



**DIPARTIMENTO DI ECOLOGIA E SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE**

**Azioni di monitoraggio ambientale per la  
valutazione dell’impatto dovuto alla riconversione a  
carbone della Centrale Enel di Civitavecchia  
“Torvaldaliga Nord”**

**Relazione Preliminare**

**(Su richiesta dell’Osservatorio Ambientale)**

**STATO AVANZAMENTO LAVORI**

**GIUGNO 2010**

## **Relazione sullo stato di avanzamento dei lavori: Stima delle ricadute di metalli in traccia mediante la valutazione dell'IBL e del bioaccumulo nei talli lichenici**

### **Indice di biodiversità lichenica**

#### *Individuazione delle stazioni di campionamento*

Nell'area di studio, che si estende nei comuni di Allumiere, Civitavecchia, Santa Marinella, Tarquinia e Tolfa, sono state individuate 25 stazioni di campionamento utilizzando la metodica proposta nelle linee guida ANPA (I.B.L.: Indice di Biodiversità Lichenica. Manuale ANPA. Serie Manuali e Linee Guida 2/2001).

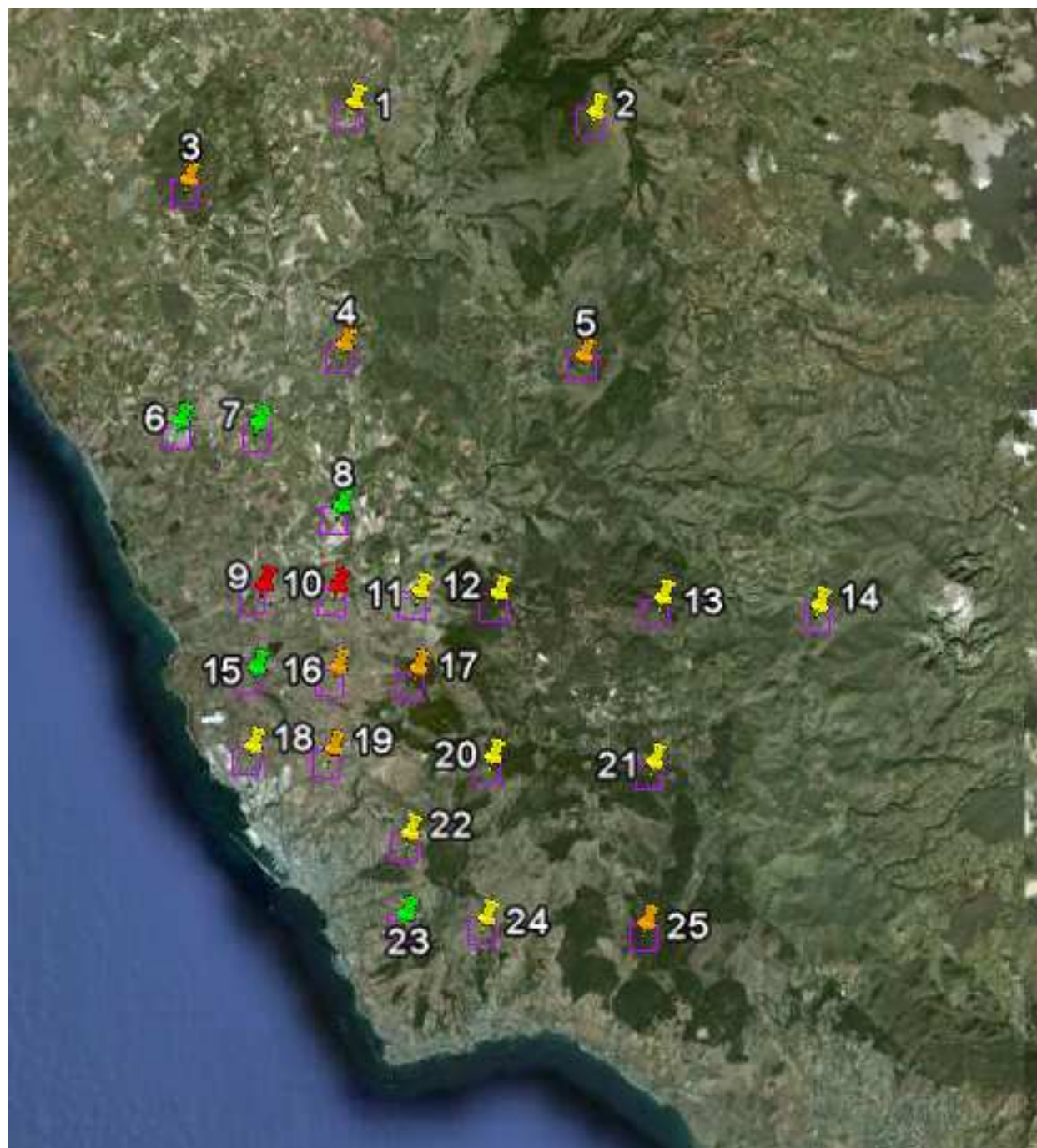
Le 25 UCP (Unità di Campionamento Primaria), celle territoriali di lato 1km x 1km, sono state disposte secondo una rete che rappresenta un sottoinsieme della rete nazionale individuata nel succitato manuale. Le stazioni non sono uniformemente distribuite sul territorio, ma sono più dense (3 km di distanza tra le stazioni) vicino alla centrale di Torre Valdaliga e più rare (fino a 9 km di distanza tra le stazioni) nelle zone più lontane dalla centrale, anche tenendo conto della direzione dei venti principali che soffiano verso Nord-NordOvest.

