

**PROGETTO: ANALISI DELLA FRAGILITA' GENETICA  
INDOTTA DA CONTAMINANTI AMBIENTALI**

**RESPONSABILI: PROF. NELSON MARMIROLI  
DOTT.SSA C.CONTE**

Dati relativi al monitoraggio di siti localizzati entro l'area dell'Azienda A.M.N.U.

Ott. Nov. Dic.1996

## INTRODUZIONE

Una delle principali cause di rischio ambientale è la presenza di vari agenti inquinanti che determinano effetti tossici e mutageni (genotossici) su tutti gli organismi viventi.

E' necessario quindi mettere a punto dei sistemi affidabili per rilevare la presenza e gli effetti conseguenti di questi inquinanti. Benché la scoperta e la valutazione della loro presenza possa essere stabilita anche con metodi chimici e fisici, l'analisi dei loro effetti sugli organismi viventi può essere solo direttamente determinata con sistemi biologici: i "bio-indicatori" o "bio-sensori" del danno biologico prodotto dagli inquinanti.

Per valutare gli effetti genotossici dovuti all'accumulo di metalli pesanti nell'ambiente e per stimare il rischio ambientale connesso al futuro informazionale dell'organismo è stato utilizzato il sistema delle "impronte" molecolari basato sull'uso della PCR. Per gli esperimenti descritti in questo lavoro è stato utilizzato il vegetale superiore *Arabidopsis thaliana*.

## ESPERIMENTI

Il modello sperimentale è stato trasferito dalle prove in laboratorio, dove il contaminante è stato fornito in modo puntuale, a prove *in situ* in località scelte dall'Azienda per le caratteristiche di rischio che esse rappresentano dove il contaminante è presente in forma estemporanea.

A questo proposito sono stati scelti tre siti da monitorare presso l'A.M.N.U.:

- SITO A: tra le palazzine degli uffici tecnici
- SITO B: nei pressi dello stradello che dal parcheggio delle macchine porta al ponticello
- SITO C: sull'argine dietro al camino al riparo dal caricamento della polvere.

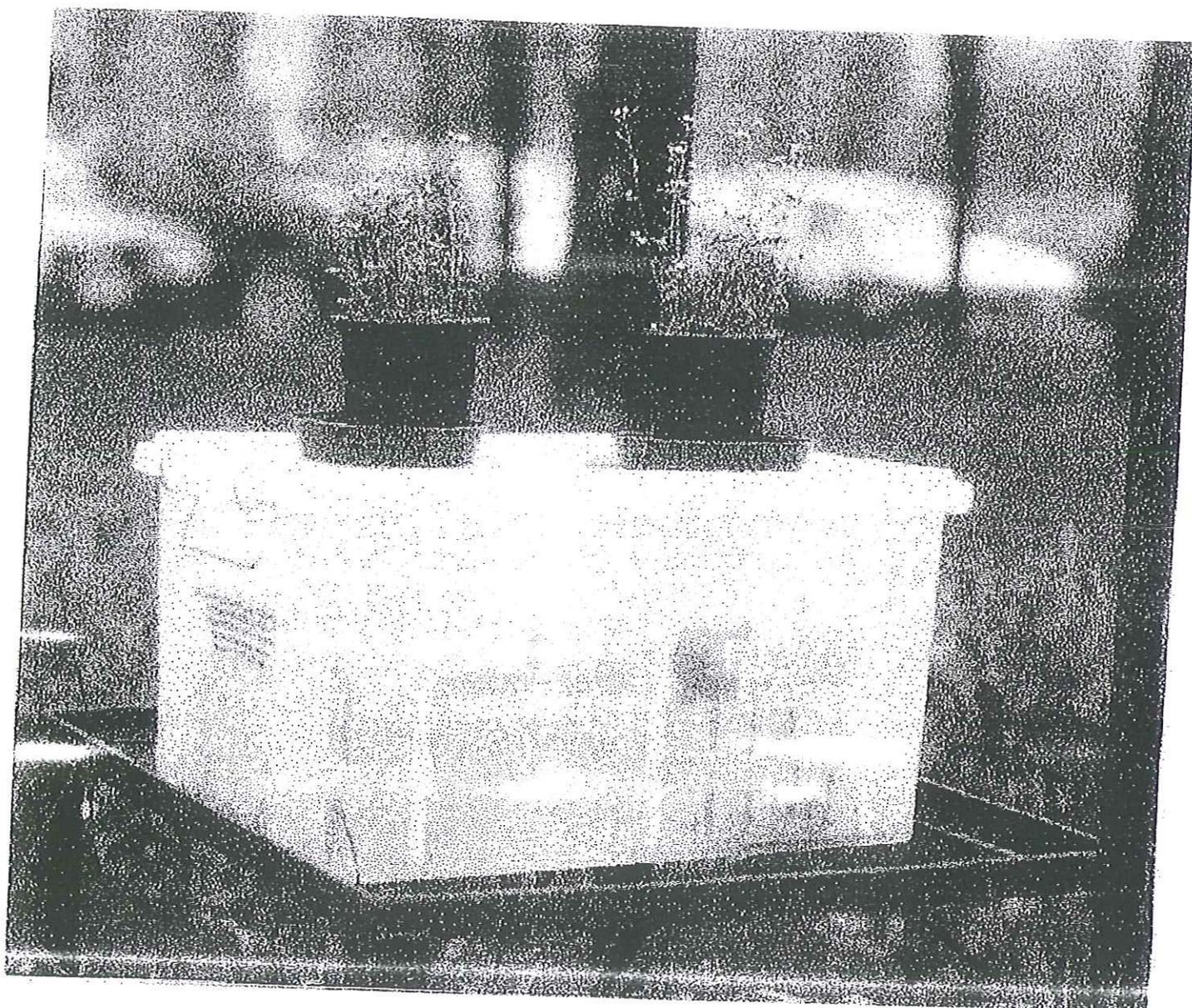
In questi tre siti sono state posizionate tre celle di crescita (Fig.1) contenenti ciascuna sei vasetti nei quali sono state fatte crescere piantine di *A.thaliana* esposte in tempi diversi in un periodo compreso tra 0 e 4 settimane dal 23-10 al 20-11-1996.

