

R. BATISTONI (\*), M. GENOVESE (\*), P. DERI (\*)

## EFFETTI GENOTOSSICI IN TRICLADI D'ACQUA DOLCE IN SEGUITO AD ESPOSIZIONE A SOLFATO DI CROMO, UN COMPOSTO USATO NELL'ATTIVITÀ CONCIARIA

**Riassunto** - Alcuni esemplari di Tricladi d'acqua dolce, invertebrati comunemente presenti in corsi d'acqua puliti ed ossigenati, sono stati esposti a diluizioni diverse di solfato di cromo, un composto ampiamente utilizzato nel processo conciario. Parallelamente, sono stati eseguiti test fisici mediante trattamento con calore. Come risposta immediata, ambedue i trattamenti hanno prodotto, negli animali analizzati, una caduta generalizzata della sintesi proteica. Dopo circa 12 ore è stata osservata la graduale ripresa di una sintesi proteica generalizzata, seguita da neosintesi di proteine specifiche. In seguito all'esposizione a solfato di cromo è stato infatti possibile osservare, ad esempio, la presenza di un polipeptide di circa 41 kDa, mediante SDS-PAGE e successiva fluorografia. La sintesi di due diverse proteine, rispettivamente di 46 kDa e 55 kDa, è stata evidenziata in seguito a shock termico.

**Parole chiave** - Cromo(III), shock termico, Tricladi d'acqua dolce, proteine, fluorografia.

**Abstract** - *Genotoxic effects in freshwater Triclads after exposure to  $Cr_2(SO_4)_3$ , chemical used in tanning processing.* Freshwater Triclads, common invertebrates in unpolluted aquatic ecosystems, have been utilized as potential genotoxicity biomarkers. Some variations in the pattern of protein synthesis have been evidenced as a genomic response after exposure to toxic chemicals, in particular chromium sulphate, used in tanning processes. At the same time, in different samples, heat shock treatments were performed. Both treatments produced a drastic immediate decrease in the protein synthesis, observed by SDS-PAGE electrophoresis and fluorography. After 12 hours, fluorograms showed gradual restoring of protein synthesis followed by expression of specific polypeptides. As an example, the 41 kDa protein, synthesized in response to chromium sulphate, appeared to be specific and different from the two proteins (46 kDa and 55 kDa) detected after heat-shock treatments.

**Key words** - Chromium(III), heat shock, freshwater Triclads, proteins, fluorography.

### INTRODUZIONE

Lo stato dell'ambiente attuale e futuro ed il problema della gestione del territorio e delle risorse rappresentano temi che ricevono attualmente un'attenzione crescente (Blasi e Paoletta, 1993). L'immissione nell'ambiente di sostanze solide, liquide e gassose, conseguente ad un processo di sfruttamento, produce un inquinamento dell'aria, dell'acqua e

del suolo, la cui portata è spesso di difficile valutazione, anche perchè esistono risposte a lungo termine ed interazioni tra i vari inquinanti (Gardin e Paziotti, 1992). Aggregati urbani, attività industriali ed agricole sono responsabili di accumulo e di emissioni di agenti chimici e fisici, che alterano lo stato dell'ambiente con danni di notevole entità (Rapisarda Sassoon, 1994).

Tra le attività industriali, la lavorazione delle pelli e del cuoio è indubbiamente un processo produttivo inquinante, che ha notevole diffusione in Italia. Questo settore di attività si articola in circa 3.100 imprese, il 75% delle quali impiega meno di dieci addetti per unità locale, concentrate principalmente in Veneto, Toscana e Campania (Gardin e Paziotti, 1992). La concia, che è il processo produttivo alla base della lavorazione delle pelli e del cuoio, consiste nell'impregnare la pelle con sostanze che si fissano irreversibilmente alla medesima e ne impediscono la putrefazione senza alterarne morbidezza, flessibilità e struttura. Esistono vari sistemi di concia, i più diffusi tra i quali sono la concia vegetale, la concia ai sali di cromo e la concia ai sali di alluminio. Il metodo di concia al cromo, per i vantaggi tecnici che presenta, è il più seguito nonostante determini, dal punto di vista ecologico, gravi problemi, in quanto produce una concentrazione di cromo(III) negli scarichi finali superiore a quella di 3 mg/l, prevista dalla Legge n. 319 del 5/5/76.

