

Genotossicità di clorito e clorato

La genotossicità di clorito e clorato, sottoprodotti inorganici della disinfezione dell'acqua con biossido di cloro, è stata analizzata mediante test di mutagenesi su organismi vegetali e cellule umane. I due ioni hanno mostrato la capacità di indurre effetti genotossici nelle cellule vegetali, anche a concentrazioni inferiori ai limiti posti dalla normativa italiana

Donatella Feretti, Ilaria Zerbini, Elisabetta Ceretti, Claudia Zani, Grazia Orizio, Francesco Donato
Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Sezione di Igiene, Università degli Studi di Brescia

Cristina Fatigoni, Milena Villarini, Massimo Moretti, Silvano Monarca
Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche e Salute Pubblica, Università degli Studi di Perugia

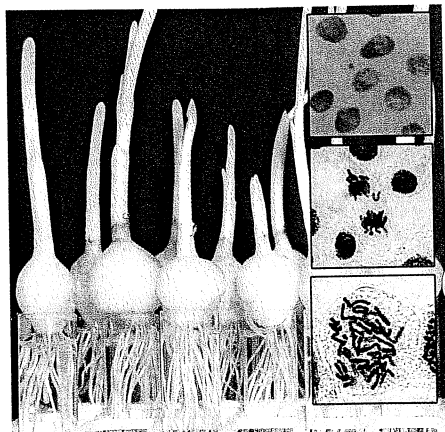
La disinfezione, pur essendo fondamentale per garantire il controllo del rischio microbiologico associato al consumo di acqua potabile, non è un processo senza rischi sanitari per la popolazione. I disinfettanti comunemente utilizzati, in particolare cloro e ipoclorito, possono infatti reagire con alcune sostanze presenti nell'acqua, generando sottoprodotti della disinfezione (DBPs, Disinfection By-Products) (WHO, 2004). Per alcuni di questi, per esempio i trihalometani, gli acidi aloacetici e il bromato, è stata ampiamente dimostrata l'attività genotossica e cancerogena (Boorman et al., 1999). I sottoprodotti della disinfezione sono presenti in tracce nell'acqua potabile, ma a causa dell'uso giornaliero e delle molteplici vie di esposizione rappresentano comunque un rischio per la salute, dovuto in particolare all'insorgenza di disturbi cronici. Alcune indagini epidemiologiche hanno messo in evidenza la relazione tra mortalità per cancro ad organi come

la vescica, il colon e il retto e il consumo abituale di acqua potabile (Koivusalo et al., 1997; Cantor et al., 1998).

Il biossido di cloro (ClO_2) è stato inizialmente introdotto come alternativa al cloro e all'ipoclorito proprio perché ha dimostrato di non formare trihalometani (Li et al., 1996).

1 - Bulbi di *Allium cepa* durante l'esposizione alle soluzioni di clorito e clorato. Nel particolare, una cellula interfascica con micronucleo ed esempi di aberrazioni cromosomiche in cellule anafasiche (una C-mitosi e un cromosoma volante).

Tuttavia questo disinfettante in soluzione acquosa si riduce velocemente formando sottoprodotti inorganici: gli ioni clorito (ClO_2^-), il prodotto principale, clorato (ClO_3^-) e cloruro (Cl^-). La riduzione del ClO_2^- è molto rapida e viene completata in quattro ore; il ClO_2^- è relativamente stabile in presenza di composti organici, ma in presenza di cloro libero può essere ossidato a ClO_3^- , il quale invece permane inalterato nell'acqua (WHO, 2004). ClO_2^- , ClO_2 e ClO_3^- sono stati oggetto di numerosi studi che ne hanno valutato tossicità, genotossicità ed effetti sullo sviluppo; i risultati ottenuti e riportati in letteratura sono contrastanti e quindi non definitivi (USEPA, 2000; WHO, 2005). In base ad essi, la IARC ha inserito il ClO_2^- nel gruppo 3 (sostanze non classificabili come cancerogeni per l'uomo; IARC, 1991). Tuttavia, l'OMS ha suggerito per l'acqua potabile un valore limite provvisorio di 0,7 mg/L per ClO_2^- e ClO_3^- e una soglia riferita alle caratteristiche organolettiche dell'acqua di 0,4 mg/L per il ClO_2 (WHO, 2005). La normativa italiana invece prevede un valore limite di 0,2 mg/L per il ClO_2^- (Decreto Legislativo 31/2001). I test di mutagenesi a breve termine permettono una valutazione globale dei campioni e l'individuazione di effetti sinergici dei costituenti di miscele complesse. Tra questi test, quelli condotti su organismi vegetali (quali *Allium cepa* e *Tradescantia*) sono particolarmente indicati e molto utilizzati nello studio dell'acqua in toto proveniente anche da fonti differenti (acqua potabile, reflua, superficiale, ecc), in quanto non necessitano di preparazione del campione che comporta processi di concentrazione lunghi e costosi (Ma et al., 1985; Monarca et al., 2002, 2005). Per saggiare campioni di acqua mediante test su cellule di mammifero è



