



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE

CORSO DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE PER
L'AMBIENTE

LA CONTAMINAZIONE IN APICOLTURA AD OPERA
DEI METALLI PESANTI

Relatore: Prof. Valerio Di Marco

Laureanda: Marta Miotti
2042746

Anno Accademico 2023/2024

Riassunto

Oggigiorno, e già da alcuni anni, si sta assistendo ad un importante calo della popolazione degli insetti impollinatori a livello globale, conseguenza del crescente inquinamento ambientale che mette a rischio la salute degli ecosistemi ma anche la sicurezza alimentare. Questa ricerca bibliografica è mirata ad approfondire la contaminazione in apicoltura ad opera dei metalli pesanti derivanti dall'uso di agrofarmaci e pesticidi in ambito agricolo e da attività industriali, chimiche e metallurgiche, valutando la loro presenza in particolare nel miele. Verrà inoltre affrontata la tematica del biomonitoraggio ambientale e del bioaccumulo di questi elementi tossici all'interno dei prodotti derivanti dall'apicoltura come propoli, polline e cera d'api.

Abstract

Nowadays, and for some years now, we are witnessing a significant decline in the population of pollinating insects at a global level, a consequence of growing environmental pollution which puts the health of ecosystems but also food security at risk. This bibliographic research is aimed at investigating the contamination in beekeeping by heavy metals deriving from the use of agrochemicals and pesticides in agriculture and from industrial, chemical and metallurgical activities, evaluating their presence in particular in honey. The topic of environmental biomonitoring and the bioaccumulation of these toxic elements within beekeeping products such as propolis, pollen and beeswax will also be addressed.

INDICE

INTRODUZIONE	1
1) L'APIS MELLIFERA (L.).....	2
1.1) I PRODOTTI DELL'APIS MELLIFERA	3
2) I METALLI PESANTI.....	5
3) LA CONTAMINAZIONE IN APICOLTURA AD OPERA DEI METALLI PESANTI	6
3.1) I METALLI PESANTI CONTENUTI NEL MIELE.....	7
3.2) IL CADMIO	8
3.3) IL PIOMBO.....	9
3.4) EFFETTI DEI METALLI PESANTI SULL'APE DOMESTICA	9
3.5) LO STRESS OSSIDATIVO.....	11
3.6) EFFETTI SUL MICROBIOTA INTESTINALE	12
4) LA DETOSSIFICAZIONE AD OPERA DELLE METALLOTIONEINE.....	13
5) L'APE DOMESTICA E I SUOI PRODOTTI COME BIOINDICATORI AMBIENTALE	14
6) CONCLUSIONI	17
7) BIBLIOGRAFIA	18

INTRODUZIONE

La maggior parte degli alimenti che consumiamo abitualmente sono frutto di un lungo lavoro di cui sono protagonisti gli insetti impollinatori. Senza questi piccoli organismi il settore alimentare nel mondo subirebbe un drammatico calo di produzione che porterebbe a gravi danni economici ma soprattutto sociali.

Negli ultimi anni, il declino di questi insetti sta in effetti portando a gravi conseguenze nel settore dell'agricoltura; l'origine di questo fenomeno sembra proprio essere imputabile all'inquinamento antropico. L'uso sempre più massiccio di pesticidi e fertilizzanti in ambito agricolo, ma anche di combustibili e sostanze xenobiotiche in varie attività industriali e chimiche, sta pian piano cambiando il sistema naturale in cui viviamo. Proprio per questo molte ricerche scientifiche sono indirizzate alla valutazione dello stato di salute degli insetti impollinatori sempre più minacciati dall'esposizione a numerosi inquinanti.

Questo studio mira ad approfondire la contaminazione in apicoltura in particolare dei metalli pesanti, ormai quasi onnipresenti in ambienti urbani, ma anche in quelli agricoli e rurali. Questi elementi, infatti, stanno causando gravi episodi di tossicità soprattutto nell'*Apis Mellifera (L.)*, specie maggiormente allevata in tutto il mondo per la produzione di miele e altri derivati come propoli, cera d'api e polline.

Molti metalli pesanti, principalmente cadmio e piombo, influenzano notevolmente la crescita e lo sviluppo delle api come anche la qualità dei loro prodotti. Questa ricerca bibliografica ha come obiettivo quello di evidenziare lo stato attuale dell'inquinamento da metalli pesanti nell'ambito dell'apicoltura. Verranno citate le principali fonti di origine di questi elementi e il percorso che li porta a contatto con il mondo dell'apicoltura e degli impollinatori in generale. Verranno anche approfondite le modalità con cui questi insetti possono tollerare ma anche detossificare in parte i loro prodotti tramite particolari molecole ed enzimi presenti naturalmente nel loro corpo, e le conseguenze di questi metalli sulla loro fisiologia. Gli alveari ma anche gli insetti, inoltre, sono importanti bioindicatori dell'inquinamento ambientale, in particolare dell'area di foraggiamento delle api stesse, e possono quindi fornire informazioni sulla salute di un determinato ambiente.

1) L'APIS MELLIFERA (L.)

L'Apis mellifera, più comunemente definita ape europea, è un insetto impollinatore ormai allevato in tutto il mondo per la sua praticità e per il commercio dei suoi prodotti. Oltre a contribuire alla biodiversità di un ecosistema, svolge un ruolo fondamentale di impollinazione di piante da frutto, orticole e di moltissime altre colture vegetali; senza l'opera di questo insetto, la produzione agricola come oggi si è sviluppata ed è conosciuta non esisterebbe.

Si tratta di un insetto sociale, ovvero la sua vita è strutturata in società organizzate, nelle quali ogni ape ha una propria funzione all'interno dell'alveare. In ogni arnia vi sono una regina, le api operaie e i fuchi. La regina ha il compito di deporre le uova a seconda delle condizioni climatiche e della disponibilità di cibo dell'ambiente esterno. Le api operaie, divise in bottinatrici ed esploratrici, hanno il compito di portare all'alveare il cibo che verrà consumato dalle larve e dalle pupe. La ricerca del polline e del nettare avviene grazie alle api esploratrici, le quali, tramite particolari sostanze denominate feromoni, inviano messaggi alle compagne operaie. Si tratta di sostanze prodotte dai singoli individui che vengono emanate nell'ambiente e raggiungono gli altri organismi della colonia come dei messaggeri chimici. Infine, i fuchi sono i maschi della specie e sono preposti all'accoppiamento con l'ape regina. Vengono allevati nel periodo in cui vengono allevate anche le api regina. Il fattore che porta alla distinzione tra ape operaia e regina è dato dall'alimentazione, cioè da come verranno nutrite le larve dalle api nutrici.

Questo imenottero è provvisto di un apparato boccale lambente-succhiante che permette di succhiare i liquidi zuccherini delle piante, come il nettare ma anche la melata o semplicemente l'acqua. Inoltre, le sue mandibole svolgono un ruolo fondamentale nella lavorazione della cera nell'alveare.

Essendo un artropodo è costituito da un esoscheletro e da uno strato peloso che lo protegge dall'ambiente esterno e da possibili agenti patogeni. L'ape europea possiede anche una macroflora batterica ben sviluppata all'interno dell'organismo, che tuttavia risulta piuttosto suscettibile ad alterazioni per esposizione a pesticidi e fertilizzanti utilizzati in agricoltura. Infatti, essendo un insetto che si nutre di nettare proveniente da diverse fonti, è in grado di trasportare e accumulare molti contaminanti nelle arnie, soprattutto metalli pesanti, che possono trovarsi nella sua area di foraggiamento. Un'Apis Mellifera, per ricercare nettare e polline, può spostarsi anche fino a tre chilometri dall'alveare e quindi sorvolare un'area fino a dieci chilometri quadrati.

1.1) I PRODOTTI DELL'APIS MELLIFERA

L'apicoltura è un settore in forte sviluppo in molti paesi. Infatti, i prodotti che ne derivano sono un importante bene economico per quanto riguarda esportazioni e importazioni in tutto il mondo. Dall'allevamento delle arnie si ricavano polline, cera d'api, pappa reale, propoli, miele e anche veleno d'api per uso terapeutico.

Il prodotto per eccellenza è sicuramente il miele, commercializzato in tutto il mondo; differisce a seconda della varietà floreale da cui le api prelevano il nettare. Si tratta di una miscela di diversi carboidrati, tra cui fruttosio, glucosio, saccarosio e maltosio, e proteine, amminoacidi di vario genere, vitamine e minerali. La specie vegetale da cui viene estratto il nettare, oltre a differenziare le tipologie di miele, ne influenza il colore, il sapore e anche le proprietà organolettiche. Si possono distinguere mieli unifloreali, come quello d'acacia o castagno, o polifloreali, come il classico millefiori.