Le difficoltà di tipo ambientale che si collegano all'attività conciaria riguardano principalmente il trattamento degli effluenti liquidi, lo smaltimento dei relativi fanghi di depurazione, la riduzione dei carichi inquinanti in uscita dai vari processi, nonché la minimizzazione dei consumi idrici (Contardi *et al.*, 1990).

Nell'ottica del disinquinamento e del recupero di materiali utilizzati nel processo produttivo, è stato realizzato a Santa Croce sull'Arno, località della provincia di Pisa dove esiste una notevole attività conciaria, un impianto centralizzato per il recupero del cromo, nel tentativo di abbattere l'inquinamento a valle del processo.

Parallelamente alla sperimentazione di tecnologie per la protezione dell'ambiente, è stata attivata una attività di ricerca il cui fine è valutare la pericolosità del cromo negli ecosistemi per realizzare una scala di interventi (Gisotti e Bruschi, 1990). In quest'otti-

(\*) Università degli Studi di Pisa, Dipartimento di Fisiologia e Biochimica, Sezione di Biologia Cellulare e dello Sviluppo, Via Carducci 13, 56010 Ghezzano, Pisa. Ricerca effettuata con il contributo finanziario del M.U.R.S.T. M. Genovese ha usufruito di una borsa di studio I.N.C.A. finanziata dall'E.N.E.A.

ca si inserisce la lettura dell'ecosistema secondo parametri bio-ecologici. Gli individui di una data specie, infatti, costituiscono un'unità funzionale con la porzione abiotica del relativo ecosistema. Come conseguenza, la qualità di un ambiente può essere valutata per mezzo degli organismi che vi vivono. L'indicatore biologico rappresenta in sostanza una «reazione biologica» che, per le sue caratteristiche, è utilizzabile per analizzare o prevedere gli effetti di sostanze inquinanti sulle popolazioni di una comunità vivente. L'efficacia dell'uso di indicatori biologici va ricercata nel fatto che essi sono in grado di documentare effetti reali del danno ecologico, contrariamente alle analisi chimico-fisiche che forniscono soltanto una misura della concentrazione di un inquinante nell'ambiente in cui gli organismi vivono, non evidenziando il rischio al quale sono sottoposti. Attualmente, per l'analisi della qualità dei corsi d'acqua è utilizzato l'E.B.I. (*Extended Biotic Index*; Woodiwis, 1980) con le modifiche apportate da Ghetti (1986). Questo metodo si basa sulla diversa sensibilità agli inquinanti di alcuni gruppi faunistici e sulla ricchezza in specie, tenendo conto che il numero delle specie e quello dei microrganismi presenti in un corso d'acqua variano in relazione al contenuto di sali, che la composizione delle comunità varia da monte a valle e la sensibilità all'inquinamento è un parametro variabile da specie a specie. I dati acquisiti al termine del campionamento microbiologico rappresentano gli indici biotici che permettono stime sulla letalità e la comparsa di forme tumorali. Scarsi e poco conosciuti rimangono gli effetti genotossici sulle popolazioni naturali. Per sopperire a questa mancanza e per valutare le conseguenze dovute ad esposizione alle sostanze tossiche, analisi biologiche di diverso tipo si sono recentemente affiancate a questi studi (cfr. Anderson e Wild, 1994). I primi risultati ottenuti su alcuni modelli animali indicano che è possibile evidenziare e studiare, in risposta a inquinanti ambientali di varia natura, un'ampia gamma di processi biologici, tra i quali sviluppi embrionali anormali con alte incidenze di mortalità, riduzione nella produzione di gameti o loro anomalie morfologiche, aberrazioni cromosomiche di vario genere. Infine, a livello di genoma, sono stati osservati fenomeni di amplificazione selettiva di componenti specifiche o sintesi di proteine particolari (Sunderman *et al.*, 1995). Tutto questo consente di valutare a vari livelli il danno genetico che si ripercuote sull'ecosistema. La ricerca ecotossicologica si pone quindi come strumento indispensabile per la valutazione dello stato di salute degli ecosistemi e necessita di un continuo reperimento di «specie modello» per prove diagnostiche. Scopo del presente lavoro è indagare se, nell'ambito di una problematica ambientale, sia possibile utilizzare i Tricladi dulciacquicoli, conosciuti comunemente come «planarie», per un monitoraggio biologico della qualità dei corsi d'acqua. La scelta di questo sistema di studio riflette sia la valenza ecologica sia l'indifferenza ad una specifica biocenosi che questo gruppo presenta. Infatti, dal punto di vista ecologico, la specie di planarie utilizzata può considerarsi inter-

