

# XENOBIOTICI

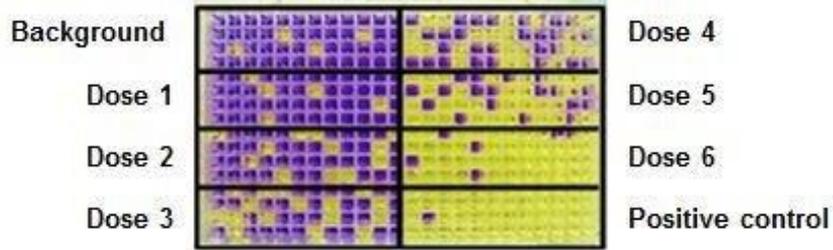


MUTAGENESI AMBIENTALE

Test di genotossicità

e

Controlli su matrici ambientali



# INDICE

In copertina e su questa slide  
**Test di Ames (metodo di fluttuazione)**

By Fluggesini - Own work, CC BY-SA 4.0,

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=41286251>

Test di genotossicità: introduzione

Test di Ames

Photo credits



# Test di genotossicità

BioTecnologieSanitarie.it

# Test di genotossicità

Un tossico o veleno può causare nell'organismo umano **tossicità** acuta o cronica oppure provocare modificazioni nel DNA (mutazioni) ed essere quindi **genotossico**. Le sostanze ad attività mutagena sono spesso anche cancerogene. L'interesse a mettere a punto dei test che selezionino sostanze mutagene ha come obiettivo ultimo quello di adottare dei piani per diminuire l'esposizione dell'uomo ad esse.

Tali test possono essere eseguiti su batteri, piante e animali.

# Test di genotossicità

I test possono essere di diverso tipo e coinvolgere competenze completamente diverse.

- ★ A breve termine: forniscono risposte anche in 48 ore e il tipico esempio è il test di Ames
- ★ A lungo termine: sono in genere studi effettuati su popolazioni animali (es. roditori) in periodi medio-lunghi
- ★ Studi epidemiologici: valutano l'esposizione dell'uomo ad una singola sostanza

# Test di genotossicità

Nel tempo sono stati messi a punto diversi tipi di test: test di Ames, il cromotest SOS, il test in vitro sui batteri luminescenti, i test citogenetici e l'uso di organismi bioindicatori.

Questi test, a loro volta, come vedremo, subiscono continue modificazioni per poter essere adattati sempre meglio ad un ambiente complesso che si arricchisce in continuazione di nuove sostanze xenobiotiche.

Cominciamo con il test di Ames.



**Test di  
genotossicità:  
Test di Ames**

BioTechnologiesSanitarie.it

# Test di Ames

Il **test di Ames** è stato già trattato nella pagina del sito [biotecnologiesanitarie.it](http://biotecnologiesanitarie.it) dedicata alla tossicologia. Le relative slide con la spiegazione teorica vengono riportate di seguito.

Il test è utilizzato per valutare le proprietà mutagene di un tossico.

Ricordo che l'[INDICE](#) delle successive slide (dalla 9 alla 16) è legato alla presentazione [tossicologia](#) da cui sono state tratte le diapositive.

# I metodi per testare la tossicità

Ci sono anche dei test su batteri che possono arrivare a valutare su di loro l'effetto di un tossico per verificarne le proprietà mutagene e quindi dedurre un analogo, probabile meccanismo causa-effetto sull'uomo.

Parliamo del **test di AMES**. È molto usato in campo biomedico e farmacologico-industriale nella fase preclinica di sperimentazione di nuove molecole o per analisi ambientale.

# I metodi per testare la tossicità

## Test di AMES

Prima di passare al metodo sono necessarie alcune considerazioni iniziali. Studiare la mutagenesi, cioè quali sostanze provocano modificazioni nel DNA, è molto complesso.

**1.** Ovviamente l'interesse principale è sull'uomo e il suo DNA ma l'uomo non può essere usato come cavia.

**2.** Bisogna allora usare altri organismi su cui i test devono però essere predittivi, avere cioè validità.

# I metodi per testare la tossicità

## Test di AMES

**3.** Il DNA è uguale come struttura molecolare in tutti i viventi ma ciò che cambia sono gli enzimi di riparazione del DNA cioè quelli destinati a riparare eventuali mutazioni. Altri enzimi, quelli implicati nella neutralizzazione di sostanze estranee, sono coinvolti. (Nell'uomo gli enzimi di riparazione sono concentrati nell'epidermide, la parte più esposta alle radiazioni, mentre nei batteri tutto è presente nella stessa cellula).

# I metodi per testare la tossicità

## Test di AMES

4. Altro problema è la bassissima frequenza delle mutazioni (una ogni  $10^7$  o  $10^8$  individui). I mutageni indubbiamente aumentano questa frequenza ma bisognerebbe studiare milioni di individui per avere risultati significativi. I batteri rappresentano anche per questo aspetto una valida scelta perché crescono molto velocemente, a bassi costi e con scarsissimo impatto ambientale al contrario di molti altri organismi seppure piccoli.

# I metodi per testare la tossicità

## Test di AMES

Questo test si basa sulla reversione della mutazione (retromutazione). In un ceppo di mutanti si può presentare in alcuni individui una nuova mutazione che ristabilisce la situazione originaria, cioè quella di partenza. I nuovi individui sono detti revertanti. Prendiamo il caso della *Salmonella typhimurium*. Ci sono ceppi mutanti **his** - (incapaci di produrre istidina, pertanto trasformati in auxotrofi). Il test di Ames parte dall'utilizzo di questi batteri mutati.

# I metodi per testare la tossicità

## Test di AMES

Le salmonelle auxotrofe si seminano in grande quantità su una piastra con terreno con minime quantità di istidina.

La minima quantità di istidina è necessaria per evidenziare le eventuali salmonelle revertanti che altrimenti richiederebbero più cicli di replicazioni come succede quando le mutazioni sono puntiformi e riguardano uno solo dei due filamenti.

# I metodi per testare la tossicità

## Test di AMES

Nel centro si mette un dischetto imbevuto della sostanza da studiare, possibile mutageno.

La sostanza diffonde nel terreno intorno al dischetto e se è mutagena può indurre mutazioni all'indietro in qualche batterio trasformando alcune salmonelle auxotrofe his - in **his +** (prototrofe, cioè in grado di nuovo di sintetizzare istidina).

# I metodi per testare la tossicità

## Test di AMES

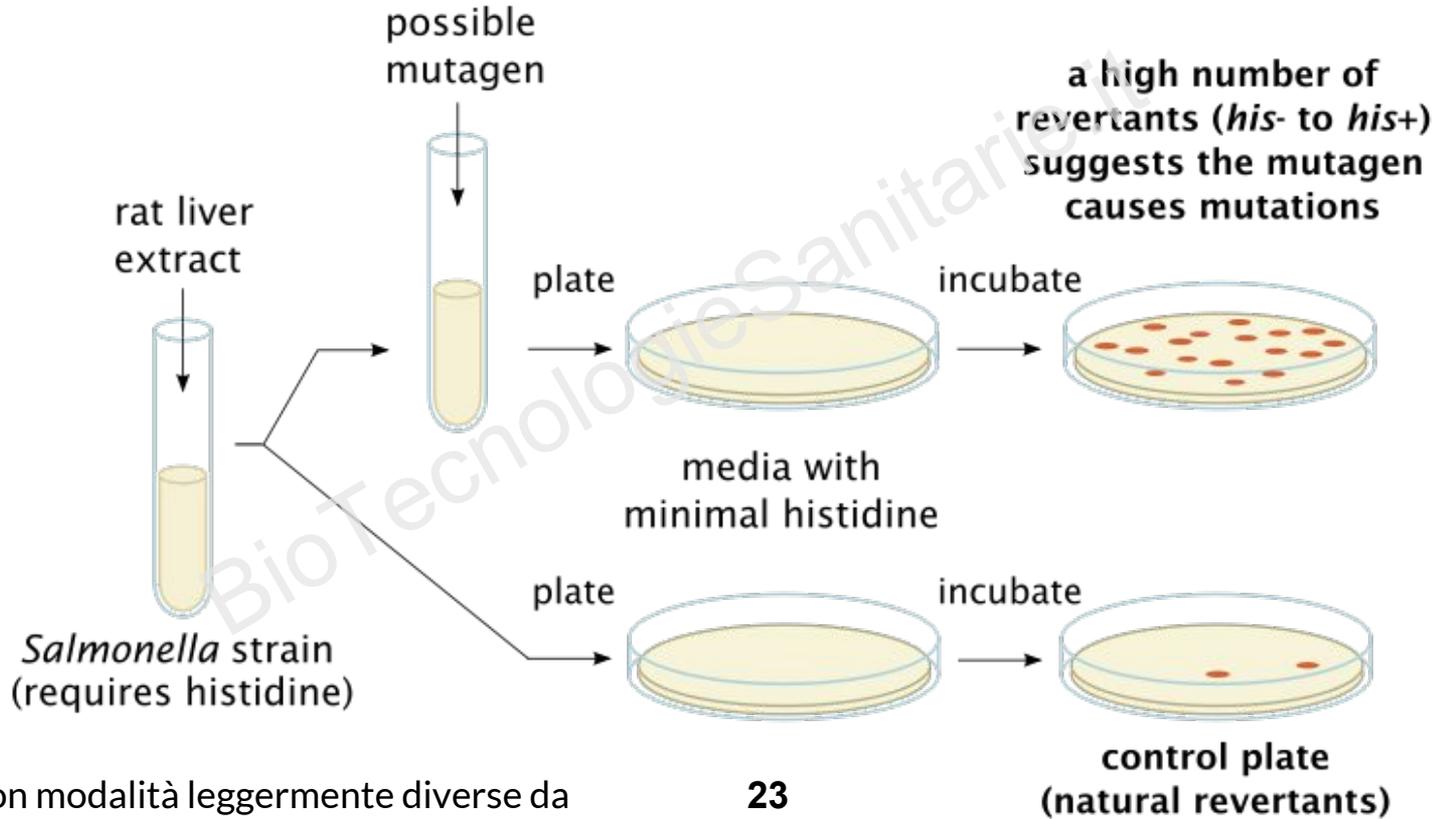
A questo punto le piastre vengono incubate.

