

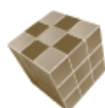


# RAPPORTI ISTISAN 20|6

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

## **Ecotossicologia e salute: approcci metodologici**

a cura di  
L. Mancini, I. Lacchetti, S. Cacioli, M. Carere



AMBIENTE  
E SALUTE



**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Ecotossicologia e salute:  
approcci metodologici**

a cura di  
Laura Mancini, Ines Lacchetti, Silvana Cacioli, Mario Carere  
*Dipartimento Ambiente e Salute*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN**  
**20/6**

Istituto Superiore di Sanità

**Ecotossicologia e salute: approcci metodologici.**

A cura di Laura Mancini, Ines Lacchetti, Silvana Caciolli, Mario Carere  
2020, 45 p. Rapporti ISTISAN 20/6

L'indagine ecotossicologica è riconosciuta a livello internazionale come strumento valido nella prevenzione di effetti avversi negli ecosistemi che possono manifestarsi anche nell'uomo attraverso un'esposizione diretta/indiretta a sostanze chimiche pericolose, inclusi i contaminanti "emergenti" e le miscele. Pertanto l'Istituto Superiore di Sanità ha organizzato due incontri specifici dal titolo "Ecotossicologia e Salute". Il primo finalizzato alla costituzione di una piattaforma di esperti nazionali di settore e individuare nuovi approcci ecotossicologici (1° Meeting, 27 marzo 2018). Il secondo con lo scopo di elaborare linee guida per la salvaguardia dell'ambiente e della salute umana utili al legislatore, attraverso la costituzione di tre gruppi di esperti: sulla normativa, sui metodi ecotossicologici collegati alla salute umana e sui metodi eco-genotossicologici (2° Meeting, 25-26 marzo 2019). In questo rapporto sono riportati alcuni contributi di relatori che hanno concorso a creare il network nazionale.

*Parole chiave:* Ecotossicologia; Contaminanti emergenti; Miscele; Ambiente; Salute Umana

Istituto Superiore di Sanità

**Ecotoxicology and health: methodological approaches.**

Edited by Laura Mancini, Ines Lacchetti, Silvana Caciolli, Mario Carere  
2020, 45 p. Rapporti ISTISAN 20/6 (in Italian)

Ecotoxicology has been accepted internationally as a valid tool in prevention of adverse effects in ecosystems. The toxic effects detected in ecosystems can also occur in humans through direct/indirect exposure to chemical substances, including the "emerging" contaminants and mixtures. Therefore, the Istituto Superiore di Sanità (the National Institute of Health in Italy) organized two specific meetings on ecotoxicology and health. The first one aimed to create a network of national experts for sharing and exchange specific experiences and to identify new eco-toxicological approaches (1<sup>st</sup> Meeting, 27 March 2018). The second one with the aim to elaborate guidelines useful to the policy-makers for the protection of the environment and human health through the establishment of three groups of experts: on legislation, on ecotoxicological methods linked to human health and on ecogenotoxicological methods (2<sup>nd</sup> Meeting, 25-26 March 2019). In this report some contributions by speakers who have contributed to creating a national network are reported.

*Key words:* Ecotoxicology; Emerging Contaminants; Mixture; Environmental; Human Health.

Si ringraziano tutti i partecipanti ai due meeting tra cui numerose persone afferenti alle Agenzie Regionali per la Prevenzione Ambientale (ARPA), all'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), al Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), alle Università oltre al personale degli enti pubblici e privati. Infine si ringraziano tutti i collaboratori tecnici che hanno permesso la realizzazione di questi eventi, e un ringraziamento particolare a Silvia Marchini che con il suo lavoro e passione ha contribuito in tanti anni di servizio ad accrescere l'esperienza e le conoscenze nell'ecotossicologia.

Per informazioni su questo documento scrivere a: [ines.lacchetti@iss.it](mailto:ines.lacchetti@iss.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it)

Citare questo documento come segue:

Mancini L, Lacchetti I, Caciolli S, Carere M (Ed.). *Ecotossicologia e salute: approcci metodologici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2020. (Rapporti ISTISAN 20/6).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti, Manuela Zazzara*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



# INDICE

## **Introduzione**

*Laura Mancini, Ines Lacchetti, Silvana Caciolli, Mario Carere*..... 1

## **Ecotossicologia come strumento di prevenzione e protezione della salute umana: applicazioni e sviluppi normativi**

*Laura Mancini, Mario Carere*..... 3

## **Approcci basati sugli effetti ecotossicologici a tutela della salute umana**

*Ines Lacchetti*..... 7

## **Eco-genotossicologia: il contributo della Società Italiana di Mutagenesi Ambientale e Genomica**

*Antonio Antoccia, Alessandra di Masi* ..... 11

## **Effetti della contaminazione sugli ecosistemi naturali e attività della Society of Environmental Toxicology and Chemistry in Italia**

*Paola Grenni, Anna Barra Caracciolo*..... 14

## **Metodi innovativi di genotossicità negli ecosistemi: una panoramica**

*Renato Baudo* ..... 23

## **Nanomateriali ingegnerizzati ed ecotossicità**

*Giovanni Libralato, Giusy Lofrano, Francesco Aliberti, Marco Guida*..... 28

## **Applicazione di saggi biologici *in vitro* su diverse matrici: l'esperienza dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta**

*Daniela Meloni* ..... 32

## **Approcci ecotossicologici emergenti: dai segnali molecolari alla valutazione del rischio ecologico**

*Francesco Regoli*..... 36

## **Ruolo dei saggi di eco-genotossicità per la protezione dell'ambiente e della salute umana**

*Roberta Meschini, Silvia Filippi, Sara Spognardi, Patrizia Papetti, Dario Angeletti*..... 41



## INTRODUZIONE

Laura Mancini, Ines Lacchetti, Silvana Caciolli, Mario Carere  
*Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Gli effetti rilevati negli ecosistemi (es. genotossici, embriotossici, neurotossici) possono manifestarsi anche nell'uomo attraverso un'esposizione diretta e/o indiretta a sostanze chimiche pericolose inclusi anche i contaminanti cosiddetti "emergenti" e le miscele. La presenza di miscele di contaminanti è ormai la situazione più ricorrente nelle indagini ambientali e lo studio dell'effetto cocktail è un concetto centrale nella prevenzione della salute dell'uomo che risulta esposto a sostanze chimiche da molteplici fonti. Anche se le metodiche analitiche chimiche si stanno sempre più affinando, permettendo di individuare concentrazioni di sostanze chimiche a livelli estremamente bassi il supporto dell'ecotossicologia per una valutazione scientifica appropriata risulta essenziale. L'ecotossicologia e le sue sottodiscipline (l'eco-neurotossicologia e l'eco-genotossicologia) che si perfezionano nei vari ambiti di utilizzo, stanno ottenendo ottimi risultati applicativi e spesso si sono rilevate sentinelle decisive in contaminazioni ambientali non rilevate dai monitoraggi routinari. L'indagine ecotossicologica è riconosciuta a livello internazionale come un valido strumento nella prevenzione di effetti avversi negli ecosistemi.

L'interesse crescente e la consapevolezza del ruolo cruciale dell'ecotossicologia soprattutto nella prevenzione della salute umana, si riscontra anche nelle recenti scelte del governatore che, seppur timidamente, la sta inserendo in diversi contesti legislativi. Sono un esempio i recenti inserimenti nelle norme in materia ambientale per il dragaggio dei sedimenti marini (DM 15 luglio 2016 n.173) e quello per la Valutazione di Impatto Sanitario (VIS) prevista per la presentazione di progetti riguardanti le centrali termiche e altri impianti di combustione con potenza termica superiore a 300 MW (megawatt).

Sulla base di tali motivazioni il 27 marzo 2018 si è tenuto presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) il 1° Meeting "Ecotossicologia e Salute" al fine di creare un network di esperti nazionali per la condivisione e scambio di conoscenze ed esperienze in materia. A conclusione di questo incontro è emersa la necessità di elaborare proposte operative e concrete per la salvaguardia dell'ambiente e della salute umana anche mediante lo sviluppo e individuazione di nuove metodologie ecotossicologiche, che fungessero da base per la realizzazione di linee guida di riferimento per il Legislatore. Con questo obiettivo, durante il 2° Meeting "Ecotossicologia e Salute" (Roma, 25-26 marzo 2019 - ISS) sono stati costituiti tre gruppi di esperti suddivisi in tre tematiche specifiche:

- metodi per l'applicazione nella normativa;
- metodi ecotossicologici collegati alla salute umana;
- metodi eco-genotossicologici.

Questi incontri hanno quindi, tra gli obiettivi, quello di identificare e validare un approccio ecotossicologico a tutela dell'ecosistema attraverso la stesura di documenti condivisi che possano rappresentare un supporto concreto e utile per le decisioni del Legislatore nelle strategie di prevenzione della salute umana e dell'ambiente.

In questo rapporto sono riportati alcuni dei contributi degli esperti che hanno relazionato sul tema "ecotossicologia e salute" durante il 1° meeting e che hanno contribuito a creare il network nazionale in materia. In questi due incontri si è evidenziato come l'evoluzione dello stato degli ecosistemi e le continue pressioni ambientali pongono al centro dell'attenzione la necessità del ripristino e dello sviluppo di strumenti diagnostici utili alla prevenzione della salute umana. In

quest'ottica l'ecotossicologia fornisce un ruolo centrale nel collegamento tra la salute ambientale e la salute umana, rappresentando un valido strumento di prevenzione.

Il Reparto di Ecosistemi e Salute del Dipartimento di Ambiente e Salute dell'Istituto Superiore di Sanità si è attivato concretamente nel far accrescere e favorire la creazione di un network nazionale in modo da mettere in rete tutte le eccellenze del Paese e le conoscenze metodologiche sperimentali sul territorio. Questo rapporto rappresenta quindi un primo contributo per rinsaldare e promuovere la nascita di questo network.



# ECOTOSSICOLOGIA COME STRUMENTO DI PREVENZIONE E PROTEZIONE DELLA SALUTE UMANA: APPLICAZIONI E SVILUPPI NORMATIVI

Laura Mancini, Mario Carere

*Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'approccio ecosistemico alla salute della popolazione si riferisce agli aspetti diagnostici, preventivi e predittivi della gestione degli ecosistemi e indaga le relazioni che li legano alla salute umana. La definizione ecosistemica di salute si rifà alle più recenti definizioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) che la vede non solo come assenza di malattie ma come uno "stato dinamico di benessere fisico, mentale, sociale e spirituale". Considera l'essere umano quindi come parte integrante dell'ecosistema e auspica un rapporto coevolutivo tra uomo e ambiente.

L'uomo può degradare gli ecosistemi con impatti generati su diverse scale spazio-temporali: cambiamenti climatici globali, deposizioni acide, uso del suolo (agricoltura, allevamento, attività forestali), industrie estrattive (miniere, cave, prelievo inerti in alveo), urbanizzazione (scarichi di depurazione, dilavamento suoli impermeabilizzati, ecc.), acquacoltura, eccessivo prelievo delle risorse, uso di farmaci e prodotti per la cura personale, emissioni industriali di vario livello e grado.

Un ecosistema, strutturalmente e funzionalmente efficiente, dovrebbe essere in grado di supportare contemporaneamente la biodiversità, espressa ai vari livelli dell'organizzazione biologica (dai geni agli ecosistemi) e le attività di interesse economico come la pesca e l'acquacoltura che su questa si basano. I citati usi antropici tendono invece a generare pressioni più intense sugli ecosistemi, con esternalità negative più rilevanti. Gli eventi inquinanti indotti dall'uomo, quindi, possono esercitare effetti diversi sulle popolazioni esposte, generando cambiamenti nella struttura della comunità e nel funzionamento degli ecosistemi (Parker *et al.*, 1999, Mancini *et al.*, 2017).

L'evoluzione socio-economica e le conseguenti attività produttive comportano il rilascio e l'immissione nell'ambiente di molteplici contaminanti spesso emergenti e/o genotossici la cui diffusione, interazione ed effetti sulla salute umana sono spesso ignoti o poco conosciuti. I cambiamenti climatici in atto comportano inoltre un aumento di eventi estremi i cui effetti sulla salute umana devono essere identificati e compresi. Come raccomandato negli obiettivi strategici di sviluppo sostenibile delle Nazioni Unite, nel piano di azione europeo ambiente e nell'ambito dell'agenda strategica di ricerca europea (Horizon 2020) è necessario adottare un approccio di prevenzione che si basi sulla conoscenza e lo studio degli ecosistemi nella loro globalità.

L'obiettivo è quindi quello di individuare e promuovere approcci di prevenzione per mitigare i possibili effetti sulla salute delle popolazioni associati a problematiche complesse quali i cambiamenti globali ambientali, l'antropizzazione e gli eventi estremi. Il principale strumento che si intende utilizzare a tale fine è quindi quello dello studio, l'analisi e la valutazione degli effetti e degli impatti sugli ecosistemi.

Negli ultimi decenni l'ecotossicologia è emersa come disciplina che fornisce il quadro teorico e gli strumenti per valutare correttamente tali scenari di esposizione e modelli di distribuzione, abbondanza, diversità (Chapman, 2002). I test ecotossicologici infatti possono comprendere o rappresentare diverse parti degli ecosistemi (Mancini, 2002) e tengono conto del fatto che non siamo esposti non a singoli fattori di rischio, ma a miscele complesse di contaminanti.

A seconda del livello e della durata degli eventi inquinanti, le alterazioni nella struttura della comunità e il funzionamento dell'ecosistema generati dalla presenza di sostanze tossiche possono teoricamente causare differenti risposte:

- eliminazione di specie sensibili dovute a effetti tossici diretti;
- sostituzione di tali specie con quelle meno sensibili dovuta all'assenza di competizione;
- cambiamenti nelle interazioni delle catene trofiche come risultato della diminuzione della predazione e/o del pascolo delle specie sensibili;
- acclimatazione (adattamento fisiologico);
- selezione della tolleranza geneticamente ereditata (adattamento genetico).

Nonostante la maggiore consapevolezza e il numero di studi relativi agli effetti che gli eventi inquinanti esercitano su diversi tipi di ecosistemi, il biomonitoraggio delle interruzioni ecologiche a lungo termine è stato svolto principalmente attraverso indagini sulla biodiversità (Barbour *et al.*, 1999) o saggi eseguiti con comunità sperimentali che utilizzano micro e mesocosmi (Barata *et al.*, 2002; Slijkerman *et al.*, 2004).

Un esempio di approccio in evoluzione è quello della Direttiva Quadro Acque (Direttiva 2000/60/CE) che prevede la classificazione dello stato di qualità dei corpi idrici europei sulla base di programmi di monitoraggio e valutazione dello stato chimico (sostanze prioritarie a livello europeo) e dello stato ecologico (parametri chimico-fisici, ecologici e idromorfologici).

Tale legislazione include però solo una piccola frazione delle sostanze chimiche presenti nell'ambiente. Il Regolamento (CE) 1907/2006 (noto come REACH: *Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals*) ad esempio ha registrato oltre 100.000 sostanze chimiche a cui vanno aggiunti prodotti di trasformazione, metaboliti e anche i processi di degradazione. La maggior parte delle sostanze attualmente in uso non sono incluse quindi nella normativa e gli effetti avversi sono spesso inesplorati sia per ambiente che per l'uomo; infine vi è una scarsa conoscenza dei rischi derivanti dalle miscele (Brack, 2017).

Nell'ambito del gruppo di lavoro "sostanze chimiche" della Direttiva Quadro Acque, l'Italia ha coordinato, insieme alla Svezia, un gruppo di esperti che ha elaborato un rapporto tecnico europeo (Wernersson *et al.*, 2015) sull'applicazione di metodi di monitoraggio basati sugli "effetti" a supporto delle analisi chimiche nei diversi programmi di monitoraggio nei corpi idrici superficiali. Il gruppo di lavoro era composto da 46 esperti provenienti da diversi Stati Membri, da associazioni industriali europee, dal network europeo Norman e da rappresentanti del Centro Ricerche della Commissione Europea. Il rapporto ha raggruppato tali metodi in: saggi di tossicità *in vivo*, *in vitro* e *biomarker*.

Tali metodi possono avere diversi obiettivi, tra i quali:

- fungere da sistemi di allerta in relazione a specifici inquinamenti causati da situazioni emergenziali (es. alluvioni causati dai cambiamenti climatici);
- metodi di screening per poter identificare siti *hotspot* dove la contaminazione è elevata e dove dovrebbero convergere i programmi di monitoraggio chimici;
- rafforzare il link tra stato chimico ed ecologico;
- valutare la qualità degli effluenti e anche delle acque di riutilizzo, sia urbane che industriali;
- valutare la qualità dei sedimenti insieme alle analisi chimiche.

Tali obiettivi rappresentano aspetti fondamentali anche per proteggere la salute umana; la popolazione infatti può essere esposta a inquinanti chimici attraverso l'ingestione di acqua potabile, la balneazione, il consumo di prodotti della pesca contaminati e il consumo di frutta e vegetali irrigati e, quindi, i metodi che possono rilevare ad esempio effetti eco-genotossicologici, eco-neurotossicologici, embriologici, di interferenza endocrina sono altamente raccomandati dalla comunità scientifica.

Per tali motivi l'ecotossicologia si sta evolvendo anche in maniera rapida, includendo l'uso di saggi bioanalitici (ad esempio con colture cellulari o di lievito) per poter rilevare gli effetti delle

sostanze chimiche in alcuni casi anche a concentrazioni più basse dei metodi di rilevanza chimici analitici (Kunz, 2014). Per esempio alcuni saggi di eco-genotossicologia possono rilevare un effetto mutageno/genotossico a concentrazioni non rilevabili dall'analisi chimica.

Attraverso test ecotossicologici moderni si possono identificare e rilevare i *Mode of Action* (MoA) delle sostanze chimiche più rilevanti per ambiente e uomo (es. neurotossicità, genotossicità, cardiotoxicità) in modo da coprire la gran parte degli effetti avversi presente nell'ambiente compresi quelli delle miscele sia complesse sia di sostanze con stesso MoA. È chiaro che per raggiungere tale obiettivo è anche necessario individuare dei criteri di valutazione e dei limiti soglia per poter discriminare lo stato di qualità di un sito.

In tale quadro risultano importanti anche metodi ecologici rispondenti all'inquinamento chimico come ad esempio gli approcci di metagenomica che, attraverso l'analisi di un elevato numero di sequenze, possono far identificare l'inquinante che ha causato la variazione dell'abbondanza e biodiversità di specifici generi o famiglie batteriche.

Un altro esempio importante di applicazione moderna dell'ecotossicologia è quello in ambito VIS (Valutazione di Impatto Sanitario) in cui si deve valutare il rischio per la salute umana connesso alla costruzione ad esempio di centrali termoelettriche o di inceneritori (DM 27/2019). Nell'ambito di tale procedura l'ecotossicologia può fornire un ruolo centrale.

Per esempio nella fase di *scoping*, noti i fattori di pressione preesistenti sul territorio, potrebbe essere valutata la possibilità di effettuare indagini ecotossicologiche *ante-operam*, durante la realizzazione e, in seguito, durante la fase di *monitoring*: ciò può essere utile per valutare il trend degli effetti. L'indagine ecotossicologica per la VIS dovrebbe prevedere una scelta di test appropriata e sito-specifica comprendente saggi generici, almeno su tre livelli trofici, di ecotossicità acuta/cronica e saggi di eco-genotossicità, in quanto gli effetti mutageni/genotossici sono strettamente correlati alla salute umana. La scelta dovrebbe essere effettuata sia sulla base di informazioni riguardanti l'ecosistema in cui verrà realizzata l'opera (ambiente naturale, ambiente costruito, tipologia dei corpi idrici, ecosistemi acquatici o terrestri) sia sulla base della tipologia di ciclo industriale e potenziali inquinanti emessi.

