



**BIOMONITORAGGIO DELLA CENTRALE
ENEL A CARBONE “TORVALDALIGA NORD”**

ANNO 2011

Introduzione

Il progetto si propone di valutare l'impatto dovuto alla riconversione a carbone della Centrale ENEL di Civitavecchia "Torvaldaliga nord" attraverso azioni di biomonitoraggio.

I principali inquinanti potenzialmente dannosi emessi della Centrale attualmente in costruzione saranno: SO₂, NO_x, polveri sottili e ultrasottili, radiazioni ionizzanti dovuti alla presenza di radionuclidi in tracce nel carbone e nelle ceneri, metalli pesanti (in particolare As, Ni e Hg), IPA (idrocarburi policiclici aromatici), PCDD/PCDF (diossine), ammoniaca e alogenuri.

Il progetto si compone di tre azioni modulari e complementari di biomonitoraggio sulla componente vegetale, animale ed umana:

- **Monitoraggio di impatto ambientale tramite uso di bioindicatori vegetali (licheni).**
- **Valutazione del danno primario al DNA (comet assay) in organismi animali "sentinella" sia terrestri che marini.**

Dette azioni sono già state svolte nel 2010. I risultati che si otterranno nell'anno 2011 saranno utili per un confronto con quelli dell'anno precedente al fine di valutare una modifica dei parametri ambientali collegati al funzionamento della Centrale.

Monitoraggio di impatto ambientale tramite uso di bioindicatori vegetali (licheni)

Lo scopo del progetto è effettuare uno studio di biomonitoraggio della qualità ambientale tramite licheni epifiti nel territorio interessato dalla centrale termoelettrica di Torre Valdaliga Nord (Civitavecchia - Roma), di recente conversione a carbone, come richiesto dall'osservatorio ambientale costituito dai comuni limitrofi (Allumiere, Civitavecchia, Santa Marinella, Tarquinia e Tolfa). Questo studio mira principalmente a fornire una stima dell'impatto della conversione monitorando l'evoluzione e i cambiamenti che si verificheranno nel corso degli anni nelle comunità licheniche presenti nell'area interessata dall'attività della centrale in oggetto. Come punto "zero" dello studio, si fa riferimento all'indagine effettuata nel 2010, anno di attivazione del nuovo impianto.

Le metodologie applicate per ottenere la valutazione della qualità dell'aria sono:

1. Determinazione dell'Indice di Biodiversità Lichenica (I.B.L.)

2. Analisi chimica degli elementi in traccia accumulati in talli lichenici trapiantati.

La bioindicazione utilizza la sensibilità dei vegetali ai contaminanti atmosferici e permette di ottenere informazioni sulla situazione ambientale di vaste aree. Nelle specie sensibili, in caso di inquinamento, possono verificarsi modificazioni morfologiche, modificazioni fisiologiche con seguente riduzione della vitalità e danni genetici che si riflettono in cambiamenti a livello delle comunità vegetali e della biodiversità (metodo indiretto).

Nel caso del bioaccumulo, si utilizzano specie resistenti all'inquinamento atmosferico o comunque in grado di accumulare nel tempo quantità anche elevate di elementi quali metalli pesanti, composti organici, radionuclidi ed altri composti. Questa tecnica prevede l'analisi chimica degli elementi accumulati nel materiale vegetale (metodo diretto).

1. Indice di Biodiversità Lichenica

La biodiversità dei licheni epifiti ha dimostrato di essere un eccellente indicatore dell'inquinamento da sostanze gassose fitotossiche. I licheni rispondono infatti con relativa velocità ai cambiamenti ambientali e possono ricolonizzare in pochi anni ambienti urbani ed industriali qualora si verifichi un miglioramento delle condizioni ambientali, come dimostrato in molte parti d'Europa (Seaward, 1997). Gli studi della qualità dell'aria mediante licheni hanno trovato anche in Italia larga diffusione a partire dagli anni ottanta. La metodologia oggi utilizzata si basa su un protocollo standardizzato, pubblicato dall'Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (ANPA 2001),

concordato in ambito europeo e che definisce regole precise per le strategie di campionamento, il rilevamento ed il calcolo della biodiversità lichenica.