La composizione del nettare, oltre a determinare la tipologia di miele, è responsabile della presenza di vari contaminanti all'interno della miscela zuccherina. Le api domestiche, infatti, prelevano il nettare dalle colture e lo portano dentro all'alveare dove verrà elaborato e trasformato in miele, trasportando però contemporaneamente anche possibili residui di pesticidi, fertilizzanti e altre sostanze chimiche.

Il miele contiene una discreta quantità di metalli pesanti, che sono dei costituenti naturali di questo composto, derivanti infatti dalla composizione del terreno su cui crescono le piante, che li assorbono attraverso il sistema radicale. In questo caso questi elementi sono presenti nella roccia madre del suolo in concentrazioni minime. Lo stesso fenomeno si ha nelle regioni costiere dove le piante sono esposte allo spray marino. Questi elementi possono essere distinti nel miele anche attraverso il colore: i mieli più scuri contengono normalmente maggiori concentrazioni di cadmio, ferro e piombo, mentre in quelli più chiari troviamo in maggiori quantità alluminio e magnesio. I mieli di melata, una sostanza zuccherina secreta dagli afidi e da cui le api traggono nutrimento, contengono tra le più alte concentrazioni di metalli ¹ come indicato nella figura 1.1.

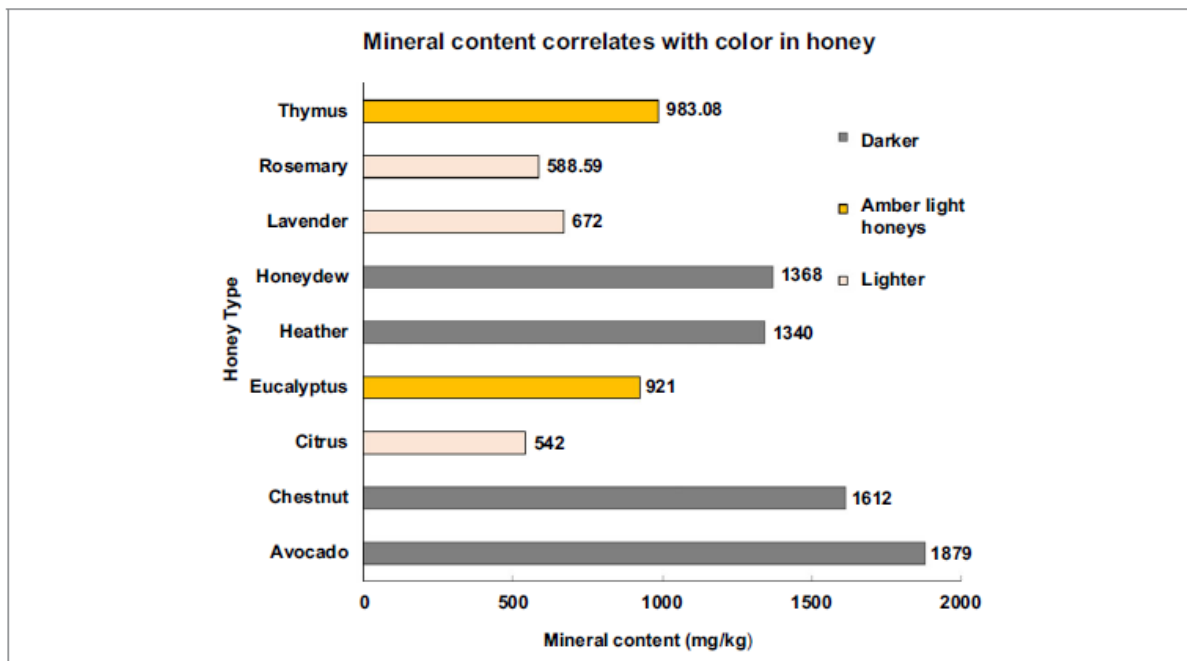


Figura 1.1: Concentrazioni riportate di minerali e metalli nei mieli più scuri (mieli di avocado, castagno, melata ed erica) rispetto a mieli ambrati (mieli di eucalipto e timo) o mieli più leggeri (mieli di agrumi, rosmarino e lavanda) ^{2,3}.

Il miele può essere contaminato anche attraverso la sua estrazione, lavorazione e stoccaggio in maturatori. Infatti, non essendo tutte attrezzature in acciaio inossidabile, ma anche in acciaio zincato e alluminio, l'effetto corrosivo dato dal pH acido del miele (3.5-4.8) può portare in soluzione alcuni metalli aumentandone la concentrazione finale nel composto ⁴.

Un altro importante prodotto delle api è la cera d'api, a sua volta un'importante contenitrice di metalli pesanti, che possono essere accumulati per decenni. La cera è una sostanza composta da esteri di acidi grassi, alcoli liberi, idrocarburi, acqua e piccole quantità di propoli. È stato dimostrato che i favi all'interno delle arnie hanno una concentrazione di metalli pesanti tanto più alta quanto maggiore è l'età del favo ⁵. Per questo motivo, una buona pratica di apicoltura dovrebbe prevedere la sostituzione dei favi vecchi, più scuri e danneggiati con favi costituiti da cera fresca. Inoltre, i fili non costituiti da acciaio inossidabile che sostengono la struttura del nido d'ape possono rappresentare una sorgente di metalli pesanti, in particolare di ferro, molibdeno, manganese, nichel, cadmio e zinco ⁶.

Le ricerche scientifiche sul contenuto di inquinanti nella cera d'api non sono così numerose come per il miele, non essendo questa sostanza un prodotto direttamente consumato dall'uomo.

2) I METALLI PESANTI

Molti elementi, i quali rientrano nella classificazione di metalli, come ad esempio rame, ferro e cobalto, sono fondamentali per lo sviluppo e il buon funzionamento dell'organismo umano e anche degli insetti impollinatori, a condizione che siano presenti a basse concentrazioni. Vengono infatti classificati come oligoelementi ^{7,8}. Altri metalli, invece, risultano molto tossici in quanto non sono presenti naturalmente nell'ambiente in cui vivono le api, e risultano per questo sostanze xenobiotiche, che possono interrompere e causare gravi danni alla fisiologia degli organismi.

I metalli che presentano rilevanti proprietà contaminanti tossicologiche ed ecotossicologiche sono talvolta definiti "metalli pesanti", anche se va sottolineato che il termine non ha una definizione univoca ed è spesso utilizzato in modo fuorviante⁹. I principali metalli pesanti che vengono analizzati nei prodotti derivanti dall'apicoltura sono cadmio, piombo, arsenico, ferro, mercurio, cobalto, zinco, manganese, molibdeno, rame, cromo e alluminio ¹⁰.

Le fonti di questi elementi possono essere naturali o antropiche. Quelle biogeniche, come già anticipato, sono dovute alla roccia madre nel terreno, e i metalli vengono assorbiti a livello radicale dalle piante. Possono derivare anche da eruzioni vulcaniche, geysir, erosione delle rocce ad opera del vento o da incendi boschivi ^{11, 12, 13}.

Nell'ultimo secolo le emissioni antropogeniche di metalli pesanti sono aumentate notevolmente, a cominciare dalla rivoluzione industriale. Il sempre più massiccio uso di combustibili fossili, come il carbone e il petrolio, unito al costante aumento del traffico stradale sono solo alcune fonti di questi elementi. L'estrazione mineraria, le fonderie e l'ampio uso di fertilizzanti, pesticidi e insetticidi in agricoltura sono le principali cause di contaminazione ambientale di metalli pesanti ^{14, 15}.

Molte industrie metallurgiche e chimiche, a partire dal dopoguerra, attraverso la loro attività hanno contribuito alla dispersione nell'ambiente di moltissimi metalli pesanti, che si sono accumulati con il tempo nel suolo, nelle acque e anche nell'aria. Anche la creazione di discariche, spesso non gestite in maniera adeguata, dove vengono smaltiti rifiuti elettronici, e gli inceneritori sono fonti di questi elementi tossici ^{16, 17}.

I due metalli pesanti più comunemente studiati nell'ambito dell'apicoltura sono il piombo, molto usato nell'edilizia e nelle batterie, e il cadmio proveniente soprattutto da industrie metallurgiche e inceneritori ¹⁸.

3) LA CONTAMINAZIONE IN APICOLTURA AD OPERA DEI METALLI PESANTI

Gli insetti impollinatori sono specie particolarmente esposte all'inquinamento ambientale da metalli pesanti in quanto si nutrono di nettare proveniente dalle specie vegetali nella loro area di foraggiamento. Come abbiamo già detto, i principali siti di approvvigionamento per le api domestiche sono le specie floreali. Una prima problematica che sorge deriva proprio dallo sfruttamento di molte specie vegetali per la detossificazione di un ambiente inquinato, sfruttando una pratica nota come "fitodepurazione". La fitodepurazione utilizza le piante come organismi detossificanti per rimuovere dall'ambiente possibili inquinanti accumulandoli all'interno della pianta stessa. Questa pratica molto favorevole permette da un lato di risanare un ecosistema, ma dall'altro rappresenta una fonte di sostanze tossiche per gli insetti impollinatori che vivono nella stessa area^{19,20,21}. Molte piante, sito di nidificazione e foraggiamento per alcuni insetti impollinatori, vengono infatti definite "metallofite"²², ovvero grandi accumulatrici di questi elementi. Proprio per questo motivo sono la causa di morie di api domestiche come di altri impollinatori che non tollerano concentrazioni di metalli pesanti così elevate.