Sulla base dei risultati ottenuti nell'indagine ecotossicologica nella VIS, a titolo esemplificativo, si possono verificare diverse situazioni:

- nessuna presenza di ecotossicità e eco-genotossicità e quindi nessun avviso di allerta per la VIS;
- ecotossicità o eco-genotossicità rilevata: necessità di integrare nell'ambito della VIS le informazioni acquisite o investigare con maggior dettaglio gli inquinanti emessi; in caso di ecotossicità acuta il livello di allerta è maggiore;
- ecotossicità e eco-genotossicità rilevata: fase di massima allerta, necessità di messa a punto/rimodulazione di misure di riduzione del rischio adeguate.

Le valutazioni possono variare in merito alle situazioni specifiche locali e/o sulla base di ulteriori informazioni presenti nel sito.

In conclusione, tenuto conto dei due esempi citati (Direttiva Quadro Acque e VIS), si può affermare che l'ecotossicologia può tornare a svolgere un ruolo importante in un'ottica di prevenzione anche della salute umana garantendo sempre un approccio ecosistemico che considera l'uomo come parte dell'ecosistema. È chiaro che per rafforzare tale approccio saranno necessarie le collaborazioni e sinergie tra più partner, la creazione di network, elaborazione di linee guida e casi studio per poter far crescere tale disciplina e farla diventare fondamentale anche per la salvaguardia della salute umana implementando e migliorando le normative attualmente in vigore.

## Bibliografia

- Barata C, Donald J, Baird Medina M, Albalat A, Soares AMVM. Determining the ecotoxicological mode of action of toxic chemicals in meiobenthic marine organisms: stage-specific short tests with *Tisbe battagliai*. *Marine Ecology process series* 2002;230:183-94.
- Barbour, MT, Gerritsen J, Snyder BD, Stribling JB. *Rapid bioassessment protocols for use in streams and wadeable rivers: periphyton, benthic macroinvertebrate and fish*. Washington (USA) US Environmental Protection Agency; 1999.
- Brack W, Dulio V, Ågerstrand M. Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. *Science of the Total Environment* 2017;576:720-37.
- Carere M, Polesello S, Kase R, Gawlik BM. The emerging contaminants in the context of the EU Water Framework Directive. In: Petrovic M, Sabater S, Elosegi A, Barceló D (Ed.). *Emerging contaminants in river ecosystems*. Berlin: Springer Heidelberg International; 2015. p. 1-19.
- Chapman P. Integrating toxicology and ecology: Putting the 'eco' into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin* 2002;44(1):7-15.
- Ministero della Salute. Decreto Ministeriale del 27 marzo 2019. Linee guida per la valutazione di impatto sanitario (VIS). *Gazzetta ufficiale* 126 del 31/5/2019.
- Europa. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale L 327*, del 22/12/2000.
- Kunz P, Kienle C, Carere M, Homazava N, Kase R. *In vitro* bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J Pharm Biomed Anal* 2015;106:107-15.
- Mancini L, Marcheggiani S, Puccinelli C, et al. Global environmental changes and the impact on human health. *Energia, Ambiente e Innovazione* 2017;3:98-102.
- Mancini L, Zapponi G.A. Section I Health and ecotoxicology. Preface. *Ann Ist Super Sanità* 2002;38(2):109-110.
- Parker IM, Simberloff D, Lonsdale WM, et al. Impact: toward a framework for understanding the ecological effects of invaders. *Biological Invasion* 1999;1:3-19.
- Europa. Regolamento 1907/2006/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio. del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'agenzia europea per le sostanze chimiche. *Gazzetta Ufficiale L 396*, 30/12/2006.
- Slijkerman DM, Baird DJ, Conrad A, Jak RG, Van Straalen NM. Assessing structural and functional plankton responses to carbendazim toxicity. *Environ Toxicol Chem* 2004;23(2):455-62.
- Wernersson AS, Carere M, Maggi C et al. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe* 2015;27(7)1-11.

# APPROCCI BASATI SUGLI EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI A TUTELA DELLA SALUTE UMANA

Ines Lacchetti

Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

I contaminanti emergenti e le miscele di contaminanti scaricate ed emesse quotidianamente da diverse fonti inquinanti diffuse o puntiformi nelle acque superficiali rappresentano un rischio non trascurabile per l'ecosistema e di conseguenza per la salute dell'uomo (Mushtaq *et al.*, 2020). Queste sostanze spesso non sono rilevate nei monitoraggi routinari o perché non sono contemplate nella legislazione ambientale o perché sono presenti a concentrazioni molto basse (es. i farmaci) (OECD, 2019; Santos *et al.*, 2010).

Gli attuali programmi di monitoraggio chimico della WFD (*Water Framework Directive*) dei corpi idrici superficiali, per esempio, si basano esclusivamente su un elenco di sostanze chimiche (sostanze prioritarie, inquinanti specifici del bacino idrografico e *watch-list*) definito attraverso valutazioni di rischio semplificate basate su dati di monitoraggio e modelli di diffusione.

Quando questi composti sono presenti in ambiente come miscele complesse di contaminanti anche con gli stessi "modi di azione", possono determinare effetti additivi o sinergici che impattano con maggior forza sull'ecosistema circostante.

Se si aggiungono poi gli effetti comprovati dei cambiamenti climatici che provocano modificazioni di pH e salinità delle acque (Yuqiang *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2019), il quadro si complica ulteriormente; vengono a essere modificate infatti le principali proprietà chimico-fisiche delle sostanze come per esempio il coefficiente di ripartizione ottanolo acqua (*Kow*) che aumenta la lipofilità della sostanza rendendola più bioaccumulabile dagli organismi.

L'uso di strumenti innovativi che possano aiutare a rilevare e comprendere gli effetti nell'ambiente (*Effect based methods*) è diffusamente raccomandato dalla comunità scientifica (Wernerson *et al.*, 2015). In questo contesto l'uso di metodi ecotossicologici, come i saggi biologici in vivo e *in vitro*, può dare un forte contributo nella prevenzione della salute degli ecosistemi e dell'uomo. Tali saggi possono essere utilizzati sia per valutare gli effetti dell'immissione e l'autorizzazione nel mercato di diversi contaminanti (es. biocidi, pesticidi, farmaci veterinari, solventi), ma anche per valutare lo stato di qualità degli ecosistemi acquatici, terrestri ed in alcuni casi anche aerei.

Uno degli strumenti più promettenti nel comprendere e studiare le modalità di azione e tossicità delle sostanze chimiche e delle loro miscele è rappresentato dal vertebrato *zebrafish* (*Danio rerio*); negli ultimi 20 anni l'uso e l'affermazione di questo organismo-modello sono aumentati esponenzialmente grazie anche ai molteplici vantaggi associati al suo impiego. Nel recente meeting online della SETAC del 2020 (<https://dublin.setac.org/welcome-to-setac-scicon/>) sono state oltre 80 gli studi in cui questo organismo è stato utilizzato per comprendere gli effetti delle sostanze chimiche nell'ambiente.

I risultati ottenuti con *zebrafish*, inoltre, non sono solo paragonabili ad altre specie di vertebrati superiori, ma anche agli esseri umani in relazione alla somiglianza delle risposte fisiologiche in particolare negli stadi embrionali. Il test di tossicità che utilizza embrioni di *zebrafish* (*Fish Embryo Toxicity Acute test* - OECD 236), è l'approccio alternativo più promettente al test acuto classico con il pesce adulto che non è compatibile con la maggior parte della normativa vigente in materia di benessere degli animali (Direttiva 2010/63/UE).

Mediante l'utilizzo degli embrioni di *zebrafish*, inoltre, possono essere misurati simultaneamente diversi *endpoint*, fornendo una descrizione più dettagliata delle modalità di azione e degli effetti di contaminanti quali neurotossicità, cardiotoxicità, embriotossicità, genotossicità, interferenza endocrina.

Da diversi anni il Reparto di Ecosistemi e Salute (EES) dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS) è impegnato nello sviluppo di un approccio *multiendpoint* su embrioni di *zebrafish*, attraverso l'elaborazione e individuazione di nuovi *endpoints*, con lo scopo di ampliare la conoscenza dei differenti *Mode of Action* (MoA) dei principali contaminanti emergenti (Cristiano *et al.* 2020).

Nel reparto sono stati analizzati alcuni campioni di acque superficiali e miscele di diversi contaminanti emergenti preparati in laboratorio per valutare gli effetti neurotossici, cardiotossici, genotossici, teratogeni e comportamentali che gli embrioni possono sviluppare in seguito all'esposizione dei contaminanti singoli o in miscela.

Ai diversi campioni è stato applicato sia il saggio "*Fish Embryo Acute Toxicity* (FET) - OCSE 236" con embrioni di *zebrafish* attraverso il quale sono stati acquisiti dati di letalità attraverso le registrazioni di 4 *endpoint* alla fine delle 96 ore di esposizione: coagulazione dell'embrione, mancato distacco della coda, mancata formazione dei somiti e assenza di battito cardiaco.

Per quanto riguarda la neurotossicità e cardiotoxicità oltre ai dati di tossicità acuta, sono stati valutati differenti effetti sub-letali sugli embrioni esposti, registrati e raccolti durante le diverse fasi del test e fino a 120 ore. I dati acquisiti sulla frequenza dei battiti cardiaci, sulle differenti malformazioni e sui movimenti spontanei della coda degli embrioni sono stati misurati attraverso l'uso di un software specifico che analizza contemporaneamente file video e immagini di diversi embrioni contemporaneamente. In particolare, il movimento spontaneo della coda nelle prime 18/20 ore degli embrioni sta portando a interessanti risultati in merito alla presenza di sostanze neurotossiche nei campioni ambientali. Inoltre per la sua rapidità di risposta, potrebbe essere un ottimo indicatore nei monitoraggi ambientali come strumento di screening.

Il test, detto anche *Analysis of tail coiling activity* (Zindler *et al.*, 2019a, Zindler *et al.*, 2019b) è stato utilizzato dal reparto EES e condotto in piastre a 24 pozzetti. L'acquisizione dei dati è stata ottenuta su 3/5 embrioni/pozzetto contemporaneamente in due tempi di esposizione: a 18 e a 21 ore. Questo periodo infatti corrisponde allo sviluppo del sistema nervoso segnalato dal primo movimento della coda appena distaccata dal sacco vitellino. Il numero e l'intensità dei movimenti della coda degli embrioni esposti sono stati confrontati con quelli misurati su embrioni non esposti discernendo tra i diversi modi di azione delle sostanze neurotossiche più o meno stimolanti. L'analisi di questi effetti è estremamente rilevante per poter comprendere gli impatti che le sostanze neurotossiche esercitano sugli ecosistemi ed indirettamente sull'uomo.

Nel monitoraggio dei corpi idrici dovrebbe essere contemplato anche il rilevamento del potenziale genotossico di contaminanti poiché alcune sostanze chimiche possono manifestare effetti mutageni solo a concentrazioni inferiori a quelle di tossicità acuta. La capacità di rilevare sostanze mutagene rappresenta un importante strumento per la tutela della salute umana, soprattutto a causa della diretta correlazione tra mutazioni genetiche acquisite e lo sviluppo del cancro. Un metodo che può essere considerato ottimo indicatore biologico in tale contesto è il test del Micronucleo sulla pianta di *Vicia faba* (Gustavino *et al.*, 2013). Il metodo è stato applicato dal Reparto Ecosistemi e Salute del Dipartimento di Ambiente e Salute su diverse tipologie di campioni ad esempio su acque reflue industriali (Mancini *et al.*, 2019), dimostrando notevoli vantaggi applicativi rispetto allo stesso test su animali, oltre a risultare un metodo sensibile e affidabile.

La presenza di sostanze mutagene nel campione induce nelle cellule degli apici radicali di *Vicia faba* danni al DNA cromosomico, provocando il non corretto svolgimento del processo mitotico evidenziato dalla presenza di figure anafasiche irregolari o dalla presenza di frammenti di DNA extranucleari (micronuclei). L'incremento significativo della frequenza di

micronuclei o anafasi irregolari nei campioni esposti rispetto ai controlli indica il manifestarsi di effetti genotossici. Il metodo è stato applicato a diverse tipologie di campioni.

Gli esempi descritti in questo articolo evidenziano come siano sempre più necessarie strategie basate sulla ricerca degli effetti delle sostanze chimiche nell'ambiente. Tali effetti possono infatti essere sinergici o essere causati anche da miscele di sostanze chimiche, spesso emergenti. I metodi per rilevare gli effetti sono di tipo biologico e si basano sulla valutazione di effetti ecotossicologici che possono anche essere rilevanti per l'uomo (es. genotossicità e neurotossicità). Nella valutazione dell'immissione nel mercato e nelle autorizzazioni tali metodi sono già obbligatori nelle normative di settore, mentre nei monitoraggi ambientali tali metodi dovrebbero essere implementati supportando le analisi chimiche già previste dalla normativa in materia e garantendo una maggiore protezione e prevenzione al fine di tutelare la salute degli ecosistemi, incluso l'uomo, e per perseguire una corretta strategia di prevenzione per la salute umana.

## Bibliografia

- Cristiano W, Lacchetti I, di Domenico K, Corti M, Mancini L, Carere M. Application of effect-based methods (EBMs) in a river basin: a preliminary study in Central Italy. *Ann Ist Super Sanità* 2020;56(1)114-21.
- Europa. Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea* del 20-10-2010.
- Gustavino B, Caciolli S, Mancini L. *Linea guida del test dei micronuclei in Vicia faba per la valutazione di effetti mutageni in acque dolci e sedimenti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/27).
- Mancini L, Lacchetti I, Caciolli S, Puccinelli C, D'Angelo AM, Marchini S, Giuseppetti R, Pierdominici E, Marcheggiani S, Carere M. Wastewater reuse in the industry. An Eco-genotoxicological approach. *Fresenius Environmental Bulletin* 2019;49-74.
- Mushtaq N, Singh DV, Bhat RA, Dervash MA, Hameed O. Freshwater Contamination: Sources and Hazards to Aquatic Biota. In: Qadri H, Bhat RA, Dar GH, Mehmood MA (eds) *Freshwater pollution dynamics and remediation*. Springer Nature, Singapore, 2020. p. 27–50.
- Organisation for Economic Co-operation Development (OECD). *Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Guidelines for the Testing of Chemicals*. Paris: OECD, 2013;236.
- Organisation for Economic Co-operation Development Paris (OECD). *Pharmaceutical Residues in Freshwater: Hazards and Policy Responses*, OECD Studies on Water. Paris: OECD; 2019.
- Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MC. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 2010;175:45-95.
- Shi W, Han Y, Guo C, Su W, Zhao X, Zha S, Wang Y, Liu G. Ocean acidification increases the accumulation of titanium dioxide nanoparticles (nTiO<sub>2</sub>) in edible bivalve mollusks and poses a potential threat to seafood safety. *Scientific Reports* 2019;9:3516.
- Wernersson AS, Carere M, Maggi C, Tusil P, Soldan P, James A, Sanchez W, Dulio V, Broeg K, Reifferscheid G, Buchinger S, Maas H, Van Der Grinten E, O'Toole S, Ausili A, Manfra L, Marziali L, Polesello S, Lacchetti I, Mancini L, Lilja K, Linderoth M, Lundeberg T, Fjällborg B, Porsbring T, Larsson DG J, Bengtsson-Palme J, Förlin L, Kienle C, Kunz P, Vermeirssen E, Werner I, Robinson CD, Lyons B, Katsiadaki I, Whalley C, den Haan K, Messiaen M, Clayton H, Lettieri T, Carvalho R N, Gawlik B M, Hollert H, Di Paolo C, Brack W, Kammann U, Kase R. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe* 2015;27:7.

- Yuqiang T, Bin X, Guoliang L, Fei L, Zhen W. Effects of climate change on bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in the planktonic food web of a subtropical shallow eutrophic lake in China. *Environmental Pollution* 2017; 223:624-34.
- Zindler F, Beedgen F, Brandt D, Steiner M, Stengel D, Baumann L, Braunbeck T. Analysis of tail coiling activity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos allows for the differentiation of neurotoxicants with different modes of action. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2019a;186.
- Zindler F, Beedgen F, Braunbeck T. Time-course of coiling activity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to ethanol as an endpoint for developmental neurotoxicity (DNT) – Hidden potential and underestimated challenges. *Chemosphere* 2019b;235:12-20.



# ECO-GENOTOSSICOLOGIA: IL CONTRIBUTO DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI MUTAGENESI AMBIENTALE E GENOMICA

Antonio Antocchia, Alessandra di Masi

*Società Italiana di Mutagenesi Ambientale e Genomica e Dipartimento di Scienze, Università "Roma Tre", Roma*

La SIMAG (Società Italiana di Mutagenesi Ambientale e Genomica) si propone di promuovere e favorire studi di mutagenesi di carattere sia teorico che applicativo, dalla ricerca sui meccanismi d'azione degli agenti mutageni agli studi applicativi che riguardano le conseguenze della presenza di agenti mutageni in termini di rischio per l'uomo e di danno per gli ecosistemi. Alcune delle linee di ricerca dei nostri soci sono volte proprio ad aspetti di tipo eco-genotossicologico trattati nell'evento organizzato all'ISS.

La SIMA fu fondata nel luglio del 1991 da alcuni genetisti italiani afferenti a Università ed enti di ricerca che avevano ben compreso la rilevanza scientifica, sanitaria, ambientale, legislativa ed economica della mutagenesi ambientale, assurta a livello internazionale come disciplina tossicologica fondamentale, come la Cancrologia, nella valutazione del rischio chimico. A livello internazionale, la mutagenesi ambientale era già nata da oltre un ventennio, con la fondazione della *Environmental Mutagen Society* (EMS) a Washington (USA) nel 1969 e della *European Environmental Mutagen Society* (EEMS), nel 1970. La fondazione della SIMA avvenne pertanto quando la mutagenesi ambientale si era ormai affermata come disciplina scientifica a sé stante, fondamentale nella valutazione del rischio chimico genetico e cancerogeno e dell'impatto di inquinanti chimici genotossici su gli eco-sistemi, investendo le aree della Sanità pubblica e dell'Ambiente, con tutte le conseguenze legislative derivanti.

La SIMA diventa poi Sezione italiana della EEMS, a sua volta afferente all'*International Association of Environmental Mutagen Societies* (IAEMS, fondata nel 1973) (1), che comprende attualmente 13 sezioni regionali. Da 15 anni la SIMA è anche affiliata, insieme ad altre 13 Società nazionali, alla Federazione Italiana di Scienze della Vita (FISV).

Il 26 febbraio 2018, sulla scia di quanto avvenuto per la Società Internazionale e quella Europea, la SIMA ha cambiato nome in SIMAG, in quanto aspetti della genomica in senso lato acquisiscono un significato sempre più ampio, abbracciando non solo lo studio del DNA (genoma in senso stretto), dell'mRNA (transcriptoma) e delle proteine (proteoma), ma anche dei meccanismi di modulazione epigenetica al livello di microRNA (mirnoma), modificazione degli istoni, ecc.

Seppure sia difficile raggruppare in poche righe i vari filoni di ricerca seguiti dai nostri soci, è possibile comunque fare una suddivisione di massima tra linee di ricerca volte allo studio di aspetti meccanicistici di base e linee di ricerca con un taglio di tipo più applicativo. Tra le prime compaiono sicuramente quelle volte alla comprensione dei meccanismi di stabilità genomica, riparazione del DNA, epidemiologia molecolare, polimorfismi genetici e suscettibilità a patologie.

Sin dai primi anni dalla sua fondazione, in seno alla società si sono sviluppate importanti competenze volte allo studio dell'impatto genotossico di inquinanti ambientali in diverse matrici (aria, acqua, suolo) e in diversi modelli sperimentali. In tal senso, sono attivi diversi progetti di ricerca, con risvolti di interesse nel campo della eco-genotossicità, nei quali, utilizzando crostacei, molluschi e pesci come bioindicatori, viene studiato l'impatto ambientale di inquinanti mediante

l'utilizzo di saggi specifici per la determinazione del danno al DNA (quale test del micronucleo e saggio della Cometa) e analisi della modulazione genica mediante studi di trascrittomica.

