

RICERCA E APPLICAZIONE DI METODOLOGIE ECOTOSSICOLOGICHE

L'ECOTOSSICOLOGIA COME STRUMENTO DI GESTIONE DEGLI AMBIENTI ACQUATICI E TERRESTRI

La ricerca, il controllo da parte delle Agenzie, il mondo dei privati

ATTI DELLE GIORNATE DI STUDIO

8^a edizione
Giornate di Studio
26-28 novembre 2018

Camera di Commercio
Piazza del Municipio, 48 - Livorno



8th Biannual ECOTOxicology MEeting (BECOME 2018)

Organizzato da:



ECOTOX Lds

Con il supporto di:



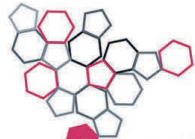
Con il patrocinio di:





ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



**Sistema Nazionale
per la Protezione
dell'Ambiente**

GIORNATE DI STUDIO - 8^a EDIZIONE

**Atti delle giornate di studio su:
l'ecotossicologia come strumento
di gestione degli ambienti acquatici
e terrestri**

La ricerca, il controllo da parte delle Agenzie. Il mondo dei privati

ATTI

Livorno, 26-28 novembre 2018

Informazioni legali

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell'ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132.

Le persone che agiscono per suo conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questa pubblicazione.

ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.gov.it

ISPRA, Atti 2019
ISBN 978-88-448-0954-6

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina: Sonia Poponessi

Foto di copertina: Silvia Giuliani

Coordinamento pubblicazione on line:

Daria Mazzella

ISPRA – Settore Editoria

GIUGNO 2019

A cura di:

Cristian Mugnai (ISPRA CN - COS)

INDICE

PREMESSA	6
Le piante nel monitoraggio ambientale: effetti fitotossici e genotossici di diversi contaminanti	7
Indagine su biomarker di fitotossicità in <i>Lepidium sativum</i>	12
Is “green” braking possible? Comparative assessment of microparticles generated by traditional and innovative braking systems.	17
Linee cellulari umane (e non) nell'indagine di matrici ambientali e complesse.	22
Valutazione preliminare della tossicità acquatica di ingredienti cosmetici innovativi	26
Indagine preliminare sugli effetti del pfoa su stati embrionali di <i>Danio rerio</i> : un possibile indicatore di salute dell'ecosistema.....	31
Verso la validazione del test dei micronuclei con <i>Tradescantia</i> per il monitoraggio della genotossicità in ambiente alpino.....	36
Applicazione di test ecotossicologici su acque potabili.....	41
L'utilità dell'approccio ecotossicologico a tutela della salute del bagnante	46
Applicazione del protocollo analitico per la caratterizzazione ecotossicologica e chimica dei sedimenti (PRATO) dell'invaso della Valgrosina.....	51
Terreni provenienti da scavi meccanizzati: valutazione della loro ecotossicità.....	56
Valutazione della tossicità dei sedimenti degli invasi ai fini della fluitazione: il protocollo PrATO.....	62
Determinazione dei valori di fondo naturale dei sedimenti marini abruzzesi: la rivincita dell'ecotossicologia.....	68

Sviluppo di “mappe (eco)tossicologiche” e loro applicazione nel risk assessment del fiume ledra.....73

PREMESSA

L'8ª edizione delle Giornate di Studio "Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche: L'ecotossicologia come strumento di gestione degli ambienti acquatici e terrestri", si è svolta a Livorno presso la Camera di Commercio, dal 26 al 28 novembre 2018.

L'iniziativa ha riscosso un notevole successo, registrando una affluenza di oltre 200 partecipanti (con una grande rappresentanza di giovani) e con la presentazione di 34 comunicazioni scientifiche e 52 poster.

Gli argomenti trattati nelle varie sessioni hanno considerato: nuove frontiere nell'indagine ecotossicologica; criticità e sviluppi applicativi dell'ecotossicologia rispetto alla normativa vigente; l'ecotossicologia nella gestione ambientale e nell'analisi del rischio ecologico.

Rispetto alle edizioni precedenti, è stato dato ampio spazio alla discussione, partendo dalla prima giornata con i focus group attraverso la tecnica del mutual survey, fino ad arrivare alla tavola rotonda propedeutica all'avvio delle sessioni.

