

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata XXIII ciclo
Curriculum in Ecologia

*Valutazione della genotossicità in suoli a diverso grado di
contaminazione*

Coordinatore: Prof. Ezio Ricca

Candidata: Annamaria Rocco

Tutore: Dott.ssa Giulia Maisto

Tutore esterno: Dott.ssa Sonia Manzo

A.A. 2009-2010

INDICE

1. Introduzione	3
1.1 Il suolo e la pedogenesi	3
<i>1.1.1 Caratteristiche del suolo</i>	5
<i>1.1.2 Organismi del suolo</i>	9
1.2 Il suolo nell'ecosistema urbano	10
<i>1.2.1 Inquinamento del suolo</i>	11
<i>1.2.2 I metalli pesanti</i>	12
1.3 Ecotossicologia	13
1.4 Genotossicologia	18
<i>1.4.1 Biomarker di genotossicità</i>	19
1.5 Citotossicità	24
1.6 Valutazione della tossicità ed integrazione dei risultati	26
2. Scopo della ricerca	30
3. Materiali e metodi	31
3.1 Campionamento del suolo	31
3.2 Caratterizzazione chimico-fisica dei suoli	32
<i>3.2.1 Tessitura</i>	32
<i>3.2.2 Contenuto di sostanza organica</i>	33
<i>3.2.3 Tenore idrico</i>	33
<i>3.2.4 Capacità idrica massimale (CIM)</i>	33
<i>3.2.5 pH</i>	34
3.3 Scelta e messa a punto dei test di genotossicità	35
<i>3.3.1 Test dei micronuclei</i>	36

3.3.2 <i>Test della cometa</i>	37
3.4 Contaminazione del suolo standard	40
3.5 Espressione dei risultati di genotossicità	41
3.6 Calcolo di un indice di genotossicità integrato	41
3.7 Bioaccumulo e stabilità della membrana lisosomiale in <i>Eisenia fetida</i>	43
3.7.1 <i>Trattamento preliminare dei lombrichi</i>	43
3.7.2 <i>Campionamento e contaminazione del suolo di riferimento</i>	44
3.7.3 <i>Preparazione del test ed analisi</i>	44
3.8 Analisi statistica	46
4. Risultati e discussione	48
4.1 Caratteristiche dei suoli	48
4.2 Batteria di test di genotossicità applicata ai suoli campionati	53
4.2.1 <i>Relazioni tra proprietà chimico-fisiche e risultati di genotossicità nei suoli campionati</i>	60
4.3 Confronto degli effetti genotossici ottenuti per il suolo contaminato artificialmente e per il suolo urbano	62
4.4 Indice di genotossicità (Genotoxicity test Battery integrated Index – GBI)	67
4.5 Risposta dei lombrichi <i>E. fetida</i> alla contaminazione da Cu: bioaccumulo e stabilità della membrana lisosomiale	72
5. Conclusioni	79
Bibliografia	81
Ringraziamenti	96

1. INTRODUZIONE

1.1 Il suolo e la pedogenesi

Nel 1911, Raman definiva il suolo come “lo strato superiore della crosta terrestre sottoposto alle intemperie. Esso è costituito da frammenti della roccia madre sbriciolati e rimaneggiati chimicamente, e da detriti di piante e animali” (Coineau, 1974). Nel 1998, la FAO ha definito il suolo come un corpo naturale continuo, le cui tre maggiori caratteristiche sono:

1. l'organizzazione in strutture, specifiche per il mezzo pedologico. Queste strutture formano l'aspetto morfologico del suolo, derivano dalla sua storia e determinano le sue proprietà e la sua dinamica;
2. la composizione, formata da costituenti minerali e organici, che comprende la fase solida, liquida e gassosa;
3. la costante evoluzione, caratteristica che assegna al suolo la sua quarta dimensione: il tempo.

In sintesi, il suolo è un habitat estremamente vario, uno dei più ricchi di organismi, sia dal punto di vista tassonomico che numerico, di tutta la biosfera. Secondo la natura della roccia madre, le condizioni climatiche, l'esposizione, la pendenza della zona in cui avviene la degradazione, si possono avere molti tipi di suolo, ciascuno strettamente correlato sia con la vegetazione sia con gli organismi che in esso vivono. Il suolo presenta una struttura dinamica; in esso si verificano una continua circolazione di acqua e di aria e continue modificazioni biochimiche determinate dai microrganismi che intervengono attivamente, trasformandolo e rigenerandolo (Nappi, 2000).

Le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche del suolo cambiano in funzione della profondità. Il profilo del suolo, infatti, è differenziato in strati

omogenei ad andamento quasi orizzontale, detti orizzonti, di spessore variabile. Ogni orizzonte ha caratteristiche proprie che sono determinate dai processi di alterazione *in situ* e dal flusso di materia rispetto agli orizzonti limitrofi. L'orizzonte superficiale è caratterizzato da materiale organico poco alterato, mentre gli orizzonti sottostanti presentano una minore percentuale di materia organica, fino ad arrivare ad orizzonti costituiti da particelle incoerenti o consolidate (fig. 1.1).

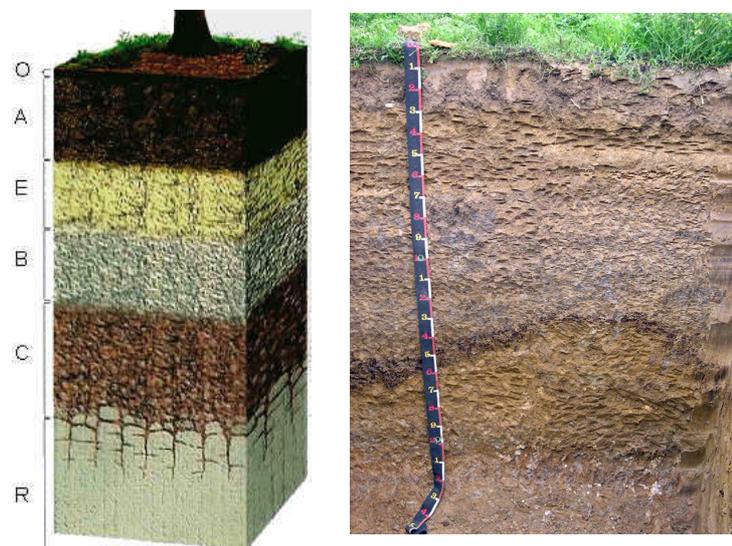


Figura 1.1. Profilo del suolo: principali orizzonti.

Il processo di formazione del suolo, detto pedogenesi, coinvolge e dipende da una rilevante serie di variabili che contribuiscono a diversi livelli: escursioni termiche, differenti regimi di piovosità, erosione eolica, cui si associa l'azione dei microrganismi. La degradazione meteorica delle rocce rappresenta il fattore principale del primo stadio di formazione di un suolo: essa comprende tutti i processi di degradazione chimico-fisica cui sono soggette normalmente le rocce di

affioramento e che variano al variare del clima e della composizione della roccia stessa. Anche l'attività biologica contribuisce alla disgregazione della roccia, soprattutto attraverso organismi "pionieri", quali i licheni, che a loro volta favoriscono l'insediamento di altri tipi di microrganismi quali batteri, funghi, alghe e protozoi (Matthey et al., 1987).

Nel percorso di colonizzazione, dal primo insediamento dei licheni a quello degli organismi vegetali superiori, possono passare molti anni. Durante questo processo, si verifica il progressivo accumulo di sostanza organica stabile (humus) che rappresenta la componente essenziale perché si possa parlare di suolo propriamente detto. Nel processo pedogenetico non è da escludere l'azione di funghi e batteri decompositori che svolgono un ruolo rilevante nelle trasformazioni chimiche del substrato organico che si accumula al suolo.

1.1.1 Caratteristiche del suolo

Nel suolo è possibile riconoscere tre fasi strettamente interconnesse: una fase solida, costituita da una componente inorganica, una organica e una colloidale; una fase liquida, costituita dall'acqua del suolo con le sostanze solubili in essa disciolte, e una fase gassosa rappresentata dall'aria che occupa gli interstizi vuoti nel suolo.

La componente organica della fase solida è la risultante dei processi di produzione primaria e secondaria e di decomposizione. I principali input di sostanza organica nel suolo derivano dalle biomasse vegetali, e secondariamente dalle spoglie animali e microbiche. In un suolo forestale, il contributo principale di sostanza organica deriva dalla deposizione della lettiera, mentre in un suolo prativo la fonte principale è costituita dalla rizosfera sotto forma di secreti, micro

soluti rilasciati, cellule di sfaldamento, aree radicali morte. L'humus, che deriva dall'attività dei decompositori, rappresenta la componente organica "stabile"; essa interagisce con le frazioni minerali per formare aggregati, le cui dimensioni e caratteristiche chimico-fisiche condizionano la struttura, l'aerazione e la ritenzione idrica del suolo. Anche l'humus può essere decomposto e mineralizzato, sia pure molto lentamente, liberando nutrienti che torneranno ad essere fruiti dagli organismi.

La componente minerale della fase solida del suolo è costituita dalla terra fine, l'insieme di tutte le particelle di diametro inferiore ai 2 mm, e dallo scheletro, le particelle con diametro superiore ai 2 mm. La terra fine è costituita da sabbia, limo ed argilla; lo scheletro, invece, è costituito da ghiaia, ciottoli, pietre e sassi.

Infine, la componente colloidale risulta costituita dalle sostanze umiche e dalla frazione argillosa, che, oltre ad aumentare la strutturazione del suolo, essendo cariche negativamente, legano cationi, aumentando la capacità di scambio cationico del suolo.

L'acqua che si trova nel suolo occupa una parte dei pori dove è trattenuta da forze fisiche tanto maggiori quanto più piccole sono le loro dimensioni. Su queste basi si può distinguere:

- acqua di gravità, che dopo le precipitazioni riempie i pori di maggiori dimensioni per poi disperdersi per azione della forza di gravità;
- acqua capillare che viene trattenuta nei pori con diametro compreso tra 0.2 e 0.8 μm ;
- acqua igroscopica, che forma un sottile film di molecole trattenuto dalla pressione presente sulla superficie delle particelle di suolo.

L'acqua non solo influenza direttamente tutte le attività degli organismi del suolo, ma può diventare limitante per l'aerazione e, quindi, per la disponibilità di ossigeno agli organismi. Aria e acqua, infatti, in un sistema a porosità finita, come il suolo, competono per gli stessi spazi. La composizione chimica dell'aria nel suolo non differisce molto da quella atmosferica ad eccezione della concentrazione dell'anidride carbonica, che risulta più elevata rispetto all'aria atmosferica, a causa dell'intensa attività dei decompositori.

Da un punto di vista fisico, due dei parametri di maggiore importanza per la caratterizzazione dei suoli sono la *tessitura* e la *struttura*. La tessitura definisce la distribuzione percentuale delle tre componenti della terra fine (sabbia, limo ed argilla). La struttura indica le modalità con cui le singole particelle si uniscono a formare aggregati. La struttura del suolo, a sua volta, influenza importanti proprietà fisiche quali la *porosità* (volume degli spazi vuoti del suolo come rapporto percentuale sul volume totale), la *permeabilità* (attitudine del suolo ad essere attraversato dall'acqua) e la *capacità di campo*, ovvero il volume complessivo di acqua che può essere trattenuto da un suolo liberamente drenato.

Un'altra importante proprietà fisica dei suoli è la *temperatura* che dipende sostanzialmente dal bilancio di radiazione solare alla superficie (influenzata dall'esposizione, dalla copertura vegetale e dalla presenza di lettiera), dalla conduttività (influenzata dalle componenti del suolo come quarzo, altri minerali, materia organica, acqua, aria) e dalla capacità termica (influenzata dal contenuto in acqua e dal colore del suolo). Temperature più elevate favoriscono le attività chimiche e biologiche che invece sono ridotte dal freddo e cessano quando l'acqua presente nel suolo è gelata (Accordi et al., 1993).

Tra le principali proprietà chimiche del suolo vi è il contenuto di macro e micronutrienti. I *nutrienti* rappresentano quella categoria di ioni o molecole la cui assunzione diretta o indiretta è indispensabile per gli organismi viventi. I *macronutrienti* sono le sostanze che si rinvencono con maggiore frequenza in tutte le principali molecole biologiche. Ossigeno, azoto, carbonio, idrogeno, sono gli elementi preponderanti, ma grande importanza hanno anche zolfo, fosforo, sodio, potassio, calcio, magnesio e cloro sotto forma di ione cloruro. I *micronutrienti* sono richiesti in quantità estremamente ridotte, e per lo più si rinvencono all'interno di molecole enzimatiche o in quelle aventi il ruolo di "scambiatori di elettroni", quali i citocromi, le clorofille, i carotenoidi, etc. I più importanti sono: ferro, manganese, zinco, rame, cobalto, nickel, selenio, molibdeno, cromo, iodio come ioduro e silicio. Per i nutrienti che vengono assorbiti dal suolo, è necessario considerare la loro "disponibilità": non è sufficiente, infatti, che siano presenti in un certo volume di suolo, ma occorre che si trovino in uno stato chimico-fisico che li renda fruibili agli organismi viventi. A tal proposito, tra le proprietà chimiche che caratterizzano un suolo, risulta di notevole importanza il *pH* perché esso influenza sia processi fisici, chimici che biologici. Dal pH dipendono la solubilità degli elementi nutritivi, l'attività dei microrganismi responsabili della decomposizione della sostanza organica e la maggior parte delle trasformazioni chimiche che avvengono nel suolo. La tessitura del suolo influenza il pH: i terreni sabbiosi, che lasciano percolare l'acqua più liberamente, sono teoricamente più acidi di quelli argillosi (Bullini et al., 1998). Ma ancora, la natura della roccia madre, la presenza di vegetazione sono altri fattori che possono definire i valori di pH del suolo. Un'altra importante caratteristica del suolo che determina un gran numero di proprietà, incluso il pH

ed il bilancio dei nutrienti nella soluzione del suolo, è *la capacità di scambio cationico* ovvero la capacità che il suolo ha di trattenere ioni positivi sulla superficie dei suoi componenti organici e minerali e di rilasciarli quando la quantità degli stessi ioni, nell'acqua che circola nel suolo, diminuisce oltre un certo livello. Il suolo ha inoltre un elevato *potere tampone*, è capace cioè di opporsi a variazioni di pH, in seguito all'immissione di piccole quantità di sostanze acide o alcaline.

1.1.2 Organismi del suolo

L'insieme degli organismi che vivono nel suolo prende il nome di pedofauna o fauna edafica. Il suolo comprende un numero grandissimo di organismi come vermi, nematodi, artropodi, batteri, funghi e protozoi, che rivestono un ruolo importante nel ciclo dei nutrienti (immobilizzazione e rilascio degli stessi nell'ambiente). Tali organismi sono stati classificati sulla base delle loro dimensioni in: microflora, microfauna, mesofauna, macrofauna e megafauna (fig. 1.2). Da un punto di vista funzionale, gli animali che vivono nel suolo si possono suddividere in predatori, che si nutrono di altri organismi viventi, decompositori, che convertono la sostanza organica morta in composti inorganici, e detritivori, che utilizzano quali fonti alimentari residui organici di origine animale o vegetale già parzialmente degradati e quindi a contenuto energetico più basso. Dunque, il suolo è il più complesso sistema biologico presente sul pianeta formato da una complicata architettura e da milioni di microrganismi estremamente differenti (Pepper et al., 2009), che contribuiscono con la propria attività metabolica alla formazione dello stesso.

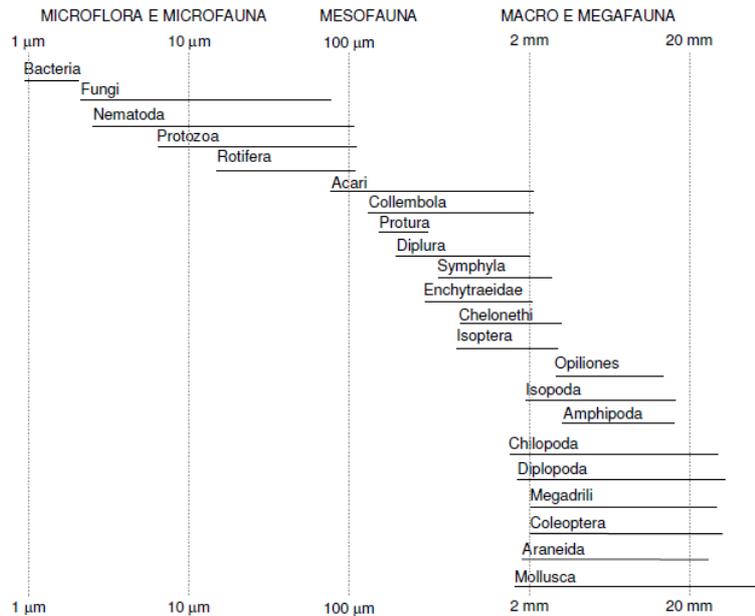


Figura 1.2. Classificazione degli organismi viventi nel suolo in base alle dimensioni (Da Swift et al., 1979 mod.).

1.2 Il suolo nell'ecosistema urbano

Nelle aree urbane il suolo è parte essenziale dell'ecosistema e contribuisce, direttamente o indirettamente, alla qualità della vita dei cittadini. L'esistenza di spazi verdi ed aree rurali nel tessuto urbano (anche se frutto casuale di uno sviluppo disordinato della città), svolge un ruolo molto importante di riequilibrio ambientale ed ecologico. Tali spazi, infatti, possono costituire elementi importanti per le reti ecologiche, per la conservazione della biodiversità e per la promozione dell'agricoltura e della forestazione urbana (Di Lorenzo e Di Gennaro, 2008). Parchi e giardini, inoltre, hanno un'importante funzione estetico-paesaggistica e possono costituire luogo di ricreazione e di educazione ambientale. In considerazione della centralità del sistema suolo nell'ambiente, la Commissione Europea (2006) ha individuato le minacce che ne possono pregiudicare la

conservazione: erosione, perdita di sostanza organica, inquinamento diffuso, impermeabilizzazione e compattazione.

1.2.1 Inquinamento del suolo

L'inquinamento può essere definito come "l'immissione o il prelievo nell'ambiente di materia e/o di energia tali da provocare un'alterazione persistente e talvolta irreversibile" (Della Croce et al., 1997). In base alle modalità di input di contaminanti al suolo, è possibile distinguere la contaminazione del suolo in inquinamento diretto e indiretto. L'inquinamento diretto nelle zone urbane e industriali si verifica in conseguenza dello smaltimento di reflui scarsamente depurati, o non depurati affatto, o a causa dell'accumulo di materiali di scarto contenenti prodotti chimici. L'inquinamento diretto del suolo può anche essere dovuto all'impiego di prodotti chimici (fertilizzanti inorganici e fitofarmaci), all'uso di reflui zootecnici, di fanghi di depurazione e di compost. L'inquinamento indiretto è provocato principalmente dai contaminanti derivanti dagli apporti atmosferici. La continua deposizione umida (sotto forma di precipitazioni) o secca (particelle, polveri) rappresenta un'importante via attraverso la quale gli inquinanti atmosferici raggiungono il sistema suolo e ne modificano le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche. L'inquinamento del suolo può causare una serie di alterazioni che possono ripercuotersi non solo sulla composizione chimica, ma anche sull'attitudine ad ospitare piante ed altri organismi (Keogh e Whitehead, 1975).

Gli inquinanti dei suoli, a causa della loro ampia diffusione e pericolosità, sono oggetto di studio nella valutazione del rischio ambientale. Il loro

comportamento è regolato da diverse variabili legate alle caratteristiche del suolo e a quelle dell'inquinante.

1.2.2 I metalli pesanti

Tra i principali contaminanti chimici del suolo vi sono i metalli pesanti. I metalli pesanti sono definiti chimicamente in base alla loro densità, superiore a 5 g cm³, ma ormai tale terminologia, è associata anche agli elementi che oltre a possedere le caratteristiche chimiche dei metalli hanno peso molecolare e atomico elevati. Sono presenti nel suolo, esclusi il ferro e l'alluminio, in concentrazioni molto basse, dell'ordine di parti per milione o per miliardo, e per tale motivo sono definiti anche come elementi in traccia. Tra i metalli pesanti si distinguono quelli indispensabili per gli organismi viventi, con potenziale tossicità (ferro, cobalto, cromo, rame, manganese, molibdeno, selenio, zinco) e quelli ritenuti prevalentemente tossici (alluminio, arsenico, berillio, cadmio, mercurio, nichel e piombo).

Gli effetti della contaminazione del suolo da metalli pesanti sulla salute umana e sulla vitalità degli ecosistemi sono stati, purtroppo, per lungo tempo trascurati. Per molti anni, infatti, si è ritenuto che il suolo possedesse la capacità di trattenerli in forme chimiche innocue per gli ecosistemi. Tale capacità del suolo è nota come capacità tampone ed è il risultato di delicati equilibri che s'instaurano tra gli inquinanti e le componenti del suolo: gas, soluzioni, minerali e sostanza organica (Sequi, 1989). Le ricerche condotte negli ultimi anni (Alloway, 1995; Stigliani e Jaffe, 1993) hanno evidenziato come la capacità tampone del suolo possa essere rapidamente ridotta a causa dei cambiamenti ambientali che, come le piogge acide, le pratiche agricole o il cambiamento d'uso dei terreni, determinano rapide

variazioni delle proprietà chimiche e fisiche del suolo. All'abbassamento della capacità tampone del suolo segue una brusca trasformazione degli inquinanti immagazzinati nel suolo dalle forme insolubili non tossiche alle forme solubili altamente tossiche. Quando, in seguito all'instaurarsi di questi fenomeni, la contaminazione da metalli pesanti nel suolo raggiunge livelli sufficientemente elevati, questi possono essere rilasciati con conseguenze di difficile reversibilità.

Uno dei principali effetti dell'inquinamento da metalli pesanti nei suoli è l'alterazione della comunità microbica in termini di composizione e di crescita (Bååth, 1989; Giller et al., 1997). L'esposizione cronica ad elevate concentrazioni di metalli pesanti, infatti, può indurre un cambiamento nella composizione della microflora edafica selezionando i microrganismi metallo-resistenti, con conseguente progressiva riduzione delle specie più sensibili (Mergeay, 2000). I metalli pesanti tendono a concentrarsi nei tessuti adiposi ed essendo escreti molto lentamente causano il fenomeno della "magnificazione biologica", ovvero la tendenza a concentrarsi negli organismi da un livello trofico all'altro lungo la catena alimentare.

1.3 Ecotossicologia

Ai fini dell'analisi e/o del monitoraggio nel tempo dello stato di qualità e/o del grado di inquinamento degli ecosistemi terrestri, è ormai ampiamente riconosciuto che la semplice valutazione del contenuto del contaminante in un suolo non consente di esprimere, da sola, valutazioni attendibili sugli effetti che il contaminante può esercitare sugli organismi che vivono nel suolo. L'effetto biologico del contaminante è legato alla frazione di esso che risulta biodisponibile nel recettore ecologico, la cui dimensione può dipendere oltre che da fattori

specie-specifici e dalla natura stessa del contaminante, anche dall'influenza che su quest'ultimo hanno le specifiche condizioni della matrice e dell'ambiente. Pertanto, questa consapevolezza ha portato alla necessità di integrare il dato chimico con quello derivabile da indagini biologiche ed ecotossicologiche.

L'ecotossicologia studia gli effetti tossici degli agenti chimici e fisici su popolazioni o comunità all'interno di un ecosistema definito, individuando i diversi tipi di trasporto di questi agenti e la loro interazione con l'ambiente (Butler, 1978). Pertanto, l'ecotossicologia studia il meccanismo d'azione degli inquinanti, valuta il danno biologico su una o più specie, ma in aggiunta valuta la tossicità a livello ecosistemico, integrando gli effetti dei fattori di stress attraverso tutti i livelli di organizzazione biologica da quello molecolare ad intere comunità ed ecosistemi (Maltby e Naylor, 1990). Inoltre, l'indagine ecotossicologica tiene conto anche delle interazioni fra composti, che possono dare origine a fenomeni di sinergia (amplificazione non aritmetica dell'effetto dovuta alla combinazione di più stressori) oppure di antagonismo (diminuzione non aritmetica dello stesso), e, infine, tiene conto anche di tutte le sostanze che non sono caratterizzate come tossiche per definizione, ma possono produrre squilibri trofici (come i nutrienti e la materia organica) e quindi alterare la composizione degli ecosistemi in modo più o meno permanente (APAT, 2006).