necessario invece ottenere degli estratti e quindi, nonostante possano fornire importanti informazioni per la valutazione del rischio, questi test vengono raramente condotti (Buschini et al., 2004; Maffei et al., 2005). Scopo di questo lavoro è stata la valutazione del rischio genotossico derivante dall'uso di biossido di cloro come disinfettante dell'acqua, mediante lo studio degli effetti dei suoi due principali sottoprodotti inorganici. Soluzioni acquose di ClO_2 , ClO_3 e loro miscele in diverse concentrazioni sono state analizzate mediante cinque test di mutagenesi a breve termine: il test del micronucleo e il test delle aberrazioni cromosomiche in *Allium cepa*, il test del micronucleo in *Tradescantia*, il comet test e il test del micronucleo in cellule HepG2.

Materiali e metodi

Soluzioni di clorito e clorato

Soluzioni di clorito di sodio (25%, NaClO_2 , Sanipur S.r.l., Flero, BS, Italia) e di clorato di sodio (45%, NaClO_3 , Caffaro S.P.A., Cesano Maderno, MI, Italia) sono state diluite in acqua distillata e usate a concentrazioni comprese tra 0,001 e 0,8 mg/L. Miscele 1:1 e 1:2 v/v di clorito e clorato sono state saggiate a concentrazioni comprese tra 0,01 e 0,2 mg/L.

Test di genotossicità su vegetali:

Allium cepa test

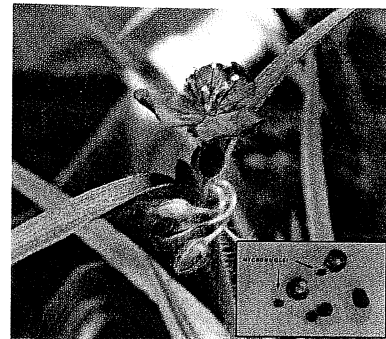
Su cellule dell'apice radicale di *Allium cepa* sono stati condotti due diversi test: il test delle aberrazioni cromosomiche in cellule anafasiche e il test del micronucleo in cellule interfasiche (Rank e Nielsen, 1994) (figura 1). Per entrambi i test, giovani bulbi di cipolla pregerminati in acqua minerale sono stati esposti a soluzioni di ClO_2 e ClO_3 e a miscele 1:1 e 1:2 v/v di ClO_2 e ClO_3 per 6 h a diverse concentrazioni preliminarmente testate in un saggio di citotossicità. Dopo il trattamento le radici sono state tagliate, fissate in soluzione di acido acetico-etanolo (1:3 v/v)

e quindi mantenute in etanolo al 70%. Contemporaneamente sono stati condotti un controllo negativo (acqua distillata, 6 h) e uno positivo (idrazide maleica 10 mg/L, 24 h). Per la valutazione dell'indice mitotico (indice di tossicità cellulare) e della frequenza dei micronuclei sono state considerate 1000 cellule/vetrino in 5 vetrini, mentre per l'analisi delle aberrazioni cromosomiche sono state contate 40 cellule anafasiche in 20 vetrini. I dati riferiti ai micronuclei sono stati analizzati mediante l'analisi della varianza e il test di Dunnett, mentre quelli riguardanti indice mitotico e aberrazioni cromosomiche sono stati analizzati tramite il test del chi-quadro.

