



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



**RISPOSTA ORMETICA DI
ESCHERICHIA COLI
ALLA TETRACICLINA**

Autori

Prof.ssa Luciana Migliore – Dipartimento di Biologia, Università degli Studi “Tor Vergata”, Roma

Prof.ssa Maria Cristina Thaller – Dipartimento di Biologia, Università degli Studi “Tor Vergata”, Roma

Dott.ssa Laura Stecca – Dipartimento di Biologia, Università degli Studi “Tor Vergata”, Roma

Dott.ssa Nadia Lucia Cerioli – ISPRA, Roma

INDICE

1. RIASSUNTO	4
PAROLE CHIAVE	5
2. INTRODUZIONE	6
2.1 DEFINIZIONE E GENERALITÀ	6
2.2 ORMESI E ORMOLIGOSI	6
2.3 UN FENOMENO DIFFUSO	8
2.4 ORMESI E ANTIBIOTICI	9
3. MATERIALI E METODI	11
3.1 TEST SU ESCHERICHIA COLI CEPPO K-12 MG1655	11
3.1.2 PROCEDURA SPERIMENTALE	11
4. RISULTATI	13
4.1 CURVE DI CRESCITA	13
5. DISCUSSIONE	17
6. CONCLUSIONI	19
7. BIBLIOGRAFIA	21

1. RIASSUNTO

Risposte di tipo ormetico sono state rilevate in molti organismi filogeneticamente lontani e fisiologicamente molto diversi tra loro, esposti a molti tipi di contaminanti.

In questo lavoro la risposta dose/effetto di tipo ormetico nell'accrescimento numerico, è stata saggiata su un modello biologico ben noto, *Escherichia coli*, esposto alla Tetraciclina, antibiotico di largo uso in clinica umana/veterinaria e in zootecnia intensiva, tanto da rappresentare spesso un contaminante frequentemente rilevato in comparti ambientali acquatici e terrestri a concentrazioni sub-inibenti, cioè quelle che possono provocare una risposta ormetica.

Per determinare se la Tetraciclina fosse in grado di indurre un effetto ormetico sono state saggiate concentrazioni molto al di sotto della MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*, che è 4 µg/ml), in un intervallo tra 0,00375 e 0,12 µg/ml, sull'enterobatterio *Escherichia coli* K12, ceppo MG1655.

Il protocollo sperimentale messo a punto, prevede conte ogni 30' per un periodo di 5 ore, e ha permesso di dimostrare la presenza di una risposta di tipo ormetico nella dinamica di accrescimento del microrganismo.

La 'zona' di risposta ormetica, cioè le concentrazioni in grado di determinare una risposta di "apparente miglioramento" (in questo caso un incremento numerico in termini di numero di Unità Formanti Colonie, CFU) è stata identificata nelle concentrazioni intermedie (0,015 e 0,03 µg/ml), alle quali si rileva un incremento considerevole delle CFU, che arrivano rispettivamente al 135,3 % e al 121,7 % rispetto al controllo.

Alle concentrazioni più alte e più basse il numero di CFU non si discosta in maniera apprezzabile da quella del controllo: è dunque possibile affermare che la curva di crescita di popolazioni di *E. coli* K12 ceppo MG1655, esposte alla Tetraciclina nell'intervallo 0,00375-0,12 µg/ml, è una curva di tipo ormetico a forma di U rovesciata.

Questo dato conferma l'ipotesi che il meccanismo ormetico sia comune a molti (se non a tutti) i viventi e rappresenti una risposta adattativa generica a condizioni di alterata qualità ambientale.

La ormai diffusa presenza di contaminanti a concentrazioni molto basse rende estremamente importante la valutazione di questo tipo di risposta, da cui non si dovrebbe prescindere nei protocolli di monitoraggio ambientale.

Parole chiave

Accrescimento, antibiotici, curva di risposta a U, Escherichia coli MG1655, ormesi, tetraciclina, tossicità

2. INTRODUZIONE

2.1 *Definizione e generalità*

L'ormesi (dal greco ορμειν = eccitare) è una relazione dose-risposta caratterizzata da un effetto bifasico: molti organismi/sistemi biologici esposti ad un'ampia gamma di stimoli, mostrano risposte opposte a seconda della dose; l'ormesi viene considerata una funzione adattativa (Amendola *et al.*, 2006, 2008).

Le risposte ormetiche sono caratterizzate da una modesta stimolazione della funzione interessata (*endpoint*) a basse dosi (30-60% maggiore del controllo) e dall'inibizione della stessa alle alte dosi, è quindi una relazione dose- risposta non lineare (Klonowsky, 1999, 2007).

La curva dose/risposta può essere raffigurata da una U diritta o rovesciata a seconda dell'*endpoint* considerato: è dritta se viene valutato un danno all'organismo (alterazione di funzioni fisiologiche, mortalità o incidenza di malattie), è rovesciata se si considerano funzioni quali accrescimento o sopravvivenza. La trattazione di questi aspetti è già stata affrontata in "Ormesi: la rivoluzione dose/risposta", monografia APAT edita nel 2006 (Amendola *et al.*, 2006).

Tuttavia, è bene precisare che stabilire se gli effetti stimolatori rilevati a basse dosi siano benefici o dannosi non rientra nella definizione del fenomeno: questo invece è oggetto della valutazione del contesto biologico ed ecologico di questo particolare tipo di risposta (Calabrese e Baldwin, 2002).

