

# GENO-ECOTOSSICOLOGIA NEGLI ECOSISTEMI

Silvana Cacioli

Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma

## Premessa

Ecotossicologia è un termine coniato nel 1969 da René Truhaut, professore all'Università di Parigi di tossicologia, disciplina dalla quale ha preso principi e metodi, applicati però all'Ecologia, definendola: "branca della tossicologia che tratta degli effetti diretti o indiretti di sostanze naturali e di contaminanti artificiali sugli organismi viventi". Il potenziale genotossico di contaminanti ambientali è la capacità di produrre alterazioni alla macromolecola del DNA. Qualsiasi sostanza, nessuna esclusa, può causare danni e/o morte dell'organismo, qualunque sostanza, può diventare tossica con l'aumento della dose, mentre nessuna sostanza che non sia genotossica può diventarlo con l'aumento della dose, dato che la genotossicità richiede la possibilità di agire sul DNA, e ciò dipende esclusivamente dalla struttura chimica del composto.

## Introduzione

Composti organici e inorganici provenienti da rifiuti industriali, dall'attività agricola, dall'allevamento vengono scaricati nei corsi d'acqua o rilasciati nel terreno dove possono penetrare e diffondersi causando contaminazioni di suolo, di acque superficiali fino ad arrivare alle falde acquifere. Tali sostanze, soprattutto se persistenti nell'ambiente, possono costituire una fonte di rischio per la salute di tutti gli organismi, uomo compreso, sia direttamente che indirettamente attraverso il metabolismo. Gli effetti dell'interazione tra organismi e agenti contaminanti (xenobiotici) possono essere distinti in tre principali categorie:

- *Effetto tossico*: è il grado con cui una sostanza può danneggiare la capacità di un organismo di funzionare nel suo ambiente; si parla di tossicità acuta quando questa capacità viene distrutta, viene inibita cioè la progressione del ciclo cellulare e la mitosi. Livelli superiori di tossicità possono indurre letalità cellulare. La tossicità è cronica quando la capacità di funzionare dell'organismo è compromessa riducendo la sua competitività.
- *Effetto genotossico*: è la capacità di contaminanti di indurre alterazioni alla molecola del DNA, provocare cioè un danno primario o pre-mutazionale in quanto solo potenzialmente mutageno; le cellule, infatti, sono provviste di meccanismi di riparazione per cui non tutti i danni primari si tramutano in mutazioni in conseguenza dell'efficienza o meno dei processi di riparazione messi in atto dalla cellula per la loro rimozione.
- *Effetto mutageno*: è dovuto all'induzione di variazioni permanenti e trasmissibili nelle sequenze del materiale genetico delle cellule. Queste mutazioni possono interessare singoli geni, blocchi di geni, interi cromatidi.

Quali sono le conseguenze di una mutazione cellulare?

- se il danno non può essere riparato, segue la morte cellulare;
- se il danno genetico non è riparato, ma è compatibile con la sopravvivenza, segue la malattia; è il caso delle malattie, come il cancro, che possono impiegare molti anni per manifestarsi.

Gli effetti tossici spesso si manifestano in un tempo relativamente breve dopo l'esposizione (Brusick, 1987), alcune sostanze tossiche inoltre possono esprimere anche un effetto mutageno, ma questo si manifesta solo a concentrazioni inferiori a quelle tossiche a causa del prevalere degli effetti citotossici o letali indotti da queste ultime. Infatti, l'effetto mutageno di uno xenobiotico aumenta con l'aumentare della concentrazione e raggiunge un massimo in corrispondenza di dosi che non inducono elevata tossicità.

## Test di ecotossicità, genotossicità

### Test di ecotossicità

Il saggio ecotossicologico è un esperimento biologico atto a verificare se un composto, potenzialmente tossico, o un campione ambientale, causa una risposta biologica rilevante negli organismi utilizzati per il test.

I saggi ecotossicologici sono generalmente applicati sulle seguenti matrici:

- acque superficiali
- acque sotterranee
- scarichi civili
- scarichi industriali
- suoli di siti contaminati
- sedimenti fluviali

Questi test prevedono l'impiego di specie (animali e vegetali) sensibili; poiché non esiste una singola specie adatta ad esprimere gli effetti di tutti i possibili tossici, è necessario utilizzare una serie di organismi, con una diversa sensibilità nei confronti delle sostanze tossiche.