Le analisi ecotossicologiche sono effettuate attraverso l'impiego di saggi ecotossicologici. Un saggio ecotossicologico è una prova, spesso di laboratorio, che utilizza un sistema biologico su cui si valutano gli effetti tossici indotti dall'esposizione, per un determinato tempo, alla sostanza tossica o alla matrice ambientale in esame, intendendo per effetti tossici l'alterazione o la compromissione di una o più funzioni come sopravvivenza, crescita, riproduzione,

motilità, fotosintesi, comportamento (Maffiotti et al., 1997). Perché l'effetto si manifesti è necessario che la sostanza non solo entri nell'organismo, ma, superata la capacità omeostatica di questo, venga a contatto con le strutture cellulari (eventualmente con uno specifico sito bersaglio) in quantità e per un tempo sufficienti tali da indurre il danno biologico. Un test di tossicità si fonda sul principio secondo il quale, esponendo un organismo vivente ad un agente tossico, la risposta risulta essere funzione diretta della dose assunta e indiretta del livello di esposizione.

La tossicità di un agente (o miscela) è generalmente evidente, in un primo momento, a livello biochimico e molecolare (cambiamento nelle attività enzimatiche, alterazioni del DNA, etc.) e solo successivamente a livello degli organuli cellulari, del tessuto, e infine dalla popolazione (fig. 1.3).

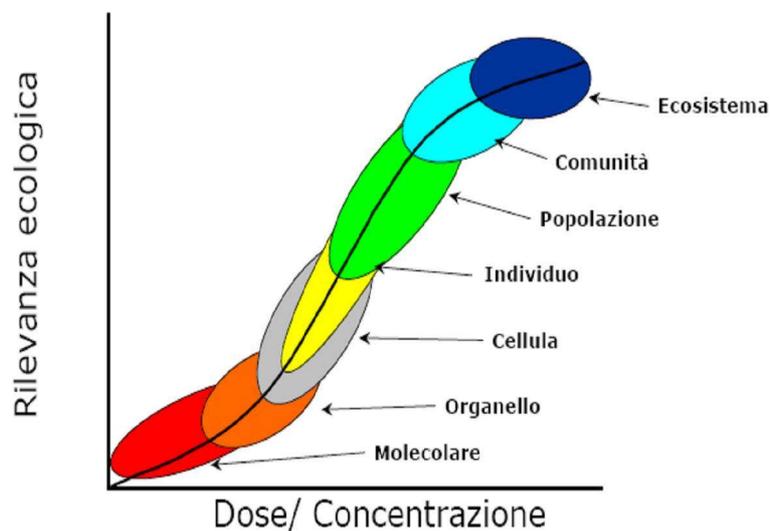


Figura 1.3. Livelli di azione dei contaminanti sulle varie componenti biologiche.

Il tipo di effetto che viene misurato nel saggio tossicologico è in genere indicato come "endpoint". L'endpoint può avere una valenza riproduttiva (es:

mortalità, immobilizzazione dell'individuo test; germinazione dei semi), di crescita (es: allungamento dell'organismo, allungamento della radice o del germoglio o produzione di biomassa) o essere riferito a parametri metabolici o fisiologici dell'organismo ("biomarker") a seconda della tipologia di saggio utilizzato.

I saggi ecotossicologici possono essere classificati in base al periodo di esposizione e alla durata del ciclo vitale dell'organismo (Wright e Welbourn, 2002):

- Test acuti. Di breve durata, rilevano effetti avversi che si manifestano in un breve arco temporale successivo alla somministrazione di una dose singola di sostanza.
- Test sub-cronici. Evidenziano effetti dovuti all'esposizione ad una sostanza per un periodo inferiore o uguale ad un decimo della vita dell'organismo.
- Test cronici. Stimano gli effetti che si manifestano in seguito ad esposizioni per un tempo superiore, che spesso coincide con più della metà della durata della vita dell'organismo test.

Nel caso dei danni al genoma, gli effetti vengono considerati di solito cronici in quanto l'effetto di un mutageno sul DNA, pur verificandosi anche dopo un tempo assai breve, si può ripercuotere sulle generazioni future, (mutazioni germinali) e/o sulla fisiologia dell'organismo test (mutazioni somatiche).

La determinazione della tossicità dei suoli può essere effettuata mediante saggi o test condotti sia sulla matrice solida che sull'elutriato. Le prove di tossicità condotte direttamente sulla matrice solida consentono di valutare, a differenza dei saggi condotti sull'elutriato, le interazioni tra il suolo ed il contaminante, interazioni che esercitano effetti non trascurabili sulla biodisponibilità delle

sostanze tossiche. Inoltre, i test condotti sulla matrice solida risultano più realistici poichè utilizzano la matrice *in toto* (APAT, 2004).

Batterie di test sul suolo tal quale utilizzano piante (Chung et al., 2007; Hamdi et al., 2007; Hubálek et al., 2007; Leitgib et al., 2007) o invertebrati terrestri come nematodi, lombrichi, collemboli (Crouau e Pinelli, 2008; Nahmani et al., 2007; Roh et al., 2009). Quando crescono su un suolo contaminato, le piante possono accumulare sostanze tossiche (es. metalli pesanti) nei loro tessuti diventando una potenziale minaccia per la salute degli animali e dell'uomo, essendo alla base della catena trofica. Le piante hanno anche la proprietà, attraverso la produzione di essudati dalle radici, di acidificare il suolo e quindi di poter legare i metalli presenti modificandone la mobilità. Studiare gli effetti tossici dei contaminanti del suolo sulle piante è molto importante proprio per il ruolo ecologico che esse ricoprono. Gli endpoint normalmente osservati per questi test sono la germinazione e l'allungamento radicale, ma è possibile effettuare anche studi sulla produzione di biomassa e sul bioaccumulo di metalli pesanti (An, 2004). Molti invertebrati, che vivono permanentemente o temporaneamente nel o sul suolo, svolgono ruoli fondamentali nella decomposizione della sostanza organica, nella fissazione dell'azoto, nel sequestro e nel riciclo di carbonio e dei nutrienti, nel controllo del numero e della qualità delle reti trofiche dell'ecosistema, e nelle modificazioni delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo. Pertanto, le specie della fauna terrestre adoperate in test di ecotossicità sono selezionate in funzione della sensibilità ai contaminanti, della allevabilità in laboratorio, dell'elevato tasso di riproduzione e dalla velocità di risposta all'esposizione (Van Gestel et al., 1997). Gli endpoint utilizzati in questi saggi sono: sopravvivenza, riproduzione, crescita corporea e bioaccumulo.

1.4 Genotossicologia

Molti composti rilasciati nell'ambiente sono potenzialmente genotossici, sono in grado, cioè, di interagire con il materiale genetico direttamente o a seguito di attivazione metabolica, modificandolo. Il metabolismo cellulare delle sostanze genotossiche è un fenomeno relativamente complesso e la mancanza di una detossificazione completa può portare alla formazione di metaboliti elettrofili altamente reattivi, che possono attaccare i centri nucleofili di macromolecole come DNA, lipidi e proteine. L'interazione tra sostanze genotossiche e DNA si manifesta primariamente attraverso alterazioni strutturali del DNA che possono manifestarsi come addotti, alterazione chimica delle basi azotate, legami crociati e rotture a livello di singolo e doppio filamento. Tali alterazioni, di solito, sono prontamente corrette da meccanismi cellulari di riparazione, senza conseguenze dannose per l'organismo. Le lesioni che non sono riparate o sono processate in modo improprio, possono portare alla fissazione di anomalie del materiale genetico come aberrazioni cromosomiche, mutazioni geniche ed altri effetti a lungo termine come il cancro nei vertebrati, uomo compreso. Inoltre, le sostanze genotossiche possono agire sulle cellule della linea germinale causando danni ereditabili. Kurelec (1993) ha introdotto il termine di "genotoxic disease syndrome" per definire l'insieme di alterazioni indotte in invertebrati e vertebrati dall'esposizione a composti genotossici. Tra gli effetti considerati vi sono: squilibri delle funzioni enzimatiche e nel metabolismo generale, alterato turnover delle proteine, produzione di promotori di danno citotossico, inibizione della crescita, processi degenerativi ed atrofie in tessuti ed organi, invecchiamento precoce, riduzione della fitness, aumentata frequenza di malattie, riduzione delle

capacità riproduttive e di adattamento, e riduzione della sopravvivenza di una popolazione fino alle estreme conseguenze (estinzione).

L'esposizione a genotossine può provocare una cascata di eventi in grado di cambiare l'integrità del DNA e risultare in vari tipi di danno. L'identificazione e la quantificazione dei vari eventi, nella sequenza dall'esposizione alla fissazione del danno genetico, possono essere utilizzate come biomarker in organismi esposti ad ambienti contaminati.

1.4.1 Biomarker di genotossicità

Numerose tecniche e metodologie sono disponibili per rilevare le varie risposte genotossiche che possono essere indotte in organismi esposti a contaminanti (Shugart, 1995). Sono definiti biomarker di tipo irreversibile quelli che valutano le anomalie del materiale genetico, che si presentano in seguito a lesioni che non sono rimosse dal sistema di riparazione del DNA, come aberrazioni cromosomiche, scambio di cromatidi fratelli, mutazioni geniche ed effetti cellulari (es. comparsa di tumori, differenziazione cellulare). Sono definiti strutturali, invece, quei biomarker che valutano le alterazioni della struttura del DNA e che possono presentarsi sotto forma di addotti (l'agente chimico o il suo metabolita si attaccano covalentemente al DNA), di rotture a livello di singolo e doppio filamento, di alterazione chimica delle basi azotate.

Negli ultimi 20 anni, sono stati sviluppati e definiti più di 200 test per la valutazione degli effetti genotossici (Hoffman, 1996) che prevedono l'utilizzo di un'ampia varietà di organismi (batteri, lieviti, piante superiori, invertebrati, insetti, pesci, uccelli). Molti di questi test possono essere applicati sia *in vivo* che *in vitro*, sia nelle cellule somatiche che in quelle germinali.

La maggior parte della letteratura scientifica riferita allo studio della mutagenicità in suoli contaminati valuta l'induzione di mutazioni geniche (White e Claxton, 2004). Il test più utilizzato a questo scopo è il test di Ames che prevede l'utilizzo del batterio *Salmonella typhimurium* (Ames et al., 1975; Mortelmans e Zeiger, 2000) e che si basa sulla valutazione delle retromutazioni delle colonie batteriche dovute all'esposizione a sostanze tossiche. Questo test è di rapida esecuzione e poco dispendioso, tuttavia utilizzando un organismo procariote, la cui struttura cromosomica è notevolmente diversa da quella più complessa delle cellule animali, potrebbe non riconoscere, come mutagene, sostanze che portano a mutazioni dovute alle interazioni tra DNA e proteine. L'indagine delle mutazioni geniche è inoltre effettuata spesso mediante l'utilizzo di piante come *Tradescantia* (Ma et al., 1994a) e *Zea Mais* (Plewa, 1985) per le quali si valutano rispettivamente mutazioni nei peli staminali e mutazioni in uno specifico *locus* genico (*waxy*).

Inoltre, la stima della genotossicità dei suoli è effettuata mediante la valutazione di una varietà di endpoint di clastogenicità come le aberrazioni cromosomiche, l'induzione di micronuclei e l'induzione di scambi tra cromatidi fratelli. Solamente i primi due endpoint sono però riconosciuti come biomarker di effetti dannosi per la salute degli organismi come ad esempio il cancro (Majer et al., 2001; Norppa, 2004), mentre il terzo è un utile marker di effetti citogenetici *in vivo* e *in vitro* (Bilban, 2004; Galloway et al., 1987) ma la sua utilità come biomarker di effetti dannosi per la salute è ancora ampiamente discusso (Bonassi et al., 2004; Hagmar et al., 2004).

Per la valutazione degli endpoint di mutagenicità e clastogenicità si ricorre spesso all'utilizzo di piante non solo in considerazione del loro ruolo negli

ecosistemi, ma anche perché risultano facili da maneggiare, sono sensibili e possiedono cromosomi grandi e facili da analizzare. Alcuni test che vedono l'impiego di piante sono stati validati e standardizzati; tra questi il test dei micronuclei, delle aberrazioni cromosomiche e dello scambio dei cromatidi fratelli con *Vicia faba* (Kanaya et al., 1994; Ma, 1982), il test delle aberrazioni cromosomiche negli apici radicali di *Allium cepa* (Grant, 1982), ed i test dei micronuclei e delle mutazioni dei peli staminali con *Tradescantia* (Ma et al., 1994a,b). I test sopra menzionati sono stati condotti dopo esposizione diretta al suolo tal quale, al suolo in fase slurry, e agli estratti acquosi/lisciviati o organici. White e Claxton (2004), in una review di 118 pubblicazioni scientifiche, concludono che l'esposizione diretta al suolo tal quale fornisce un'analisi della genotossicità più efficace di quella ottenuta dall'esposizione agli estratti acquosi. Purtroppo, vista la scarsa disponibilità di dati riguardanti l'esposizione agli estratti organici, White e Claxton (2004) non riescono a definirne l'efficacia. Comunque, alcuni autori (Cabrera et al., 1999; Gichner e Velemínsky, 1999) suggeriscono che l'esposizione agli estratti organici potrebbe essere utile per la valutazione di genotossicità di suoli contaminati con sottoprodotti della combustione (es. IPA) o altri composti organici.

Altri endpoint indagati per la valutazione della mutagenicità associata a suoli contaminati sono quelli che misurano l'induzione del danno al DNA (risposta SOS, addotti al DNA, rotture a livello di singolo e doppio filamento) utilizzando test come l'SOS Chromotest (Quillardet e Hofnung, 1993), il *Salmonella* umu-test (Oda et al., 1985), il test della post-marcatura con il ³²P (Randerath et al., 1981), e il test della cometa (Singh et al., 1988). L'SOS Chromotest utilizza il ceppo PQ37 di *Escherichia coli* nel quale la produzione di β-galattosidasi è sotto il controllo

del meccanismo di riparo SOS del danno al DNA che viene quindi misurato colorimetricamente (Quillardet e Hofnung, 1985). Il *Salmonella* umu-test si basa sullo stesso principio dell'SOS Chromotest ma prevede l'utilizzo del plasmide pSK1002 che viene introdotto in un ceppo di *S. typhimurium*. Entrambi i test sono stati utilizzati con successo nella valutazione del potenziale genotossico degli estratti di suolo in quanto mostrano risposte a mutageni che inducono delezioni o inserzioni, ad agenti intercalanti e agli inibitori della sintesi del DNA (Rossman et al., 1984; Quillardet e Hofnung, 1993). Il test della post-marcatura con il ^{32}P è un metodo radiochimico utile per valutare la presenza di una grande varietà di addotti partendo da esigue quantità di DNA ma, per la sua complessità, è scarsamente utilizzato nello studio della mutagenicità associata a suoli. Il test della cometa è stato descritto come un metodo molto sensibile (individua un taglio ogni 1×10^{10}) (Gedik et al., 1992), può essere effettuato con un numero estremamente esiguo di cellule nucleate di ogni tipo, animali e vegetali (Koppen e Verschave, 1996) e in tempi relativamente brevi. Tale test è ampiamente utilizzato per valutare la presenza di rotture nella doppia elica (Cotelle e Férard, 1999; Dhawan et al., 2009), danno correlato alle proprietà mutagene e cancerogene di numerose sostanze.

I biomarker di genotossicità sono stati spesso utilizzati singolarmente a corredo delle analisi ecotossicologiche (Casabé et al., 2007; Griest et al., 1993; Haeseler et al., 1999). Tale tipo di approccio risulta però molto riduttivo. E' noto, infatti, che esistono numerosi agenti genotossici e che i loro meccanismi di azione sono multipli (es. formazione di legami crociati, aneuploidia). Inoltre, i mutageni chimici generalmente non colpiscono i diversi endpoint genetici con lo stesso grado di efficienza (Crebelli et al., 2005).

Pertanto, al fine di ottenere una diagnosi più attendibile della qualità di un suolo, è necessario ricorrere all'utilizzo di batterie di test di genotossicità (Hartmann et al., 2001; Van Goethem et al., 1997). Inoltre, poiché nessun organismo è in grado di coprire l'intera varietà di risposte agli stressori e di rispondere a vari intervalli di concentrazione di xenobiotici, è consigliabile impiegare più di un organismo i cui ambiti di sensibilità non si sovrappongano ma siano complementari (Lah et al., 2008; Xiao et al., 2006). Gli organismi test componenti la batteria di genotossicità sono solitamente scelti in base alla loro rappresentatività ed in base alle loro relazioni con la catena trofica. La scelta delle specie è particolarmente importante e può essere effettuata sulla base di differenti criteri, in relazione allo scopo della ricerca. Si può scegliere ad esempio di utilizzare specie indigene dell'ambiente da studiare, in funzione della rilevanza ecologica (specie chiave nella catena alimentare), dell'importanza economica o della facilità di reperimento e semplicità di gestione (disponibile e/o allevabile). Spesso però si utilizzano specie in funzione della peculiare sensibilità ai composti in esame, o della standardizzazione dei metodi.

La scelta degli endpoint da indagare invece dipende principalmente da quali informazioni pregresse si possiedono sulla contaminazione dell'area di studio, dai tipi di contaminanti che si presume siano presenti e dalla conoscenza dei loro meccanismi d'azione.

Un esempio di batteria di biomarker di genotossicità è quella applicata da Lah et al. (2008) per valutare la genotossicità dei suoli della valle Šaleška, contaminata principalmente da metalli pesanti e da composti dell'azoto e dello zolfo. Gli autori indagano differenti endpoint genetici: mutazioni puntiformi dovute a sostituzioni di coppie di basi o a delezioni/inserzioni di basi valutate mediante il test di Ames,

rotture del DNA/danni al DNA primario mediante il test della cometa, e i danni citogenetici dovuti all'alterazione dell'integrità cromosomica con il test dei micronuclei. Gli stessi autori riportano che il test della cometa e quello dei micronuclei si mostrano sensibili nella stima della genotossicità dei campioni di suolo in esame, mentre il test di Ames si dimostra poco sensibile, concludendo quindi che un approccio che prevede l'utilizzo di più biomarker di genotossicità, migliora la valutazione degli effetti ecotossicologici dei campioni ambientali, a causa delle differenti classi di composti xenobiotici presenti nell'ambiente.

1.5 Citotossicità

Tra i principali contaminanti che possono esercitare effetti a livello cellulare e/o subcellulare vi sono senz'altro i metalli. Gli effetti tossici dei metalli insorgono a causa delle interazioni che essi stabiliscono con componenti cellulari essenziali tramite legami ionici e/o covalenti, risultanti in una alterazione delle attività metaboliche cellulari (Bruins et al., 2000). La cellula necessita quindi di sistemi per contrastare la tossicità delle specie metalliche non essenziali, ma anche per arginare un aumento della concentrazione di quelle essenziali al di sopra dei livelli fisiologici, i cui conseguenti effetti tossici sulla cellula possono essere di pari entità rispetto a quelli provocati dai metalli considerati non essenziali. Oltre a danneggiare la struttura del DNA con effetti genotossici per la cellula, i metalli possono, ad esempio, danneggiare la membrana cellulare, alterare la specificità enzimatica, disorganizzare le funzioni cellulari.

A livello molecolare, l'esposizione a metalli può determinare un aumento dell'espressione di metallotioneine, proteine a basso peso molecolare rilevabili in citoplasma, nucleo e lisosomi. Queste proteine, grazie ad un elevato contenuto di

residui tiolici dovuto all'abbondanza di cisteine, hanno un'elevata affinità per i cationi metallici divalenti e sono quindi in grado di regolare l'omeostasi di ioni metallici essenziali come Cu e Zn ed il sequestro di metalli tossici come Cd e Hg e di specie reattive dell'ossigeno. In questo modo, le metallotioneine prevengono eventuali effetti citotossici dovuti ad un'eccessiva concentrazione intracellulare di metalli (Cajaraville et al., 2000; Sanchez-Hernandez, 2006).

A livello sub-cellulare, i lisosomi sono il principale sito di digestione intracellulare e contribuiscono alla detossificazione cellulare sequestrando gli xenobiotici. Accumulandosi nei lisosomi, i contaminanti, tra cui i metalli, possono alterarne struttura e funzione, causando così ulteriori danni cellulari (Domouhtsidou e Dimitriadis, 2000; Svendsen et al., 2004). Le reazioni patologiche dei lisosomi consistono in cambiamenti destabilizzanti della membrana, induzione di autofagia e relative variazioni morfo-funzionali, processi ampiamente studiati come biomarker di esposizione (ed effetto) a contaminanti ambientali biodisponibili (Calisi et al., 2009; Scott-Fordsmand et al., 1998). In particolare la valutazione della stabilità della membrana lisosomiale dei lombrichi risulta un biomarker molto funzionale in quanto mostra: un'elevata relazione dose/risposta, alta sensibilità rispetto ad altri endpoint (es. crescita, riproduzione), specificità chimica, nessuna differenza interspecifica e semplicità di esecuzione (Svendsen et al., 2004).

1.6 Valutazione della tossicità ed integrazione dei risultati

E' solo di questi ultimi anni la generale consapevolezza che il suolo rappresenta una risorsa limitata e vulnerabile e tale, quindi, da richiedere la promulgazione di normative efficaci allo scopo di proteggerlo dalle differenti forme di degrado (Nortcliff, 2002). In Italia manca ancora un quadro normativo organico che colleghi la conoscenza della complessità formativa del suolo alle cause naturali o antropiche che ne possono alterare gli equilibri chimico-fisici. La valutazione della tossicità di un suolo è uno degli argomenti di discussione ed approfondimento più attuali non solo del mondo scientifico ma anche di quello politico amministrativo. Dal Decreto Legislativo 152 del 3 aprile 2006, predisposto dal Ministro dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e recante "Norme in materia ambientale", nell'Allegato 5 alla parte Terza "Norme in materia di difesa del suolo e lotta alla desertificazione, di tutela delle acque dall'inquinamento e di gestione delle risorse idriche", si evince che per la valutazione dello stato ecologico sono obbligatori solamente i test ecotossicologici di tossicità acuta e che, in caso di esecuzione di più test di tossicità, si debba considerare il caso peggiore. Nessun cenno viene fatto alla valutazione del potenziale mutageno associato alla matrice suolo. Inoltre, il riscontro di tossicità non è sanzionabile, ma comporta l'obbligo di approfondimento dell'indagine, di ricerca delle cause e della loro rimozione. La scelta del caso peggiore per la definizione del grado di tossicità è, in ogni caso, un approccio estremamente conservativo in quanto non prevede l'utilizzo di un giudizio esperto basato sul "weight of evidence" cioè su dati pesati in base alle evidenze sperimentali.

Definire quanto è tossico un campione di suolo risulta il cardine principale su cui stabilire criteri qualitativi ed applicare programmi di bonifica e sanzioni amministrative. Se da un lato sono stati fatti numerosi sforzi per supportare la necessità di un approccio multi-marker (Viarengo et al., 2007), molto poco esiste sulla interpretazione dei risultati di batterie di test e sulla elaborazione di scale di lettura. Esiste pertanto l'esigenza di un indice sintetico che integri e rappresenti i risultati ottenuti dalla batteria di test in modo da renderli confrontabili nello spazio e nel tempo e fruibili per studi più ampi come la valutazione del rischio. Al fine di facilitare l'applicazione dei test di tossicità deve però essere superata la problematica relativa alla difficile interpretazione dei risultati. L'utilizzo di batterie di test di ecotossicità o di genotossicità, se da un lato migliora la valutazione della qualità di un suolo fornendo una visuale più completa delle possibili azioni tossiche che la matrice indagata può indurre, dall'altro complica l'azione dell'operatore che deve interpretare i risultati dei differenti test al fine di trarne un giudizio complessivo.

Gli studi di sviluppo ed applicazione di indici e scale per la definizione della tossicità dei suoli, dalla consultazione della letteratura sull'argomento, risultano molto scarsi (Dagnino et al., 2008; Manzo et al., 2008), mentre differenti approcci sono stati sviluppati per i sedimenti (Bombardier e Bermingham, 1999; Phillips et al., 2001; Stronkhorst et al., 2003) e gli effluenti (Costan et al., 1993; Vindimian et al., 1999). Di particolare interesse il lavoro di Manzo et al. (2008) che, partendo da un indice sperimentale per i sistemi acquatici, hanno messo a punto un indice che integra i risultati di una batteria di test ecotossicologici applicati al suolo. Brevemente, per definire la tossicità di un campione utilizzano un modello che

tiene conto della severità dell'effetto, del grado della risposta, della variabilità del test, della consistenza tra i test e del numero di endpoint misurati. In particolare:

$$\text{Punteggio del campione} = \left(\sum [(severità)(CCS)(comparto)(\% \text{ risposta})] + \{consistenza\} \right) / \sqrt{N}$$

La *severità* è quella della risposta e dipende dall'effetto misurato dall'endpoint.