2.2 *Ormesi e ormoligosi*

Di recente fenomeni analoghi a quelli definiti ormetici sono stati presentati con il nome di ormoligosi.

James e Price (2002) studiando l'effetto dell'*Imidacloprid*, pesticida ad ampio spettro utilizzato fin dai primi anni '80, osservarono che dosi subletali non solo non avevano effetto tossico sugli acari *Tetranychus urticae* (TSSM, *TwoSpotted Spider Mite*) ma anzi, ne stimolavano la riproduzione, determinando

un aumento del numero di uova e, di conseguenza, un incremento numerico della popolazione.

Successivamente Marcic (2003) ha effettuato delle prove per determinare l'effetto della *Clofentezina*, inibitore della crescita, sulla popolazione femminile dello stesso organismo a differenti stadi del ciclo vitale: a concentrazioni che causavano il 90% di mortalità gli organismi sopravvissuti, soprattutto nei primi stadi del ciclo vitale, mostravano una fertilità più alta rispetto al controllo.

Abdullah *et al.* (2005), in una serie di esperimenti condotti su *Bemisia tabaci* esposti a diversi insetticidi, ha dimostrato che alcuni degli insetticidi utilizzati inducono sia un incremento dell'ovodeposizione dell'insetto, sia nella crescita della pianta di cotone su cui veniva sparso l'insetticida.

In tutti i casi sopra riportati è evidente che il modello di risposta, la diffusione del fenomeno e la risposta ai composti è la stessa che caratterizza l'ormesi.

La fig. 1 riporta una curva di risposta ormetica e una lineare, senza soglia.

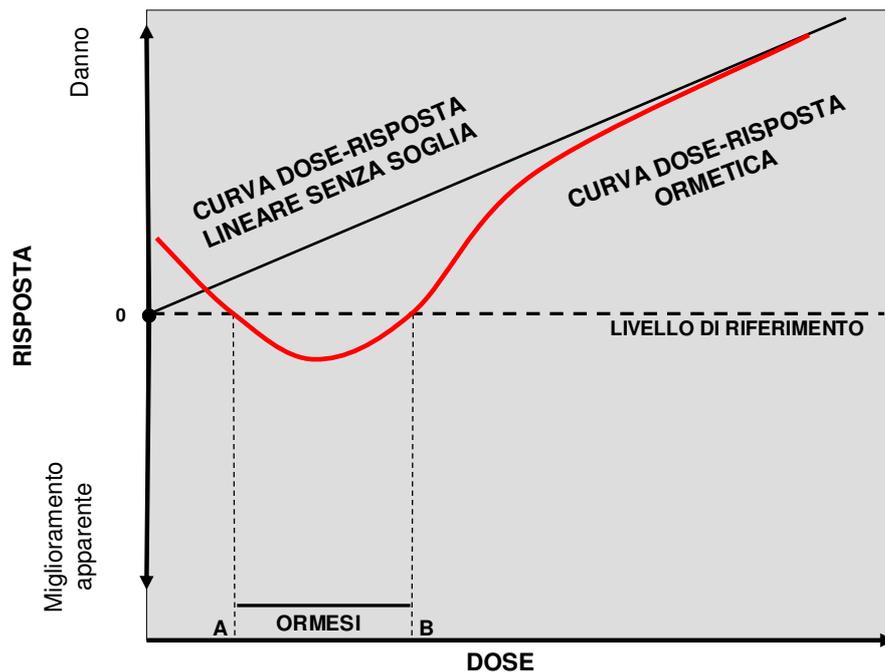


Figura 1. Risposta biologica all'esposizione ad agenti fisici e chimici: la linea continua rappresenta una relazione dose-risposta ormetica, la linea tratteggiata una relazione lineare. Nella curva ormetica alle dosi più basse (<A), si può osservare un effetto di danno; nell'intervallo A e B si osserva un apparente miglioramento; alle dosi più alte (>B) si rileva tossicità o altri effetti nocivi (da Klonowski, 2007, modificata)

L'ormesi sembra anche coinvolta nell'induzione di meccanismi che proteggono dallo stress: questa forma è stata nominata *stress-response hormesis* per distinguerla dal fenomeno finora trattato nel suo senso più ampio (Gems e Partridge, 2008).

Il principio dell'ormesi come risposta allo stress è stata osservata in molti contesti: bassi livelli di insetticida inducono resistenza mediante l'aumento di reazioni di detossificazione verso tali molecole (Calabrese *et al.*, 1999); basse concentrazioni di xenobiotici determinano l'induzione degli enzimi che li metabolizzano, che a loro volta danno protezione contro la carcinogenesi (chemoprotezione) (Talalay *et al.*, 2003).

Ancora, lo stress termico implica l'aumento dell'espressione delle *heat-shock protein* (chaperonine) (che proteggono l'organismo dai danni molecolari responsabili, nel tempo, del processo di invecchiamento), determinando un aumento della durata della vita, come dimostrato in *Caenorhabditis elegans*, in cui stress termici di piccola entità inducono termotolleranza e significativi incrementi della durata di vita (Lithgow e Walker, 2002).

2.3 Un fenomeno diffuso

È ormai pensiero diffuso che l'ormesi si verifichi in tutti i sistemi biologici e rappresenti una risposta adattativa a variazioni di stato o ad alterazioni dei meccanismi di regolazione, indotta da agenti esterni (Stebbing, 1997).