Test di genotossicità su vegetali:

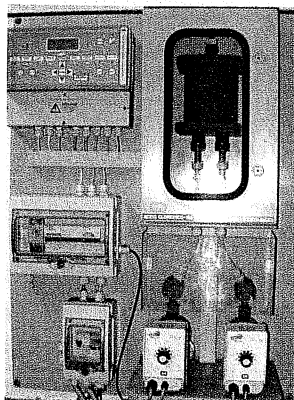
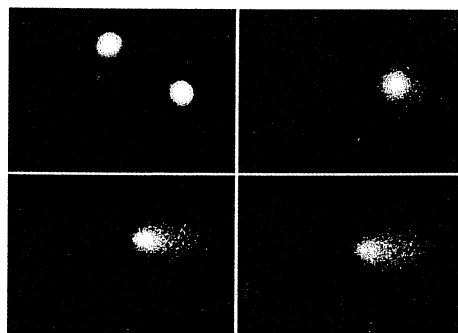
Tradescantia/micronuclei test

Questo test è stato condotto usando un ibrido di *Tradescantia hirsutiflora* e *Tradescantia subacaulis* (clone #4430) (Ma et al., 1994) (figura 2). Giovani infiorescenze sono state immerse direttamente in soluzioni di ClO_2 e ClO_3 e in miscele 1:1 e 1:2 v/v dei due per 24 h a diverse concentrazioni. Parallelamente sono stati condotti un controllo negativo (acqua distillata, 24 h) e uno positivo (idrazide maleica 0,4 M, 6 h). Dopo il trattamento, tutte le infiorescenze sono state mantenute per 24 h in acqua minerale, fissate in soluzione di acido acetico-etanolo (1:3 v/v) e mantenute poi in etanolo al 70%. Per la valutazione della frequenza di micronuclei, sono state considerate 300 tetradi/vetrino in 5 vetrini; la frequenza è stata calcolata



2 - Un'infiorescenza di *Tradescantia*. Nel particolare, una tetrad con micronuclei

3 - Comet assay. Classi di danno al DNA distinte in base alla percentuale di DNA migrato nella coda della cometa



Il biossido di cloro

Il biossido di cloro è una sostanza disinfettante che viene normalmente prodotta a partire da clorito di sodio e acido cloridrico. Grazie al suo elevato potere ossidante è efficace contro batteri, virus e protozoi. La sua tecnologia industriale di sintesi è ormai matura, sicura e affidabile.

Il biossido di cloro trova impiego nella potabilizzazione delle acque, nella disinfezione delle acque reflue e nel trattamento delle acque tecnologiche e di processo. Nel processo di potabilizzazione è preferibile al cloro/ipoclorito, in quanto non produce i THM (trialometani), che sono molecole tossiche e cancerogene, ha una maggior capacità disinfettante, non è influenzato dal pH dell'acqua e spesso ne migliora anche le caratteristiche organolettiche. Sanipur nei suoi oltre 20 anni di esperienza, ha sviluppato una serie di produttori di biossido adatti alle diverse esigenze.

test di Dunnett di comparazione multipla. L'analisi della correlazione è stata invece effettuata mediante il test di Pearson.

Risultati

Test su organismi vegetali

Radici di *Allium cepa* esposte per 6 h a differenti concentrazioni di ClO_2 e ClO_3 hanno mostrato un incremento di aberrazioni cromosomiche a partire dalla concentrazione di 0,15-0,20 mg/L, con un andamento crescente fino alla più alta dose testata (0,80 mg/L), corrispondente al valore limite effettivamente adottato in USA e superiore al limite proposto dall'OMS (tabella 1; figura 4A). Un significativo aumento di aberrazioni cromosomiche è stato trovato anche in radici di *Allium cepa* trattate con miscele di ClO_2 e ClO_3 già alle basse dosi, in modo particolarmente evidente per la miscela 1:2 v/v, suggerendo un effetto sinergico dei due composti (tabella 2; figura 4B). Non è stata invece osservata alcuna induzione di micronuclei in radici di *Allium cepa* trattate sia con i singoli composti, sia con miscele dei due. Nella tabella 3 sono riportati i dati relativi alla *Tradescantia* esposta per 24 h a soluzioni di clorito e clorato. Un aumento significativo della frequenza di micronuclei è stato riscontrato in infiorescenze trattate con ClO_2 alle concentrazioni di 0,4 mg/L e di 0,8 mg/L e con ClO_3 alla concentrazione di 0,4 mg/L. Anche le miscele dei due ioni hanno indotto formazione di micronuclei solo alle dosi più alte (a partire da 0,075 mg/L, tabella 4).