Di seguito si riportano i contributi tecnico scientifici i cui autori hanno autorizzato la pubblicazione come ATTI della 8ª edizione delle Giornate di Studio "Ricerca e applicazione di metodologie ecotossicologiche in ambienti acquatici e matrici contaminate".

Cristian Mugnai

LE PIANTE NEL MONITORAGGIO AMBIENTALE: EFFETTI FITOTOSSICI E GENOTOSSICI DI DIVERSI CONTAMINANTI

by L. Giorgetti ^a, L. Bellani ^{a,b}, S. Muccifora ^b, E. Tassi ^c, C. Spanò ^d, S. Bottega ^d, F. Barbieri ^b, M. Ruffini Castiglione ^d

^aIstituto di Biologia e Biotecnologia Agraria, UOS Pisa, CNR, Via Moruzzi 1, 56124 Pisa, Italia - email: l.giorgetti@ibba.cnr.it

^bDipartimento di Scienze della Vita, Università di Siena, Via A. Moro 2, 53100 Siena, Italia - email: lorenza.bellani@unisi.it; simonetta.muccifora@unisi.it; barbierifrance88@gmail.com

^c Istituto di Ricerca sugli Ecosistemi Terrestri, UOS Pisa, CNR, Via Moruzzi 1, 56124 Pisa, Italia - email: elianalanfranca.tassi@cnr.it

^dDipartimento di Biologia, Università di Pisa, Via Ghini 13, 56126 Pisa, Italia - email: carmelina.spano@unipi.it; stefania.bottega@unipi.it; monica.ruffini.castiglione@unipi.it

Abstract - Le piante con il loro stile di vita sessile, la loro struttura e fisiologia, entrano direttamente in contatto con le matrici ambientali, suolo, acqua e aria. Proprio per queste prerogative, gli studi di monitoraggio ambientale basati sui sistemi vegetali possono essere molto indicativi del reale stato di salute dell'ambiente. I saggi biologici sulle piante permettono di analizzare gli effetti di contaminanti a dispersione naturale o antropica (metalli pesanti, sostanze organiche e aromatiche, nanoparticelle, etc) e sono molto vantaggiosi, economici, ad alta sensibilità e correlabili con risultati ottenuti su sistemi animali. Questi saggi, possono considerare diversi endpoints: parametri fisiologici e morfologici (effetti fitotossici); produzione di enzimi e molecole legate alla risposta a stress; effetti su attività mitotica e ciclo cellulare (effetti citotossici); danni al DNA da attività clastogenica e mutagenica (effetti genotossici); danni ultrastrutturali. Inoltre questi test permettono di valutare il danno acuto o cronico in seguito ad esposizioni più o meno lunghe ai contaminanti.

A conferma dell'efficienza di questo metodo di indagine si riportano studi effettuati nei nostri laboratori su piante modello di interesse agrario (*Vicia faba*, *V. sativa*, *Allium cepa*, *Hordeum vulgare* e *Zea mays*) esposte a diversi inquinanti e valutate attraverso un approccio multidisciplinare.

Keywords: monitoraggio ambientale, fitotossicità, genotossicità, contaminanti, ultrastruttura

Introduzione

Le piante interagiscono direttamente con l'ambiente terrestre e atmosferico, sono altamente sensibili ai diversi contaminanti e possiedono risposte cellulari simili a quelle degli organismi animali, ma il loro utilizzo nella sperimentazione dal punto di vista etico è più accettabile e più facilmente realizzabile (Blinova 2004; Arambasić et al., 1995). Pertanto l'uso delle piante per saggi di tossicità ha acquisito notevole valore negli ultimi decenni con sperimentazioni effettuate sia *in vivo* che *in vitro*.

Il processo di germinazione del seme rappresenta l'evento più critico nella formazione della futura pianta (Dash e Panda, 2001). Il saggio di fitotossicità rappresenta l'approccio sperimentale più immediato per valutare l'effetto di un potenziale contaminante sulla germinazione dei semi e sulla crescita del germoglio (effetto acuto) e, in tempi più lunghi, a livello del ciclo vitale della pianta (effetto cronico) (Martignon, 2009). Le specie modello comunemente utilizzate sono *Lepidium sativum* L., *Cucumis sativus* L. e *Lactuca sativa* L. (Baudo et al., 2007). I parametri (endpoints) analizzabili possono essere molteplici e complessi come percentuale di germinazione e lunghezza della radice primaria, sviluppo della biomassa, contenuto di clorofilla o altri pigmenti fotosintetici, attività enzimatiche e contenuto di metaboliti secondari, che possono variare in risposta allo stress. Inoltre si possono valutare gli effetti genotossici dei contaminanti ambientali utilizzando il meristema radicale di piante modello come *Vicia faba* L. e *Allium cepa* L. Le analisi sono mirate alla valutazione di possibili alterazioni del ciclo cellulare, e/o dei danni al patrimonio genetico, questi ultimi rilevati anche dal test del micronucleo (Giorgetti et al., 2011; Barbaferri e Giorgetti, 2016; Ruffini Castiglione et al., 2015; Cotelle et al., 2015).

