimi idrolitici presenti nelle cellule vegetali, è comprensibile come reazioni di idrolisi possano verificarsi con facilità anche a carico di composti esogeni quali xenobiotici organici ed inquinanti inorganici. Gli enzimi più coinvolti in tali processi sono le esterasi e le ammidasi. Le esterasi formano un vasto gruppo di isoenzimi distribuiti largamente in tutti gli organismi. Tali enzimi sono dotati di grande adattabilità ai substrati esogeni ma alcune volte l'idrolisi di determinati inquinanti organici comporta l'attivazione della loro



tossicità. Questo perché il principio attivo viene utilizzato sottoforma di estere così da risultare meno polare e meglio assorbito. L'importanza delle amidasi nel metabolismo degli inquinanti organici ed inorganici emerge dalla frequenza dei processi idrolitici che si riscontrano a carico di composti contenenti il legame C-N. Come Esempio può esserci la detossificazione del propanil nel riso in cui interviene una arilacilammidasi che libera la dicloroanilina che è destinata a fissarsi sulla lignina. Azioni idrolitiche sono possibili anche a carico di fitofarmaci aventi un gruppo nitrile che, tramite l'intervento di nitrilasi, viene trasformato in gruppo ammidico prima e carbossilico poi. Come per le reazioni di ossidazione anche per quelle di idrolisi può esistere incertezza nell'identificazione esatta dell'enzima che interviene. Per esempio, se l'enzima responsabile del processo idrolitico a carico di un fitofarmaco avente un legame ammidico non viene isolato e caratterizzato, non è possibile avere la sicurezza che il composto sia stato idrolizzato da una amidasi piuttosto che da un altro enzima (Marrs, 2006).

### 3.1.3 FASE II: LE REAZIONI DI CONIUGAZIONE

La coniugazione di inquinanti organici ed inorganici con substrati endogeni, o dei loro metaboliti provenienti dalla fase 1 è uno dei più diffusi mezzi di detossificazione perché i derivati sono composti a più alto peso molecolare, più polari e di conseguenza meno mobili, e generalmente meno tossici o non tossici. I processi di coniugazione possono essere ricondotti a due tipi: coniugazione con macromolecole quali, ad esempio, lignina e cellulosa, che immobilizzano l'inquinante od i suoi metaboliti in maniera irreversibile in residui immobilizzati (fase III), oppure coniugazione con molecole quali il glucosio e il glutatone. Il glutatone (GSH) è un tripeptide formato da glicina (Gly), cisteina (Cys) ed acido glutammico (Glu); la reazione che lo coinvolge nella coniugazione consiste in un attacco nucleofilo del gruppo tiolico della cisteina a carico di un eventuale sito

elettrofilo del substrato. Tale tipo di reazione è catalizzato dalle Glutathione Sulfotransferasi (GST) esistenti sotto molteplici forme isoenzimatiche.

#### **4 GLUTATIONE S-TRANSFERASI**

Le glutathione S-transferasi sono rappresentate da una grande e diversificata famiglia di geni presenti in tutti gli organismi viventi codificanti specifiche proteine solubili con forme e masse molecolari variabili in un intervallo compreso tra 24 e 29 kDa. Tali proteine possono essere suddivise in 5 classi sulla base delle loro sequenze amminoacidiche: phi, tau, theta, zeta e lambda. GST theta e zeta sono presenti principalmente negli animali, le restanti famiglie sono tipiche delle piante. Il genoma di *Arabidopsis thaliana* contiene 48 geni GST, con una maggior presenza di GST tau e phi. È proprio il largo spettro delle forme isoenzimatiche che spiega la capacità delle GST di agire su sostanze xenobiotiche organiche e inorganiche inquinanti aventi differenze strutturali anche notevoli. Per tale motivo, un composto che offra la possibilità di una sostituzione nucleofila per la presenza di un adatto gruppo uscente, o che possa divenire adatto tramite le reazioni della prima fase di detossificazione sopra menzionata, è un idoneo candidato alla coniugazione con il glutathione. Sulla base della loro localizzazione subcellulare, le GST degli eucarioti possono essere distinte in citosoliche, mitocondriali e microsomiali. Le GST citosoliche e mitocondriali sono proteine solubili e presentano forti analogie nella loro struttura quaternaria. Le GST microsomiali (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism, MAPEG) non sembrano giocare un ruolo significativo nel metabolismo degli xenobiotici, ma sono implicate nella biosintesi di steroidi e leucotrieni, molecole di segnale endogene di natura lipidica (Ruzza *et al.* 2009). Le proteine GST eseguono una serie di funzioni utilizzando il tripeptide glutathione (GSH) come cosubstrato o coenzima. GST sono espressi prevalentemente nel citosol, dove le loro funzioni catalitiche GSH-dipendenti includono la coniugazione e la conseguente detossificazione di erbicidi, la