I risultati sono mostrati in Tabella 2 e rappresentati nella Figura 3.

In contemporanea è stata fatta una valutazione quantitativa del contenuto di metalli pesanti mediante Assorbimento Atomico su campioni di materiale depositato nelle quattro settimane sulle tettoie le cui dimensioni sono di ca. 80 cm<sup>2</sup> poste a protezione del sistema di monitoraggio e sui filtri posizionati sulle coperture delle celle di crescita.(Tabella 1)

Inoltre sono stati prelevati campioni di essenze vegetali spontanee (*Trifolium arvensis*, *Plantago lanceolata* e *Taraxacum officinale*) di cui sono note le capacità di fito-accumulo, nelle vicinanze dei siti di monitoraggio ed anche in questi è stato valutato l'accumulo di metalli pesanti sempre mediante metodi di Assorbimento Atomico.(Tabella 1)

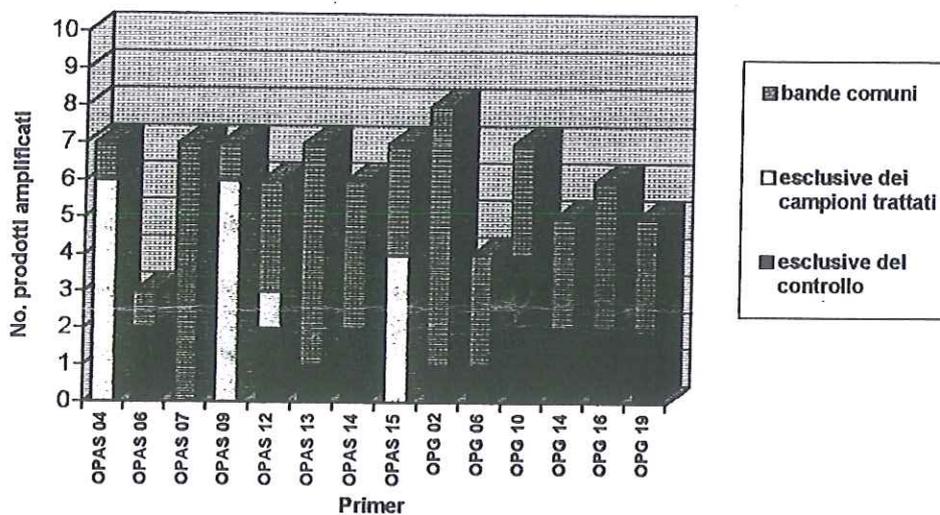
**FIGURA 1: Dispositivo a biosensori .Nel materiale vegetale usato per il monitoraggio sono impiegate conoscenze scientifiche e tecnologiche d'avanguardia .**