In base alle attività di ricerca, si distinguono i gruppi di Genova, Parma, Brescia, Pisa e Padova.

- Il gruppo di Genova che è coordinato dalla dottoressa Claudia Bolognesi. In tale contesto l'attività di ricerca di laboratorio è stata focalizzata sullo studio e la validazione di biomarcatori di danno genetico nello studio dell'inquinamento ambientale. Nell'ambito dello sviluppo di metodologie per l'identificazione di agenti cancerogeni nell'ambiente marino sono stati attuati studi di validazione e di intercalibrazione di biomarcatori di genotossicità negli animali acquatici, stanziali e stabulati. Test di danno al DNA e danno cromosomico, come frequenza di micronuclei, sono stati messi a punto in diversi tessuti di bioindicatori, quali molluschi bivalvi (mitili ed ostriche) e pesci. Gli studi condotti nell'ambito di programmi nazionali ed internazionali hanno permesso di definire il livello di inquinamento di diverse aree scelte lungo le coste del Mediterraneo occidentale. Il laboratorio ha collaborato al biomonitoraggio dell'area interessata dall'affondamento della petroliera Haven al largo di Arenzano (Liguria) nell'ambito del programma di bonifica organizzato dall'ARPA Liguria e finanziato dal Ministero dell'Ambiente, inoltre ha coordinato il biomonitoraggio del sito di interesse nazionale Cogoletto-Stoppani associato al programma di bonifica su incarico del Commissario Delegato della Presidenza del Consiglio dei Ministri – Dipartimento della Protezione Civile.
- Il gruppo di Parma coordinato dalla dott.ssa Anna Maria Buschini afferente al laboratorio di genotossicologia umana, microbica e vegetale dell'Università di Parma. La struttura si occupa della caratterizzazione di matrici ambientali (acqua, aria, suolo) mediante l'analisi di biomarcatori tossicologici, geno-tossicologici e epi-tossicologici in bioindicatori animali e vegetali. Nello specifico, il gruppo ha esperienza con il *Comet Assay* e metodi di analisi dell'espressione genica in *Daphnia magna*, applicati nel monitoraggio degli ambienti acquatici.
- Il gruppo di Brescia coordinato dalla dott.ssa Donatella Feretti afferente al laboratorio dell'Università di Brescia, Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche, Scienze Radiologiche e Sanità Pubblica. Il gruppo ha sviluppato modelli integrati di studio per la tutela della salute e la prevenzione negli ambienti di vita e di lavoro, seguendo una linea di ricerca che consiste nello studio degli effetti mutageni di matrici ambientali (aria, acqua, suolo) e di prodotti che possono diffondere nell'ambiente (alimenti, farmaci, resine odontoiatriche, detersivi, scorie di acciaieria, aggregati di cava, nuove molecole, ecc.) mediante test di mutagenesi a breve termine su diversi tipi cellulari animali e vegetali.
- Il gruppo di Pisa coordinato dalla dott.ssa Giada Frenzilli afferente al laboratorio dell'Università di Pisa, Dipartimento di Medicina Clinica e sperimentale, Sezione Biologia e Genetica. Il *team* utilizza modelli sperimentali rappresentati da pesci marini e molluschi con lo scopo di valutare gli effetti genotossici dovuti all'esposizione combinata a più contaminanti, come la nanoparticella, biossido di titanio e inquinanti ambientali "classici", quali la diossina e il cadmio; inoltre, ha condotto indagini *in vitro* per studiare le risposte cellulari alla contaminazione ambientale su linee cellulari di tursiope e valutare la suscettibilità di specie a rischio agli effetti genotossici di contaminanti ambientali classici ed emergenti.
- Il gruppo di Padova coordinato dalla dott.ssa Paola Venier afferente al laboratorio dell'Università di Padova, Dipartimento di Biologia, che ha una lunga esperienza nell'applicazione dei molluschi per gli studi di genotossicità sull'ambiente acquatico della laguna di Venezia, e che ha rivolto il suo interesse verso gli studi di trascrittomica al fine di identificare le differenze tra i vari organismi nella risposta agli agenti tossici e mutageni. Inoltre, il gruppo segue una linea di ricerca di frontiera nell'ambito dell'ecotossicologia,

rappresentata dallo studio delle complesse interazioni tra l'ospite e i microorganismi simbiotici, opportunisti o patogeni.

## **Bibliografia**

1. De Marini D, De Flora S. What's in a name? The argument for changing the name of IAEMS and its affiliated societies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2010;705(3):201-4.

# **EFFETTI DELLA CONTAMINAZIONE SUGLI ECOSISTEMI NATURALI E ATTIVITÀ DELLA SOCIETY OF ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY IN ITALIA**

Paola Grenni, Anna Barra Caracciolo

*Istituto di Ricerca sulle Acque – Consiglio Nazionale delle Ricerche e SETAC Italian Language Branch, Roma*

## **Introduzione**

Il riconoscimento dell'importanza degli ecosistemi naturali e delle loro molteplici funzioni che generano diversi beni e servizi per la popolazione umana ha, negli ultimi anni, ottenuto un crescente consenso, anche al fine di integrare tali informazioni nelle decisioni per la gestione delle risorse naturali e nella pianificazione del territorio. I servizi e i beni ecosistemici sono riconducibili a quattro principali categorie funzionali quali regolazione, produzione, habitat e informazione (Battaglia & Barra Caracciolo, 2012). Sebbene la maggior parte della ricerca sulla biodiversità e sulla conservazione degli ecosistemi rivolge l'attenzione verso i grandi organismi eucarioti, è importante riconoscere che molti servizi ecosistemici insostituibili sono forniti dalle comunità microbiche naturali. Le popolazioni microbiche, e in particolare i batteri naturalmente presenti in tutti gli ambienti, grazie alla loro abbondanza e diffusione, al rapido tasso di crescita e alla loro versatilità funzionale, hanno grandi capacità omeostatiche nei confronti dei disturbi ambientali e in particolare della presenza di contaminanti. Infatti, i microrganismi hanno un ruolo chiave non solo nella decomposizione della sostanza organica e riciclo dei nutrienti, ma anche nella rimozione dei contaminanti organici dagli ecosistemi e sono gli unici organismi in grado di effettuare la loro completa mineralizzazione. Il mantenimento della qualità dell'acqua e del suolo attraverso il riciclo dei nutrienti, la biodegradazione e rimozione dei contaminanti è, dunque, riconosciuto come un servizio ecosistemico essenziale di regolazione, fornito principalmente dalle comunità microbiche naturali.

Gli ecosistemi sono, dunque, soggetti a contaminazione multipla sia di tipo diffuso che cronico. Alcuni contaminanti sono normati e vengono monitorati (es. pesticidi, policlorobifenili, idrocarburi policiclici aromatici, ecc.), ma per altri (sostanze emergenti), seppur ne è stata riconosciuta la presenza diffusa nell'ambiente, non sono ancora state stabilite le concentrazioni di effetto e i limiti di concentrazione. Un esempio sono i farmaci, molecole altamente reattive anche a basse concentrazioni, la cui presenza può costituire un rischio per la salute dell'uomo e degli ecosistemi per i loro possibili effetti sub-letali.

Gli ecosistemi possono rispondere alla contaminazione attraverso le capacità omeostatiche delle comunità microbiche naturali che possono rimuovere le molecole tossiche attraverso processi metabolici e co-metabolici biodegradativi.

Gli effetti della contaminazione sulle comunità microbiche naturali possono essere essenzialmente di due tipi:

- effetto negativo diretto con la scomparsa/inibizione di alcune popolazioni microbiche (taxa sensibili) che forniscono funzioni ecosistemiche essenziali (es. riciclo dei nutrienti, decomposizione sostanza organica, produzione nel caso degli organismi autotrofi) con conseguente perdita di servizi ecosistemici;

- un contaminante può agire come forza selettiva su popolazioni batteriche (taxa indicatori di recupero) che si adattano al contaminante e, in alcuni casi, attraverso il metabolismo o il co-metabolismo, lo rimuovono. Questa capacità riflette la funzione omeostatica delle comunità microbiche naturali e la loro attività di Regolazione della qualità ecosistemica.

La presenza di tali taxa può dunque essere considerata indicatrice di recupero, fornendo uno strumento di indagine utile a supportare i controlli analitici di routine. Il biorecupero dalla contaminazione è possibile, comunque, nei limiti in cui la tossicità del contaminante non comprometta l'attività microbica (Artigas *et al.*, 2012).

In ultima analisi, dunque, lo studio delle comunità microbiche naturali permette di definire lo stato di qualità, la capacità potenziale di recupero naturale di un ecosistema e gli effetti della contaminazione multipla.

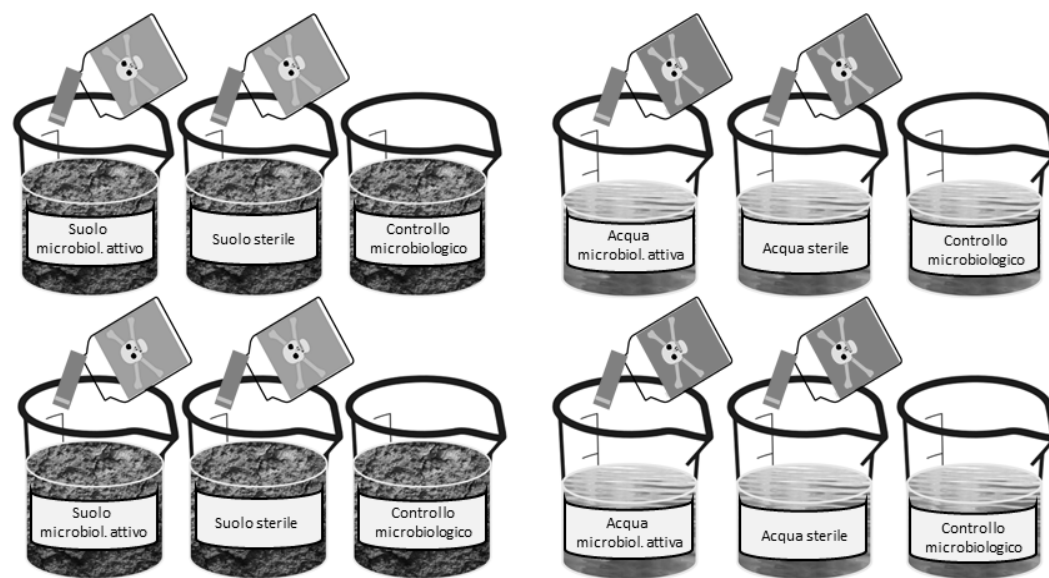
## Capacità di recupero di suoli e acque contaminate mediante microcosmi/mesocosmi in condizioni sito-specifiche

Il destino di un contaminante nel suolo o nell'acqua dipende dalle sue proprietà fisico-chimiche intrinseche (es. solubilità in acqua, lipofilia, pressione di vapore), da diversi fattori ambientali sito-specifici (PH, nutrienti, carbonio organico, ecc.), comprese anche le condizioni climatiche locali, ma soprattutto dalla presenza di microrganismi che possiedono la capacità di biodegradarlo. La presenza di una comunità microbica naturale è infatti un prerequisito necessario per una risposta efficace alla presenza di diverse sostanze chimiche che possono contaminare un ecosistema per la loro degradazione.

La stima della degradazione biotica e abiotica, nonché la valutazione degli effetti dei contaminanti sulle comunità microbiche, può essere valutata attraverso l'approccio ecologico dello studio in microcosmi o mesocosmi. Essi sono ecosistemi modello in cui una porzione dell'ambiente naturale viene circoscritta e studiata; contengono campioni ambientali indisturbati (terreno, di acqua o di sedimento) in cui le comunità microbiche naturali vengono mantenute in condizioni controllate (es. temperatura, umidità), ma che rispecchiano quelle naturali (Barra Caracciolo *et al.*, 2013). L'utilizzo di microcosmi e mesocosmi mira a risolvere i problemi della variabilità e della riproducibilità, e offre un elevato livello di precisione per studiare la degradazione di un contaminante e i suoi effetti su alcune funzioni dell'ecosistema. Nello specifico, ad esempio, vengono confrontate la concentrazione residuale del composto parentale nei microcosmi microbiologicamente attivi con quella di quelli sterilizzati (Figura 1). Viene, inoltre, calcolato il tempo di scomparsa del 50% della concentrazione iniziale del composto parentale (*Degradation half-life Time*,  $DT_{50}$ ), dando una stima della persistenza del composto studiato; se la degradazione nei microcosmi sterilizzati non avviene o è limitata, viene dimostrato il ruolo fondamentale della comunità microbica nella trasformazione del contaminante stesso. Al fine di valutare se la presenza del contaminante ha degli effetti (es. incremento/decremento di alcuni gruppi rispetto ad altri) sulle popolazioni microbiche naturali, viene studiata l'abbondanza microbica e la composizione dei principali gruppi filogenetici presenti (biodiversità) nei microcosmi trattati e confrontata con quella di microcosmi di controllo non trattati (controlli microbiologici).

Sono stati effettuati numerosi esperimenti di laboratorio di biodegradazione con diversi xenobiotici, da soli o in co-presenza con altri contaminanti (es. un fertilizzante) e/o ammendanti organici (es. residui di legno) per valutare se la biodegradazione poteva essere influenzata dalla loro presenza. Tra i contaminanti studiati vi sono sia quelli già compresi nella normativa (es.

insetticidi carbammati: aldicarb, carbofuran; erbicidi triazinici: atrazina, terbutilazina, simazina; erbicidi fenilureici: diuron, linuron, metolachlor), che emergenti (antivirale tamiflu, antinfiammatorio non steroideo naprossene, regolatore lipidico gemfibrozil, antibiotici sulfametossazolo e ciprofloxacina), nonché composti organici persistenti (policlorobifenili, PCB; Diclorodifenildicloroetilene, DDE).



**Figura 1. Esempio schematico di sperimentazione in microcosmi di suolo e acqua.**

I principali risultati di diversi esperimenti in microcosmo relativi allo studio della biodegradazione di pesticidi con i rispettivi valori di  $DT_{50}$  (tempo di degradazione della concentrazione iniziale del composto studiato) e abbondanza microbica sono riportati in Barra Caracciolo *et al.*, 2013. I principali risultati, invece, relativi allo studio della biodegradazione di composti emergenti (farmaci e antibiotici), con i rispettivi valori di  $DT_{50}$  e abbondanza microbica sono riportati in diverse recenti pubblicazioni (es. Accinelli *et al.*, 2007; Grenni *et al.*, 2014, 2018; Patrolecco *et al.*, 2018; Barra Caracciolo *et al.*, 2018).

A parità di concentrazioni applicate, le condizioni abiotiche (presenza ad esempio di luce UV, co-presenza di altri contaminanti), ma soprattutto quelle biotiche (presenza/assenza della comunità microbica naturale e sua abbondanza) influenzano i tassi degradativi delle sostanze studiate. Infatti, nei tempi sperimentali considerati, la persistenza delle molecole è risultata sempre maggiore in assenza della comunità microbica naturale.

In tutti gli studi finora effettuati (Barra Caracciolo *et al.*, 2005a; Barra Caracciolo *et al.*, 2005b; Grenni *et al.*, 2012), dunque, è stato dimostrato il ruolo fondamentale delle comunità microbiche nella degradazione di tutte le sostanze chimiche studiate ed è stata stabilita una relazione tra la degradazione e il ruolo delle comunità microbiche naturali, dimostrando anche l'idoneità dell'approccio della sperimentazione in microcosmo per riprodurre in laboratorio scenari di esposizione ambientali realistici. Attraverso tecniche molecolari, è anche stato dimostrato l'incremento di alcune popolazioni microbiche associabili alla degradazione di alcuni contaminanti (vedi ad esempio Barra Caracciolo *et al.*, 2013; 2018; Grenni *et al.*, 2009a e 2009b; 2013; 2014; 2018a; Volpe *et al.*, 2017; Ancona *et al.*, 2017; Maturro *et al.*, 2016; Patrolecco *et al.*, 2018; Di Lenola *et al.*, 2018); in alcuni casi sono state isolate specie batteriche responsabili

della biodegradazione al fine di un loro possibile utilizzo interventi di biorimedio (Martín *et al.*, 2008; Barra Caracciolo *et al.*, 2010; Grenni *et al.*, 2009b). Infine, è stata evidenziata un'influenza sui tassi di degradazione dovuto alla co-presenza di più contaminanti o a fattori ambientali sito-specifici.

Un particolare rilievo hanno attualmente le problematiche legate alla contaminazione ambientale da antibiotici (Grenni *et al.*, 2018b); questi ultimi, infatti, essendo volti all'eliminazione dei batteri, anche in quantità molto basse, possono avere effetti negativi anche sulle comunità microbiche naturali delle acque e del terreno, coinvolte nel mantenimento della qualità ambientale (Patrolecco *et al.*, 2018).

Lo studio dei microrganismi e la possibilità di sfruttare le loro capacità naturali di recupero è alla base delle strategie di biorimedio. Quando viene effettuato in presenza di una o più piante si parla di biorimedio fitoassistito, di fitorimedio bioassistito o pianta assistito. Tale tecnologia sfrutta l'azione sinergica che si instaura nella rizosfera tra apparato radicale delle piante e microrganismi (batteri e funghi) per rimuovere, trasformare o contenere sostanze tossiche presenti nei suoli, sedimenti, acque.

Nel caso dei contaminanti organici persistenti (PCB, DDE) il biorimedio fitoassistito è stato testato sia in microcosmi che in esperimenti in campo; in quest'ultimo caso il biorimedio fitoassistito si è dimostrato efficace nel rimuovere i PCB e migliorare la qualità del suolo attraverso l'utilizzo della specie vegetale *Medicago sativa* (Di Lenola *et al.*, 2018), e della specie arborea *Populus* in un'area sperimentale multi-contaminata sia da metalli pesanti che PCB (Ancona *et al.*, 2014; 2017; 2019; Barra Carracciolo, 2018c). Questa attività è stata svolta collaborazione con la sede di Bari dell'Istituto di Ricerca Sulle Acque - Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR).

## Effetti ecotossicologici dei contaminanti in matrici ambientali: il caso delle terre e rocce da scavo

Per effettuare lo scavo meccanizzato di gallerie con la cosiddetta TBM-EPB (*Tunnel Boring Machine, Earth Pressure Balance*), il terreno deve essere condizionato con prodotti commerciali lubrificanti. Si tratta di additivi schiumogeni e polimeri scelti in funzione delle caratteristiche specifiche dei terreni da scavare. Il loro utilizzo permette sia il sostegno del fronte di avanzamento dello scavo, sia un trasporto agevole e idoneo del terreno scavato (terre e rocce da scavo) attraverso la coclea e il nastro trasportatore fino al sito di deposito temporaneo.

Sebbene le terre e rocce da scavo rientrino nel tema delle bonifiche e dei rifiuti del Codice dell'ambiente (DL.vo 152/2006), la gestione delle terre e rocce da scavo attualmente non è ancora chiara, nonostante la normativa sia stata oggetto di modifiche legislative (Legge 71/2013 di conversione con modifiche del DL 43/2013 cd. "Expo 2015"; DL 69/2013 cd. "decreto del fare"; DM 161/2012) e sia uscito nel 2017 il nuovo decreto riguardante la gestione delle terre e rocce da scavo (DPR 120/2017).

