



**UNIVERSITÀ
DEL SALENTO**

**Progetto GENE0 - SISTEMI DI VALUTAZIONE DI
DIAGNOSI PRECOCE DELLE CORRELAZIONI TRA
GENOTOSSICITA' DEI SUOLI E NEOPLASIE IN AREE A
RISCHIO PER LA SALUTE UMANA**

Relazione scientifica finale

Analisi di bioassay e biomarker in organismi sentinella

Dott. Antonio Calisi



Sommario

INTRODUZIONE.....	3
PIANO DI LAVORO.....	5
RISULTATI.....	8
Test di tossicità acuta.....	9
Test di tossicità cronica.....	10
Metallotioneine.....	10
Acetilcolinesterasi.....	13
Test dei Micronuclei.....	13
CONCLUSIONI.....	15
BIBLIOGRAFIA.....	16



INTRODUZIONE

Il monitoraggio biologico del suolo è rivolto alla valutazione della qualità del suolo mediante l'utilizzo di organismi viventi. Questi ultimi possono essere utilizzati in laboratorio nelle prove di tossicità oppure osservati nel loro ambiente naturale e rappresentare indicatori delle condizioni ambientali. La caratterizzazione chimica del suolo, infatti non consente, da sola, di esprimere valutazioni relative al pericolo per gli organismi viventi derivanti dai contaminanti presenti; è necessario, pertanto, ricorrere agli strumenti biologici ed eco tossicologici per una valutazione di rischio complessiva. L'effetto biologico è legato alla frazione biodisponibile delle sostanze contaminanti che, a sua volta, dipende dalle sostanze chimiche presenti e dalle condizioni ambientali. Questa consapevolezza spinge alla necessità di utilizzare in maniera integrata con l'approccio chimico il monitoraggio biologico per una corretta valutazione del rischio tossicologico derivante dalla contaminazione del suolo. Le vie di esposizione degli organismi ai contaminanti presenti nel suolo sono rappresentate prevalentemente dal contatto con l'acqua interstiziale, dall'ingestione del suolo e della sostanza organica in esso presente, dalla respirazione dell'aria interstiziale.

Nei programmi di biomonitoraggio ambientale le risposte biologiche a stress chimico, definite *biomarker*, vengono misurate in organismi bioindicatori. Definiamo "organismi bioindicatori" tutti quegli organismi che attraverso una serie di reazioni biochimiche, fisiologiche, morfologiche, ecc. facilmente identificabili forniscono informazioni sulla qualità ambientale (Bargagli et al., 1998). Il termine "bioindicatore" va distinto da quello di "bioaccumulatore", che indica, invece, un "organismo in grado di sopravvivere alla presenza di un contaminante, assimilato dalle matrici ambientali accumulandolo e permettendone una qualificazione e una quantificazione" (Lagadic et al., 2000). Quindi bioindicatore è un organismo vivente che, in presenza di un inquinante o miscele di inquinanti, subisce variazioni rilevabili dello stato naturale. Un organismo può quindi essere considerato un buon bioindicatore qualora manifesti reazioni identificabili a differenti concentrazioni di dati inquinanti. La scelta delle specie bioindicatrici deve essere ponderata attentamente in un programma di biomonitoraggio. Infatti, le specie bioindicatrici devono essere sufficientemente stanziali per essere indicativi dell'area da monitorare, inoltre devono essere abbondanti e facili da campionare. In particolare, la scelta dello strumento di bioindicazione sarà consequenziale alla scala topografica del progetto di studio. Per la valutazione della presenza e degli effetti degli inquinanti derivanti da sorgenti puntiformi in un ambito locale si impone la scelta di specie a ristretta mobilità; mentre l'impatto complessivo di tutte le attività di un grande bacino



deve essere monitorato attraverso l'uso di specie ad ampia mobilità, con preferenza appartenenti ad un livello trofico elevato e quindi capaci di una buona integrazione. Inoltre, per un corretto utilizzo delle specie bioindicatrici si deve avere una buona conoscenza delle loro caratteristiche anatomiche, fisiologiche ed ecologiche (Lowe & Kendal., 1990) e della variabilità naturale dei parametri scelti per poter apprezzare correttamente le variazioni dovute alla contaminazione chimica. Attenzione va posta alla selezione degli organismi oggetto d'indagine, poiché la loro scelta potrebbe determinare risultati assai differenti. Tra gli organismi terrestri, anellidi, aracnidi e isopodi, sono i gruppi più rappresentativi delle comunità di invertebrati edafici e, pertanto, sono potenziali candidati da utilizzare come bioindicatori negli studi di biomonitoraggio ambientale (Spurgeon et al. 1996). Tra i rappresentanti più importanti della catena del detrito del suolo, troviamo gli anellidi oligocheti (Lombrichi).

I lombrichi sono organismi molto importanti per la formazione del suolo e la degradazione della materia organica nella maggior parte degli ambienti terrestri e tradizionalmente sono stati considerati indicatori della fertilità del suolo (Lionetto et al., 2012). Essi contribuiscono alla pedogenesi del suolo, influenzandone le proprietà fisiche, chimiche e microbiologiche (Barlett et al., 2010) migliorandone la fertilità. In particolare lombrichi possono aumentare la mineralizzazione e l'umificazione della sostanza organica mediante la respirazione e i processi di digestione (Lavelle e Spagna 2001). Possono inoltre stimolare indirettamente la massa microbica e la loro attività nonché la mobilitazione dei nutrienti, aumentando la superficie di particelle organiche (Emmerling & Paulsch 2001). Inoltre, con la loro attività scavatoria contribuiscono significativamente ad aumentare il passaggio dell'acqua e l'aerazione del suolo. Il ruolo dei lombrichi nella decomposizione della materia organica e riciclo dei nutrienti ha sollevato l'interesse del loro uso come organismi indicatori per l'impatto degli inquinanti nel suolo. Questi organismi, infatti, sono sensibili ai contaminanti chimici (in quanto si comportano come efficienti accumulatori di metalli pesanti, e sono fortemente sensibili all'azione di numerosi tipi di pesticidi), sono facili da mantenere in condizioni controllate di laboratorio, inoltre possiedono molte delle caratteristiche che, in linea generale, sono richieste ad un organismo bioindicatore:

- Ampia distribuzione geografica (presenti in ambienti terrestri ed anche in ecosistemi acquatici, ad eccezione delle aree caratterizzate da un'eccessiva e permanente disidratazione o da temperature estremamente rigide per la maggior parte dell'anno)
- Semplice reperibilità stagionale
- Semplicità di campionamento



- Omogeneità genetica e lungo ciclo vitale
- Semplicità di identificazione sistematica
- Approfondita conoscenza dei suoi vari aspetti fisiologici ed ecologici (Edwards and Bohlen, 1996)

Essi sono, pertanto, ampiamente utilizzati negli studi ecotossicologici sul suolo (EEC 1985; Kokta 1992; OECD 1984, 2004; Van Gestel et al 1989a,b, 1995). L'utilizzo di lombrichi nella valutazione ecotossicologica dei suoli è stato sviluppato a partire dagli anni '80 e, successivamente, è stato standardizzato in diversi protocolli applicativi (EPA, OECD, EEC, ecc.). Il vantaggio di tale metodologia è rappresentato dall'assenza di trattamenti della matrice e, quindi, dalla possibilità di poter testare la tossicità del terreno oggetto di studio direttamente sui campioni di suoli tal quali e non su estratti acquosi. Inoltre, i lombrichi sono organismi che hanno come habitat naturale il suolo e, pertanto, possono rappresentare ottimi indicatori dello stato di salute di quest'ultimo.

PIANO DI LAVORO

Sono stati allestiti dei tests di tossicità acuta e cronica utilizzando l'organismo bioindicatore *Eisenia foetida*. I test di tossicità sono stati allestiti con riferimento alle norme ISO (ISO 11268-1; ISO 11268-2). *Eisenia foetida*, una specie di anellide oligochete ampiamente utilizzata sia in agricoltura per la produzione di humus, sia in ambito ecotossicologico per test di tossicità sul suolo.

La tossicità acuta dei campioni di terreno in esame è stata quantificata attraverso l'applicazione di un test che consiste nel misurare la mortalità degli animali dopo 14 giorni di esposizione al terreno da analizzare. Il test di tossicità cronica valuta invece gli effetti tossici provocati da tempi di esposizioni prolungati. In tal caso il test ha una durata maggiore, corrispondente a 8 settimane in modo da poter osservare la crescita degli organismi, lo sviluppo e la produzione della prima generazione. Infatti, in questo test si valutano gli effetti negativi sulla riproduzione della specie test.

Quindi per effettuare tali test sono stati acquistati circa 50.000 lombrichi della specie suindicata e sono state allestite delle vasche di mantenimento (Fig.1.) all'interno dell'orto botanico dell'Università del Salento.



Fig. 1. Vasca di mantenimento

Quindi dopo un periodo di acclimatamento sono stati prelevati circa 750 lombrichi i quali sono stati utilizzati per la messa a punto dei test di tossicità acuta e cronica. Sono stati utilizzati per la prova unicamente lombrichi adulti, sessualmente maturi, con età compresa tra 2 mesi e 1 anno e dotati di clitello ben sviluppato. I lombrichi sono stati acclimatati per 1-7 giorni in terreno artificiale (preparato secondo le Linee Guida 207 dell'OECD). Durante questo periodo i lombrichi sono stati nutriti con lo stesso cibo che è stato poi utilizzato durante il saggio.

I dati ottenuti sono serviti per poter effettuare dei confronti tra il tempo di partenza dei test di esposizione ($t=0$) e il tempo di rimozione degli animali dai box contenenti i terreni da controllare ($t=30$), la conta della mortalità è stata effettuata dopo 14 giorni di esposizione ($t=14$).

I lombrichi sono stati esposti a campioni di terreno proveniente dai comuni delle aree individuate sulla base di dati pregressi di ASL, LILT e ISTAT di incidenza e mortalità tumorale nei 97 territori comunali della provincia di Lecce, prelevati entro i primi 50 cm di profondità. Prima dell'inizio dei tests, i terreni oggetto di valutazione sono stati reidratati (Fig. 2.) con una quantità di acqua distillata pari al 15-20% del peso totale delle quantità da analizzare (1 Kg per box). Tale reintegrazione ha fornito ai terreni l'umidità necessaria affinché gli animali utilizzati non avessero stress di tipo idrico.



Fig.2. Fase di reidratazione dei terreni

In accordo con le indicazioni del metodo standard, i contenitori all'interno dei quali è stato eseguito il test avevano una capacità di 1 litro e un'area di sezione trasversale all'incirca di 200 cm², in modo da raggiungere l'altezza di circa 5-6 cm di substrato umido quando si aggiunge una quantità equivalente a 500-600 g di sostanza secca.

È stata realizzata sui contenitori una copertura trasparente e forata in modo da permettere lo scambio gassoso tra il substrato e l'atmosfera, permettere l'accesso della luce e, soprattutto, per prevenire la fuga dei lombrichi (Fig.3.). All'interno di ogni contenitore sono stati posti 10 lombrichi e, tali contenitori, sono stati alloggiati all'interno di una camera climatizzata. Ogni determinazione è stata effettuata in tre repliche.



Fig.3. Allestimento dei tests

I lombrichi sono stati accuratamente lavati e asciugati e, successivamente posizionati su carta assorbente per un breve periodo, per permettere l'eliminazione dell'acqua in eccesso.

Gli animali utilizzati avevano un peso iniziale unitario omogeneo e sono stati sottoposti alle seguenti condizioni di prova: aerazione continua, umidità controllata, temperatura di 20 + 2 °C. Il



saggio è stato effettuato con cicli controllati di luce/buio (16 ore di luce e 8 di buio) con illuminazione variabile tra 400 e 800 lux nell'area dei contenitori.