A dimostrazione di ciò, Calabrese e Baldwin (2001, 2003) hanno effettuato un'ampia revisione delle risposte ormetiche in modelli biologici molto diversi ed esposti a tipi differenti di contaminanti e dal 2005 curano un progetto che prevede lo sviluppo di un database sull'argomento basato su *study design*, entità della risposta stimolatoria a basse dosi, significatività statistica e riproducibilità dei risultati.

L'esigenza di raccogliere tutti i lavori che documentano l'effetto deriva dal fatto che l'ormesi sta suscitando un considerevole interesse, data la diffusione e la generalizzabilità del fenomeno. Il resoconto iniziale documentava, infatti, il

presentarsi della risposta ormetica per un ampio *range* di modelli biologici: dai funghi alle alghe, dalle piante agli animali (Calabrese e Blain, 2008).

La diffusione del fenomeno in tutti i comparti ambientali ed in tutti gli organismi viventi, è confermata da studi molto recenti. Lefcort *et al.* (2008) hanno osservato l'effetto dell'esposizione a basse dosi di metalli pesanti su due specie di lumache acquatiche: *Physella columbiana*, comune in siti contaminati da zinco, piombo, cadmio, e *Lymnaea palustris* proveniente da siti incontaminati. *P. columbiana* mostrava risposta ormetica negli individui esposti a basse concentrazioni di metalli, che consisteva in un aumento della crescita e della riproduzione rispetto a quella degli organismi non esposti.

2.4 Ormesi e antibiotici

Non sono molti gli studi sulla capacità degli antibiotici di determinare ormesi; risposte ormetiche sono state rilevate sull'accrescimento di piante terrestri da raccolto (Migliore *et al.*, 1995, 1996, 2008; Brambilla *et al.*, 2007) e infestanti (Migliore *et al.*, 1997, 1998), ma anche di piante acquatiche (Forni *et al.*, 2002), confermando i dati che indicavano come questa risposta sia diffusa nel regno vegetale.

Nonostante storicamente le prime osservazioni sull'ormesi siano state fatte proprio sui microrganismi (Southam e Erlich, 1942), non ci sono dati sperimentali recenti che confortano le antiche osservazioni.

È sembrato dunque di grande interesse valutare gli effetti di basse dosi di antibiotici su un microrganismo rappresentativo e di grande importanza anche clinica quale *Escherichia coli*.

Il farmaco utilizzato nella sperimentazione illustrata in questo lavoro, è la Tetraciclina, scelta per il suo ampio utilizzo sia in veterinaria/zootecnia sia in medicina umana: esso rappresenta uno dei più comuni contaminanti ambientali tra gli antibiotici (Sarmah *et al.*, 2006; Brambilla *et al.*, 2007). È stato dimostrato, sia in prove di laboratorio sia su campo, che molti organismi vegetali sono in grado di assorbire tetracicline (Brambilla *et al.*, 2007; Migliore *et al.*, 2008) o altri

antibiotici di uso veterinario (Migliore *et al.*, 1995, 1996, 1997, 1998, 2000, 2003; Boxall *et al.*, 2006).

Le tetracicline sono state oggetto di studi ecotossicologici su numerosi modelli biologici (Flaherty e Dodson, 2005; Baguer *et al.*, 2000; Boxal *et al.*, 2006; Haling-Sorensen, 2000; Kumar *et al.*, 2005; Wollenberger *et al.*, 2000).

Il piano sperimentale ha previsto l'utilizzo di *Escherichia coli* ceppo MG1655, in un saggio di crescita della durata di 5 ore, in cui un inoculo del ceppo, nella fase di crescita logaritmica, viene fatto crescere a basse concentrazioni di Tetraciclina (da 0.00375 a 0,12 µg/ml), per valutare una possibile risposta ormetica della dinamica di accrescimento della popolazione microbica.

Lo scopo di questo lavoro è stato produrre evidenze sperimentali che chiariscano la dinamica dei fenomeni di tossicità e/o di beneficio apparente della risposta ormetica in un modello sperimentale ben noto, *Escherichia coli*. A tale scopo, è stato messo a punto un nuovo protocollo sperimentale che potrà essere applicato anche in futuro per ricerche sulle basi biochimiche e molecolari del fenomeno ormetico, e valutare la sua risposta alla presenza di antibiotici a livelli di concentrazione comparabili a quelli rilevabili nei comparti ambientali terrestri (come i campi agricoli) o acquatici.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Test su *Escherichia coli* ceppo K-12 MG1655

Escherichia coli K-12 MG1655 (Genotipo: F-lambda-*ilvG- rfb-50 rph-1*; Sierotipo: OR:H48:K-) è un ceppo ottenuto e denominato da Mark Guyer, a partire dal ceppo W1485, che proveniva da una coltura stabilizzata del laboratorio di Joshua Lederberg, diretta discendente dell'isolato K-12 originale; questo ceppo è stato sequenziato da Blattner *et al.* (1997) ed è quello che maggiormente si approssima al *wild-type* di *E. coli*.