La maggior parte delle salmonelle non riesce a crescere perché nel terreno non c'è in quantità sufficiente il nutriente essenziale per la loro crescita.

Diversa la situazione per i revertanti, cioè le salmonelle che hanno subito una mutazione all'indietro e che formeranno colonie intorno al dischetto.

Il test è veloce e richiede solo l'aggiunta di estratto di fegato di topo per rifornire il sistema di enzimi necessari per attivare l'azione mutagenica.

# I metodi per testare la tossicità



Test di AMES con modalità leggermente diverse da quelle spiegate

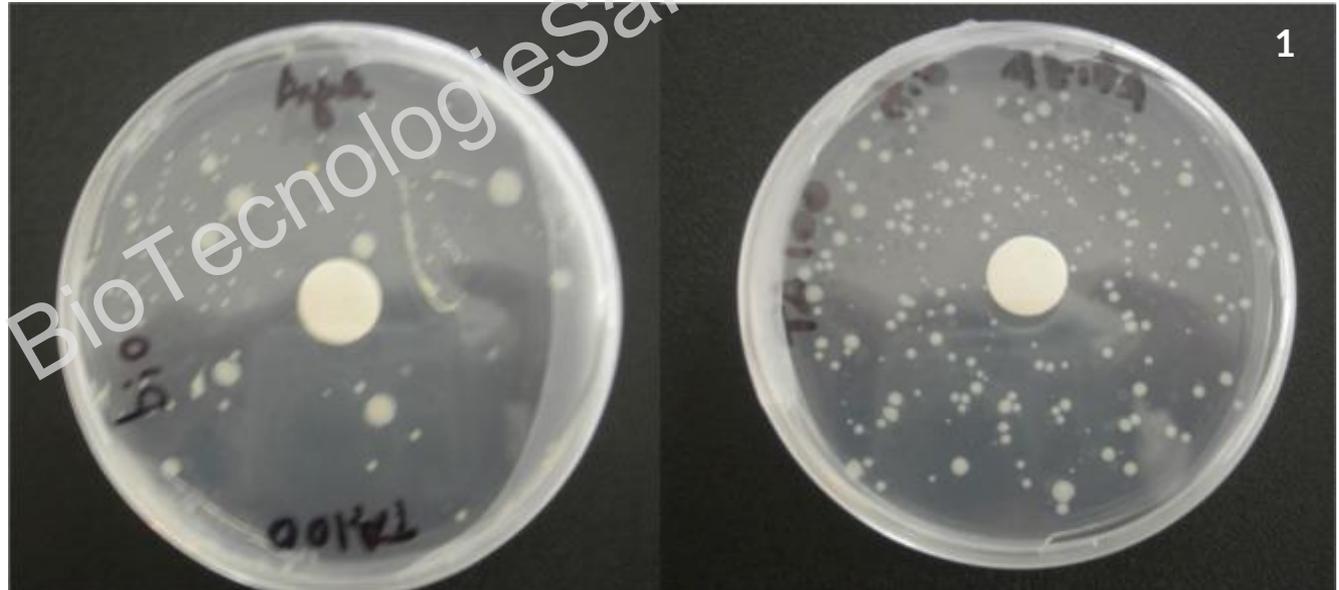
# Test di Ames

Le foto successive chiariscono ancora meglio quanto spiegato prima con l'aiuto del disegno.

Controlli da affiancare sempre al test di Ames.

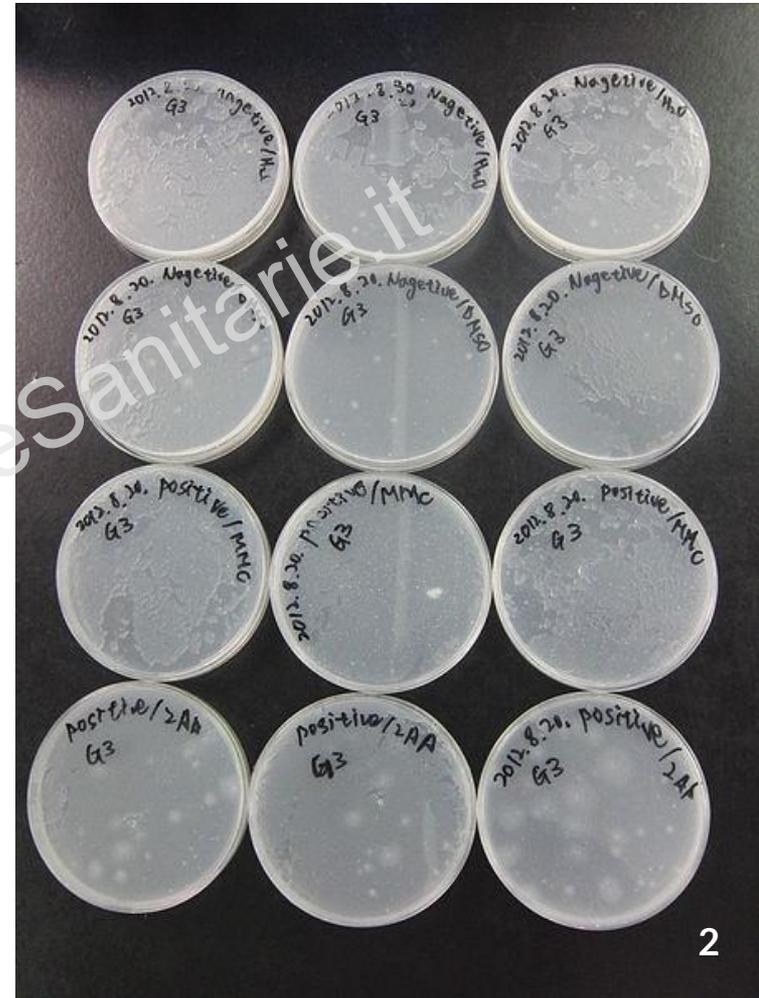
A sinistra: controllo negativo.

A destra: controllo positivo



# Test di Ames

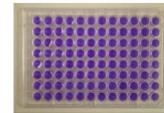
La foto di lato, del 2012, mette in evidenza le piastre negative (prime due file in alto) e positive (ultime due file in basso) ottenute da questo tipo di test.



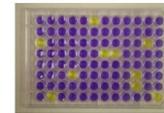
# Test di Ames

Fin dai tempi in cui è stata messa a punto la metodica appena descritta, è stata concepita anche un'ulteriore procedura in cui i batteri vengono fatti crescere in terreno liquido con l'aggiunta di un indicatore di pH.

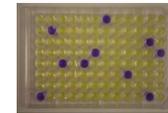
Il tutto, compresa la sostanza da valutare, viene seminato in micropiastre da 96 o 394 pozzetti.



Sterility Check



Background



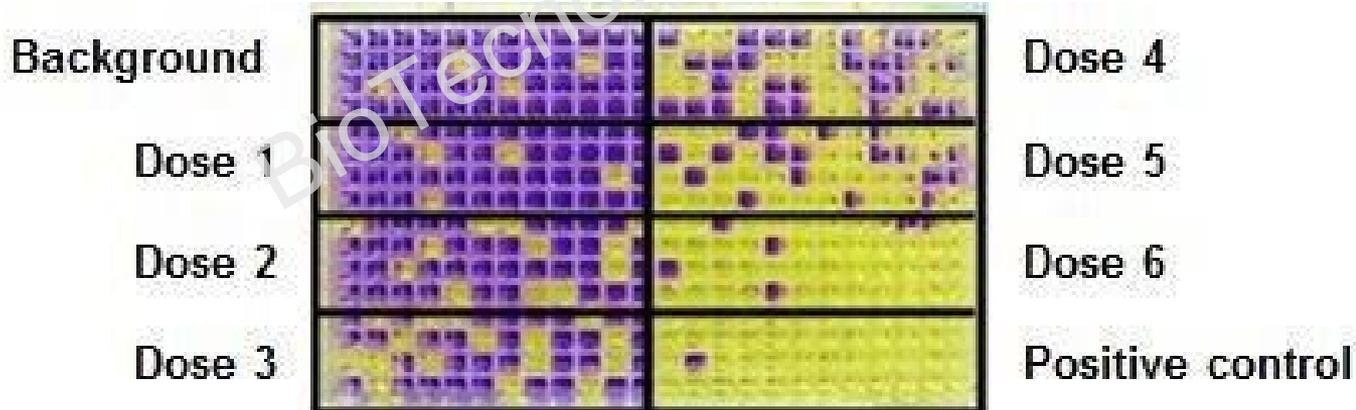
Strong Mutagen



Positive Control

# Test di Ames

La frequenza della mutazione viene letta con il cambio di colore nei pozzetti che virano dal giallo al blu in quanto il pH varia al variare del metabolismo delle cellule batteriche come si può vedere nella micropiastre a 394 pozzetti.