Il numero di punti individuati eccede quello indicato nella convenzione (18) perché generalmente alcune stazioni risultano non campionabili per vari motivi, nonostante le sostituzioni già previste dal metodo. Proprio queste sostituzioni fanno sì che le stazioni di biomonitoraggio coincidano solo parzialmente con quelle del bioaccumulo in cui le 'bags' sono state posizionate in precedenza per permettere l'esposizione dei talli per un tempo sufficiente.

Fino a questo momento, delle 14 stazioni esaminate in campo due solamente sono risultate prive di alberi idonei al rilevamento e andranno sostituite. La mancanza di alberi idonei (forofiti) è la maggiore difficoltà che si sta incontrando nel lavoro. Nella fascia più vicina alla costa infatti, sono principalmente presenti pini, eucalipti, robinie e altre specie che per le caratteristiche della scorza non sono adatte alla bioindicazione con licheni epifiti. Inoltre, i forofiti per essere idonei devono possedere caratteristiche che non è sempre facile incontrare in natura, come per esempio dimensioni minime di circonferenza, scarsa inclinazione e assenza di elementi di disturbo nella zona di rilevamento. Ulteriori difficoltà sono rappresentate dall'impossibilità di raggiungere alcuni punti per le caratteristiche del territorio, per la mancanza di strade, perché situati

in proprietà private, adibite al pascolo o in aree boschive con sottobosco particolarmente fitto.

La distribuzione delle stazioni di campionamento all'interno dell'area di studio e lo stato di avanzamento dei rilievi IBL sono mostrati in figura.



Rosso: non rilevabile

Giallo: rilevamento da effettuare totalmente

Arancione: rilevamento parzialmente effettuato

Verde: rilevamento completato

## Bioaccumulo

Per poter effettuare le analisi degli elementi accumulati nei talli lichenici si è proceduto al trapianto di talli della specie *Evernia prunastri*, un lichene epifita molto usato in studi del genere, nelle stesse 25 stazioni utilizzate per la bioindicazione tramite IBL. L'utilizzo dei trapianti, e non di licheni presenti *in situ*, si è reso necessario perché un sopralluogo preliminare nell'area ha evidenziato l'assenza di vegetazione lichenica idonea in gran parte delle stazioni di monitoraggio. La tecnica dei trapianti permette di poter posizionare i campioni anche in zone prive di alberi e permette di confrontare tra loro i risultati dell'esposizione di campioni cresciuti, fino al momento del trapianto, in condizioni omogenee e lontano da fonti di inquinamento.