I lombrichi sono stati pesati individualmente prima di essere collocati nei contenitori per l'inizio del saggio. Una volta pesati, gli animali sono stati depositati sulla porzione superficiale del suolo in ciascun contenitore al fine di valutare qualitativamente lo stato di salute degli animali. I lombrichi in buono stato di salute, normalmente, si interrano subito sotto la superficie del substrato e, di conseguenza, quelli che rimangono in superficie dopo 15 minuti possono essere danneggiati e devono essere sostituiti. Tutti i lombrichi selezionati hanno dimostrato uno stato di salute buono superando positivamente la prova. Il contenuto idrico del substrato di suolo nei contenitori è mantenuto costante durante il periodo dei tests tramite pesate periodiche dei contenitori. L'acqua persa è rinnovata come necessario in modo tale che alla fine dei tests, il contenuto d'acqua non differirà per più del 10% da quello di partenza.

Durante l'esecuzione dei tests gli animali sono alimentati con concime bovino secco reidratato. In particolare, il giorno dopo aver aggiunto i lombrichi ai contenitori per i tests sono stati forniti circa 5 g di cibo secco finemente tritato, sparsi sulla superficie del suolo di ogni contenitore e inumiditi con acqua distillata (da 5 a 6 ml per contenitore). Successivamente, il cibo è fornito una volta alla settimana. Dopo 14 giorni di esposizione è stata effettuata la conta e la misurazione dei pesi medi dei lombrichi sopravvissuti quindi sono inoltre registrati cambiamenti nel comportamento (incapacità di interrarsi, immobilità dopo stimolo esterno) e nella morfologia. Dopo 28 giorni i lombrichi sono stati rimossi dai contenitori. Il suolo privato dei lombrichi adulti ma contenente i bozzoli prodotti (cocoon) è stato posto in incubazione per ulteriori 28 giorni con le stesse condizioni del saggio eccetto per il fatto che il nutrimento è stato somministrato solo una volta all'inizio di questa fase. Al termine delle prove si è determinato il numero di giovani prodotti. Sono stati anche registrati eventuali segni di danno presentati dai nuovi nati. Sugli organismi rimossi al 28 giorno di esposizione sono stati effettuati le misurazione dei biomarkers richiesti.

RISULTATI

La valutazione dei risultati delle analisi di tossicità sui suoli sono state condotte mediante l'impiego di organismi sentinella su campioni prelevati alla fine dei cicli colturali. I risultati riguardano, oltre alla valutazione di endpoint quali la mortalità o alterazioni della riproduzione, anche lo studio di alterazioni molecolari e cellulari (biomarkers) indotte dalla esposizione a contaminanti chimici. Accanto ad endpoint quali la mortalità o alterazioni della riproduzione sono state misurati



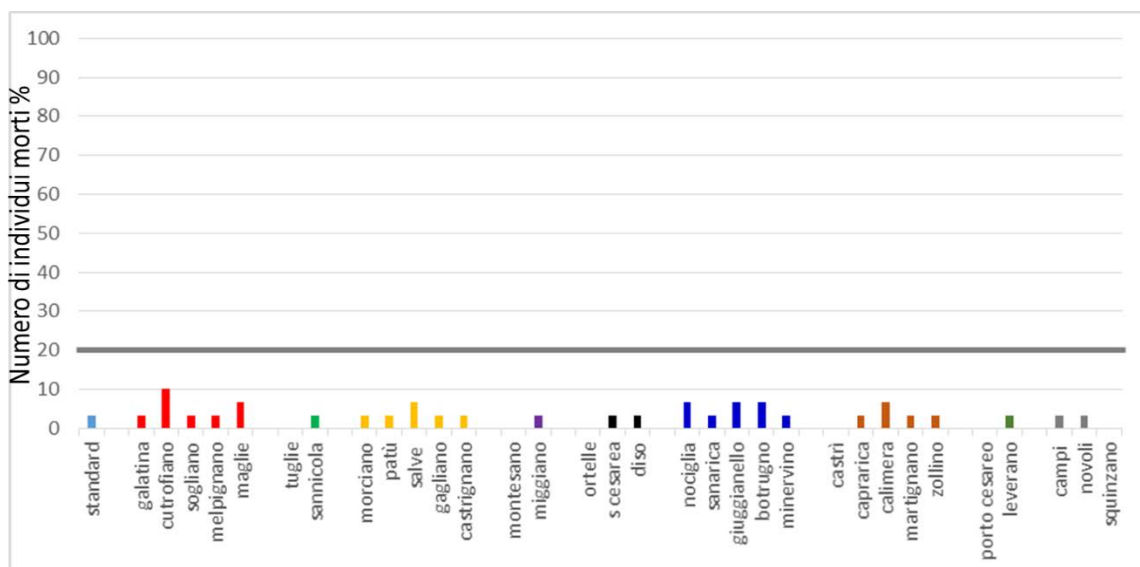
alterazioni molecolari e cellulari (biomarkers) indotte negli organismi dalla esposizione a contaminanti chimici. In particolare, sono stati analizzati negli animali esposti:

- Frequenza dei micronuclei viene utilizzato per valutare eventuali alterazioni e danni al DNA provocati da contaminanti chimici ambientali.
- I livelli tissutali di metallotioneine, proteine citoplasmatiche aventi elevata affinità per i cationi dei metalli pesanti e la cui sintesi ex novo rappresenta un biomarker specifico di esposizione a metalli pesanti.
- L'attività enzimatica dell'acetilcolinesterasi, enzima specificamente inibita da pesticidi organofosfati e carbammati

Test di tossicità acuta

Il test di tossicità acuta consiste nel misurare la mortalità degli animali dopo 14 giorni di esposizione (ISO 11268-1) al terreno ritenuto potenzialmente tossico. Oltre ai terreni da testare si utilizza un terreno artificiale standard di controllo preparato secondo le Linee Guida 207 dell'OECD. La mortalità può essere espressa come il numero di individui morti in un certo periodo sul totale della popolazione. La valutazione avviene mediante la conta dei lombrichi sopravvissuti dopo un periodo di incubazione di 14 giorni; se la mortalità è superiore al 10% il terreno è considerato tossico.