Molti studi hanno dimostrato che spesso in aree agricole, boschive e rurali sono presenti maggiori concentrazioni di metalli pesanti rispetto ad aree urbane o industriali^{23,24}. Questo deriva dall'uso massiccio di fertilizzanti, erbicidi e pesticidi generici di origine chimica che sono ampiamente distribuiti nelle pratiche agricole. Molti pesticidi utilizzati in tutto il mondo per il mantenimento di orticole contengono alte concentrazioni di arsenico, piombo e rame¹⁴, mentre erbicidi comuni come il glifosato sono fonti continue di nichel, cobalto, cromo e piombo¹⁵. La tossicità dei metalli pesanti aumenta con l'aumentare della solubilità. Molti insetti impollinatori sono esposti a questi elementi in quanto disciolti in soluzione acquose e quindi solubili e introdotti all'interno dell'organismo tramite ingestione. Tuttavia, questo non significa che gli ioni meno solubili siano innocui o meno tossici per gli insetti impollinatori. Ad esempio, molti metalli possono trovarsi nell'ambiente anche come nanoparticelle insolubili e venire assorbiti a livello del sistema tracheale degli insetti oppure tramite adsorbimento nella cuticola²⁵. Infatti, le nanoparticelle che vengono ingerite o inalate dall'epitelio intestinale possono essere adsorbite dai tessuti e danneggiare anche gli organelli delle cellule stesse²⁶. Inoltre, quasi sempre in natura, i metalli pesanti non sono presenti come singoli elementi, ma associati ad altre sostanze chimiche o ad altri metalli stessi che ne aumentano la tossicità²⁷.

3.1) I METALLI PESANTI CONTENUTI NEL MIELE

Negli ultimi anni il miele è stato oggetto di un crescente interesse internazionale in quanto si stanno riscontrando concentrazioni sempre maggiori di metalli pesanti all'interno di mieli europei e non solo ^{28, 29}.

L'origine di questi elementi è imputabile all'inquinamento antropico a livello urbano, ma anche all'uso massiccio di pesticidi e fertilizzanti in continuo aumento per far fronte al crescente fabbisogno alimentare.

Nella tabella 3.1 sono indicati gli elementi maggiormente presenti, in media, nella maggioranza dei mieli analizzati in uno studio internazionale condotto tra il 2001 e il 2014.

Tabella 3.1: Elementi principali, oligoelementi e metalli pesanti nel miele (SD: deviazione standard) ³⁰.

Element	Units	Mean	SD	Range
Na ^a	mg/kg	96.48	80.58	3.23–236.80
K ^a	mg/kg	742.43	453.88	39.66–1349.34
Ca ^a	mg/kg	84.36	68.34	4.85–218.00
Mg ^a	mg/kg	74.31	163.05	2.18–563.72
P ^a	mg/kg	84.10	48.36	28.80–118.50
S ^a	mg/kg	35.27	19.86	15.39–72.20
Cl ^a	mg/kg	302.63	83.81	181.30–427.2
Fe ^b	mg/kg	30.34	64.99	0.41–224.00
Cu ^{b,c}	mg/kg	1.99	4.31	0.05–17.30
Zn ^{b,c}	mg/kg	9.33	19.55	0.23–73.60
As ^b	mg/kg	0.05	0.04	ND–0.10
Ni ^{b,c}	mg/kg	1.24	2.62	ND–9.00
Mn ^{b,c}	mg/kg	1.42	1.47	0.00–4.35
Se ^b	mg/kg	0.01	0.00	0.01–0.01
Al ^b	mg/kg	5.12	3.61	1.39–11.36
Si ^b	mg/kg	23.52	16.13	8.70–40.70
B ^b	mg/kg	5.36	1.33	4.42–6.30
Mo ^b	mg/kg	0.23	0.30	0.01–0.44
Cr ^b	mg/kg	1.63	1.03	0.90–2.36
V ^b	mg/kg	0.03	0.03	0.01–0.05
Ti ^b	mg/kg	43.40	17.30	25.00–71.00
Cd ^{b,c}	µg/kg	89.69	129.75	0.17–373.00
Pb ^{b,c}	µg/kg	424.57	839.65	0.63–3232.00
Co ^b	µg/kg	171.78	291.72	0.01–800.00
Hg ^{b,c}	µg/kg	5.09	6.82	0.27–9.91
Cr ^{b,c}	µg/kg	152.84	139.74	ND–370.00
Ag ^{b,c}	µg/kg	299.61	419.17	3.21–596.00
Be ^b	µg/kg	9.93	0.05	9.83–10.00

^a Major elements.

^b Trace elements.

^{b,c} Trace elements/Heavy metals.

Si può notare che l'elemento più abbondante è il potassio, che è un elemento essenziale per l'organismo, ma vi sono anche altri elementi presenti in concentrazioni piuttosto elevate quali piombo, cadmio, cromo e argento che naturalmente non sarebbero presenti nel miele.

Lo studio ha preso in considerazione dei mieli proveniente da stati in tutto il mondo, e questi risultati dimostrano come l'impatto dell'inquinamento antropico in natura sia diffuso uniformemente nel nostro pianeta. Il cloro è stato riscontrato

principalmente nei mieli spagnoli ³¹, mentre nei mieli italiani prodotti in aree contaminate sono state trovate le più alte concentrazioni di piombo, fino a 2730 mg/kg ³².

A livello europeo, il miele viene costantemente monitorato e il metallo che viene riscontrato in concentrazione maggiore è il cadmio, seguito da piombo e rame ³³.

Il monitoraggio di questo alimento viene effettuato per rilevare il grado di incidenza dei trattamenti fitosanitari e anche per prevenire le adulterazioni del miele stesso che avvengono sempre più frequentemente con sciroppo di glucosio e di fruttosio⁴. La contaminazione del miele può avvenire anche tramite l'utilizzo di antibiotici nell'alveare, come i varroacidi, costituiti principalmente da timolo ^{34,35}.

3.2) IL CADMIO

Il cadmio è naturalmente presente nelle rocce e quindi in natura, ed è spesso associato ad altri minerali contenenti zinco, rame e piombo. In seguito ai vari fenomeni atmosferici viene disperso nell'ambiente sottoforma di nanoparticelle. Ciononostante, questo metallo proviene per la maggior parte da emissioni antropiche a livello industriale, dalla raffinazione dei metalli, dalla produzione di cemento e di batterie, dall'incenerimento di rifiuti urbani e dal trattamento delle acque reflue. Le sue caratteristiche lo rendono piuttosto lisciviabile, per questo molto spesso si riscontra nelle acque correnti di fiumi ma anche nell'acqua piovana. Le particelle invece vengono deposte sul suolo o sulle piante bioaccumulandosi e rimanendo esposte a vegetali e animali.

Gli insetti impollinatori sono esposti al cadmio soprattutto attraverso le piante contaminate e maggiormente nella stagione primaverile-estiva, quando queste specie sono più attive per la maggior presenza di nettare ^{29,36}.

Questo elemento è sicuramente responsabile della diminuzione di popolazione degli insetti impollinatori assieme ad altri composti inquinanti diffusi in natura dall'uomo³⁷.

3.3) IL PIOMBO

Il piombo è un metallo ubiquitario che ha effetti neurotossici; una volta depositato nell'ambiente richiede ingenti costi di bonifica con tempi particolarmente lunghi ^{38, 39}.

A partire dalla rivoluzione industriale le fonti naturali di Pb (emissioni vulcaniche, erosione di rocce) sono state soppiantate per quantità di emissioni da quelle antropiche che provengono dall'industria dei combustibili, dalle attività minerarie, da tecniche di fusione di metalli e da operazioni di verniciatura. Fino a non molti anni fa, la maggior fonte di diffusione del piombo nell'ambiente era rappresentata dalla benzina con l'aggiunta di piombo tetraetile come agente antidetonante. Solo alla fine del XX secolo questo combustibile ha cominciato ad essere commercializzato senza Pb. Purtroppo, l'eredità di questo inquinamento da Pb si è protratta negli anni, e i governi hanno dovuto investire somme ingenti per la bonifica di suoli in modo da salvaguardare la salute pubblica ⁴⁰.

Oggigiorno la contaminazione da piombo è molto più frequente nelle città o in prossimità di aree industriali. Questo metallo non possiede effetti tossici solo per gli esseri umani ma per tutti gli organismi viventi, in particolare anche per gli insetti impollinatori come le api mellifere ^{41, 42}.