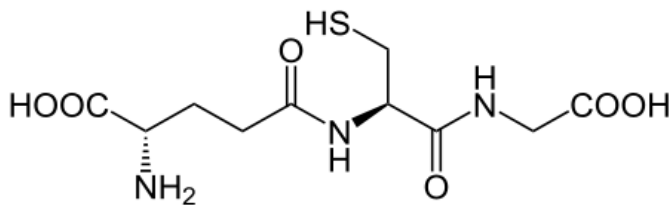
riduzione di idroperossidi organici formati in situazioni di stress ossidativo e l'isomerizzazione del maleilacetoacetato a fumarilacetoacetato, un evento fondamentale nel catabolismo della tirosina (Scarponi L.,2005). Recenti studi hanno anche identificato le GST quali vie di segnalazione cellulari per i raggi ultravioletti e come potenziali regolatori dell'apoptosi (Shroder P.,2009). Sebbene diverse sequenze producono GSTs con funzioni multiple, la struttura di queste proteine è altamente conservata. Le GST rappresentano quindi un ottimo esempio di come specifiche famiglie di proteine possono diversificarsi per soddisfare molteplici funzioni pur conservando la forma e la struttura. Tutte le GST solubili in forma attiva sono dimeri, con una massa molecolare di c.ca 25 kDa, costituite da due catene polipeptidiche identiche (omodimeri) o codificate da due geni distinti (eterodimeri). La struttura tridimensionale di alcune GST solubili è stata recentemente risolta grazie alla cristallografia ai raggi X. Ogni subunità delle GST solubili contiene un primo sito, chiamato GSH-binding site (G-site), il quale può riconoscere e legare il GSH, e un secondo sito di riconoscimento, chiamato Hydrophobic-binding site (H-site), in grado di legare composti idrofobici a carattere elettrofilo di varia natura. Il dominio N-terminale include la maggior parte degli aminoacidi coinvolti nella formazione del G-site ed è abbastanza conservato tra le classi, mentre il dominio C-terminale ( $\alpha$ -elica) forma la gran parte dell'H-site ed è più divergente. La variazione nella composizione degli aminoacidi idrofobici dell'H-site viene a determinare la specificità di substrato (Ruzza et al. 2009.). Il G-site delle GST delle classi Alfa, Tau e Phy contiene un residuo di tirosina (Tyr) o serina (Ser), con un ruolo cruciale nell'attivazione del tripeptide. Il legame ad idrogeno tra il residuo di Tyr o Ser del G-site e il gruppo tiolico del GSH, contribuisce all'abbassamento della pKa del tripeptide, da c.ca 9,3 in soluzione, a c.ca 7 nel contesto del sito attivo dell'enzima, promuovendo la formazione dell'anione tiolato GS<sup>-</sup>, nucleofilo più forte del gruppo sulfidrilico indissociato (-SH). Il ruolo chiave degli aminoacidi Tyr e Ser nell'attività catalitica di alcune GST solubili è stato confermato da esperimenti di mutagenesi sito-diretta. Altre classi di GST hanno un residuo di Cys nel loro G-site, il quale forma un ponte disolfuro con il GSH. Questi enzimi

mostrano una debole attività coniugativa, ma sono implicati in reazioni redox (Ruzza et al. 2009).