Tuttavia la normativa ambientale non riporta i limiti tabellari (Concentrazioni Soglia di Contaminazione, CSC) da rispettare per tutte le sostanze potenzialmente presenti nei terreni scavati al fine di classificarli come sottoprodotto\* e poterli così riutilizzare, ad esempio, come

---

\* Si deve considerare che le terre e rocce da scavo, per poter essere utilizzate come sottoprodotto (con un notevole vantaggio per l'ambiente e il paesaggio), devono essere caratterizzate chimicamente per verificare che la concentrazione di determinate sostanze sia al di sotto di specifici valori (Art. 184 DL.vo 152/2006; Concentrazioni Soglia di Contaminazione - CSC, Colonne A-B, Tab. 1, All. 5, parte IV DL.vo 152/2006). Se il materiale scavato non avesse idonee caratteristiche per il riutilizzo (es. presenza di

materiale di riempimento di cave, la realizzazione di sottofondi e rilevati stradali e ferroviari ecc. In particolare non vengono riportati nella normativa i limiti nel terreno o in estratti acquosi per i tensioattivi anionici, che sono i componenti principali dei prodotti schiumogeni più comunemente venduti e utilizzati specialmente a livello nazionale. Pertanto, anche in questo caso ci si pone il problema della loro biodegradabilità una volta miscelate alle terre.

La problematica si è posta in quanto ingenti quantità di prodotti commerciali (additivi schiumogeni e polimeri per il condizionamento del terreno) che contengono glicoli, polimeri naturali e tensioattivi vengono utilizzati nello scavo meccanizzato con TBM. Tali sostanze, benché dichiarate biodegradabili dal produttore (per la loro immissione in commercio sono state infatti testate secondo normative vigenti con test standard OECD), una volta miscelate alle terre e rocce possono avere tempi di degradazione differenti. La persistenza di queste sostanze dipenderà in primo luogo dalla presenza di comunità microbiche in grado di degradarle e, in secondo luogo dalle condizioni a contorno abiotiche quali la tessitura del terreno, la temperatura, il contenuto d'acqua, il pH ecc., fattori che regolano l'attività biodegradativa. La rilevanza dal punto di vista ambientale risiede pertanto nella concentrazione residuale di tali sostanze nel materiale scavato, nella loro concentrazione potenziale di effetto ecotossicologico sugli organismi terrestri e acquatici e sulla destinazione di uso di tali terreni.

Gli effetti ecotossicologici di tutte le sostanze contenute nei prodotti commerciali sono poco conosciuti e solo per alcune di esse sono note le concentrazioni di effetto. È quindi importante valutare la possibilità di poter riutilizzare le ingenti quantità di terre e rocce prodotte durante la realizzazione di opere ingegneristiche ed escludere, attraverso un approccio scientifico ecologico, che vi siano potenziali effetti avversi sugli ecosistemi.

Un team interdisciplinare di ricercatori dell'IRSA-CNR, in collaborazione con l'ISS (Istituto Superiore di Sanità) e l'università di Milano-Bicocca, sta svolgendo da diversi anni un'attività di ricerca finalizzata a verificare la persistenza e l'eventuale impatto sull'ambiente delle principali sostanze contenute in alcuni prodotti commerciali utilizzati come agenti schiumogeni negli scavi di gallerie di grandi opere ingegneristiche di autostrade e ferrovie. Il fine ultimo è la qualificazione delle terre e rocce da scavo da un punto di vista ambientale. Tale attività sono state svolte anche in collaborazione con altri istituti o enti per l'esecuzione di alcuni test ecotossicologici (sezione di Brugherio dell'IRSA: test algale *Pseudokirchneriella subcapitata*; IBAF-CNR: test germinazione e accrescimento *Lepidum sativum*; IMC-CNR: test batterio luminescente *Vibrio fischeri*; ISS: test *Daphnia magna*, test su embrione di pesce *Danio rerio*; Università Bicocca: test su lombrico *Eseinia foetida*).

In tutti gli studi effettuati è stato seguito l'approccio ecologico sito-specifico per la valutazione dell'eco-compatibilità delle terre e rocce da scavo. In particolare i principali aspetti presi in considerazione sono:

- *caratteristiche ecotossicologiche* intrinseche di ogni prodotto commerciale (che dipendono dai componenti principali in essi contenuti e dalle loro quantità); a tal proposito, ad esempio, ci sono differenti prodotti in commercio che contengono la stessa sostanza principale (es. il tensioattivo anionico sodio lauril eter solfato, SLES) in differenti concentrazioni (5-50%) e con differenti componenti minoritari e per questa ragione mostrano una tossicità intrinseca differente.

---

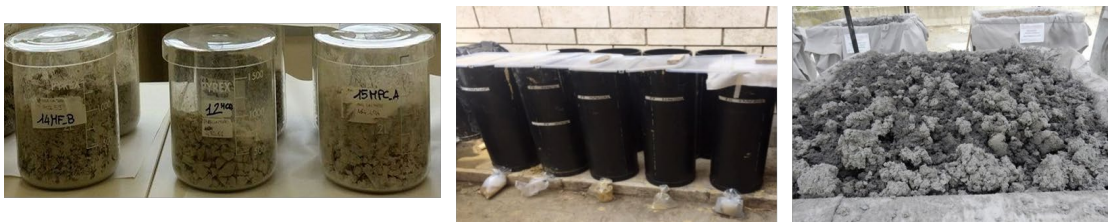
sostanze inquinanti superiori alle CSC), deve essere considerato rifiuto; il materiale potrà, in tal caso, seguire due strade: quella del recupero a fini ambientali (rispettando la disciplina sui rifiuti seguendo i processi tipici delle bonifiche dei terreni con un loro possibile trattamento al fine di eliminare l'inquinante fino a valori inferiori alle CSC, e quindi consentire il riuso), oppure quella di smaltimento in impianto di discarica controllata, con costi elevati e occupazione di elevate superfici di suolo.



- *concentrazione delle sostanze* che compongono il prodotto commerciale che si ritrovano nel terreno, che dipende dalle quantità di utilizzo del prodotto –TR, treatment ratio, L/m<sup>3</sup> terreno- e dalla loro biodegradabilità;
- *sito di destinazione del materiale* e i *possibili scenari di esposizione* per verificare i possibili contatti del materiale con il terreno o con acque superficiali o sotterranee).

Nell'utilizzo del terreno come sottoprodotto, si deve tenere conto dei possibili scenari di contaminazione non solo del comparto terrestre, ma eventualmente di quello acquatico se in relazione con quello terrestre.

Sono state effettuate numerose sperimentazioni sia di laboratorio (microcosmi) che in campo (mesocosmi) finalizzate a verificare la biodegradabilità e l'eventuale impatto sull'ambiente delle principali sostanze contenute nei prodotti commerciali utilizzati come agenti lubrificanti nelle operazioni di scavo meccanizzato del terreno (Figura 2).



**Figura 2. Microcosmi e mesocosmi sperimentali in laboratorio e in campo allestiti per valutare la degradazione dei componenti principali dei prodotti schiumogeni utilizzati negli scavi con TBM, effettuati con terreni provenienti direttamente dal sito di scavo**

Se il tensioattivo anionico degrada fino a raggiungere i valori di compatibilità ambientale (concentrazione al di sotto dei limiti di rilevabilità o concentrazioni di non effetto per gli organismi considerati nei test ecotossicologici), possiamo considerare le terre e rocce da scavo un sottoprodotto. I test vanno effettuati a diversi tempi dal condizionamento del terreno e selezionando organismi test del comparto terrestre o acquatico in funzione del sito di destinazione delle terre e rocce scavate (Grenni *et al.*, 2018c). Tanto minore sarà la persistenza della sostanza in esame, tanto più bassa la probabilità che possa indurre effetti avversi sull'ambiente. Gli studi sperimentali effettuati nei diversi casi di studio hanno costituito le basi per la stesura di "Protocolli di caratterizzazione delle terre e rocce da scavo in corso d'opera" (Grenni *et al.*, 2019).

## **Attività della *Society of Environmental Toxicology and Chemistry - Italian Language Branch***

Una buona gestione delle sostanze chimiche per limitare i rischi per la salute umana e per l'ambiente richiede un confronto tra chi le produce (industria), chi ne studia gli effetti sull'ambiente (ricerca) e chi ne regola l'uso (*governance*). In questo ambito si inserisce la *Italian Language Branch* della *Society of Environmental Toxicology and Chemistry* (SETAC), organizzazione multidisciplinare no-profit a livello mondiale che, fin dal 1979, costituisce un punto di incontro/network dove scienziati, manager e altri professionisti scambiano informazioni e idee sullo studio, analisi e la soluzione di problemi ambientali, la gestione e la regolazione delle risorse naturali, la ricerca e sviluppo e educazione ambientale. È formata da quasi 6000 iscritti e istituzioni da circa 100 Paesi.

I principi fondamentali di SETAC sono:

- un approccio multidisciplinare alla risoluzione dei problemi ambientali;
- un equilibrio multi-settoriale fra mondo accademico, aziende private, governi e settore non-profit;
- una scienza basata su risultati obiettivi.

La SETAC è sempre presente all'interno di importanti iniziative globali, come l'approccio strategico alla gestione internazionale delle sostanze chimiche, e collabora con il programma delle Nazioni Unite per l'ambiente e l'Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione (ISO). L'iniziativa *Life Cycle* UNEP/SETAC, di grande successo e visibilità, ha condotto a un approfondimento dei rapporti con l'UNEP, tanto che attualmente la SETAC collabora con la *Global Environmental Facility*. La SETAC ha un occhio particolare per gli studenti, che possono sfruttare diverse opportunità professionali, di *mentoring* e di *leadership*, nonché la possibilità di *networking* e apprendimento, tarate sulle loro esigenze. Per i soci studenti sono a disposizione diverse possibilità di supporto ai viaggi in occasione degli eventi SETAC, alle presentazioni, alle pubblicazioni nonché sono messi a disposizione dalla SETAC molti premi (es migliore pubblicazione scientifica dell'anno). Le cinque unità geografiche della SETAC (Africa, Asia Pacifico, Europa, America latina e Nord America), assieme alle *Regional Branches* (sedi regionali), offrono programmi scientifici all'avanguardia grazie anche alla grande partecipazione ai meeting e workshop.

L'*Italian Language Branch* (<https://italianbranch.setac.org>) è attiva da diversi anni nel nostro Paese, organizzando e promuovendo incontri, corsi nazionali e internazionali (vedi ad esempio Grenni & Barra Caracciolo, 2016).

L'evento di grande rilievo organizzato nel 2018 è stato il 28° meeting europeo della SETAC a Roma, che si è svolto nel nuovissimo centro convegni La Nuvola all'EUR e ha avuto come tema principale *Responsible and Innovative Research for Environmental Quality*.

L'evento ha richiamato circa 2700 partecipanti provenienti da più di 60 Paesi localizzati in tutti i continenti, con scienziati e rappresentanti dell'industria e dei governi di tutto il mondo dei settori dell'ecotossicologia, della tossicologia umana, della valutazione del rischio, dell'esposizione ad agenti chimici, dell'analisi del ciclo di vita dei prodotti (*Life Cycle Assessment*, LCA) e di altri temi strettamente connessi alle politiche ambientali.

L'evento è stata un'occasione di scambio a livello scientifico internazionale oltre che un'importante vetrina per le innovazioni industriali volte a migliorare la sostenibilità dei modelli produttivi e la qualità dell'ambiente.

Il centro convegni in tale occasione è diventato una vera e propria "cittadina internazionale della scienza" dove sono stati illustrati più di 2.500 contributi. Le sessioni principali (*tracks*)\*\* hanno compreso argomenti specifici della chimica ed ecotossicologia. Le sessioni scientifiche (88 in totale, <https://globe.setac.org/setac-rome-session-summaries>) hanno riguardato le problematiche connesse alla contaminazione ambientale, le tecnologie più innovative di valutazione degli effetti, nonché la gestione e regolamentazione delle sostanze chimiche e dei materiali di sintesi. Tra gli argomenti trattati, sono stati di particolare rilievo la contaminazione ambientale dei farmaci, la resistenza agli antibiotici, la presenza nell'ambiente di sostanze chimiche con effetti di distruttori endocrini e cancerogeni, le fioriture algali tossiche, la gestione

---

\*\*titoli delle principali sessioni sono: Ecotoxicology and human toxicology: from molecules to organisms, from omics to in vivo; Ecotoxicology becomes stress ecology: from populations to ecosystems and landscapes; Environmental chemistry and exposure assessment: analysis, monitoring, fate and modelling; Ecological risk assessment and human health risk assessment of chemicals, mixtures and stressors and risk mitigation strategies; Life cycle assessment and foot-printing; Environmental policy, risk management, and science communication; Think-outside-the-box (fundamentally new concepts, innovative/controversial ideas, interdisciplinary issues); Special sessions.

delle terre e rocce da scavo, le tecnologie di rimedio e biorimedio alla contaminazione, l'uso dei test ecotossicologici per valutare il rischio delle sostanze chimiche immesse nell'ambiente. Inoltre sono state organizzate sette sessioni su specifiche tematiche di grande attualità, tra cui quella sulle microplastiche nell'ambiente, sulla chimica e sui beni culturali. È stata dedicata, infine, una intera sessione sui diciassette obiettivi per lo Sviluppo Sostenibile dell'Agenda 2030 che rappresentano il piano di azione globale delle Nazioni Unite per sradicare la povertà, proteggere il pianeta e garantire la prosperità a livello globale.

Di grande rilievo internazionale sono stati i *Keynote speaker* con il loro intervento in sessione plenaria:

- Roger Strand (Bergen University, Centre for the Study of the Sciences and the Humanities): *Responsible Research and Innovation (RRI): a path towards sustainability?*
- Bernhard Url (European Food Safety Authority): *Food safety in a complex changing world.*
- Eugenia Dogliotti (Istituto Superiore di Sanità, Dept. of Environment and Health): *Innovative research issues in environmental mutagenesis.*
- Jason Snape (AstraZeneca Global Safety, UK Health and Environment): *The environmental dimension of antimicrobial resistance- assessing and managing the risks of anti-infectives.*

## Bibliografia

- Accinelli C, Barra Caracciolo A, Grenni P. Degradation of the antiviral drug oseltamivir carboxylate in surface water samples. *Int J Environ Anal Chem* 2007;87(8):579-87.
- Ancona V, Uricchio VF, Ferrara L, Massacci A, Barra Caracciolo A, Grenni P. Fitorimedio bio-assistito: interventi di risanamento ambientale al Centro Educativo Murialdo di Taranto. In: Uricchio AF (Ed.). *L'emergenza ambientale a Taranto: le risposte del mondo scientifico e le attività del Polo "Magna Grecia"*. Bari: Cacucci Editore; 2014. p. 229-41.
- Ancona V, Barra Caracciolo A, Grenni P, Di Lenola M, Campanale C, Calabrese A, Uricchio VF, Mascolo G, Massacci A. Plant-assisted bioremediation of a historically PCB and heavy metal-contaminated area in Southern Italy. *New Biotechnol* 2017;38 (Part B):65-73.
- Ancona V, Barra Caracciolo A, Campanale C, De Caprariis B, Grenni P, Uricchio VF, Borello D. Gasification treatment of poplar biomass produced in a contaminated area restored using plant assisted bioremediation. *J Environ Manage* 2019;239:137-41.
- Artigas J, Arts G, Babut M, Barra Caracciolo A, Charles S, *et al.* Towards a renewed research agenda in Ecotoxicology. *Environ Poll* 2012;160:201-6.
- Barra Caracciolo A, Giuliano G, Grenni P, Cremisini C, Ciccoli R, Carla U. Effect of urea on degradation of terbuthylazine in soil. *Environ Toxicol Chem* 2005a;24:1035-40.
- Barra Caracciolo A, Grenni P, Ciccoli R, Di Landa G, Cremisini C. Simazine biodegradation in soil: analysis of bacterial community structure by in situ hybridization. *Pest Manag Sci* 2005b;61:863-9.
- Barra Caracciolo A, Grenni P, Saccà ML, Amalfitano S, Martín M, Gibello A. The role of a groundwater bacterial community in the degradation of the herbicide terbuthylazine. *FEMS Microbiol Ecol* 2010; 71:127-36.
- Barra Caracciolo A, Bottoni P, Grenni P. Microcosms studies to evaluate microbial potential to degrade pollutants in soil and water ecosystems. *Microchem J* 2013;107:126-30.
- Barra Caracciolo A, Grenni P, Rausedo J, Ademollo N, Cardoni M, Patrolecco L. Degradation of a fluoroquinolone antibiotic in an urbanized stretch of the River Tiber. *Microchem J* 2018a;136:43-8.
- Battaglia A, Barra Caracciolo A. Contaminazione da microcontaminanti emergenti e servizi ecosistemici forniti dalle comunità microbiche: un caso di studio. *Notiziario dei Metodi Analitici* 2012;1:2-7.

- Di Lenola M, Barra Caracciolo A, Grenni P, Ancona V, Rauseo J, Laudicina VA, Uricchio VF, Massacci A. Effects of Apirolio addition and Alfalfa and compost treatments on the natural microbial community of a historically PCB-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut* 2018;229:143.
- Grenni P, Barra Caracciolo A, Rodríguez-Cruz MS, Sánchez-Martín MJ. Changes in the microbial activity in a soil amended with oak and pine residues and treated with linuron herbicide. *Appl Soil Ecol* 2009a;41:2-7.
- Grenni P, Gibello A, Barra Caracciolo A, Fajardo C, Nande M, Vargas R, Saccà ML, Martínez-Iñigo MJ, Ciccoli R, Martín M. 2009b. A new fluorescent oligonucleotide probe for in situ detection of s-triazine-degrading *Rhodococcus wratislaviensis* in contaminated groundwater and soil samples. *Water Res* 2009b;43:2999-3008.
- Grenni P, Rodríguez-Cruz MS, Herrero-Hernández E, Marín-Benito JM, Sánchez-Martín MJ, Barra Caracciolo A. Effects of wood-amendments on the degradation of terbuthylazine and on soil microbial community activity in a clay loam soil. *Water Air Soil Poll* 2012;223:5401-12.
- Grenni P, Patrolecco L, Ademollo N, Tolomei A, Barra Caracciolo A. Degradation of gemfibrozil and naproxen in a river water ecosystem. *Microchem J* 2013;107:158-64.
- Grenni P, Patrolecco L, Ademollo N, Di Lenola M, Barra Caracciolo A. Capability of the natural microbial community in a river water ecosystem to degrade the drug Naproxen. *Environ Sci Poll Res* 2014;21:13470-9.
- Grenni P, Barra Caracciolo A. SETAC Italian branch: a place for biologists, chemists and environmental scientists to meet. *SETAC Globe* 2016;17(5).
- Grenni P, Patrolecco L, Ademollo N, Di Lenola M, Barra Caracciolo A. Assessment of gemfibrozil persistence in river water alone and in co-presence of naproxen. *Microchem J* 2018a;136C:49-55.
- Grenni P, Ancona V, Barra Caracciolo A. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: a review. *Microchemical Journal* 2018b;136c:25-39.
- Grenni P, Barra Caracciolo A, Patrolecco L, Ademollo N, Rauseo J, Saccà ML, Mingazzini M, Palumbo MT, Galli E, Muzzini V, Polcaro CM, Donati E, Lacchetti I, Di Giulio A, Gucci P, Beccaloni E, Mininni G. A bioassay battery for the ecotoxicity assessment of soils conditioned with two different commercial foaming products. *Ecotoxicol Environ Saf* 2018c;148:1067-77.
- Grenni P, Patrolecco L, Barra Caracciolo A. Site-specific protocols for evaluating environmental compatibility of spoil materials produced by EPB-TBMs. In: Peila D, Viggiani G, Celestino T, *Tunnels and Underground Cities: Engineering and Innovation meet Archaeology, Architecture and Art. Proceedings of the WTC 2019 ITA-AITES World Tunnel Congress*. London: CRC Press; 2019.
- Martín M, Gibello A, Lobo C, Nande M, Garbi C, Fajardo C, Barra Caracciolo A, Grenni P, Martínez-Iñigo MJ. Application of fluorescence in situ hybridization technique to detect simazine-degrading bacteria in soil samples. *Chemosphere* 2008;71:703-10.
- Matturro B, Ubaldi C, Grenni P, Barra Caracciolo A, Rossetti S. Polychlorinated biphenyl (PCBs) anaerobic degradation in marine sediments: microcosm study and role of the autochthonous microbial communities. *Environ Sci Poll Res*, SI Integrated environmental characterization of the contaminated marine coastal area of Taranto, Ionian Sea. *The RITMARE Project* 2016;23(13):12613-23.
- Patrolecco L, Rauseo J, Ademollo N, Grenni P, Cardoni M, Levantesi C, Luprano ML, Barra Caracciolo A. Persistence of the antibiotic sulfamethoxazole in river water alone or in the co-presence of ciprofloxacin. *Sci Total Environ* 2018;640-641: 1438-46.
- Volpe A, Pagano M, Mascolo G, Grenni P, Rossetti S. Biodegradation of UV-filters in marine sediments. *Sci Total Environ* 2017;575:448-57.