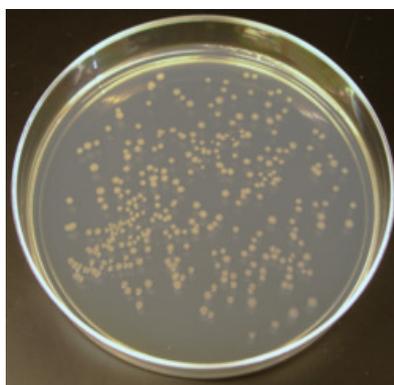


Figura 2. *Escherichia coli*

Il ceppo è stato coltivato in terreno liquido in presenza di concentrazioni crescenti di Tetraciclina, notevolmente inferiori alla Minima Concentrazione Inibente (MIC-*Minimal Inhibitory Concentration*) che, per il ceppo in esame, è pari a 4 µg/ml.

3.1.2 Procedura sperimentale

I terreni utilizzati nell'esperimento, *Muller Hinton Broth* (MHB) per la determinazione della curva di crescita e il *Trypticase Soy Agar* (TSA) per le conte.

Sono state allestite diluizioni seriali per ottenere le concentrazioni finali di tetraciclina riportate in Tab. 1; ciascuna diluizione veniva inoculata con *E. coli* MG 1655 a partire da una sospensione di assorbanza a 600 nm (A_{600}) uguale a 0,14 in modo da ottenere una densità finale di circa 5×10^5 cellule per ciascuna concentrazione.

Tabella 1. Concentrazioni sperimentali.

Falcon (#)	Tetraciclina ($\mu\text{g/ml}$)
1	0,12
2	0,06
3	0,03
4	0,015
5	0,0075
6	0,00375
Controllo	-----

La valutazione della dinamica di crescita delle colture è stata fatta effettuando ogni mezz'ora, per 5 ore dal momento della semina (T0-T10), conte del numero di microrganismi presenti nel mezzo di coltura. La prima conta (T0) viene effettuata immediatamente dopo l'introduzione dell'inoculo iniziale e, in seguito, le provette vengono tenute in termostato a 37 °C per l'intera durata dell'esperimento.

Le conte sono state effettuate allestendo diluizioni note, in base 10, del mezzo di crescita e inoculandone 5 μl su piastre di TSA (*Trypticase Soy Agar*). Da queste *microconte*, opportunamente convertite, è possibile risalire al numero effettivo di cellule presenti nella coltura al momento del prelievo e tracciare quindi la curva di crescita della coltura.

La procedura sperimentale è stata messa a punto con una serie di esperimenti effettuati tra giugno e dicembre 2007; prove sperimentali reiterate sono state effettuate tra gennaio e luglio 2008, per avere una valutazione della riproducibilità del fenomeno.

4. RISULTATI

4.1 Curve di crescita

L'effetto di basse concentrazioni di Tetraciclina sulla dinamica di popolazione di *Escherichia coli*, ceppo K-12 MG1655 è stato valutato confrontando la curva di crescita del controllo con quella rilevata nei microrganismi esposti alle diverse concentrazioni di antibiotico, in 5 prove di cui si riportano qui di seguito i valori medi e le deviazioni standard.

La curva di crescita del ceppo in condizioni standard di laboratorio (37 °C, buio) mostra che la densità della coltura passa da 1×10^7 CFU a circa 5×10^7 CFU nelle prime 4 ore, poi l'incremento diventa velocissimo (fase logaritmica) fino a 4,5 ore per poi rallentare, mantenendo la densità della coltura intorno a $1,5 \times 10^8$ CFU dopo 5 ore. La coltura si stabilizza su questo valore, sul quale rimane praticamente inalterato fino a 24 ore. La curva di crescita del controllo è riportata in fig. 10.

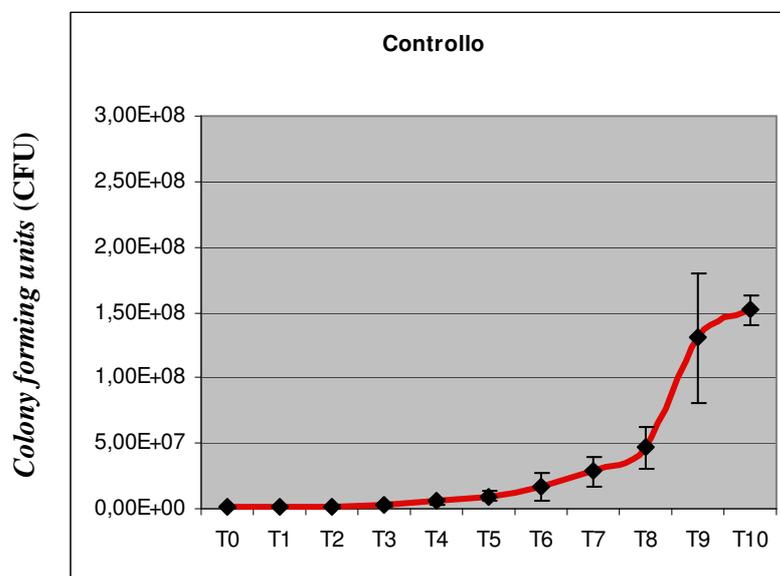


Figura 3. Curva di crescita di una coltura di Controllo. Ciascun punto rappresenta il valore medio di 5 prove; le barre mostrano la deviazione standard. Le conte delle CFU sono state effettuate ogni mezz'ora, per 5 ore dal momento della semina (T0-T10).

Invece, la presenza di basse concentrazioni di tetraciclina è in grado di alterare la dinamica di crescita del microrganismo.