Di seguito si riportano i dati del test di mortalità su i terreni individuati per le colture (Fig.1). In generale, nel test di tossicità acuta con *Eisenia foetida* valori di mortalità superiori al 20% indicano la presenza di tossicità acuta nel terreno oggetto di esame.



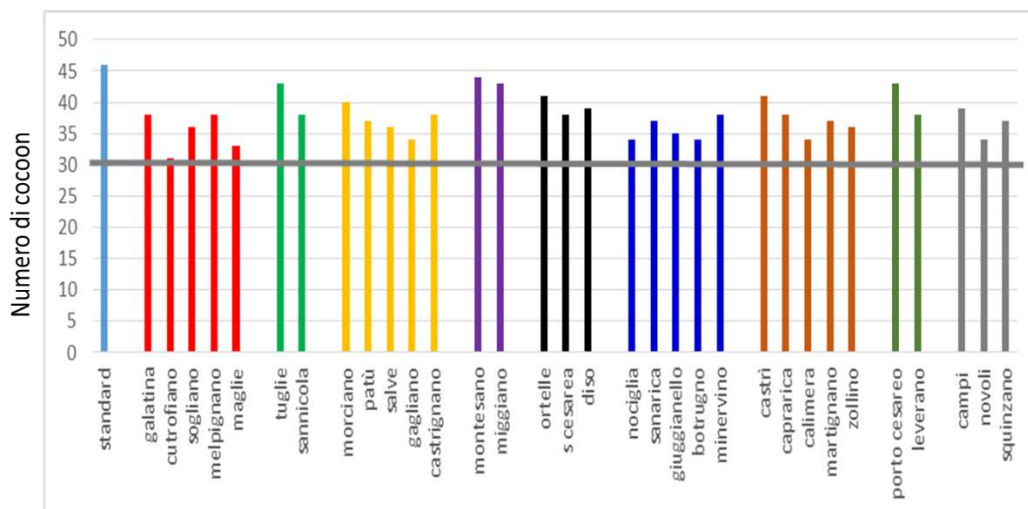


Analizzando i dati ottenuti, nessuno dei terreni esaminati ha mostrato tossicità acuta in quanto la mortalità osservata nella popolazione omogenea di *Eisenia foetida* utilizzata per l'esecuzione del test è stata inferiore al 20%.

Inoltre, la mortalità nel gruppo di controllo è risultata pari a 0. Questo risultato garantisce la validità del saggio, in quanto il test di tossicità acuta è considerato valido se la mortalità nel gruppo di controllo è inferiore al 10%.

Test di tossicità cronica

Il test di tossicità cronica valuta gli effetti tossici provocati da tempi di esposizioni prolungati. In tal caso il test ha una durata maggiore, corrispondente a 8 settimane in modo da poter osservare la crescita degli organismi, lo sviluppo e la produzione della prima generazione. Nel test di tossicità cronica valori di nuovi nati per replica inferiori a 30 sono considerati indicatori di tossicità cronica.



I dati riferiti ai terreni analizzati mostra come nessuno dei terreni esaminati ha mostrato un effetto di tossicità cronica.

Come è possibile osservare dai dati riportati, il numero di nuovi nati per replica nel gruppo di controllo è superiore a 30 ed, inoltre, il coefficiente di variazione di riproduzione è minore del 30%. Questi risultati garantiscono la validità del saggio effettuato.

Metallotioneine

La concentrazione tissutale di metallotioneine è stata determinata nei lombrichi utilizzando il metodo descritto da Viarengo et al. (1997).



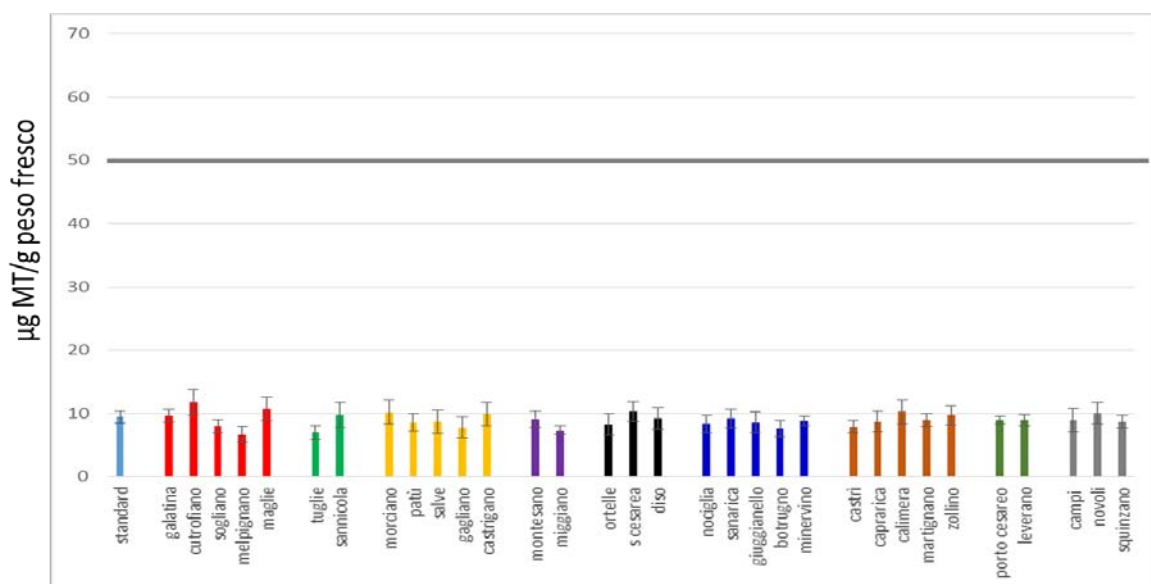
Il campione da sottoporre ad analisi delle metallotioneine, dopo essere stato pesato, viene omogeneizzato al politron in 4,5 ml di buffer di omogeneizzazione. Il mix di omogeneizzazione viene preparato in un cilindro con: 30 ml di Buffer (buffer saccarosio 0,13 M 500ml: 44,13g di saccarosio; 1,21g di Tris e portare a pH 8 con HCl), 60 μ l di PMSF (1mM), 90 μ l di Leupeptina (0,006mM) come agenti proteolitici, e 3 μ l di β -mercaptoetanololo (0,01%) come agente riducente. Gli agenti proteolitici servono a neutralizzare l'attività di proteasi presenti nelle cellule, mentre l'agente riducente impedisce la formazione di prodotti ad alto peso molecolare formati da ponti disolfuro intermolecolari in seguito a reazioni di ossidazione. La soluzione così ottenuta viene versata all'interno di corex e sottoposta a centrifugazione a 16000 rpm per 20 minuti (rotore a bracci fissi). Si preleva il sovrinatante, liberandolo della fase lipidica, e lo si trasferisce nelle corex contenenti etanolo assoluto (4,5 ml) e cloroformio (336 μ l). Si effettua una seconda centrifugazione a 7000 rpm per 10 minuti (rotore a bracci fissi), secondo il protocollo introdotto da Kimura et al. (1979). La precipitazione con etanolo e cloroformio permette l'eliminazione di tioli solubili a basso peso molecolare che, reagendo con il DTNB durante la determinazione spettrofotometrica, potrebbero interferire con la misurazione delle metallotioneine, i cui livelli sono bassi nei tessuti di organismi che vivono in ambienti non contaminati. Il sovrinatante risultante viene incubato con 23 ml di etanolo assoluto, 40 μ l di HCl e 1 mg di RNA per 1 ora a -18° .