# Test di Ames

**Punti deboli.** Torniamo ora all'affermazione iniziale ... Ci sono anche dei test su batteri che possono arrivare a valutare su di loro l'effetto di un tossico per verificarne le proprietà mutagene e quindi dedurre un analogo, probabile meccanismo causa-effetto sull'uomo. **Bisogna sottolineare “un analogo, probabile meccanismo causa-effetto sull'uomo”.** Ecco il punto debole.

# Test di Ames

**Punti deboli.** Salmonella typhimurium non è un modello perfetto per l'uomo, per ovvie ragioni. E quindi il test di Ames deve essere affiancato da altre analisi su cellule eucariotiche e da test in vivo.

Non solo. Si rischia di non rilevare i promutageni quelli cioè la cui azione mutagena è legata al processo di detossificazione che avviene nell'uomo. Per ovviare a questo altro inconveniente si aggiungono al terreno di coltura gli enzimi coinvolti nell'uomo.

# Test di Ames

**Punti deboli.** Salmonella typhimurium non è un modello perfetto per l'uomo, evidentemente. E quindi il test di Ames deve essere affiancato da altre analisi su cellule eucariotiche e da test in vivo.

Non solo. Si rischia di non rilevare i promutageni quelli cioè la cui azione mutagena è legata al processo di detossificazione che avviene nell'uomo. Per ovviare a questo inconveniente si aggiungono al terreno di coltura gli enzimi coinvolti nell'uomo.



**Test di  
genotossicità:  
SOS/Cromo test in  
Escherichia coli**

# SOS/Cromo test

L' **SOS/Cromo test** è stato pensato come alternativa o complemento al test di Ames che ha i punti deboli appena descritti. Vengono utilizzati ceppi di E. coli ingegnerizzati e si sfrutta uno dei meccanismi di riparazione del DNA presenti nelle cellule batteriche, il **sistema SOS**. La sua attivazione consente al DNA di non interrompere la replicazione anche se è presente un danno in una sequenza; in altre parole la DNA polimerasi continua ad appaiare le basi azotate non rispettando la fedeltà al filamento originario.

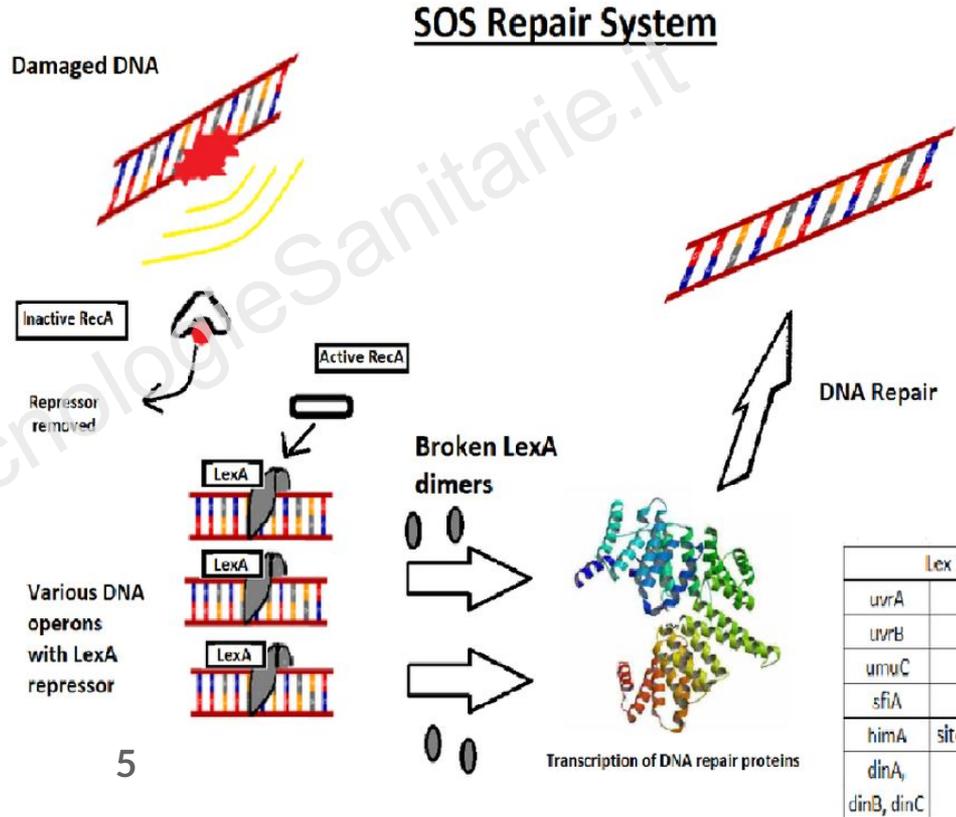
# SOS/Cromo test

I geni che costituiscono il sistema SOS sono molti ma i più importanti sono:

- **lexA**, codifica per il repressore di tutti i geni del sistema
- **recA**, codifica per la proteina che degrada il repressore precedente e attiva le proteine del complesso umuDC
- **umuDC**, le relative proteine permettono alla DNA polimerasi, bloccata sulla lesione, di non interrompere la sintesi del neofilamento anche se questo comporta un errato appaiamento di basi

# SOS/Cromo test

Il disegno di lato mostra il DNA danneggiato e il coinvolgimento delle proteine codificate da *lexA* e *recA*; una volta degradato il repressore *lexA*, la proteina codificata da *recA* può attivare il giusto complesso che, nel caso di mutagenesi, è *umuDC*. A questo punto l'azione della DNA polimerasi, bloccata sul danno, può proseguire.



Lex A Target Genes	
<i>uvrA</i>	Excision repair
<i>uvrB</i>	Excision repair
<i>umuC</i>	Mutagenesis; repair
<i>sfiA</i>	Cell division inhibitor
<i>himA</i>	site-specific recombination
<i>dinA</i> , <i>dinB</i> , <i>dinC</i>	Unknown

# SOS/Cromo test

Una volta chiarito il meccanismo d'azione del sistema di riparazione SOS vediamo come viene sfruttato nell'SOS/Cromo test. In genere si procede alla fusione di uno dei geni del sistema (*sfiA*) con il gene *LacZ*, essenziale nella codificazione della  $\beta$ -galattosidasi (l'enzima che tra le tante funzioni espletate scinde il lattosio in glucosio e galattosio) che a questo punto diventa il gene reporter. Questa operazione viene effettuata in un plasmide introdotto in *E. coli* ottenendo così il ceppo PQ37.

In questo modo l'espressione della  $\beta$ -galattosidasi è strettamente dipendente da quella del gene *sfiA*.

# SOS/Cromo test

Il fatto che nel test venga aggiunto al terreno di coltura un analogo del lattosio come l'X-Gal, già introdotto nello screening bianco-blu ([Tecnologia del DNA ricombinante](#)), può facilmente far capire, a questo punto, il meccanismo d'azione.

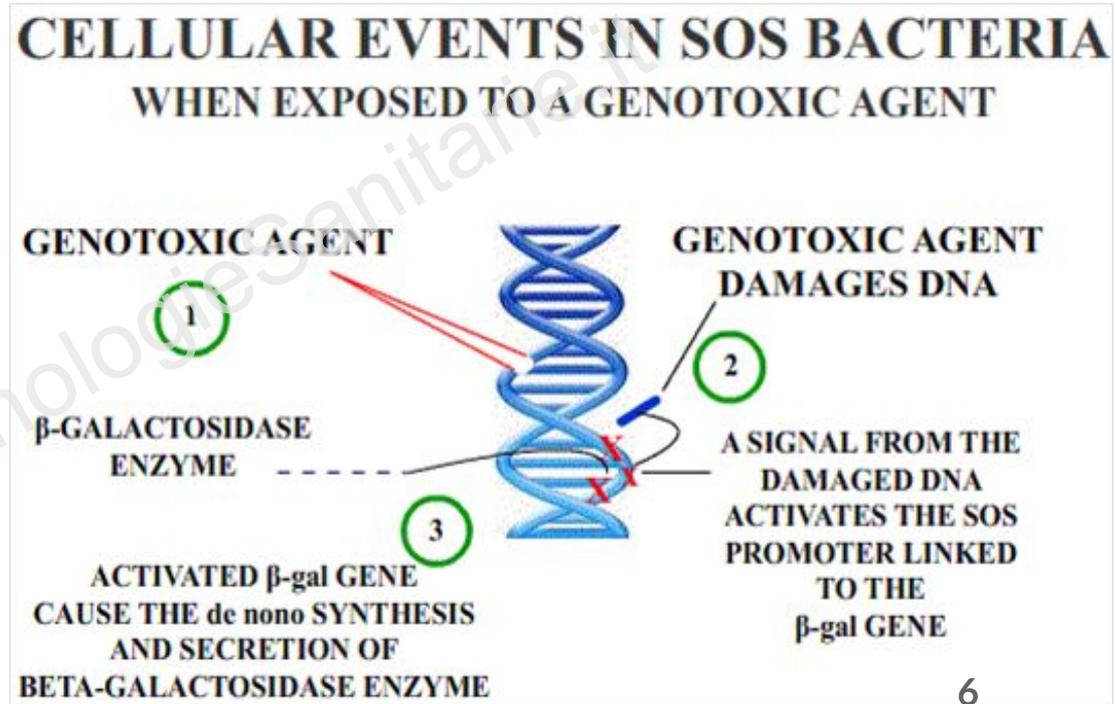
L'obiettivo è far esprimere il gene reporter per la  $\beta$ -galattosidasi che ricordiamo è sotto il controllo del gene *sfiA* del sistema SOS (gene bersaglio) perché fuso con esso.