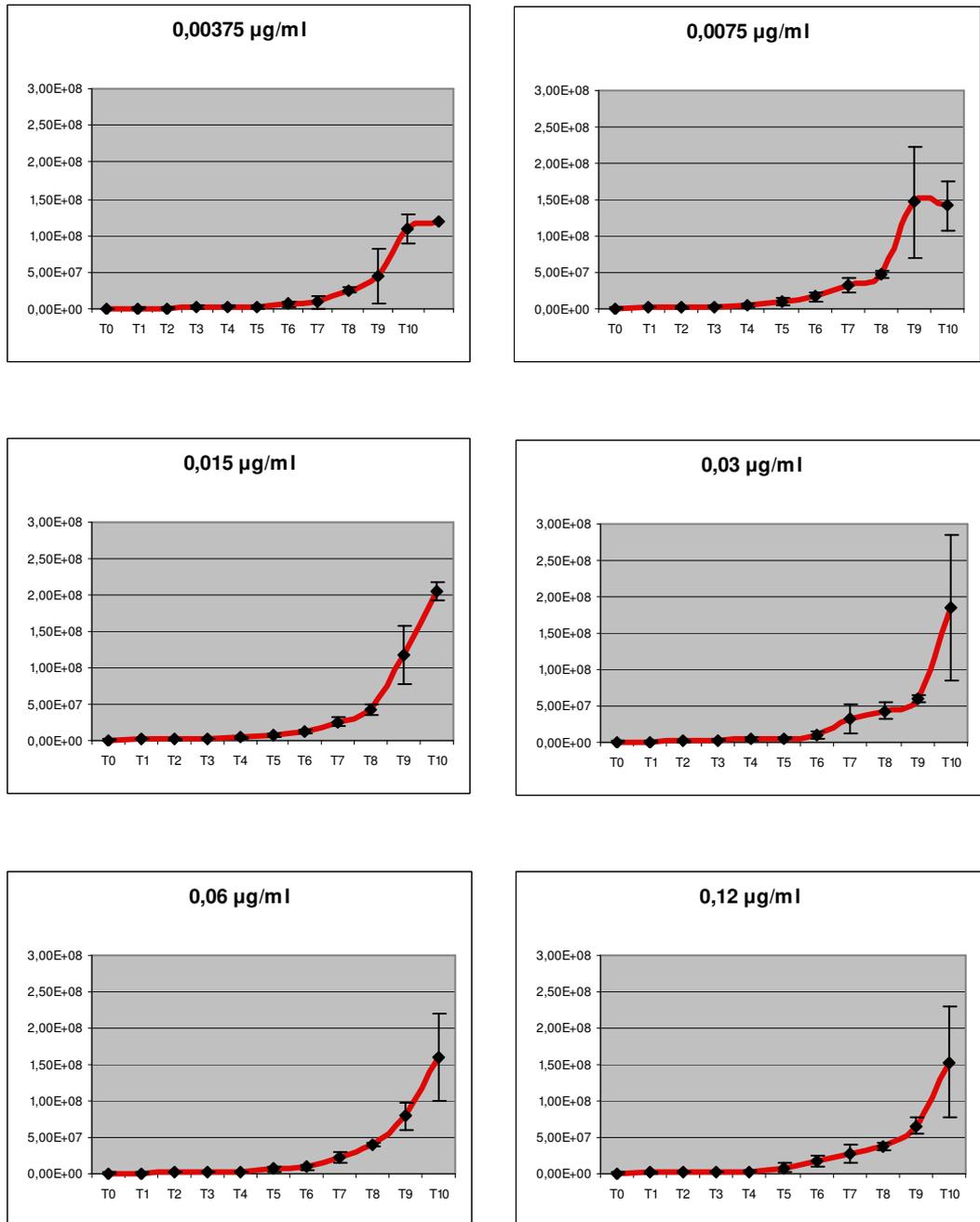


Figura 4. Curva di crescita alle diverse concentrazioni. Le conte delle CFU sono state effettuate ogni mezz'ora, per 5 ore dal momento della semina (T0-T10).

Come si vede in fig. 11 alla concentrazione di 0,00375 µg/ml la curva di crescita appare analoga a quella del controllo, sebbene alla fine della prova il

numero di CFU sia un po' più basso del controllo. Invece, a 0,0075 µg/ml già a partire dalle 3 ore si rileva un incremento del numero di CFU, l'incremento è massimo a 4,5 ore e, come nel controllo, tra 4,5 e 5 ore il numero di CFU rimane inalterato. A 0,015 µg/ml l'incremento del numero di CFU a partire dalle 3 ore è ancora più marcato, continua ad essere elevato fino alla fine della prova; di conseguenza, il numero di CFU raggiunto alla fine della prova è consistentemente più alto di quello del controllo. Analoga dinamica della curva di crescita si rileva anche a 0,03 µg/ml, per quanto il numero di CFU sia un po' più basso di quello rilevato a 0,015 µg/ml; anche in questo caso il numero di CFU alla fine della prova è più alto di quello del controllo. Alle concentrazioni successive si rileva una riduzione dell'incremento e i risultati finali in termini di CFU sono praticamente sovrapponibili a quelli rilevati per il controllo.

In fig. 12 è riportato il quadro riassuntivo della dinamica del processo di crescita di *E. coli* K12, ceppo MG1655, in presenza di Tetraciclina dopo 5 ore di coltura.