# METODI INNOVATIVI DI GENOTOSSICITÀ NEGLI ECOSISTEMI: UNA PANORAMICA

Renato Baudo

già Istituto per lo Studio degli Ecosistemi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pallanza (VB)

## Introduzione

Gli studi sulle sostanze genotossiche, in particolare sui carcinogeni, risalgono a ben prima della scoperta del DNA. Infatti, una veloce ricerca su Wikipedia ricorda che già nel 1567 Paracelso sospettava che un allora ignoto agente, successivamente identificato con il radon, provocasse una malattia nei minatori. Successivamente, numerosi scienziati cercarono di identificare le cause di varie forme cancerose o, a partire dagli anni 20 del 1900, di indurre mutazioni utilizzando raggi X, raggi ultravioletti e agenti chimici.

Poi, nel 1953, James Watson e Francis Crick presentarono il modello a doppia elica del DNA, che rese plausibile interpretare le conseguenze di una esposizione ad agenti genotossici (fisici o chimici) come una alterazione del patrimonio genetico.

Ma la svolta si ottenne negli anni Settanta del secolo scorso, quando Bruce Ames mise a punto l'omonimo saggio per l'identificazione di mutageni. Una organizzazione in particolare, l'OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), si è da subito attivata per pubblicare linee guida (*Test Guidelines*) per il saggio di sostanze genotossiche, ben 19 a partire dagli anni Ottanta, di seguito elencate:

- 471 *Bacterial Reverse Mutation Test* (1983)
- 473 *In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Test* (1997)
- 474 *Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test* (1997)
- 475 *Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test* (1997)
- 476 *In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test* (1997)
- 477 *Genetic Toxicology: SLRL Test in Drosophila melanogaster* (1984)
- 478 *Genetic Toxicology: Rodent Dominant Lethal Test* (1984)
- 479 *Genetic Toxicology: In vitro Sister Chromatid Exchange Assay in Mammalian Cells* (1986)
- 480 *Genetic Toxicology: Saccharomyces cerevisiae, Gene Mutation Assay* (1986)
- 481 *Genetic Toxicology: Saccharomyces cerevisiae, Mitotic Recombination Assay* (1986)
- 482 *Genetic Toxicology: DNA Damage and Repair, Unscheduled DNA Synthesis in Mammalian Cells in vitro* (1986)
- 483 *Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test* (1997)
- 484 *Genetic Toxicology: Mouse Spot Test* (1986)
- 485 *Genetic Toxicology: Mouse Heritable Translocation Assay* (1986)
- 486 *Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver in vivo* (1997)
- 487 *In vitro Mammalian Cell Micronucleus Test* (2010)
- 488 *Transgenic rodent somatic and germ cell gene mutation assays* (2011)
- 489 *In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay* (2016)
- 490 *In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests Using the Thymidine Kinase Gene* (2016)

Con il passare del tempo, la maggior parte di queste linee guida è stata rivista e adeguata alle nuove esigenze di ricerca; 6 sono state però cancellate (*Test Guidelines* 477, 479, 480, 481, 482 e 484) e l'OECD stessa raccomanda che non vengano più utilizzate per nuove ricerche.

Ci sono state poi due aggiunte, per studi sulla carcinogenicità:  
451 *Carcinogenicity Studies* (2009)  
453 *Combined Chronic Toxicity/Carcinogenicity Studies* (2009).

## Saggi di genotossicità per la ricerca

In totale sono quindi disponibili 15 protocolli metodologici, che rispondono almeno parzialmente a diverse esigenze di ricerca: infatti, la *Test Guidelines* 471 prevede l'uso di batteri (*S. typhimurium*, *Escherichia coli*), mentre le altre impiegano linee cellulari di roditori (ratto, topo, criceto) e, in tre casi (*Test Guidelines* 473, 476 e 486) ammettono anche l'uso di linee cellulari umane.

Complessivamente, queste Linee Guida offrono quella flessibilità dei protocolli analitici richiesta dalle ricerche scientifiche, essendo applicabili a matrici diverse, con differenti end point e modelli biologici. Ma, come giustamente puntualizzato dall'OECD, la scelta dell'uno o dell'altro metodo deve tener conto di alcuni vincoli:

- certi composti battericidi (es. antibiotici) possono interferire specificatamente con il sistema di replicazione cellulare dei mammiferi;
- certi composti carcinogeni per i mammiferi operano secondo meccanismi assenti nelle cellule batteriche;
- certe sostanze o i loro metaboliti non raggiungono il tessuto bersaglio;
- certe sostanze sono sesso-specifiche;
- i saggi *in vitro* solitamente richiedono un attivatore metabolico esogeno che può non interamente simulare le condizioni *in vivo*.

Se opportunamente applicati, i protocolli metodologici OECD consentono comunque di rispondere ad esempio ai requisiti del Regolamento (CE) 1907/2006 (noto come REACH: *Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals*), che prevede appunto l'uso di saggi specifici, quali la mutazione genica dei batteri *in vitro*, lo studio *in vitro* della mutagenicità su cellule di mammifero o *in vitro* del micronucleo, la mutazione genica *in vitro* su cellule di mammifero e perfino la proposta di sperimentazione per la genotossicità *in vivo* (se applicabile), per la valutazione delle proprietà genotossiche di composti chimici.

## Saggi di tossicità nella routine

Il caso è però diverso se i saggi di genotossicità devono essere applicati, invece che a formulati di composizione nota, per controlli di routine su campioni ambientali che, solitamente, hanno una composizione ignota o solo parzialmente caratterizzata: per questo specifico scopo, i protocolli metodologici devono preferibilmente essere semplici, rapidi, economici ma, soprattutto, standardizzati e riconosciuti come metodi ufficiali nazionali.

Per quanto riguarda i protocolli standardizzati è quindi scontato guardare innanzi tutto a quelli pubblicati dalla ISO (*International Organization for Standardization*) che, a differenza delle Linee Guida OECD – le quali, generalmente, ammettono una certa flessibilità nelle condizioni operative - fissano precise regole di esecuzione dei saggi, in modo tale da garantire che laboratori diversi, applicando lo stesso protocollo ad un medesimo campione, ottengano risultati del tutto comparabili.

A partire dal 2000, la ISO ha pubblicato 9 diversi standard dedicati ai saggi di genotossicità:

- ISO 11350:2012. *Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome fluctuation test (Ames fluctuation test)*. Confirmed in 2017.
- ISO 13829:2000. *Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water using the umu-test*. Confirmed in 2016.
- ISO 21427-1:2006. *Water quality – Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei – Part 1: Evaluation of genotoxicity using amphibian larvae*. Confirmed in 2015.
- ISO 21427-2:2006. *Water quality – Evaluation of genotoxicity by measurement of the induction of micronuclei – Part 2: Mixed population method using the cell line V79*. Confirmed in 2015.
- ISO 16240:2005. *Water quality – Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome test (Ames test)*. Confirmed in 2014.
- ISO 10993-3:2014. *Biological evaluation of medical devices – Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity*.
- ISO/TR 10993-33:2015. *Biological evaluation of medical devices – Part 33: Guidance on tests to evaluate genotoxicity – Supplement to ISO 10993-3*.
- ISO 29200:2013. *Soil quality – Assessment of genotoxic effects on higher plants – Vicia faba micronucleus test*.

Purtroppo, solo due standard sono stati riconosciuti come metodi ufficiali CEN (vincolanti per i Paesi dell'Unione Europea) e quindi automaticamente adottati in Italia come metodi ufficiali UNI:

- UNI EN ISO 21427-2:2009. *Qualità dell'acqua - Valutazione della genotossicità per mezzo della misurazione dell'induzione di micronuclei - Parte 2: Metodo a popolazione mista che utilizza la linea delle cellule V79*.
- UNI EN ISO 10993-3:2015. *Valutazione biologica dei dispositivi medici - Parte 3: Prove di genotossicità, carcinogenicità e tossicità sulla riproduzione*.

A questi si può aggiungere lo standard ISO 29200:2013, che ha trovato una controparte nella linea guida dell'Istituto Superiore di Sanità (Rapporti ISTISAN 13/27) (Gustavino *et al.*, 2013).

Il *Technical Report* 10993-33 evidentemente esula dal contesto qui considerato, quindi complessivamente, si può contare su due soli metodi standardizzati e ufficiali che, fortunatamente, utilizzano linee cellulari vegetali (Rapporti ISTISAN 13/27), oltre che animali (UNI EN ISO 21427-2:2009).

Tuttavia, considerando che saggi di genotossicità sono richiesti od auspicabili nel controllo di routine sia in campo ambientale (acqua, aria, suolo, rifiuti, ecc.) che a salvaguardia della salute (medicina del lavoro, alimenti, farmaci, cosmetici, ecc.), è auspicabile un ampliamento degli strumenti attualmente disponibili.

Poiché i saggi di genotossicità e in particolare quelli in vivo, risultano ancora piuttosto complicati, richiedendo il mantenimento di colture cellulari e/o laboriose preparazioni dei materiali, attualmente vengono proposti anche particolari kit, che contengono tutto ciò che serve per effettuare i saggi (reagenti, colture e prodotti di consumo), pronti all'uso anche per laboratori non specialistici. Questi kit sono stati scelti in diversi studi ad esempio in studi di genotossicità di acque superficiali (Zani *et al.*, 2005), sedimenti fluviali (Šestinová *et al.*, 2017), acque reflue (Kocak, 2015; Eck-Varanka *et al.*, 2016; Jabbour *et al.*, 2016; Vijay *et al.*, 2017), della frazione PM10 del particolato atmosferico (Piekarska *et al.*, 2011; Romano *et al.*, 2019) e degli eluati da

discariche di materiali plastici (Alabi *et al.*, 2019); sono stati selezionati anche per verificare la genotossicità di acque potabili conservate in bottiglie in PET Ubomba-Jaswa *et al.*, 2010 e la mutagenicità di un immunomodulatore antivirale (Tobólska *et al.*, 2018 ) e di nuovi candidati dolcificanti (Rega *et al.*, 2017).

Esistono, infine, kit che si basano su ceppi batterici ingegnerizzati per esprimere enzimi umani, con lo scopo di “mimare” ciò che avverrebbe all’interno dell’organismo umano (Honda *et al.*, 2016).

## Conclusioni

Questa veloce panoramica evidenzia chiaramente che lo sviluppo di protocolli metodologici per i saggi di genotossicità procede a due velocità: per le diverse esigenze di ricerca, in tutto il mondo, Italia compresa, numerosissimi laboratori continuano a sviluppare nuovi metodi ad un ritmo accelerato, a mano a mano che si prospettano nuovi problemi e, soprattutto, vengono formulati nuovi xenobiotici potenzialmente genotossici.

Purtroppo, non si può dire altrettanto per i saggi che potrebbero e dovrebbero trovare concreta applicazione nei laboratori chiamati ad utilizzare nella routine i saggi di genotossicità, perché molto meno risorse vengono investite nei processi di ottimizzazione e standardizzazione dei rispettivi protocolli metodologici.

Per questo, è necessario che le organizzazioni competenti, ovvero l’Istituto Superiore di Sanità (ISS) e l’Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) in collaborazione con Università e laboratori pubblici e privati, organizzino gli indispensabili interconfronti richiesti per una standardizzazione dei metodi, a sua volta premessa irrinunciabile perché tali metodi trovino un riconoscimento ufficiale e possano essere proposti per l’inclusione dei saggi di genotossicità nella normativa vigente.

## Bibliografia

- Alabi OA, Sorungbe AA, Adeoluwa YM. *In vitro* mutagenicity and genotoxicity of raw and simulated leachates from plastic waste dumpsite. *Toxicol Mech Methods* 2019;29(6):403-10.
- Eck-Varanka B, Kováts N, Paulovits G, *et al.* Assessment of municipal wastewater genotoxicity using the Ames fluctuation test, the SOS Chromotest and the mussel micronucleus test: a comparison. *IJEE* 2016;3(1):135-8.
- Gustavino B, Caciolli S, Mancini L. *Linea guida del test dei micronuclei in Vicia faba per la valutazione di effetti mutageni in acque dolci e sedimenti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/27).
- Honda H, Minegawa K, Fujita Y, *et al.* Modified Ames test using a strain expressing human sulfotransferase 1C2 to assess the mutagenicity of methyleugenol. *Genes Environ* 2016;38(1).
- Jabbour J-F, Farah J, Abdel-Massih RM. Hospital wastewater genotoxicity: A comparison study between an urban and rural university hospital with and without metabolic activation. *J Environ Eng Ecol Sci* 2016;5(2):1-6.
- Kocak E. Investigation of potential genotoxic activity using the SOS Chromotest for real paracetamol wastewater and the wastewater treated by the Fenton process. *J Environ Health Sci Eng* 2015;13:66.
- Piekarska K, Zaciera M, Czarny A, Zaczyńska E. Application of short-term tests in assessment of atmospheric air pollution. *Environ Prot Eng* 2011;37(2):85-98.



- Rega MF, Siciliano A, Gesuele R, Lofrano G, Carpentieri A, Picone D, Guida M. Ecotoxicological survey of MNEI and Y65R-MNEI proteins as new potential high-intensity sweeteners. *Environmental Science and Pollution Research* 2017;24(10):9734-40.
- Romano S, Perrone MR, Becagli S, Pietrogrande MC, Russo M, Caricato R, Lionetto MG. Ecotoxicity, genotoxicity, and oxidative potential tests of atmospheric PM10 particles. *Atmospheric Environment* 2019;221:1-11.
- Šestinová O, Findoráková L, Hančulák J, Špaldon T. Investigation of genotoxicity in river sediments. *Nova Biotechnol Chim.* 2017;16(2):86-91.
- Tobólska S, Terpilowska S, Jaroszewski J, Siwicki AK. Genotoxicity and Mutagenicity of Inosine Pranobex. *J Vet Res* 2018;62(2):207-13.
- Ubomba-Jaswa E, Fernández-Ibáñez P, McGuigan KG. A Preliminary Ames fluctuation assay assessment of the genotoxicity of drinking water that has been solar disinfected in Polyethylene Terephthalate (PET) Bottles. *J Water Health* 2010;8(4):712-9.
- Vijay U, Gupta S, Mathur P, Bhatnagar P. Evaluating genotoxicity of treated wastewater from health centers with special reference to their mutagenicity. *EC Microbiology* 2017;12(2):83-96.
- Zani C, Feretti D, Buschini A, Poli P, Rossi C, Guzzella L, Di Caterino F, Monarca S. Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2005;587(1-2):26-37.

## NANOMATERIALI INGEGNERIZZATI ED ECOTOSSICITÀ

Giovanni Libralato (a), Giusy Lofrano (b), Francesco Aliberti (a), Marco Guida (a)

(a) Dipartimento di Biologia, Università Federico II, Napoli

(b) Dipartimento di Chimica e Biologia, Università di Salerno, Fisciano (SA)

Le nanotecnologie rappresentano uno dei campi di ricerca più innovativi dell'ultimo secolo, essendo in grado di modificare profondamente le proprietà fisico-chimiche della materia in funzione della relativa dimensione (Minetto *et al.*, 2016; Minetto *et al.*, 2014). A causa della maggiore superficie specifica in volume, i nanomateriali possono avere proprietà diverse rispetto allo stesso materiale privo delle caratteristiche di nanoscala, ottenendo ad esempio una maggiore efficienza catalitica, conduttività elettrica, durezza e resistenza. Secondo la *European Chemical Agency* (2018), i nanomateriali sono sostanze chimiche o materiali composti da particelle con almeno una delle dimensioni compresa tra 1 e 100 nanometri (nm). In particolare, sulla base della raccomandazione della Commissione Europea 2011/696/EU, con "nanomateriale" s'intende un materiale naturale, derivato o fabbricato contenente particelle allo stato libero, aggregato (es. particella composta da particelle fuse o fortemente legate fra loro) o agglomerato (es. insieme di particelle o aggregati con legami deboli in cui la superficie esterna risultante è simile alla somma delle superfici dei singoli componenti), e in cui, per almeno il 50% delle particelle nella distribuzione dimensionale numerica, una o più dimensioni esterne siano comprese fra 1 nm e 100 nm. In casi specifici, e laddove le preoccupazioni per l'ambiente, la salute, la sicurezza e la competitività lo giustifichino, la soglia del 50% della distribuzione dimensionale numerica può essere sostituita da una soglia compresa fra l'1% e il 50%. In deroga a questa definizione, però, anche i fullereni, i fiocchi di grafene e i nanotubi di carbonio a parete singola con una o più dimensioni esterne inferiori a 1 nm dovrebbero essere considerati nanomateriali.

Le nanotecnologie presentano un'ampia gamma di applicazioni comprendendo materiali nanostrutturati dalle singole particelle, alla funzionalizzazione delle superfici, sino alla produzione di materiali nanocompositi (es. nanocristalli, *nanocluster*, *quantum dot*, nanofili, nanotubi, matrici di nanoparticelle, superfici e film sottili) e sono in rapida espansione sul mercato europeo, dove è già presente un gran numero di prodotti contenenti nanomateriali (es. batterie, rivestimenti, indumenti antibatterici, cosmetici e prodotti alimentari).

Tuttavia, se da un lato i nanomateriali offrono opportunità tecniche e commerciali di grande interesse, dall'altro possono comportare rischi per l'ambiente e sollevare preoccupazioni per la salute e la sicurezza dell'uomo e degli animali.

Le definizioni che li contraddistinguono sono utilizzate primariamente per identificare i materiali che necessitano di particolari precauzioni, ad esempio, in merito alla valutazione del rischio e alla composizione da indicare in etichetta. Queste disposizioni non sono parte della definizione, ma di legislazioni specifiche nelle quali la definizione di nanomateriali può essere utilizzata come nel caso dei cosmetici (Regolamento CE 1223/2009). Attualmente, a livello europeo sono presenti varie norme e guide tecniche che fanno riferimento ai nanomateriali. Al fine di assicurare una relativa conformità normativa, qualora i nanomateriali siano utilizzati in vari contesti, l'obiettivo delle raccomandazioni è di assicurare riferimenti trasversali coerenti, anche nei vari settori di applicazione. Se un materiale è presente in forma nanoscopica nell'ambito di un certo settore produttivo, sarà trattato come tale anche negli altri settori applicativi. La tabella di marcia dell'UE in merito ai modelli di rilascio-trasporto-destino dei nanomateriali prevede: la

definizione e prioritizzazione dei processi di rilascio attraverso delle simulazioni a scala laboratorio e una comprensione della modalità dei processi; il miglioramento e validazione dei modelli di rilascio per l'esposizione in ambito lavorativo, i consumatori, la popolazione e l'ambiente più in generale, incluse le emissioni diffuse entro il 2020, e il miglioramento e validazione dei modelli di trasporto ambientale includendo l'interazione dei nanomateriali con l'ambiente nonché le loro trasformazioni chiave in tutti i comparti ambientali entro il 2025 (Savolainen, 2013).