L'I.B.L. consente di stimare gli effetti biologici dell'inquinamento misurando le deviazioni da condizioni normali delle comunità licheniche. Tale metodologia risulta essere particolarmente utile per stimare gli effetti sinergici degli inquinanti sulla componente biologica e rappresenta quindi uno strumento indispensabile di monitoraggio non alternativo, ma complementare a quello strumentale.

Per il presente studio, sono state individuate, seguendo la metodologia ANPA, 25 stazioni (UCP, Unità di Campionamento Primarie). Le UCP non sono state uniformemente distribuite sul territorio, ma disposte con una densità maggiore vicino alla centrale di Torre Valdaliga e minore nelle zone più lontane dalla centrale, anche in funzione della direzione dei venti principali. L'I.B.L. verrà determinato in 18 delle 25 UCP individuate inizialmente.

Le UCP sono aree quadrate con lato di 1 km all'interno delle quali, secondo procedure standard, vengono individuati gli alberi (forofiti) su cui si esegue il rilevamento della biodiversità lichenica.

La B.L. sarà rilevata su *Quercus pubescens*, *Q. cerris*, *Q. ilex*, *Tilia* sp. e *Pyrus piraster*, specie arboree a scorza acida presenti nell'area. Il numero di forofiti su cui effettuare i rilievi in ciascuna UCP sarà compreso tra un minimo di 3 e un massimo di 12, a seconda della disponibilità di alberi in possesso delle caratteristiche di rilevabilità. Per raggiungere le UCP e georeferenziare i forofiti si farà uso di una apparecchiatura GPS. L'I.B.L. verrà rilevato utilizzando il reticolo descritto nel manuale ANPA (2001) e tutte le informazioni necessarie per l'individuazione delle stazioni e dei forofiti e per la ripetizione dello studio verranno riportate nelle apposite schede.

I valori di I.B.L. rilevati saranno interpretati utilizzando la scala di interpretazione elaborata per l'area Tirrenica (Loppi *et al.*, 2002) che permette di individuare 5 classi di alterazione rispetto a condizioni ambientali considerate di "naturalità". I risultati verranno rappresentati graficamente producendo una carta di naturalità/alterazione con il programma di mappatura Surfer 7.0.

Inoltre, i dati verranno correlati con la presenza industriale e urbana e con i fattori climatici, la lista floristica sarà analizzata e commentata e, per ogni stazione, verranno elaborati gli indici ecologici di pH, xerofitismo, fotofitismo ed eutrofizzazione delle specie per una migliore caratterizzazione dell'area di studio.

2. Bioaccumulo nei licheni

Il progetto prevede un monitoraggio biologico basato sull'utilizzo di trapianti lichenici, poiché, da un sopralluogo effettuato nell'area di indagine, è emersa l'assenza di una vegetazione lichenica idonea all'analisi di talli presenti *in situ*.

Per le indagini di bioaccumulo verrà utilizzato il lichene *Evernia prunastri* (L.) Ach., uno dei licheni fruticosi più comuni d'Italia, già ampiamente utilizzato in studi del genere. Le caratteristiche morfologiche del tallo, costituito da lobi (lacinie) a sezione appiattita, offrono una grande superficie di esposizione e favoriscono la preparazione del campione per le analisi chimiche.

Le stazioni di monitoraggio per il bioaccumulo saranno fatte coincidere con quelle utilizzate per il rilevamento dell'I.B.L. per favorire l'integrazione dei risultati ottenuti con le due metodologie.

Le metodiche di campionamento, preparazione ed analisi chimiche dei campioni seguiranno le linee guida proposte dall'APAT.

I talli di *E. prunastri* necessari per i trapianti saranno raccolti nella Riserva Naturale di Monte Casoli (VT), dove l'elevato grado di naturalità dell'area, non antropizzata e lontana da evidenti fonti d'inquinamento, garantisce una bassa concentrazione iniziale di metalli nei licheni. Questo permetterà di distinguere facilmente l'accumulo di tali elementi dovuto all'esposizione.