#### 4.1- IL GLUTATIONE E LE GST

Il tripeptide  $\gamma$ -glutamilcisteinglicina o glutatione (GSH) è il regolatore non enzimatico più importante dell'omeostasi redox intracellulare ed è presente ubiquitariamente in tutti i tipi di cellule a concentrazioni millimolari. Questo tripeptide contenente cisteina, esiste sia in forma ridotta (GSH) che in forma ossidata (GSSG), meglio indicata come glutatione disolfuro, e prende parte alle reazioni redox grazie all'ossidazione reversibile dei suoi gruppi tiolici attivi. Nella cellula, in condizioni redox normali, la maggior parte del GSH è in forma ridotta ed è distribuito nel vacuolo, nel reticolo endoplasmatico e nel citosol. Oltre che in forma libera, il GSH, mediante un processo chiamato glutationilazione, può anche essere legato covalentemente a proteine, regolandone la funzione o fungendo da coenzima in sistemi enzimatici antiossidanti. Il GSH può quindi agire direttamente da scavenger di radicali liberi e di xenobiotici elettrofili, oppure da substrato per le glutatione perossidasi (GPxs) e le glutatione S-transferasi (GSTs), durante i processi di detossificazione del perossido di idrogeno, di idroperossidi lipidici e di composti elettrofili. L'intervento di questi due enzimi comporta un abbassamento del livello totale del GSH intracellulare ed un aumento del GSSG. Questo aumento è potenzialmente molto citotossico, in quanto porta alla formazione di ponti disolfuro nelle proteine cellulari. Al fine di mantenere costante il rapporto GSH/GSSG, il GSSG viene rilasciato dalla cellula e degradato nell'ambiente extracellulare. Durante le reazioni mediate dalle GST, inoltre, il GSH si coniuga a varie sostanze elettrofile, e gli addotti così formati vengono secreti attivamente dalla cellula, con ulteriore deplezione di GSH se la concentrazione della sostanza elettrofila è maggiore della capacità di biosintesi. Il GSH cellulare può essere rigenerato in seguito a riduzione del GSSG formatosi, oppure sintetizzato ex novo. La riduzione del GSSG a GSH è catalizzata dalla

glutazione reduttasi (GR), che utilizza come agente riducente il NADPH, prodotto dalla via ossidativa dei pentosi-fosfato, ed è quindi dipendente dalla efficienza di tale via metabolica. Il GSH può essere sintetizzato ex novo attraverso due reazioni sequenziali, ATP-dipendenti, catalizzate rispettivamente dalla  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasi ( $\gamma$ GCS), la cui attività limita la velocità di sintesi, e dalla glutazione sintetasi. Altri fattori che intervengono nella regolazione della sintesi del GSH sono la disponibilità di cisteina e la concentrazione stessa di GSH che funge, con un meccanismo di feedback negativo, da inibitore dell'attività della  $\gamma$ GCS (Schroeder P., 2009).