Il nostro gruppo di ricerca è da anni attivo nell'uso delle piante per monitorare contaminanti di varia natura in diverse matrici ambientali.

Materiali e metodi

-Saggi di fitotossicità: gli endpoints considerati sono la percentuale di germinazione e la lunghezza della radice dopo 72 ore di trattamento.

-Saggi di genotossicità: effettuati tramite analisi citologica dell'apice radicale mediante colorazione di Feulgen e valutazione dell'indice mitotico, delle aberrazioni citologiche e dell'eventuale presenza di micronuclei.

-Studi ultrastrutturali: mirati alla caratterizzazione dei contaminanti, ad esempio nanoparticelle (NP) di biossido di titanio (TiO₂) per valutarne la forma e le dimensioni, alla determinazione delle modalità di internalizzazione e all'identificazione di eventuali alterazioni dell'ultrastruttura.

-Analisi delle attività enzimatiche: determinazione degli enzimi coinvolti nello stress ossidativo derivato dall'esposizione ai diversi tipi di contaminanti mediante approccio istochimico e saggi biochimici.

Risultati

In Tabella 1 sono riportate le specie vegetali, i contaminanti e le matrici ambientali valutate con gli approcci sopra riportati a rappresentare alcuni esempi degli studi effettuati negli ultimi anni dal nostro gruppo di ricerca.

Tabella 1.

Piante utilizzate	Contaminanti:	Matrici ambientali:	Pubblicazioni
<i>Vicia faba</i> , <i>Allium cepa</i> , <i>Lactuca sativa</i>	Organici e inorganici	Acque reflue	Giorgetti et al. 2011. Di Gregorio et al. 2015.
<i>Vicia faba</i>	PAHs	Suolo (ex situ bioremediation in biopila)	Ruffini Castiglione et al. 2016.
<i>Vicia faba</i>	Boro	Suolo	Barbafieri & Giorgetti 2016.
<i>Vicia sativa</i> L.	CuBr ₂	Acqua	Bellani et al. 2014. Muccifora & Bellani 2013
<i>Vicia faba minor</i> <i>Zea mays</i>	NP di TiO ₂	Acqua	Ruffini Castiglione et al. 2011. Ruffini Castiglione et al. 2016.
<i>Vicia narbonensis</i>	NP di TiO ₂	Acqua	Ruffini Castiglione et al. 2015.
<i>Helianthus annuus</i>	NP di CeO ₂	Suolo (+B)	Tassi et al. 2017.
<i>Raphanus sativus</i>	Nanotubi di Halloysite	Acqua	Bellani et al. 2016.
<i>Pisum sativum</i>	NP di TiO ₂	Suolo (+fango)	Giorgetti et al. 2019.

Discussione

I saggi effettuati hanno permesso di analizzare gli effetti di contaminanti a dispersione naturale o antropica come metalli pesanti, sostanze organiche, aromatiche, NP in diversi sistemi vegetali.

In particolare gli studi più complessi e più recenti sono stati effettuati su contaminanti emergenti costituiti da NP di TiO₂ che sono tra le più diffuse e utilizzate in molti settori industriali (cosmetici, prodotti autopulenti, filtri solari, vernici, industria alimentare, farmaceutica) e in campo medico. L'approccio sperimentale multidisciplinare da noi impiegato è basato sul test di fitotossicità e sull'analisi citogenetica e test del micronucleo (Fig. 1), sull'analisi al microscopio elettronico a trasmissione (Fig. 2) e sull'analisi di variazioni di attività enzimatiche con approccio biochimico e istochimico. Queste analisi hanno evidenziato che le NP di TiO₂ possono causare tossicità a diversi livelli, a seconda delle loro dimensioni e forma e della matrice ambientale in cui sono presenti.

