

PROGETTO DI BIOMONITORAGGIO



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 degli impatti con l'uso Bioindicatori vegetali;**
- **Valutazione del danno primario al DNA (comet assay) in organismi animali "sentinella";**

Monitoraggio degli impatti con l'uso di Bioindicatori vegetali

Ai fini della valutazione della qualità ambientale si procederà all'applicazione di più metodologie di indagine che possano fornire un quadro esaustivo della diffusione e ricaduta dei principali inquinanti derivanti dal funzionamento e dalla conversione a carbone della centrale. Il programma di biomonitoraggio proposto consente di effettuare una indagine *before-after*, volta cioè a valutare su media scala la situazione attuale e l'evoluzione futura connessa alla conversione della centrale di Torre Valdaliga Nord.

Ai fini della valutazione della qualità dell'aria verranno attuate le seguenti metodologie di indagine:

1. Stima delle reazioni delle comunità licheniche epifite all'inquinamento da gas fitotossici (SO₂, Nox), mediante la valutazione dell'Indice di Biodiversità Lichenica (I.B.L.)
2. Stima delle ricadute di metalli in traccia mediante la determinazione del bioaccumulo in licheni.

1. Indice di biodiversità lichenica

La biodiversità dei licheni epifiti ha dimostrato di essere un eccellente indicatore dell'inquinamento prodotto da sostanze gassose fitotossiche. I licheni rispondono infatti con relativa velocità al peggioramento della qualità dell'aria 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 in Italia larga diffusione a partire dagli anni ottanta e la metodologia oggi utilizzata si basa su un protocollo standardizzato, pubblicato dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (ANPA 2001), concordato in ambito europeo; esso definisce regole precise per le strategie di campionamento, il rilevamento ed il calcolo della biodiversità lichenica (BL).

L'indice di biodiversità lichenica consente di stimare gli effetti biologici dell'inquinamento, misurando le deviazioni da condizioni normali delle comunità licheniche, quali componenti di ecosistemi, particolarmente note per la loro risposta all'inquinamento. Tale metodologia risulta essere particolarmente utile per stimare gli effetti combinati di più inquinanti sulla componente biologica. Rappresenta quindi uno strumento indispensabile di monitoraggio, non alternativo ma di supporto a quello strumentale e ad altre forme di indagine.

Sono state individuate, in maniera oggettiva, 18 stazioni (UCP, Unità di Campionamento Primarie); partendo da un sistema nazionale di campionamento organizzato secondo una griglia geografica a maglie quadre di 18 km di lato, le stazioni individuate ricadono in una griglia di sottomaglia di 9 km di lato e, nell'area più prossima alla centrale, in una griglia di sottomaglia di 4.5 km di lato (vedi cartina allegata). La scelta delle stazioni è stata poi valutata anche alla luce della direzione dei venti prevalenti. Le stazioni sono porzioni di territorio di superficie e forma definita (quadrati di 1 x

1 km di lato) all'interno delle quali, seguendo procedure standard, verranno individuati gli alberi (forofiti) su cui eseguire il rilevamento della biodiversità lichenica. Esse sono definite dalle coordinate del punto centrale.

Delle 18 stazioni in cui verrà effettuato il rilievo della BL, 3 rientrano nella lista delle 929 stazioni di interesse nazionale (in verde nella cartina allegata).

I forofiti su cui effettuare il rilevamento della biodiversità lichenica verranno selezionati all'interno delle UCP. Il campione di forofiti selezionato sarà compreso tra 1 e 12, a seconda della disponibilità di alberi in possesso delle caratteristiche di rilevabilità. Per il raggiungimento dell'UCP ed il rilevamento si farà uso di una apparecchiatura GPS.

Ai fini del monitoraggio verranno utilizzate specie vegetali con scorza acida; preferibilmente verrà utilizzata la roverella (*Quercus pubescens*), ma qualora questo non sia possibile, probabilmente nelle stazioni più prossime alla costa, verrà utilizzato il leccio (*Quercus ilex*); nelle stazioni in cui sarà presente un numero congruo dei due forofiti, verranno campionati entrambi per consentire adeguate trasformazioni dei dati. Il reticolo di campionamento è costituito da quattro subunità, che verranno disposte verticalmente sul tronco, secondo la normativa prevista nel manuale ANPA (2001). Nelle schede-stazione verranno riportate per ogni albero tutte le informazioni (localizzazione satellitare, esposizione esatta di ciascuna subunità del reticolo, ecc) necessarie a consentire una ripetizione dello studio negli anni successivi al fine di monitorare eventuali modificazioni avvenute.

I valori della BL delle stazioni di campionamento saranno stimati statisticamente sulla base dei valori rilevati nelle stazioni stesse; l'insieme dei valori ottenuti nelle 15 stazioni verranno visualizzati con un apposito programma di mappatura (Surfer 7.0) ed interpretati sulla base di classi di naturalità/alterazione dell'aria, che esprimono il grado di deviazione da condizioni "naturali" (Loppi *et al.*, 2002). Per una migliore caratterizzazione dell'area, per ogni stazione verranno calcolati, sulla base delle caratteristiche ecologiche delle specie presenti e delle loro frequenze, i valori medi degli indici ecologici di pH, xerofitismo, fotofitismo ed eutrofizzazione, e verranno realizzate le relative carte; ogni specie infatti presenta peculiari esigenze nei confronti di fattori quali acidità del substrato, disponibilità di nutrienti, acqua e luce, per cui l'insieme delle

specie presenti in una stazione fornisce informazioni sulle caratteristiche chimico-fisiche dell'area in cui si effettua il campionamento.