L'acido ribonucleico (RNA) è un coprecipitante che migliora la precipitazione delle metallotioneine. A questo punto si effettua una terza centrifugata a 6000 rpm per 10 minuti (rotore a bracci oscillanti). Si elimina il sovrinatante e si risospende il pellet in 12 ml totali di soluzione tampone composta da etanolo assoluto 10,44 ml, cloroformio 120 μ l e buffer 1,44 ml (buffer saccarosio 0,13 M 500ml: 44,13g di saccarosio; 1,21g di Tris e portare a pH 8 con HCl) per eliminare contaminanti endogeni (GSH e cisteina) ed esogeni (agenti riducenti) a basso peso molecolare. Si centrifuga a 6000 rpm per 10 minuti (rotore a bracci oscillanti). Infine si recupera il pellet che viene asciugato sotto flusso d'azoto e risospeso in 150 μ l di NaCl (NaCl 0,25 M 25 ml: 0,365g di NaCl). Si aggiunge una soluzione di HCl contenente EDTA (150 μ l, HCl 1N contenente EDTA 4mM 25ml: 0,0372g di EDTA in 23 ml di acqua distillata e 2,07ml di HCl) (l'EDTA stacca gli ioni metallici dalle metallotioneine rendendo i gruppi $-SH$ liberi di reagire con il DTNB) e 4,2 ml di reattivo di Elmann (NaCl 15,19g; Na₂HPO₄ 3,69g; portare a pH 8 con NaH₂PO₄ e volume 130ml; aggiungere in a 120ml di soluzione 0,0204 di DTNB) preparato precedentemente contemporaneamente alla retta di interpolazione. I campioni vengono incubati per 30 minuti a temperatura ambiente per 25 min e successivamente centrifugati a 5000 RPM (rotore a bracci fissi).



Per la retta di taratura si prepara lo standard rappresentato da glutazione (0.0010g di GSH in 1 ml di Tris-EDTA).

Si aggiungono 4,2 ml di reattivo di Elmann (contemporaneamente all'incubazione dei campioni). Alla fine, viene effettuata la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 412 nm. Sapendo che le metallotioneine possiedono 20 residui di cisteina sui 60 amminoacidi complessivi (Roesijadi, 1992) e che il glutatione ridotto ha un solo gruppo –SH, dividendo le moli dei gruppi –SH ricavati dalla retta di taratura del glutatione ridotto per 20, è possibile calcolare il numero di moli di metallotioneine del campione. Per ottenere la quantità delle metallotioneine espresse in microgrammi, basta moltiplicare il numero di moli per il peso molecolare delle stesse (7000 D). La centrifuga usata nel corso della preparazione è una “Beckman Coulter” con rotori “JA-25.50” a bracci fissi e “JS-13.1” a bracci oscillanti. Lo spettrofotometro usato è un “Beckman Coulter DU 640 U”. La concentrazione tissutale di metallotioneine viene misurata come $\mu\text{g MT/g}$ peso fresco. Valori normali si riferiscono a quantitativi non superiori ai $50 \mu\text{g MT/g}$ peso fresco (UNEP 1999, Kammenga 2000, Scott Fordsman and Weeks 2000). I valori finali ai fini statistici sono calcolati considerando medie di 30 campioni singoli per sito.