Conclusioni

Considerando l'importanza delle piante negli studi di ecotossicologia possiamo concludere che i test di fitotossicità e genotossicità forniscono informazioni immediate e importanti per la valutazione degli effetti di contaminanti ambientali. L'approccio multidisciplinare permette di valutare molti parametri sia ambientali che biologici favorendo una maggiore comprensione dei meccanismi cellulari implicati nella risposta della pianta alle diverse sostanze e delle interazioni contaminante-matrice-pianta.

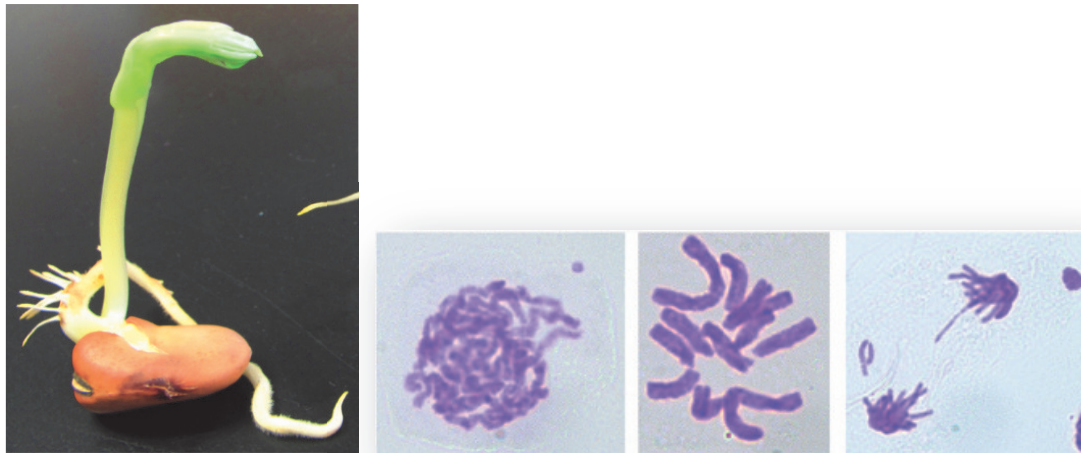


Fig. 1. Test di fito-genotossicità in *Vicia faba* L.

Nel caso degli studi effettuati sulle NP i nostri risultati suggeriscono una riflessione sulla possibile tossicità di NP e di nanomateriali largamente usati e che, immessi nell'ambiente, possono accumularsi nelle diverse matrici raggiungendo la catena alimentare e quindi procurando danni agli organismi viventi.

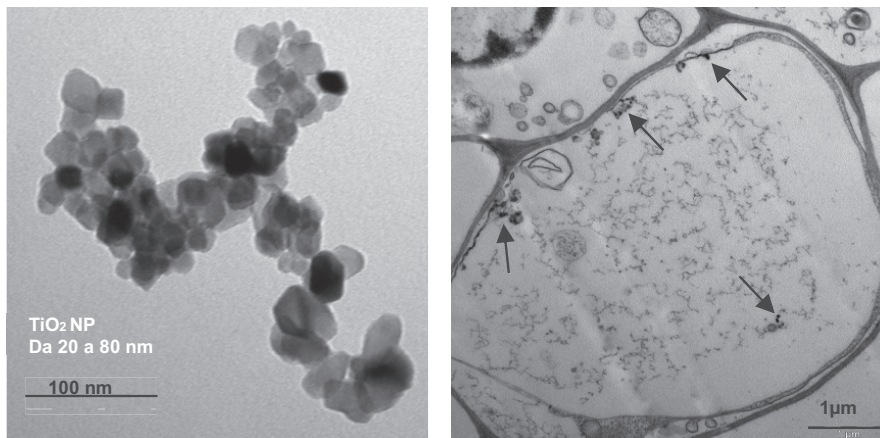


Fig. 2. Analisi al microscopio elettronico di NP di TiO_2 isolate ed in cellule di radici di *Pisum sativum* L. [freccie].

Bibliografia

Arambašić MB, Bjelic S, Subakov G 1995. Acute toxicity of heavy metals [copper, lead, zink], phenol and sodium on *Allium cepa* L., *Lepidium sativum* L. and *Daphnia magna* St.: comparative investigations and the practical applications. *Water Res* 29: 497-503.