Il parametro osservato e misurato (*endpoint*) nei differenti gruppi di organismi può essere la mobilità, la sopravvivenza, la dimensione o crescita, il numero di uova o figli, oppure qualsiasi variabile biochimica o fisiologica che può essere attendibilmente quantificata. Le osservazioni possono essere effettuate dopo uno o più periodi di esposizione prefissata. Solitamente, gli organismi vengono esposti a differenti concentrazioni o dosi di una sostanza di prova o di un campione (acqua di scarico, fango di depurazione, suolo, sedimento fluviale, ecc.) diluiti in un mezzo opportuno.

Un gruppo di organismi (gruppo di controllo) non è sottoposto alla sostanza di prova o al campione, ma è trattato esattamente nello stesso modo degli organismi esposti.

La batteria di test ecotossicologici deve comprendere individui appartenenti almeno a 3 livelli diversi della catena alimentare, selezionata in base alla rappresentatività ecologica, in funzione cioè del tipo di ambiente sul quale verrà effettuata l'indagine e dell'obiettivo prefissato:

1. un'alga: organismo unicellulare (*Pseudokirchneriella subcapitata*)  
È l'organismo unicellulare con cui si valuta l'inibizione della crescita e rappresenta un test cronico (72 h). La risposta finale ad una eventuale sostanza tossica presente nel campione testato si manifesta mediante una inibizione della proliferazione delle cellule algali (UNI EN ISO 8692; OECD, 2011);
2. un batterio: organismo unicellulare (*Vibrio fischeri*)  
Il batterio *Vibrio fischeri*, organismo unicellulare con cui si valuta l'inibizione della bioluminescenza, rappresenta un test acuto (15 min). Il saggio con batteri bioluminescenti sfrutta la naturale capacità di questi batteri marini di emettere luce se si trovano nelle condizioni ottimali (UNI EN ISO 11348-3);

3. un invertebrato: organismo pluricellulare (*Daphnia magna*)

Il crostaceo *Daphnia magna*, organismo pluricellulare, rappresenta un test acuto. I neonati di meno di 24h vengono immessi nel campione da analizzare e dopo un periodo di tempo prestabilito (24 - 48h) si osserva la percentuale di individui sopravvissuti o immobilizzati (APAT IRSA-CNR, 2003; OECD, 2012).

Per una maggiore rappresentatività ecologica, si effettuano anche test di fitossicità della durata di 72 ore, con semi di piante mono e dicotiledoni, come il sorgo (*Sorghum saccharatum*), il crescione (*Lepidium sativum*) e la senape bianca (*Sinapis alba*) sia su matrici acquose che solide (sedimenti, fanghi di depuratori e compost). Vengono verificati due *endpoint*, ovvero la germinazione dei semi e l'allungamento radicale.

## Test di genotossicità

Nelle cellule esiste un sistema deputato alla riparazione delle lesioni al DNA, la cui espressione viene attivata a seconda del tipo di danno prodotto e della fase in cui si trova la cellula. Il sistema SOS (*Son Of Sevenless*) è costituito da numerosi geni (più di 15) di cui risultano molto importanti i geni *lexA*, *recA* e *umuDC*. Alcuni geni SOS possono essere indotti quando i danni del DNA sono pochi o lievi, altri entrano invece in funzione solo quando il danno al DNA è persistente e grave (Grimaldi, 2006).

I test di genotossicità si basano sulla fusione di uno dei geni coinvolti in questo sistema di riparazione (gene bersaglio) con il gene *LacZ* che codifica per la  $\beta$ -galattosidasi (gene reporter) che può essere evidenziato attraverso un cambiamento di colore. Si tratta infatti di test colorimetrici. Poiché l'induzione della risposta SOS è strettamente correlata alla presenza del danno al DNA, il trattamento con sostanze ad attività mutagena è in grado di attivare, in maniera dose-dipendente, l'espressione del gene SOS di interesse (ISO 11350:2012).