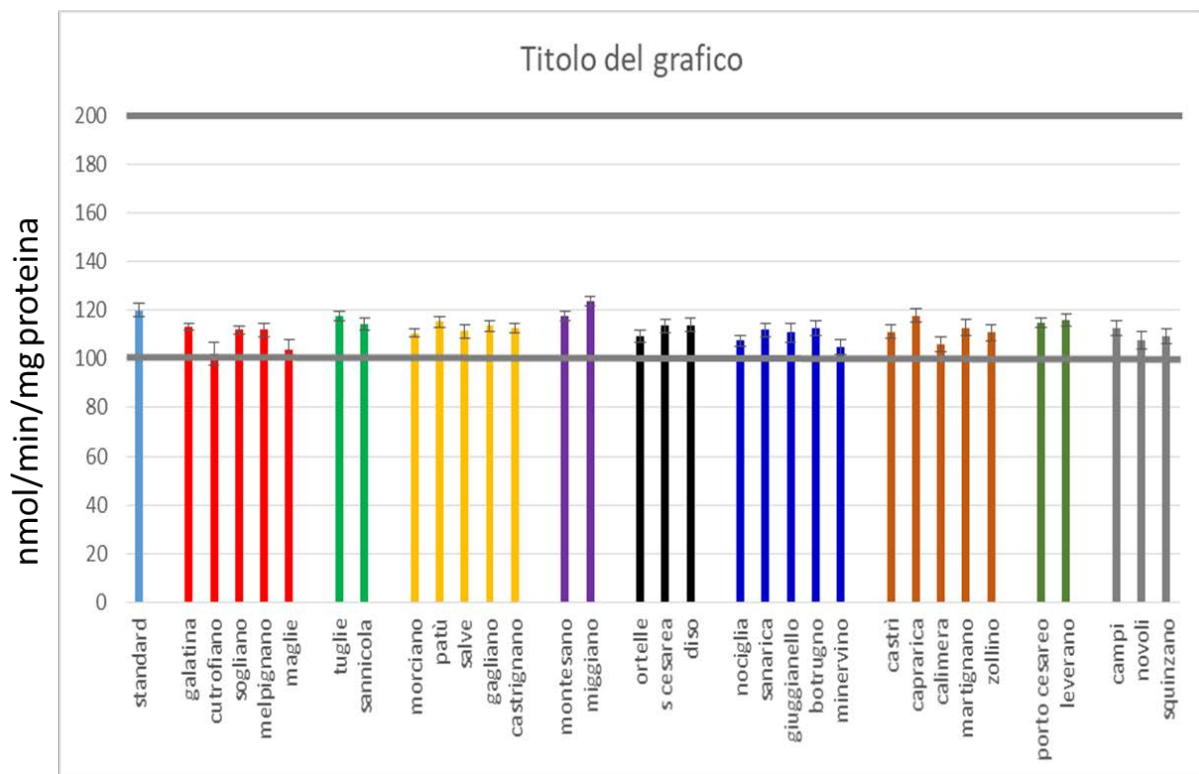


I risultati ottenuti in animali non esposti hanno mostrato dei livelli basali di metallotioneine nella norma, pertanto idonei al loro utilizzo in test di esposizione a terreni con possibili concentrazioni di metalli pesanti naturali o indotte. I dati riportati in figura mostrano come non ci siano differenze significative tra i livelli di metallotioneine negli animali posti in contatto con i terreni standard e i terreni da testare. In generale un aumento nel tempo dei livelli di metallotioneine è un indice di

contaminazione da metalli pesanti. I dati ci indicano che i terreni testati non possiedono valori di metalli pesanti potenzialmente pericolosi.

Acetilcolinesterasi

In aggiunta ai dati richiesti dal progetto si sono effettuati i dosaggi dell'attività acetilcolinesterasica (mediante il metodo spettrofotometrico di Elmann, 1961) negli animali posti in contatto con i terreni testati, poiché una inibizione di tale enzima è sinonimo di contaminazione da pesticidi, organo fosfati o carbammati. L'attività enzimatica viene misurata come nmol/min/mg proteina. valori normali si riferiscono a range compresi tra 100 e 200 (Elmann et al. 1961). I valori finali ai fini statistici sono calcolati considerando medie di 30 campioni singoli per sito. Dal grafico si nota come nessuno dei terreni mostrava delle variazioni significative rispetto al terreno standard.



Test dei micronuclei

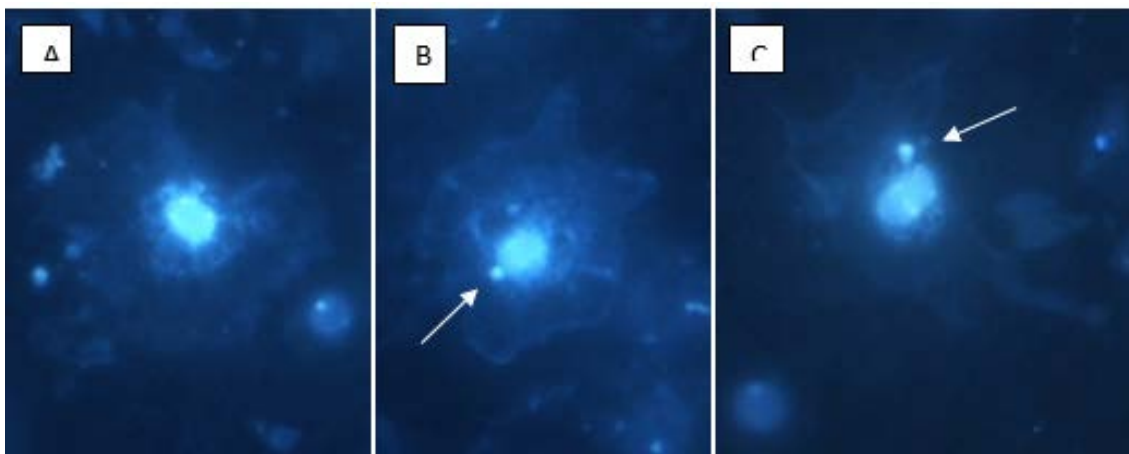
Il test dei micronuclei viene utilizzato per valutare eventuali alterazioni e danni al DNA provocati da contaminanti chimici ambientali. Esso è stato applicato a cellule di liquido celomatico. I tipi di mutazione che possono contribuire alla formazione dei micronuclei includono:

- mutazioni alle proteine del cinetocoro e ai centromeri che possono provocare un'ineguale distribuzione dei cromosomi nell'anafase;