Le "bags" verranno realizzate con porzioni di 10 × 20 cm di rete in plastica a maglie di dimensioni 0,5 × 0,5 cm, preventivamente lavate in acqua distillata e chiuse con un filo in PVC con il quale saranno anche fissate agli alberi. In ciascuna bag verranno posizionati tre talli distesi, in modo da evitare sovrapposizioni e massimizzare la superficie esposta. Alcuni dei talli raccolti saranno conservati a -80°C come materiale di riferimento ("bianco") per le analisi.

Le bags verranno esposte entro 3 giorni dall'allestimento, in ciascuna stazione, su rami di alberi preventivamente ripuliti da foglie o ramificazioni secondarie, ad un'altezza da terra maggiore di 150 cm per evitare contaminazioni derivanti dal suolo. Le bags saranno esposte evitando la prossimità di strade ad elevato traffico veicolare o altre fonti d'inquinamento per un periodo di 3-4 mesi.

I campioni ritirati saranno estratti dalle bags, ripuliti dal materiale estraneo, essiccati in stufa a temperatura non superiore a 40° per limitare la perdita degli elementi volatili, polverizzati in mortai a sfere d'agata e sottoposti alle analisi di laboratorio.

La determinazione del contenuto dei metalli pesanti verrà effettuata mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico. Si procederà alla determinazione delle concentrazioni dei seguenti elementi: alluminio (Al), arsenico (As), berillio (Be), cadmio (Cd), cromo (Cr), rame (Cu), ferro (Fe), manganese (Mn), mercurio (Hg), nichel (Ni), piombo (Pb), titanio (Ti), vanadio (V) e zinco (Zn).

I risultati delle analisi verranno interpretati sia singolarmente che in relazione ai dati ottenuti con il metodo dell'I.B.L.

Riferimenti bibliografici

ANPA, 2001. I.B.L. Indice di Biodiversità Lichenica. Manuale e Linee Guida 2/2001, 85 pp.

- Heggestad H.E., 1991. Origin of Bel W3, Bel C and Bel B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution* 74: 264-291.
- Loppi S., Giordani P., Brunialti G., Isocrono D., Piervittori R., 2002. A new scale for the interpretation of lichen biodiversity values in the Tyrrhenian side of Italy. *Bibliotheca Lichenologica* 82: 237-243.
- Lorenzini G., 1994. A miniaturized kit for ozone biomonitoring. *Applied Biochemistry & Biotechnology* 48: 1-4.
- Seaward M.R.D., 1997. Urban deserts bloom: a lichen renaissance. *Bibliotheca Lichenologica* 67 : 297-309.

Valutazione del danno primario al DNA (comet assay) in organismi animali “sentinella”

La valutazione di esposizione precoce ad agenti mutageni verrà effettuata attraverso l'analisi del danno primario al DNA (Comet assay) in tre differenti organismi animali “sentinella” opportunamente scelti, rappresentanti di differenti habitat presenti nel territorio potenzialmente interessato dall'impatto della centrale termoelettrica a carbone.

L'analisi del grado di rottura del DNA valutato attraverso il test della cometa come “biomarcatore” di esposizione correlato al rischio cancerogenetico, al danno riproduttivo e ad altri effetti negativi derivanti dall'inquinamento ambientale è stato valutato in diversi organismi animali (pesci ossei, anfibi molluschi, policheti, crostacei) esposti a diversi contaminanti ambientali derivanti dalle attività antropiche come metalli pesanti, idrocarburi policiclici aromatici, diossine e composti mutageni nitroderivati (Shugart, 1990; Everaarts *et al.*, 1994; Everaarts *et al.*, 1995; Padranghi *et al.*, 1995; Belpaeme *et al.* 1996; Ralph *et al.*, 1996; Mitchelmore and Chipman 1998, Lee and Steinert 2003; Regoli *et al.* 2006)

Il Comet Assay risulta quindi un metodo sensibile affermatosi anche perché tecnicamente semplice e potenzialmente applicabile a qualsiasi cellula eucariote nucleata.

La valutazione della esposizione precoce ad agenti mutageni verrà effettuata attraverso l'analisi del danno primario al DNA (Comet assay) nei seguenti organismi: il pesce osseo lagunare *Aphanius fasciatus*, il cefalopode marino-costiero *Paracentrotus lividus*, un echinoderma marino-costiero *Octopus vulgaris* e il gasteropode terrestre *Helix aspersa*. Le stazioni di campionamento sono descritte nella cartina allegata.