Alcuni composti xenobiotici potrebbero non agire come mutageni in quanto tali, ma necessitano di una attivazione metabolica per esprimere il potenziale genotossico e quindi si usa fare l'esperimento con e senza l'aggiunta dell'estratto post mitocondriale S9 preparato dal fegato di ratto pretrattato con ALOCOR 1254.

## SOS-chromo test

È progettato per una rapida rilevazione del danno al DNA e utilizza meccanismi propri della cellula. In particolare il test adopera un ceppo di *Escherichia coli* (PQ37) che porta un plasmide in cui il gene *lacZ* per la  $\beta$ -galattosidasi è fuso con il gene *sfiA*, uno dei geni coinvolti nella risposta SOS. In questo modo l'attività della  $\beta$ -galattosidasi diventa strettamente dipendente dall'espressione del gene *sfiA*; pertanto rilevare la presenza di  $\beta$ -galattosidasi, che può essere evidenziato attraverso un cambiamento di colore, equivale a rilevare l'induzione del gene *sfiA*. I ceppi di *E. coli* PQ37 presentano, inoltre, altre caratteristiche genetiche volte a migliorarne la sensibilità nei confronti degli agenti mutageni. Il ceppo porta, infatti, le mutazioni *rfa* e *uvrA* che aumentano la permeabilità dell'involucro cellulare per consentire la penetrazione anche di sostanze tossiche di maggiore dimensione.

## Umu-chromo test

Quando il batterio *Salmonella typhimurium* TA 1535 [pSK 1002] viene esposto ad una sostanza genotossica, il danno a livello del DNA, induce la risposta SOS della cellula. Il plasmide

pSK1002 contiene il gene *umuC* fuso con il gene *lacZ*. L'induzione di questo gene, quindi, è una misura del potenziale genotossico del campione. Visto che il gene è fuso con il gene *lacZ* per la  $\beta$ -galattosidasi, l'induzione di *umuC*-gene può essere facilmente valutato dall'attività della  $\beta$ -galattosidasi, attraverso la conversione colorimetrica da incolore a giallo. Come in altri test genotossici, alcuni xenobiotici hanno bisogno di essere attivati con l'aggiunta dell'estratto microsomiale di estratto di fegato di ratto S9 (ISO 13829:2000).

## Test di mutagenesi

### Test di Ames

Il test di Ames, in cui l'*endpoint* è un netto cambiamento di colore, si basa sul concetto di reversione della mutazione: in un ceppo di individui mutanti nell'operone che codifica la sintesi dell'Histidina, può capitare che avvenga una nuova mutazione che ristabilisca la situazione originaria. Il test di Ames sfrutta questa loro capacità per determinare il potere mutageno delle sostanze.

Grazie a questa possibilità, in un ceppo di mutanti auxotrofi possono nascere, spontaneamente o indotti da un mutageno, individui prototrofi, cioè in grado di sintetizzare da soli la sostanza che i mutanti non erano più in grado di sintetizzare. Questi revertanti sono quindi in grado di crescere su terreno minimo.

La maggior parte dei ceppi di *Salmonella* utilizzati nel test presentano anche altre mutazioni che alterano la permeabilità della parete consentendo l'ingresso nel batterio di mutageni anche di grosse dimensioni, o eliminano l'azione dei meccanismi di riparo del DNA permettendo in tal modo il mantenimento delle mutazioni ottenute (ISO 16240:2005). La norma (OECD Guideline 471) indica l'utilizzo di quattro ceppi di *Salmonella typhimurium* e uno *Escherichia coli* per evidenziare mutazioni puntiformi che comprendono sostituzione, addizioni e delezioni di uno o più coppie di basi. Le mutazioni puntiformi sono la causa di molte malattie genetiche umane.

### Muta chromo-Ames test a 96 pozzetti

È la versione a 96 pozzetti dell'Ames. L'*endpoint* è un netto cambiamento di colore. Il test impiega ceppi mutanti di *Salmonella typhimurium*, con mutazione/i nell'operone che codifica la sintesi dell'Histidina. Quando il batterio viene esposto ad agenti mutageni, avviene una retro mutazione da aminoacido (histidina) auxotrofo a prototrofo\*.

Se il batterio riacquista la sua capacità, vuol dire che è avvenuta una retromutazione e il batterio riassume la capacità di sintetizzare l'histidina e cresce virando il colore viola del pozzetto in giallo. Si confronta la piastra di controllo con quella con il campione.