La  $\beta$ -galattosidasi attiva fa degradare l'X-Gal conferendo un colore blu al mezzo colturale. Quindi l'SOS/Cromo test è un test colorimetrico.

# SOS/Cromo test

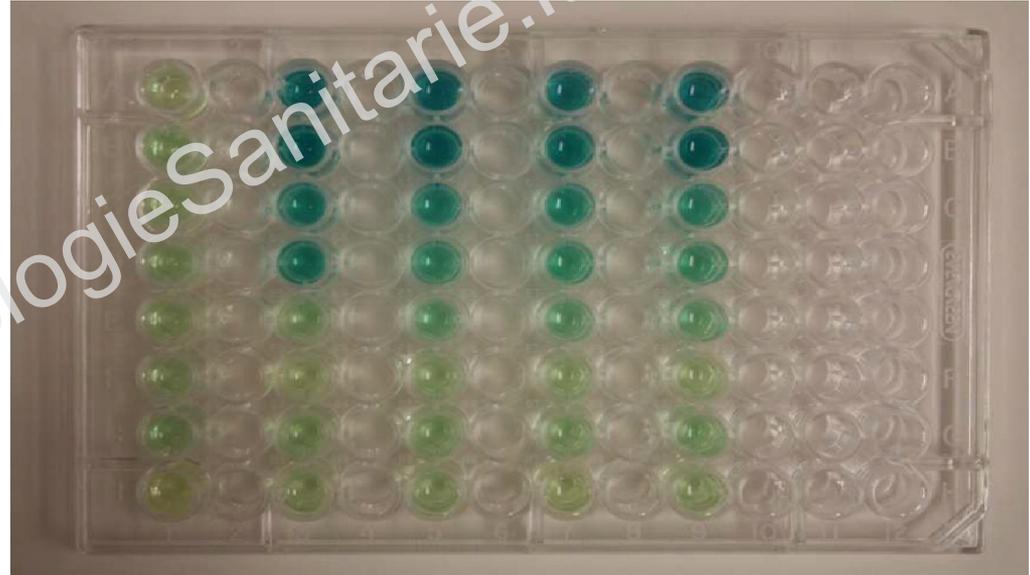
La  $\beta$ -galattosidasi attiva è il segno dell'induzione del gene *sfiA* e quindi del danno al DNA.

La figura di lato evidenzia molto bene i passaggi



# SOS/Cromo test

Si possono usare micropiastre a 96 pozzetti che consentono di testare concentrazioni crescenti dello stesso tossico. Si procede poi alla lettura con spettrofotometro con cui si hanno misure quantitative che consentono di ottenere una curva dose-risposta. Per gli screening può andare bene anche la lettura ottica.





**Test di  
genotossicità:  
Test della cometa**

BioTechnologiesSanitarie.it

# Test della cometa

Il **test della cometa**, chiamato anche **elettroforesi su singola cellula**, viene effettuato sulle cellule di mammifero per verificare danni strutturali sui cromosomi. Sia rotture su un filamento che su ambedue i filamenti. In tutti e due i casi si formano frammenti di cromosomi.

La metodica è sensibile e non è complicata.

Nelle prossime slide i dettagli.

# Test della cometa

Primo step. Le cellule in esame (ottenute sia da una coltura cellulare che da un individuo vivo) vengono isolate le une dalle altre.

Poi vengono sospese in agarosio a basso punto di fusione. Un vetrino coprioggetto è disposto angolato su un vetrino portaoggetti e una goccia di sospensione viene fatta cadere tra i due vetrini. Il coprioggetto a questo punto viene abbassato sul portaoggetto e quindi la sospensione di agarosio si distribuisce in uno strato sottile.

Si procede poi alla refrigerazione a 4°C.

# Test della cometa

L'agarosio incapsula le cellule formando un involucro di fibre di carboidrati che le ancora sul vetrino. Lo strato di agarosio non impedisce però alle successive soluzioni di entrare in contatto con le cellule stesse.

Una volta che l'agarosio è gelificato il coprioggetto viene rimosso. Si procede poi con la lisi perché lo scopo della prima parte del test è isolare i frammenti del DNA dal resto della cellula. Ogni vetrino ottenuto viene immerso in una soluzione salina molto concentrata con detergente.

# Test della cometa

Il sale agisce sulle proteine mentre il detergente dissolve la membrana cellulare.

Bisogna stare attenti al pH della soluzione usata che può essere basico o neutro. Il pH neutro è necessario per identificare le fratture su ambedue i filamenti dei cromosomi. Il basico per le fratture su singolo filamento; infatti a pH alcalino si separano i due filamenti del DNA. Quindi il pH andrà calcolato sulla base di che cosa si vuole indagare.

# Test della cometa

Tutti i componenti delle cellule vengono distrutti e passano nella soluzione tranne il DNA che si spacchetta per riempire la cavità dell'agarosio in cui era presente prima la cellula. L'operazione richiede 1 o 2 ore a 4°C.

## Secondo step.

A questo punto si lava il vetrino con acqua distillata per allontanare il sale e lo si trasferisce in una soluzione per elettroforesi con la precauzione di seguire le raccomandazioni sul pH già esposte.

# Test della cometa

Bisogna aspettare una ventina di minuti prima di trasferirlo nella vaschetta per elettroforesi. Questa attesa consente anche alla doppia elica la denaturazione, cioè di separarsi nei singoli filamenti

Modalità della elettroforesi: 20' a 25 V.

## Terzo step.

Alla fine il vetrino viene lavato, portato a pH 7 e colorato con una sostanza fluorescente in grado di legarsi al DNA per poter poi essere visualizzato al microscopio a fluorescenza.

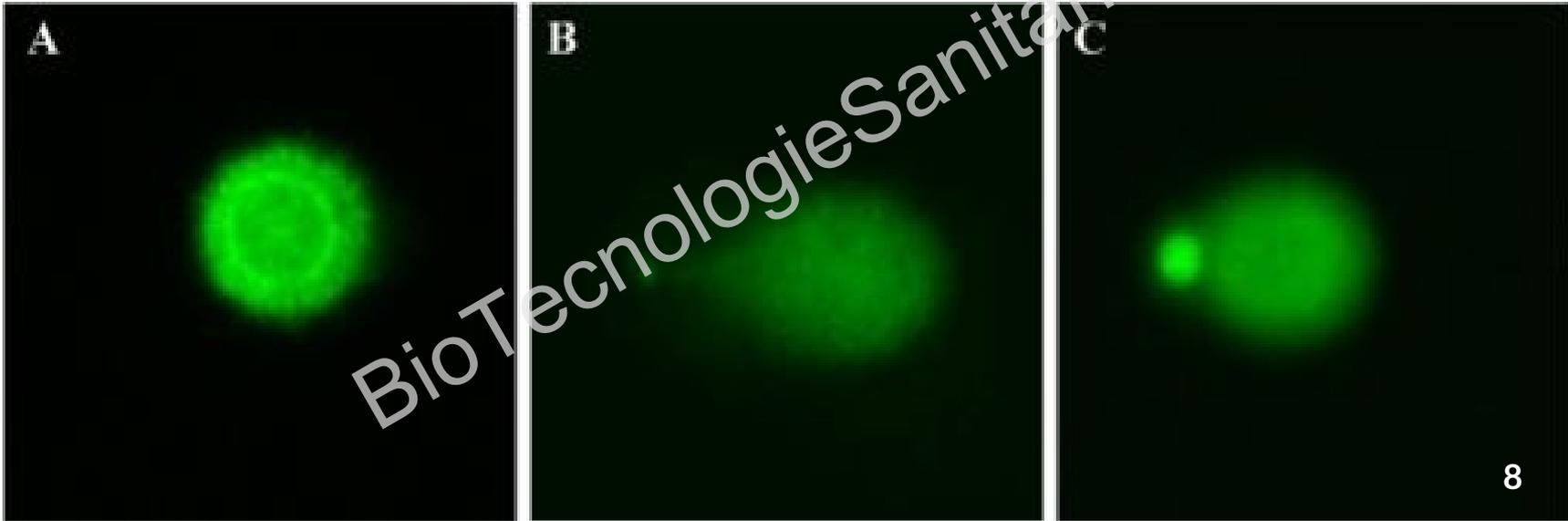
# Test della cometa

La lettura. Se non ci sono fratture, il DNA rimane nella cavità dell'agarosio e sotto l'impulso del campo elettrico migra verso l'anodo in modo compatto, restituendo l'immagine sferica tipica di un "nucleo".

Al contrario, se ci sono frammenti di DNA e quindi l'acido nucleico ha subito un danno, questi sono già espansi al di fuori della cavità dell'agarosio che aveva ospitato la cellula inizialmente. Più piccoli sono i frammenti, più sono liberi di muoversi in un determinato periodo di tempo e lasceranno la tipica scia della cometa.