Test su cellule di mammifero

Il test del micronucleo in cellule HepG2 ha dato risultati negativi dopo trattamento sia con ClO_2 che con ClO_3 a tutte le concentrazioni testate. Non c'è stato infatti alcun incremento nella frequenza di micronuclei rispetto al controllo negativo. L'esposizione a ClO_2 è risultata non genotossica anche nel test della cometa, che invece ha dato esito positivo dopo trattamento con ClO_3 ; alla dose di 0,001 mg/L, la più bassa dose testata di ClO_3 , è stato osservato infatti un significativo incremento dei valori di TI ($7,13 \pm 2,04$, $p < 0,05$ al test di Dunnett) rispetto al controllo negativo ($3,68 \pm 0,93$). Inaspettatamente, il valore di TI diminuisce dopo la prima dose con un andamento dose-dipendente (coefficiente di correlazione di Pearson: $-0,541$, $p < 0,05$).

Discussione

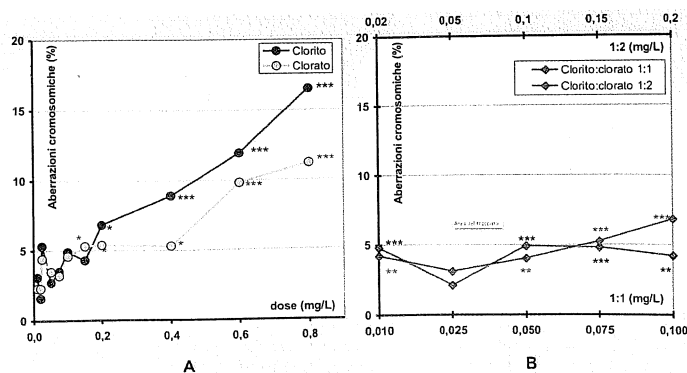
La qualità dell'acqua potabile è un problema rilevante in sanità pubblica. A causa della presenza di

Clorito:clorato			
1:1 (mg/L)	AC (%)	MCN (‰)	IM (%)
0,010:0,010	4,8***	1,2 ± 1,6	8,5
0,025:0,025	2,1	0,4 ± 0,9	8,2
0,050:0,050	4,9***	0,8 ± 1,3	9,3
0,075:0,075	4,8***	0,0 ± 0,0	9,9
0,100:0,100	4,2**	0,0 ± 0,0	10,8
1:2 (mg/L)	AC (%)#	MCN (‰)	IM (%)
0,010:0,020	4,2**	0,2 ± 0,5	10,1
0,025:0,050	3,1	1,0 ± 1,4	9,3
0,050:0,100	4,0**	2,0 ± 2,4	9,2
0,075:0,150	5,2***	0,2 ± 0,5	11,0
0,100:0,200	6,8***	0,2 ± 0,5	11,0
C-	1,7	0,8 ± 0,8	9,5

** statisticamente significativo vs C-, secondo il test del Chi^2 ($p < 0,01$);
 *** statisticamente significativo vs C-, secondo il test del Chi^2 ($p < 0,001$);
 # trend lineare statisticamente significativo ($p < 0,001$).

sottoprodotti della disinfezione potenzialmente genotossici, il suo consumo può rappresentare un rischio per la salute, in particolare per l'insorgenza di disturbi cronici, in quanto l'esposizione a tali sostanze, pur essendo un'esposizione a basse dosi, è quotidiana e avviene per molteplici vie (non solo per ingestione). Scopo di questo lavoro è stata la valutazione della genotossicità dei due principali sottoprodotti inorganici presenti nell'acqua disinfettata con biossido di cloro. Clorito e clorato hanno mostrato la capacità di indurre danno cromosomico in organismi vegetali, anche a concentrazioni inferiori ai limiti stabiliti dalla legge italiana (0,2 mg/L) e dall'OMS (0,7 mg/L). La genotossicità di questi due composti è stata valutata innanzitutto mediante tre test di mutagenesi a breve termine su organismi vegetali (*Allium cepa* e *Tradescantia*) con due differenti end-point genetici: la formazione di aberrazioni cromosomiche (analizzate in *Allium cepa*) e l'induzione di micronuclei

4 - Aberrazioni cromosomiche in radici di *Allium cepa* trattate con clorito e clorato (A) e con miscele di clorito e clorato (B)
 * statisticamente significativo vs C-, secondo il test del Chi^2 ($p < 0,05$);
 ** statisticamente significativo vs C-, secondo il test del Chi^2 ($p < 0,01$);
 *** statisticamente significativo vs C-, secondo il test del Chi^2 ($p < 0,001$);



dividendo il numero totale di micronuclei (MCN) per il numero totale delle tetradi contate ed è stata espressa come MCN/100 tetradi. I risultati sono stati analizzati statisticamente mediante l'analisi della varianza e il test di Dunnett.