3.4) EFFETTI DEI METALLI PESANTI SULL'APE DOMESTICA

Come già accennato i metalli pesanti possono accumularsi nel corpo degli impollinatori tramite inalazione, ingestione ma anche adsorbimento attraverso la cuticola. L'ape domestica è ricoperta da un sottile strato peloso, dove possono depositarsi le particelle di contaminanti, tra cui i metalli quando l'insetto visita le specie floreali alla ricerca del nettare. La contaminazione dipende anche dalla posizione dell'apiario, se viene installato in aree rurali o in prossimità di zone industriali o urbane ^{43,44}.

Gli effetti di queste sostanze tossiche sugli impollinatori sono molteplici. Secondo un esperimento⁴⁵ l'esposizione delle api nutrici nella loro dieta a sali di cadmio (CdCl_2 e CdSO_4) ne ha aumentato la mortalità già dopo 24 ore dalla somministrazione. La dose letale per CdCl_2 è risultata pari a 3.51 $\mu\text{g Cd/ape}$ per 48 ore, e a 2.80 $\mu\text{g Cd/ape}$ per 96 ore; per CdSO_4 , sono stati riportati valori di dose letale pari a 2.34 $\mu\text{g Cd/ape}$ per 48 ore e a 1.44 $\mu\text{g Cd/ape}$ per 96 ore, dimostrando una correlazione inversa tra il tempo di esposizione e la dose necessaria per causare la morte degli insetti.

L'esposizione al cadmio delle api può non avvenire solo sugli individui adulti ma anche allo stadio larvale e di pupa. Le api bottinatrici e raccogliatrici portano all'interno delle api nettare e polline con cui nutrire le larve; quindi, molto spesso

questi insetti sono esposti ai contaminanti durante gli stadi precoci della loro vita. L'esposizione ai metalli pesanti può compromettere la crescita della larva o anche causarne la mortalità allo stadio di pupa. Gli effetti dei metalli e del cadmio in particolare sono molto più dannosi negli individui giovani rispetto a quelli adulti. Attraverso lo stesso esperimento e la somministrazione di una dieta artificiale contenente frazioni di cadmio, si è notato un peso larvale e pupale minore, uno sviluppo delle ali più corto e un tasso di crescita ridotto ^{46,47}.

A lungo andare questo inquinamento da metalli pesanti comporta un minor numero di api operaie all'interno dell'alveare. L'esposizione ai contaminanti influenza, infatti, anche il successo riproduttivo ⁴⁸.

Per dosi elevate di metalli pesanti, come cadmio, piombo e arsenico, a cui gli insetti sono esposti per più di una settimana corrisponde una mortalità del 100%. Questo accade, per esempio, in concomitanza con trattamenti fitosanitari da calendario, in determinate stagioni, che causano sempre più spesso morie di api.

Negli ultimi decenni, oltre ai trattamenti aerei su colture già sviluppate, si utilizzano spesso semi conciatati da mettere a dimora, ovvero ricoperti di insetticidi o pesticidi innocui per la pianta ma letali per insetti, in modo da preservare il seme. Quando la pianta germoglia e compaiono le prime foglioline, il seme essuda acqua, e gli insetti, spesso impollinatori, ne vengono attratti. La sostanza per eccellenza con cui vengono conciatati i semi sono i neonicotinoidi, potenti insetticidi che inducono la paralisi nervosa degli insetti e che causano morie delle api domestiche ⁴⁹. Oggigiorno i neonicotinoidi sono vietati in molti stati dell'Unione Europea; tuttavia, sono ancora molto utilizzati in alcuni paesi del mondo, come Cina, Stati Uniti, Australia e in molti stati dell'America Latina ⁵⁰.

Le api domestiche e molti impollinatori hanno organi olfattivi ben sviluppati e acquisiscono informazioni dall'ambiente esterno attraverso recettori presenti nei sensilli delle antenne, nell'apparato boccale e anche a livello intestinale ⁵¹. È proprio questa sensibilità che permette alle api di scegliere le specie floreali più adatte da cui prelevare il nettare. Questa scelta avviene grazie alla lunga e sottile proboscide delle api con la quale prelevano i liquidi zuccherini.

La struttura è molto sensibile anche ai metalli, come lo sono anche i recettori delle antenne. Per esempio, il rame viene rifiutato a livello dei sensilli ma il composto viene consumato se la stimolazione avviene attraverso la proboscide. Per quanto riguarda invece il cadmio, questo metallo viene rifiutato a livello di entrambe le strutture, mentre il piombo solo a livello della proboscide ^{52,53}. Non tutti i metalli pesanti vengono però discriminati: le api a cui vengono proposte soluzioni di saccarosio con ossidi di zinco, ad esempio, tendono a scegliere queste miscele contaminate rispetto a quelle naturali ⁵⁴.

Questi elementi influenzano quindi anche l'alimentazione delle api domestiche, impedendo a questi insetti di distinguere soluzioni ricche di saccarosio rispetto alla semplice acqua ⁵⁵ e possono influenzarne la memoria a breve e lungo termine. Ad esempio, As, Pb e Cu impediscono alle api di discriminare due o più odori ³⁶.

Inoltre, l'esposizione al cadmio provoca una depressione olfattiva negli impollinatori impedendo la localizzazione delle specie floreali e limitando il ruolo ecologico che svolgono questi insetti ⁵⁶.

Le api domestiche sono di fondamentale importanza per il loro servizio ecosistemico, ma anche per la loro fisiologia. L'analisi dei livelli fisiologici e biochimici, infatti, permette lo studio di un determinato ambiente per comprenderne l'inquinamento. In particolar modo, la fisiologia di questi insetti risulta essere molto sensibile ai metalli pesanti che inibiscono molti meccanismi biochimici interni, a partire dal calo di produzione di emociti nell'emolinfa ²⁸.

Molti insetticidi sono definiti ad "ampio spettro", ovvero non sono specie specifiche verso un unico organismo, e spesso i bersagli sono anche gli impollinatori. Gli insetticidi contenenti metalli sono letali per molte specie, tra cui le api mellifere, in quanto causano paralisi nervose e l'interruzione dei segnali sinaptici. Questo avviene spesso anche ad opera dei pesticidi e del cadmio che, causano l'inibizione dell'acetilcolinesterasi (ACE), un enzima che, se inattivato, porta all'interruzione della trasmissione sinaptica in quanto è responsabile della metabolizzazione dell'acetilcolina. Dato che l'ACE agisce anche a livello delle giunzioni neuromuscolari, la sua inattivazione provoca la paralisi delle funzioni cerebrali e anche di quelle muscolari, dati appunto dall'accumulo del neurotrasmettitore acetilcolina che non viene più metabolizzato dall'enzima ⁵⁷.

La contaminazione da cadmio, interferendo sull'ACE, influenza anche il metabolismo del calcio, agendo sui canali del calcio voltaggio-dipendenti nelle fibre muscolari, inducendo problemi alla locomozione delle api. Questo accade in quanto l'acetilcolina, essendo un neurotrasmettitore, in presenza di cadmio causa un potenziale d'azione modificato nelle cellule muscolari. Questi canali dipendono dai segnali elettrici che vengono inviati alle cellule e regolano il passaggio degli ioni dallo spazio intracellulare a quello esterno. Proprio per questo, l'inibizione della trasmissione sinaptica dal sistema nervoso alle fibre muscolari provoca un rallentamento della contrazione muscolare, di cui è responsabile il calcio, e danni più ampi alla locomozione dell'insetto ⁵⁸.

3.5) LO STRESS OSSIDATIVO

Molto spesso la contaminazione da metalli pesanti genera lo sviluppo dei radicali liberi, ovvero specie reattive dell'ossigeno (ROS) che possono ostacolare la funzionalità di molti enzimi. Queste sostanze radicaliche causano gravi danni cellulari all'organismo, oltre che effetti di cancerogenicità e mutazioni del DNA. Le ROS sono lo ione superossido, l'ossigeno singoletto, il radicale ossidrilico e il perossido di idrogeno.

Normalmente le api possiedono dei sistemi di difesa antiossidante che combattono la presenza di questi radicali. I principali enzimi sono la catalasi, la superossido

dismutasi e il glutatione perossidasi che hanno il compito di detossificare l'organismo dalle ROS e da tutte quelle sostanze radicaliche che presentano elettroni spaiati. In presenza di rilevanti quantità di metalli pesanti queste difese sono inibite e l'insetto subisce un danno da stress ossidativo.

Nel momento in cui si verifica una contaminazione da cadmio, questo metallo si sostituisce ad elementi essenziali, inibisce e modifica la produzione di enzimi antiossidanti, che vengono indotti dall'espressione di determinati geni sensibili a concentrazioni crescenti di metalli pesanti. Ne deriva che più aumenta la contaminazione, più aumenta la sintesi di enzimi antiossidanti e lo stress ossidativo diviene presente nell'ape, ovvero più sostanze radicaliche devono essere eliminate⁵⁹.