# Test della cometa

Pertanto, la quantità di DNA che lascia la cavità è una misura della quantità di danno al DNA nella cellula.



**A:** La forma circolare indica l'assenza di danni al DNA. **B:** la lunga coda indica un danno al DNA  
**C:** evidente la diminuzione della lunghezza della coda dovuta ad un pretrattamento con sostanze protettive 41

# Test della cometa

Il video mostra velocemente alcuni passaggi della metodica





**Test di  
genotossicità:  
Test su batteri  
luminescenti**

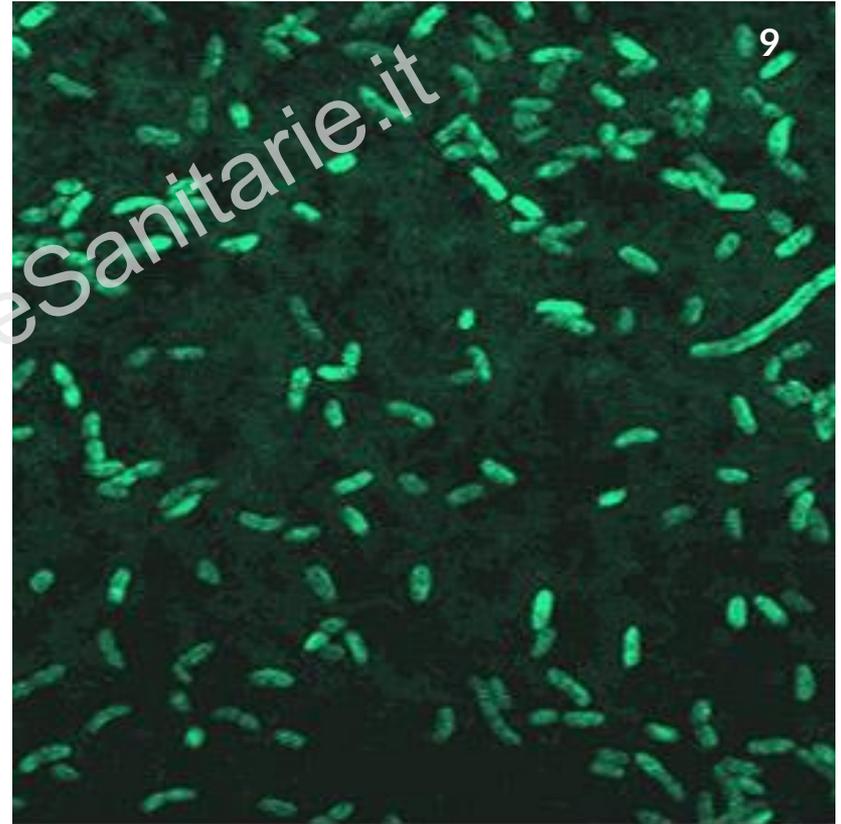
BioTecnologieSanitarie.it

# Test su batteri luminescenti

## Test su batteri luminescenti

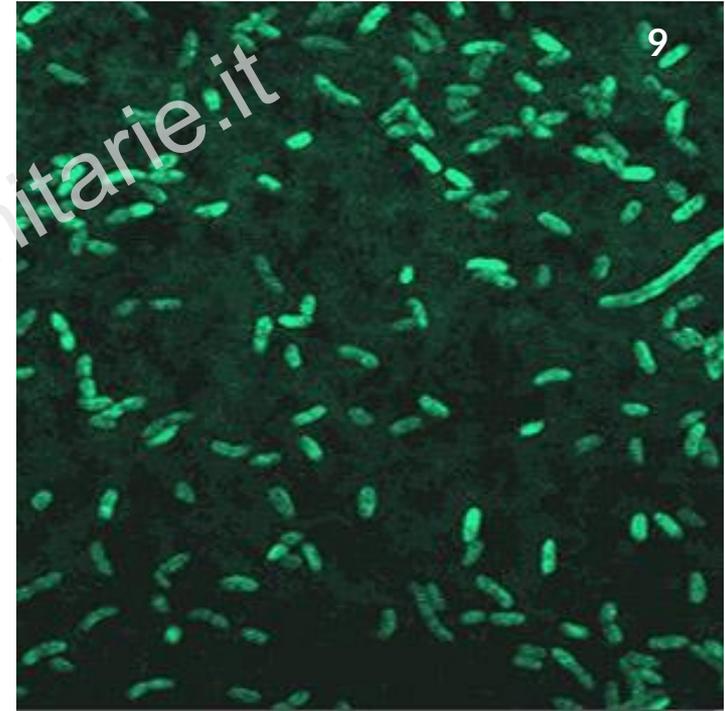
Il test utilizza un fenomeno naturale. Alcuni batteri tra cui **Vibrio fischeri** e **Vibrio harvey** (batteri Gram-negativi, tipici degli ambienti marini) sono in grado di emettere energia luminosa attraverso un processo chimico.

Vibrio fischeri



# Test su batteri luminescenti

**Test su batteri luminescenti** Il fenomeno della bioluminescenza richiede la presenza di due composti: la luciferina, un substrato organico che emette luce, e la luciferasi, un enzima che catalizza la reazione. La luciferina, in presenza di ATP (adenosintrifosfato), magnesio e dell'enzima luciferasi, cede elettroni, i quali, passando ad un livello minore di energia, liberano energia sotto forma di luce. Nei batteri questa reazione, che viene svolta da esseri viventi di diversi regni, richiede ossigeno.



Vibrio fischeri

# Test su batteri luminescenti

**Test su batteri luminescenti** I batteri appena citati come molti altri adottano un sistema di comunicazione che è legato alla densità della popolazione (**quorum sensing**). In altre parole essi riescono a coordinare l'espressione di un gene rispetto alla densità della popolazione.

Ne deriva che la luminescenza sarà evidente quando la popolazione avrà superato un punto critico di densità.



I fotofori (organi in grado di emettere luminescenza) di una seppia popolati da *Vibrio fischeri*

# Test su batteri luminescenti

**Test su batteri luminescenti** Chiarito il meccanismo della bioluminescenza è facile intuire come viene effettuato il test. O si effettuano misure del consumo di ATP direttamente coinvolto nella reazione di bioluminescenza per verificare le variazioni del metabolismo delle cellule batteriche e quindi indirettamente il grado di tossicità.

Oppure il composto che deve essere testato viene messo a contatto con la coltura batterica e poi misurata l'eventuale diminuzione di luminescenza che è ritenuta proporzionale alla tossicità del campione. In questo modo possono essere effettuate misure anche su acque reflue, acque dolci e marine ..

# Test su batteri luminescenti

## Test su batteri luminescenti

Se invece si utilizzano ceppi mutati di *V. fischeri* che hanno perso la capacità di emettere luce, il ripristino della bioluminescenza (reversione su mutanti) indica la capacità mutagena della sostanza in questione.



**Test di  
genotossicità:  
Test citogenetici**

# Test citogenetici

**Test citogenetici** Questo tipo di test misura le aberrazioni cromosomiche che possono essere facilmente individuate dopo aver sottoposto organismi animali o vegetali a sostanze potenzialmente genotossiche. Ovviamente le anomalie devono riguardare il nucleo o i cromosomi che appaiono ad esempio disgregati.

# Test citogenetici

Tra i vegetali più utilizzati la **cipolla** (*Allium cepa*) e l'**orzo** (*Hordeum vulgare*). Le radici della cipolla o i suoi tessuti meristematici sono preferiti perché le aberrazioni che vengono cercate sono facilmente osservabili. Infatti i cromosomi sono pochi e grandi.



Tessuto normale di radice di cipolla

# Test citogenetici

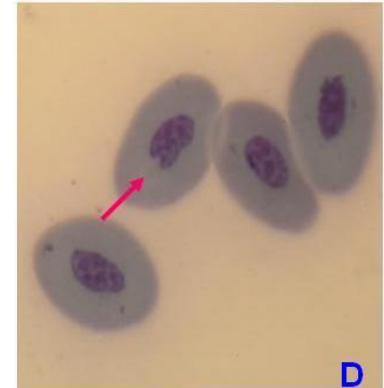
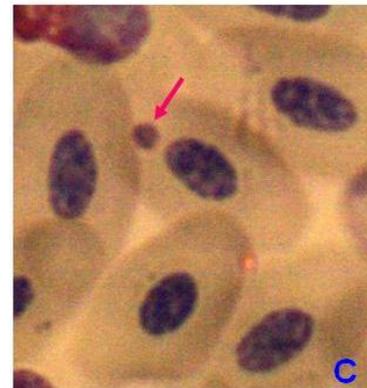
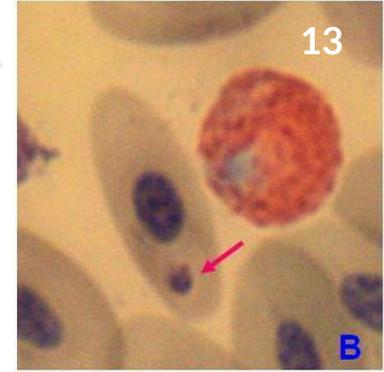
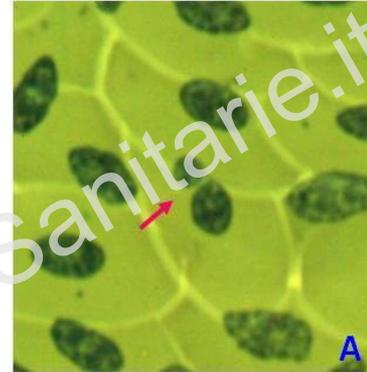
Sempre tra i vegetali più utilizzati va ricordata l'**erba miseria**. Sono piante ornamentali del genere Tradescantia sui cui pollini vengono fatte ricerche per scoprire eventuali anomalie dopo l'esposizione ad agenti con presunta attività genotossica.