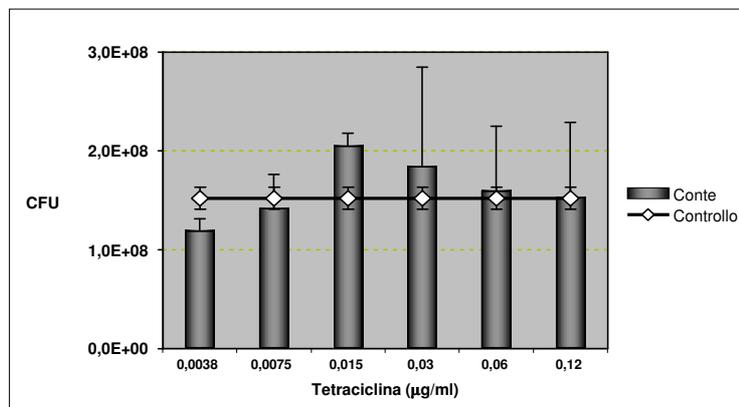


Figura 5. Entità finale della crescita di *E.coli* K12 MG1655 (numero di CFU aggiunte dopo 5 ore) a diverse concentrazioni di tetraciclina. Valore medio di 5 prove e deviazione standard.

A 0,00375 µg/ml il numero finale di CFU prodotte è inferiore a quello del controllo; a 0,0075 µg/ml i valori di CFU si avvicinano a quelli del controllo, mentre a 0,015 µg/ml il numero finale di CFU è considerevolmente maggiore. Questo incremento va progressivamente diminuendo con l'aumentare della

concentrazione fino a tornare a valori di CFU analoghi a quelli del controllo alla concentrazione di 0,12 µg/ml.

5. DISCUSSIONE

La curva dose/risposta di tipo ormetico, cioè il *continuum* tra effetto avverso e apparente miglioramento (*sensu* Stebbing, 1997) è stata rilevata valutando l'accrescimento di *Escherichia coli* K12 ceppo MG1655, esposto all'antibiotico Tetraciclina. In particolare questo lavoro è stato dedicato ad approfondire la dinamica della porzione di curva ormetica di "miglioramento apparente".

La Tetraciclina, a dosi molto al di sotto della MIC (4 µg/ml), in un esperimento della durata di 5 ore, modifica la curva di accrescimento di *Escherichia coli* K12, ceppo MG1655. La concentrazione più bassa di Tetraciclina (0,00375 µg/ml) determina una riduzione dello sviluppo (78,9 % del controllo) ma all'aumentare della concentrazione prevale l'effetto di stimolazione dell'accrescimento numerico: a 0,0075 µg/ml la riduzione è meno evidente e infatti passa al 93,6 % del controllo mentre alla concentrazione successiva (0,015 µg/ml) si rileva il massimo di incremento, che raggiunge il valore del 135,3 % del controllo. Il processo si inverte all'aumentare della concentrazione di Tetraciclina: la percentuale di CFU rispetto al controllo torna progressivamente a ridursi scendendo dal 121,7% a 0,03 µg/ml, al 105,2% a 0,06 µg/ml per ritornare a 100,8%, sovrapponibile al controllo, alla concentrazione di 0,12 µg/ml.

È quindi possibile identificare la curva dose/risposta della crescita numerica di *E. coli* MG1655 esposta a Tetraciclina nell'intervallo 0,00375-0,12 µg/ml con una curva di tipo ormetico a forma di U rovesciata; inoltre, l'intervallo di concentrazioni di Tetraciclina utilizzato è quello che determina il "miglioramento apparente" come definito da Klonowsky (1999) nelle relazioni dose-risposta non lineari.

E' interessante notare che nei diversi esperimenti effettuati, la risposta della popolazione microbica alla presenza di tetraciclina nel mezzo è stata abbastanza omogenea alle concentrazioni più basse mentre, alle dosi tra 0,03 e 0,12 µg/ml, in cui si rileva la risposta ormetica, la variabilità della risposta è piuttosto elevata.

Quest'ultimo dato è di grande importanza anche alla luce delle nuove evidenze sperimentali che si stanno accumulando sul ruolo delle concentrazioni sub-inibenti di antibiotico, che possono svolgere altri ruoli, oltre quello di

meccanismi di difesa dai competitori: esse possono funzionare come innesco dell'espressione di determinanti di virulenza, possono attivare/favorire la formazione di *biofilm* o incrementare la motilità batterica (Linares *et al.*, 2006), come pure essere coinvolti nell'attivazione di meccanismi *quorum sensing* (Fajardo e Martinez, 2008). La risposta ormetica può dunque essere correlata anche a queste funzionalità degli antibiotici recentemente identificate.

Va sottolineato che questo è il primo dato sperimentale di risposta ormetica indotta nella curva di crescita di microrganismi, in particolare in *E. coli*, ottenuto nella letteratura più recente; e ancora, che il protocollo messo a punto per questo esperimento, potrà essere utilizzato per la valutazione di fenomeni ormetici in altri microrganismi e per proseguire l'approfondimento biochimico/fisiologico di questo studio.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, il presente lavoro di ricerca ha dimostrato che anche per ciò che riguarda l'accrescimento numerico di *E. coli* l'ormesi rappresenta la risposta alla presenza di basse concentrazioni di Tetraciclina nel mezzo ambiente. Inoltre, il protocollo messo a punto apre prospettive per ulteriori indagini su questo fenomeno.