*In figura: struttura chimica del glutathione*

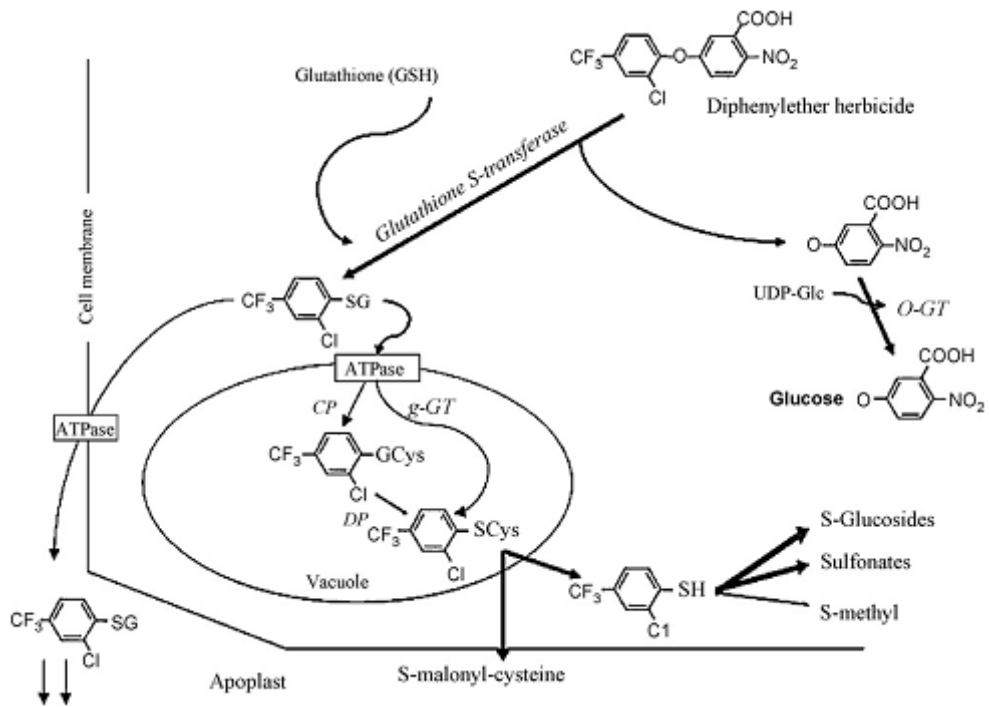
Come già accennato le GST sono coinvolte nella detossificazione, attraverso la coniugazione con il GSH, di vari xenobiotici e loro metaboliti di fase I, tra cui farmaci, sostanze inquinanti organiche ed inorganiche (erbicidi, metalli pesanti etc.). Le reazioni coniugative catalizzate dal GST includono reazioni di sostituzione nucleofila, addizioni di Michael su composti carbonilici  $\alpha,\beta$ -insaturi e l'apertura di anelli epossidici. Le GST citosoliche possono inoltre catalizzare reazioni non coniugative, tra cui perossidazioni, isomerizzazioni cis-trans e reazioni tiol-transferasiche. Le GST hanno anche un ruolo importante nella detossificazione di vari composti endogeni, tra cui idroperossidi derivanti dal danno ossidativo di lipidi e acidi nucleici, e o-chinoni, derivanti dall'ossidazione fisiologica delle catecolamine (Hayes et al. 2005, Ruzza et al. 2009). E'

importante sottolineare che non tutti i prodotti delle reazioni catalizzate dalle GST sono privi di tossicità. In alcuni casi, infatti, l'attività delle GST porta alla formazione di metaboliti citotossici reattivi e/o cancerogeni (*Ruzza et al. 2009*).

#### 4.2 - TRASPORTO E DESTINO METABOLICO DEI GSH- CONIUGATI

I GSH- coniugati di inquinanti organici ed inorganici sono molto più idrofili degli inquinanti iniziali e pertanto non possono penetrare facilmente attraverso le membrane biologiche (*Scarponi L., 2003*). Essi di solito sono soggetti all'azione di enzimi peptidici che idrolizzano i residui di glutammato e di glicina lasciando i corrispondenti cistein-coniugati. Questi ultimi poi subiscono altre reazioni che li trasformano in composti quali malonil-derivati o tiolattico-derivati, i quali rappresentano i prodotti terminali della metabolizzazione GSH- dipendente di inquinanti organici e non. Poiché tali metaboliti si presentano solitamente nei vacuoli, è stata ipotizzata e documentata l'esistenza di un processo di trasporto attraverso la membrana del tonoplasto di alcuni GSH coniugati. Questo trasporto, che accumula i coniugati nel vacuolo contro gradiente di concentrazione, è sostenuto dal punto di vista energetico dall'idrolisi dell' ATP. Tale processo non sembra essere legato al gradiente protonico trans membrana poiché non è influenzato dagli agenti che dissipano tale gradiente. Nel vacuolo i GSH coniugati possono essere sottoposti ad ulteriori trasformazioni. Per esempio, l'erbicida alachlor si accumula rapidamente nel vacuolo delle foglie di soia per poi essere trasformato in glutamilcisteina- coniugato e poi a cistein-coniugato per azione di una carbossipeptidasi che è presente esclusivamente nel vacuolo. I glutatione - coniugati formati nel citosol hanno la capacità di penetrare il vacuolo grazie all'azione di specifici trasportatori e, dal punto di vista energetico, dalle ATPasi di trasporto (*Schroeder P., 2009*). Una volta giunti nel vacuolo, ricco di enzimi idrolitici, i coniugati possono subire l'azione di peptidasi che li trasformano in glutammilcistein-derivati o cistein-derivati. In questo contesto i trasportatori fungono da pompe ad elevata specificità per la rimozione dei coniugati dal citosol.