L'inquinamento di un ambiente ad opera dei metalli pesanti può quindi essere quantificato misurando lo stress ossidativo degli impollinatori che vivono e si nutrono in quell'area, ponendo attenzione all'espressione genica degli enzimi antiossidanti⁶⁰.

3.6) EFFETTI SUL MICROBIOTA INTESTINALE

La comunità microbiologica presente nell'intestino delle api domestiche è di fondamentale importanza. Permette a questi insetti di aumentare la tolleranza all'esposizione di fitofarmaci, pesticidi, microplastiche e nanoparticelle di sostanze estranee all'organismo. Tuttavia, con l'aumento di sostanze xenobiotiche, il microbiota può essere disturbato e non svolgere più la sua funzione.

La presenza di metalli pesanti influenza l'interazione ospite-simbionte⁶¹. Non tutti i metalli, però, agiscono allo stesso modo. Per esempio, l'esposizione al rame non influenza la comunità batterica mentre la contaminazione da cadmio ne riduce l'entità e la funzione⁶².

Nonostante questa alterazione, il microbiota presente nell'intestino delle api è in grado di rimuovere il cadmio presente innescando quindi un meccanismo protettivo verso questo metallo. Non si conosce ancora pienamente questa modalità che riduce la biodisponibilità dell'elemento nell'organismo, ma i protagonisti sembrano essere proprio i batteri simbiotici che ne facilitano l'escrezione⁶³.

4) LA DETOSSIFICAZIONE AD OPERA DELLE METALLOTIONEINE

Le metallothioneine (MT) sono una famiglia di proteine presenti in tutti gli organismi viventi. Sono caratterizzate da un basso peso molecolare, da un alto contenuto di cisteina e da una spiccata capacità di legare numerosi metalli tossici ^{64, 65, 66}. Questa proprietà fa sì che esse svolgano un ruolo fondamentale a livello biologico nella detossificazione da questi elementi. Vengono espresse a livello dell'intestino, nei tessuti grassi e nella testa delle api esposte a concentrazioni di metalli pesanti ^{64, 66}. Le MT sono fondamentali anche per il mantenimento delle concentrazioni dei metalli essenziali come Zn e Cu, per i quali svolgono quindi un ruolo omeostatico. La capacità delle MT di legare gli ioni metallici è dovuta alla presenza di un gruppo tiolico (-S-H-) sulla cisteina. Questi gruppi funzionali presentano un'affinità specifica verso numerosi ioni metallici tossici, quali Pb(II), Hg(II) e Cd(II), formando con essi dei complessi che causano una riduzione della quantità libera del metallo, maggiormente tossica. Si è scoperto che è proprio la presenza di ioni metallici in eccesso, in particolare di Cd(II), a indurre la sintesi delle metallothioneine ⁶⁴. Esiste infatti una correlazione tra l'esposizione al Cd e l'espressione genica che codifica una singola MT nell'Apis mellifera, ed è stata identificata una regione che esprime il promotore del gene di sintesi delle MT ⁶⁷. Tuttavia, è importante precisare che l'ape domestica codifica meno geni per l'espressione di enzimi coinvolti nella detossificazione cellulare rispetto ad altri insetti come il genere *Bombus* che contiene tre volte gli enzimi coinvolti in queste reazioni rispetto all'Apis mellifera. Gli insetti *Bombus* subiscono quindi una minore mortalità causata dall'esposizione ai metalli rispetto all'ape domestica ⁶⁸. Un metallo di fondamentale importanza per le MT è lo zinco che, a basse concentrazioni, oltre ad aumentare la sintesi di questa proteina riduce anche l'accumulo di altri metalli come Cd, Cu e Pb ⁶⁹. Oltre all'esposizione ai metalli, la sintesi delle metallothioneine è promossa anche dalla presenza dei radicali liberi dell'ossigeno. Queste proteine, infatti, svolgono anche un ruolo di difesa antiossidante eliminando le specie radicaliche (ROS). Si è dimostrato che in risposta a uno stato di stress ossidativo viene attivata l'espressione genica dell'enzima glutatione S-transferasi (GST), che ha un ruolo fondamentale nella gestione delle specie reattive dell'ossigeno. L'esposizione ai metalli pesanti, tuttavia, può ostacolare la funzione del GST e di altri enzimi come la catalasi o il glutatione perossidasi che non sono quindi più in grado di svolgere la loro azione detossificante ⁷⁰.

5) L'APE DOMESTICA E I SUOI PRODOTTI COME BIOINDICATORI AMBIENTALE

Come abbiamo ribadito le api accumulano inquinanti dal nettare prelevato dalle specie floreali e lo trasportano all'alveare. Allo stesso tempo, l'apicoltura è una pratica diffusa in tutto il mondo. Le colonie di api possono essere collocate in aree rurali, agricole ma anche industriali o urbane dove la concentrazione dei metalli e di altre sostanze tossiche può diventare particolarmente elevata, senza tuttavia essere in grado di danneggiare la colonia ⁷¹. Per questi motivi, l'ape domestica è sempre più studiata per la sua importanza nel campo del biomonitoraggio ambientale.

L'ubicazione degli alveari è fondamentale nello studio della salute ambientale di un luogo perché possono essere spostati da un ambiente all'altro ⁷². In particolare si è condotto uno studio che ha raccolto dati di campionamenti su alveari in ben 55 paesi in tutto il mondo con lo scopo di valutare la salute ambientale degli ecosistemi. Nella figura 5.1 sono evidenziati i paesi dove sono stati raccolti i dati.

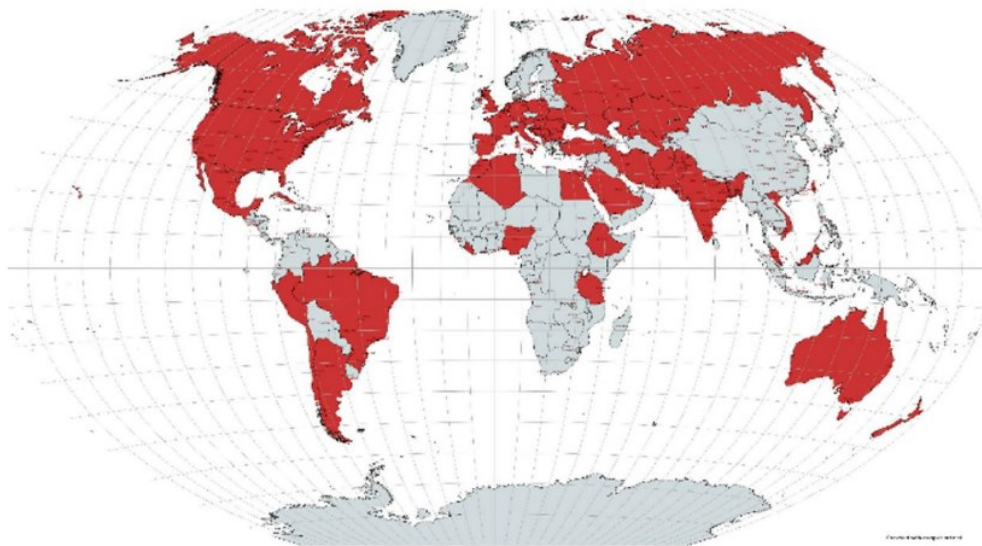


Figura 5.1: Panoramica dei 55 paesi in cui sono stati raccolti i campioni per lo studio di biomonitoraggio ambientale ⁷³.

Gli stati dove il monitoraggio ambientale basato sulle api domestiche è maggiormente diffuso sono Brasile, Italia, Polonia e Serbia; l'Europa risulta essere il continente che investe maggiormente nella ricerca in questo ambito ⁷³.

Nello studio sono stati analizzati i principali metalli pesanti citati in precedenza; i risultati ottenuti sono mostrati in figura 5.2, e sono rappresentati come frequenza di ritrovamento, cioè come numero di alveari che hanno mostrato contaminazione da quel particolare metallo.

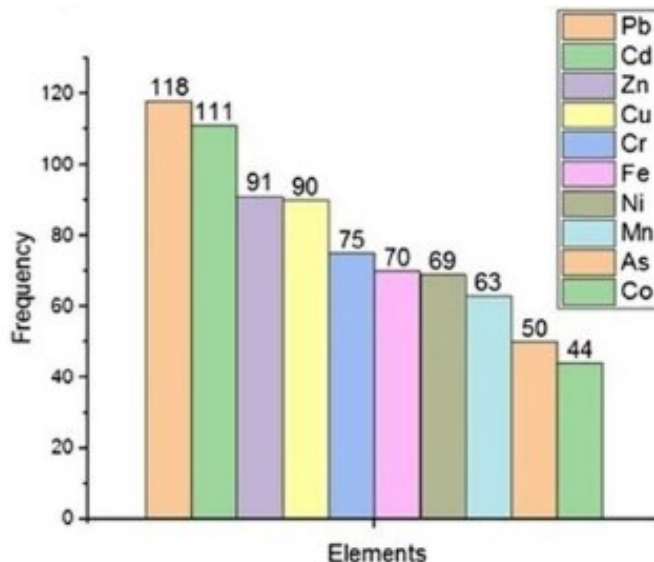


Fig. 5.2: I dieci elementi riscontrati per quanto riguarda il biomonitoraggio con frequenza di ritrovamento nei campioni ⁷³.