I talli lichenici utilizzati sono stati raccolti nella Riserva Naturale Monte Casoli di Bomarzo (VT), dove la specie *E. prunastri* è particolarmente abbondante. L'elevato grado di naturalità di quest'area garantisce che il materiale biologico non contenga alte concentrazioni di metalli pesanti che possano pregiudicare i risultati dell'indagine. Dopo la raccolta, i talli sono stati trasportati in laboratorio, selezionati, puliti da eventuali impurità, lasciati asciugare e collocati in delle "bags". Al fine di evitare ogni possibile contaminazione dei talli, i campioni sono stati manipolati con guanti in lattice e pinzette in plastica e una volta allestiti, conservati in sacchetti di plastica sterili fino al momento della loro esposizione. Alcuni dei talli raccolti sono conservati a temperatura ambiente e a -80° come materiale di riferimento ("bianco") per le analisi.

Le "bags" sono state realizzate con porzioni di 20 x 10 cm di rete in plastica a maglie di dimensioni 0,5 x 0,5 cm, preventivamente lavate in acqua distillata e chiuse con un filo in PVC; con lo stesso filo in PVC sono state fissate agli alberi. Tre talli distesi sono stati posizionati in ciascuna bag, in modo da evitare sovrapposizioni e massimizzare la superficie esposta.

Per ogni stazione sono state collocate 3 bags su rami di alberi preventivamente ripuliti di foglie o ramificazioni secondarie, ad un'altezza da terra maggiore di 150 cm per evitare contaminazioni dei talli da parte del suolo. Le stazioni selezionate sono 25, 7 in più rispetto a quelli stabiliti per fronteggiare eventuali perdite di materiale in seguito a atti vandalici e/o cause naturali.

Tutte le bags sono state collocate al loro posto tra il 19 e il 22 aprile e rimarranno esposte fino a settembre.

## **Relazione sullo stato di avanzamento dei lavori: Valutazione del danno primario al DNA (comet assay) in organismi animali "sentinella" e analisi dei metalli pesanti su matrice ambientale e biologica.**

### ***1 Aphanius fasciatus***

Sulla specie ittica lagunare, individuata come organismo sentinella nel monitoraggio del danno genotossico a livello di DNA, è stata completata la messa a punto delle tecniche di valutazione del danno al DNA e la raccolta dati relativa alle Saline di Tarquinia, una delle due stazioni di campionamento previste.

La messa a punto del protocollo di monitoraggio è di seguito sintetizzata:

Sono state approntate 10 trappole (nasse) con struttura metallica e rete di maglia 0,5 x 0,5 cm. Le trappole vengono posizionate nei punti di campionamento preventivamente individuati all'interno dell'area di monitoraggio e recuperate il giorno successivo; da queste viene prelevato il numero di individui necessario a condurre il test (variabile tra 5 e 10 individui), mentre gli individui eccedenti vengono rilasciati. Gli animali sono quindi mantenuti vivi in recipienti ossigenati contenenti acqua prelevata nel punto di campionamento, quindi trasportati in laboratorio entro 2-4 ore, per essere processati.

Quale tessuto dove condurre il test della cometa, è stato individuato il sangue circolante ed in particolare gli eritrociti, essendo nei pesci provvisti di nucleo, facilmente reperibili nelle quantità necessarie e non necessitando di particolari trattamenti prima di condurre il test di valutazione del danno primario al DNA. In laboratorio gli animali vengono sacrificati per dislocamento cervicale ed un campione di sangue di circa 10 µl per ogni animale viene prelevato dalla regione pericardica.