## TARATURA DEL SISTEMA DI MONITORAGGIO

Il sistema di monitoraggio è stato tarato in laboratorio per quello che riguarda gli effetti dei metalli pesanti come mostrato nella FIG. 2

**FIGURA 2: Prodotti di amplificazione ottenuti con diversi primer in campioni trattati con Cadmio. Sono ben visibili le differenze di polimorfismi ottenuti nelle due situazioni con prevalenza nel caso delle piante trattate e pure della capacità del metodo di percepire agenti dannosi alla salute del genoma.**



**TABELLA 1: ANALISI QUANTITATIVA**

Campioni	Siti di esposizione	Cd (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)
<i>Plantago lanceolata</i>	AMNU	1.75	18.75
<i>Trifolium arvensis</i>	AMNU	2.125	18.75
<i>Taraxacum officinale</i>	AMNU	2.25	21
<i>Plantago lanceolata</i>	Controllo	1.25	3.75
<i>Trifolium arvensis</i>	Controllo	1.25	5
<i>Taraxacum officinale</i>	Controllo	1.25	5
Filtro A	Sito A	1.25	26.6
Filtro B	Sito B	1.25	22.5
Filtro C	Sito C	1.5	46.5
Tettoia A	Sito A	1.75	62
Tettoia B	Sito B	1.5	200
Tettoia C	Sito C	1.9	79.5

**legenda:** I valori sono espressi in mg di ione per Kg di sostanza secca. I campioni di controllo sono stati prelevati in una zona collinare sufficientemente distante da fonti di inquinamento da metalli pesanti.

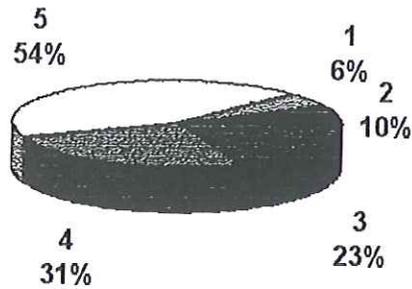
**TABELLA 2: ANALISI QUALITATIVA**

Periodo di esposizione	N° di primer utilizzati	N° polimorfismi individuati (media dei diversi siti analizzati)	% di polimorfismi rispetto al controllo (media dei diversi siti analizzati)
1	14	5	6
2	14	8	10
3	14	17	23
4	14	23	31
5	14	39	54

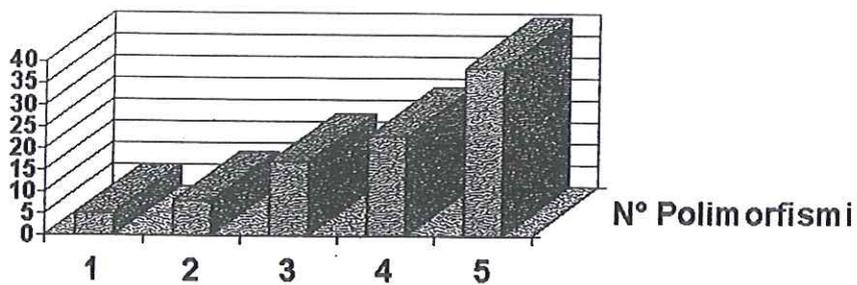
**Legenda:** 1= Campioni esposti durante la prima settimana di sperimentazione  
 2= Campioni esposti durante la seconda settimana di sperimentazione  
 3= Campioni esposti durante la terza settimana di sperimentazione  
 4= Campioni esposti durante la quarta settimana di sperimentazione  
 5= Campioni esposti durante le quattro settimane di sperimentazione

Il DNA è preparato con il metodo di Dallaporta modificato con purificazione con CTAB/NaCl. I primer utilizzati sono forniti dalla ditta Operon. I polimorfismi sono analizzati con elettroforesi su gel di Agarosio.