1 *Aphanius fasciatus*

Il pesce *Aphanius fasciatus* è tipico di ambienti lagunari del mediterraneo, dove compie l'intero ciclo biologico. Si tratta di una specie relegata a questi ambienti che solo a causa di eventi alluvionali può essere trasportata passivamente in mare. Per tale motivo questa risulta una specie target idonea, rappresentativa delle condizioni ambientali delle lagune in cui vive, le quali, a loro volta, per la scarsa circolazione idrica possono essere sede di accumulo di eventuali inquinanti.

La stazione di campionamento scelta è la R.N. delle Saline di Tarquinia, area protetta che non è sottoposta ad impatti antropici, che è posta a N.O. rispetto alla Centrale di Torrevaldalica nord, quindi sottovento rispetto ai venti dominanti di scirocco.

Le analisi saranno condotte su eritrociti di 5 – 10 individui per ogni campionamento effettuato; saranno condotti 2 campionamenti stagionali (1 + una replica) nelle due stazioni individuate, per un totale di 4 campionamenti e 20 – 40 individui.

2 *Rana esculenta* complex

Gli anfibi compiono gran parte degli scambi respiratori attraverso la cute, per cui assorbono facilmente e con immediatezza gli inquinanti eventualmente presenti negli ambienti che frequentano.

Il complesso *Rana esculenta*, inoltre, è costituito dalle due specie parentali *Rana lessonae* e *Rana ridibunda* e dall'ibrido *Rana esculenta*. L'ibrido *Rana esculenta* può riprodursi solo per ibridogenesi con *Rana lessonae*, per cui necessita di questa specie parentale per compiere il proprio ciclo. L'elevata eterozigosi dell'ibrido gli conferisce una maggiore resistenza a condizioni di stress ambientale per cui le percentuali relative di *R. lessonae* e *R. esculenta* possono definire la qualità delle acque attraverso il cosiddetto "Indice Rana esculenta" (Andreani *et al.*, 2003).

La valutazione della esposizione precoce ad agenti mutageni verrà quindi preceduta da una preliminare valutazione di tale indice, attraverso il riconoscimento delle due specie con marcatori genetici, al fine di definire la qualità ambientale attuale delle stazioni di campionamento.

Sono state individuate le seguenti 4 stazioni di campionamento: stagni in prossimità della R.N. delle Saline di Tarquinia (1 stazione), stagni della R.N. di Macchiatonda (1 stazione), stagni dei Monti della Tolfa (1 stazione); Bosco della Roccaccia (Tarquinia – 1 stazione).

Le località di prelievo sono state scelte in base alla loro ubicazione, a N.O. a E. e a S.E. rispetto alla Centrale di Torrevaldalica nord, quindi sottovento rispetto ai venti dominanti di scirocco, libeccio e maestrale; inoltre tali aree non sono sottoposte ad impatti rilevanti di altra natura.

Le analisi saranno condotte su eritrociti di 5 – 10 individui per ogni campionamento effettuato; saranno condotti 2 campionamenti (1 + una replica) in 2 stagioni, per un totale di 10 campionamenti e 20 – 40 individui.

3 *Helix aspersa*

Le specie del genere *Helix* hanno la capacità di accumulare diverse classi di inquinanti di natura chimica e si trovano in costante contatto con il substrato e le deposizioni umide che su di esso si formano e per tale motivo sono ampiamente utilizzate nel biomonitoraggio di habitat terrestri (Regoli *et al.* 2006 e citazioni ivi contenute).

Il gasteropode terrestre *Helix aspersa* è ampiamente diffuso in tutti gli habitat terrestri della zona potenzialmente interessata da ricadute di inquinanti, ed è quindi possibile scegliere opportunamente diverse stazioni di campionamento, più o meno prossime all'impianto di Torrevaldaliga nord.

Tre stazioni di campionamento “prossime” sono localizzate ad una distanza massima di dieci chilometri dall'impianto lungo le tre direttrici principali definite dai venti dominanti (N.O. N.E. e S.E.), mentre altre tre stazioni “distanti” sono localizzate in zone limitrofe, non sottoposte ad impatti rilevanti di altra natura: R.N. delle Saline di Tarquinia, R.N. di Macchiatonda e Monti della Tolfa.