La *% della risposta* indica il grado della risposta ed è espressa in percentuale del valore medio del controllo. La *% della risposta* viene poi corretta sulla base del confronto statistico campione/controllo mediante il test *t* di Student per varianze disuguali (che tiene conto cioè anche della variabilità per quello specifico campione e del controllo in quel momento), usando un coefficiente correttivo statistico CCS. Si utilizza, inoltre, anche un fattore di correzione per i comparti, moltiplicando la severità per i valori attribuiti al comparto (i valori dipendono della rilevanza ecologica e della manipolazione dei campioni).

CV è il coefficiente di variazione tra le repliche del campione ed esprime la variabilità specifica del test per quel campione, ma comprende anche la variabilità sperimentale del momento.

La *consistenza* esprime il grado di accordo tra i vari endpoint: è alta se tutti i test concordano, ed è quindi alta anche la fiducia di poter identificare una situazione di rischio; la consistenza però diminuisce se i risultati sono contraddittori o conflittuali, e quindi diminuisce anche la fiducia di identificare correttamente il grado di rischio.

N è il numero totale di endpoint.

Complessivamente il calcolo diventa:

$$\text{Punteggio del campione} = \left(\sum [(severità)(CCS)(comparto)(\% \text{ risposta})] + \{consistenza\} \right) / \sqrt{N}$$

E per la tossicità:

$$\text{Punteggio tossicità} = \left(\sum [(severità)(CCS)(comparto)(\% \text{ risposta})] \right) / \sqrt{N}$$

Il confronto di questi due punteggi permette così di interpretare la tossicità in termini di rischio: se il campione presenta un effetto tossico e i diversi endpoint sono tra loro consistenti, il rischio è maggiore rispetto al caso con uguale punteggio, ma con endpoint tra loro discordanti. Il punteggio del campione può essere letto in una scala 0-100 relativa alla batteria utilizzata adoperando per ciascun endpoint la percentuale, relativa all'endpoint che dà la risposta massima (%) per la combinazione massima (severità*comparto*CCS) della batteria considerata. Il valore massimo corrisponde alla tossicità altamente significativa (CCS) per un test di rilevanza massima su comparto di massimo punteggio che ha dato una risposta del 100% o relativamente la più elevata.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Obiettivo principale di questo lavoro di ricerca è stato valutare la genotossicità di suoli a diverso grado di contaminazione. A tale scopo è stata selezionata e messa a punto una batteria di test composta dal test dei micronuclei mediante *Vicia faba* e dal test della cometa mediante *V. faba* ed *Eisenia veneta*. Tale batteria è stata applicata a suoli campionati nell'area urbana di Napoli, sottoposti a diverso impatto antropico. Inoltre è stata evidenziata la relazione degli effetti genotossici osservati sia con il contenuto di alcuni metalli pesanti sia con le principali caratteristiche chimico-fisiche di tali suoli.

Al fine di poter confrontare in maniera spazio-temporale e di attribuire un giudizio di rischio genotossico ai suoli campionati è stato inoltre sviluppato un indice di genotossicità, che integra i risultati ottenuti dalla batteria di test.

Per valutare il contributo di piombo e rame (scelti come principali metalli responsabili della contaminazione dei suoli) alla genotossicità riscontrata nei suoli urbani indagati, la batteria di test è stata applicata anche ad un suolo standard cui sono stati aggiunti, separatamente, Pb e Cu in concentrazioni pari a quelle più alte misurate nei suoli campionati.

I metalli pesanti possono provocare oltre al danno genotossico anche altri effetti a livello sub-cellulare. A tale scopo è stato condotto uno studio preliminare sui lombrichi della specie *Eisenia fetida* volto a testare la capacità del saggio “stabilità della membrana lisosomiale” di risposta alla contaminazione da rame. In particolare, la stabilità della membrana lisosomiale è stata monitorata sia durante un periodo di esposizione al rame, sia durante un periodo di purificazione, al fine di evidenziare, rispettivamente, l'eventuale danno e la potenziale capacità di ripristino della membrana lisosomiale.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campionamento del suolo

I campionamenti di suolo sono stati effettuati ad aprile 2009 ed a febbraio 2010 in tre siti a diverso impatto antropico nell'area urbana di Napoli e in un sito lontano da centri urbani (fig. 3.1).



Figura 3.1. Siti di campionamento.

In particolare, i prelievi sono stati eseguiti in un'area confinante con una strada ad elevato traffico veicolare (Area urbana), in un'area confinante con una strada caratterizzata da traffico a scorrimento veloce (Area extraurbana), in un bosco urbano limitrofo ad una strada molto trafficata (Parco urbano), e in un bosco situato in un'area remota protetta dal WWF non interessato da impatto antropico

(Area remota). In ciascun sito, dopo la rimozione della lettiera, sono stati prelevati circa 10-15 campioni di suolo (0-10 cm) sotto la chioma di lecci (*Quercus ilex* L.) per minimizzare l'influenza della copertura vegetale sulle proprietà chimico-fisiche e biologiche del suolo. I campioni di suolo prelevati in ciascun sito sono stati in seguito mescolati per ottenere un campione omogeneo e rappresentativo. In laboratorio, i campioni di suolo sono stati setacciati (2 mm) per le successive analisi chimiche, fisiche e genotossicologiche, e conservati al buio a 4 °C; per l'analisi granulometrica sono stati utilizzati i suoli non setacciati.

3.2 Caratterizzazione chimico-fisica dei suoli

I suoli sono stati caratterizzati per tessitura, contenuto di sostanza organica, tenore idrico, capacità idrica massimale e pH. Inoltre, per questi stessi suoli sono state determinate le concentrazioni totali e delle frazioni disponibili di Pb, Cu, Cd, Cr e Ni che sono state riportate in questa tesi (Carotenuto R. e Santorufo L., comunicazione personale).

3.2.1 Tessitura

La tessitura è stata determinata dal gruppo di ricerca del laboratorio di geologia della sezione ACS PROT-CHIM del centro di ricerche Enea Casaccia di Roma, attraverso setacciatura e analisi mediante sedigrafo. I risultati sono stati espressi come percentuali di sabbia, limo e argilla e le classi tessiturali fanno riferimento alla classificazione USDA (United States Department of Agriculture).

3.2.2 *Contenuto di sostanza organica*

La sostanza organica dei suoli è stata determinata mediante incenerimento del campione. E' stato pesato 1 g di suolo secco (105 °C) in capsule di porcellana tarate che sono state successivamente poste in muffola a 550 °C per 2 ore. Il contenuto di sostanza organica è stato espresso come percentuale di peso secco di suolo ed è stato calcolato con la seguente formula:

$$SO (\%) = \frac{\text{peso netto secco} - \text{peso netto calcinato}}{\text{peso netto secco}} \cdot 100$$

Sono state effettuate tre repliche per ogni campione.

3.2.3 *Tenore idrico*

Il tenore idrico dei suoli è stato valutato mediante il metodo gravimetrico. Il tenore idrico è stato determinato dopo essiccamento in stufa (105 °C), fino a raggiungimento di peso costante, di 5 g di campione di suolo fresco. Il tenore idrico dei suoli è stato espresso come percentuale del peso secco del campione ed è stato calcolato con la seguente formula:

$$TI (\%) = \frac{\text{peso netto fresco} - \text{peso netto secco}}{\text{peso netto secco}} \cdot 100$$

Sono state effettuate tre repliche per ogni campione.

3.2.4 *Capacità idrica massimale (CIM)*

La capacità idrica massimale, o capacità di campo, è stata determinata mediante il metodo gravimetrico. Sono stati utilizzati per le misure, cilindri di plastica, a peso noto, aperti sulla sommità e con fondo forato ricoperto

internamente da carta assorbente. I cilindri, nei quali sono stati pesati i campioni di suolo, sono stati immersi parzialmente in acqua deionizzata, fino ad ottenere la completa imbibizione del campione. E' stato determinato il peso a saturazione e, successivamente, i campioni sono stati essiccati in stufa (105 °C) fino a raggiungimento di peso costante. Il valore della capacità idrica massimale è stato calcolato con la seguente formula:

$$CIM (\%) = \frac{\text{peso netto a saturazione} - \text{peso netto secco}}{\text{peso netto secco}} \cdot 100$$

Sono state effettuate tre repliche per ogni campione.

3.2.5 pH

Il pH dei suoli è stato determinato mediante il metodo potenziometrico. A 10 g di suolo fresco, pesato in beuta, sono stati aggiunti 25 ml di acqua deionizzata. Le beute sono state tenute in agitazione su un piano oscillante per 20 minuti e poi lasciate a decantare per 10 minuti. E' stato poi misurato il pH del surnatante attraverso l'utilizzo di un pHmetro. Sono state effettuate tre repliche per ogni campione.

3.3 Scelta e messa a punto dei test di genotossicità

Le analisi genotossicologiche sono state precedute da una fase di selezione della batteria da applicare ai suoli. La scelta si è basata su diversi fattori: la necessità di valutare gli effetti su organismi di diverso livello di organizzazione biologica; la necessità di considerare differenti endpoint in più di una specie; la disponibilità di organismi standardizzati da poter facilmente coltivare/allevare in laboratorio; l'utilizzo diffuso nella comunità scientifica degli organismi della batteria nello studio della genotossicità dei suoli. Pertanto, la batteria di test di genotossicità selezionata è composta dal test dei micronuclei con la pianta superiore *Vicia faba* e dal test della cometa mediante *V. faba* ed il lombrico *Eisenia veneta* (fig. 3.2).



Figura 3.2. Organismi utilizzati per i test: la pianta *V. faba* ed il lombrico *E. veneta*.

3.3.1 Test dei micronuclei

Per il test dei micronuclei è stato utilizzato come riferimento il protocollo di Kanaya et al. (1994) al quale sono state apportate modifiche finalizzate alla semplificazione della procedura descritta. Un'aliquota di 20 g di suolo è stata posta in piastra Petri e portata a saturazione con acqua deionizzata. In ogni piastra sono stati seminati 5 semi di *V. faba* e, successivamente, le piastre sono state poste in una camera umida ed incubate a 20 ± 1 °C per 96 ore al buio. Dopo tale periodo, sono stati prelevati gli apici della radice primaria e fissati in una miscela di metanolo (99.8%) ed acido acetico (99.8%) in rapporto di 3:1=v:v a 4 °C. Il giorno successivo gli apici radicali sono stati idrolizzati con acido cloridrico (37%) 1N per 8 minuti a 60 °C. Dopo un risciacquo con acqua deionizzata, alle radici è stato aggiunto, per circa 30 minuti, il reattivo di Schiff, un colorante costituito da fucsina basica solforata. In seguito, gli apici sono stati decolorati (posti in acqua deionizzata) per circa 7 minuti, trattati con acido acetico (45%) per 10 minuti ed, infine, la parte dell'apice contenente il meristema è stata recisa con una lama sterile. I vetrini sono stati preparati per schiacciamento. Prima del montaggio si è proceduto alla disidratazione dei vetrini, mediante passaggi successivi in una serie ascendente di alcoli (un passaggio in etanolo al 95% e due in etanolo assoluto), e alla chiarificazione del preparato, attraverso due passaggi in xilene; infine, il montaggio è stato effettuato in Histovitrex (montante resinoso sintetico) con vetrini coprioggetto. La conta delle cellule micronucleate in almeno 2000 cellule per ogni apice è stata effettuata al microscopio ottico con un ingrandimento 40x (fig. 3.3). Contestualmente, sono stati eseguiti il controllo negativo su suolo standard (OECD, 1984), composto da: sabbia quarzosa (70%), argilla caolinitica (20%), torba di sfagno (10%), e il controllo positivo sul suolo

OECD contaminato con una soluzione di $K_2Cr_2O_7$ (10 mg l^{-1}) come riportato da Feng et al. (2007). I risultati sono stati espressi come frequenza di micronuclei su 1000 cellule (%).

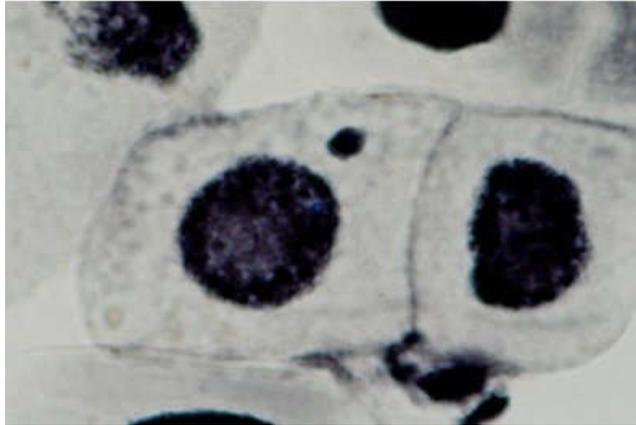


Figura 3.3. Cellula micronucleata dell'apice radicale di *V. faba*.

3.3.2 Test della cometa

Questo test è stato messo a punto tenendo conto dei diversi metodi riportati nella letteratura scientifica (Dhawan et al., 2009; Koppen e Verschave, 1996; Singh et al., 1988; Tice et al., 2000) ed è stato eseguito sia sulle cellule degli apici radicali della pianta *V. faba* che su quelle del celoma del lombrico *E. veneta*.

Gli apici radicali di *V. faba* sono stati ottenuti seguendo la stessa procedura descritta in precedenza per il test dei micronuclei. Dopo la rimozione, le singole radici sono state poste in piastre Petri su ghiaccio e ricoperte con $400 \mu\text{l}$ di PBS (tampone salino fosfato, pH 7.4); utilizzando un rasoio sterile, le radici sono state tagliate delicatamente e poste nel tampone per estrarre le cellule (Gichner et al., 2000).

Per il test con la specie animale, 5 lombrichi dal peso di circa 500 mg sono stati esposti a ciascun suolo (500 g p.s.) per 28 giorni a 20 ± 1 °C e con un fotoperiodo di 12h:12h (luce:buio) seguendo le linee guida del test di riproduzione di tali organismi descritto dall'OECD (2004). In breve, i suoli sono stati portati al 60% di umidità con l'aggiunta di acqua deionizzata; settimanalmente, i lombrichi sono stati alimentati con 3 g di letame di cavallo ed è stata aggiunta, in superficie, una quantità di acqua pari a quella persa per evaporazione. Al termine delle 4 settimane di esposizione, le cellule del celoma sono state ottenute per estrusione (Eyambe et al., 1991) mediante immersione dei lombrichi in 3 ml di soluzione estraente (Na_2EDTA 2.5 mg ml^{-1} , NaCl 0.9%, Etanolo assoluto 10%, pH 7.5) per circa 3 minuti. Le cellule espulse nel fluido celomatico sono state rapidamente trasferite in provette contenenti PBS e poste in ghiaccio.

Dopo l'estrazione, sia le cellule radicali sia quelle celomatiche sono state trattate seguendo il procedimento riportato di seguito.

Le cellule, diluite fino a 10^4 cell ml^{-1} in PBS, sono state intrappolate in un gel di agarosio (LMA, Low Melting Agarose) all'1% disciolto in PBS a 37 °C. Un'aliquota di 80 μl della soluzione ottenuta dal mescolamento della sospensione cellulare con LMA è stata stratificata su un vetrino da microscopia in precedenza ricoperto con uno strato di NMA (Normal Melting Agarose) all'1% e poi ricoperta con un terzo strato di LMA all'1%. Al fine di far distendere ogni strato di gel, sul vetrino è stato posto un vetrino coprioggetti e dopo la solidificazione del preparato al buio per 5 minuti a 4 °C il vetrino coprioggetti è stato rimosso. Al termine, i vetrini sono stati immersi per un'ora in una soluzione di lisi a 4 °C al buio per evitare che il DNA potesse essere danneggiato da radiazioni luminose. La soluzione di lisi viene preparata a partire da una soluzione detta di "prelisi" (NaCl

2.5 M, Na₂EDTA 0.1 M, Tris-HCl 0.01 M, pH 10) alla quale, poco prima dell'uso, sono aggiunti dimetilsolfossido (10%) e TRITON X-100 (1%).

In una successiva fase di unwinding i vetrini sono stati disposti in una camera elettroforetica orizzontale e ricoperti, per circa 40 minuti, da un buffer alcalino di elettroforesi (NaOH 300 mM, Na₂EDTA 1 mM, pH>13) per consentire lo srotolamento dei doppi filamenti del DNA in modo da esprimere la presenza di siti labili e le Single Strand Breaks come rotture del singolo filamento. Avvenuta la denaturazione del DNA, è stata eseguita la corsa elettroforetica a 1V/cm e 300 mA per 20 minuti a 4 °C al buio.

Dopo la corsa, i vetrini sono stati trattati per tre volte con 2 ml di una soluzione neutralizzante (Tris-HCl, pH 7.5) al fine di ripristinare un pH quasi neutro e consentire la successiva colorazione. I vetrini sono stati colorati con 50 µl di colorante DAPI (4,6-diamino-2phenilindole) e lasciati a 4 °C per 3 ore. I campioni sono stati osservati al microscopio ottico a fluorescenza con un ingrandimento 40x, utilizzando una telecamera collegata ad un computer, analizzando cinquanta immagini random per campione (fig. 3.4).

Il test è stato effettuato in triplice replica. La valutazione quantitativa dei dati è stata realizzata mediante il programma informatico CometScore 1.5.2.6. (TriTek Corp. 2006) che consente di rilevare istantaneamente diversi parametri fondamentali per valutare il danno genotossico (es. lunghezza, area e intensità dell'intera cometa, della testa e della coda). I risultati sono stati espressi come percentuale di DNA nella coda (% DNA in tail) rispetto a quello totale della cellula e confrontati con i controlli (negativo e positivo).

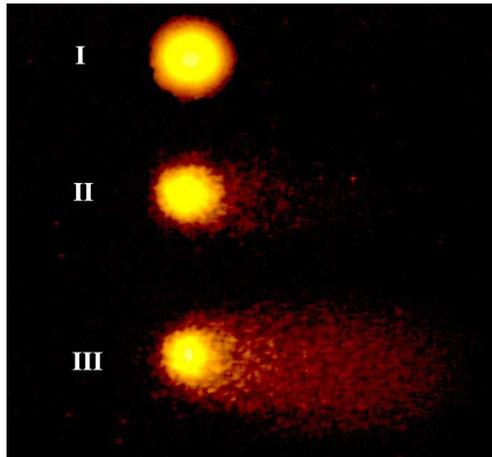


Figura 3.4. Test della cometa: nucleo con DNA non danneggiato (I); nuclei con DNA frammentato che è migrato verso l'anodo (II, III).

3.4 Contaminazione del suolo standard

Al fine di valutare il possibile contributo apportato da Pb e Cu alla genotossicità dei campioni di suolo saggiati, la batteria di test è stata applicata al suolo standard (OECD) contaminato artificialmente con 226.2 e 357.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s., rispettivamente di Pb e Cu, che rappresentano le più alte concentrazioni di questi due metalli misurate nella campagna di prelievo del 2009. Il piombo è stato addizionato al suolo come nitrato $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ partendo da una soluzione madre contenente 1 g Pb l^{-1} mentre il rame è stato aggiunto come cloruro ($\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) da una soluzione madre contenente 2 g Cu l^{-1} . Le soluzioni di Pb e Cu sono state aggiunte al suolo in quantità tali da raggiungere il 100% ed il 60% di umidità in ciascun suolo, per i test con *V. faba* e con *E. veneta*, rispettivamente. I suoli così contaminati sono stati mescolati a lungo manualmente ed in seguito sono stati lasciati stabilizzare per 24 ore prima dell'inizio dei test.

3.5 Espressione dei risultati di genotossicità

Per confrontare i risultati ottenuti dai differenti test di genotossicità questi ultimi sono stati espressi anche come percentuale d'effetto rispetto al controllo positivo e calcolati secondo la seguente formula:

$$Effetto (\%) = \frac{\overline{X}_{controllo} - \overline{X}_{campione}}{\overline{X}_{controllo}} \cdot 100$$

L'incertezza è stata espressa con la deviazione standard (σ) e con l'errore relativo:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \overline{X})^2}{n-1}}$$

$$Err.rel. = \left(\frac{\sigma_{controllo}}{\overline{X}_{controllo}} + \frac{\sigma_{campione}}{\overline{X}_{campione}} \right) \cdot Effetto (\%)$$

3.6 Calcolo di un indice di genotossicità integrato

Partendo dalla procedura descritta da Manzo et al. (2008), in cui viene calcolato un indice per la classificazione dei suoli sulla base dei risultati dei test ecotossicologici, è stato calcolato un nuovo indice che utilizza i risultati dei test genotossicologici: il Genotoxicity test Battery integrated Index (GBI).

L'effetto percentuale (%E) ottenuto per ogni endpoint è stato corretto per ottenere uno Score test Endpoint (SE_i) utilizzando due criteri. Il primo è la comparazione statistica con il controllo positivo (SCF, Statistical Correction Factor) basata sull'utilizzo del test t di Student e può assumere i seguenti valori: 0 che corrisponde a nessuna differenza ($p > 0.05$), 1 che corrisponde a tossicità ($p < 0.05$) e 2 ad elevata tossicità ($p < 0.01$). Il secondo criterio è un fattore di correzione legato al "giudizio esperto" in base al quale si attribuiscono differenti

valori alla matrice e alla severità dell'endpoint e dell'organismo impiegato. È stato attribuito il valore 3 alla matrice (M) e la severità (S) è stata posta uguale a: 2 per il test della cometa con *E. veneta*, 2.5 per il test della cometa con *V. faba*, e 5 per il test dei micronuclei con *V. faba*.

La formula del calcolo del SE_i è la seguente:

$$SE_i = \%E (M \cdot S) SCF$$

SE_i potrebbe essere letto in una scala 0-100 relativa alla batteria di test utilizzata nel modo seguente:

$$\%SE_i = SE_i \left(\frac{\%E_m}{SE_{max}} \right)$$

dove ($\%E_m$) è la massima percentuale di effetto osservata corrispondente al massimo $M \cdot S$ ottenuto e SE_{max} è il massimo Score test Endpoint calcolato.

Pertanto il Genotoxicity test Battery integrated Index (GBI) sarà:

$$\%GBI = \frac{\left(\sum \%SE_i \right)}{N}$$

dove N è il numero di endpoint.

L'indice GBI può essere usato per calcolare la percentuale di rischio genotossico ($\%R$) nel modo seguente:

$$\%R = \%GBI \frac{\left(\sum \%SE_i + C \right)}{\sum \%SE_i}$$

dove C (Consistenza) = $\left(\frac{N}{2} - X \right)^3$ e X è il numero di endpoint statisticamente non significativi.

Il GBI può essere utilizzato inoltre per definire la seguente scala di rischio genotossico:

- Non significativo ($\text{GBI} \leq 5\%$)
- Basso ($5\% < \text{GBI} \leq 20\%$ con $C \leq 0$)
- Medio ($5\% < \text{GBI} \leq 20\%$ con $C > 0$)
- Alto ($20\% < \text{GBI} \leq 50\%$)
- Molto alto ($\text{GBI} > 50\%$)

3.7 Bioaccumulo e stabilità della membrana lisosomiale in *Eisenia fetida*

Il test sulla stabilità della membrana lisosomiale dei lombrichi è stato eseguito presso i laboratori del National Environment Research Institute (NERI) a Silkeborg, in Danimarca. La stabilità della membrana lisosomiale della specie *Eisenia fetida* è stata valutata sia durante che successivamente ad un periodo di esposizione a suoli con diverse concentrazioni di rame.

3.7.1 Trattamento preliminare dei lombrichi

Gli organismi della specie *E. fetida* utilizzati per il test sono stati selezionati da un allevamento dei laboratori del NERI. Tre giorni prima dell'inizio del test, i lombrichi, dal peso compreso tra 100 e 200 mg, sono stati prelevati dall'allevamento ed incubati in un suolo di riferimento (vedi sotto) a temperatura di 20 ± 1 °C e fotoperiodo di 12h:12h (luce:buio). Un giorno prima dell'inizio del test, gli organismi sono stati posti in piastre Petri su filtri di carta inumiditi al fine di ottenere una completa depurazione degli intestini.