Test su cellule di mammifero:

Trattamento delle cellule

Le cellule HepG2 (ATCC HB 8065, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna Bruno Umbertini, Brescia, Italia) appartengono ad una linea cellulare derivata da epatoblastoma umano. Cellule HepG2 sono state seminate a una concentrazione di $1,0 \times 10^6$ in piastre per coltura contenenti 5 ml di terreno. Dopo 24 h, il terreno è stato sostituito con terreno di crescita completo contenente 1, 10, 100 e 200 µg/L di soluzioni di ClO_2 e ClO_3 (concentrazioni alle quali la vitalità

cellulare è risultata essere superiore a 80%) e le piastre sono state incubate per altre 24 h (37°C , 5% CO_2). In ogni esperimento sono stati inclusi un controllo negativo (cellule non trattate) e un controllo positivo (benzo(a)pirene 20 µM per il comet test e 2,4 µM per il test del micronucleo).

Test su cellule di mammifero: Comet test

Dopo l'incubazione, le cellule sono state raccolte mediante trattamento con tripsina, sospese in LMA (low melting agarose), distribuite su vetrini portaoggetto pre-agarizzati con NMA (normal melting agarose) e immerse in soluzione di lisi (pH=10) per 1 h a 4°C . I vetrini sono stati poi posizionati in una cella elettroforetica orizzontale per 40 minuti, immersi in soluzione tampone fredda (pH>13) per permettere il rilassamento delle molecole di DNA e infine sottoposti ad un campo elettrico (1 V/cm, 300 mA, 20 min). I vetrini sono stati quindi neutralizzati, fissati in etanolo e colorati con bromuro di etidio per l'analisi al microscopio a fluorescenza (filtro di eccitazione 515-560 nm; filtro di emissione 590 nm) equipaggiato con CCD camera ad alta sensibilità. L'immagine di 50 nuclei scelti casualmente in ogni vetrino (3 vetrini per campione) è stata analizzata usando un software dedicato (Comet Assay III, Perceptive Instruments, UK) (figura 3).

Il Tail Intensity (TI, % di DNA nella coda della cometa) è stato usato come misura del danno al DNA (Singh et al., 1988). I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente mediante analisi della varianza (ANOVA), seguita dal test di Dunnett di comparazione multipla. L'analisi della correlazione è stata invece effettuata mediante il test di Pearson.

Test su cellule di mammifero:

test del micronucleo con blocco della citodieresi (CBMN)

Dopo il trattamento delle cellule HepG2, il terreno contenente ClO_2 e ClO_3 è stato sostituito con terreno fresco contenente citocalasina B (3 µg/ml). Dopo 24 h, le cellule sono state raccolte mediante trattamento con tripsina, trattate con KCl 0,56% freddo, centrifugate (5 min, 800 rpm), risospese in KCl 0,56%, distribuite su un vetrino e asciugate. Per rilevare i micronuclei (MN) nelle cellule binucleate, i vetrini sono stati colorati con Giemsa 2% per 8 minuti. Per ogni campione sono stati preparati 3 vetrini e per ogni vetrino sono state contate 1000 cellule binucleate (Fenech, 2000).

I dati ottenuti sono stati analizzati statisticamente mediante analisi della varianza (ANOVA), seguita dal

Tabella 1 - Aberrazioni cromosomiche (AC), micronuclei (MCN) e indice mitotico (IM) in radici di *Allium cepa* esposte per 6 ore a soluzioni di clorito e clorato