La presenza di risposte di tipo ormetico in organismi filogeneticamente lontani e fisiologicamente molto diversi conferma l'ipotesi che il meccanismo ormetico sia comune a molti (se non a tutti) i sistemi viventi. Su questa base teorica non si dovrebbe dunque più prescindere dal considerare l'ormesi nei protocolli di monitoraggio ambientale: sarà fondamentale approfondire gli studi in questo campo ancora così poco esplorato. Informazioni più dettagliate sulle risposte ormetiche saranno fondamentali nel lavoro di definizione delle soglie di tossicità, necessarie a garantire la salvaguardia di ecosistemi naturali e antropizzati. Infatti, ignorare le risposte ormetiche, in particolare utilizzare modelli che non considerino gli effetti potenziali dell'ormesi, può influenzare le stime statistiche nell'analisi del rischio e la valutazione della tossicità/ecotossicità di xenobiotici, inclusi i farmaci.

Quindi, nelle linee guida di valutazione del rischio si impone la necessità di utilizzare modelli che includano gli effetti e le conseguenze dell'esposizione a basse dosi, finora non considerati (Klonowsky, 1999).

Il fenomeno dell'ormesi ha provocato un intenso dibattito, e ha stimolato il fiorire di molte ricerche. Molti autori suggeriscono che l'ormesi non debba essere presa in considerazione per giustificare un indebolimento degli *standard* regolatori correnti (Elliot, 2008): infatti, uno dei punti chiave di questa fase della ricerca sull'ormesi sarà quella di valutare quanto il fenomeno di "miglioramento apparente" non debba essere effettivamente considerato una sorta di *tossicità mascherata*. Un altro punto caldo è se e come il principio di precauzione possa essere interessato dal fenomeno dell'ormesi: su questo punto il dibattito è stato molto acceso negli anni scorsi nonostante in alcuni lavori vi sia un tentativo per

avvicinare l'ormesi, se accettata in tossicologia e gestione del rischio, al principio di precauzione (Calabrese, 2004).

Poiché il fenomeno "ormesi" interessa numerosi ambiti che vanno dalla tossicologia/ecotossicologia alla salute pubblica, all'economia, determinando un diffuso interesse per il fenomeno, le possibili implicazioni rendono necessaria una legislazione che ne tenga conto. La prospettiva di una normativa che integri il fenomeno ormetico dovrebbe prevedere alla base un processo conoscitivo e deliberativo con una base molto ampia, che potrebbe incrementare la ricerca nel campo; inoltre, potrebbe fornire l'opportunità a molti *stakeholder* (portatori di interesse: dalle istituzioni ai consumatori, agli utenti, all'opinione pubblica, ai non-esperti), di analizzare e formarsi il giudizio su di una problematica scientifica di grande rilevanza (Elliot, 2008).

7. BIBLIOGRAFIA

Abdullah N.M.M., Singh J., Sohal B.S., 2005, "Behavioral hormoligosis in oviposition preference of *Bemisia tabaci* on cotton", *Pesticides Biochem. Physiol.*, 84:10-16.

Amendola A., Cerioli N.L., Migliore L., 2006, "Ormesi: la rivoluzione dose/risposta", *Monografie APAT*, pp. 1-35, IGER, Roma.

Baguera A.J., Jensenb J., Henning Kroghb P., 2000, "Effects of the antibiotics oxytetracycline and tylosin on soil fauna", *Chemosphere* 40:751-757.

Blackwell P.A., Holten Lützhøft H.C., Ma H.P., Halling-Sørensen B., Boxall A.B., Kay P., 2004a, "Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection", *Talanta*, 64(4):1058-64.

Blackwell P.A., Lützhøft H.C., Ma H.P., Halling-Sørensen B., Boxall A., Kay P., 2004b, "Fast and robust simultaneous determination of three veterinary antibiotics in groundwater and surface water using a tandem solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography-UV detection", *J. Chromatogr. A*, 1045(1-2):111-117.

Blattner F.R., Plunkett III G., Bloch C.A. et al., 1997, "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12", *Science*, 277:1453-74.

Boxall B.A. Alistair, Johonson P., Smith E.J., Sinclair C.J., Stutt E., Levy L.S., 2006, "Uptake of Veterinary Medicines from Soils into Plants", *J. Agric. Food Chem.*, 54:2288-2297

Brambilla G., Patrizii M., De Filippis S.P., Bonazzi G., Mantovi P., Barchi D., Migliore L., 2007, "Oxytetracycline as environmental contaminant in arable lands", *Anal. Chim. Acta*, 586(1):326-329.

Calabrese E.J., 2002, "Hormesis: changing view of the dose-response, a personal account of the history and current status", *Mutation Res.*, 511:181-185.

Calabrese E.J., 2004, "Precautionary principle and hormesis", *BELLE (Biological Effects of Low Level Exposures) Newsletter*, 12(2):1-35.

Calabrese E.J., Baldwin L.A., 2000, "Chemical hormesis: its historical foundation as a biological hypothesis", *Human Exper. Toxicol.*, 19, 2-97.

Calabrese E.J., Baldwin L.A., 2001, "Hormesis: U-shaped dose response and their centrality in toxicology", *Trend Pharmacol. Sci.*, 22(6), 285-291.