3.7.2 Campionamento e contaminazione del suolo di riferimento

Il suolo di riferimento (0 – 15 cm) è stato campionato in un sito sperimentale (Hygum, Jylland, Danimarca), dove è presente un noto gradiente di contaminazione da Cu (Pedersen et al., 1999), nell'area con valori di Cu pari a circa 15 mg kg⁻¹ p.s. Per escludere la fauna indesiderata, i suoli sono stati seccati in stufa ad 80 °C per 24 ore e successivamente setacciati (2 mm). Il giorno precedente l'esposizione dei lombrichi, due sottocampioni del suolo di riferimento sono stati contaminati artificialmente, mediante soluzione acquosa di rame cloruro (CuCl₂·H₂O), raggiungendo concentrazioni di 35 e 350 mg Cu kg⁻¹ p.s.

3.7.3 Preparazione del test ed analisi

Il giorno precedente l'inizio del test, per ogni regime di esposizione (suolo di riferimento, 35 mg Cu kg⁻¹ p.s. e 350 mg Cu kg⁻¹ p.s.) sono stati preparati 40 vasetti in plastica, ognuno contenente 260 gr di suolo umido (200 gr di suolo secco e 60 ml di acqua demineralizzata oppure 60 ml di soluzione contaminata da Cu) per un totale di 120. I vasetti, dopo l'aggiunta di 5 lombrichi della specie *E. fetida*, sono stati mantenuti alle stesse condizioni di temperatura e fotoperiodo dell'allevamento per tutta la durata del test (32 giorni).

Una volta a settimana, i contenitori sono stati aperti per aggiungere il contenuto di acqua perso per evaporazione e per cibare i lombrichi con 3 g di letame di cavallo (inumidito con 10 ml di acqua demineralizzata). I lombrichi esposti al suolo di riferimento sono stati lasciati indisturbati per tutta la durata del test, invece, quelli esposti ai suoli contaminati da Cu dopo 14 giorni (periodo di accumulo) sono stati trasferiti in vasetti contenenti suolo di riferimento per

successivi 18 giorni (periodo di eliminazione). Il test è stato effettuato in quattro repliche. Per ogni regime di esposizione dopo 3, 5, 7, 10, 14, 16, 18, 21, 28 e 32 giorni, sono state valutate, per una replica, la stabilità della membrana lisosomiale dei lombrichi e, per le altre tre repliche, la concentrazione di Cu nei lombrichi. Contestualmente, per le quattro repliche, è stata determinata la concentrazione totale e della frazione biodisponibile di Cu nel suolo.

Per misurare la stabilità della membrana lisosomiale, il celoma è stato estratto dai lombrichi e colorato così come descritto da Weeks e Svendsen (1996). Per ogni lombrico, la stabilità della membrana lisosomiale è stata valutata come il rapporto tra il numero di cellule con il citosol colorato di rosso e il numero di quelle con citosol non colorato; questo rapporto è stato stimato durante due minuti di conta e ripetuto ogni quattro minuti finché il numero di cellule col citosol rosso non superava il 50% del totale. I risultati sono espressi come tempo di ritenzione del rosso neutro (NRRT), che corrisponde al numero di minuti necessari per raggiungere un rapporto di 1:1 tra il numero di cellule con citosol colorato e non colorato (fig. 3.5).

Prima della determinazione della concentrazione interna di Cu, i lombrichi sono stati tenuti per 24 ore in piastre Petri su filtri di carta inumiditi, in modo da farli depurare ed evitare quindi di misurare il rame non assimilato ma presente nel loro tratto intestinale. In seguito, gli organismi sono stati essiccati e digeriti mediante acido nitrico (65%) su piastra riscaldante a 150 °C (fino a mineralizzazione completa).

Per determinare la concentrazione totale di Cu, i suoli sono stati essiccati in stufa a 105 °C per 24 ore e polverizzati. I campioni sono stati mineralizzati mediante una soluzione di acido nitrico (65%), acido fluoridrico (47.5%) e

perossido d'idrogeno (30%) in rapporto di 3:1:1 (v:v:v) in un fornello a microonde (Anton Paar Multiwave, Perkin-Elmer).

Per estrarre la frazione di Cu biodisponibile, un'aliquota di 2 g di suolo essiccato è stata posta in 20 ml di una soluzione di CaCl₂ (0.01 M) ed agitata per 24 ore. In seguito a decantazione, il surnatante è stato prelevato ed analizzato.

Le concentrazioni di Cu sono state misurate mediante uno spettrometro di massa al plasma accoppiato induttivamente (PE SCIEX Elan 6000 ICP-MS, Perkin-Elmer) equipaggiato con un nebulizzatore cross-flow. I risultati sono stati espressi in mg kg⁻¹ p.s. Le analisi sono state condotte in triplice replica per ciascun campione.

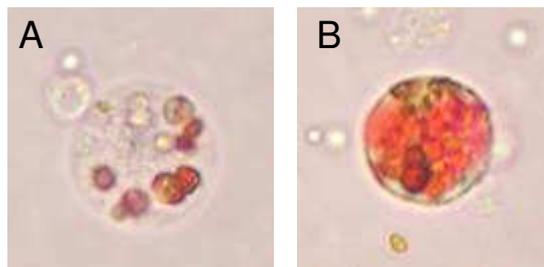


Figura 3.5. Celomociti di *Eisenia fetida* colorati con il rosso neutro. (A) Colorante all'interno dei lisosomi; (B) colorante disperso nel citosol.

3.8 Analisi statistica

Le correlazioni tra i risultati dei test di genotossicità e/o l'indice di genotossicità e quelli delle caratteristiche chimico-fisiche dei suoli, così come le correlazioni tra le concentrazioni interne di Cu nei lombrichi e quelle totali e biodisponibili presenti nei suoli, sono state valutate mediante il calcolo del

coefficiente di correlazione lineare di Pearson utilizzando il programma statistico Sigma-Stat 3.5 (Jandel Scientific, USA).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Caratteristiche dei suoli

I suoli dell'area urbana ed extraurbana presentano il contenuto di sabbia più alto e appartengono alla classe tessiturale franco-sabbiosa; il suolo del parco urbano ha il più alto contenuto di limo e tessitura franco-limosa, mentre il suolo dell'area remota mostra il più alto contenuto di argilla e tessitura argillosa (Tab. 4.1). I suoli franco sabbiosi hanno i più bassi contenuti di sostanza organica e i più bassi valori di tenore idrico (Tab. 4.2). Particolarmente bassi sono i valori di sostanza organica nell'area urbana, mentre alti sono quelli misurati nei suoli del parco urbano e dell'area remota, aree caratterizzate entrambe da fitta copertura vegetale. I valori di sostanza organica misurati, comunque, non si discostano notevolmente da quelli riportati da altri autori per la stessa tipologia di suolo (Cenci et al., 2008). I suoli del parco urbano e dell'area remota, rispettivamente, con tessitura franco-limosa ed argillosa e con i più alti contenuti di sostanza organica, presentano anche i più alti valori di tenore idrico; è noto, infatti, che tali componenti del suolo trattengono elevate quantità d'acqua (Bullini et al., 1998; Wu et al., 1990). La capacità di campo dei suoli studiati riflette la classificazione tessiturale degli stessi, con valori più elevati per i suoli con contenuto di argilla maggiore (Tab. 4.2).

Tabella 4.1

Percentuali di sabbia, limo e argilla e classi tessiturali (criterio USDA) dei suoli oggetto di studio.

Siti	Sabbia (%)	Limo (%)	Argilla (%)	Classi tessiturali
A. urbana	60	36	4	Franco sabbiosa
A. extraurbana	54	43	3	Franco sabbiosa
Parco urbano	31	58	11	Franco limosa
A. remota	24	31	45	Argillosa

Tabella 4.2

Valori medi (\pm e.s.) del contenuto di sostanza organica (SO), del tenore idrico (TI), della capacità idrica massimale (CIM) e del pH dei suoli oggetto di studio.

Anni	Siti	SO (% p.s.)	TI (% p.s.)	CIM (% p.s.)	pH
2009	A. urbana	8.00 \pm 0.00	19.55 \pm 0.17	51.20 \pm 1.81	6.67 \pm 0.03
	A. extraurbana	11.33 \pm 0.67	40.15 \pm 0.66	34.85 \pm 0.90	6.21 \pm 0.05
	Parco urbano	25.00 \pm 0.58	42.21 \pm 0.22	108.27 \pm 0.78	6.77 \pm 0.04
	A. remota	23.67 \pm 0.67	59.88 \pm 0.51	117.99 \pm 1.81	6.66 \pm 0.03
2010	A. urbana	11.00 \pm 0.00	33.84 \pm 0.08	44.24 \pm 1.77	7.06 \pm 0.09
	A. extraurbana	12.54 \pm 0.60	44.60 \pm 0.40	66.91 \pm 1.23	6.75 \pm 0.02
	Parco urbano	30.33 \pm 0.33	66.74 \pm 0.48	87.98 \pm 2.25	6.72 \pm 0.01
	A. remota	21.90 \pm 2.00	54.64 \pm 1.19	57.30 \pm 0.29	6.88 \pm 0.02

I suoli campionati, ad eccezione di quello dell'area extraurbana prelevato nel 2009 che è sub-acido, presentano valori di pH simili e prossimi alla neutralità (Tab. 4.2).

Nell'ambito del medesimo progetto di ricerca, di cui fa parte questo studio, sono state misurate anche le concentrazioni totali e delle frazioni disponibili di Pb, Cu, Cd, Cr e Ni (figg. 4.1, 4.2), ed utilizzate al fine di potervi relazionare gli effetti genotossici osservati. Tra i metalli studiati il Pb presenta la maggiore concentrazione totale nel suolo del parco urbano (sito confinante con una strada ad elevato traffico veicolare) nel 2009 e nell'area urbana nel 2010 e, in generale, risulta abbastanza elevato in tutti i suoli, con intervalli che variano da 111.0 a 226.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s. nel 2009, e da 151.1 – 228.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s. nel 2010 (fig. 4.1). La più alta concentrazione di Cu è stata misurata nel suolo del parco urbano in entrambi gli anni (fig. 4.1). La contaminazione dei suoli da questi due metalli è attribuibile ai fumi di scarico dei veicoli (Imperato et al., 2003; Ramakrishnaiah e Somasheka, 2002) poiché le concentrazioni misurate sono confrontabili con quelle rilevate, per gli stessi elementi, in altri suoli urbani (Madrid et al., 2002; Mielke et al., 2001; Salvagio Manta et al., 2002).

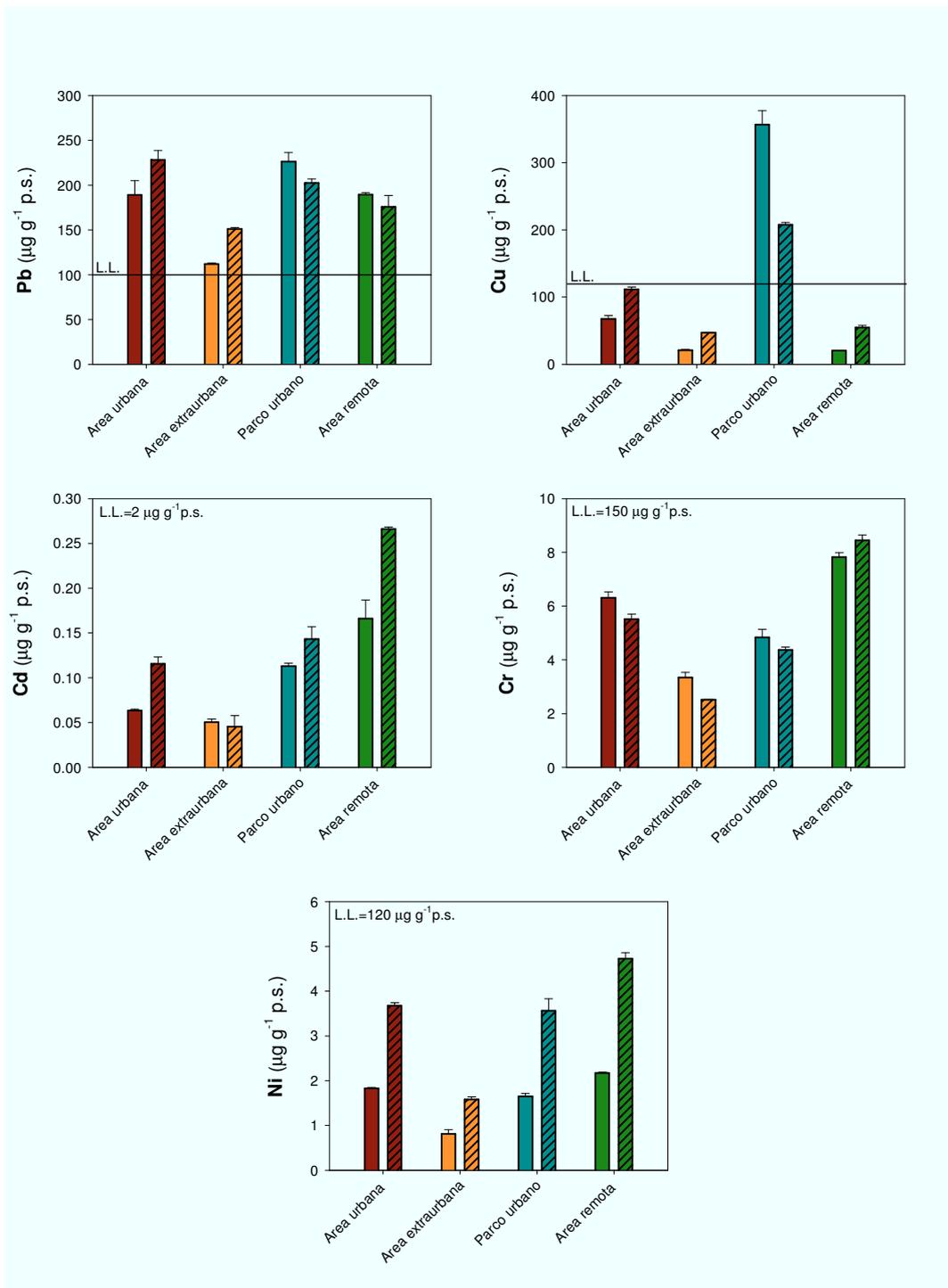


Figura 4.1. Valori medi (\pm e.s.) del contenuto totale dei metalli indagati nei suoli campionati nel 2009 (colonne piene) e nel 2010 (colonne con griglia). Sono riportati anche i limiti di legge (L.L.) fissati nel D.M. 471/1999 per suoli ad uso verde pubblico, privato e residenziale.

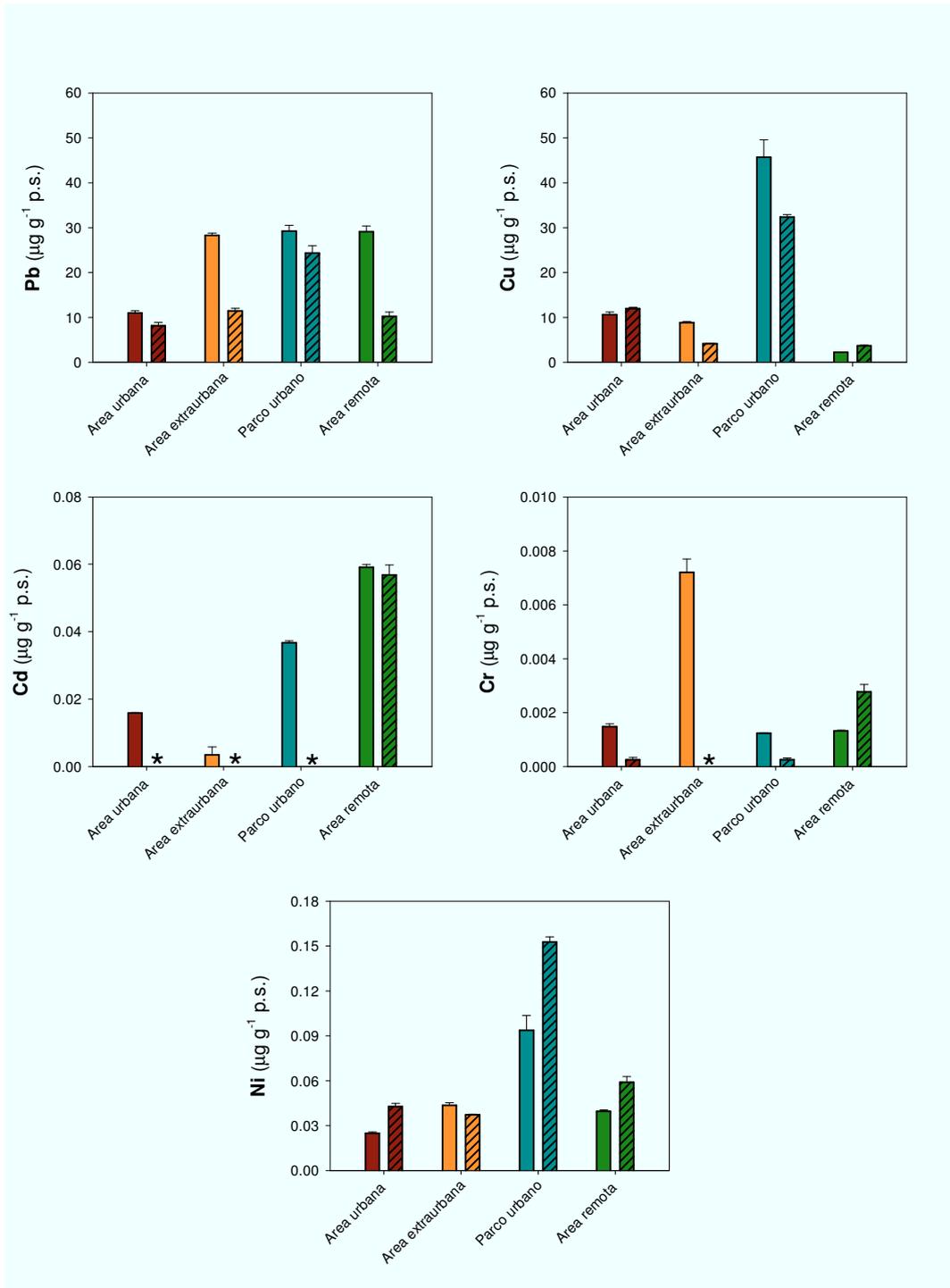


Figura 4.2. Valori medi (\pm e.s.) del contenuto della frazione disponibile dei metalli indagati nei suoli campionati nel 2009 (colonne piene) e nel 2010 (colonne con griglia).

* valori inferiori al limite di rilevabilità dello strumento.

Nonostante in Italia la benzina senza piombo sia stata vietata da qualche anno, tuttavia questo metallo è stato trovato ancora in concentrazioni superiori ai limiti di legge, $120 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s., imposti dal D.M. 471/1999 per suoli ad uso verde pubblico, privato e residenziale, suggerendo un'elevata persistenza del Pb nei suoli (Irha et al., 2009); anche le concentrazioni di Cu (fig. 4.1) superano, solo per il suolo del parco urbano, i limiti di legge, $100 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s., imposti dal medesimo decreto ministeriale. La concentrazione elevata di Pb nel sito dell'area remota potrebbe, invece, essere dovuta alla differente destinazione d'uso di questo suolo negli anni precedenti al 1993; risulta, infatti, che quest'area fosse utilizzata come riserva di caccia ed è quindi molto probabile che il piombo utilizzato per le cartucce dei fucili si possa essere accumulato nel suolo col tempo. Cd, Cr e Ni, presentando concentrazioni più elevate nell'area remota e comunque sempre inferiori ai valori limite di legge (fig. 4.1), non sembrano contribuire in maniera significativa alla contaminazione dei suoli oggetto di studio.

La disponibilità nel suolo degli elementi indagati, ad eccezione del Cu, non sembrerebbe influenzata dalla rispettiva concentrazione totale (fig. 4.2). La concentrazione dei metalli nella frazione disponibile subisce una diminuzione nei campioni del 2010 rispetto all'anno precedente (fig. 4.2), probabilmente per il lisciviamento causato dalle intense piogge che hanno preceduto il prelievo dei suoli nel 2010.

Per entrambi i prelievi, le concentrazioni totali, così come quelle delle frazioni disponibili, dei metalli studiati non sono risultate correlate ad alcuni dei parametri chimico-fisici dei suoli.

4.2 Batteria di test di genotossicità applicata ai suoli campionati

Per il campionamento del 2009, il test dei micronuclei (fig. 4.3) evidenzia effetti genotossici simili per tutti i suoli fatta eccezione per il suolo dell'area remota per il quale, infatti, si osserva una frequenza di micronuclei inferiore a quella del controllo negativo.

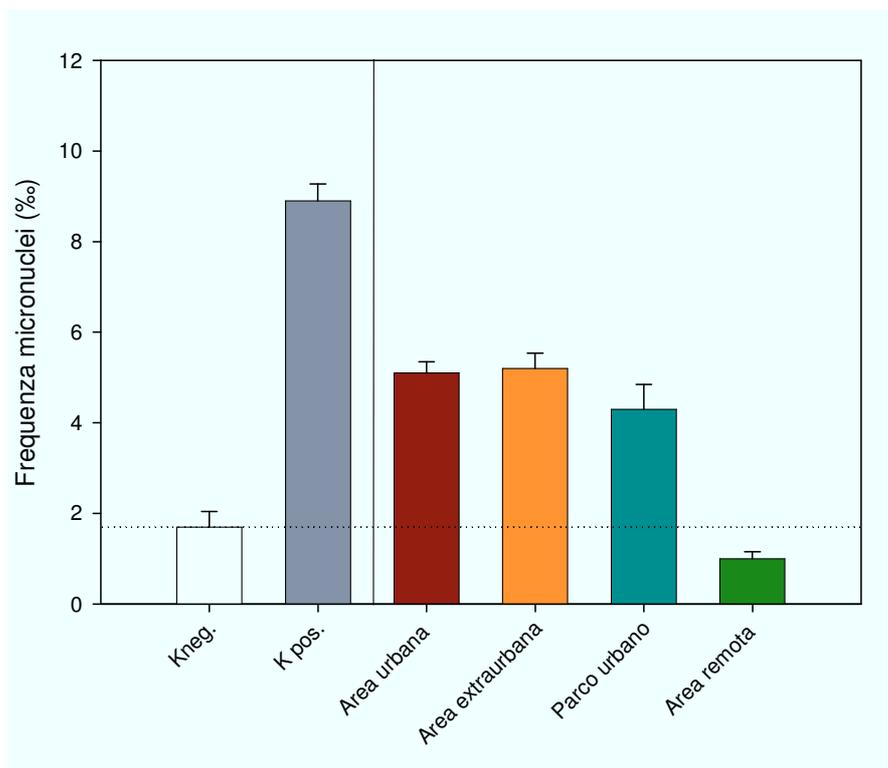


Figura 4.3. Valori medi (\pm e.s.) della frequenza di micronuclei in cellule dell'apice radicale di *V. faba* calcolati per i suoli campionati nel 2009. Il controllo negativo (K neg.) è suolo standard OECD. Il controllo positivo (K pos.) è suolo OECD a cui è stato aggiunto $K_2Cr_2O_7$ ($4\mu g g^{-1}$ p.s.).

La frequenza di micronuclei per i campioni dell'area urbana, di quella extraurbana e del parco urbano risulta rispettivamente 3.1, 3 e 2.5 volte superiore rispetto al controllo negativo. Il test della cometa con *V. faba* mostra una percentuale di DNA danneggiato di poco superiore al controllo negativo (1.4 volte) solo per il campione dell'area urbana (fig. 4.4).

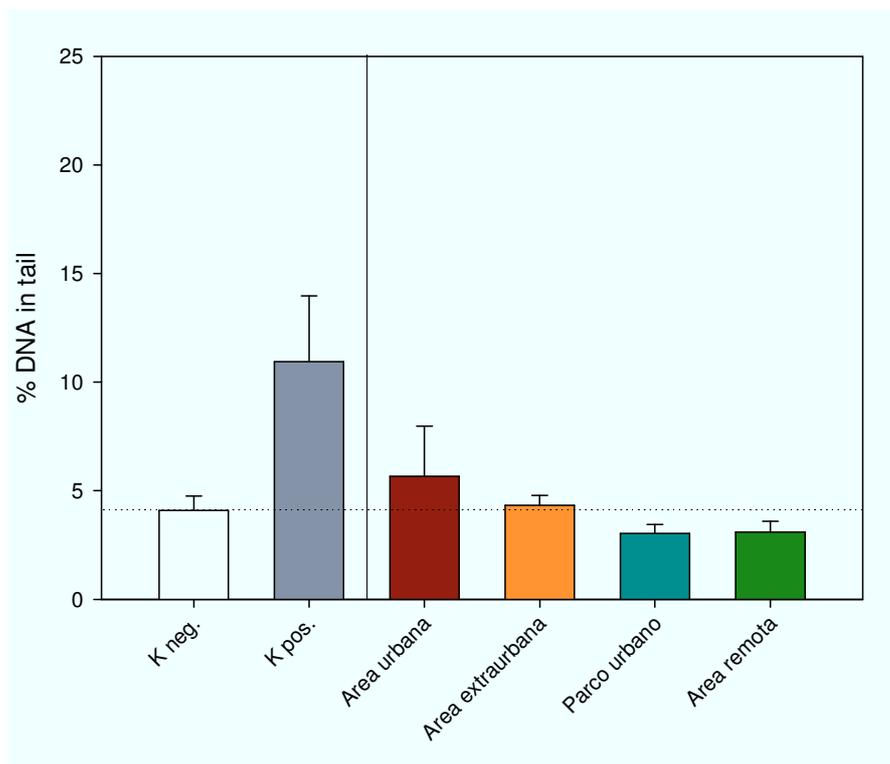


Figura 4.4. Valori medi (\pm e.s.) della percentuale di DNA nella coda di cellule dell'apice radicale di *V. faba* calcolati per i suoli campionati nel 2009. Il controllo negativo (K neg.) è suolo standard OECD. Il controllo positivo (K pos.) è suolo OECD a cui è stato aggiunto $K_2Cr_2O_7$ ($4\mu g\ g^{-1}$ p.s.).