Il test della cometa è stato messo a punto modificando il metodo classico di Singh (Singh *et al.* 1988) al fine di adattarlo alle peculiarità fisiologiche della specie. Brevemente, 1 µl di sangue prelevato, diluito in PBS, viene aggiunto a 80 µl di agarosio a basso punto di fusione. La miscela ottenuta viene quindi utilizzata per la preparazione, distendendola su un vetrino già provvisto di uno strato di gel di agarosio. I vetrini così preparati (1 + 1 replica per ogni individuo), sono immersi per 12 ore in una soluzione di lisi allo scopo di liberare il nucleo dalle membrane, prima di sottoporlo al campo elettroforetico. Relativamente al test della cometa vero è proprio, che consiste nella denaturazione del DNA nel tampone di corsa a pH alcalino, nella successiva corsa elettroforetica e nella lettura finale dei preparati al microscopio ottico a fluorescenza, sono state effettuate numerose prove al fine di individuare gli opportuni tempi di denaturazione e corsa. Al termine di esse è stato stabilito un protocollo standard per la specie che prevede 10 minuti di denaturazione in soluzione alcalina e 10 minuti di corsa elettroforetica (30 V; 280 mA). I preparati ottenuti dopo la corsa elettroforetica sono stati colorati con soluzione di bromuro di etidio, quindi analizzati al microscopio con un l'ausilio di un software di analisi di immagine dedicato (Comet-assay III). L'analisi di 100 cellule per ogni preparato hanno consentito di effettuare le valutazioni statistiche sui parametri che consentono la misura del danno genotossico medio che l'individuo presenta nel proprio DNA, sotto forma di frammentazione del DNA stesso. I principali di tali parametri sono: Tail moment, Tail Length e Tail Intensity. Il test statistico di Kruskal-Wallis è stato applicato per effettuare gli opportuni confronti tra i valori ottenuti nei diversi campioni (vedere oltre).

Prima di procedere alla raccolta dati attraverso l'analisi dei campioni prelevati presso le saline, alcuni individui sono stati sottoposti all'azione di agenti mutageni con azione

nota al fine di valutare la risposta del sistema. Due enzimi di restrizione (Eco R1 e Fok1) e raggi X sono, i quali provocano diversi gradi di frammentazione del DNA, sono stati utilizzati in tali prove. I dati ottenuti hanno mostrato una estrema sensibilità del sistema nel valutare il danno al DNA, risultando in tutte le tre prove differenze significative nel danno riscontrato tra “trattati” e “controlli”. La presenza di cellule “inquinanti” appartenenti ad altri tessuti in fase di divisione cellulare è stata valutata con l’utilizzo di bromo-deossiuridina (BrdU) su tre preparati. L’accidentale presenza di queste cellule nei preparati potrebbe infatti aumentare artificialmente il dato relativo al danno al DNA. I risultati ottenuti hanno mostrato una presenza di tali cellule inferiore all’1%, quindi trascurabile ai fini del risultato.

Realizzata la messa a punto del sistema come precedentemente descritto, sono stati analizzati un totale di 65 individui provenienti dalle Saline di Tarquinia, catturati in 4 punti di campionamento disposti lungo la direttrice nord-sud. Gli individui provenienti dalle 4 stazioni di campionamento non mostrano differenze significative relativamente alla presenza di danno al DNA, dimostrando che i risultati non sono influenzati dalle diverse condizioni di salinità, temperatura, tenore d’ossigeno etc. che si possono riscontrare nei diversi punti di campionamento.

Gli individui analizzati mostrano, utilizzando il protocollo precedentemente descritto, un danno alla molecola di DNA imputabile alla presenza di agenti inquinanti ad azione genotossica basso o nullo.