Come ci si aspettava, nella maggioranza dei campioni analizzati sono stati trovati concentrazioni rivelabili di cadmio e piombo. Altri metalli che hanno mostrato una certa contaminazione (pur in minor misura rispetto a cadmio e piombo) degli alveari sono stati zinco, rame, cromo e ferro ⁷⁴.

I metalli pesanti non sono distribuiti in modo uniforme nel corpo dell'insetto, ma a seconda dell'elemento possono dislocarsi in varie parti dell'organismo. Piombo, cadmio, zinco e stronzio si accumulano principalmente nella zona toracica ma anche in quella addominale e intestinale, in concentrazione doppia rispetto alla testa. Ferro e cesio, invece, si localizzano prevalentemente nel ventre e nell'addome dell'ape, mentre il rame all'interno della testa o nel torace ⁷⁵.

Oltre alle api, è possibile anche proporre i loro prodotti come bioindicatori ambientali, e da un punto di vista etico è una strada sicuramente preferibile in quanto non prevede l'uccisione dell'insetto nella fase di analisi chimica.

Il miele, principale prodotto dell'*Apis mellifera*, è un indicatore solo discreto della salute ambientale di un ecosistema, in quanto, essendo un prodotto lavorato dalle api stesse, ha subito in parte una detossificazione da parte degli insetti durante la sua lavorazione, detossificazione che può allontanare o degradare alcuni inquinanti. Per tale motivo il miele potrebbe sottostimare gli inquinanti presenti effettivamente in quell'ambiente.

Altri prodotti delle api, come il polline, il propoli o la cera d'api, appaiono essere bioindicatori più promettenti del miele, sebbene anch'essi, avendo subito dei processi di lavorazione da parte delle api, possano sottostimare gli inquinanti ambientali. In uno studio condotto in Romania si è ad esempio potuto osservare che il grado di contaminazione da metalli pesanti nelle api e nei suoi prodotti, in mg/kg di metalli totali trovati, diminuiva secondo il seguente ordine: api mellifere (50.72 mg/kg), fuchi (32.72 mg/kg), propoli (22.24 mg/kg), cera (21.12 mg/kg), larve di api (17.33 mg/kg), miele (14.59 mg/kg) e infine pappa reale (1.03 mg/kg)⁴³. Altre analisi hanno consolidato il fatto che i metalli tossici cadmio e piombo sono da 4 a 218 volte più concentrati nelle api e da 6 a 47 volte più presenti nel polline rispetto al miele⁷⁶.

La Tabella 5.1 riassume vantaggi e svantaggi delle api e dei suoi prodotti nel loro utilizzo come bioindicatori ambientali.

Tabella 5.1: Aspetti generali riguardanti l'utilizzo delle api e dei loro prodotti commerciali come bioindicatori ambientali⁷⁷.

Soggetti	Vantaggio e svantaggio
Api	Sono a diretto contatto con gli inquinanti La necessità di ucciderli
Miele	Altamente disponibile Ha una concentrazione di metalli inferiore Funziona meglio per contaminazioni elevate
pappa reale	Meno disponibile Più elaborato dalle api Ha il contenuto di metalli più basso
Polline, cera d'api e propoli	Meno trasformato dalle api Un'alternativa all'uccisione di api Meno contaminato delle api

Nonostante l'Europa investa particolarmente nella ricerca scientifica nel campo dei bioindicatori ambientali in apicoltura, non esiste una regolamentazione specifica e univoca riguardante i contaminanti che sono ammessi nei prodotti dell'apicoltura. Vi sono solo dei limiti massimi accettabili fissati per alcuni metalli che normalmente sono più presenti nel miele come cadmio (1 mg/kg) e piombo (0.1 mg/kg)⁷⁸.

6) CONCLUSIONI

Negli ultimi anni la crescente preoccupazione per la graduale diminuzione del numero degli insetti impollinatori ha interessato sempre più la comunità scientifica internazionale, che sta investendo nella ricerca allo scopo di identificare e prevenire la contaminazione dei prodotti derivanti dall'apicoltura.

L'*Apis mellifera* è una delle specie più minacciate dall'inquinamento ambientale e questo si può osservare dalla crescente contaminazione soprattutto da metalli pesanti, quali cadmio e piombo, derivanti dal massiccio uso di fertilizzanti e pesticidi in agricoltura e da innumerevoli attività antropiche. Questi elementi tossici risultano essere nocivi per questi insetti, soprattutto a livello fisiologico e biochimico, inibendo la funzionalità di molti enzimi antiossidanti.

I metalli pesanti, oltre ad aumentare la mortalità di questi insetti, ne disturbano l'attività di impollinatori, causando la loro depressione olfattiva e l'incapacità di distinguere le diverse specie floreali. La concentrazione maggiore di elementi tossici è presente soprattutto nell'ape stessa e diminuisce proporzionalmente alla lavorazione e quindi alla detossificazione dei suoi prodotti ad opera dell'insetto.

L'*Apis mellifera*, come molti altri organismi, possiede delle proteine, le metallothioneine, in grado di legare i metalli limitandone la circolazione nell'emolinfa e in altre parti del corpo. Anche la presenza di numerosi enzimi antiossidanti congiuntamente alla microflora batterica svolge un ruolo attivo negli insetti che permette di contrastare questi elementi xenobiotici che possono causare stress ossidativo e quindi danni più ampi all'ape.

L'agricoltura convenzionale e l'uso massiccio di pesticidi ed erbicidi concorrono ad aggravare la diminuzione degli insetti impollinatori, la qual cosa è osservabile attraverso l'ubicazione di alveari in prossimità di aree agricole intensive ma anche nelle vicinanze di aree industriali.

Il contenuto sempre maggiore di metalli pesanti nel miele in tutto il mondo riflette in modo inequivocabile il crescente inquinamento ambientale ormai ubiquitario nel nostro pianeta. Una delle sfide che ci attendono sarà quella di garantire dei maggiori investimenti nella ricerca scientifica sugli impollinatori e sul loro ruolo biologico come importanti bioindicatori della salute ambientale di un ecosistema.

7) BIBLIOGRAFIA

Pistoia, A. (1999). Apicoltura tecnica e pratica. Verona: Edizioni L'Informatore Agrario s.r.l.

[1] **Hernández, O., Fraga, J., Jimenez, A., Jimenez, F., Arias, J., (2005).** Characterization of honey from the Canary Islands: determination of the mineral content by atomic absorption spectrophotometry. *Food Chem* 93:449–58.

[2] **Caroli, S., Forte, G., Iamiceli, A., Galoppi, B., (1999).** Determination of essential and potentially toxic trace elements in honey by inductively coupled plasma-based techniques. *Talanta* 50:327–36.

[3] **Devillers, J., Dore, J., Marengo, M., Poirier-Duchene, F., Galand, N., Viel, C., (2002).** Chemometrical analysis of 18 metallic and nonmetallic elements found in honeys sold in France. *J Agric Food Chem* 50:5998–6007.

[4] **Pisani, A., Protano, G., Riccobono, F., (2008).** Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chem.* 107-1553.

[5] **Taha, E-KA., Manosur, HM., Shower, MB., (2010).** The relationship between comb age and the amounts of mineral elements in honey and wax. *J Apic.*

[6] **Özcan, M.M., Al Juhaimi, F.Y., (2012).** Determination of heavy metals in beehoney with connected and not connected metal wires using Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES). *Environ Monit Assess* 184(4):2373–2375. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-2123-6>

[7] **Nielsen, FH., (1984).** Ultratrace elements in nutrition. *Annu Rev Nutr* 4:21–41.

[8] **Belitz, H., Grosch, W., Schieberle, P., (2009).** Food Chemistry. 4th revised and extended ed. Berlin; London: Springer, 1070 pages.

[9] **IUPAC Technical Report (2002).** “Heavy metals” - a meaningless term?” *Pure Appl. Chem., Vol. 74, No. 5, pp. 793–807, 2002.*

[10] **Tuzen, M., Silici, S., Soylak, M., (2007).** Trace element levels in honeys from different regions of Turkey. *Food Chem.* 103-325.