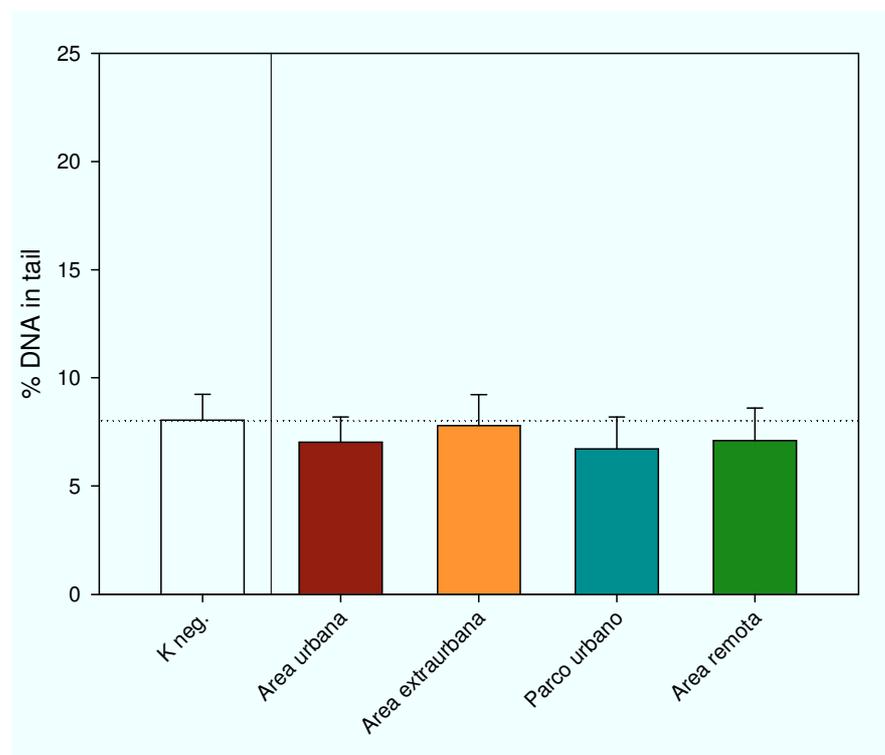


Figura 4.5. Valori medi (\pm e.s.) della percentuale di DNA nella coda di cellule del celoma di *E. veneta* calcolati per i suoli campionati nel 2009. Il controllo negativo (K neg.) è suolo standard OECD.

Lo stesso test effettuato con *E. veneta* non evidenzia la presenza di danni al DNA per alcuno dei suoli indagati (fig. 4.5) essendo la percentuale di DNA migrato nella coda in relazione al DNA totale della cellula sempre inferiore a quella misurata per il controllo negativo.

Al fine di rendere possibile un confronto tra i risultati dei test della batteria, questi sono stati espressi come percentuale d'effetto rispetto al controllo (fig. 4.6). Per l'area urbana e quella extraurbana, il test dei micronuclei fa registrare un effetto molto alto, pari circa al 200%, mentre i test della cometa evidenziano effetti molto più bassi (5-40%) con *V. faba* e nulli con *E. veneta* (fig. 4.6). Per il parco urbano, l'unico test che mostra effetti genotossici è quello dei micronuclei (150%), mentre per l'area remota si riscontra assenza di genotossicità (fig.4.6).

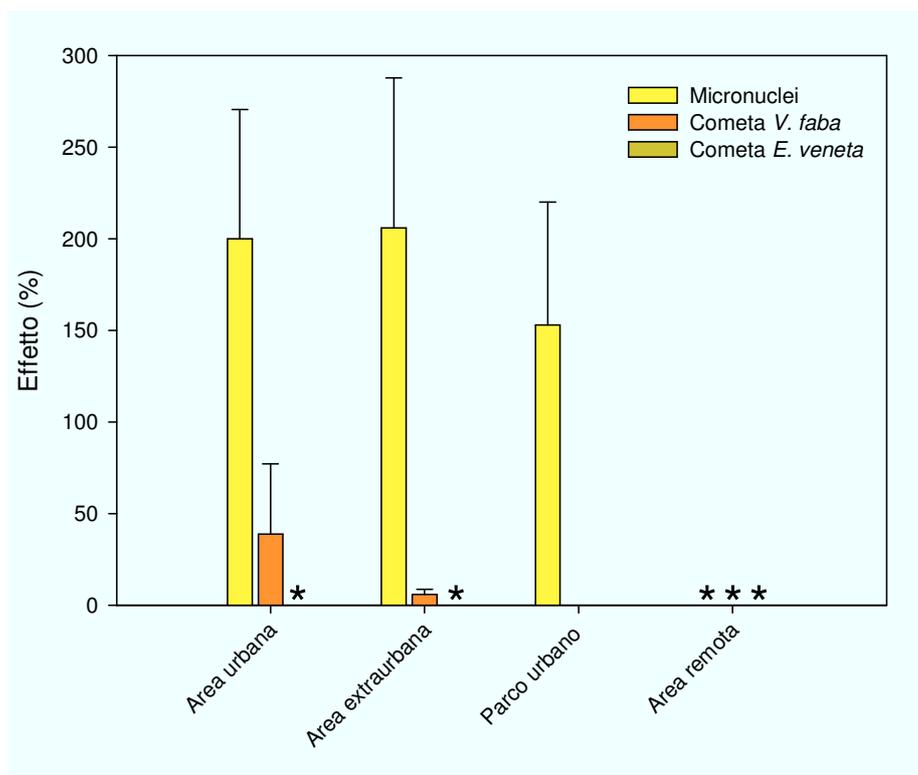


Figura 4.6. Effetto percentuale medio (\pm err.rel.) rispetto al controllo positivo (suolo OECD) dei risultati dei test di genotossicità relativi ai suoli campionati nel 2009.

* valori inferiori al controllo.

Per il campionamento del 2010, la frequenza dei micronuclei è simile per tutti i suoli eccetto che per quello dell'area remota che presenta valori più bassi (fig. 4.7). Comunque, la frequenza dei micronuclei è mediamente più bassa dell'anno precedente, infatti, al massimo si registra una frequenza doppia rispetto al controllo negativo (fig. 4.7).

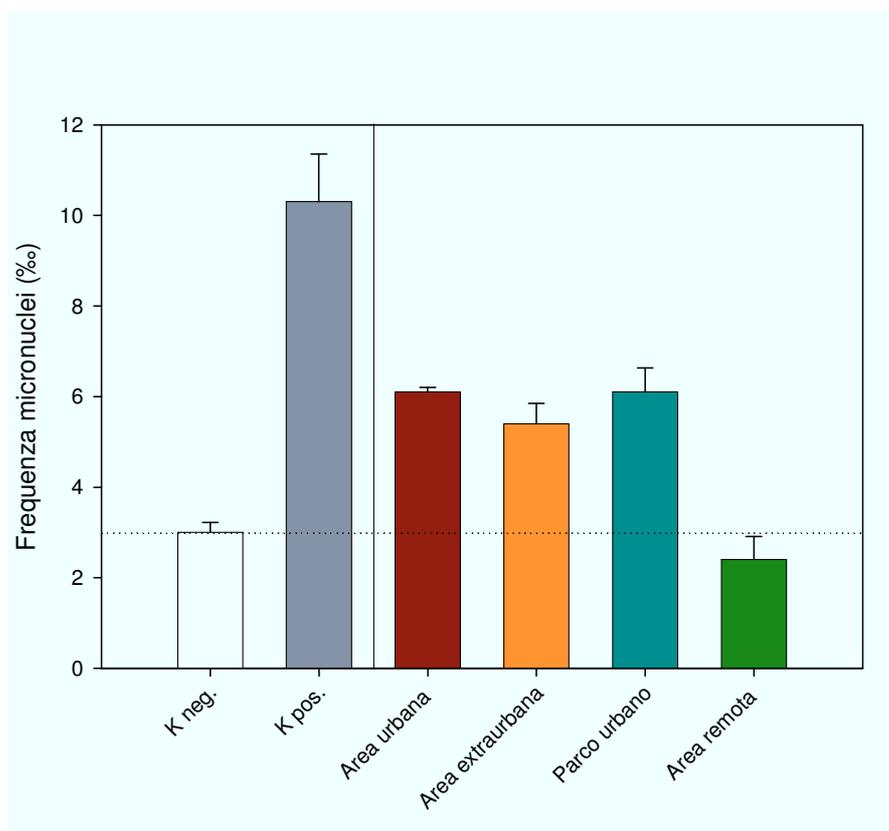


Figura 4.7. Valori medi (\pm e.s.) della frequenza di micronuclei in cellule dell'apice radicale di *V. faba* calcolati per i suoli campionati nel 2010. Il controllo negativo (K neg.) è suolo standard OECD. Il controllo positivo (K pos.) è suolo OECD a cui è stato aggiunto $K_2Cr_2O_7$ ($4\mu g\ g^{-1}$ p.s.).

Per il test della cometa con *V. faba*, la percentuale di DNA migrato nella coda è sempre maggiore per i suoli campionati rispetto al controllo negativo e superiore di 2.1 e 1.8 volte, rispettivamente, per l'area urbana e quella extraurbana, e di 1.3 volte sia per il parco urbano sia per l'area remota (fig. 4.8). Il test della cometa con *E. veneta* (fig. 4.9) non evidenzia, per i campioni delle aree indagate, sostanziali scostamenti rispetto al controllo.

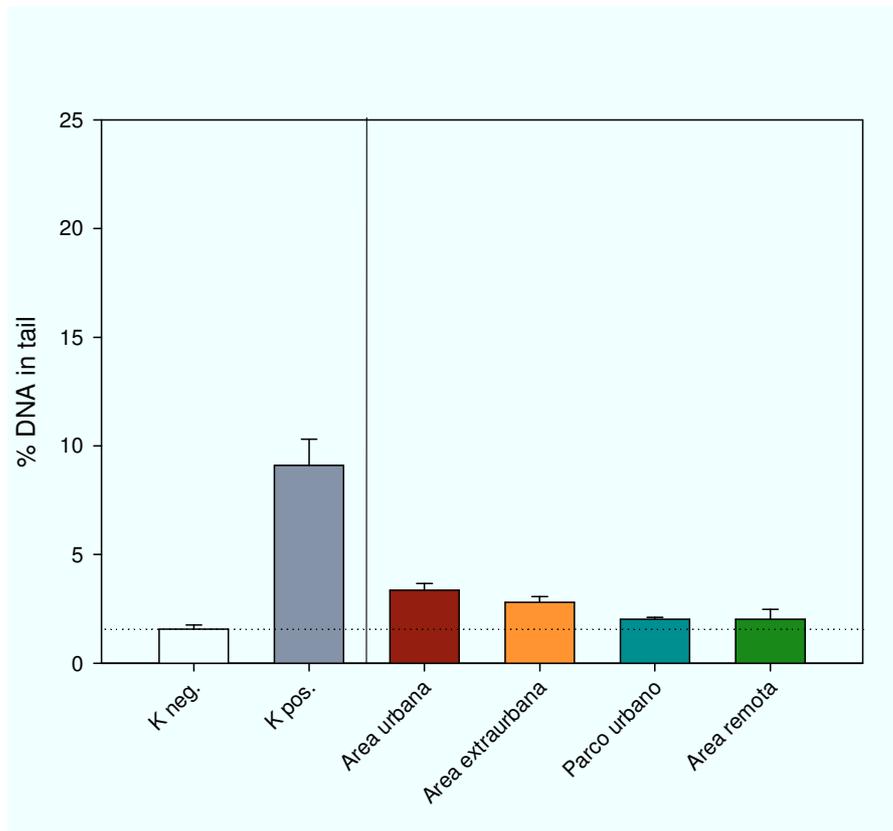


Figura 4.8. Valori medi (\pm e.s.) della percentuale di DNA nella coda di cellule dell'apice radicale di *V. faba* calcolati per i suoli campionati nel 2010. Il controllo negativo (K neg.) è suolo standard OECD. Il controllo positivo (K pos.) è suolo OECD a cui è stato aggiunto $K_2Cr_2O_7$ ($4\mu g\ g^{-1}$ p.s.).

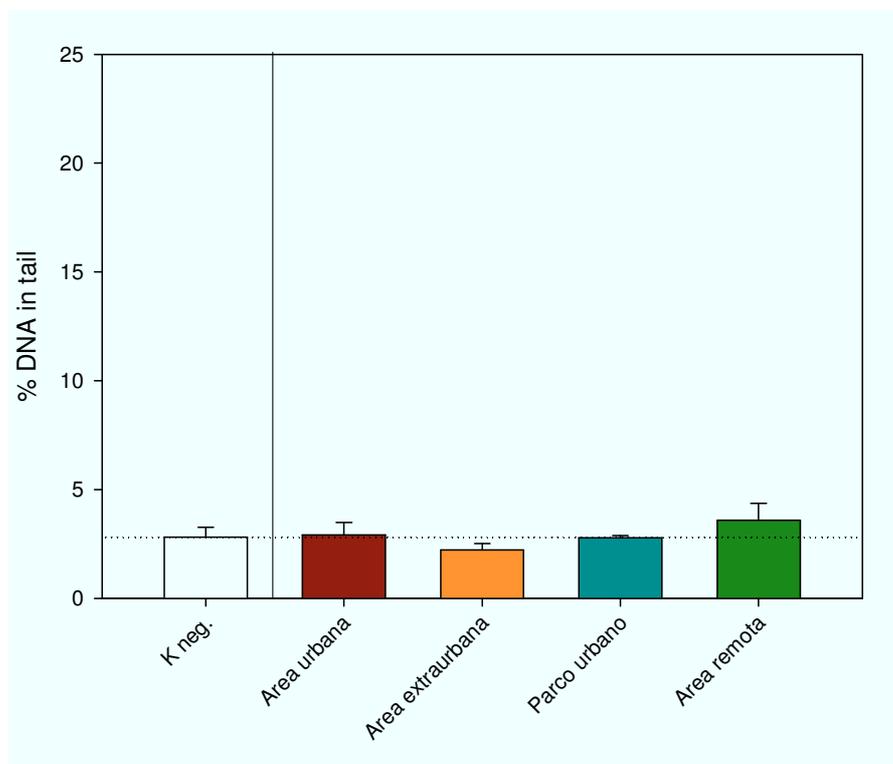


Figura 4.9. Valori medi (\pm e.s.) della percentuale di DNA nella coda di cellule del celoma di *E. veneta* calcolati per i suoli campionati nel 2010. Il controllo negativo (K neg.) è suolo standard OECD.

Solamente la percentuale di DNA danneggiato delle cellule celomatiche dei lombrichi esposti al suolo dell'area remota è 1.3 volte superiore rispetto a quella misurata per il controllo negativo.

Nel 2010 per l'area urbana, extraurbana e per il parco urbano si registrano percentuali d'effetto pari a circa il 100% per il test dei micronuclei, effetti che oscillano tra valori compresi tra il 30 e il 100% per il test della cometa con *V. faba* ed effetti nulli per il test della cometa con *E. veneta* (fig. 4.10). Per l'area remota invece si rilevano effetti all'incirca del 30% per i due test della cometa ed effetti nulli per il test dei micronuclei (fig. 4.10).

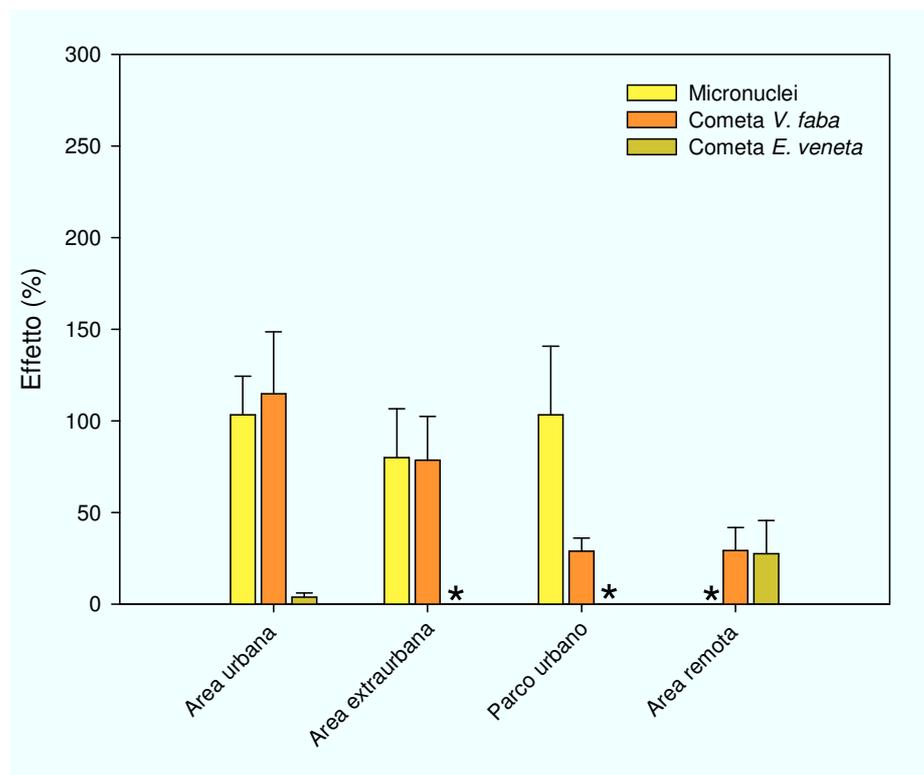


Figura 4.10. Effetto percentuale medio (\pm err.rel.) rispetto al controllo positivo (suolo OECD) dei risultati dei test di genotossicità relativi ai suoli campionati nel 2010.

* valori inferiori al controllo.

In generale la genotossicità dei campioni indagati è stata evidenziata principalmente dal test dei micronuclei; la maggior parte dei suoli indagati, che mostrano effetti elevati con il test dei micronuclei danno risposte inferiori, e in

alcuni casi negative, con il test della cometa. Tali risultati non indicano che il test della cometa sia meno sensibile di quello dei micronuclei, bensì che valuta effetti diversi da quest'ultimo. In particolare, il test della cometa rileva lesioni a singolo e doppio filamento del DNA eventualmente riparabili (Kassie et al., 2000; Tice et al., 2000), mentre il test dei micronuclei rileva lesioni permanenti al DNA, come le mutazioni cromosomiche o l'alterazione del numero di cromosomi (effetto aneugenico) (El Hajjouji et al., 2007; Marcato-Romain et al., 2009a). Hartmann e coautori (2001) riportano che due composti organici (demelconina e carbendazima) con nota azione aneugenica, non manifestano effetti genotossici con il test della cometa mentre esercitano una forte genotossicità con il test dei micronuclei. Inoltre, il test della cometa non è in grado di rilevare danni al DNA attribuibili alla formazione di legami crociati (*crosslinkers*) DNA-DNA e/o DNA-proteine (Merck e Speit, 1999).

In letteratura esistono pochi lavori in cui i due tipi di test sono applicati contemporaneamente alla stessa matrice ed inoltre, gli effetti genotossici riscontrati, messi a confronto, sono spesso discordanti (Lah et al., 2008, Seth et al., 2008). Van Goethem et al. (1997) e Zang et al. (2000) suggeriscono un utilizzo combinato dei due test avvalorando l'esigenza di considerare due diversi endpoint (mutazioni cromosomiche per il test dei micronuclei e danno al DNA, eventualmente riparabile, per quello della cometa). Anche i risultati della batteria di test applicata in questo lavoro evidenziano la necessità di utilizzare test di genotossicità che valutino differenti endpoint, al fine di evitare una sottostima del danno genotossico associato ai suoli contaminati.

Le differenti risposte evidenziate dallo stesso tipo di test (test della cometa) ottenute da *V. faba* ed *E. veneta*, potrebbero essere attribuite alla diversa

sensibilità di questi organismi. Diversi autori (Verschaeve et al., 1995; Zang et al., 2000) hanno dimostrato che il test della cometa effettuato con i lombrichi è efficace per monitorare ed identificare la presenza di composti genotossici negli ecosistemi terrestri; dai loro risultati emerge che è possibile, infatti, ricavare curve dose/risposta tra le concentrazioni di vari contaminanti e il grado di danno al DNA dei celomociti. I risultati ottenuti con il test della cometa hanno evidenziato una maggiore sensibilità dell'organismo vegetale rispetto a quello animale (che non manifesta alcun danno genotossico) al tipo di contaminazione presente nei suoli indagati. Questo risultato sottolinea che, per evitare la sottostima del danno genotossico, è anche importante adoperare specie appartenenti a livelli trofici differenti. La maggiore sensibilità della specie vegetale potrebbe essere legata alla tipologia cellulare utilizzata per questo test. Le cellule del tessuto meristemato sono cellule piccole ed appiattite, non ancora differenziate e mantengono la capacità di dividersi (ogni 36-48 ore) per tutto il loro ciclo vitale. Tale caratteristica genera una più alta probabilità di incorrere in mutazioni. Inoltre le cellule in attiva duplicazione presentano una più alta percentuale di DNA in forma despiralizzata (eucromatina), e quindi più sensibile all'azione di composti genotossici, rispetto a cellule specializzate come i celomociti dei lombrichi, che presentano una più alta percentuale di DNA spiralizzato e complessato con proteine (eterocromatina).

4.2.1 Relazioni tra proprietà chimico-fisiche e risultati di genotossicità nei suoli campionati

Per entrambi i prelievi, i test di genotossicità mostrano effetti nulli o molto bassi per i suoli campionati nell'area remota, laddove alte concentrazioni totali e

delle frazioni disponibili dei metalli indagati sono state misurate. L'effetto della contaminazione sulla genotossicità potrebbe essere stato mitigato dall'elevato contenuto di sostanza organica ritrovato in questo suolo (Marcato-Romain et al., 2009b). Il suolo campionato nel parco urbano con contenuto di sostanza organica simile a quello misurato nell'area remota, tuttavia, presenta effetti genotossici rilevanti. In questo suolo la genotossicità (figg. 4.6, 4.10) potrebbe essere attribuita agli effetti sinergici di Cu e Pb le cui concentrazioni, sia come totale che come frazione disponibile, sono particolarmente alte (figg. 4.1, 4.2). Diversi autori riportano effetti genotossici in suoli dovuti alla co-contaminazione da metalli (Marcato-Romain et al., 2009a; Minissi et al., 1998). Invece, l'elevata genotossicità rilevata per il suolo urbano e per quello extraurbano potrebbe derivare da una serie di fattori come il basso contenuto di sostanza organica, l'elevata contaminazione dai metalli indagati così come dall'elevata concentrazione (circa 1000 ng g⁻¹ p.s.) di idrocarburi policiclici aromatici (Manzo et al., 2008). Complessivamente, la genotossicità subisce delle variazioni dal 2009 al 2010 sia per l'entità dell'effetto che per la tipologia di danno. Infatti, si osserva una diminuzione del danno genotossico di tipo irreversibile, identificato dal test dei micronuclei, ed un aumento, in tutti i siti, delle lesioni al DNA eventualmente riparabili, identificate dal test della cometa mediante *V. faba* (figg. 4.6, 4.10). Da quanto riportato, gli effetti genotossici non sono ascrivibili alla sola contaminazione da metalli indagati. Infatti, i risultati ottenuti dai tre test della batteria non risultano statisticamente correlati alle concentrazioni totali, alle frazioni disponibili dei metalli, e alle rispettive sommatorie. Piuttosto, gli effetti genotossici sembrerebbero essere mitigati dalle caratteristiche chimico-fisiche dei suoli. Infatti, i risultati ottenuti dal test della cometa con *V. faba* sono

inversamente correlati sia con il tenore idrico sia con il contenuto di sostanza organica dei suoli (Tab. 4.3), mentre quelli del test della cometa con *E. veneta* mostrano una correlazione negativa con il contenuto di sostanza organica (Tab. 4.3).