Calabrese E.J., Baldwin L.A., 2002, "Defining hormesis", *Human Exper. Toxicol.*, 21:91-97.

Calabrese E.J., Baldwin L.A., 2003, "The dose-response revolution", *Annual. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 43:175-97.

Calabrese E.J., Blain R.B., 2008, "Hormesis and plant biology", *Environ. Pollut.*, doi:10.1016/j.envpol.2008.07.028.

Calabrese E.J., Baldwin L.A., Holland, C.D., 1999, "Hormesis: A highly generalizable and reproducible phenomenon with important implications for risk assessment", *Risk Anal.*, 19:261–281.

Elliot K.C., 2008, "A case of deliberation in response to hormesis research", *Human Exper. Toxicol*, 27:529-538

Forni C., Cascone A., Fiori M., Migliore L., 2002, "Sulfadimethoxine and *Azolla filiculoides* Lam.: a model for drug remediation", *Water Res.*, 36(13):3183-3184.

Fajardo A., Martínez J.L., 2008, “Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses”, *Curr. Opin. Microbiol.*, 11:161-167.

Flaherty C.M., Dodson S.I., 2005, “Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction”, *Chemosphere* 61:200–207.

Gems D., Partridge L., 2008, “Stress response hormesis and aging: <That which does not kill us makes us stronger>”, *Cell Metabolism*, 7(3):200-203.

Halling-Sorensen B., 2000, “Algal toxicity of antibacterial agents used in intensive farming”, *Chemosphere* 40:731-739

James D.G., Price T.S., 2002, “Imidacloprid Boosts TSSM Egg Production”, *Agrichemical and Environmental News*, Issue No. 189. <http://aenews.wsu.edu>

Klonowski W., 1999, “Non-linearity and statistics - implications of hormesis on dose- response analysis”, *Biocyb. Biomed. Eng.*, 19:41-55.

Klonowski W., 2007, “From conformons to human brains: an informal overview of nonlinear dynamics and its applications in biomedicine”, *Nonlinear Biomedical Physics*, 1:1-19.

Kumar K., Gupta S. C., Baidoo S.K., Chander Y., Rosen C.J., 2005, ”Antibiotic Uptake by Plants from Soil Fertilized with Animal Manure”, *J. Environ. Quality*, 34:2082–2085.

Lefcort H., Freedman Z., House S., Pendleton M., 2008, “Hormetic effects of heavy metals in aquatic snails: is a little bit of pollution good?”, *EcoHealth*, 5:10–17.

Linares J.F., Gustafsson I., Baquero F. and Martinez J.L., 2006, “Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons”, PNAS, 103(51):19484-19489.

Marcic D. 2003, “The effects of clofetezine on life-table parameters in two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*”, *Exper. Appl. Acarology*, 30:249-263.

Migliore L., Brambilla G., Cozzolino S., Gaudio L., 1995, “Effects on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*)”, *Agricult. Ecosyst. Envir.*, 52:103-110.

Migliore L., Brambilla G., Casoria P., Civitareale C., Cozzolino S., Gaudio L., 1996, “Effect of Sulphadimethoxine on barley (*Hordeum distichum* L., Poaceae, Liliopsida) in laboratory terrestrial models”, *Agricult. Ecosyst. Envir.*, 60:121-128.

Migliore L., Civitareale C., Brambilla G., Cozzolino S., Casoria P., Gaudio L., 1997, “Effect of Sulphadimethoxine on cosmopolitan weeds (*Amaranthus retroflexus* L., *Plantago major* L. and *Rumex acetosella* L.)”, *Agricult. Ecosyst. Envir.*, 65:163-168.

Migliore L., Civitareale C., Cozzolino S., Casoria P., Brambilla G., Gaudio L., 1998, “Laboratory models to evaluate phytotoxicity of Sulphadimethoxine on terrestrial plants”, *Chemosphere*, 37(14-15): 2957-2961.

Migliore L., Cozzolino S., Fiori M., 2000, “Phytotoxicity to and uptake of Flumequine used in intensive aquaculture on the aquatic weed, *Lythrum salicaria* L.”, *Chemosphere*, 40:741-750.

Migliore L., Cozzolino S., Fiori M., 2003, “Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants”, *Chemosphere*, 52(7):1233-1244.

Migliore L., Godeas F., De Filippis S.P., Bonazzi G., Mantovi P., Barchi D., Brambilla G., 2008, “Effetti della contaminazione da tetracicline sul mais (*Zea mays* L.): rischi del trasferimento di farmaci con la fertirrigazione”, Atti del Congresso congiunto AIOL-SitE, in press.

Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall B.A, 2006, “A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment”, *Chemosphere*, 65, 725–759.

Southam C.M., Ehrlich J., 1943, “Effects of extract of Western Red Cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture”, *Phytopathology*, 33:517-524.

Stebbing A.R.D., 1997, “A theory for growth hormesis”, *Mutation Res.*, 403:249-258.

Talalay P., Dinkova-Kostova A.T., Holtzclaw W.D., 2003., “Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis”, *Adv. Enzyme Regul.*, 43:121–134.

Walker G.A., Lithgow G.J., 2002, “Stress resistance as a determinate of *C. elegans* lifespan”. *Mech. Ageing Dev.* 123:765-771.

Wollenberger L., Halling-Sorensen B., Kusk K.O., 2000, “Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*”, *Chemosphere*, 40:723-730.