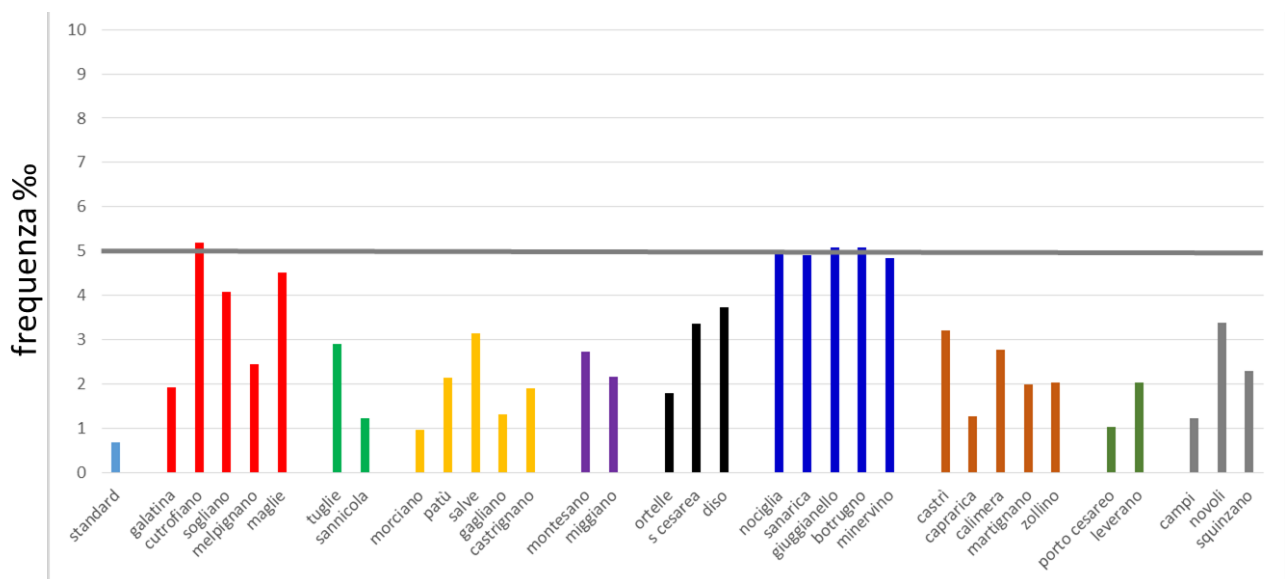
- irreparabili danni al DNA indotti da agenti genotossici che possono provocare frammentazione cromosomica.

Per l'esecuzione del test i celomociti prelevati vengono opportunamente diluiti con un volume di soluzione salina in rapporto 1:3 (la soluzione salina utilizzata ha la seguente composizione: 1.19 g di HEPES, 3.625g NaCl, 0.05g MgSO₄, 0.1g KCl, 0.1g CaCl₂ e pH 7.4) e sottoposti a centrifugazione a 1000 rpm X 10 minuti per eliminare i detriti terrosi. Si recupera, quindi, il sovrantante dal quale si prelevano 40 µl che vengono posti su di un vetrino precedentemente polilisinato. I vetrini con l'emolinfa vengono incubati in una camera umida per 30 minuti per permettere alle cellule di aderire alla superficie del vetrino. In seguito viene drenata delicatamente la soluzione in eccesso (con un po' di carta assorbente) e le cellule vengono fissate con una soluzione di metanolo/ acido acetico. Si elimina la soluzione di fissativo in eccesso e si utilizza una soluzione di DAPI 300nm diluita in soluzione salina. Il DAPI è un colorante fluorescente specifico per gli acidi nucleici in particolare del DNA. Le cellule vengono incubate con 300 µl di DAPI per 5 minuti. Passati i 5 minuti si eseguono dei lavaggi per eliminare il colorante in eccesso. Quindi si fissano le cellule colorate con un vetrino copri oggetto e del liquido antifade per evitare che il preparato si deteriori nel tempo. Si esegue quindi una visualizzazione in microscopia a fluorescenza utilizzando i filtri adeguati. Si osserveranno tutto il materiale nucleare colorato in blu e i contorni delle cellule come frazione traslucida. La visione permette di evidenziare la presenza di eventuali micronuclei, i campioni positivi avranno una frequenza dei micronuclei superiore al 5%. I valori finali ai fini statistici sono calcolati considerando medie di 30 campioni singoli per sito. La misura della frequenza dei micronuclei su linee cellulari viene utilizzata come indicatore dei danni al DNA indotti da agenti fisici e chimici (Bolognesi et al., 1999, 2004). In figura sono riportate delle immagini che mostrano cellule sane (A) e cellule con micronuclei (B,C).





Per i micronuclei identificati ed analizzati seguendo i criteri di valutazione è stato effettuato un calcolo della loro frequenza media di comparsa nelle cellule di emolinfa. Dalla figura è possibile osservare che solo i terreni provenienti da Cutrofiano (area 3) ed alcuni terreni dell'area 4 (Giuggianello, Botrugno) inducevano nei organismi testati delle frequenze di micronuclei borderline, cioè non genotossici ma con valori al limite.



CONCLUSIONI

Analizzando i dati ottenuti, nessuno dei 32 terreni esaminati ha evidenziato presenza di tossicità acuta e tossicità cronica.

Tra i *biomarker* utilizzati, i risultati dovuti alla frequenza di micronuclei hanno permesso di valutare la genotossicità dei terreni esaminati.

I valori di frequenza di micronuclei indicano che i terreni analizzati non sono genotossici ma nel caso di tre 3 terreni (Cutrofiano, Giuggianello e Botrugno) si consiglia un controllo nel tempo dei terreni in quanto i valori dei tre comuni erano dei valori borderline (prossimi alla significatività),

Gli ultimi biomarker considerati, in questa attività di biomonitoraggio, sono quelli relativi al dosaggio delle metallotioneine. Molti studi sono stati effettuati sulle metallotioneine che hanno dimostrato chiaramente il loro fondamentale ruolo nei meccanismi di detossificazione come chelante dei metalli pesanti (Viarengo et al., 2000).



Dall'analisi dei risultati, è importante notare come non ci sia variazione significativa di MT in nessun sito. Infatti i dati mostrano come non ci siano differenze tra i livelli di metallotioneine negli animali posti in contatto con i terreni standard non trattati e i terreni da testare. Questo risultato sembra suggerire l'assenza di alte e dannose concentrazioni di metalli biodisponibili.

Si è eseguito anche il dosaggio dell'attività acetilcolinesterasica il quale ha evidenziato come nessuno dei terreni esaminati aveva una significatività dei risultati. In conclusione si possono ritenere non tossici tutti i terreni esaminati, ma si consiglia un monitoraggio periodico dei siti in quanto alcuni dati erano prossimi ai valori limite.