Tabella 4.3

Valori delle correlazioni statisticamente significative tra le proprietà chimico-fisiche e i risultati di genotossicità.

Relazione	r Pearson
Cometa <i>V. faba</i> vs TI	-0.823*
Cometa <i>V. faba</i> vs SO	-0.771*
Cometa <i>E. veneta</i> vs SO	-0.775*

* p < 0.05

Tali risultati concordano con quelli riportati da Majer et al. (2002) che non riscontrano correlazioni statisticamente significative tra le concentrazioni di metalli e la genotossicità misurata con il test dei micronuclei in 20 differenti suoli indagati, mentre rilevano che gli effetti genotossici dipendono soprattutto dalle proprietà chimico-fisiche dei suoli, in particolar modo dai valori di pH e dal contenuto di sostanza organica.

4.3 Confronto degli effetti genotossici ottenuti per il suolo contaminato artificialmente e per il suolo urbano

Al fine di valutare il contributo apportato dal rame e dal piombo alla genotossicità riscontrata nei suoli urbani, la batteria di test di genotossicità è stata applicata anche ad un suolo standard cui sono stati aggiunti, separatamente, Pb e Cu in concentrazioni pari a quelle misurate nel suolo maggiormente contaminato da questi due metalli. Per entrambi i metalli le più alte concentrazioni sono riscontrate, per il 2009, nel suolo del parco urbano e risultano 226.2 e 357.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ p.s., rispettivamente, per Pb e Cu.

Il test dei micronuclei e della cometa con *V. faba* evidenziano effetti genotossici solo per il suolo contaminato con Pb (figg. 4.11, 4.12), infatti, sia la frequenza dei micronuclei sia la percentuale di DNA danneggiato risultano 2.7 volte superiori ai rispettivi risultati ottenuti per il suolo controllo. Sebbene con effetto minore, anche il test della cometa con *E. veneta* mostra danno genotossico solo in seguito alla contaminazione da Pb mostrando una percentuale di DNA nella coda 1.4 volte superiore a quella misurata per il suolo controllo (fig. 4.13).

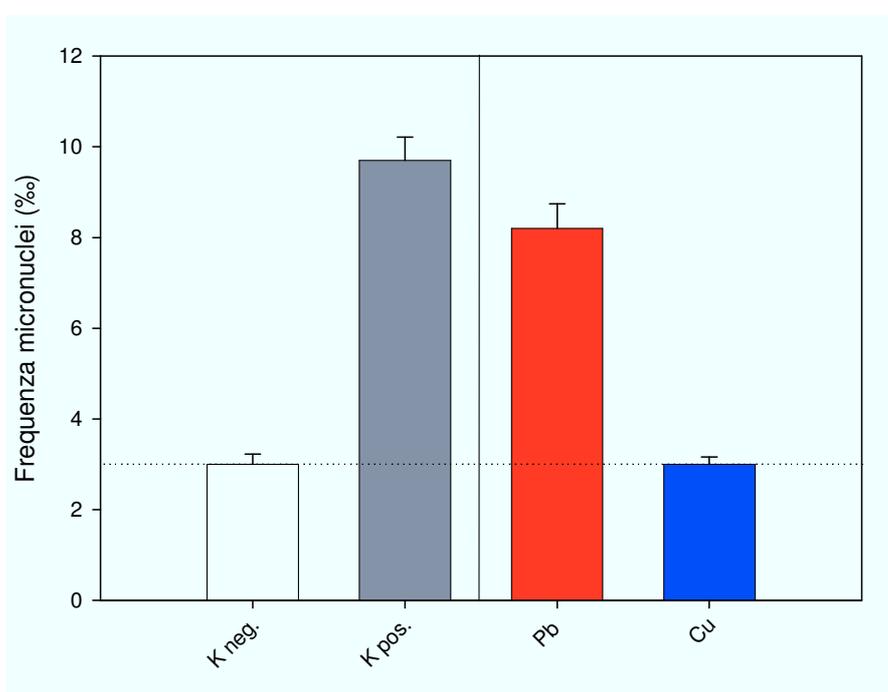


Figura 4.11. Valori medi (\pm e.s.) della frequenza di micronuclei in cellule dell'apice radicale di *V. faba* calcolati per il suolo standard OECD contaminato artificialmente con Pb ($226.2 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.) e Cu ($357.0 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.). Il controllo negativo (K neg.) è suolo standard OECD. Il controllo positivo (K pos.) è suolo OECD a cui è stato aggiunto $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($4 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.).

Risultati simili sono riportati da Steinkellner et al. (1998) che, nel comparare mediante il test dei micronuclei gli effetti genotossici indotti da alcuni metalli pesanti in diversi tipi di piante, notano che il Cu, a differenza del Pb, non causa effetti mutageni. Inoltre, dai risultati ottenuti sembrerebbe confermato ciò che è riportato in letteratura a proposito dei differenti meccanismi di azione

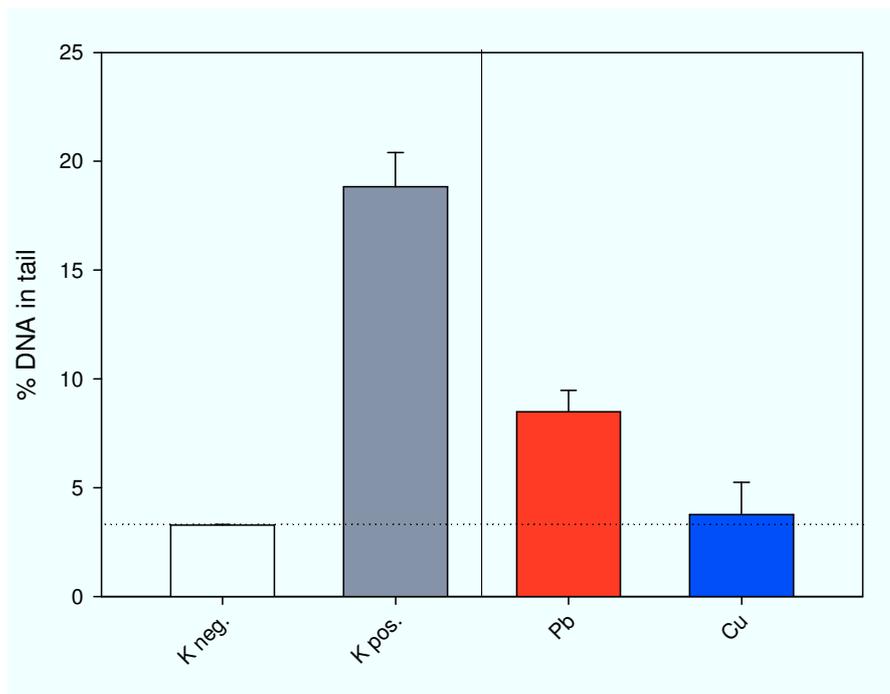


Figura 4.12. Valori medi (\pm e.s.) della percentuale di DNA nella coda di cellule dell'apice radicale di *V. faba* per il suolo standard OECD contaminato artificialmente con Pb ($226.2 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.) e Cu ($357.0 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.). Il controllo negativo (K neg.) è suolo standard OECD. Il controllo positivo (K pos.) è suolo OECD a cui è stato aggiunto $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($4 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.).

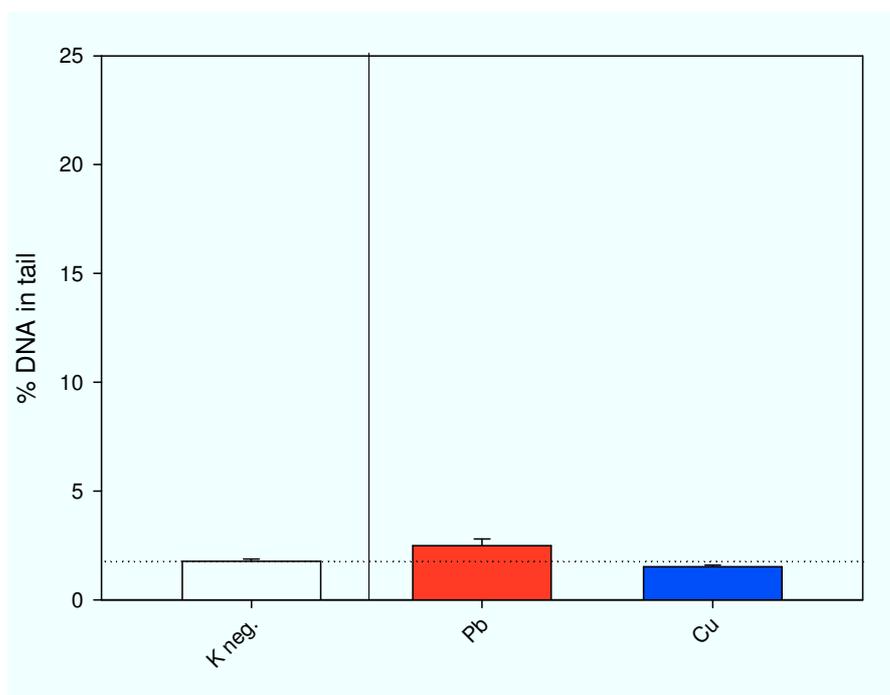


Figura 4.13. Valori medi (\pm e.s.) della percentuale di DNA nella coda di cellule del celoma di *E. veneta* calcolati per il suolo standard OECD contaminato artificialmente con Pb ($226.2 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.) e Cu ($357.0 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.). Il controllo negativo (K neg.) è suolo standard OECD.

genotossica attribuibili al Pb (National Toxicology Program, 2003; García-Lestón et al., 2010). Tale metallo, infatti, sembrerebbe presentare meccanismi di azioni multiple che portano sia a rotture a singolo e doppio filamento del DNA che all'induzione di aberrazioni cromosomiche, danni evidenziati, rispettivamente, dal test della cometa e dal test dei micronuclei (fig. 4.14).

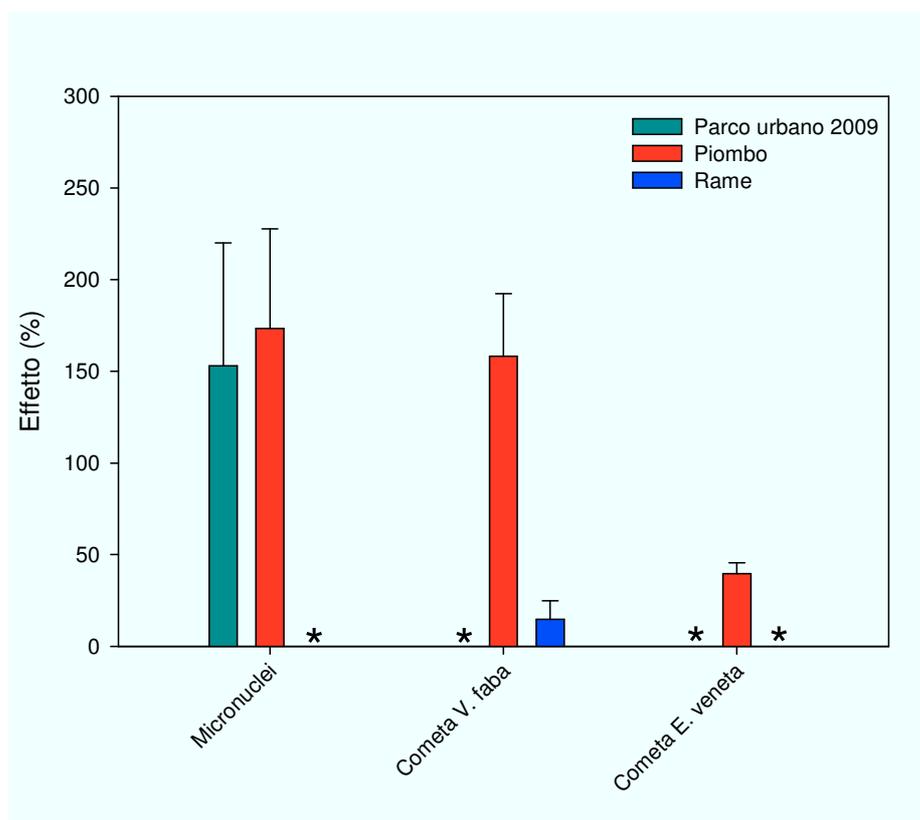


Figura 4.14. Confronto tra le percentuali di effetto medio (\pm err.rel.) rispetto al controllo positivo (suolo OECD) dei test di genotossicità condotti sul suolo del parco urbano campionato nel 2009 e sul suolo standard, OECD, contaminato artificialmente con Pb ($226.2 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.) e Cu ($357.0 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.).

* valori inferiori al controllo.

Il confronto tra l'effetto genotossico ottenuto dai test condotti sul suolo contaminato artificialmente da Pb e Cu e sul suolo del parco urbano campionato nel 2009 (da cui sono state desunte le concentrazioni di questi due metalli per la contaminazione artificiale) evidenzia che solo per il test dei micronuclei l'effetto ottenuto per il suolo contaminato artificialmente da Pb è paragonabile a quello

ottenuto per il suolo urbano (fig. 4.14). Il confronto tra i risultati ottenuti dal test della cometa con *V. faba* evidenzia invece che, nonostante vi sia un effetto elevato per il suolo contaminato artificialmente da Pb, nessun effetto è stato evidenziato per il suolo urbano. Visti i risultati discordanti ottenuti dai due test (micronuclei e cometa con *V. faba*) sembrerebbe che le caratteristiche chimico-fisiche del suolo del parco urbano siano in grado di mitigare i danni associati a rotture a singolo e doppio filamento di DNA ma non quelli associati ad aberrazioni cromosomiche. In una recente ricerca, Shahid et al. (2011) mostrano che la formazione di complessi organometallici del Pb (Pb-EDTA) fa aumentare in maniera dose-dipendente l'assorbimento di questo metallo in radici di *V. faba* rispetto alla forma ionica Pb^{2+} e che la genotossicità, valutata mediante il test dei micronuclei, è significativamente ridotta, suggerendo un ruolo protettivo dell'agente chelante. In alternativa, il Pb presente nel suolo urbano potrebbe essere adsorbito da colloidi organici ed inorganici o formare chelati insolubili con la sostanza organica (Adani et al., 2002) ed essere quindi poco biodisponibile. In un recente studio, Magrisso et al. (2009) indagano i fattori che controllano la biodisponibilità del Pb esaminando gli effetti di cinque principali componenti del suolo: carbonato, sostanza organica, minerali argillosi, quarzo e ossidi di Fe. Essi dimostrano che circa la metà del Pb potenzialmente disponibile (estratto in fase acquosa) viene reso indisponibile ai microrganismi (*Cupriavidus metallidurans*) dalla presenza di carbonato e di quarzo, mentre la kaolinite rende indisponibile circa il 90% del Pb disciolto; essi dimostrano inoltre che gli ossidi di Fe e la sostanza organica, data la loro enorme capacità di assorbimento, sono capaci di legare grandi quantità di Pb fino a renderlo completamente non riscontrabile in soluzione acquosa. Secondo i loro risultati l'1% di sostanza organica presente in un suolo può arrivare a

complessare fino a 200 ppm di Pb. Nel caso in cui il danno da Pb fosse irrilevante, l'elevata frequenza dei micronuclei nel suolo del parco urbano potrebbe dipendere da fattori differenti (es. contaminanti non indagati in questo lavoro) che possono esercitare danni non rilevabili con il test della cometa (es. azione citotossica e formazione di legami crociati).

4.4 Indice di genotossicità (Genotoxicity test Battery integrated Index – GBI)

Nel presente lavoro, al fine di superare una visione estremamente conservativa e poco realistica in base alla quale si debba attribuire al campione un giudizio dettato dal risultato peggiore della batteria di test utilizzata, è stato applicato in via sperimentale, un indice integrato di genotossicità. In un approccio di integrazione di dati per la stima del rischio ecologico e della vulnerabilità biologica Dagnino et al. (2008) calcolano un indice di genotossicità basato sull'applicazione di una batteria di test composta da numerosi biomarker di genotossicità (danno al DNA in *Eisenia andrei* e *Pisum sativum* determinato col test della cometa; indice mitotico, anomalie mitotiche, frequenza di micronuclei, contenuto di DNA). Gli autori confrontano i risultati di tali test con due valori soglia, Th' che rappresenta il valore di soglia minimo e che corrisponde generalmente ad uno scostamento del 20% dal valore del controllo, e Th'' che rappresenta il valore di soglia massimo che è determinato da un gruppo di esperti in materia. Successivamente, gli autori riportano i risultati derivanti dai test su una scala di indice di stress (SI), composta da valori compresi tra 0 e 1, che considera i valori attribuiti a Th' e Th''. In particolare, SI = 0 per i risultati inferiori a Th', SI = 1 per i risultati superiori a Th'' e $0 < SI \leq 1$ per i risultati compresi tra Th' e Th''. Dal valore medio degli SI ricavano infine un valore di indice integrato di genotossicità. L'intervento del

giudizio esperto consiste nell'attribuzione di un valore di soglia massimo per ogni test che rappresenta in maniera sintetica il peso attribuito ad ogni singolo test sulla base di una profonda conoscenza della variabili (es. organismo utilizzato, endpoint indagato, etc.) che lo caratterizzano e dei risultati ottenuti in letteratura dall'applicazione di tale test. Nel calcolo di un indice per la classificazione dei suoli sulla base dei risultati di test ecotossicologici Manzo et al. (2008) invece, attribuiscono pesi differenti non ai test impiegati ma agli endpoint studiati (es. mortalità, riproduzione, etc.) in funzione della loro severità e alle matrici indagate (es. suolo tal quale, estratto acquoso). Partendo da tale approccio, in questo lavoro è stato messo a punto un indice di genotossicità che ha permesso di integrare tutti i risultati ottenuti dai singoli test tenendo conto delle caratteristiche proprie della matrice, della diversa severità degli endpoint indagati e degli organismi utilizzati.

Numerosi studi presenti in letteratura riportano test di genotossicità condotti sugli estratti acquosi e/o organici del suolo (Bagni et al., 2006; Bierkens et al., 1998; Lah et al., 2008) poiché questi presentano semplici procedure di esecuzione e quindi di interpretazione dei risultati. In questo lavoro i test di genotossicità sono stati applicati sulla matrice suolo tal quale poiché questi ultimi saggi rispecchiano la tossicità globale del suolo, mentre, quelli applicati agli estratti acquosi mettono in evidenza solo la tossicità di contaminanti inorganici e microinquinanti idrosolubili, e quelli applicati agli estratti organici evidenziano solo la tossicità dei microinquinanti organici. Pertanto, nel calcolo dell'indice di genotossicità, GBI, alla matrice indagata è stato attribuito un valore pari a 3 ritenendo opportuno assegnare un peso maggiore rispetto a quello che si dovrebbe attribuire invece ai test condotti sugli estratti acquosi (valore = 2) e sugli estratti organici (valore = 1). Nel calcolo del GBI, inoltre, sono stati attribuiti pesi diversi

al test dei micronuclei e della cometa in funzione della tipologia di danno che i test evidenziano. In particolare, il test dei micronuclei stima la presenza di anomalie del materiale genetico che possono essere ereditate e possono portare ad effetti a lungo termine; il test della cometa, invece, valuta le rotture a livello di singolo e doppio filamento che possono essere prontamente corrette dai meccanismi cellulari di riparazione senza conseguenze serie per l'organismo. Pertanto, al test dei micronuclei è stato attribuito un peso doppio (valore = 5) rispetto a quello assegnato ai test della cometa (valori = 2.5 e 2). Al test della cometa sono stati attribuiti due differenti valori a seconda della specie utilizzata: alla specie vegetale è stato attribuito un peso leggermente superiore rispetto a quello assegnato alla specie animale per la maggiore vulnerabilità all'azione dei composti genotossici delle cellule del meristema apicale. Quest'ultime presentano un tasso di suddivisione molto più elevato, mentre le cellule del celoma dei lombrichi sono già differenziate.

Per il prelievo effettuato nel 2009, ad eccezione del suolo dell'area remota, i GBI evidenziano una genotossicità molto alta per tutti i suoli (fig. 4.15). Nell'anno successivo, il suolo dell'area remota mostra assenza di genotossicità, solo il suolo dell'area urbana presenta un GBI ancora molto alto, mentre sia il suolo dell'area extraurbana che quello del parco urbano mostrano una diminuzione del GBI, sebbene i valori restino ancora alti (fig. 4.15).

La tossicità dei siti viene ad essere risolta in tre livelli di rischio genotossico: un livello elevato (rischio molto alto per i due anni di campionamento) per il sito dell'area urbana, un livello medio (rischio molto alto nel 2009 e alto nel 2010) per i siti dell'area extraurbana e del parco urbano, ed un livello basso (rischio non significativo per i due anni di campionamento) per il sito dell'area remota. I livelli

di rischio genotossico dei suoli concordano con quelli dell'indice di genotossicità evidenziando una moderata consistenza (espressione del grado di accordo tra i vari endpoint) tra i risultati dei test genotossici condotti. Infatti, nel caso in cui la consistenza fosse più elevata i livelli di rischio genotossico dovrebbero essere superiori.

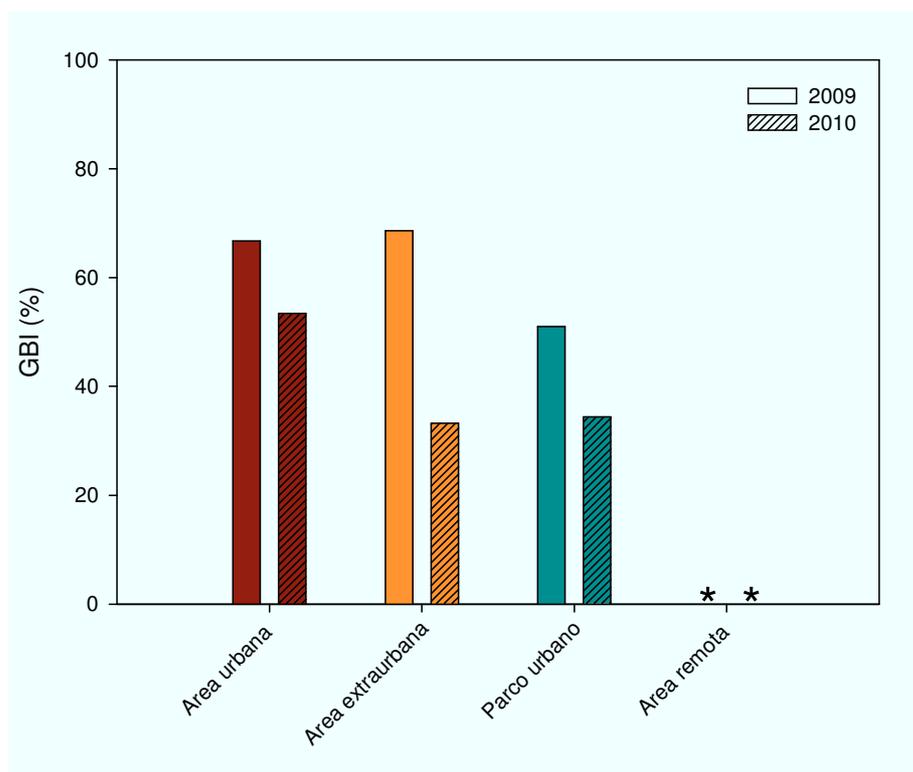


Figura 4.15. Indice della batteria di genotossicità (GBI) calcolato per ogni suolo nei due anni di campionamento.

* valori nulli.

Il rischio genotossico dei suoli non sempre identifica il grado di contaminazione da metalli (fig. 4.16), infatti, il suolo dell'area urbana mostra, per entrambi gli anni, un rischio molto alto e una contaminazione da metalli (Σ metalli = $300 \mu\text{g g}^{-1}$ p.s.) pari a circa la metà di quella misurata nel parco urbano nel 2009 per il quale è stato evidenziato lo stesso livello di rischio. Inoltre, il suolo dell'area extraurbana, che mostra la minore concentrazione di metalli totali per entrambi gli anni di campionamento, presenta un rischio genotossico elevato (molto alto/ alto)

e il suolo dell'area remota presenta, per entrambi gli anni di campionamento, un rischio genotossico non significativo sebbene le concentrazioni totali di metalli siano elevate e paragonabili a quelle degli altri siti (fig. 4.16). Probabilmente, nella valutazione complessiva del rischio genotossico rientrano una serie di fattori che possono esercitare effetti sinergici o antagonisti rispetto a quelli esercitati dalla sola contaminazione da metalli. Tale ipotesi è in accordo con l'assenza di correlazioni tra il rischio genotossico e le concentrazioni totali, le frazioni disponibili dei metalli, e le rispettive sommatorie, così come si era evidenziato per i singoli test della batteria applicata.