[11] **Nagajyoti, P.C., Lee, K.D., Sreekanth, T.V.M., (2010).** Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environ. Chem. Lett.* 8 (3), 199–216. <https://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>

[12] **Wuana, R.A., Okieimen, F.E., (2011).** Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *ISRN Ecol.* 2011, 1–20. <https://doi.org/10.5402/2011/402647>

- [13] **Edelstein, M., Ben-Hur, M., (2018).** Heavy metals and metalloids: sources, risks and strategies to reduce their accumulation in horticultural crops. *Sci. Hortic.* 234, 431–444. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.039>
- [14] **He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., (2005).** Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 19 (2–3), 125–140. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.02.010>
- [15] **Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G.E., (2018).** Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicol. Rep.* 5, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.025>
- [16] **Melchor-Martínez, E.M., Macias-Garbett, R., Malacara-Becerra, A., Iqbal, H.M.N., Sosa-Hernández, J.E., Parra-Saldívar, R., (2021).** Environmental impact of emerging contaminants from battery waste: a mini-review. *Case Stud. Chem. Environ. Eng.* 3, 100104. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2021.100104>.
- [17] **Vincēviča-Gaile, Z., (2010).** Macro- and trace elements in honey. *LLU-Raksti* 25:54–66.
- [18] **Rodríguez Garcia, J.C., Iglesias Rodríguez, R., Pena Crecente, R.M., Barciela Garcia, J., Garcia Martin, S., Herrero Latorre, C., J. Agric, J., (2006).** Preliminary chemometric study on the use of honey as an environmental marker in Galicia (northwestern Spain). *Food Chem.* 54 (2006) 7206.
- [19] **Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., (1998).** Phytoremediation: a review. *Annu. Rev. Plant Physiol. PlantMol. Biol.* 49, 643–668 <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.49.1.643>
- [20] **Van Aken, B., (2008).** Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends Biotechnol.* 26 (5), 225–227. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.02.001>
- [21] **Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., (2013).** Phytoremediation of heavy metals - concepts and applications. *Chemosphere* 91 (7), 869–881. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.
- [22] **Dalvi, A.A., Bhalerao, S.A., (2013).** Response of plants towards heavy metal toxicity: an overview of avoidance, tolerance and uptake mechanism. *Ann. Plant Sci.* 2 (09), 362–368.

- [23] **Van der Steen, J.J.M., Cornelissen, B, Blacquiere, T., et al (2016).** Think regionally, act locally: metals in honeybee workers in the Netherlands (surveillance study 2008). *Environ Monit Assess* 188:1–9. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5451-8>
- [24] **Zarić, N.M., Ilijević, K., Stanisavljević, L., Gržetić, I., (2016).** Metal concentrations around thermal power plants, rural and urban areas using honeybees (*Apis mellifera* L.) as bioindicators. *Int J Environ Sci Technol* 13:413–422. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0895-x>
- [25] **Negri, I., Mavris, C., Di Prisco, G., Caprio, E., Pellecchia, M., (2015).** Honey bees (*Apis mellifera*, L.) as active samplers of airborne particulate matter. *PLoS One* 10 (7), e0132491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132491>
- [26] **Dabour, K., Al Nagggar, Y., Masry, S., Naiem, E., Giesy, J.P., (2019).** Cellular alterations in midgut cells of honey bee workers (*Apis mellifera* L.) exposed to sublethal concentrations of CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture. *Sci. Total Environ.* 651, 1356–1367. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.311>
- [27] **Lado, L.R., Hengl, T., Reuter, H.I., (2008).** Heavy metals in European soils: a geostatistical analysis of the FOREGS geochemical database. *Geoderma* 148 (2), 189–199. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.09.020>
- [28] **Caliani, I., Campani, T., Conti, B., Cosci, F., Bedini, S., D’Agostino, A., Ammendola, A., Di Noi, A., Gori, A., Casini, S., (2021).** Multi-biomarker approach and IBR index to evaluate the effects of different contaminants on the ecotoxicological status of *Apis mellifera*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 208, 111486. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111486>
- [29] **Ilijević, K., Vujanović, D., Orčić, S., Purać, J., Kojić, D., Zarić, N., Čelić, T.V., (2021).** Anthropogenic influence on seasonal and spatial variation in bioelements and non-essential elements in honeybees and their hemolymph. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 239:108852.
- [30] **Solayman, Md., Asiful Islam, Md., Sudip, P., Yousuf, A., Ibrahim Khalil, Md., Alam, N. and Siew Hua Gan (2016).** Physicochemical Properties, Minerals, Trace Elements, and Heavy Metals in Honey of Different Origins: A Comprehensive Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2016 Jan; 15(1):219–233. doi: 10.1111/1541-4337.12182. Epub 2015 Nov 18.

- [31] **González Paramás, A.M., Gómez Báñez, JA., Garcia-Villanova, R.J., Rivas Palá, T., Ardanuy Albajar, R., Sánchez, J. (2000).** Geographical discrimination of honeys by using mineral composition and common chemical quality parameters. *J Sci Food Agric* 80:157–65.
- [32] **D’ambrosio, M., Marchesini, A., (1982).** Research on contamination by heavy metals in honey sample. *Atti della Societa Italiana di Scienze Naturali* 123:342–8.
- [33] **Lazarus, M., Tariba Lovakovíc, B., Orct, T., et al., (2021).** Difference in pesticides, trace metal(loid)s and drug residues between certified organic and conventional honeys from Croatia, *Chemosphere*, vol. 266, Article ID 128954, 2021.
- [34] **Wallner, K., (1997a).** Bericht der Anstalt für Bienenkunde der Universität Hohenheim, *Allg.Dtsch. Imkerztg.* 31, XV.
- [35] **Bogdanov, S., Kilchenmann, V., Imdorf, A., Fluri, P., (1998b)** Residues in honey after application of thymol against varroa using the Frakno Thymol Frame, *Am. Bee J.* 138, 610–611.
- [36] **Monchanin, C., Drujont, E., Devaud, JM., Lihoreau, M., Barron, A.B., (2021).** Metal pollutants have additive negative effects on honey bee cognition. *J Exp Biol* 224(12):241869.
- [37] **Di Noi, A., Casini, S., Campani, T., Cai, G., Caliani, I., (2021).** Review on sublethal effects of environmental contaminants in honey bees (*Apis mellifera*), knowledge gaps and future perspectives. *Int. J. Environ Res Public Health* 18(4):1863.
- [38] **Mielke, H.W., Laidlaw, M.A.S., Gonzales, C.R., (2011).** Estimation of leaded (Pb) gasoline’s continuing material and health impacts on 90 US urbanized areas. *Environ. Int.* 37, 248–257. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.08.006>
- [39] **O’Connor, D., Hou, D., Ok, Y.S., Lanphear, B.P., (2020).** The effects of iniquitous lead exposure on health. *Nat. Sustain.* 3, 77–79. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-0475-z>
- [40] **Filippelli, G.M., Risch, M., Laidlaw, M.A.S., Nichols, D.E., Crewe, J., (2015).** Geochemical legacies and the future health of cities: a tale of two neurotoxins in urban soils. *Elem. Sci. Anthr.* 3, 000059 <https://doi.org/10.12952/journal.elementa.000059>

- [41] **Devillers, J., Pham-Delègue, M.H., (2002).** Honey Bees: Estimating the Environmental Impact of Chemicals. *Taylor & Francis, Philadelphia, PA, USA*.
- [42] **Celli, G., Maccagnani, B., (2003).** Honey bees as bioindicators of environmental pollution. *Bulletin of Insectology* 56, 137e139.
- [43] **Cozmuta, AM., Bretan, L., Mihaly Cozmuta, L., (2012).** Lead traceability along soil-melliferous flora-bee family-apiary products chain. *J Environ Monit* 14:1622-1630. <https://doi.org/10.1039/c2em30084b>
- [44] **Gliga, O., (2015).** The content of heavy metals in the bees body depending on location area of hives. *Sci Pap Ser Lucr Științifice* 65:169-175.
- [45] **Cronn, RC., (1991).** Determination of cadmium toxicity and the relationship between dose and metallothionein levels in the honey bee, *Apis mellifera*. *Graduate Student Theses, Dissertations, & Professional Papers* 2032. <https://scholarworks.umt.edu/etd/2032>
- [46] **Monchanin, C., Blanc-Brude, A., Drujont, E., Negahi, M.M., Pasquaretta, C., Silvestre, J., Baqué, D., Elger, A., Barron, A.B., Devaud, J.-M., Lihoreau, M., (2021c).** Chronic exposure to trace lead impairs honey bee learning. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 212, 112008. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112008>
- [47] **Li, Z., Qiu, Y., Li, J., Wan, K., Nie, H., Su, S., (2022).** Chronic cadmium exposure induces impaired olfactory learning and altered brain gene expression in honey bees (*Apis mellifera*). *Insects* 13 (11), 988. <https://doi.org/10.3390/insects13110988>
- [48] **Bromenshenk, J.J., Gudatis, J.L., Carlson, S.R., Thomas, J.M., Simmons, M.A., (1991).** Popolazione dynamics of honey bee nucleus colonies exposed to industrial pollutants. *Apidologie* 22 (4), 359-369. <https://doi.org/10.1051/apido:19910401>
- [49] **Kenna, D., Graystock. P., Gill. R.J., (2023).** Toxic temperatures: bee behaviours exhibit divergent pesticide toxicity relationships with warming. *Glob. Chang. Biol.* 00, 1-18. <https://doi.org/10.1111/gcb.16671>
- [50] **Murcia-Morales, M., Heinzen, H., Parrilla-Vázquez, P., del Mar Gómez-Ramos, M., & Fernández-Alba, A. R. (2021).** Presence and distribution of pesticides in apicultural products: A critical appraisal. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 146, Article 116506. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116506>