Clorito (mg/L)	AC (%)#	MCN (‰)	IM (%)
0,010	3,1	0,2 ± 0,4	8,3
0,020	1,6	0,2 ± 0,5	7,8
0,025	5,3	0,2 ± 0,5	9,4
0,050	2,7	0,4 ± 0,9	9,3
0,075	3,5	0,2 ± 0,4	8,5
0,100	4,9	2,2 ± 3,8	9,7
0,150	4,3	1,4 ± 1,1	9,2
0,200	6,8*	1,0 ± 1,7	9,1
0,400	8,9***	1,6 ± 3,1	10,7
0,600	11,9***	1,0 ± 1,0	9,5
0,800	16,5***	0,4 ± 0,5	8,5
Clorato (mg/L)	AC (%)#	MCN (‰)	IM (%)
0,010	2,3	1,0 ± 0,7	10,0
0,020	2,3	1,8 ± 1,9	10,2
0,025	4,4	2,4 ± 3,4	10,5
0,050	3,5	0,6 ± 0,9	9,9
0,075	3,2	1,4 ± 1,7	9,3
0,100	4,6	1,4 ± 0,9	9,7
0,150	5,3*	0,8 ± 0,8	10,0
0,200	5,4*	0,6 ± 0,9	9,0
0,400	5,3*	0,0 ± 0,0	9,8
0,600	9,8***	0,2 ± 0,4	9,8
0,800	11,2***	0,4 ± 0,5	9,4
C-	3,1	0,0 ± 0,0	10,4

* statisticamente significativo vs C-, secondo il test del Chi^2 ($p < 0,05$);

*** statisticamente significativo vs C-, secondo il test del Chi^2 ($p < 0,001$);

trend lineare statisticamente significativo ($p < 0,001$).

(valutata sia in *Allium cepa* che in *Tradescantia*), considerati indicatori di danno cromosomico di pari sensibilità. Le aberrazioni cromosomiche consistono in alterazioni del normale assetto cromosomico o della struttura stessa dei cromosomi e hanno origine da rotture o disturbi cromosomici. I micronuclei, invece, sono formati da frammenti acentrici di cromosoma o da interi cromosomi che sono rimasti esclusi dal nucleo cellulare durante il processo di cariocinesi; l'induzione di micronuclei riflette quindi l'avvento di eventi clastogeni e/o aneugenici.

I risultati da noi ottenuti sembrano suggerire che il test delle aberrazioni cromosomiche sia più sensibile all'azione di clorito e clorato rispetto al test del micronucleo. Una frequenza di aberrazioni cromosomiche

significativamente superiore rispetto al controllo negativo è stata rilevata, infatti, in radici di *Allium cepa* trattate con clorito e clorato, a partire dalla concentrazione di 0,15-0,20 mg/L, con un evidente andamento dose-effetto per entrambi i composti (tabella 1). Il test del micronucleo, invece, ha dato in *Tradescantia* risultati positivi solo alle dosi più alte (0,4 e 0,8 mg/L) e in *Allium cepa* risultati negativi a tutte le dosi testate (tabelle 1 e 3).

Inoltre, il test del micronucleo condotto nei due differenti organismi vegetali ha dato risultati contrastanti. Questo effetto può essere in parte spiegato dalla maggiore sensibilità che il test in *Tradescantia* generalmente mostra, in quanto le cellule meiotiche (come le cellule madri del polline) sono più suscettibili al danno genotossico rispetto alle cellule mitotiche (come le cellule dell'apice radicale) (Steinkellner et al., 1998). Per quanto riguarda il potenziale genotossico delle miscele di clorito e clorato, i risultati ottenuti riflettono l'andamento descritto per i tre test condotti dopo trattamento con i singoli composti, mostrando una maggiore sensibilità del test delle aberrazioni cromosomiche in *Allium cepa* (positivo a partire dalla più bassa dose testata in entrambi i tipi di miscela) rispetto al test del micronucleo in *Tradescantia* (positivo soltanto alle due più alte dosi testate) e in *Allium cepa* (negativo a tutte le dosi testate). È importante inoltre notare che le concentrazioni a cui le miscele hanno indotto effetti significativamente positivi sono molto più basse rispetto alle concentrazioni efficaci delle soluzioni dei singoli ioni (tabella 2; figura 4). Questo aspetto può essere ricondotto ad un loro possibile effetto sinergico che li rende maggiormente attivi quando sono combinati. In questa ricerca è stata anche indagata la capacità di clorito e clorato di indurre danno al DNA e micronuclei in cellule umane metabolicamente competenti (cellule HepG2).