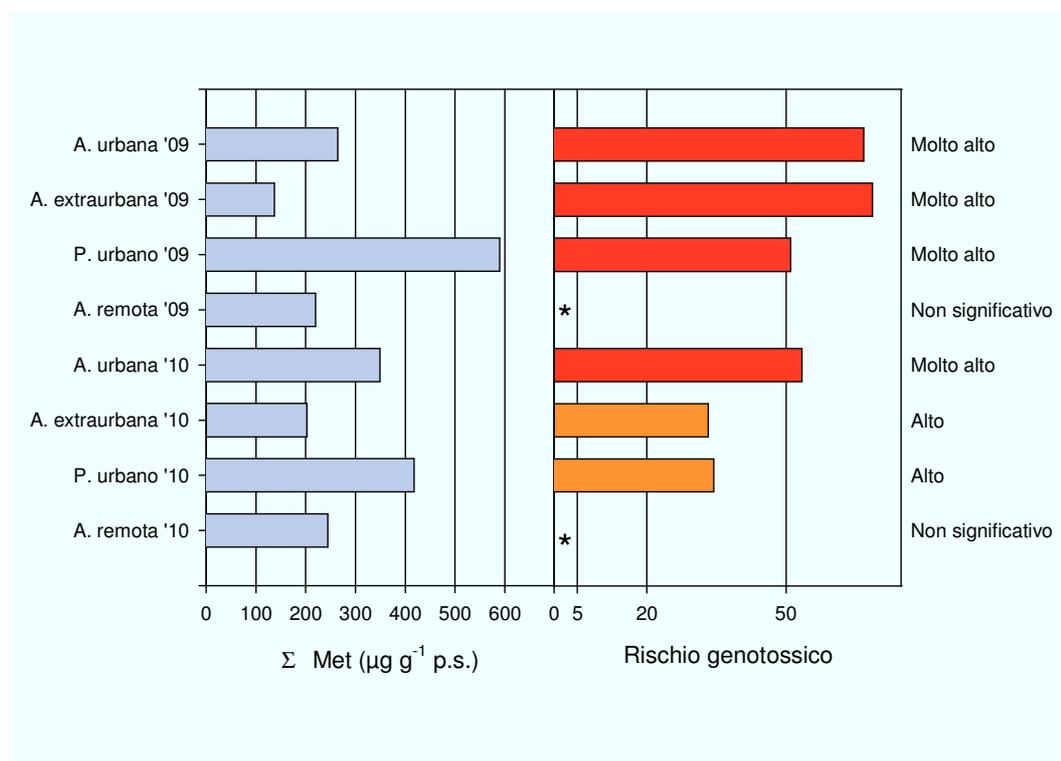


Figura 4.16. Confronto tra le sommatorie del contenuto totale dei metalli indagati ed il rischio genotossico per ogni suolo nei due anni di campionamento.

* valori nulli.

4.5 Risposta dei lombrichi *E. fetida* alla contaminazione da Cu: bioaccumulo e stabilità della membrana lisosomiale

Per stimare un ulteriore effetto a livello sub-cellulare della contaminazione da Cu (metallo scelto tra quelli studiati) sui lombrichi, si è valutata la stabilità della membrana lisosomiale della specie *E. fetida* sia durante un periodo di esposizione a tale metallo sia durante un periodo di purificazione. Il test, condotto su lombrichi esposti a due concentrazioni differenti di Cu (35 e 350 mg kg⁻¹ p.s.), ha evidenziato che i lombrichi accumulano maggiormente quando esposti a maggiori concentrazioni di Cu nel suolo (fig. 4.17). Infatti, la concentrazione interna di Cu, che all'inizio del test è circa 1 mg kg⁻¹ p.s., diviene circa 5 e 18 volte maggiore alla fine del periodo di accumulo nei lombrichi esposti, rispettivamente, a 35 e 350 mg di Cu kg⁻¹ p.s. Tale risultato è in accordo con quanto riportato da Svendsen e Weeks (1997) che riscontrano un bioaccumulo di Cu maggiore in organismi di *E. andrei* esposti a 320 mg Cu kg⁻¹ rispetto a quelli esposti a 40 mg Cu kg⁻¹ (rispettivamente 102 e 40 µg Cu g⁻¹ p.s.).

Inoltre i lombrichi, indipendentemente dalla concentrazione di Cu cui sono stati esposti, raggiungono già dopo 3 giorni uno stato stazionario di concentrazione interna di Cu e, più precisamente, accumulano concentrazioni di 6.5 e 18.7 mg kg⁻¹ p.s., rispettivamente, nei lombrichi esposti a 35 e 350 mg di Cu kg⁻¹ p.s. (fig. 4.17). La dinamica temporale delle concentrazioni interne di Cu indicano che il bioaccumulo avviene molto velocemente; i tassi di accumulo dopo 3 giorni sono 1.8 e 5.9 mg Cu kg⁻¹ p.s. d⁻¹, rispettivamente, per i lombrichi esposti al più basso e più alto regime di esposizione, mentre, nei giorni successivi (dal quarto al quattordicesimo) i tassi di bioaccumulo ed eliminazione risultano simili, raggiungendo quindi lo stato stazionario. Il raggiungimento di uno stato

stazionario nelle concentrazioni interne di Cu dopo pochi giorni di esposizione è riportato anche da Peijnenburg et al. (1999) per *E. andrei*. Il raggiungimento dello stato stazionario nell'accumulo di Cu entro pochi giorni suggerirebbe che i lombrichi hanno una regolazione attiva delle concentrazioni interne di tale metallo probabilmente attraverso efficienti processi di eliminazione.

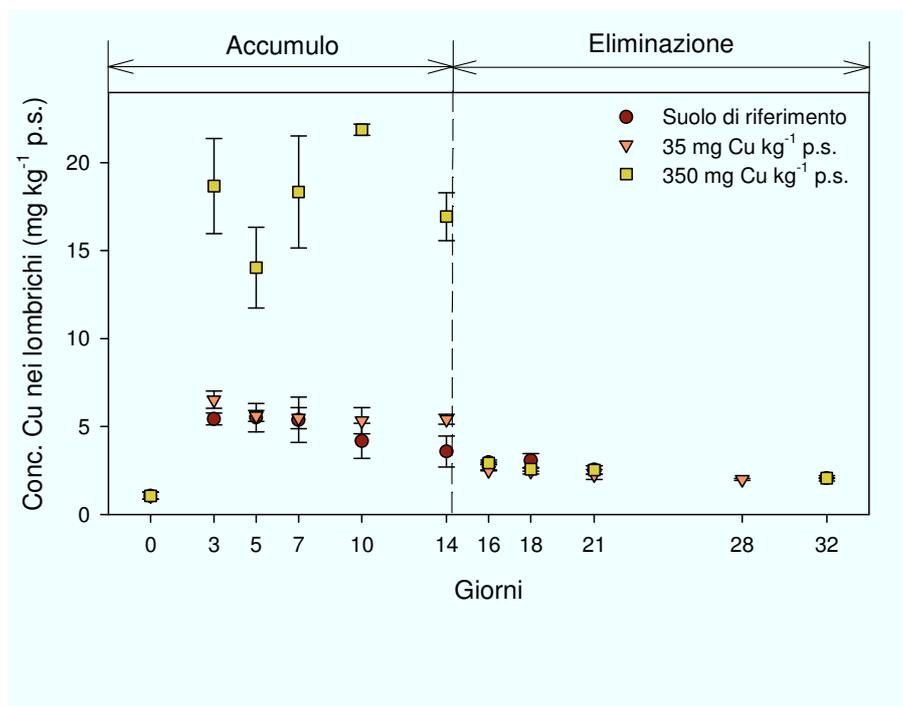


Figura 4.17. Valori medi (\pm e.s.) delle concentrazioni interne di Cu dei lombrichi (*E. fetida*) esposti al suolo di riferimento e ai suoli contaminati artificialmente, 35 e 350 mg Cu kg⁻¹ p.s., durante i periodi di accumulo ed eliminazione.

Dopo il trasferimento nel suolo di riferimento, le concentrazioni interne di Cu diminuiscono rapidamente in soli 2 giorni raggiungendo valori di circa 3 mg kg⁻¹ p.s. senza sostanziali differenze tra i vari gruppi di lombrichi precedentemente esposti a diversi regimi di Cu (fig. 4.17); nei successivi 16 giorni si osserva solo una più contenuta eliminazione di Cu. I tassi di eliminazione dopo i primi due giorni del periodo di depurazione sono 1.4 e 7.0 mg Cu kg⁻¹ p.s. d⁻¹ rispettivamente per i lombrichi precedentemente esposti al più basso e più alto

regime di esposizione e, successivamente, essi decrescono a circa $0.05 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ p.s. d^{-1} alla fine dell'esperimento per entrambi i gruppi di lombrichi. Tassi di eliminazione di Cu così rapidi sono stati trovati per diverse specie di invertebrati (Arnold e Hodson, 2007; Dallinger, 1993; Hopkin, 1989; Spurgeon e Hopkin, 1999). Inoltre, il più alto tasso di eliminazione, riscontrato in questo studio, per i lombrichi esposti al più alto regime di esposizione è supportato da Neuhausen et al. (1995) che, per organismi delle specie *Allolobophora tuberculata* e *Lumbricus rubellus*, riscontrano tassi di escrezione del Cu più rapidi all'aumentare delle concentrazioni di tale metallo nel suolo a cui gli organismi sono stati esposti.

Durante il periodo in cui i lombrichi sono stati esposti al rame (0-14 giorni), le concentrazioni totali di Cu nel suolo rimangono alquanto costanti per entrambi i regimi di esposizione (fig. 4.18); la frazione di Cu biodisponibile nei suoli con la più bassa concentrazione di Cu (35 mg kg^{-1} p.s.) resta costante, mentre, quella nei suoli con la concentrazione di Cu maggiore (350 mg kg^{-1} p.s.) diminuisce con il tempo, in particolare, dopo 5 giorni, passa da 1.9 ad 1.0 mg kg^{-1} p.s., per poi rimanere costante fino alla fine del periodo di accumulo (figg. 4.18, 4.19). Durante il periodo di accumulo, per il regime di esposizione maggiore, le concentrazioni interne di Cu sono negativamente correlate ($P < 0.05$) sia con le concentrazioni totali che biodisponibili di Cu, mentre, per il regime di esposizione minore le concentrazioni interne di Cu risultano inversamente correlate ($P < 0.05$) solo con le concentrazioni totali di Cu. Tali correlazioni suggeriscono che, ad elevate concentrazioni di Cu nel suolo, corrisponde un progressivo bioaccumulo di Cu da cui consegue una diminuzione di questo elemento nel suolo.

I tempi di ritenzione del rosso neutro (NRRT), biomarker della stabilità della membrana lisosomiale, cambiano notevolmente in funzione del grado di

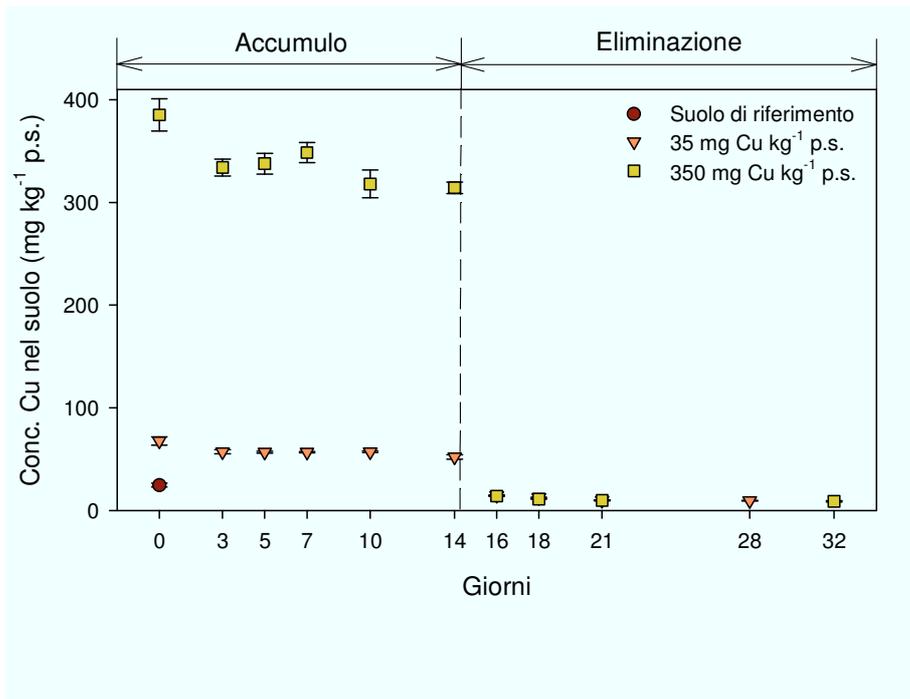


Figura 4.18. Valori medi (\pm e.s.) delle concentrazioni di Cu totale nel suolo di riferimento e nei suoli contaminati artificialmente, 35 e 350 mg Cu kg⁻¹ p.s., durante i periodi di accumulo ed eliminazione.

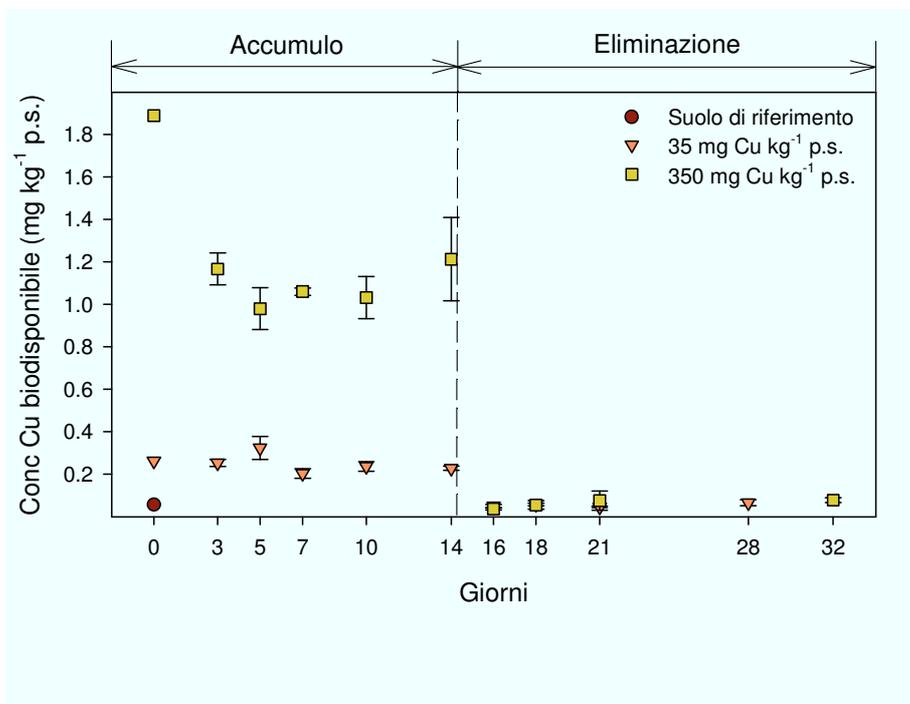


Figura 4.19. Valori medi (\pm e.s.) delle concentrazioni della frazione biodisponibile di Cu nel suolo di riferimento e nei suoli contaminati artificialmente, 35 e 350 mg Cu kg⁻¹ p.s., durante i periodi di accumulo ed eliminazione.

contaminazione da Cu a cui gli organismi sono stati esposti. In particolare, i tempi di ritenzione del rosso neutro negli organismi di *E. fetida* esposti ai suoli contaminati da Cu sono inferiori a quelli nei lombrichi esposti al suolo di riferimento (fig. 4.20). I lombrichi esposti sia al più basso che al più alto regime di esposizione, mostrano, già dopo 3 giorni, una riduzione dei NRRT da circa 50 a 29 e 13 minuti, rispettivamente. Il maggiore danno lisosomiale è stato, pertanto, evidenziato nei lombrichi che, esposti alla maggiore concentrazione di Cu nei suoli, hanno anche accumulato le più alte concentrazioni di Cu. Nei lombrichi esposti a 350 mg kg⁻¹ p.s., a partire dal terzo giorno, si osserva una lineare diminuzione del tempo di ritenzione del colorante con il trascorrere dei giorni raggiungendo il valore di 21 minuti al quattordicesimo giorno, mentre, nei lombrichi esposti a 35 mg kg⁻¹ p.s., dopo il terzo giorno, i tempi di ritenzione del colorante rimangono costanti a circa 13 minuti fino all'ultimo giorno di esposizione (fig. 4.20). Il trend temporale osservato nel periodo di accumulo è simile a quello riportato da Svendsen et al. (2004) che, in un loro lavoro, osservano una diminuzione dei NRRT dopo 12-24 ore di esposizione, paragonabile a quella registrata dopo 28 giorni. Mentre il rapido abbattimento dei NRRT potrebbe essere dovuto ad una risposta tossica dei lombrichi, la stabilità dei NRRT osservata dopo il terzo giorno e fino alla fine dell'esposizione, potrebbe essere attribuibile ad una risposta adattativa degli organismi in seguito ad una esposizione al Cu a lungo termine (Svendsen et al., 2004).

In seguito al trasferimento nel suolo di riferimento, i NRRT nei lombrichi ritornano a valori simili a quelli misurati all'inizio del test dopo 14 e 18 giorni, rispettivamente, per quelli precedentemente esposti a 35 e 350 mg Cu kg⁻¹ p.s. (fig. 4.20). E' importante sottolineare che i tassi di recupero della stabilità della

membrana lisosomiale sono inferiori rispetto a quelli per i quali è stato evidenziato il danno; infatti, il recupero lo si raggiunge solo dopo circa due settimane dal trasferimento nel suolo di riferimento, mentre, la massima instabilità della membrana è evidente già dopo tre giorni di esposizione al Cu. I tempi di recupero della membrana lisosomiale sono più lunghi per i lombrichi che sono stati esposti alle più alte concentrazioni di Cu nei suoli (fig. 4.20).

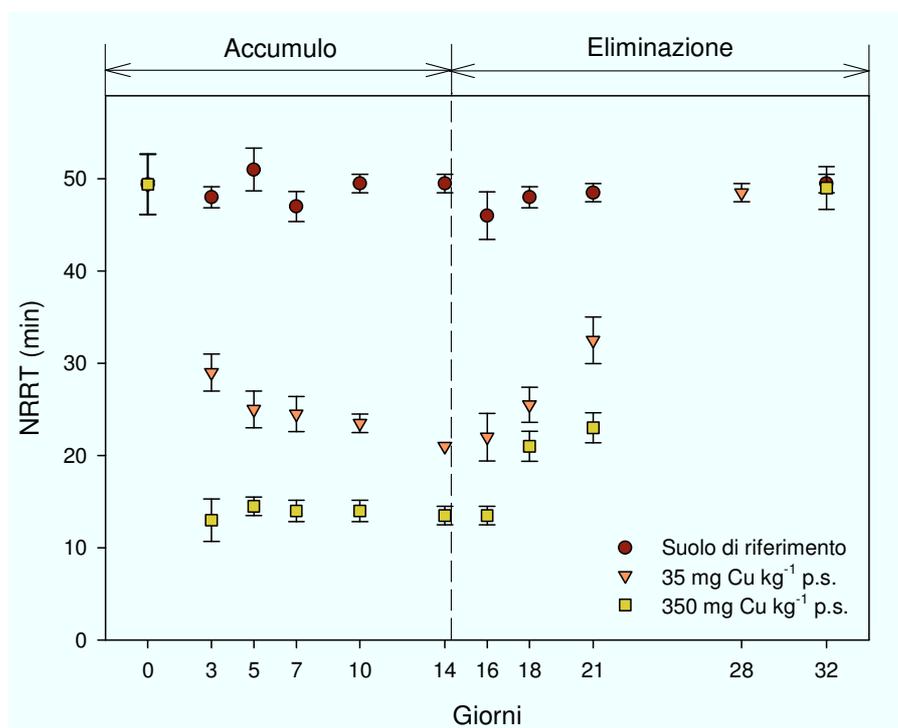


Figura 4.20. Valori medi (\pm e.s.) dei tempi di ritenzione del rosso neutro per i lombrichi (*E. fetida*) esposti al suolo di riferimento e ai suoli contaminati artificialmente, 35 e 350 mg Cu kg⁻¹ p.s., durante i periodi di accumulo ed eliminazione.

Durante il periodo di esposizione, la stabilità della membrana lisosomiale è sensibilmente relazionata al bioaccumulo di Cu: per le concentrazioni interne di Cu comprese nell'intervallo da 3.6 a 6.5 mg kg⁻¹ p.s. i tempi di ritenzione del colorante variano da 51 a 21 minuti mentre, per le concentrazioni interne di Cu da 14 a 21 mg kg⁻¹ p.s. i tempi di ritenzione rimangono costanti a circa 14 minuti (fig. 4.21).

Durante il periodo di eliminazione (fig. 4.21), invece, non è evidente una relazione tra la stabilità della membrana lisosomiale e le concentrazioni interne di Cu; infatti, l'intervallo delle concentrazioni interne di Cu è molto stretto (da 2 a 3 mg kg⁻¹ p.s.) mentre i NRRT sono altamente variabili (da 13.5 a 49.5 min). La detossificazione da Cu sembrerebbe procedere in maniera più veloce del recupero della stabilità della membrana lisosomiale: probabilmente i tempi più lunghi del recupero della membrana lisosomiale sono da attribuire ad una progressiva sostituzione delle cellule danneggiate con nuovi celomociti.

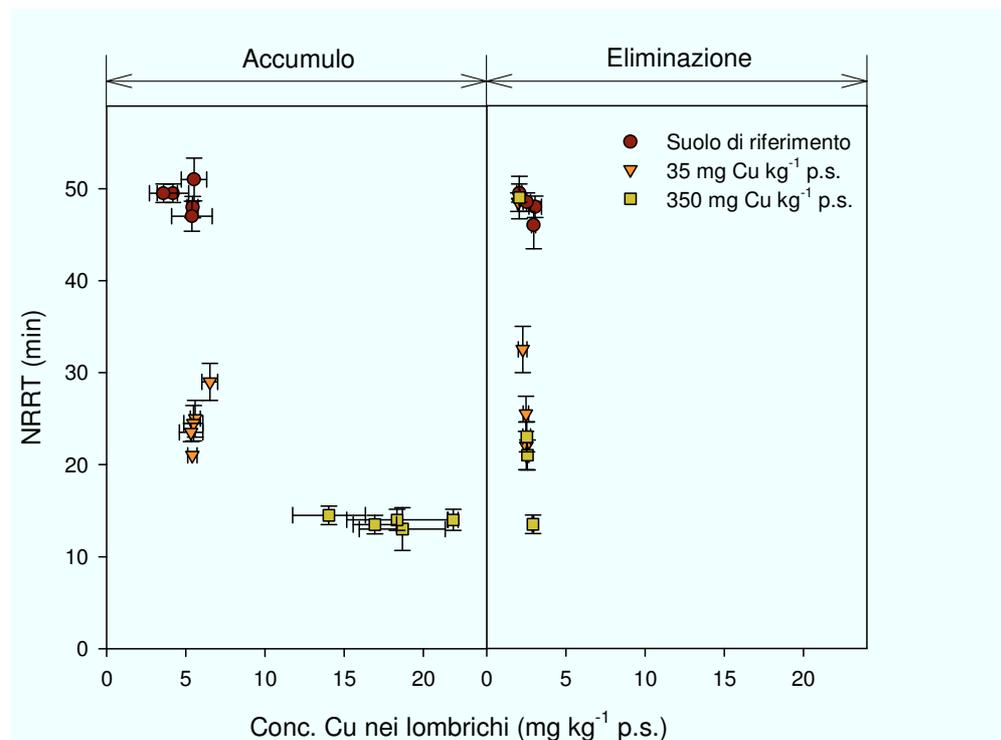


Figura 4.21. Relazione tra i valori medi (\pm e.s.) dei tempi di ritenzione del rosso neutro e le corrispondenti concentrazioni interne di Cu dei lombrichi (*E. fetida*) esposti al suolo di riferimento e ai suoli contaminati artificialmente, 35 e 350 mg Cu kg⁻¹ p.s., durante i periodi di accumulo ed eliminazione.