media tra le specie tipicamente reofile (stenoterme) e quelle limnadofile (euriterme), assumendo pertanto una posizione di equilibrio tra specie caratteristiche di alcuni biotopi ed altre che non richiedono condizioni ambientali specifiche (Benazzi, 1965). Questi organismi ubiquitari sono inoltre facilmente campionabili in tutti i periodi dell'anno e possono essere allevati con facilità in condizioni di laboratorio.

## MATERIALI E METODI

Le planarie utilizzate in questo studio appartengono alla specie *Dugesia etrusca* (Lepori, 1947) e sono state raccolte in un ruscello non inquinato, presso Parrana (Livorno). In tutti gli esperimenti sono stati utilizzati individui tenuti a digiuno per circa 10 giorni. Gli animali sono stati preincubati in solfato di cromo,  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ , a concentrazioni variabili da 0,001 ppm (parti per milione) a 1000 ppm, per tempi compresi tra 10 minuti e 72 ore (Tab. 1). Al termine della preincubazione, ad ogni campione sono stati aggiunti 20 mCi/ml di  $^{35}\text{S}$ -metionina (Amersham) e successivamente l'incubazione è proseguita per 24 ore. In parallelo, sono stati condotti esperimenti esponendo alcuni individui a calore. Per queste analisi, gli animali sono stati preincubati in acqua di ruscello preriscaldata alle temperature rispettivamente di 37 °C e 30 °C, per tempi compresi tra 3 minuti e 60 minuti (Tab. 2). Quantità corrispondenti di estratti proteici, ottenuti da singoli animali, sono state sottoposte ad elettroforesi su gel di poliacrilammide-SDS (SDS-PAGE), tecnica che permette la separazione di polipeptidi di diverso peso molecolare. La presenza di un segnale radioattivo, indice dell'incorporazione di amminoacidi marcati ( $^{35}\text{S}$ -metionina) in polipeptidi di nuova sintesi, è stata evidenziata mediante tecniche fluorografiche.

Tab. 1 - Prospetto riassuntivo delle prove sperimentali effettuate sottoponendo le planarie, per tempi compresi tra 10 minuti e 72 ore, a concentrazioni variabili di  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$ . x = prove eseguite.

Tempo	Concentrazione della soluzione (ppm)						
	0,001	0,01	0,1	1	10	100	1000
10 min				x	x	x	x
30 min					x		
1 ora					x		x
3 ore				x	x	x	x
6 ore				x	x	x	
9 ore					x		
12 ore				x	x	x	
18 ore	x	x	x		x		
24 ore				x	x	x	
36 ore					x		
53 ore	x	x	x	x	x	x	
72 ore	x	x	x	x	x	x	

Tab. 2 - Prospetto riassuntivo delle prove sperimentali effettuate. Le planarie sono state esposte per tempi variabili alle temperature di 30 °C e 37 °C (shock termico). x = prove eseguite.