Il test della cometa condotto su tali cellule ha rilevato un aumento dell'entità di danno al DNA solo dopo trattamento con clorato alla più bassa dose testata; il valore di TI inoltre diminuisce con l'aumentare della dose di clorato. Il test della cometa rileva il danno al DNA sotto forma di rotture a singolo e doppio filamento; tali rotture possono essere dirette oppure indotte dalle condizioni sperimentali (elettroforesi a pH>13) in corrispondenza di siti alcalo-labili creati nella molecola di DNA da altre classi di danno, quali danno ossidativo, siti a-basici, addotti alcalo-labili, cross-link DNA-DNA o DNA-proteine, riparazione incompleta del DNA. I risultati sopra descritti relativi al trattamento con il clorato possono essere ricondotti

Tabella 3 – Micronuclei (MCN) in infiorescenze di *Tradescantia* esposte a soluzioni di clorito e clorato per 24 ore

Clorito (mg/L)	MCN (%)
0,100	12,9 ± 4,0
0,200	16,5 ± 4,5
0,400	23,2 ± 8,7*
0,800	33,3 ± 13,5***
Clorato (mg/L)	MCN (%)
0,100	12,1 ± 1,1
0,200	19,6 ± 9,8
0,400	14,9 ± 3,0**
0,800	11,8 ± 3,6
C-	10,1 ± 4,5
* statisticamente significativo vs C-, secondo il test di Dunnett (p<0,05);	
** statisticamente significativo vs C-, secondo il test di Dunnett (p<0,01);	
*** statisticamente significativo vs C-, secondo il test di Dunnett (p<0,001).	

Tabella 4 – Micronuclei (MCN) in infiorescenze di *Tradescantia* esposte a miscele di clorito e clorato per 24 ore

Clorito:clorato	MCN (%)
1:1 (mg/L)	MCN (%)
0,010:0,010	4,7 ± 1,3
0,025:0,025	7,7 ± 3,8
0,050:0,050	7,4 ± 2,7
0,075:0,075	20,6 ± 7,9***
0,100:0,100	17,6 ± 9,9**
1:2 (mg/L)	MCN (%)
0,010:0,020	3,8 ± 1,5
0,025:0,050	8,9 ± 2,2
0,050:0,100	11,4 ± 5,4
0,075:0,150	19,5 ± 11,1***
0,100:0,200	12,8 ± 6,5
C-	5,8 ± 0,6
** statisticamente significativo vs C-, secondo il test di Dunnett (p<0,01);	
*** statisticamente significativo vs C-, secondo il test di Dunnett (p<0,001).	

Donatella Feretti, Iaria Zerbini, Elisabetta Ceretti, Claudia Zani, Grazia Orizio, Francesco Donato

Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Sezione di Igiene, Università degli Studi di Brescia

Cristina Fatigoni, Milena Villarini, Massimo Moretti, Silvano Monarca

Dipartimento di Specialità Medico-Chirurgiche e Salute Pubblica, Università degli Studi di Perugia

Genotoxicity of chlorite and chlorate

Genotoxicity of chlorite and chlorate, main inorganic by-products in chlorine dioxide disinfected water, was analyzed by means of mutagenicity test on plant systems and human cells. The results showed that chlorite and chlorate were able to induce genotoxic effects at concentrations lower than the Italian law limits