5. CONCLUSIONI

La batteria di test selezionata si è rivelata uno strumento di facile applicazione e sensibile nell'identificazione della genotossicità dei suoli studiati. In particolare, la genotossicità dei suoli urbani indagati sembrerebbe riconducibile a lesioni permanenti al DNA (elevate frequenze di micronuclei), piuttosto che a danni al DNA eventualmente riparabili (effetti evidenziati dal test della cometa). Tali risultati avvalorano l'esigenza di utilizzare test di genotossicità che valutino differenti endpoint, al fine di stimare, in maniera più realistica, il grado di genotossicità di un campione di suolo.

Gli effetti genotossici osservati non sembrerebbero ascrivibili direttamente e/o esclusivamente alla contaminazione da metalli vista l'assenza di correlazioni significative con le concentrazioni totali e delle frazioni disponibili dei metalli indagati. Piuttosto, sembrerebbe evidente un ruolo mitigatore della sostanza organica sull'azione di composti in grado di provocare rotture a singolo e doppio filamento di DNA, ma non su quella di contaminanti capaci di indurre aberrazioni cromosomiche, come confermato dal confronto dei risultati della batteria di test di genotossicità condotta sul suolo campionato e sul suolo contaminato artificialmente da piombo. I danni associati alle aberrazioni cromosomiche potrebbero essere attribuiti al piombo (così come evidenziato dai risultati del test condotto su suolo artificiale), sebbene non possa essere esclusa l'azione di altri contaminanti.

L'indice della batteria di genotossicità (GBI) può essere ritenuto un valido strumento in quanto ha permesso di integrare in un unico valore i risultati della batteria di test applicati, e di attribuire un giudizio relativo al rischio genotossico di ogni suolo.

Il test della stabilità della membrana lisosomiale può essere considerato un buon biomarker dello stress indotto dalla contaminazione da rame poiché ha evidenziato una diminuzione della stabilità della membrana in lombrichi esposti a suoli contaminati e un conseguente recupero della stessa dopo esposizione ad un suolo incontaminato. Sarebbe, pertanto, auspicabile verificare questo test come biomarker di stress indotto da altri contaminanti.

BIBLIOGRAFIA

- Accordi, B., Lupia Palmieri, E., Parotto, M., 1993. Il globo terrestre e la sua evoluzione. IV edizione. Zanichelli (Ed.), Bologna, pp. 520.
- Adani, F., Tambone, F., Negri, M., Molaschi, G., Genevini, P., Scaglia, B., 2002. I metalli nell'ambiente. Franco Angeli (Ed.), Milano, Italy, pp. 74.
- Alloway, B.J., 1995. Heavy Metals in Soils. Blackie Academic and Professional (Ed.), Glasgow and London, pp. 368.
- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.
- An, Y.-J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environ. Pollut.* 127, 21-26.
- APAT, 2004. Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati: utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici. RTI CTN-TES 1/2004.
- APAT, 2006. L'ecotossicologia negli ambienti acquatici. Rapporto 71/2006.
- Arnold, R.E., Hodson, M.E., 2007. Effect of time and mode of depuration on tissue copper concentrations of the earthworms *Eisenia andrei*, *Lumbricus rubellus* and *Lumbricus terrestris*. *Environ. Pollut.* 148, 21-30.
- Bååth, E., 1989. Effects of heavy metal in soil on microbial processes and populations (a review). *Water Air Soil Poll.* 47, 335-379.
- Bagni, G., Osella, D., Sturchio, E., Mascini, M., 2006. Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies. *Anal. Chim. Acta.* 573-574, 81-89.

- Bierkens, J., Klein, G., Corbisier, P., Van Den, H.E.U.V., Verschaeve, L., Weltens, R., Schoeters, G., 1998. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*. 37, 2935-2947.
- Bilban, M., 2004. Mutagenic testing of workers exposed to toluene-diisocyanates during plastics production process. *Am. J. Ind. Med.* 45, 468-474.
- Bombardier, M., Bermingham, N., 1999. The SED-TOX index: Toxicity-directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard-concept and application. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 685-698.
- Bonassi, S., Lando, C., Ceppi, M., Landi, S., Rossi, A.M., Barale, R., 2004. No association between increased levels of high-frequency sister chromatid exchange cells (HFCs) and the risk of cancer in healthy individuals. *Environ. Mol. Mutagen.* 43, 134-136.
- Bruins, M.R., Kapil, S., Oehme, F.W., 2000. Microbial resistance to metals in environment. *Ecotox. Environ. Safe.* 45, 198-207.
- Bullini, L., Pignatti, S., Virzo De Santo, A., 1998. *Ecologia generale*. UTET (Ed.), Torino, pp. 519.
- Butler, G.C., 1978. *Principles of Ecotoxicology*, SCOPE 12. Wiley and Sons (Ed.), Chichester, England, pp. 350.
- Cabrera, G.L., Rodriguez, D.M., Maruri, A.B., 1999. Genotoxicity of the extracts from the compost of the organic and the total municipal garbage using three plant bioassays. *Mutat. Res.* 426, 201-206.
- Cajaraville, M.P., Bebianno, M.J., Blasco, J., Porte, C., Sarasquete, C., Viarengo, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.* 247, 295-311.

- Calisi, A., Lionetto, M.G., Schettino, T., 2009. Pollutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida*. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1369-1377.
- Casabé, N., Piola, L., Fuchs, J., Oneto, M.L., Pamparato, L., Basack, S., Giménez, R., Massaro, R., Papa, J.C., Kesten, E., 2007. Ecotoxicological Assessment of the Effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine Soya Field. *J. Soils Sediments.* 7, 232-239.
- Cenci, R.M., Dabergami, D., Beccaloni, E., Ziemacki, G., Benedetti, A., Pompili, L., Mellina, A.S., Bianchi, M., 2008. Bioindicatori per valutare la qualità dei suoli di alcuni parchi della città di Roma. EUR 23567 IT ISSN 1018-5593 ISBN: 978-92-79-10648-4.
- Chung, M.K., Hu, R., Wong, M.H., Cheung, K.C., 2007. Comparative toxicity of hydrophobic contaminants to microalgae and higher plants. *Ecotoxicology.* 16, 393-402.
- Coineau, Y., 1974. Introduction a l'étude des microarthropodes du sol et de ses annexes. Documents pour l'enseignement pratique de l'écologie. Doin (Ed.), Paris, pp. 118.
- Commissione Delle Comunità Europee, 2006. Strategia tematica per la protezione del suolo. Comunicazione della Commissione al Consiglio, al Parlamento Europeo, al Comitato Economico e Sociale Europeo e al Comitato delle Regioni. Bruxelles, 22.9.2006 - COM(2006)231.
- Costan, G., Bermingham, N., Blaise, C., Férard, J.F., 1993. Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Environ. Toxic. Water.* 8, 115-140.

- Cotelle, S., Férard, J.F., 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environ. Mol. Mutagen.* 34, 246-255.
- Crebelli, R., Conti, L., Monarca, S., Feretti, D., Zerbini, I., Zani, C., Veschetti, E., Cutilli, D., Ottaviani, M., 2005. Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid- or hypochlorite-disinfected sewage wastewater. *Water Res.* 39, 1105-1113.
- Crouau, Y., Pinelli, E., 2008. Comparative ecotoxicity of three polluted industrial soils for the Collembola *Folsomia candida*. *Ecotox. Environ. Safe.* 71, 643-649.
- Dagnino, A., Sforzini, S., Dondero, F., Fenoglio, S., Bona, E., Jensen, J., Viarengo, A., 2008. A “Weight-of-Evidence” Approach for the Integration of Environmental “Triad” Data to Assess Ecological Risk and Biological Vulnerability. *Integrated Environ. Assess. Manag.* 4, 314-326.
- Dallinger, R., 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Dallinger, R., Rainbow P.S. (Eds.), *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*, Lewis Publishers, Chelsea, pp. 245-289.
- Della Croce, N., Cattaneo Vietti, R., Danovaro, R. 1997. *Ecologia e protezione dell’ambiente marino costiero*. UTET (Ed.), Torino, pp.243.
- Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D., 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell. Biol. Toxicol.* 25, 5-32.
- Di Lorenzo, A., Di Gennaro, A., 2008. Una Campagna per il futuro. La strategia per lo sviluppo dello spazio rurale nel Piano Territoriale della Campania. CLEAN (Ed.), Napoli, pp. 168.
- Domouhtsidou, G. P., Dimitriadis, V. K., 2000. Ultrastructural Localization of Heavy Metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in Gills and Digestive Gland of Mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 472-478.

- El Hajjouji, H., Pinelli, E., Guiresse, M., Merlina, G., Revel, J.-C., Hafidi, M., 2007. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.* 634, 25-31.
- Eyambe, G.S., Goven, A.J., Fitzpatrick, L.C., Venables, B.J., Cooper, E.L., 1991. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. *Lab. Anim.* 25, 61-67.
- FAO, 1998. World Reference Base for Soil Resources. ISBN 92-5-104141-5. FAO, ISRIC & ISSS, Rome.
- Feng, S., Wang, X., Wei, G., Peng, P., Yang, Y., Cao, Z., 2007. Leachates of municipal solid waste incineration bottom ash from Macao: Heavy metal concentrations and genotoxicity. *Chemosphere.* 67, 1133-1137.
- Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, B.H., Resnick, M.A., Anderson, B., Zeiger, E., 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* 10, 1-175.
- García-Lestón, J., Méndez, J., Pásaro, E., Laffon, B., 2010. Genotoxic effects of lead: An updated review. *Environ. Int.* 36,623-636.
- Gedik, C.M., Ewen, S.W.B., Collins, A.R., 1992. Single cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *It. J. Radiat. Biol.* 62, 313-320.
- Gichner, T., Velemínsky, J., 1999. Monitoring the genotoxicity of soil extracts from two heavily polluted sites in Prague using the *Tradescantia* stamen hair and micronucleus (MNC) assays. *Mutat. Res.* 426, 163-166.

- Gichner, T., Ptáček, O., Stavreva, D.A., Wagner, E.D., Plewa, M.J., 2000. A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mutat. Res.* 470, 1-9.
- Giller, K.E., Beare, M.H., Lavalle, P., Izac, A.M.N, Swift, M.J., 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* 6, 3-16.
- Grant, W.F., 1982. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 99, 273-291.
- Griest, W.H., Stewart, A.J., Tyndall, R.L., Caton, J.E., Ho, C.H., Ironside, K.S., Caldwell, W.M., Tan, E., 1993. Chemical and toxicological testing of composted explosives-contaminated soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1105-1116.
- Haeseler, F., Blanchet, D., Druelle, V., Werner, P., Vandecasteele, J.-P., 1999. Ecotoxicological assessment of soils of former manufactured gas plant sites: bioremediation potential and pollutant mobility. *Environ. Sci. Technol.* 33, 4379-4384.
- Hagmar, L., Stromberg, U., Tinnerberg, H., Mikoczy, Z., 2004. Epidemiological evaluation of cytogenetic biomarkers as potential surrogate end-points for cancer. *IARC Sci. Publ.* 157, 207-215.
- Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadžianas, L., Aoyama, I., Jedidi, N., 2007. Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. *Chemosphere.* 70, 135-143.
- Hartmann, A., Elhajouji, A., Kiskinis, E., Poetter, F., Martus, H.-J. Fjällman, A., Frieauff, W., Suter, W., 2001. Use of the alkaline comet assay for industrial

- genotoxicity screening: Comparative investigation with the micronucleus test. *Food Chem. Toxicol.* 39, 843-858.
- Hoffman, G.R., 1996. Genetic toxicology. In: Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. Klaassen, C.D. (Ed.), McGraw-Hill, New York, pp. 269-300.
- Hopkin, S.P., 1989. *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*, Elsevier Applied Science, London, UK, pp. 366.
- Hubálek, T., Vosáhlová, S., Matejů, V., Kováčová, N., Novotný, C., 2007. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: A case study. *Arch. Environ. Con. Tox.* 52, 1-7.
- Imperato, M., Adamo, P., Naimo, D., Arienzo, M., Stanzione, D., Violante, P., 2003. Spatial distribution of heavy metals in urban soils of Naples city (Italy). *Environ. Pollut.* 124, 247-256.
- Irha, N., Steinnes, E., Kirso, U., Petersell, V., 2009. Mobility of Cd, Pb, Cu, and Cr in some Estonian soil types. *Est. J. Earth Sci.* 58, 209-214.
- Kanaya, N., Gill, B.S., Grover, I.S., Murin, A., Osiecka, R., Sandhu, S.S., Andersson, H.C., 1994. *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutat. Res.* 310, 231-247.
- Kassie, F., Parzefal, W., Knasmüller, S., 2000. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.* 463, 13-31.
- Keogh, R.G., Whitehead, P.H., 1975. Observations on some effects of pasture spraying with benomyl and carbendazim on earthworm activity and litter removal from pasture. *New Zeal. J. Exp. Agr.* 3, 103-104.
- Koppen, G., Verschaeve, L., 1996. The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutat. Res.* 360, 193-200.

- Kurelec, B., 1993. The Genotoxic Disease Syndrome. *Mar. Environ. Res.* 35, 341-348.
- Lah, B., Vidic, T., Glasencnik, E. Cepeljnik, T. Gorjanc, G., Marinsek-Logar, R., 2008. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay. *Environ. Monit. Assess.* 139, 107-118.
- Leitgib, L., Kálmán, J., Gruiz, K., 2007. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere.* 66, 428-434.
- Ma, T.H., 1982. *Vicia* cytogenetic tests for environmental mutagens. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 99, 257-271.
- Ma, T.H., Cabrera, G.L., Cebulska-Wasilewska, A., Chen, R., Loarca, F., Vandenberg, A.L., Salamone, M.F., 1994a. *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutat. Res.* 310, 211-220.
- Ma, T.H., Cabrera, G.L., Chen, R., Gill, B.S., Sandhu, S.S., Vandenberg, A.L., Salamone, M.F., 1994b. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutat. Res.* 310, 221-230.
- Madrid, L., Díaz-Barrientos, E., Madrid, F., 2002. Distribution of heavy metal content of urban soils in parks of Seville. *Chemosphere.* 49, 1301-1308.
- Maffiotti, A., Bona, F., Volterra, L., 1997. Introduzione all'ecotossicologia. Analisi e recupero dei sedimenti marini. *Quaderni di Tecniche di Protezione Ambientale.* Pitagora (Ed.), Bologna, pp. 139.
- Magrisso, S., Belkin, S., Erel, Y., 2009. Lead Bioavailability in Soil and Soil Components. *Water Air Soil Pollut.* 202, 315-323.

- Maltby, L., Naylor, C., 1990. Preliminary Observations on the Ecological Relevance of the *Gammarus* 'Scope for Growth' Assay: Effect of Zinc on Reproduction. *Funct. Ecol.* 4, 393-397.
- Majer, B.J., Laky, B., Knasmüller, S., Kassie, F., 2001. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat. Res.* 489, 147-172.
- Majer, B.J., Tscherko, D., Paschke, A., Wennrich, R., Kundi, M., Kandeler, E., Knasmüller, S., 2002. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: A comparative investigation. *Mutat. Res.* 515, 111-124.
- Manzo, S., De Nicola, F., De Luca Picione, F., Maisto, G., Alfani, A., 2008. Assessment of the effects of soil PAH accumulation by a battery of ecotoxicological tests. *Chemosphere.* 71, 1937-1944.
- Marcato-Romain, C.E., Guisresse, M., Cecchi, M., Cotelle, S., Pinelli, E., 2009a. New direct contact approach to evaluate soil genotoxicity using the *Vicia faba* micronucleus test. *Chemosphere.* 77, 345-350.
- Marcato-Romain, C.E., Pinelli, E., Pourrut, B., Silvestre, J., Guisresse, M., 2009b. Assessment of the genotoxicity of Cu and Zn in raw and anaerobically digested slurry with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.* 672, 113-118.
- Matthey, W., Della Santa, E., Wannemacher, C., 1987. Guida pratica all'ecologia. Zanichelli, Bologna, pp. 230.
- Mergeay, M., 2000. Bacteria adapted to industrial biotopes: metal-resistant *Ralstonia*. In: *Bacterial Stress Responses*. Storz, G., Hengge-Aronis, R. (Ed.), American Society for Microbiology, Washington, DC, pp.403-414.

- Merk, O., Speit, G., 1999. Detection of crosslinks with the Comet assay in relationship to genotoxicity and citotoxicity. *Environ. Mol. Mutagen.* 33, 167-172.
- Mielke, H.W., Wang, G., Gonzales, C.R., Le, B., Quach, V.N., Mielke, P.W., 2001. PAH and metal mixtures in New Orleans soils and sediments. *Sci. Total Environ.* 281, 217-227.
- Minissi, S., Caccese, D., Passafiume, F., Grella, A., Eleonora, C., and Rizzoni, M., 1998. Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. *Mutat. Res.* 420, 77-84.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environ. Pollut.* 145, 402-424.
- Nappi, P., 2000. L'utilizzo di indicatori biologici ed ecotossicologici per valutare la qualità del suolo: stato dell'arte. Seminario internazionale: Indicatori biologici ed ecotossicologici applicati al suolo e ai siti contaminati. Torino 19 maggio 2000.
- National Toxicology Program, 2003. Report on carcinogens: back ground document for lead and lead compounds. Department of Health and Human Services, Research Triangle Park, NC.
- Neuhauser, E.F., Cukic, Z.V., Malecki, M.R., Loehr, R.C., Durkin, P.R., 1995. Bioconcentration and biokinetics of heavy metals in the earthworm. *Environ. Pollut.* 89, 292-301.
- Norppa, H., 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol. Lett.* 149, 309-334.

- Nortcliff, S., 2002. Standardisation of soil quality attributes. *Agr. Ecosyst. Environ.* 88, 161-168.
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T., Shinagawa, H., 1985. Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat. Res.* 147, 219-229.
- OECD, 1984. Terrestrial plants: growth test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 208, Paris, France.
- OECD, 2004. Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals 222, Paris, France.
- Pedersen, M.B., Axelsen, J.A., Strandberg, B., Jensen, J., Attrill, M.J., 1999. The impact of a copper gradient on a microarthropod field community. *Ecotoxicology.* 8, 467-483.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Baerselman, R., De Groot, A.C., Jager, T., Posthuma, L., Van Veen, R.P.M., 1999. Relating environmental availability to bioavailability: soil-type-dependent metal accumulation in the oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotox. Environ. Safe.* 44, 294-310.
- Pepper, I.L., Gerba, C.P., Newby, D.T., Rice, C.W., 2009. Soil: a public health threat or savior? *Crit. Rev. Environ. Control.* 39, 416-432.
- Phillips, B.M., Hunt, J.W., Anderson, B.S., Puckett, H.M., Fairey, R., Wilson, C.J., Tjeerdema, R., 2001. Statistical significance of sediment toxicity test results: threshold values derived by the detectable significance approach. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 371-373.
- Plewa, M.J., 1985. Genetic assays of maize for environmental pollution control. In: *Mutagenicity Testing in Environmental Pollution Control.* Zimmermann, F., Taylor-Mayer, R. (Ed.), Ellis Horwood, Chichester, UK, pp. 147-165.

- Quillardet, P., Hofnung, M., 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins, procedures. *Mutat. Res.* 147, 65-78.
- Quillardet, P., Hofnung, M., 1993. The SOS chromotest: a review. *Mutat. Res.* 297, 235-279.
- Ramakrishnaiah, H., Somashekar, R.K., 2002. Heavy metal contamination in roadside soil and their mobility in relations to pH and organic carbon. *Soil Sediment Contam.* 11, 643-654.
- Randerath, K., Reddy, M.V., Gupta, R.C., 1981. ³²P-labeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 78, 6126-6129.
- Roh, J.-Y., Sim, S.J., Yi, J., Park, K., Chung, K.H., Ryu, D.-Y., Choi, J., 2009. Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on the Soil Nematode *Caenorhabditis elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3933-3940.
- Rossmann, T.G., Molina, M., Meyer, L.W., 1984. The genetic toxicology of metal compounds. I. Induction of lambda prophage in *E. coli* WP2s(lambda). *Environ. Mutagen.* 6, 59-69.
- Salvagio Manta, D., Angelone, M., Bellanca, A., Neri, R., Sprovieri, M., 2002. Heavy metals in urban soils: a case study from the city of Palermo (Sicily), Italy. *Sci. Total Environ.* 300, 229-243.
- Sanchez-Hernandez, J.C., 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 188, 85-126.
- Scott-Fordsmand, J.J., Weeks, J.M., Hopkin, S.P., 1998. Toxicity of nickel to the earthworm and the applicability of the neutral red retention assay. *Ecotoxicology.* 7, 291-295.
- Sequi, P., 1989. *Chimica del suolo*. Pàtron (Ed.), Bologna, pp. 608.

- Seth, C.S., Misra, V., Chauhan, L.K.S., Singh, R.R., 2008. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotox. Environ. Safe.* 71, 711-716.
- Shahid, M., Pinelli, E., Pourrut, B., Silvestre, J., Dumat, C., 2011. Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotox. Environ. Safe.* 74, 78-84.
- Shugart, L.R., 1995. Environmental genotoxicology. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Rand, G.M. (Ed.), Taylor & Francis, Washington, DC, pp. 405-420.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175, 184-191.
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1999. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Appl. Soil Ecol.* 11, 227-243.
- Steinkellner, H., Mun-Sik, K., Helma, C., Ecker, S., Ma, T-H., Horak, O., Kundi, M., Knasmüller, S., 1998. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutagen.* 31, 183-191.
- Stigliani, W.M., Jaffe, P.R., 1993. Industrial metabolism and river basin studies: A new approach for the analysis of chemical pollution. Report RR-93-6. International Institution for Applied System Analysis, Laxenburg, Austria.
- Stronkhorst, J., Schot, M.E., Dubbeldam, M.C., Ho, K.T., 2003. A toxicity identification evaluation of silty marine harbor sediments to characterize persistent and non-persistent constituents. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 56-64.

- Swift, M.J., Heal, O.W., Anderson, J.M., 1979. Decomposition in Terrestrial Ecosystems. Blackwell University of California Press, Berkeley, CA, pp. 372.
- Svendsen, C., Spurgeon, D.J., Hankard, P.K., Weeks, J.M., 2004. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotox. Environ. Safe.* 57, 20-29.
- Svendsen, C., Weeks, J.M., 1997. Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. I. Links to ecological effects in a laboratory study with *Eisenia andrei*. *Ecotox. Environ. Safe.* 36, 72-79.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F., 2000. The single cell gel /comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
- Van Gestel, C.A.M., Léon, C.D., van Straalen, N.M., 1997. Evaluation of soil fauna toxicity tests regarding their use in risk assessment. In: *Soil Ecotoxicology*. Tarradellas, J., Bitton, G., Rossel, D. (Ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 291-317.
- Van Goethem, F., Lison, D., Kirsch-Volders, M., 1997. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat. Res.* 392, 31-43.
- Verschaeve, L.; Gilles, J., 1995. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54, 112-119.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Fabbri, E., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-

- induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Phys. C.* 146, 281-300.
- Vindimian, E., Garric, J., Flammarion, P., Thybaud, E., Babut, M., 1999. An index of effluent aquatic toxicity designed by partial least squares regression, using acute and chronic tests and expert judgements. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2386-2391.
- Weeks, J.M., Svendsen, C., 1996. Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: a simple biomarker of exposure to soil copper. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1801-1805.
- White, P., Claxton, L.D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat. Res.* 567, 227-345.
- Wright, D.A., Welbourn, P., 2002. *Environmental Toxicology*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 630.
- Wu, L., Vomocil, J.A., Childs, S.W., 1990. Pore-size, particle-size, aggregate size, and water-retention. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54, 952-956.
- Xiao, R.-Y., Wang, Z., Wang, C.-X., Yu, G., Zhu, Y.-G., 2006. Genotoxic Risk Identification of Soil Contamination at a Major Industrialized City in Northeast China by a Combination of in Vitro and in Vivo Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6170-6175.
- Zang, Y., Zhong, Y., Luo, Y., Kong, Z.M., 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.* 108, 271-278.

RINGRAZIAMENTI

L'attività sperimentale, per ottenere i risultati riportati in questa ricerca, è stata svolta principalmente presso i laboratori del Centro Ricerche ENEA di Portici, ed in parte presso il dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale dell'Università Federico II di Napoli. La realizzazione di questo studio è stata possibile anche grazie alla collaborazione con il National Environment Research Institute (Silkeborg, Danimarca). Si ringrazia tutti per la gentile ospitalità.