I nanomateriali non sono intrinsecamente pericolosi di per sé, ma vi è la necessità di effettuare delle specifiche valutazioni con un approccio del tipo “caso per caso” tanto da determinare la nascita dell’“eco-nanotossicologia”. Perciò la definizione sinora data ha come obiettivo quello di fornire dei criteri chiari per identificare i materiali da avviare all’analisi del rischio per valutare l’opportunità di intraprendere le azioni (ndr prescrizioni) più adeguate al caso. Dato il principio di precauzione e nell’ottica dell’ottimizzazione delle risorse, l’obiettivo del legislatore è quello di sostenere l’approccio del *safe-by-design*. L’obiettivo è integrare la conoscenza sui potenziali effetti avversi dei nanomateriali per la salute umana e l’ambiente nel processo di disegno e fabbricazione eliminando all’origine eventuali criticità. Questo approccio implica che funzionalità e sicurezza siano considerate in modo integrato sin dalle prime fasi dei processi di ricerca, sviluppo e innovazione (Schwarz-Plaschg *et al.*, 2017).

Tra i nanomateriali più diffusi a livello commerciale globale vi sono in ordine decrescente (di mediana) gli ossidi di silicio ( $\text{SiO}_2$ , 5500 t/a), titanio ( $\text{TiO}_2$ ) (5500 t/a), nanotubi di carbonio (*Carbon NanoTubes*, CNT, 300 t/a), gli ossidi di zinco ( $\text{ZnO}$ ) (550 t/a), ferro ( $\text{FeOx}$ , 55 t/a), alluminio ( $\text{AlOx}$ , 55 t/a), cerio ( $\text{CeOx}$ , 55 t/a), il nano-argento (nAg, 55 t/a), i fullereni (0,6 t/a), e i quantum dot (QD, 0,6 t/a) (Piccinno *et al.*, 2012). La richiesta mondiale di nanomateriali ha subito un forte incremento negli ultimi dieci anni con uno spostamento della produzione e dei consumi dall’Europa verso il sud-est asiatico (Inshakova & Inshakov, 2017). Anche in campo alimentare e nei prodotti per la cura della persona, l’utilizzo dei nanomateriali è andato diffondendosi al punto tale da poter stimare un *Average Daily Intake* (ADI) per alcuni di essi, come nel caso del nano- $\text{TiO}_2$  che può raggiungere anche i 2 mg (kg peso/giorno) -1 tra i soggetti con età compresa tra 1,5 e 10 anni data la sua presenza specialmente in caramelle, panna, e glassa per dolci e con effetti ancora poco noti sul lungo termine (Weir *et al.*, 2012).

Dato l’utilizzo dei nanomateriali in vari settori, è attesa una loro presenza nelle matrici ambientali considerando possibili dispersioni durante il loro ciclo produttivo, il rilascio durante l’uso e la gestione dei prodotti contenenti nanomateriali a fine vita. Tre sono le principali vie di diffusione attese quali lo scarico delle acque reflue, il ciclo dei rifiuti solidi e l’aerosol atmosferico a cui possono seguire una serie di interazioni con le particelle di argilla presenti nel suolo/sedimento, il particolato sospeso in colonna d’acqua e d’aria, la sostanza organica naturale che ne condizionano la biodisponibilità e l’eventuale sequestro. Il rilascio intenzionale in ambiente è ancora limitato a casi isolati e generalmente associato a procedure di riqualificazione ambientale come nel caso delle bonifiche con ferro nano-zerovalente (Lofrano *et al.*, 2017). Particolare importanza riveste, quindi, la valutazione degli effetti dei nanomateriali ingegnerizzati rispetto al biota acquatico considerando la possibile persistenza, tossicità e bioaccumulabilità dei nanomateriali.

Rispetto ai tradizionali approcci di valutazione del rischio, i nanomateriali presentano delle caratteristiche tali da richiedere specifici approfondimenti al fine di determinare i parametri caratteristici come la concentrazione efficace mediana (*median Effective Concentration*,  $\text{EC}_{50}$ ) ovvero la concentrazione a cui non è possibile osservare nessun effetto avverso statisticamente significativo rispetto al controllo negativo (*No Observed Adverse Effect Concentration*, NOAEC). Sovente, è necessario procedere alla comparazione dei nanomateriali con il materiale non nano-strutturato corrispondente (*bulk*), al fine di comprendere il ruolo che la nanoscala del materiale

medesimo potrebbe avere nella definizione delle sue possibili criticità ambientali. Inoltre, risulta imprescindibile valutare anche il ruolo di eventuali agenti di copertura (*coating*) o mezzi di dispersione.

Da un punto di vista ecotossicologico i nanomateriali presentano delle singolarità tali da richiedere una “personalizzazione” del processo valutativo rispetto alle tradizionali sostanze chimiche avendo evidenziato sinora numerose criticità sperimentali a causa di fattori di confusione (es. *coating* come fonte alimentare per il target biologico o come tossico aggiuntivo, chelazione, effetti della fase ionica, aggregazione e sedimentazione) e dosaggi inaccurati delle concentrazioni valutate (Petersen *et al.*, 2014). Anche i processi di standardizzazione dei metodi per valutare da un punto di vista della tossicità i nanomateriali risultano essere in ritardo proprio per le criticità presentate e la costante accelerazione nella produzione di nuovi nanomateriali. Attualmente, esistono delle linee guida OECD (2014) per la valutazione dell’ecotossicità di nanomateriali ingegnerizzati e uno standard NIST (*National Institute of Standards and Technology*) per la preparazione di dispersioni di nano-TiO<sub>2</sub> per valutazioni ecotossicologiche (Taurozzi *et al.*, 2012).

Negli ultimi dieci anni, le conoscenze sulle sorgenti, il destino e gli effetti dei nanomateriali nell’ambiente sono progredite in modo significativo. A parte la necessità di considerare concentrazioni ambientalmente rilevanti (non mg/L, bensì µg/L o ng/L) e di valutare gli effetti sul modello biologico durante la fase espositiva, ci sono numerosi aspetti ancora da indagare in ambito eco-nanotossicologico soprattutto in riferimento alla loro interazione con le altre sostanze presenti in ambiente con riferimento agli effetti in miscela. Il comparto suolo, ad esempio, deve essere ancora adeguatamente investigato per comprendere come le sue proprietà possano influire sugli effetti dei nanomateriali presenti così come il ruolo dei *coating* che è ancora scarsamente trattato in letteratura. Infine, poco è ancora noto sugli effetti a livello di comunità ed ecosistema specialmente per quei nanomateriali che sono in grado di accumulare in certi comparti ambientali (es. sedimento) e di magnificare lungo la catena trofica. Osservazioni a lungo termine non sono ancora disponibili considerando le reti trofiche sia in senso verticale sia orizzontale (Bundschuh *et al.*, 2018).

## Bibliografia

- Bundschuh M, Filser J, Lüderwald S, McKee MS, Metreveli G, Schaumann G E, Schulz R, Wagner S. Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environ Sci Eur* 2018;30(1):6.
- Inshakova E, Inshakov O. World market for nanomaterials: structure and trends. In: Guéhot S (Ed.). *MATEC Web of Conferences*. Les Ulis: EDP Sciences; 2017. p. 1-5.
- Lofrano G, Libralato G, Brown J. *Nanotechnologies for environmental remediation: applications and implications*. Cham: Springer International Publishing AG; 2017.
- Minetto, D, Volpi Ghirardini A, Libralato G. Saltwater ecotoxicology of Ag, Au, CuO, TiO<sub>2</sub>, ZnO and C60 engineered nanoparticles: An overview. *Environ Int* 2016;92:189-201.
- Minetto D, Libralato G, Volpi Ghirardini A. Ecotoxicity of engineered TiO<sub>2</sub> nanoparticles to saltwater organisms: an overview. *Environ Int* 2014;66:18-27.
- Organisation for Economic Co-operation Development. *Ecotoxicology and environmental fate of manufactured nanomaterials: Test guidelines. Expert Meeting Report*. Paris: OECD; 2014. Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, No. 40. (ENV/JM/MONO(2014)1)
- Petersen EJ, Henry TB, Zhao J, MacCuspie RI, Kirschling TL, Dobrovolskaia MA, Hackley V, Xing B, White JC. Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements. *Environ Sci Technol* 2014;48(8):4226-46.

- Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowak B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the World. *Journal of Nanoparticles Research* 2012;14(9):1109.
- Savolainen K, Backman U, Brouwer D, Fadeel B, Fernandes T, Kuhlbusch T, Landsiedel R, Lynch I, Pylkkänen L. *Nanosafety in Europe 2015-2025: Towards safe and sustainable nanomaterials and nanotechnology innovations*. Helsinki: Finnish Institute of Occupational Health; 2013.
- Schwarz-Plaschg C, Kallhoff A, Eisenberger I. Making nanomaterials safer by design? *NanoEthics* 2017;11(3):277-81.
- Taurozzi JS, Hackley VA, Wiesner MR. *Preparation of a nanoscale TiO<sub>2</sub> aqueous dispersion for toxicological or environmental testing*. Gaithersburg, MD: National Institute of Standards and Technology; 2012; NIST Special Publication. 2012; p. 1200-3.
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, Von Goetz N. Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol* 2012;46(4):2242-50.

# APPLICAZIONE DI SAGGI BIOLOGICI *IN VITRO* SU DIVERSE MATRICI: L'ESPERIENZA DELL'ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DEL PIEMONTE, LIGURIA E VALLE D'AOSTA

Daniela Meloni

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino*

## Introduzione

Un'adeguata valutazione della tossicità di nuovi prodotti chimici e/o farmaceutici presenti negli alimenti e nell'ambiente da soli o in miscele complesse è essenziale per la protezione della salute umana. Mentre i prodotti farmaceutici subiscono un accurato controllo prima della commercializzazione, esistono ancora importanti lacune in merito agli effetti delle sostanze chimiche comunemente usate a cui siamo esposti. Le cause principali sono riferibili alla mancanza di misure di protezione, ma in particolare alla possibilità di testare efficacemente la tossicità delle sostanze chimiche. Il rendimento estremamente basso dei sistemi diagnostici attualmente in uso nella valutazione del rischio da esposizione da sostanze rende difficoltosa la caratterizzazione degli oltre 100.000 prodotti chimici esistenti, mentre nuove sostanze chimiche continuano ad essere immesse nel mercato ogni anno.

È importante inoltre sottolineare come anche l'esposizione cronica a basse concentrazioni di inquinanti può avere anche effetti profondi con la relativa necessità di un'analisi dei rischi ecotossicologici. In particolare, gli ormoni steroidei hanno dimostrato di indurre gravi disfunzioni sui vertebrati acquatici anche a concentrazioni di ng/L. Il tradizionale approccio analitico si è rivelato inadeguato in questo ambito, per via delle relazioni complesse tra i fattori ambientali e alimentari che determinano un'azione in concerto dei vari contaminanti chimici. La carenza di informazioni inerenti alle proprietà tossicologiche della maggior parte delle sostanze chimiche rende impossibile una valutazione del rischio attendibile, e, anche se tali proprietà fossero ben caratterizzate, l'analisi su miscele chimiche complesse verrebbe comunque inficiata dalla tendenza dei composti chimici a ad essere convertiti in metaboliti con una biologia diversa e sconosciuta.

La nuova legislazione REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of Chemicals*) (Regolamento CE 1907/2006) è stata istituita anche al fine di accelerare e facilitare le procedure di valutazione del rischio. Tuttavia l'introduzione di nuovi metodi di screening per la valutazione della tossicità appare essenziale.

Un cambio di approccio verso metodi che si basano su principi non convenzionali appare quanto mai necessario per valutare il rischio generato da sostanze chimiche e miscele. La ricerca della risposta biologica piuttosto che della natura esatta delle sostanze o miscele è la prima candidata, con superamento dell'approccio *target-based* e orientamento verso tecniche diagnostiche *effect-based*, ovvero in grado di identificare categorie di molecole con attività omologa.

I classici saggi biologici utilizzano animali sperimentali, tuttavia i risultati d'analisi sono discontinui e talvolta poco riproducibili, oltre che con basso rendimento. Negli ultimi anni tuttavia, lo sviluppo di metodiche nuove che utilizzano colture cellulari anziché animali ha raggiunto un'elevata qualità tecnologica che consente la generazione sistemi analitici sensibili,

riproducibili e con buon rendimento mantenendo una relativa semplicità di applicazione e un funzionamento economicamente efficace. Tali biosensori, tra i quali i *Reporter Gene Assay* (RGA), fanno uso di una componente biologica associata ad un trasduttore per valutare la presenza e/o le caratteristiche di una determinata molecola o famiglia di composti. Il principio di funzionamento si basa sull'utilizzo di recettori in grado di rilevare tutte le molecole che hanno affinità per il recettore stesso. La componente biologica generalmente lega le molecole *target* e a seguito di questa interazione va in contro a modificazioni che vengono trasformate in un segnale osservabile e misurabile dal trasduttore. Negli RGA si fa utilizzo di cellule vive, procariote o eucariote, capaci di esprimere recettori specifici per la classe di molecole ricercate. L'interazione recettore-ligando causa la trascrizione di un gene, opportunamente modificato, che a sua volta provoca l'espressione di un carattere aggiunto (fluorescenza o attività  $\beta$ -galattosidasi) che può essere osservato e misurato. Secondo quanto riportato in diversi studi, gli RGA che utilizzano cellule eucariote risultano essere più sensibili e maggiormente correlati con le analisi chimiche e i test in vita rispetto a quelli che utilizzano cellule procariote.

Gli RGA sono attualmente già largamente applicati nella ricerca di contaminanti ambientali e si propongono come utili strumenti di screening multiresiduo, si rende tuttavia necessario sviluppare e standardizzare tali metodi biologici, ai fini della loro applicazione nell'ambito del controllo ufficiale dei prodotti alimentari, dell'ambiente e negli ambiti ad essi collegati e di valutarne le prestazioni ai sensi della normativa vigente.

L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLVA) applica nei propri laboratori un pannello di RGA di CALUX® (*Chemic Activated LUciferase eXpression*) prodotti dalla BDS (Bio Detection Systems, Amsterdam, Paesi Bassi). Tra i numerosi sistemi disponibili, l'IZSPLVA utilizza:

- DR CALUX® per la ricerca delle diossine e composti diossino-simili negli alimenti di origine animale;
- GR CALUX® per la ricerca di residui di trattamenti illeciti con glucorticoidi in urine bovine;
- ER, AR, GR CALUX® per la determinazione di sostanze interferenti endocrine nei materiali a contatto con alimenti;
- ER CALUX® per la determinazione delle sostanze ad attività estrogenica nelle acque di abbeverata.

## **DR CALUX® per la ricerca in screening delle diossine e composti diossino-simili negli alimenti di origine animale**

Le diossine sono una famiglia di microinquinanti organici, estremamente tossici per l'uomo, in grado di persistere a lungo nell'ambiente, accumularsi nel grasso dell'uomo e degli animali, ed entrare così nella catena alimentare. Il biosaggio cellulare DR CALUX®, basato sul meccanismo di captazione del recettore cellulare AhR per le diossine e i composti diossino-simili, è un metodo che si è diffuso negli ultimi anni in molti Paesi, quale test di elezione per lo screening degli alimenti, per i tempi di esecuzione relativamente rapidi e i costi ridotti rispetto al metodo di conferma mediante gas cromatografia e spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS).

Lo scopo dell'attività in IZSPLVA è stato di effettuare una valutazione dell'applicabilità del metodo BDS-DR-CALUX® quale strumento di screening per il monitoraggio delle diossine nel latte prodotto nella regione Piemonte, verificandone l'attendibilità rispetto ai dati disponibili col

metodo ufficiale di conferma. A tal fine sono stati raccolti e analizzati 13 campioni di latte bovino precedentemente esaminati con HRGC/HRMS e 30 campioni di latte acquistati presso negozi per la vendita al dettaglio, di marchi conosciuti a livello nazionale.

I risultati ottenuti hanno mostrato una buona concordanza tra il metodo di analisi tradizionale e il test BDS-DR-CALUX®, su una matrice alimentare, il latte, molto utilizzata soprattutto per l'alimentazione infantile, e ampiamente sfruttata per ulteriori trasformazioni.

BDS-DR-CALUX®, pertanto, si conferma come metodo di screening valido, veloce, poco costoso e in grado di consentire un'attività di bio-monitoraggio efficace sugli alimenti.

## **GR CALUX® per la ricerca in screening di trattamenti illeciti con corticosteroidi in vitelli da carne**

Il meccanismo d'azione dei corticosteroidi è stato ampiamente studiato negli ultimi decenni e il metodo GR CALUX simula questo meccanismo. Le prove effettuate testando il GR CALUX con dosi scalari dei glucocorticoidi sintetici in DMSO, hanno mostrato che quasi tutte le molecole pure vengono rilevate a concentrazioni molto più basse dei 2 ppb di *cut-off*, ovvero la capacità di rilevazione obbligatoria (CCβ) in base alla legislazione vigente. Oltre a valutare la sensibilità della metodica alle varie molecole (EC<sub>50</sub>), per ogni glucocorticoide sintetico prescelto, è stato valutato il Potere Glucocorticoide Relativo (REP), in modo da misurare il potere di ogni molecola di stimolare le cellule del GR CALUX. I livelli endogeni di GC non sembrano influenzare le misurazioni, tuttavia nel caso dei prelievi effettuati al macello, l'aumento dei GC naturali può invalidare le analisi generando risultati falsi positivi. I pro-ormoni non sono rilevati col GR CALUX (prednisone), non andando quindi ad interferire con il processo analitico. Il metodo è stato validato con successo ai sensi della decisione della Commissione (EU) 657/2002 sulle urine bovine.

## **ER, AR e GR CALUX® per la ricerca in screening di interferenti endocrini in materiali e oggetti plastici a contatto con gli alimenti**

Nel panorama scientifico vi è evidenza di un aumento nell'incidenza di alcune patologie umane endocrine, riproduttive e dell'età evolutiva correlato all'azione di un ampio, eterogeneo e tuttora solo parzialmente conosciuto gruppo di sostanze classificate come "interferenti endocrini" (IE). Gli IE comprendono contaminanti persistenti, come ad esempio le diossine, pesticidi, sostanze industriali (es. ftalati, bisfenolo A) e sostanze naturali (es. fitoestrogeni) e sono caratterizzati dalla molteplicità di effetti, dalla diffusa esposizione, anche con problemi di bioaccumulo, nonché dalla potenzialità di rappresentare uno specifico rischio per la riproduzione e per lo sviluppo pre- e post-natale. Benché la valutazione dei possibili rischi associati all'esposizione a tali sostanze coinvolga l'ambito ambientale, sociale ed economico, in generale gli alimenti e i mangimi rappresentano una tra le principali vie d'esposizione, sia per le molecole di origine naturale che per quelle artificiali (EFSA 2013), inoltre, un ruolo centrale sembra essere svolto dai Materiali e Oggetti a Contatto con gli Alimenti (MOCA), in quanto possibili vettori di IE agli alimenti in essi contenuti.

È stata messa a punto una metodica cellulare di screening basata sugli RGA volta a saggiare l'attività biologica dei MOCA in materiale plastico verso i gruppi recettoriali estrogenici,



androgenici e glucocorticoidi, al fine di rivelare l'eventuale cessione di sostanze ad attività interferente. Gli *end-point* prescelti sono frutto di un'attenta analisi bibliografica e rappresentano quelli maggiormente espressi nei meccanismi d'azione di alcuni fra i principali IE isolati dai MOCA, per i quali sono stati stimati i parametri di riutilizzo domestico. È stata studiata la tossicità acuta delle molecole identificate su cellule epatiche e intestinali umane. I risultati sono promettenti ma necessitano di ulteriore studio.