Il test si effettua in presenza e in assenza dell'enzima di attivazione S9 (estratto di fegato di ratto per fornire gli enzimi epatici che possono metabolizzare la sostanza da testare). Questo si fa perché la sostanza potrebbe non agire come mutageno in quanto tale, ma potrebbe agire una volta metabolizzata.

---

\* Un organismo *auxotrofo* non è in grado di sintetizzare una molecola organica che è richiesta per la sua crescita: quando questo composto viene fornito all'organismo con gli altri nutrienti che richiede, allora la crescita dell'organismo può verificarsi. Un batterio si definisce *prototrofo* quando per crescere richiede un terreno minimo senza bisogno di sostanze organiche aggiunte.

## Test dei Micronuclei in semi di *Vicia faba*

Il test dei micronuclei (*MicroNucleus test*, MN-test) rappresenta un indice del danno genetico che un organismo esposto ha accumulato durante la vita. È in grado di misurare sia gli effetti clastogeni, che producono cioè rotture alla doppia elica del DNA, sia gli effetti aneugeni, che inducono mal distribuzione cromosomica e aneuploidia (White & Claxton, 2004; Ohe *et al.*, 2014).

Grazie alla sua elevata sensibilità, questo test viene eseguito in cellule di un gran numero di specie sia acquatiche che terrestri, sia animali che vegetali (Bolognesi & Hayashi, 2011; Foltête *et al.*, 2011; Ferretti *et al.*, 2012). Per il basso costo e per limitare l'utilizzo di animali da laboratorio, si possono utilizzare gli apici radicali di semi di *Vicia faba* (Figura 1) (Gustavino *et al.*, 2013); tale test per l'affidabilità e sensibilità rappresenta uno dei metodi maggiormente utilizzati negli studi di genotossicità degli ambienti acquatici.



Figura 1. *Vicia faba*: differenti varietà di semi secchi

I micronuclei, provvisti di una propria membrana nucleare, sono piccoli corpi extranucleari di dimensioni inferiori rispetto al nucleo principale, che si riscontrano in cellule in interfase. La loro comparsa è legata alla formazione, durante la divisione cellulare, di frammenti cromosomici o alla perdita di interi cromatidi (mitotica o meiotica) che, non legandosi alle fibre del fuso, risultano esclusi dal processo di segregazione dando origine al micronucleo (Figura 2) (Gustavino *et al.*, 2013).

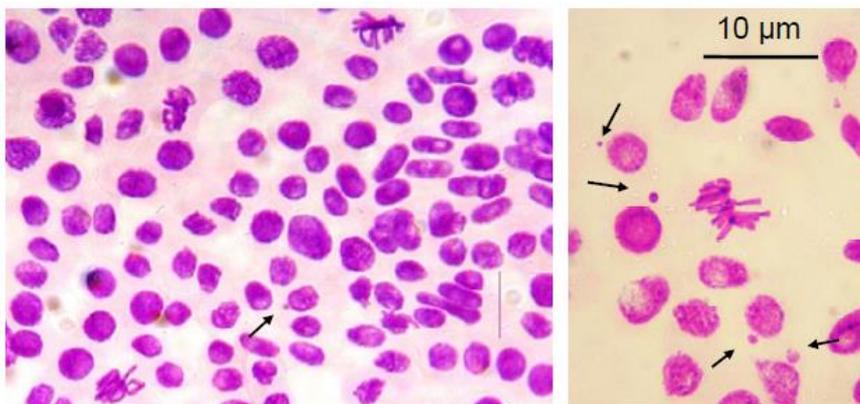
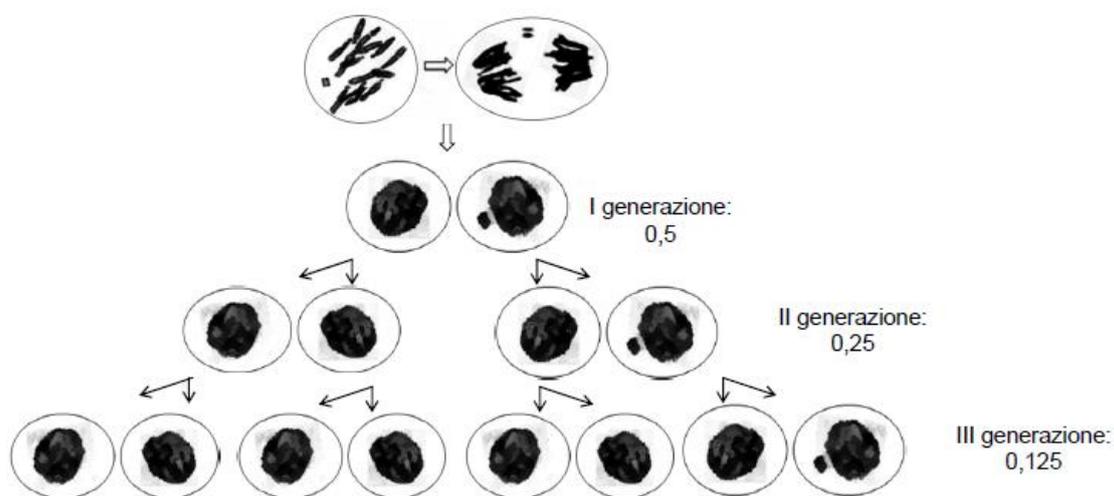