BIBLIOGRAFIA

- **Bargagli R., Cruscianti M., Leonzio C., Bacci E., 1998.** I bioindicatori. In: Ecotossicologia, Vighi e Bacci editori, Trattato di Farmacologia e Terapia, UTET. Torino, Italy. pp.40-45.
- **Barlett, M.D., Briones, M.J.I., Neilson, R., Schmidt, O., Spurgeon, D. & Creamer, R.E., 2010.** A critical review of current methods in earthworm ecology: from individuals to populations. *European Journal of Soil Biology*, 46: 67-73,
- **Bolognesi C., Landini E., Roggieri P., Fabbri R., Viarengo A., 1996.** Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: experimental studies, *Environ. Mol. Mutagen.*, 33: 287-292.
- **Bolognesi C., Frenzilli G., Lasagna C., Perrone E., Roggieri P., 2004.** Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels *Mutation Research*, 552: 153-162.
- **Edwards C.A., Bohlen P.J., 1996.** *Biology and Ecology of earthworms.* Chapman & Hall. London U.K. pp 1-212.
- **EEC, 1985.** European Economic Community, Directive 79/831, Annex V, Part C: Methods for determination of ecotoxicity-level 1.DG XI/127-129/82, Rev.1: Toxicity for earthworms. Commission of the European Community, Brussels.
- **Elmann G.L., Cortney K.D., Andrea V.J., Featherstone R.M., 1961.** A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88-95.
- **Emmerling, C., Paulsch, D., 2001.** Improvement of earthworm (*Lumbricidae*) community and activity in mine soils from open-cast coal mining by the application of different organic waste materials. *Pedobiologia*, 45: 396-407,
- **ISO (International Standard Organization), 1993.** Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate, No.11268-1. ISO, Geneve, Helvetia.
- **ISO (International Standard Organization), 1996.** Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve, Helvetia.
- **Kammenga JE, Dallinger R, Donker MH, Köhler HR, Simonsen, V, Triebkorn R, Week, JM, 2000.** Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Rev of Env Contam Toxicol.* 164: 93-147
- **Kimura M., Otaki N., Imano M., 1979.** Rabbit liver metallothionein tentative amino acid sequence of metallothionein 8 In: *Metallothionein Experantia Supplementum*, ed. Kagi j: H.R. and Nordberg Birkhauser M., Basel T., 24:163- 168.



- **Kokta C., 1992.** A laboratory test on sublethal effects of pesticides on *Eisenia Foetida*. In: Grieg-Smith P.W., Becker H., Edwards P.J., Heimbach F (eds). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept, Hants, UK.
- **Lagadic L., Caquet T., Amiard J.-C., Ramade F., 2000.** Use of Biomarkers for Environmental Quality Assessment. Science Publishers, Inc., Enfield. U.S.A. pp 21
- **Lavelle, P., Spain, A., 2001.** Soil ecology, Kluwer Scientific Publications, ISBN 978-0-7923- 7123-6, Amsterdam, Netherlands
- **Lawrence, R.A., Burk, R.F., 1976.** Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 71: 952-958
- **Lionetto M.G., Calisi A., Schettino T., 2012.** Earthworms biomarkers as tools for soil pollution assessment. In: Soil health and land use management, M.C. Hernandez-Soriano (Ed.), InTech- Open Access
- **Lowe W.R., Kendal R.J., 1990.** Sentinel species and sentinel bioassay. In: McCarthy J.F., Shugart L.R., (EDS). Biomarkers of environmental contamination. Lewis Publisher, Boca Raton. FL., U.S.A., pp: 309-331.
- **OECD, 1984.** Earthworms, acute toxicity tests. OECD, guideline for testing chemicals nr. 207. OECD, Paris, France.
- **OECD, 2004.** Earthworms reproduction tests. Guideline for testing chemicals. No 222. OECD, Paris, France.
- **Roesijadi G., 1993.** Response of invertebrate metallothioneins and MT genes to metals and implication for environmental toxicology. In: Suzuki KT, Imura N, Kimura M. (eds) Metallothionein, Voi. 111. Biological Roles and Medical Implication. Birkhauser, Basel., Helvetia.
- **Scott-Fordsmand J.J., Weeks J.M., 2000.** Biomarkers in earthworms. Rev Environ. Contam. Toxicol., 165: 117-159
- **Spurgeon D.J., Sandifer R.D., Hopkin S.P., 1996.** The use of macroinvertebrates for population and community of metal contamination indicator tax, effect parameters and the used for a soil invertebrate prediation and classification scheme (SIVPACS). In: N.M. Van Straalev and D.A. Krivolutsky (Eds), Bioindicator system for soil pollution, Kluvier Academic Publishers, N.L., U.S.A.
- **UNEP 1999.** Manual on the biomarkers recommend for the “MED POL Biomonitoring Programme”. UNEP, Athens, Greece.
- **Van Gestel C.A.M., Van Dis W.A., Diren-Van Breemen E.M., Sparenburg P.M., 1989a.** Development of a standardized reproduction toxicity test with the earthworm species *Eisenia foetida andrei* using copper, pentachlophenol, and 2,4-dichloroaniline. Ecotoxicol. Environ. Saf., 18: 305-312.
- **Van Gestel C.A.M., Van Dis W.A., Diren-Van Breemen E.M., Sparenburg P.M., Baerselman R., 1989b.** Influence of cadmium, copper, and penttachlorophenol on growth and sexual development of *Eisenia foetida* (oligochaeta; Anellida). Biol. Fertil. Soil., 12: 117-121.
- **Van Gestel C.A.M., Zaal J., Diren-Van Breemen E.M., Baerselman R., 1995.** Comparison of two test methods for determing the effects of pesticides on earthworms reproduction. Acta Zool. Fenn., 196: 278- 283.
- **Viarengo A., Ponzano E., Dondero F., Fabbri R., 1997.** A simple spectrophotometric method for metallothionein valuation marine organisms: an application to Mediterranean an antarctic molluscs. Mar. Environ. Res., 44: 69-84.
- **Viarengo A., Burlando B., Ceratto N., Panfili I., 2000.** Antioxidant role of metallothioneins: a comparative overview. Cell. Mol. Biol.

Lecce, 28/02/2018

In fede

Dott. Antonio Calisi