## Valutazione degli effetti tossici delle acque di abbeverata mediante studi traslazionali *in vivo* e *in vitro*

Lo studio ha come scopo principale quello valutare i potenziali effetti tossici dell'acqua di abbeverata concentrando l'attenzione sul sistema di distribuzione delle acque nel contesto del territorio piemontese. Gli obiettivi dello studio sono i seguenti:

- la valutazione della carica ormonale estrogenica delle acque di abbeverata con metodi biologici;
- lo studio del potenziale impatto dei concentrati di acque sulla capacità antiossidante e detossificante in sistemi cellulari e su alcuni organismi scelti come modello sperimentale.
- la valutazione *in vivo* e *in vitro* della tossicità dei possibili inquinanti e dei *disinfection by-products* (DBPs)
- la valutazione della possibile contaminazione chimica di acque potabilizzate di diversa origine nelle aree piemontesi selezionate
- l'identificazione del potenziale pericolo di trasmissione di agenti di natura virale e batterica.

### Bibliografia

- Benson R, Conerly OD, Sander W, Batt AL, Boone JS, Furlong ET, Glassmeyer ST, Kolpin DW, Mash HE, Schenck KM, Simmons JE. Human health screening and public health significance of contaminants of emerging concern detected in public water supplies. *Sci Total Environ* 2017;579:1643-48.
- Brand W, de Jongh CM, van der Linden SC, Mennes W, Puijker LM., van Leeuwen CJ, Van Wezel AP, Schriks M, Heringa, MB. Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays. *Environment international* 2013;55:109-18.
- Lapworth DJ, Baran N, Stuart ME, Ward RS. Emerging contaminants in groundwater: a review of sources, fate and occurrence. *Environ Pollut* 2012;163:287-303.
- Vandermarken T, Croes K, Van Langenhove K, Boonen I, Servais P, Garcia-Armisen T, Brion N, Denison MS, Goeyens L, Elskens, M. Endocrine activity in an urban river system and the biodegradation of estrogen-like endocrine disrupting chemicals through a bio-analytical approach using DRE-and ERE-CALUX bioassays. *Chemosphere* 2018;201:540-9.
- Xie SH, Liu AL, Chen YY, Zhang L, Zhang HJ, Jin BX, Lu WH, Li XY, Lu WQ. DNA damage and oxidative stress in human liver cell L-02 caused by surface water extracts during drinking water treatment in a waterworks in China. *Environ Mol Mutagen* 2010;51(3):229-35.
- Zegura B, Heath E, Cernosa A, Filipic M. Combination of *in vitro* bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere* 2009;75(11):1453-60.

## APPROCCI ECOTOSSICOLOGICI EMERGENTI: DAI SEGNALI MOLECOLARI ALLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO ECOLOGICO

Francesco Regoli

Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, Università Politecnica delle Marche, Ancona

Negli ultimi due decenni è cresciuta molto la nostra conoscenza sulla presenza, distribuzione ambientale ed effetti biologici di molti inquinanti come metalli pesanti, oli e Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), organo-alogenati, pesticidi, bifenili policlorurati (PCB) ritardanti di fiamma, organo-stannici ed estrogenici per citare i più famosi. L'approccio ecotossicologico ha avuto un ruolo importante e l'utilizzo di organismi bioindicatori (in senso ampio) ha permesso di comprendere le cinetiche e i meccanismi di bioaccumulo, e anche di chiarire come queste sostanze interagiscono con le componenti cellulari determinando l'attivazione di meccanismi di detossificazione, le vie di biotrasformazione, l'insorgenza di alterazioni cellulari o di effetti biologici potenzialmente avversi. Queste conoscenze, inizialmente accolte con un certo scetticismo, si sono col tempo dimostrate sempre più affidabili e oggi sono imprescindibili per qualsiasi reale valutazione dell'impatto causato dai contaminanti chimici sulla salute dell'ambiente e degli organismi.

La scelta degli organismi da utilizzare come bioindicatori è grandemente aumentata, offrendo nuove possibilità di applicazione e di studio. Si va dalle specie dello zooplankton gelatinoso, fino ai predatori terminali, si continuano anche ad utilizzare i "vecchi" modelli ma con approcci innovativi: i mitili e i ricci di mare, ad esempio, sono stati usati per chiarire fondamentali processi biologici di base, e per caratterizzare o mettere a punto sistemi diagnostici basati sui meccanismi di azione molecolare dei contaminanti. Non abbiamo solo modelli in vivo, ma anche nuovi modelli *in vitro*, dalle colture cellulari tradizionali a quelle dei fibroblasti di cetacei, fino alle *slice tissues*. Possiamo testare vescicole di membrana, organelli isolati, e numerosi kit sono oggi disponibili per saggi ecotossicologici convenzionali, ma anche per analisi innovative mirate a evidenziare specifici effetti tossicologici: i *reporter gene assay* sfruttano le specificità recettoriali di molte classi di inquinanti (diossine, IPA, estrogenici, solo a titolo di esempio) per attivare un gene *reporter* i cui livelli di espressione sono facilmente quantificabili. L'incredibile crescita che si è avuta negli ultimi dieci anni per questi supporti analitici, ha certamente contribuito ai successi dell'ecotossicologia moderna.

Anche le tecnologie analitiche si sono evolute, passando dallo screening degli effetti di singole molecole a piattaforme *high-throughput* che consentono di ottenere contemporaneamente numeri impressionanti di dati quali- e quantitativi. I modelli *in silico* rappresentano un aiuto importante per validare o indirizzare molti studi sperimentali e le tecnologie "omiche" (genomica, proteomica, metabolomica) sono divenuti termini comuni: vale tuttavia la pena ricordare che sono passati solo dieci anni dalla prima sessione interamente omica dedicata agli organismi marini durante il congresso PRIMO (*Pollutant Responses In Marine Organisms*) del 2007 a Florianopolis, Brasile. Oggi si possono usare organismi transgenici e stiamo sperimentando tessuti virtuali o ingegnerizzati, non solo nell'uomo ma anche nelle meduse e nei poriferi, per testare nuove ipotesi tossicologiche o applicazioni biotecnologiche.

L'aumento della quantità e della complessità dell'informazione scientifica che si può ottenere è stato accompagnato anche dallo sviluppo di nuove procedure bioinformatiche e di elaborazione

dei dati, tra cui le architetture neurali di pathway metabolici o i profili trascrizionali, e la *system toxicology* si è sviluppata proprio per integrare modelli computazionali sempre più complessi.

Oltre a questi aspetti di sviluppo sia tecnologico che delle conoscenze dei meccanismi di azione dei contaminanti, è certamente cambiato il nostro modo di pensare all'ecotossicologia, e siamo passati da un iniziale paradigma di una relazione lineare e continua tra livello di esposizione ed entità della risposta, ad una visione molto più dinamica. Sappiamo che le risposte e le normali funzioni biologiche non sono necessariamente perturbate da basse dosi di esposizione, e anche cambiamenti cellulari precoci possono indicare una pressione ma non riflettersi in un danno, grazie alla presenza di altri meccanismi compensatori o adattativi; solo al di sopra di certi livelli di esposizione e di effetto biologico si arriva alla compromissione di un pathway metabolico o dello stato di salute di un organismo, con effetti che possono divenire irreversibili, e quindi persistere anche se si rimuove il contaminante o il fattore di stress che li ha causati.

Con questi approcci abbiamo iniziato a caratterizzare singoli componenti molecolari che modulano la risposta alla tossicità, tra cui Nrf2, un fattore di trascrizione che regola l'induzione delle difese antiossidanti, molto poco conosciuto negli organismi marini fino a qualche anno fa, nonostante l'importanza dei *biomarker* di stress ossidativo (1). Abbiamo conoscenze molto più dettagliate sui quei sistemi di risposta che tradizionalmente sono considerati come i più specifici nei confronti di specifiche classi di inquinanti, tra cui il sistema del citocromo P450 per la biotrasformazione degli xenobiotici organici, le colinesterasi inibite da pesticidi organo-fosforici e carbammati, le metallotioneine in risposta ai metalli e le condizioni di stress ossidativo di primaria importanza nel modulare la tossicità degli inquinanti. Nel tempo tuttavia, abbiamo chiarito come questi singoli componenti sono tra loro integrati all'interno di pathway e network apparentemente complicatissimi, come quello che lega i meccanismi pro-ossidanti di molti inquinanti chimici con la risposta delle difese antiossidanti (2).

Pur senza entrare in eccessivi dettagli, gli xenobiotici organici (come diossine, IPA, PCB, organo-alogenati), sono noti indurre il sistema di biotrasformazione del citocromo P450, i cui enzimi catalizzano reazioni relativamente semplici da un punto di vista biochimico ma di grandissima importanza da un punto di vista biologico. Lo scopo generale di queste reazioni è quello di trasformare molecole idrofobiche in molecole più solubili e facilmente eliminabili dalla cellula. Il sistema genera tuttavia molti metaboliti e alcuni di questi sono ben più attivi del composto di partenza: noto è il caso del benzo[a]pirene che viene trasformato in un diol-epossido che forma addotti stabili al DNA (acido desossiribonucleico) rendendo cancerogena questa sostanza. I metalli sono spesso dei potenti pro-ossidanti attraverso meccanismi diversi come l'inibizione delle catene di trasporto elettroniche, le reazioni di Fenton e Haber Weiss, la deplezione di antiossidanti e conseguenti danni cellulari che possono ulteriormente aumentare la produzione di ROS ed essere così a loro volta esacerbati. Esistono poi meccanismi forse meno noti, ma ugualmente importanti attraverso cui molte sostanze chimiche generano specie reattive dell'ossigeno, come il ciclo redox in cui un composto inquinante è inizialmente ridotto a specie radicalica, reagisce con l'ossigeno generando anione superossido e tornando alla specie originaria che sarà nuovamente ridotta. Anche la via di trasformazione dei chinoni può avere un ruolo determinante nella insorgenza della carcinogenesi, con idrochinoni e semichinoni (ottenuti da riduzioni mono o bi-elettroniche) che sono apparentemente simili da un punto di vista chimico, ma tossicologicamente molto diversi. Tutte queste vie sono tra loro intimamente connesse, tutte producono e sono modulate da specie reattive dell'ossigeno con complesse interazioni ossidative che a loro volta determinano la comparsa di numerose forme di tossicità cellulare. Tra quelle più frequentemente misurate in ecotossicologia come tipici target cellulari di tossicità ossidativa vi sono i lisosomi, le proteine, i lipidi e il DNA. La comparsa dell'8-idrossi deossiguanosina, ossidazione tipicamente causata dal radicale idrossilico, o la perdita di integrità strutturale del DNA misurata in termini di rotture dei filamenti (test conosciuto come *Comet Assay*) o come

micronuclei, sono tipiche risposte evidenziabili in organismi esposti a contaminanti chimici come gli IPA o metalli (3-11).

Oggi sappiamo inoltre che non sono solo i contaminanti tradizionali a rappresentare un rischio in termini di effetti ecotossicologici, e negli ultimi anni la nostra conoscenza e consapevolezza è aumentata esponenzialmente sui cosiddetti contaminanti emergenti. I primi ad essere evidenziati furono i distruttori ormonali (12), già noti alla fine degli anni '60 del secolo scorso, ma oggi sappiamo molto sulla distribuzione dei farmaci nell'ambiente, plastiche e microplastiche, nanomateriali, o molecole di origine naturale come molti metaboliti o tossine algali. I farmaci sono contaminanti emergenti non perché è da poco che vengono riversati nell'ambiente ma perché solo recentemente è stata descritta la loro rilevanza come contaminanti. Sono numerose le classi di farmaci che si ritrovano comunemente negli ambienti acquatici come anti-infiammatori analgesici, antidepressivi, antiepilettici, regolatori lipidici, antibiotici. Il problema nasce dall'enorme consumo di queste sostanze (oltre 200 tonnellate l'anno di ibuprofene in Italia), spesso il non adeguato smaltimento domestico di questi prodotti e la scarsa efficienza di molti impianti di depurazione, soprattutto quelli più vecchi. Dalla metà degli anni 2000 si è cominciata ad analizzare più sistematicamente la presenza dei farmaci nelle acque, e questi composti sono stati ritrovati non solo nelle acque di scarico, ma anche nei fiumi, nei corsi d'acqua, in mare e, in alcuni casi, anche nelle acque potabili degli acquedotti di molte città (13).

Per quanto riguarda gli effetti che queste sostanze inducono in specie non target dell'ambiente marino, è già stato dimostrato che i mitili possono accumulare numerosi antiinfiammatori, e quindi rappresentano utili bioindicatori per dimostrare la presenza ambientale di composti come il nimesulide il diclofenac e l'ibuprofene; queste sostanze inoltre sono biologicamente attive anche a basse dosi di esposizione, e in grado di attivare in questi organismi una serie di risposte che vanno dalla modulazione dei geni fino ad alterazioni cellulari e fisiologiche (14-15).

Passando dalla scala di laboratorio alla valutazione della diffusione e dell'entità del problema dei farmaci negli ambienti costieri, sono state effettuate recentemente delle analisi nei tessuti di mitili raccolti in numerosi siti della costa adriatica e di quella tirrenica, andando a ricercare la presenza di composti appartenenti alle principali classi di farmaci usati a livello umano tra cui gli antinfiammatori non steroidei, gli antiepilettici, gli antidepressivi e i regolatori lipidici. Il 100% degli organismi analizzati è risultato contenere almeno una delle molecole ricercate, il 92% almeno due, il 66% almeno 3 tipologie di farmaci. Il composto, che è stato ritrovato con maggiore frequenza nei tessuti dei mitili, è la carbamazepina che non a caso è stata recentemente proposta come un affidabile indicatore della presenza antropica, andando a sostituire quello che fino a qualche tempo fa era considerato il piombo. Questi risultati non devono tuttavia generare allarmismo: le metodologie analitiche permettono di misurare livelli molto molto bassi di queste sostanze e in effetti le concentrazioni rilevate nei mitili naturali sono di gran lunga inferiori rispetto, ad esempio, a quelle normalmente assunte ad uso terapeutico. Nonostante non ci sia assolutamente alcun rischio per la salute dell'uomo, è tuttavia evidente una situazione ambientale che non possiamo più ignorare e che evidenzia la necessità di affrontare questo problema attraverso una stretta sinergia tra numerosi attori pubblici e privati. La ricerca scientifica, attraverso l'aumento delle conoscenze e la divulgazione dei risultati, dovrebbe fare da volano per l'educazione e la formazione dei cittadini suggerendo una maggiore attenzione nell'utilizzo e nel corretto smaltimento dei farmaci. La classe medica, seguendo un esempio già promosso in alcuni paesi del nord Europa, a parità di finalità terapeutica, dovrebbe iniziare a prescrivere il principio attivo a minor impatto per l'ambiente e di conseguenza anche l'industria farmaceutica, pur mantenendo come prioritario lo studio dell'effetto terapeutico sull'uomo, dovrebbe tenere in considerazione il destino ambientale di queste molecole; infine l'innovazione tecnologica può investire per migliorare i sistemi di depurazione e di controllo degli scarichi.

Le plastiche e MicroPlastiche (MP) fino a poco tempo fa erano considerate un problema di natura estetica, mentre oggi sappiamo che possono essere ingerite da tutti gli organismi. Oltre a possibili danni fisici o meccanici, preoccupa la grande capacità delle MP di adsorbire contaminanti presenti nell'acqua (una sorta di effetto spugna) e di trasferirli insieme ad altri additivi chimici, agli organismi che le hanno ingerite. Dopo l'ingestione, le microplastiche possono trasferire inquinanti nei tessuti degli organismi, rappresentando dei veri e propri *carrier*, con risposte anche molto sensibili, dal profilo trascrizionale fino ad alterazioni cellulari, soprattutto a carico del sistema immunitario (16). Risultati recenti hanno evidenziato che nel caso di ingestione di MP contaminate, si passa da una tossicità inizialmente dovuta all'effetto fisico delle particelle, poi ad una combinazione di effetti fisici e chimici, mentre a tempi di esposizione più lunghi prevalgono gli effetti chimici dei contaminanti desorbiti (17).

Se farmaci e microplastiche rappresentano solo alcuni esempi di contaminanti emergenti, l'ecotossicologia moderna si deve occupare anche dei cambiamenti climatici (soprattutto il riscaldamento, l'acidificazione e l'ipossia). Questi fattori possono causare effetti tossicologici diretti e compromettere lo stato di salute degli organismi marini, ma possono anche interagire con la presenza di inquinanti, influenzando sia il loro bioaccumulo che la sensibilità degli organismi esposti (18). Realizzare l'importanza di questa complessità e conoscere i meccanismi tossicologici sono aspetti fondamentali per capire le interazioni tra fattori ambientali e prevedere le conseguenze nel breve e nel lungo termine del disturbo ambientale. Per questo motivo oggi, forse come mai prima, l'ecotossicologia ha un ruolo centrale nelle analisi di rischio ecologico che sono tipicamente basate su approcci multidisciplinari. La centralità dell'ecotossicologia (con le sue diverse applicazioni) permette di evidenziare interazioni e fare collegamenti tra le diverse tipologie di indagini e risultati, dalla chimica alla biodisponibilità, dagli effetti molecolari a quelli ecologici, fino a possibili valutazioni sulla salute umana. Da questi modelli concettuali, stiamo passando a veri modelli di elaborazione quantitativa dei dati (19), con l'applicazione di criteri di integrazione ponderata che abbandonano l'approccio tabellare o la logica del risultato peggiore, dando invece un peso all'importanza dei parametri (chimici e biologici) che vengono misurati, all'entità delle differenze che vengono misurate non solo in relazione ai controlli ma anche a delle specifiche soglie (*threshold*). Questo approccio, basato sull'integrazione ponderata di dati chimici ed ecotossicologici, è stato recentemente recepito nella nuova normativa sulla classificazione dei sedimenti sottoposti a movimentazione (il DM 173/2016).

In conclusione, è evidente l'importanza che ha avuto l'ecotossicologia nel comprendere i meccanismi di azione dei contaminanti ambientali, e l'evoluzione che si è avuta con l'utilizzo di nuovi modelli, nuovi approcci metodologici ma anche nuove sfide ecotossicologiche. È tuttavia sentita la necessità di un'azione coordinata a livello nazionale per promuovere un approccio scientificamente rigoroso ma al tempo stesso *user-friendly*, e supportare processi più completi di valutazione del rischio ecologico e di decisioni sito-specifiche.

## Bibliografia

1. Giuliani ME, Regoli F. Identification of the Nrf2-Keap1 pathway in the European eel *Anguilla anguilla*: role for a transcriptional regulation of antioxidant genes in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 2014;150:117-23.
2. Regoli F, Giuliani ME. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar Environ Res* 2014;93:106-17.
3. Barouki R, Morel Y. Repression of cytochrome P450 1A1 gene expression by oxidative stress: mechanisms and biological implications. *Biochem Pharmacol* 2001;61:511-6.

4. Cajaraville MP, Cancio I, Ibabe A, Orbea A. Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Micros. Res Technol* 2003;61:191-202.
5. Copple IM, Goldring CE, Kitteringham NR, Park BK. The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity. *Toxicol* 2008;246:24-33.
6. Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2004;37(12):1921-42.
7. Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res* 2009;674(1-2):137-47.
8. Nikinmaa M, Rytönen KT. Functional genomics in aquatic toxicology-do not forget the function. *Aquat Toxicol* 2011;105(3):16-24.
9. Regoli F, Frenzilli G, Bocchetti R, Annarumma F, Scarcelli V, Fattorini D, Nigro M. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat Toxicol* 2004;68(2):167-78.
10. Regoli F, Giuliani ME, Benedetti M, Arukwe A. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat Toxicol* 2011;105(3):56-66.
11. Stegeman JJ, Lech JJ. Cytochrome P450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ Health Perspect* 1991;90:101-9.
12. Canesi L, Borghi C, Ciacci C, Fabbri R, Lorusso LC, Vergani L, Marcomini A, Poiana G. 2008. Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquat. Toxicol* 2008;87:272-9.
13. Mezzelani M, Gorbi S, Regoli F. Pharmaceuticals in the aquatic environments: evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Mar Environ Res* 2018;140:41-60.
14. Mezzelani M, Gorbi S, Fattorini D, d'Errico G, Benedetti M, Milan M, Bargelloni L, Regoli F. Transcriptional and cellular effects of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) in experimentally exposed mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat Toxicol* 2016;180:306-19.
15. Mezzelani M, Gorbi S, Fattorini D, d'Errico G, Consolandi G, Milan M, Bargelloni L, Regoli F. Long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to diclofenac, Ibuprofen and Ketoprofen: Insights into bioavailability, biomarkers and transcriptomic changes. *Chemosphere* 2018;198:238-48.
16. Avio CG, Gorbi S, Regoli F. Plastics and microplastics in the oceans: from emerging pollutants to emerged threat. *Mar Environ Res* 2017;128:2-11
17. Pittura L, Avio CG, Giuliani d'Errico G, Keiter S, Cormier B, Gorbi S, Regoli F. Microplastics as vehicles of environmental PAHs to marine organisms: combined chemical and physical hazards to the Mediterranean mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Front Mar Sci* 2018;5(103):1-15.
18. Nardi A, Mincarelli LF, Benedetti M, Fattorini D, d'Errico G, Regoli F. Indirect effects of climate changes on cadmium bioavailability and biological effects in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere* 2017;169:493-502.
19. Benedetti M, Ciaprini F, Piva F, Onorati F, Fattorini D, Notti A, Ausili A, Regoli F. A multidisciplinary weight of evidence approach toward polluted sediments: integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environ Intern* 2012;38:17-28.