Figura 2. Micronuclei in cellule di apici radicali di *Vicia faba* al microscopio ottico (indicati da frecce). L'attività proliferativa dei tessuti esaminati è dimostrata dalla presenza di mitosi (colorazione Feulgen)

Dal momento della loro comparsa, la frequenza dei micronuclei raggiunge il valore massimo per poi diminuire attraverso le generazioni, poiché ad ognuna di esse si dimezza il numero di cellule che li ereditano (Figura 3) (Gustavino *et al.*, 2013). Inoltre, un'ulteriore riduzione della loro frequenza può essere determinata da meccanismi di eliminazione delle cellule micronucleate per incompatibilità con la sopravvivenza cellulare dovuta agli effetti genetici della mutazione, o dalla possibilità che i cromosomi all'interno dei micronuclei vengano reintegrati nel nucleo principale durante le mitosi successive (Rizzoni *et al.*, 1989; Gustavino, 2006).



**Figura 3. Insorgenza di un micronucleo, a partire dalla formazione di un frammento cromosomico rilevato in mitosi (delezione), presente in una delle due cellule figlie prodotte dalla prima divisione mitotica (la sua frequenza iniziale viene dimezzata ad ogni ciclo di divisione cellulare successivo, risultando 1/4 nella popolazione di II generazione, e 1/8 in quella di III generazione)**

La durata del tempo di esposizione all'agente di cui si vuole studiare l'effetto mutageno può influenzare notevolmente la risposta della cellula nella induzione dei micronuclei. Si possono verificare due situazioni:

- *esposizione breve*: può già essere efficace nell'indurre frammentazione cromosomica e manifestare immediatamente l'aumento della frequenza dei micronuclei e in tempi prolungati può determinare l'arresto della proliferazione e/o morte delle cellule;
- *esposizione prolungata*: simile ad un'esposizione cronica in quanto l'effetto mutageno è lieve e risulta compatibile con la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule. La formazione dei micronuclei, dopo un'iniziale aumento, sarà costante.

È importante quindi predisporre un protocollo che preveda entrambe le esposizioni per evitare valutazioni errate sul potenziale mutageno dei contaminanti ambientali esaminati.

### **Controllo negativo**

Come nella progettazione di qualsiasi saggio biologico, almeno un gruppo di organismi non è sottoposto alla sostanza di prova o al campione, ma è trattato esattamente nello stesso modo degli organismi esposti per misurare la frequenza spontanea degli eventi mutazionali. Il gruppo di radici utilizzate come controllo negativo vengono esposte all'acqua fino ai tempi stabiliti dal protocollo.

## Controllo positivo

Allo scopo di dimostrare l'effettiva sensibilità del sistema biologico utilizzato, si inserisce un ulteriore punto sperimentale. Un gruppo di piantine viene sottoposto a trattamento con un agente mutageno forte come l'Idrazide Maleica diluita alla  $10^{-4}$  M per 4 ore, seguito da 44 o 68 ore di recupero in acqua di fonte.