Le analisi saranno condotte su ematociti di 5 – 10 individui per ogni campionamento effettuato; saranno condotti 2 campionamenti stagionali (1 + una replica), per un totale di 4 campionamenti e 20 - 40 individui.

4 *Octopus vulgaris*

E' un cefalopode stazionario che vive nelle zone costiere ed è quindi suscettibile ad essere esposto alle contaminazioni (Mangold, 1983). Le condizioni ambientali locali influenzano l'accumulo dei metalli nei tessuti e molti studi hanno dimostrato la capacità di questi organismi nell'accumulare alti livelli di elementi essenziali e non essenziali, soprattutto nelle ghiandole digestive. (ex. Miramand and Guary, 1980; Miramand and Bentley, 1992; Bustamante *et al.*, 1998a, b; Raimundo *et al.*, 2004,2005; Napoleao *et al.*, 2005). Saranno testati animali catturati in natura in 4 stazioni da S a N di Civitavecchia seguendo le correnti e la ventilazione predominanti dell'area (S-N): Santa Marinella, Civitavecchia, Tarquinia e Montalto di Castro. Ogni campionamento prevede il prelievo di 5 organismi per ogni specie in ogni stazione con frequenze diverse durante la durata del monitoraggio, in base ai risultati ottenuti nelle campagne precedenti. Ogni individuo campionato sarà immediatamente messo in ghiaccio per massimo

3h, poi sarà pesato, misurato e identificato il genere. I tessuti campione saranno immediatamente sezionati per poi essere processati con l'analisi del danno genotossico tramite il test del DNA cometa.

5 *Paracentrotus lividus*

E' un echinoderma che vive stanzialmente nelle aree costiere e si nutre prevalentemente di alghe e fanerogame marine (*Posidonia oceanica*). I tessuti che saranno presi come campioni sono le gonadi, le cellule digestive e le pareti corporee. Le gonadi sono particolarmente sviluppate nel periodo invernale e tardo primaverile. Saranno testati animali catturati in natura in 4 stazioni da S a N di Civitavecchia seguendo le correnti e la ventilazione predominanti dell'area (S-N): Santa Marinella, Civitavecchia, Tarquinia e Montalto di Castro. Ogni campionamento prevede il prelievo di 5 organismi per ogni specie in ogni stazione con frequenze diverse durante la durata del monitoraggio, in base ai risultati ottenuti nelle campagne precedenti. Ogni individuo campionato sarà immediatamente messo in ghiaccio per massimo 3h, poi sarà pesato e misurato. I tessuti campione saranno immediatamente sezionati. In questo organismo sarà valutata soltanto la concentrazione di eventuali metalli pesanti.

Per controllo, per quanto riguarda le due specie marine, saranno effettuati dei campionamenti in un'area meno esposta agli agenti inquinanti ed agli effetti dell'antropizzazione, quale l'Area Marina Protetta 'Arcipelago Toscano' nella zona Giannutri.

I test saranno affiancati dall'analisi delle concentrazioni di metalli pesanti, oltre che sull'*Octopus vulgaris* e sul *Paracentrotus lividus*, anche sui tessuti dei tre organismi sentinella (*Aphanius fasciatus*, *Helix aspersa* e *Rana esculenta complex*). Di seguito i metalli che saranno indagati: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb.

Riferimenti bibliografici

- Andreani P., Santucci F., Nascetti G., 2003. Le rane verdi del complesso *Rana esculenta* come bioindicatori della qualità degli ambienti fluviali italiani. *Biologia Ambientale*, 17 (1): 35-44.
- Belpaeme, K., Delbeke, K., Zhu, L., Kirsch-Volders, M., 1996. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 11, 485 – 492.
- Bustamante, P., Cherel. Y., Caurant. F., Miramand. P., 1998a. Cadmium, copper and zinc in octopus from Kerguelen Island, Southern Indian Ocean. *Polar Biol.* 19, 264-271.