- [51] **De Brito Sanchez, M.G., (2011).** Taste perception in honey bees. *Chem. Senses* 36 (8), 675–692. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjr040>
- [52] **Burden, C.M., Morgan, M.O., Hladun, K.R., Amdam, G.V., Trumble, J.J., Smith, B.H., (2019).** Acute sublethal exposure to toxic heavy metals alters honey bee (*Apis mellifera*) feeding behavior. *Sci. Rep.* 9 (1), 4253. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40396-x>
- [53] **Monchanin, C., De Brito Sanchez, M.G, Lecouvreux, L., Boidard, O., Méry, G., Silvestre, J., Le Roux, G., Baqué, D., Elger, A., Barron, A.B., Lihoreau, M., Devaud, J.M., (2022).** Honey bees cannot sense harmful concentrations of metal pollutants in food. *Chemosphere* 297, 134089. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134089>
- [54] **Glavan, G., Milivojević, T., Božič, J., Sepčić, K., Drobne, D., (2017).** Feeding preference and sub-chronic effects of ZnO nanomaterials in honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 72 (3), 471–480. <https://doi.org/10.1007/s00244-017-0385-x>
- [55] **Di, N., Zhang, K., Hladun, K.R., Rust, M., Chen, Y.-F., Zhu, Z.-Y., Liu, T.-X., Trumble, J.T., (2020).** Joint effects of cadmium and copper on *Apis mellifera* foragers and larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C: Toxicol. Pharmacol* 237, 108839. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108839>
- [56] **Zarić, NM., Ilijević, K., Stanisavljević, L., Gržetić, I., (2017).** Use of honeybees (*Apis mellifera* L.) as bioindicators for assessment and source appointment of metal pollution. *Environ Sci Pollut Res* 24:25828–25838. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0196-7>
- [57] **Lionetto, M.G., Caricato, R., Calisi, A., Giordano, M.E., Schettino, T., (2013).** Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives. *BioMed Res Int* 2013.
- [58] **Quintavalle, A., (2013).** Voltage-gated calcium channels in honey bees: physiological roles and potential targets for insecticides. *BioSci Master Rev* 2013:1–11.
- [59] **Nikolić, T.V., Kojić, D., Orčić, S., Batinić, D., Vukašinović, E., Blagojević, D.P., Purać, J., (2016).** The impact of sublethal concentrations of Cu, Pb and Cd on honey bee redox status, superoxide dismutase and catalase in laboratory conditions. *Chemosphere* 164:98–105.

- [60] **Nikolić, T.V., Kojić, D., Orčić, S., Batinić, D., Vukašinović, E., Blagojević, D.P., Purać, J., (2019).** Laboratory bioassays on the response of honey bee (*Apis mellifera* L.) glutathione S-transferase and acetylcholinesterase to the oral exposure to copper, cadmium, and lead. *Environ Sci Pollut Res* 26:6890–6897.
- [61] **Hrdina, A., Iatsenko, I., (2022).** The roles of metals in insect–microbe interactions and immunity. *Curr. Opin. Insect. Sci.* 49, 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2021.12.004>
- [62] **Rothman, J.A., Leger, L., Kirkwood, J.S., McFrederick, Q.S., (2019).** Cadmium and selenate exposure affects the honey bee microbiome and metabolome, and bee-associated bacteria show potential for bioaccumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 85 (21), 1–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01411-19>
- [63] **Astolfi, M.L., Conti, M.E., Messi, M., Marconi, E., (2022).** Probiotics as a promising prophylactic tool to reduce levels of toxic or potentially toxic elements in bees. *Chemosphere* 308 (P1), 136261. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136261>
- [64] **Badiou-Bénéteau, A., Benneveau, A., Gélet, F., Delatte, H., Becker, N., Brunet, J.L., Reynaud, B., Belzunces, L.P., (2013).** Honeybee biomarkers as promising tools to monitor environmental quality. *Environ. Int.* 60, 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.002>
- [65] **Gauthier, M., Aras, P., Jumarie, C., Boily, M., (2016).** Low dietary levels of Al, Pb and Cd may affect the non-enzymatic antioxidant capacity in caged honey bees (*Apis mellifera*). *Chemosphere* 144, 848–854. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.057>
- [66] **Salvaggio, A., Pecoraro, R., Scalisi, E.M., Tibullo, D., Lombardo, B.M., Messina, G., Loreto, F., Copat, C., Ferrante, M., Avola, R., D'amante, G., Genovese, C., Raccuia, S.A., Brundo, M.V., (2017).** Morphostructural and immunohistochemical study on the role of metallothionein in the detoxification of heavy metals in *Apis mellifera* L., 1758. *Microsc. Res. Tech.* 80 (11), 1215–1220. <https://doi.org/10.1002/jemt.22919>
- [67] **Purać, J., Nikolić, T.V., Kojić, D., Čelić, A.S., Plavša, J.J., Blagojević, D.P., Petri, E.T., (2019).** Identification of a metallothionein gene in honey bee *Apis mellifera* and its expression profile in response to Cd, Cu and Pb exposure. *Mol. Ecol.* 28 (4), 731–745. <https://doi.org/10.1111/mec.14984>

- [68] **Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006)**. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443(7114):931.
- [69] **Nisbet, C., Güler, A., Ormanci, N., Cenesiz, S., (2018)**. Preventive action of zinc against heavy metals toxicity in honeybee. *Afr. J. Biochem. Res.* 12 (1), 1–6. <https://doi.org/10.5897/AJBR2016.0921>
- [70] **Al Nagggar, Y., Dabour, K., Masry, S., Sadek, A., Naiem, E., Giesy, JP., (2020)**. Sublethal effects of chronic exposure to CdO or PbO nanoparticles or their binary mixture on the honey bee (*Apis mellefera* L.). *Environ Sci Pollut Res* 27:19004-19015.
- [71] **Cunningham, M.M., Tran, L., McKee, C.G., Polo, R.O., Newman, T., Lansing, L., Guarna, M.M., (2022)**. Honey bees as biomonitors of environmental contaminants, pathogens, and climate change. *Ecol Indic* 134:108457.
- [72] **Matin, G., Kargar, N., & Buyukisik, H.B., (2016)**. Bio-monitoring of cadmium, lead, arsenic and mercury in industrial districts of Izmir, Turkey by using honey bees, propolis and pine tree leaves. *Ecological Engineering*, 90, 331–335. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.01.035>
- [73] **Almeida Farias, R., Nogueira Nunes, C., Pércio Quináia, S., (2023)**. Bees reflect better on their ecosystem health than their products. *Volume 30, pages 79617–79626*.
- [74] **Salkova, D., Panayotova-Pencheva, M., (2016)**. Honey bees and their products as indicators of environmental pollution: a review. *Agric Sci Technol* 8:175-182. <https://doi.org/10.15547/ast.2016.03.032>
- [75] **Eskov, E.K., Eskova, M.D., Dubovik, V.A., Vyrodov, I.V., (2015)**. Content of heavy metals in melliferous vegetation, bee bodies, and beekeeping production. *Russ Agric Sci* 41:396-398. <https://doi.org/10.3103/s1068367415050079>
- [76] **Smith, K.E., Weis, D., (2020)**. Evaluating spatiotemporal resolution of trace element concentrations and Pb isotopic compositions of honeybees and hive products as biomonitors for urban metal distribution. *GeoHealth* 4:e2020GH000264. <https://doi.org/10.1029/2020GH000264>
- [77] **Herrero-Latorre, C., Barciela-García, J., García-Martín, S., Pena-Creciente, R.M., (2017)**. The use of honeybees and honey as environmental

bioindicators for metals and radionuclides: a review. *Environ Rev*25:463-480.
<https://doi.org/10.1139/er-2017-0029>

[78] **Bartha, S., Taut, I., Goji, G., et al., (2020).** Heavy metal content in polyfloralhoney and potential health risk. A case study of Copşa Mică, Romania. *Int J Environ Res Public Health* 17:1507. https://doi.org/10.3390/ijerp_h17051507