Tempo	Temperatura		3 5 S-metionina		
	37° C	30°	4 ore	12 ore	24 ore
3 min	x	x	x	x	x
5 min	x	x	x	x	x
10 min		x	x	x	x
15 min		x	x	x	x
20 min		x	x	x	x
30 min		x	x	x	x
40 min		x	x	x	x
60 min		x	x	x	x

## RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati ottenuti rivelano che, nelle planarie utilizzate, è rivelabile una risposta anche a concentrazioni molto basse di solfato di cromo (0,001 ppm), che consiste in una caduta generalizzata della sintesi proteica, mentre per concentrazioni superiori a 1 ppm si evidenzia la produzione di proteine specifiche, fra le quali è particolarmente evidente una proteina di 41 kDa (Tab. 3; Fig. 1). È possibile che il contatto, da parte di questi organismi, con l'agente tossico determini attivazione e/o produzione di proteine in grado di svolgere un'azione tampone attraverso la cattura dello ione cromo. Si può ipotizzare che l'effetto detossificante di queste molecole, efficace a basse concentrazioni di Cr(III), divenga insufficiente in seguito al protrarsi dell'esposizione all'agente stressogeno o a concentrazioni maggiori di quest'ultimo. Queste condizioni potrebbero attivare la sintesi di proteine specifiche, tra le quali quella evidenziata, in individui diversi, di circa 41 kDa.

Tab. 3 - Prospetto riassuntivo dei risultati ottenuti dopo esposizione delle planarie, per tempi variabili, a concentrazioni differenti di cromo(III).

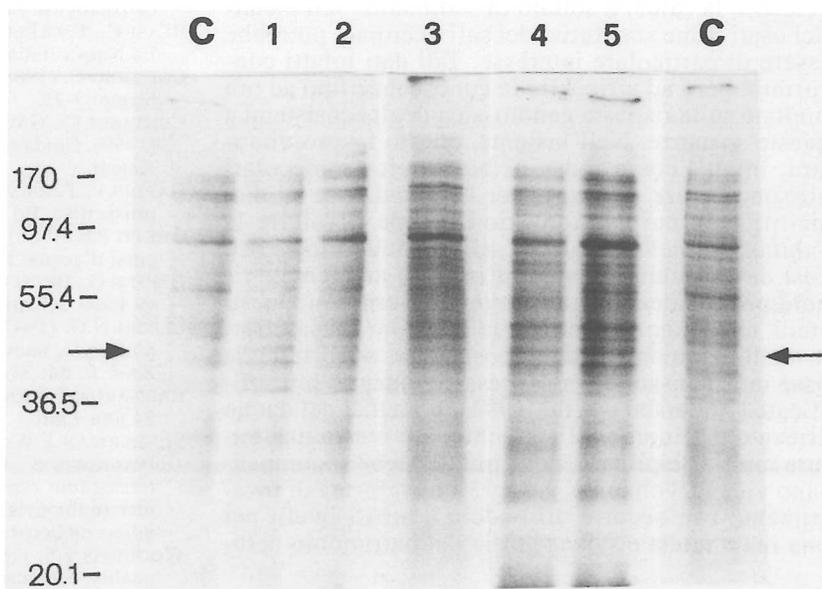
Il contatto con l'agente inquinante determina una immediata caduta della sintesi proteica. Soltanto in tempi successivi, dopo circa 12 ore, si osserva una graduale ripresa di una sintesi proteica generalizzata e, a partire dalla concentrazione di 1 ppm, la neosintesi di proteine specifiche, tra le quali è particolarmente evidente una di circa 41 kDa.