## **RUOLO DEI SAGGI DI ECO-GENOTOSSICITÀ PER LA PROTEZIONE DELL'AMBIENTE E DELLA SALUTE UMANA**

Roberta Meschini (a), Silvia Filippi (a), Sara Spognardi (b), Patrizia Papetti (c), Dario Angeletti (a)

(a) *Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche, Università della Tuscia, Viterbo*

(b) *Dipartimento di Economia Aziendale, Università di Roma Tre, Roma*

(c) *Dipartimento di Economia e Giurisprudenza, Università di Cassino e del Lazio meridionale, Cassino*

L'eco-genotossicologia è stata definita da Shugart e Theodorakis (1994) come lo studio delle interazioni tra il materiale genetico e gli agenti di origine antropica che lo danneggiano, in relazione ai successivi effetti sulla salute degli organismi. Gli studi di ecotossicologia non possono quindi prescindere da quelli di genotossicologia. Quest'ultima studia gli effetti genotossici mediante l'uso di biomarcatori che identificano l'induzione di danno al DNA. I biomarcatori, a loro volta, costituiscono degli specifici parametri di misurazione che permettono di quantificare l'esposizione e le conseguenze in termini di effetti genetici. Inoltre, tra i biomarcatori possiamo distinguere quelli di esposizione, cioè una sostanza esogena rilevata in un compartimento dell'organismo che identifica e quantifica l'esposizione a genotossici, e quelli di effetto che rappresentano la conseguenza dell'esposizione, possono spaziare da alterazioni a livello di un bersaglio critico a cambiamenti tardivi progressivi e valutano la risposta biologica (Migliore, 2004). Il *Comet Assay* e il saggio del micronucleo (MN test) rappresentano i più rilevanti biomarcatori di effetto. Il primo quantifica il danno primario al DNA, in termini di rotture a singola e doppia elica, e la sua cinetica di riparazione. Tra i principali vantaggi del *Comet Assay* ricordiamo la sua facilità di allestimento, la rapidità di esecuzione, le ridotte quantità di substrato, l'applicazione ad ogni tipo di cellula *in vitro* e *in vivo*, l'elevata sensibilità, e la sua correlazione con altri test di genotossicità (Grandi *et al.*, 2006). Il secondo, invece, valuta il processamento del danno primario al DNA in danno cromosomico espresso in termini di micronuclei. Questi ultimi rappresentano dei piccoli nuclei addizionali che si formano dalla condensazione di frammenti cromosomici o da interi cromosomi che, restando indietro durante il movimento dei cromosomi all'anafase, non sono incorporati nei nuclei principali delle cellule figlie e che originano quindi, rispettivamente, dalla frammentazione dei cromosomi ad opera di agenti clastogeni o dal danneggiamento del fuso mitotico o del centromero di cromosomi interi da parte di agenti aneuploizzanti (Fenech *et al.*, 2016). I principali obiettivi dell'eco-genotossicologia sono quelli di valutare l'effetto degli xenobiotici su organismi di popolazioni naturali come anche di individuare segnali precoci di contaminazione, prima che questa abbia degli effetti sugli ecosistemi e sulla salute umana; in questo caso la ricerca è indirizzata spesso ad individuare e testare potenziali "organismi sentinella" e a standardizzare i protocolli sperimentali (Beeby, 2001; Sebbio *et al.*, 2014). Gli organismi sentinella costituiscono degli organismi, sia animali sia vegetali, in grado di indicare il livello di contaminazione di uno specifico ambiente quale suolo, acqua o aria. A tale scopo, un organismo sentinella dovrebbe essere sensibile, affidabile e consentire l'uso di una metodologia relativamente economica, trasferibile e adeguata. Gli organismi sentinella, quindi, devono avere caratteristiche tali da poter fornire delle misure sensibili ed ecologicamente rilevanti della risposta che può essere indotta dalle variazioni dell'ambiente (Bolognesi & Venier 2004). Inoltre, tali organismi devono poter manifestare delle risposte precoci ai contaminanti ambientali, prima che questi ultimi esercitino i loro effetti sull'ecosistema e sull'essere umano (Bonisoli-Alquati, 2014).

I gasteropodi terrestri del genere *Helix* sono organismi facili da reperire in natura o possono essere acquistati presso aziende agricole. Inoltre, grazie al loro tipo di habitat, la loro scarsa mobilità e il loro comportamento alimentare possono fornire informazioni importanti sulla qualità dell'ambiente. Infatti, il contatto con un agente inquinante può verificarsi attraverso l'ingestione del suolo e della vegetazione, il contatto con il suolo e l'inalazione dell'aria (Sebbio *et al.*, 2014). I gasteropodi terrestri del genere *Helix*, inoltre, hanno la capacità di accumulare diverse classi di sostanze chimiche motivo per cui sono dei potenziali organismi sentinella e una specie idonea per il biomonitoraggio ambientale di metalli, sostanze chimiche inquinanti, inquinamento urbano ed esposizione elettromagnetica (Berger, 1993; Gomot de Vaufleury & Pihan, 2000; Beeby & Richmond, 2003; Viard *et al.*, 2004; Regoli *et al.*, 2006). In questo studio abbiamo utilizzato la comune chiocciola di terra *Helix aspersa*, per rilevare l'effetto mutageno dell'inquinamento causato da una centrale a carbone applicando l'MN test sugli emociti della chiocciola e valutando la concentrazione di elementi in traccia, come arsenico (As), cadmio (Cd), piombo (Pb), mercurio (Hg) e zinco (Zn), nel terreno e nelle chioccioline. In particolare, è stata presa in considerazione la Centrale di "Torvaldaliga Nord" è situata in prossimità della città di Civitavecchia (RM), in Italia centrale. Il carbone è considerato il combustibile più inquinante a livello ambientale (Celik *et al.*, 2007; Northrup, 2013; Rohr *et al.*, 2013). La sua estrazione e combustione causano, infatti, un significativo effetto ambientale sull'aria, sul suolo e sulle risorse idriche nelle aree adiacenti alle Centrali a carbone. I rifiuti di carbone e la combustione del carbone producono Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) e altri composti organici e inorganici (León *et al.*, 2007; Depoi *et al.*, 2008) con potenziali effetti ecotossici, genotossici e cancerogeni sull'uomo e sul biota che determinano un esito rilevante sugli ecosistemi (Finkelman, 1995; Liu *et al.*, 1999; Swaine, 2000; Zhang *et al.*, 2008). In particolare, nel presente studio, chioccioline provenienti da un'azienda agricola biologica sono state esposte per 13 giorni in cinque località situate a diverse distanze dalla centrale a carbone "Torvaldaliga Nord" (Tabella 1) con il fine di comparare la frequenza dei micronuclei negli emociti nelle cinque località rispetto al controllo come anche per verificare se vi fosse una maggiore frequenza di micronuclei nelle chioccioline esposte nelle località più vicine alla centrale.

**Tabella 1. Principali caratteristiche della località di controllo (A) e delle località di esposizione e campionamento di *H. aspersa* (posizioni B-F). Vengono inoltre riportate le rispettive distanze dal camino della centrale**

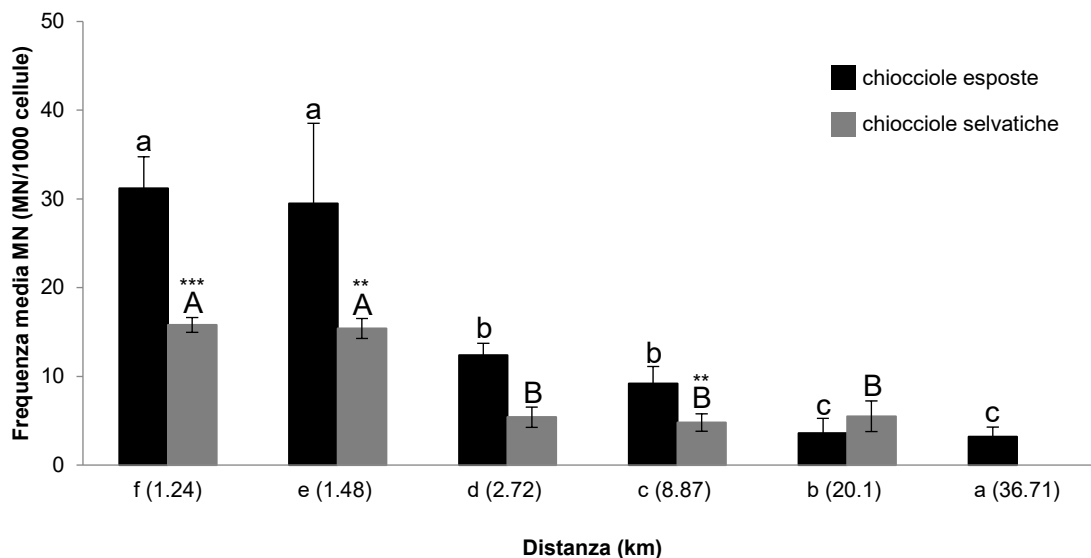
Località	Principali caratteristiche	Distanza dal camino in km
A	Zona collinare (380 m sopra il livello del mare) di agricoltura non intensiva a 4,1 km dall'area urbana più vicina e attraversata da strade sterrate locali	36,71
B	Zona collinare (120 m sopra il livello del mare) di agricoltura non intensiva a 6,2 km dall'area urbana più vicina e attraversata da strade sterrate locali	20,10
C	Zona pianeggiante e semi-naturale vicino al mare (3 m sopra il livello del mare) all'interno della Riserva Naturale "Saline di Tarquinia" a 2,5 km dall'area urbana più vicina e attraversata da una strada pedonale. La Riserva naturale protegge una laguna costiera semi-naturale per la produzione di sale, dismessa nel 1997, in cui non sono consentite attività umane e il transito di automobili	8,87
D	Pineta semi-naturale in zona pianeggiante a due passi dal mare (2 m sopra il livello del mare) a 6,0 km dall'area urbana più vicina (Civitavecchia) e attraversata da una strada sterrata locale	2,72
E	Zona pianeggiante e semi-naturale di agricoltura non intensiva (50 m sopra il livello del mare) a 4,0 km dall'area urbana più vicina (Civitavecchia) e attraversata da strade locali	1,48
F	Area di campi a maggese vicino al mare (5 m sopra il livello del mare), situata tra la centrale a carbone e una zona residenziale periferica a 1,6 km dall'area urbana più vicina (Civitavecchia) e attraversata da strade locali	1,24



Parallelamente, sono state analizzate anche chioccioline selvatiche raccolte nelle medesime località al fine di comparare la frequenza dei micronuclei tra le chioccioline esposte e quelle selvatiche e di verificare se vi fosse anche nelle chioccioline selvatiche una maggiore frequenza di micronuclei nelle località più vicine alla centrale. Infine, sono state analizzate le concentrazioni degli elementi in traccia quali As, Cd, Pb, Hg e Zn che possono derivare dalla combustione del carbone, nel terreno e nei tessuti delle chioccioline sia esposte che selvatiche per verificare la possibile correlazione con la frequenza dei micronuclei. Le cinque località, le cui principali caratteristiche sono descritte nella Tabella 1, sono state selezionate per i seguenti motivi:

- replicare le stesse località considerate nello studio precedente (Angeletti *et al.*, 2013) dove era emersa una correlazione inversa tra la percentuale di DNA nella coda della cometa, parametro assunto quale indice di danno al DNA, e la distanza dalla centrale, suggerendo che il danno primario al DNA diminuiva in funzione dell'aumento della distanza dalla fonte di inquinamento;
- sono luoghi apparentemente non interessati dalla contaminazione proveniente da altre potenziali fonti di inquinamento;
- sono località posizionate sottovento rispetto al camino della centrale e ai venti prevalenti che soffiano nella zona.

I risultati del presente studio relativi alla frequenza dei micronuclei rilevati nelle chioccioline esposte e selvatiche sono illustrati nella Figura 1 nella quale lettere diverse indicano invece differenze significative nelle frequenze dei MN (lettere maiuscole per il confronto tra chioccioline esposte e lettere minuscole per il confronto tra chioccioline selvatiche). Gli asterischi sopra le barre indicano differenze significative tra le chioccioline esposte e quelle selvatiche in ogni località.



**Figura 1. Frequenze medie dei MN nelle chioccioline esposte e selvatiche in funzione della distanza delle sei località (a - f) dal camino della centrale.**

Dalla Figura 1 si evince come la frequenza dei MN rilevati nelle chioccioline esposte fosse significativamente più elevata in quattro località situate entro 10 km dalla centrale rispetto al controllo e alle località più lontane. Inoltre, dal confronto tra la frequenza dei MN riscontrata nelle chioccioline allevate ed esposte e quelle selvatiche, è emersa, in tutte le località tranne la più

lontana, una frequenza significativamente più alta nelle prime, indicando un possibile adattamento o selezione degli organismi selvatici a causa dell'esposizione cronica a sostanze inquinanti. Infine, anche nelle chioccioline selvatiche sono state riscontrate frequenze dei MN significativamente più elevate nelle località situate vicino alla centrale.

L'analisi degli elementi in tracce ha rilevato correlazioni significative tra le frequenze dei MN e le concentrazioni di Zn e As nel suolo, sia per le chioccioline esposte che per quelle selvatiche; inoltre, le frequenze dei MN correlavano significativamente anche con le concentrazioni di Zn e Pb riscontrate nel tessuto delle chioccioline esposte.

I risultati del presente studio dimostrano:

- di essere coerenti con quelli precedentemente ottenuti (Angeletti *et al.*, 2013) nella valutazione del danno primario al DNA mediante il *Comet Assay* effettuato in chioccioline selvatiche provenienti dalla stessa area;
- che le chioccioline sia esposte sia selvatiche residenti vicino alla centrale a carbone presentano un danno citogenetico permanente, espresso in termini di micronuclei;
- l'idoneità delle chioccioline come organismi sentinella adatti al biomonitoraggio di inquinanti ambientali con effetto mutageno.

Concludendo, dati i risultati ottenuti nel nostro organismo sentinella *Helix aspersa* e nei precedenti studi epidemiologici, che indicano come l'area di Civitavecchia fosse già colpita da un'alta incidenza di tumore polmonare e pleurico negli adulti e di disturbi respiratori nei bambini residenti, è consigliabile porre in atto tutte le possibili azioni per ridurre l'inquinamento e il rischio ecologico in quest'area. Inoltre, sia il saggio del micronucleo che quello del *Comet Assay* sono metodi sensibili e affidabili per rilevare l'esposizione a composti con potenziali effetti ecotossici, genotossici e cancerogeni sia sull'uomo sia sul biota.

## Bibliografia

- Angeletti D, Sebbio C, Carere C, Cimmaruta R, Nascetti G, Pepe G, Mosesso P. 2013. Terrestrial gastropods (*Helix* spp) as sentinels of primary DNA damage for biomonitoring purposes: a validation study. *Environ Mol Mutagen* 2013;54:204-212.
- Beeby A. What do sentinels stand for? *Environ Pollut* 2001;112:285-98.
- Beeby A, Richmond L. Do the soft tissues of *Helix aspersa* serve as a quantitative sentinel of predicted free lead concentrations in soil? *Appl Soil Ecol* 2003;22:159-65.
- Berger B, Dallinger R. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environ Mon Assess* 1993;25:65-84.
- Bolognesi C, Buschini A, Venier P. Inquinanti genotossici nell'acqua. In: Migliore L (Ed.). *Mutagenesi ambientale*. Bologna: Zanichelli; 2004. p. 280-95
- Bonisoli-Alquati A. Avian genetic ecotoxicology: DNA of the Canary in a coalmine. *Curr Zool* 2014;60:285-98.
- Celik M, Donbak L, Unal F, Yuzbasioglu D, Aksoy H, Yilmaz S, 2007. Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutat Res* 2007;627:158-63.
- Depoi F, Pozebon D, Kalkreuth W. Chemical characterization of feed coals and combustion-by-products from Brazilian power plants. *Int J Coal Geol* 2008;76:227-36.
- Fenech M, Knasmueller S, Bolognesi C, Bonassi S, Holland N, Migliore L, Palitti F, Natarajan AT, Kirsch-Volders M. Molecular mechanisms by which in vivo exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes in vivo and ex vivo in humans. *Mutat Res* 2016;770:12-25.

- Finkelman RB. Modes of occurrence of environmentally sensitive trace elements in coal. In: Swaine DJ, Goodarzi F (Ed.). *Environmental aspects of trace elements in coal*. Kluwer: Dordrecht; 1995. p. 24-50.
- Gomot de Vaufleury A, Pihan F. Growing snails as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere* 2000;40:275-84.
- Grandi C, D'Ovidio MC, Tomao P. Impiego del comet test in medicina del lavoro e tossicologia industriale: considerazioni e prospettive. *G Ital Med Lav Erg* 2006;28(1):5-13.
- León G, Perez IE, Linares JC, Hartmann A, Quintana M, 2007. Genotoxic effects in wild rodents (*Rattus rattus* and *Mus musculus*) in an open coal mining area. *Mutat Res* 2007;630:42-49.
- Liu GJ, Wang GL, Zhang W. *Study on environmental geochemistry of trace and minor elements in coal*. Jiangsu: University of Mining and Technology Press; 1999.
- Migliore L(Ed.). *Mutagenesi ambientale*. Bologna: Zanichelli; 2004.
- Northrup J, Wittemyer G. Characterising the impacts of emerging energy development on wildlife, with an eye towards mitigation. *Ecol Lett* 2013;16:112-25.
- Regoli F, Gorbi S, Fattorini D, Tedesco S, Notti A, Macchella M, Bocchetti R, Benedetti M, Piva F. Use of the Land Snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: an integrated approach. *Environ Health Persp* 2006;114:63-69.
- Sebbio C, Carere C, Nascetti G, Bellisario B, Mosesso P, Cimmaruta R, Angeletti D. Interspecies variation in DNA damage induced by pollution. *Curr Zool* 2014;60:308-14.
- Shugart L, Theodorakis C. Environmental genotoxicity: Probing the underlying mechanisms. *Environ Health Persp* 1994;102(12):13-17.
- Swaine DJ. Why trace elements are important. *Fuel Process Technol* 2000;65-66:21-23.
- Viard B, Pihan F, Promeyrat S, Pihan JC. Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: Bioaccumulation in soil, Graminaceae and land snails. *Chemosphere* 2004;55:1349-59.
- Zhang Y, Schauer JJ, Zhang Y, Zeng L, Wei Y, Liu Y, Shao M, 2008. Characteristics of particulate carbon emissions from real-world Chinese coal combustion. *Environ Sci Technol* 2008;42:5068-5073.



*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di giugno 2020*

*Stampato in proprio  
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, giugno 2020*