- Everaarts J.M, Sleiderink H.M., Denbesten P.J., Halbrook R.S., Shugart L.R. (1994.) Molecular responses as indicators of marine pollution—DNA damage and enzyme-induction in *Limanda limanda* and *Asterias rubens*. *Environ. Health Perspect.* 94, 37-43.
- Everaarts J.M. (1995), DNA integrity as a biomarker of marine pollution: Strand breaks in seastar *Asterias rubens* and *Limanda limanda*. *Mar. Pollut. Bull.* 31 4–12.
- Heavy metals in *Posidonia oceanica* and *Paracentrotus lividus* from seagrass beds of the north-western Mediterranean. *The science of the Environment* 171: 95-99.
- H. Auger, G. Ramonda and M. Santimone, Teneurs en métaux lourds des oursins comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck) dans les zones à grande activité touristique de l'île de Port-Cros, in C.-F. Boudouresque (Ed.), *Colloque International sur Paracentrotus lividus et les Oursins Comestible*, GIS Posidonie Publ., 1998, pp. 271-284.
- H. Auger, G. Ramonda, J Rolland and M. Santimone, Teneurs en métaux lourds des oursins comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck) prélevés dans quatre secteurs tests du littoral de Marseille (Méditerranée, France), *Vie Mar.*, HS 10 (1989) 226-239.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Review. Use of single cell gel electro phoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Res.* 544 (2003) 43 – 64.
- Joana Raimundo, Petro M. Costa, Carlos Vale, Maria Helena Costa, Isabel Moura, 2010. Dna damage and metal accumulation in four tissues of feral *Octopus vulgaris* from two coastal areas in Portugal. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1543-1547.
- Mangold, K., 1983. *Octopus vulgaris*. In. Boyle, P. (Ed), *Cephalopod Life Cycles, Species Accounts*, vol. I. Academic press, United Kindom, pp. 335-364.
- Michel Warnau, Gilles Ledent, Ali Temara, Jean Marie Bouquegneau, Michael Jangoux, Philippe Dubois, 1995.
- Miramand. P., Guary. J., 1980. High concentrations of some heavy metals in tissues of the Mediterranean octopus. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 24, 783-788.
- Miramand. P., Bentley, D., 1992. Concentration and distribution of heavy metals in tissues of two cephalopods, *Eledone cirrhosa* and *Sepia officinalis*, from the French coast of the English Channel. *Mar. Biol.* 114, 407-414.
- Mitchelmore C.L. and Chipman J.K. (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research* 399, 135–147.
- M. Byrne, Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland, *Mar. Biol.*, 104 (1990) 275-289.
- Napoleão , P., Pinheiro , T., Sousa Reis, C., 2005. Elemental characterization of tissues of *Octopus vulgaris* along the Portuguese coast. *Sci. Total Environ.* 345, 41-49.

- Pandrangi R., Petras M., Ralph S., Vrzoc M. (1995) Alkaline single cell gel_Comet.assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ. Mol. Mutag.* 26, 345–356.
- Raimundo, J., m., Vale, c., 2004. Geographical variation and partition of metals in tissues of *Octopus vulgaris* along the Portuguese coast. *Sci. Total Environ.* 325, 71-81.
- Raimundo, J., Pereira, P., Vale, C., Caetano, M., 2005. Fe, Zn, Cu, and Cd in the digestive gland and muscle tissues of *Octopus vulgaris* and *Sepia officinalis* from coast areas in Portugal. *Cienc. Mar.* 31, 243-251.
- Ralph S., Petras M., Pandrangi R., Vrzoc M. (1996), Alkaline single cell gel_comet.assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles, *Environ. Mol. Mutag.* 28, 112–120.
- Regoli F., Gorbi S., Fattorini D., Tedesco S., Notti A., Macella N., Bocchetti R., Benedetti M., and Piva F., 2006. Use of the Land Snail *Helix aspersa* as Sentinel Organism for Monitoring Ecotoxicologic Effects of Urban Pollution: An Integrated Approach. *Environmental Health Perspectives* • Vol. 114, Number 1, January 2006.
- Shugart, L., 1990. Biological monitoring testing for genotoxicity. In McCarthy, J.F., Shugart, L. R., (Eds.), *Biomarkers of Environmental Contamination*. Lewis Publishers, Chelsea, pp. 217 – 227.