Tempo	Concentrazione della soluzione (ppm)					
	0,001	0,01	0,1	1	10	100
10 min	caduta generalizzata della sintesi proteica					
30 min						
1 ora						
3 ore						
6 ore	graduale ripresa della sintesi proteica					
9 ore						
12 ore						
18 ore						
24 ore	ripresa della sintesi proteica					
36 ore						
53 ore	ripresa della sintesi proteica		41 kDa	41 kDa	41 kDa	41 kDa
72 ore			41 kDa	41 kDa	41 kDa	41 kDa

L'esposizione a concentrazioni di 1000 ppm di solfato di cromo è risultata letale per questi organismi. L'individuazione di una soglia massima di tolleranza costituisce elemento indispensabile di riferimento per una valutazione dello stato di salute delle acque interne e quindi degli eventuali rischi cui è sottoposta la componente biotica, non ultimo l'uomo. La risposta al solfato di cromo sembra essere specifica. Infatti, gli esperimenti di esposizione al calore, condotti in parallelo, hanno evidenziato la neosinte-

Fig. 1 - Fluorografia di SDS-PAGE (12%) mostrante il pattern proteico ottenuto da singole planarie dopo 53 ore o 72 ore di esposizione a concentrazioni diverse di  $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$  e successiva incubazione in  $^{35}\text{S}$ -metionina (20 mCi/ml; 24 ore). Tempo di esposizione: 10 giorni.

Concentrazioni: 1 ppm: corsie 1-2; 10 ppm: corsia 3; 100 ppm: corsie 4-5. C = controllo. È indicata la presenza di un polipeptide di circa 41 kDa, assente nei controlli (freccia).



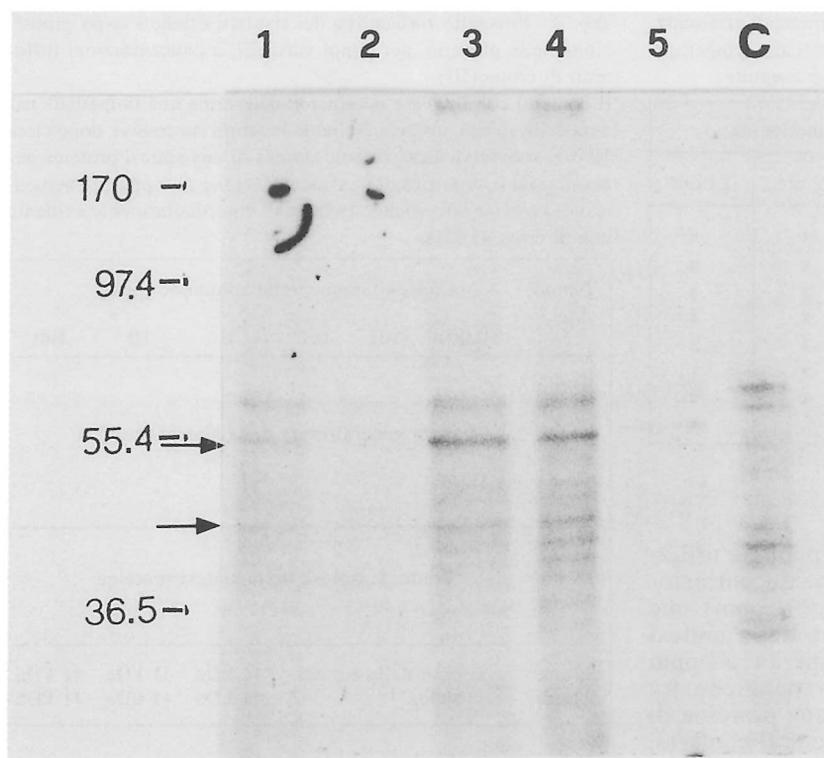


Fig. 2 - Fluorografia di SDS-PAGE (10%) mostrante il pattern proteico ottenuto da singole planarie sottoposte a shock termico per tempi variabili. Corsie 1-2: 10 min, 30 °C; corsie 3 e 5: 20 min, 30 °C; corsia 4: 60 min, 30 °C. C = controllo. Si osserva la neosintesi di due proteine, rispettivamente di 55 kDa e 46 kDa (frecce), assenti nel controllo. Dopo esposizione a  $^{35}\text{S}$ - metionina per 12 ore, il segnale autoradiografico, indicante la neosintesi di polipeptidi, è appena visibile (corsie 2 e 5); nelle corsie 1, 3 e 4 il tempo di incubazione in  $^{35}\text{S}$ - metionina è stato di 24 ore.