Pianta del genere Tradescantia

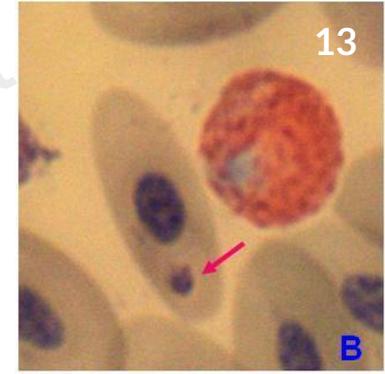
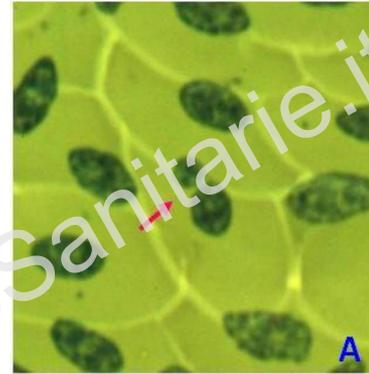
# Test citogenetici

Anche gli animali vengono usati. Di lato potete vedere esempi tipici di anomalie nucleari (A e D). In B e C sono osservabili i **micronuclei** che si possono formare durante il processo di mitosi. Le foto riguardano cellule di pinguino. Ma come si formano i micronuclei?



# Test citogenetici

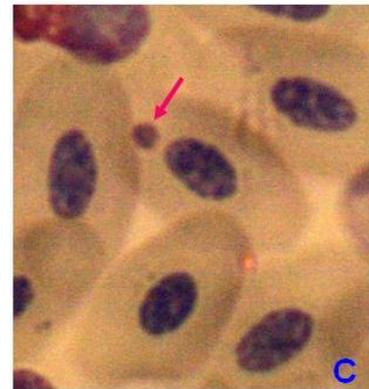
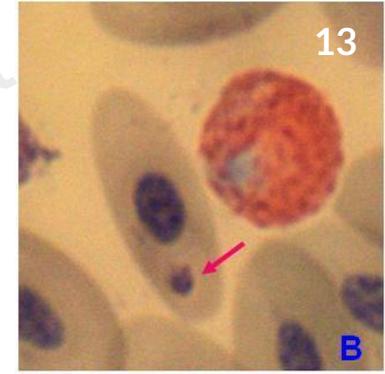
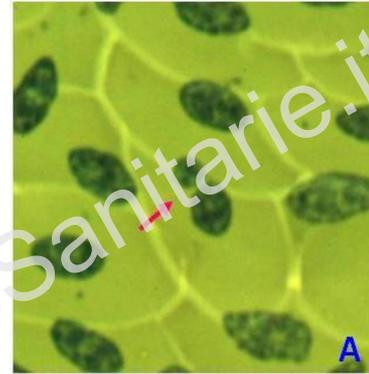
Nel nucleo possono essere presenti frammenti di cromosomi, privi di centromero, che non segregano durante la divisione cellulare. Intorno ad essi durante la telofase si riforma la membrana nucleare. Lo stesso fenomeno si può verificare con cromosomi interi che ritardando la migrazione durante l'anafase e restano esclusi dai nuclei principali.



# Test citogenetici

La frequenza e il tipo di micronuclei sono indicatori di tossicità e di genotossicità.

Si può anche calcolare l'indice di divisione nucleare (IDN) valutando il numero di cellule con uno, due, tre o quattro nuclei. Si possono così individuare agenti genotossici che stimolano la divisione cellulare.





**Test di  
genotossicità:  
Utilizzazione di  
bioindicatori**

BioTecnologieSanitarie.it

# Utilizzazione di bioindicatori

I **bioindicatori** sono organismi viventi sensibili ad uno o più specifici fattori per cui vengono utilizzati per il monitoraggio delle matrici ambientali.

All'appello non mancano funghi, piante ed animali.

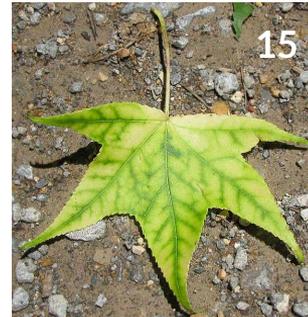
Un esempio di bioindicatori per l'aria sono i **licheni**, prodotto della simbiosi tra alghe e funghi.



*Lobaria pulmonaria*, lichene sensibile agli inquinanti ambientali

# Utilizzazione di bioindicatori

Ci sono anche **piante superiori** che vengono utilizzate per monitorare la presenza di ozono che provoca **clorosi** sulle foglie, che è la conseguenza di insufficiente produzione di clorofilla. Oltre all'ozono sono implicati molti altri fattori tra cui altri inquinanti: erbicidi, pesticidi e  $\text{SO}_2$



Foglia di liquidambar con clorosi a confronto con pianta normale

# Utilizzazione di bioindicatori

Le piante superiori sono particolarmente utili per il monitoraggio delle tre matrici ambientali (aria, acqua e suolo) ma anche per lo studio degli ambienti confinati per una serie di motivi.

- Hanno una risposta biologica più paragonabile a quella dei mammiferi rispetto ai procarioti.
- Sono anch'esse, come i mammiferi, in grado di metabolizzare sostanze che all'inizio sono inerti ma che possono dare origine durante i processi chimici a intermedi genotossici.
- Sono utilizzati spesso in situ. Si riesce così ad indagare meglio sulla sinergia di sostanze inquinanti che in laboratorio non si riesce a cogliere.

# Utilizzazione di bioindicatori

Anche gli animali possono essere utilizzati come bioindicatori.

Si possono studiare popolazioni in toto, il loro decremento o l'aumento, associandole alla presenza di inquinanti o agli effetti degli inquinanti sulla flora in esame. Gli animali studiati, facendo parte dello stesso ecosistema, infatti risentono immediatamente di eventuali danni alla flora come si può facilmente intuire. O perché le piante sono parte della loro catena alimentare o perché sono presenti altri tipi di relazioni vantaggiose.

In maniera particolare vengono studiati gli anfibi.

# Utilizzazione di bioindicatori

**Rane** e **rospi** sono particolarmente sensibili agli inquinanti, soprattutto pesticidi. Riescono ad assorbirli facilmente attraverso la cute, ad inalarli e a ingerirli con cibo contaminato.

Non riescono altrettanto facilmente a detossificarli. Quindi si accumulano nell'organismo.



Hyla intermedia

# Utilizzazione di bioindicatori

Vanno poi ricordati i **macroinvertebrati**, utilizzati per monitorare la qualità dell'acqua. Sono ubiquitari e facilmente identificabili. La sensibilità dimostrata li rende idonei a giudizi oggettivi.

Per esempio in Europa (Spagna, Francia, Russia, Norvegia ...) è stato adottato un sistema (dal 2006) basato su molluschi bioindicatori che vengono monitorati da un device intelligente che viene piazzato in situ ed è in grado di lavorare per un anno senza alcun intervento umano. Il device è collegato ad un data centre che ha il compito di raccogliere, processare e distribuire i dati nel web. Si ha così la situazione delle acque costiere in tempo reale.

Maggiori dettagli sull'argomento nella pagina del biomonitoraggio



# Il monitoraggio sulle matrici ambientali

## L'aria

# Monitoraggio ambientale

Questa serie di diapositive vuole chiarire concetti già esposti in questa come in altre presentazioni e fare il punto della situazione per ciascuna delle matrici ambientali. **Aria, acqua e suolo. Va sottolineato come negli ultimi anni particolare attenzione venga dedicata anche agli ambienti confinati, i luoghi chiusi in cui trascorriamo la maggior parte del tempo e che sono anche più inquinati degli ambienti outdoor.**

**Cominciamo a valutare i test che si eseguono sull'aria.**

# Monitoraggio ambientale: aria

Il monitoraggio dell'aria segue regole precise secondo le direttive europee (50/2008/CE - 107/2004/CE) recepite dal D.Lgs 155/10.

Sono quindi regolamentati il tipo di inquinanti, le modalità di prelievo e di analisi per ciascuno di essi, i tempi e i luoghi del monitoraggio, la gestione e la qualità dei dati rilevati.

Per chi vuole maggiori dettagli consiglio la [pagina dell'ARPA Veneto](#). Oltre all'elenco molto particolareggiato della pagina suggerita ricordo che negli ultimi anni viene studiato con sempre maggiore attenzione il **PAN**, acronimo del perossiacetilnitrato. Uno dei costituenti dello smog fotochimico.

# Monitoraggio ambientale: aria

Il PAN si forma per ossidazione dei residui di idrocarburi presenti nei gas di scarico degli autoveicoli.

Risulta irritante per gli occhi e le vie respiratorie. Ed è stato studiato nei pomodori dove provoca seri anni dopo alcune ore di esposizione. Per altre informazioni [cliccate qui](#).