BIBLIOGRAFIA

- Boorman G.A., Dellarco V., Dunnick J.K., Chapin R.E., Hunter S., Hauchman F., Gardner H., Cox M., Sills R.C. 1999. Drinking water disinfection by-products: review and approach to toxicity evaluation. *Environmental Health Perspective*, 107, 207-217.
- Buschini A., Carboni P., Frigerio S., Furlini M., Marabini L., Monarca S., Poli P., Radice S., Rossi C. 2004. Genotoxicity and cytotoxicity assessment in lake drinking water produced in a treatment plant. *Mutagenesis*, 19, 341-347.
- Cantor K.P., Lynch C.F., Hildesheim M.E., Dosemeci M., Lubin J., Alavanja M., Craun G.F. 1998. Drinking water source and chlorination by products in Iowa. I: Risk of bladder cancer. *Epidemiology*, 9, 21-28.
- Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, 455, 81-95.
- Hartmann A., Speit G. 1994. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 23, 299-305.
- IARC. 1991. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Chlorinated Drinking-water; Chlorination By-products; Some Other Halogenated Compounds; Cobalt and Cobalt Compounds, Lyon, International Agency for Research on Cancer. Vol. 52, 45-359.
- Koivusalo M., Pukkala E., Vartiainen T., Jaakkola J.J.K., Hakulinen T. 1997. Drinking water chlorination and cancer - a historical cohort study in Finland. *Cancer Causes Control*, 8, 192-200.
- Li J.W., Yu Z., Cai X., Gao M., Chao F. 1996. Trihalomethanes formation in water treated with chlorine dioxide. *Water Research*, 30, 2371-2376.
- Ma T.H., Anderson V.A., Harris M.M., Neas R.E., Lee T.S. 1985. Mutagenicity of drinking water detected by the Tradescantia micronucleus test. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 27, 143-150.
- Ma T.H., Cabrera G.L., Chen R., Gill B.S., Sandhu S.S., Vandenberg A.L., Salamone M.F. 1994. Tradescantia micronucleus bioassay. *Mutation Research*, 310, 221-230.
- Maffei F., Buschini A., Rossi C., Poli P., Cantelli Forti G., Hrelia P. 2005. Use of the Comet test and micronucleus assay on human white blood cells for in vitro assessment of genotoxicity induced by different drinking water disinfection protocols. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 116-125.
- Monarca S., Richardson S.D., Feretti D., Grotolo M., Thruston A.D., Zani C., Navazio G., Ragazzo P., Zerbini I., Alberti A. 2002. Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 309-318.
- Monarca S., Feretti D., Zani C., Rizzoni M., Casarella S., Gustavino B. 2005. Genotoxicity of drinking water disinfectants in plant bioassays. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 46, 96-103.
- Rank J., Nielsen M.H. 1994. Evaluation of the Allium anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. *Mutation Research*, 312, 17-24.
- Sing N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- 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. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31, 183-191.
- USEPA. 2000. Toxicological review of chlorine dioxide and chlorite. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- WHO. 2004. Guidelines for drinking-water quality. Third Edition. Volume 1. Recommendations. Pp. 515.
- WHO. 2005. Chlorite and chlorate in drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. WHO/SDE/WSH/05.08/86.

alla formazione di cross-link DNA-DNA, l'unico tipo di modificazione della molecola di DNA che causa una diminuzione effettiva della migrazione nel test della cometa (Hartmann e Speit, 1994).

Nel test del micronucleo invece clorito e clorato non hanno mostrato alcun effetto e sembra quindi che non siano in grado di indurre danni cromosomici in cellule HepG2. Negli studi di genotossicità e nelle analisi delle relazioni dose-effetto, un passo fondamentale è rappresentato dalla scelta degli end-points da considerare.

Molti fattori, quali la biodisponibilità, l'attivazione/inattivazione metabolica, la riparazione del DNA, il processo di apoptosi e la sopravvivenza cellulare, possono in vari modi modulare l'effetto finale sull'end-point considerato. In questo studio, sono stati presi in considerazione differenti end-points (aberrazioni cromosomiche, micronuclei e danno al DNA), differenti tipi cellulari (cellule vegetali meiotiche e mitotiche e cellule umane) e differenti organismi (*Allium cepa*, *Tradescantia* e uomo). Clorito, clorato e le loro miscele hanno mostrato un'evidente attività genotossica nelle cellule vegetali, mentre nelle cellule HepG2 solamente il clorato ha indotto un incremento di danno al DNA. Le cellule umane, in particolare le cellule di fegato, sono dotate di numerosi enzimi coinvolti nella detossificazione delle sostanze esogene e nella riparazione del DNA, funzioni meno rilevanti invece nelle cellule vegetali. Tali attività enzimatiche giocano certamente un ruolo chiave nel meccanismo genotossico di clorito e clorato e quindi possono dare spiegazione alle diverse risposte ottenute nei vari tipi cellulari utilizzati.

Conclusioni

Clorite e clorato hanno mostrato la capacità di indurre danno genotossico in sistemi vegetali, anche a concentrazioni inferiori rispetto a quelle riscontrate nelle acque condottate, ma non in cellule umane. Un'ampia batteria di test per analizzare la genotossicità di una sostanza è necessaria per valutare diversi aspetti dell'attività del composto in esame e ottenere una visione più completa della sua potenziale pericolosità. D'altro canto, i risultati qui descritti suggeriscono di condurre ulteriori studi per valutare gli effetti genotossici di clorite e clorato, in particolare quelli derivanti da esposizioni croniche a basse dosi di questi composti, anche in riferimento all'uso sempre più diffuso del biossido di cloro in sostituzione del cloro nella disinfezione delle acque destinate al consumo umano.