si, in individui diversi, di due differenti prodotti proteici, rispettivamente di 55 kDa e 46 kDa (Fig. 2). Anche in questo caso, le prove condotte mettono in luce, come risposta precoce, una caduta della sintesi proteica, che quindi può essere interpretata come un segnale generalizzato che l'animale fornisce a qualsiasi azione di disturbo dell'ambiente in cui vive. Uno studio della risposta allo stress, ampliato ad altre sostanze tossiche presenti nel processo conciarario come i cloruri, la calce, il solfato di sodio, altri sali metallici usati come sostitutivi dei sali di cromo, potrebbe essere di particolare interesse. Tali dati infatti concorrerebbero ad arricchire le conoscenze fino ad ora limitate sulla risposta genotossica degli ecosistemi a queste sostanze. Nell'insieme, questo lavoro dimostra, infatti, come indagini biochimico-molecolari possono essere utilizzate per l'acquisizione di dati analitici, la cui estrapolazione rende possibile la valutazione dello «stato di salute» della biocenosi, così da arricchire gli studi d'impatto ambientale finora prevalentemente a carattere descrittivo. Questi studi, che tengono conto delle relazioni causa-effetto delle componenti dell'ecosistema, sono tuttavia base indispensabile per successive indagini più sofisticate (Anderson e Wild, 1994). L'analisi del danno arrecato dall'uomo all'ambiente, attraverso una lettura multidisciplinare, dove più tecniche si compensano vicendevolmente, è oggi l'unica forma di investimento che occorre diffondere a tutti i livelli per una reale tutela e salvaguardia del patrimonio natu-

ra, fonte di «energia» non rinnovabile (Colombo, 1988).

#### BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON S., WILD G. (1994). Linking genotoxic responses and reproductive success in Ecotoxicology. *Env. Health Perspect.* **102** (Suppl. 12): 9-12.
- BENAZZI M. (1965). Le planarie nell'insegnamento e nella ricerca zoologica. *Le Scienze* **2**: 70-77.
- BLASI C., PAOLELLA A. (1993). Progettazione ambientale - Ed. La Nuova Italia Scientifica.
- COLOMBO U. (1988). Energia e Ambiente. In: L'ENEA per l'ambiente: 7-25.
- CONTARDI C., GAY A., GHISOTTI G., ROBASTO G., TABASSO G. (1990). Guida tecnica sui trattamenti delle acque. Ed. Franco Angeli.
- GARDIN P., PAZIENTI M. (1992). L'ambiente in Italia: problemi e prospettive. Ed. Franco Angeli.
- GHETTI P.F. (1986). I macroinvertebrati nell'analisi di qualità dei corsi d'acqua. Ed. Provincia Autonomia di Trento.
- GHISOTTI G., BRUSCHI S. (1990). Valutare l'ambiente. Ed. La Nuova Italia Scientifica.
- LEPORI N.G. (1947). Descrizione di *Dugesia etrusca monodactyla*, nuova razza di planaria di acqua dolce. *Monitore Zool. It.* **56**: 35-44.
- RAPISARDA SASSOON C. (1994). Capire l'ambiente. Ed. Il Sole-24 Ore Libri.
- SUNDERMAN F.W., PLOWMAN M.C., KROFTOVA O.S., GRBACIVANKOVIC S., FOGLIA L., CRIVELLO J.F. (1995). Effects of teratogenic exposures to  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$  on metallothionein and metallothionein-mRNA contents of *Xenopus* embryos. *Pharmacol. Toxicol.* **76**: 178-184.
- WOODIWI F.S. (1980). Biological monitoring of surface water quality. Summary Report E.E.C. ENV/787/80-EN.