I glutatione- coniugati sono trasportati nel vacuolo perché identificati come inibitori delle glutatione sulfo- transferasi e pertanto la loro rimozione dal citosol garantisce ulteriori metabolizzazioni di agenti xeno biotici tramite successive coniugazioni con il glutatione stesso.



In figura: attività delle GST nel metabolismo del difeniletere

## BIBLIOGRAFIA:

- Abhilash P.C., Jamil S., Singh N. (2009)- Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics in : *Biotechnology Advances*, vol 27 (pp 474-488), India.
- Bonomo L. e Sezenna L. (2005). Criteri per la selezione delle tecnologie, in : *bonifica di siti contaminati* , McGraw-Hill (pp304-322).
- Brown D. H. (1984) - Uptake of mineral elements and their use in pollution monitoring, in : *Experimental Biology* , Accademic Press, New York (pp 229-256).
- Campbell S., Paquin D., Awaya J., Li Q. (2002)- Remediation of benzopyrene and chrysene- contaminated soil with industrial hemp. (pp 157-168).
- Chaudhry Q., Zandstra M., Gupta S. (2005) - utilising the synergy between plants and ryzospher microorganism to enhance breakdown of organic pollutants in the environment in : *exploitation of plants for the removal of organics in environmental remedation*, *Biotechnology advance* (pp 355-364).
- Eapen S. and D'Souza S. F. (2005)- Prospect of genetic engineering of plants for phytoremediation of toxic metals in :*Biotechnology Advances*, vol 43 (pp 576-593), Spain.
- Hatzios K.K. (2005). Metabolism and elimination of toxicants. In: *Plant toxicology* (Hock, Elstner Ed.) Marcel Dekker, New York. pp: 469- 518.
- Kvesitadze- G. G. Khatisashvili- T. Sadunishvili- J.J. Ramsden (2006). Uptake, translocation and effects of contaminants in plants in : *Biochemical Mechanisms of Detoxification in Higher Plants; Basis of Phytoremediation*, Springer, Berlino, Heidelberg. pp 55-97.
- Halsey L.G., Blackburn T. M., P.J. Butler (October 2006) in: *Functional Ecology*, Rev. vol 20 issue 5 (pp 889-899).



- Hayes JD., Flamagan JU., Jowsey IR. (2005)- Glutathione transferases (Annu Rev.) in: Pharmacol Toxicol (pp 51-88).
- Information System (ESIS) (2001) e EEA (2007): Stato del rapporto ambiente n ° 1/2007, Environ-europea, Bruxelles.
- Marrs K. A. (1996) - the function and regulation of Glutathione S- Transferase in Plants, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol , (pp 127-158), California.
- McCutcheon SC (2002) -Phytoremediation : an ecological solution to organic contaminantion (Susarla S., Medina F., McCutcheon S.C.) IN : Ecological Engineering (cap 18 pp 647-658).
- Ruzza P., Rosato A., Rossi CR., Floreani M., Quintieri L. (2009)- Glutathione Transferases as Targets for cancer Therapy in : Anticancer Agents Med Chemistry (pp 763-777).
- Scarponi L.(2003) – La metabolizzazione dei fitofarmaci nei vegetali. In : Biochimica Agraria (Scarponi), Pàtron Editore,Bologna pp.987-1011.
- Sotte F. (2009) in : Agriregioni Europa, editoriale n.17, Roma.
- Schroeder P., Daubner D., Maeir H., Debus R. (2009)- Phytoremediation of organic xenobiotics; Glutathione dependent detoxification in Phragmites plants from European treatment sites in : Bioresource Technology, vol 99 (pp 7183-7191).
- Verkleij J., Goldhirsh G., Antosiewicz D (2009), GST role in plant detoxification in : journal of Environmental and Experimental Botany vol 67 (pp 10-22), Amsterdam.
- Zhang YY., Liu Jh. (2011) Transgenic alfalfa plants co- expressing Glutathione S- Transferase (gst) in: Journal of Hazardous Materials, vol 189 issues 1-2 (pp 357-362), department of Pharmaceutics, University of Science and Technology, China.