2. Bioaccumulo

Ai fini della valutazione quali-quantitativa di alluminio, arsenico, cadmio, nichel, piombo, vanadio, azoto totale e zolfo nell'area di influenza della centrale di Torre Valdaliga Nord viene proposta una tecnica di bioaccumulo, che misura, mediante analisi chimiche, le concentrazioni di metalli in traccia in organismi in grado di assorbirle ed accumularle dall'ambiente.

Questi organismi posseggono alcune caratteristiche fondamentali che ne fanno degli ottimi accumulatori, quali una elevata tolleranza agli inquinanti in esame ed una notevole capacità di accumulo. Il progetto prevede un monitoraggio biologico di tipo *passivo*, tramite l'osservazione e l'analisi di campioni biologici della flora lichenica autoctona spontanea ampiamente ed omogeneamente distribuiti sul territorio nazionale ed in buono stato fisiologico (assenza di patologie o lesioni).

2.1 Bioaccumulo nei licheni

Come bioaccumulatore si prevede di utilizzare *Xanthoria parietina*, una specie ad ampia distribuzione europea, molto comune in Italia dalla fascia pianiziale a quella montana, e diffusamente presente nell'area di studio. Piuttosto resistente all'inquinamento, è questa una specie che è stata ampiamente utilizzata come bioaccumulatore in Italia e all'estero. Le caratteristiche morfologiche del tallo, provvisto di lobi larghi, favoriscono il prelievo e la preparazione del campione. Poiché i *pattern* di diffusione e trasporto in atmosfera della maggior parte dei metalli pesanti di origine antropica spesso si esauriscono su aree ristrette, si suggerisce un campionamento su scala territoriale ridotta, a distanza crescente dal camino della centrale, utilizzando ipotetici cerchi concentrici, centrati sull'impianto. In considerazione dei lenti tassi di crescita dei licheni, si prevede una ripetizione del monitoraggio dopo due anni.

Ai fini dell'indagine proposta verranno seguite le metodiche di campionamento, preparazione ed analisi chimiche dei campioni riportate nelle linee guida, concordate a livello europeo, in pubblicazione in un manuale APAT.

Per procedere alla valutazione di eventuali deposizioni aerodiffuse, i campionamenti verranno effettuati, tutto intorno ai tronchi degli alberi, ad una altezza di 100-200 cm dal suolo, limitatamente alle porzioni periferiche del tallo, cioè le più recenti. Per ogni stazione verranno prelevati più di 6 talli da più di 3 alberi, in quantità tale da ottenere, dopo la pulitura, un campione di peso non inferiore a 250 mg. Il materiale verrà poi pulito, essiccato a temperatura ambiente, tritato ed omogeneizzato in mortai d'agata, setacciato e sottoposto alle analisi di laboratorio. La determinazione del contenuto dei metalli pesanti nelle soluzioni ottenute con le procedure di mineralizzazione verranno effettuate 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).

Per l'interpretazione dei dati si farà uso delle più recenti ed aggiornate scale di naturalità/alterazione.

Riferimenti bibliografici

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

3. 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; Padrangi *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*, gli anfibi anuri del complesso *Rana esculenta* e il gasteropode terrestre *Helix aspersa*. Le stazioni di campionamento sono indicate nell'allegata cartina.

3.1 *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.

Le stazioni di campionamento scelte sono la R.N. delle Saline di Tarquinia e la R.N. di Macchiatonda, aree protette, non sottoposte ad altri impatti antropici, poste rispettivamente a N.O. e a S.E. rispetto

alla Centrale di Torrevaldalica nord, quindi sottovento rispetto ai venti dominanti di scirocco e maestrale.

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 16 campionamenti e 80 – 160 individui.

3.2 Rana esculenta complex

Gli anfibii 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 (2 stazioni in prossimità di Tolfa ed Allumiere rispettivamente).

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 tre stagioni (con esclusione della stagione invernale), per un totale di 24 campionamenti e 120 – 240 individui.

3.3 *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 48 campionamenti e 240 - 480 individui.

I test saranno affiancati dall'analisi delle concentrazioni di metalli pesanti (Al, As, Be, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Hg, Ni, Pb, Ti, V e Zn). nella matrice ambientale delle stazioni di campionamento (acqua per *A. fasciatus* acqua e sedimento per *R.esculenta*) e nella matrice biologica (tessuti dei campioni dei tre organismi).

Il monitoraggio dovrà essere svolto a partire da un anno prima della messa in funzione della centrale per ottenere un confronto tra la situazione *ex ante* ed *ex post* relativamente a concentrazioni di inquinanti ed entità del danno genotossico eventualmente rilevato.

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.
- 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 dab *Limanda limanda*. *Mar. Pollut. Bull.* 31 4–12.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Review. Use of single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Res.* 544 (2003) 43 – 64.
- 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.
- 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.
- 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.