Barbafieri M, Giorgetti L 2016. Contaminant bioavailability in soil and phytotoxicity/genotoxicity tests in *Vicia faba* L.: a case study of boron contamination. *Environ Sci Pollut Res Int* 23: 24327-24336.

Baudo R, Beltrami M, Gazzola M 2007. Presentazione dei risultati dell'interconfronto sulla determinazione degli effetti tossici di sostanze presenti in matrici solide sulla

germinazione e allungamento radicale di semi di monocotiledoni e dicotiledoni. In: M Beltrami e R Baudo Atti 8° Workshop Fitotox. Edizioni CNR - ISE, Verbania: 27-116.

Bellani L, Giorgetti L, Riela S, Lazzara G, Scialabba A, Massaro M 2016. Ecotoxicity of halloysite nano tube-supported Palladium nanoparticles in *Raphanus sativus* L. *Environ Toxicol Chem* 35: 2503–2510.

Bellani L, Muccifora S, Giorgetti L 2014. Response to copper bromide exposure in *Vicia sativa* L. seeds: Analysis of genotoxicity, nucleolar activity and mineral profile. *Ecotox Environ Saf* 107: 245–250.

Blinova I 2004. Use of freshwater algae and duckweeds for phytotoxicity testing. *Environ Toxicol* 19: 425–428.

Cotelle S, Dhyèvre A, Muller S, Chenon P, Manier N, Pandard P, Echairi A, Silvestre J, Guiresse M, Pinelli E, Giorgetti L, Barbaferi M, Silva VC, Engel F, Radetski CM 2015. Soil genotoxicity assessment results of an interlaboratory study on the *Vicia* micronucleus assay in the context of ISO standardization. *Environ Sci Pollut Res Int* 22: 988-995.

Dash M, Panda SK 2001. Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Biol Plant* 44: 587-589.

Di Gregorio S, Giorgetti L, Ruffini Castiglione M, Mariotti L, Lorenzi R 2015. Phytoremediation for improving the quality of effluents from a conventional tannery wastewater treatment plants. *Int J Environ Sci Technol* 12: 1387–1400.

Giorgetti L, Spanò C, Muccifora S, Bellani L, Tassi E, Bottega S, Di Gregorio S, Siracusa G, Sanità di Toppi L, Ruffini Castiglione M 2019. An integrated approach to highlight biological responses of *Pisum sativum* root to nano-TiO₂ exposure in a biosolid-amended agricultural soil. *Sci Total Environ* 10: 2705-2716.

Giorgetti L, Talouizte H, Merzouki M, Caltavuturo L, Geri C, Frassinetti S 2011. Genotoxicity evaluation of effluents from textile industries of the region Fez-Boulmane, Morocco: a case study. *Ecotoxicol Environ Saf* 74: 2275-2283.

Martignon G 2009. Linee guida per la misura della tossicità dei suoli. Test di fitotossicità per il suolo. CESI RICERCA-ASV Ambiente e Sviluppo Sostenibile.

Muccifora S, Bellani L 2013. Effects of copper on germination and reserve mobilization in *Vicia sativa* L. seeds. *Environ Pollut* 179: 68-74.

Ruffini Castiglione M, Giorgetti L, Becarelli S, Siracusa G, Lorenzi R, Di Gregorio S 2016. Polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soils: bioaugmentation of autochthonous bacteria and toxicological assessment of the bioremediation process by means of *Vicia faba* L. *Environ Sci Pollut Res Int* 23: 7930-7941.

Ruffini Castiglione M, Giorgetti L, Bellani L, Muccifora S, Bottega S, Spanò C 2016. Root responses to different types of TiO₂ nanoparticles and bulk counterpart in plant model system *Vicia faba* L. *Environ Exp Bot* 130: 11-21.

Ruffini Castiglione M, Giorgetti L, Cremonini R, Bottega S, Spanò C 2015. Impact of TiO₂ nanoparticles on *Vicia narbonensis* L.: potential toxicity effects. *Protoplasma* 251: 1471-1479.

Ruffini Castiglione M, Giorgetti L, Geri C, Cremonini R 2011. The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. *J Nano Res* 13: 2443-2449.

Tassi E, Giorgetti L, Morelli E, Peralta-Videa J R, Gardea-Torresdey J L, Barbaferi M 2017. Physiological and biochemical responses of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to nano-CeO₂ and excess boron: Modulation of boron phytotoxicity. *Plant Physiol Biochem* 110: 50-58.