Tornando ai vari inquinanti uno dei più importanti per gli effetti sulla salute umana è il particolato; il suo prelievo simula la filtrazione dell'apparato respiratorio dell'uomo arrivando così a fornire non solo il risultato quantitativo della presenza di PM10 e di forme ultrasottili ma anche altri dati.

# Monitoraggio ambientale: aria

Ecco i dati decisamente importanti ai fini dell'argomento trattato a cui alludevo.

- La potenza mutagena specifica: numero di mutazioni per unità di peso di estratto organico
- L'attività mutagena specifica: numero di mutazioni per unità di volume di aria.

L'attività genotossica viene studiata con i test in vivo, in vitro e in situ.



Stazione di rilevamento qualità dell'aria in Nevada



# Il monitoraggio sulle matrici ambientali

## L'acqua

BioTecnologieSanitarie.it

# Monitoraggio ambientale: acqua

Parlare dell'acqua è molto complesso perché il monitoraggio ambientale non coinvolge solo le acque potabili. Partiamo comunque dalle acque potabili perché il legislatore si è interessato prioritariamente a queste.

‘La "qualità dell'acqua destinata al consumo umano" è disciplinata dal Decreto Legislativo n.31 del 2001, che recepisce la Direttiva 98/83/CE, e che si applica a tutte le acque destinate all'uso potabile, per la preparazione di cibi e bevande, sia in ambito domestico che nelle imprese alimentari, a prescindere dalla loro origine e tipo di fornitura’  
*tratto da*

<http://www.portaleacque.salute.gov.it/PortaleAcquePubblico/normativa.do>

# Monitoraggio ambientale: acqua

Un altro punto importante sono le acque destinate alla balneazione. Sempre il portale delle acque gestito dal Ministero della Salute chiarisce la situazione e mappa le nostre coste.

Maggiori dettagli in questa pagina

<http://www.portaleacque.salute.gov.it/PortaleAcquePubblico/mappa.do>

Ma il monitoraggio si limita solo alle acque per uso umano? prioritariamente sì. Ma il ciclo a cui è sottoposta l'acqua ci dimostra ampiamente come questa abbia continui contatti con le altre due matrici ambientali e come acque meteoriche, superficiali e sotterranee si trasformino una nell'altra. E questo viene preso in considerazione nei lavori di ricerca.

# Monitoraggio ambientale: acqua

In queste pagine non si affronta il monitoraggio microbiologico, già trattato in “[Acqua: inquinamento chimico, fisico e microbiologico](#)”, ma la costante ricerca di sostanze genotossiche tra cui bisogna ricordare prioritariamente i metalli pesanti, gli IPA e i POP (acronimo per Persistent Organic Pollution). Vale la pena soffermarsi su quest'ultima categoria visto che delle altre ci siamo già occupati in diversi capitoli. I **POP** sono una categoria di sostanze organiche persistenti nell'ambiente perché resistenti alla degradazione chimica e biologica e ai processi fotolitici. Inoltre sono poco solubili in acqua perché lipofili e si bioconcentrano quindi facilmente nei tessuti adiposi. Grazie a queste caratteristiche le sostanze in questione si bioaccumulano con conseguenze sulla salute umana e sull'ambiente.

# Monitoraggio ambientale: acqua

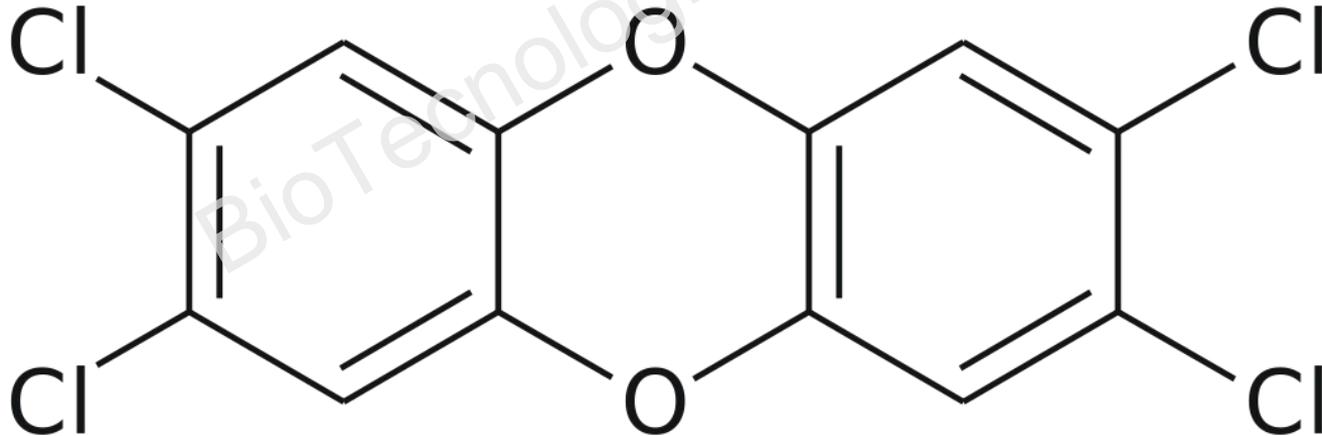
Ma che cos'è il **bioaccumulo**? È la concentrazione progressiva di una sostanza inquinante all'interno di un organismo. Il fenomeno può portare a concentrazioni di migliaia di volte maggiori all'interno dell'essere vivente rispetto all'ambiente esterno. Se poi pensiamo alla catena alimentare e al possibile passaggio da un anello al successivo si può facilmente intuire che i predatori possono avere una concentrazione di xenobiotici maggiore delle loro prede (**biomagnificazione**).

I POP sono pesticidi, prodotti farmaceutici, solventi; per lo più molecole di sintesi chimica.

Tra gli insetticidi bisogna ricordare l'Endrin, il Dieldrin, l'Aldrin, il DDT ... e poi non possiamo dimenticare le diossine derivate da combustioni incomplete o dalla produzione di pesticidi e i PCB.

# Monitoraggio ambientale: acqua

La diossine sono composti organici eterociclici caratterizzati da un anello a 6 atomi (4 di carbonio e 2 di ossigeno). Alle diossine appartengono alcuni composti dichiaratamente cancerogeni per l'uomo e altri responsabili di episodi tossici acuti. La più pericolosa è la 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-diossina, nell'immagine in basso. Nota come **TCDD**



# Monitoraggio ambientale: acqua

La formazione delle diossine non è mai voluta ma è successiva a processi chimici e/ di combustione. Per esempio è legata alla *fase iniziale della combustione dei rifiuti*, quando però la combustione genera HCl gassoso. È necessaria per questa reazione la presenza tra i rifiuti di metalli e cloro organico legato a polimeri come il PVC. Il problema della presenza di diossine intorno alle aree in cui sono presenti inceneritori è molto sentito perché indagini statistiche dimostrano un aumento delle forme di cancro nella popolazione residente.

# Monitoraggio ambientale: acqua

Le diossine vengono emesse anche *durante la produzione di un diserbante, l'acido triclorofenossiacetico*. A questo processo chimico è legato l'incidente di Seveso del 1976. Un'esplosione nell'industria chimica ICMESA del luogo ha disperso diossine nell'ambiente causando nell'immediato cloracne e nel medio e lungo tempo un aumento di alcune forme di cancro, soprattutto al seno, direttamente correlate alla concentrazione delle diossine nel sangue.

La zona colpita fu suddivisa in tre aree: A, B e C a seconda della concentrazione di TCDD individuate.

# Monitoraggio ambientale: acqua

Il Parco Naturale regionale *Bosco delle Querce*, costruito a seguito del Disastro di Seveso sopra la zona "A" e che contiene, in apposite vasche sigillate e sotterrate, il materiale contaminato.



# Monitoraggio ambientale: acqua

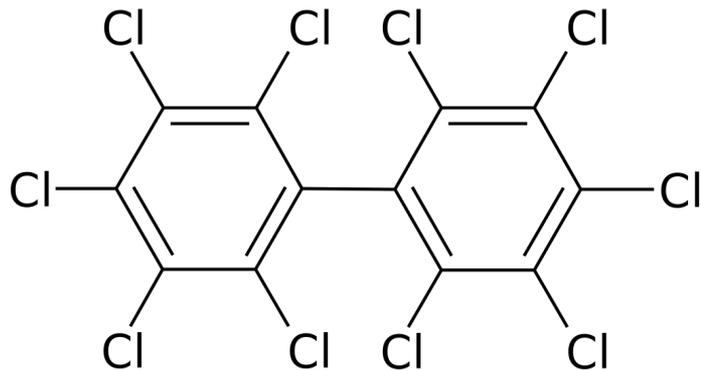
La **cloracne** è provocata nell'uomo dal contatto ma anche dall'ingestione e dall'inalazione di idrocarburi aromatici alogenati come le diossine clorurate di cui ci stiamo occupando. In questo addetto alla produzione di erbicidi ha coinvolto quasi tutti gli orifizi follicolari sul viso e sul collo con comedoni (conosciuti come punti neri), papule e lesioni simili a cisti



# Monitoraggio ambientale: acqua

Per completare l'argomento sui POP due parole sui PCB (*bifenili policlorurati*). Sono ampiamente distribuiti, bioaccumulano con altrettanta facilità e come le diossine si concentrano nei tessuti adiposi lungo la catena alimentare. Quindi oltre ad essere diffusi nell'ambiente li troviamo anche nel nostro piatto.