**FIGURA 3a: % di polimorfismi nei campioni esposti rispetto al controllo durante le quattro settimane (media dei diversi siti analizzati)**



**FIGURA 3b: Numero di polimorfismi nei campioni esposti durante le quattro settimane (media dei diversi siti analizzati)**



- 1= campioni esposti durante la prima settimana
- 2= campioni esposti durante la seconda settimana
- 3= campioni esposti durante la terza settimana
- 4= campioni esposti durante la quarta settimana
- 5= campioni esposti durante le quattro settimane

## CONCLUSIONI

Il confronto tra genoma "normale" e genoma "esposto" a contaminanti ambientali attraverso analisi RAPD evidenzia il ruolo dell'inquinamento ambientale nel produrre mutazioni nel patrimonio genetico di organismi complessi.

**Ciò è alla base delle valutazioni di rischio di genotossicità ambientale attraverso la comparsa di modificazioni genetiche nel DNA.** Ottenendo una misura della correlazione tra il numero di danni mutageni a livello del DNA e la probabilità della trasformazione oncogena, il sistema descritto, basato sulla determinazione delle "impronte molecolari" del DNA di queste piante, può essere applicato ai siti inquinanti in altri luoghi da scegliere accuratamente in modo da stabilire il reale rischio che questi comportano per la salute umana.

In particolare i risultati delle esperienze condotte sul sito prescelto AMNU mettono in evidenza che:

- 1 **L'analisi di campioni prelevati da essenze spontanee cresciute in loco dimostra una presenza allarmante di metalli pesanti, in particolare Piombo, rispetto a campioni di controllo (C) cresciuti in aree non contaminate.**
- 2 **L'analisi del deposito sulle tettoie di protezione è indicativa della quantità di metallo depositato al suolo nell'arco di 30 giorni e di conseguenza estendibile all'intero arco dell'anno.**
- 3 **L'analisi dei polimorfismi (RAPD) dimostra che all'aumentare del tempo di esposizione dei biosensori aumenta parallelamente la comparsa di variazione del patrimonio genetico rispetto all'analisi dei campioni di controllo.**

Dati i rilievi quantitativi fatti sui metalli depositati sulle strutture utilizzate per contenere il biosensore e sulle essenze presenti nei pressi del sito monitorato sembra ragionevole supporre che gli effetti sono da ascrivere alla presenza del piombo. Si vuole ricordare che il piombo ad elevate concentrazioni determina danni a carico del cervello e di altri organi, anemia ed a dosi molto elevate anche la morte per avvelenamento sistemico. **Sull'assorbimento del piombo da parte degli esseri umani ha un ruolo particolare lo stato in cui esso si trova. Nel nostro caso probabilmente nel pulviscolo sotto forma di microparticelle che se avessero dimensioni comprese tra gli 1 e i 2  $\mu\text{m}$  avrebbero una probabilità quasi del 90% di raggiungere gli alveoli polmonari e quindi venire scambiati con i fluidi del sangue ad una intensità variabile tra gli 0,4 e 1  $\text{M}^3/\text{h}$  di un individuo normale in attività lavorativa non pesante (valore medio tra capacità respiratoria di maschi e femmine).**

Gli effetti specifici del contaminante potrebbero poi essere aumentati da concause quali:

- l'età delle persone esposte (i vecchi e i bambini sono più esposti )
- il sesso (gli ormoni possono determinare ipersensibilità)
- il peso (inversamente proporzionale)
- il grasso corporeo (agisce da concentratore)
- stress psicologici (aumentano la vulnerabilità)
- il pH e stato ionico del contaminante

-l'ambiente chimico (presenza di sostanze sinergiche)

-le condizioni climatiche (umidità e pressione atmosferica fanno aumentare l'assorbimento)

Considerando che il modello di rischio secondo una delle tre versioni più usate (one hit model) prevede che  $P(x) = ax$

dove  $P(x)$  è la probabilità di contrarre una malattia e  $a$  è la potenza carcinogenica della sostanza in  $\text{mg/Kg/giorno}^{-1}$  e che  $x$  è il tempo di esposizione alla medesima, risulta che  $P(x)$  per ammalarsi è di circa  $5 \times 10^{-3}$  uguale a quello di un accanito fumatore ( $\approx 5 \times 10^{-3}$ ) ma che è nettamente superiore a quello di essere investiti da un'auto ( $4 \times 10^{-5}$ ), di avere un incidente sul lavoro ( $8 \times 10^{-5}$ ), o di ammalarsi bevendo acqua di pozzo non controllata ( $1,2 \times 10^{-4}$ ).

Ovviamente questi risultati sono molto preliminari e soprattutto limitati nella loro estensione temporale e spaziale per cui al di là di proiezioni non è possibile andare, almeno allo stato attuale.