## Analisi dell'indice mitotico e della frequenza dei micronuclei

L'analisi della frequenza dei micronuclei si effettua al microscopio ottico selezionando l'area di osservazione in base alla buona colorazione dello strato cellulare e alla presenza di un abbondante numero di mitosi. Lo stato proliferativo delle cellule esaminate influenza la frequenza dei MN, infatti, se l'analisi venisse effettuata in popolazioni di cellule non proliferanti, il risultato ottenuto sarebbe negativo poiché, anche nel caso in cui il campione fosse altamente mutageno, non si osserverebbe la comparsa dei MN a causa del blocco delle mitosi (Figura 2). La stima dell'indice mitotico, è dato dal rapporto numerico tra cellule in fase mitotica e il totale delle cellule esaminate.

Per effettuare l'analisi statistica dei dati ottenuti sono disponibili diversi programmi per PC, facilmente reperibili e di facile applicazione. I dati ottenuti dal conteggio dei micronuclei per la stima dell'eventuale effetto mutageno di uno xenobiotico è dato dal confronto binario eseguito tra la frequenza dei micronuclei del campione negativo rispetto alla frequenza rilevata in ciascuno dei punti sperimentali (es. il test di Mann-Whitney).

La frequenza dei micronuclei viene studiata analizzando per ogni punto sperimentale 10.000 cellule per apice per almeno 10 apici, per un totale di 100.000 cellule per punto sperimentale.

## Bibliografia

- APAT, IRSA-CNR. Sezione 8000 - Metodi ecotossicologici. In: *Metodi analitici per le acque*. Roma: Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici; 2003. (APAT Manuali e linee guida 29/2003).
- Bolognesi C, Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 2011;26:205-13.
- Brusick D. *Principles of genetic toxicology* - Second Edition. New York: Plenum Press; 1987.
- Feretti D, Ceretti E, Gustavino B, Zerbini I, Zani C, Monarca S, Rizzoni M. Ground and surface water for drinking: a laboratory study on genotoxicity using plant tests. *Journal of Public Health Research* 2012;1:31-7.
- Foltête AS, Dhyèvre A, Féraud JF, Cotellet S. Improvement of Vicia-micronucleus test for assessment of soil quality: a proposal for international standardization. *Chemosphere* 2011;85:1624-29.
- Grimaldi IL. *Come funziona il sistema SOS di correzione del DNA?* viaLattea.net. Categoria: Biologia Molecolare e Genetica: Scienze Biologiche. Views:4321; 18/11/2006. Disponibile all'indirizzo: <https://www.vialattea.net/content/2784/>; ultima consultazione 05/02/2018).
- Gustavino B, Caciolli S, Mancini L (Ed.). *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).
- Gustavino B. Applicazione dei test di mutagenesi al monitoraggio ambientale. In: Cassoni F, Bocchi C (Ed.). *Atti del corso di formazione nazionale. Quaderno ARPA*. Bologna: IGTM; 2006. p. 50-9.

- ISO 11350. *Determination of the genotoxicity of water and waste water – Salmonella/microsome fluctuation test*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.
- ISO 13829. *Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water using the UMU test*. Geneva: International Organization for Standardization; 2000.
- ISO 6341. *Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test*. Geneva: International Organization for Standardization; 2012.
- ISO16240. *Water quality - Determination of the genotoxicity of water and waste water- Salmonella/microsome test (Ames test)*. Geneva: International Organization for Standardization; 2005.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test*. Paris: OECD Publishing; 2011. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2)
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*. Paris: OECD Publishing; 2012. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2).
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). *Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test*. Paris: OECD Publishing; 1997. (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4).
- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res* 2004;567:109-49.
- Rizzoni M, Tanzarella C, Gustavino B, Degrassi F, Guarino A, Vitagliano E. Indirect mitotic nondisjunction in *Vicia faba* and Chinese hamster cells. *Chromosoma* 1989;97:339-46.
- UNI EN ISO 11348-3. *Water quality-Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of Vibrio fischeri (Luminescent bacteria test). Method using frized-dried bacteria*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione 2007.
- UNI EN ISO 8692. *Water quality-Freshwater algal growth inhibition tests with unicellular green algae*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2005.
- White PA, Claxton LD. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat Res* 2004; 567:227-345.