Decaclorobifenile



22

# Monitoraggio ambientale: acqua

I PCB erano utilizzati molto nel passato come liquidi refrigeranti nei trasformatori e nei condensatori. Ma nella seconda metà del XX secolo ci si è resi conto della loro pericolosità per l'ambiente e la salute dell'uomo.

Ci sono voluti molti anni prima di arrivare alla sospensione della produzione dei magnifici 12, i POP. Il **trattato di Stoccolma**, che è stato firmato da 150 Paesi nel 2001, è stato ispirato dal principio di precauzione ed ha sancito ufficialmente il bando dei POP. Eppure attualmente si riprende la discussione sul DDT. Il problema viene posto in numero di morti. I morti per malaria superano abbondantemente quelli legati ai danni da DDT. Che cosa è meglio fare?

# Monitoraggio ambientale: acqua

Da quanto appena spiegato ci si potrebbe chiedere come mai questo argomento viene inserito nel monitoraggio dell'acqua. Le diossine come gli altri POP in realtà interessano tutte e tre le matrici ambientali ma parlare di queste molecole in particolare è stata anche l'occasione giusta per inquadrare i concetti di bioaccumulazione e biomagnificazione.

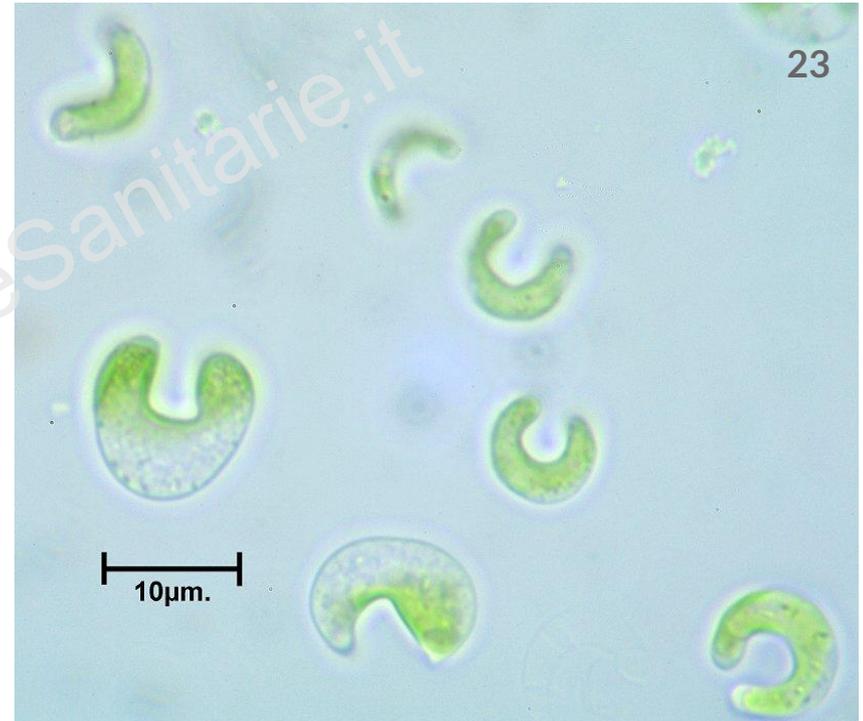
# Monitoraggio ambientale: acqua

Per quanto riguarda i test genotossici cosa recita la normativa? la normativa non prevede l'applicazione di test mutageni. Esistono però studi condotti in diversi Paesi che testimoniano come l'acqua per uso umano non possa essere esente da sostanze cancerogene. Quindi una serie di test chimici, biologici e mutageni potrebbe essere molto utile per tenere sotto controllo l'acqua. Suggestisco di leggere questa pagina dell'[ARPA Emilia-Romagna](#) che in modo schematico ma esaustivo propone le diverse modalità con cui sostanze genotossiche possano venire in contatto con l'acqua. Compresa la possibilità che alcuni agenti utilizzati a scopo disinfettante a base di cloro reagiscano formando **trialometani**.

# Monitoraggio ambientale: acqua

A proposito di test da condurre vale la pena ricordare qui le analisi che si conducono su un'alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Si valuta la presenza di tossici attraverso l'inibizione della crescita algale in un tempo di 4 giorni.

Il test viene condotto sulle acque superficiali e di scarico.



*Pseudokirchneriella subcapitata*



# Il monitoraggio sulle matrici ambientali **il suolo**

# Monitoraggio ambientale: suolo

Le sostanze genotossiche presenti nel suolo derivano per lo più da attività antropiche e possono essere la conseguenza di **sorgenti localizzate** come ad esempio discariche abusive, l'abbandono di sostanze pericolose (terra dei fuochi), impianti di incenerimento, impianti industriali o sversamenti accidentali. Oppure di **sorgenti diffuse** come il traffico veicolare.



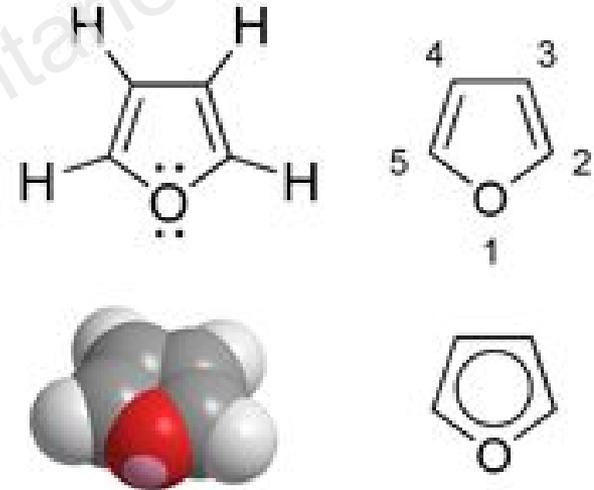
24

Discarica abusiva

# Monitoraggio ambientale: suolo

Il suolo viene monitorato attraverso campionamenti fissati ad una certa profondità e vengono ricercati circa 70 contaminanti tra metalli pesanti, IPA, PCB, diossine e furani.

Il furano, altro POP, è un composto organico eterociclico aromatico che si ottiene per sintesi e per distillazione del legno di pino. Si può però formare anche durante il trattamento termico degli alimenti. L'[EFSA](#) nell'ottobre del 2017 ha lanciato l'allarme per le conseguenze sulla salute relativa a danni al fegato.



25

Formule di struttura e modello molecolare del furano

# Monitoraggio ambientale: suolo

Tornando al monitoraggio del suolo c'è da ricordare che il D.Lgs. 152/06 fissa valori limite per tutti i 70 contaminanti ricercati.

Diversa è la ricerca per la genotossicità per cui si possono applicare il test dei micronuclei o il test della cometa. Si fa anche uso di bioindicatori.

Questi studi sono particolarmente utili oltre che nel monitoraggio ordinario prima che venga insediato un nuovo sito industriale o in seguito al cambio di destinazione d'uso quando una ex area industriale viene destinata ad uso abitativo o scolastico.

# Photo credits

- 1 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3577329/figure/f1-jmbe-13-2-175/>
- 2 By GOKLuLe 盧樂 (Own work) [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)], via Wikimedia Commons
- 3 By Genotox - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18631719>
- 4 By Fluggesini - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=41286251>
- 5 By Skowro28 - Own work, CC BY-SA 4.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=64612243>
- 6 By Genotox - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18632579>
- 7 By Genotox - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18633703>
- 8 Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0)
- 9 <https://www.flickr.com/photos/ajc1/252308050>
- 10 By Jamie Foster - Direct email from the author for the purpose of posting the image on Wikimedia/Wikipedia, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29613423>
- 11 By John Alan Elson [GFDL (<http://www.gnu.org/copyleft/fdl.html>) or CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)], via Wikimedia Commons
- 12 Di LucaLuca - Opera propria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=2891727>
- 13 By Faustus1983 (Own work) [CC BY-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)], via Wikimedia Commons

# Photo credits

- 14** By Bernd Haynold - selbst fotografiert - own picture, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3320107>
- 15** By Jim Conrad - JIM CONRAD'S NATURALIST NEWSLETTER. Written on the road and issued from the woods edge near Natchez, Mississippi, USA <http://www.backyardnature.net/n/08/080728.htm> <http://www.backyardnature.net/n/08/080728cl.jpg>, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=5541218>
- 16** By Aroche - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=14946785>
- 17** By Benny Trapp - Own work, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18800796>
- 18** By Jeremy Buckingham from Orange, Australia (Air quality monitoring Dish Texas) [CC BY 2.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>)], via Wikimedia Commons
- 19** Di Utente:Paginazero - Opera propria, Pubblico dominio, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=48280474>
- 20** Di Massimiliano Mariani - Opera propria, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=18648934>
- 21** By NIOSH - OCCUPATIONAL DERMATOSES - CDC/NIOSH, Public Domain, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=36912773>
- 22** Di Paginazero - mio disegno, Pubblico dominio, <https://it.wikipedia.org/w/index.php?curid=1443657>

# Photo credits

23 tratto da <http://algalweb.net/plankton.htm>

24 Nicholas Frisardi [CC BY-SA 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/>)], via Wikimedia Commons

25 CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=670481>

BioTecnologieSanitarie.it