Questi dati vanno considerati definitivi relativamente alla valutazione *ex-ante* dell’impatto della Centrale termoelettrica a carbone Torvaldaliga nord e costituiscono il riferimento o “Controllo Storico” per effettuare i confronti con i dati che verranno ottenuti applicando il medesimo protocollo su individui raccolti durante il periodo d’esercizio a regime della Centrale Enel. Si sottolinea che si tratta di dati che vanno necessariamente inquadrati in un’ottica relativa di confronto con i dati che verranno ottenuti negli anni di esercizio della Centrale. Questi dati e le relative elaborazioni sono stati archiviati su files excell e sono disponibili per eventuali consultazioni.

Venti individui tra gli animali analizzati (5 per stazione), insieme a 8 campioni di acqua prelevati nel punto di campionamento (1+1 replica per ogni punto), sono stati catalogati e vengono conservati in opportune condizioni (- 80°C) per effettuare l’analisi della presenza di metalli pesanti nella matrice ambientale e nei tessuti.

Relativamente alla seconda stazione di monitoraggio, la R N di Macchiatonda, sono in corso campionamenti ed analisi dei campioni. La raccolta dati per gli individui di *Aphanius fasciatus* provenienti da Macchiatonda viene effettuata applicando senza ulteriori modifiche il protocollo precedentemente descritto.

Anche in questo caso alcuni degli individui analizzati con il test della cometa e campioni di acqua provenienti dal punto di campionamento, vengono catalogati e conservati per le analisi dei metalli pesanti.

## **2 *Rana esculenta* complex**

Sono state individuate 3 delle 4 stazioni di campionamento previste: una in prossimità della riserva naturale delle Saline di Tarquinia e 2 nella zona dei Monti della Tolfa. Relativamente ai campionamenti presso le Saline di Tarquinia, data la scarsità degli individui reperibili, i campionamenti vanno effettuati in un raggio più ampio di quello inizialmente previsto.

Gli individui sono catturati manualmente o con retini da pesca (a seconda del sito di campionamento) nelle ore serali. Vengono trasportati in laboratorio entro 2-4 ore,

mantenuti in appositi contenitori e processati la mattina successiva. Il sangue viene prelevato dopo asportazione di una falange; 5-10 µl di sangue sono utilizzati per la preparazione dei vetrini secondo tecniche del tutto analoghe a quanto precedentemente descritto per il pesce.

Relativamente al test della cometa è in corso la definizione del protocollo di monitoraggio che prevede le stesse fasi descritte per la specie precedente: definizione dei tempi di denaturazione e corsa, e valutazione della sensibilità del sistema. Al completamento di questa fase seguirà la raccolta dati su circa 30 esemplari per ogni stazione di campionamento

Per effettuare l'analisi dei metalli pesanti tre individui, 2 campioni di acqua e 2 campioni di sedimento (1+1 replica) per ognuna delle tre stazioni sulle quali si è operato, sono stati raccolti, catalogati e sono conservati in opportune condizioni (- 80°C).

### **3 *Helix aspersa***

Parte del protocollo di monitoraggio per effettuare il test della cometa su *Helix aspersa* è stato messo a punto. Gli ematociti sono ottenuti prelevando tramite microsiringa circa 10 µl di emolinfa dalla parte terminale della spirale del guscio, in prossimità del mantello. I vetrini sono preparati secondo le modalità già descritte in precedenza, e sottoposti alla corsa elettroforetica in ambiente alcalino. Anche in questo caso è in corso la definizione del protocollo di monitoraggio che prevede: definizione dei tempi di denaturazione e corsa, e valutazione della sensibilità del sistema. Al completamento di questa fase seguirà la raccolta dati su circa 30 esemplari per ogni stazione di campionamento

Nel caso del gasteropode i medesimi individui non vengono utilizzati per il test della cometa e l'analisi dei metalli pesanti su matrice biologica, per cui contemporaneamente alla messa a punto del protocollo del test della cometa è stata effettuata la raccolta di altro materiale destinato alle analisi dei metalli pesanti: un totale di 30 individui sono stati raccolti in tre stazioni "prossime" (10 per ogni punto di campionamento), localizzate rispettivamente in località "La Frasca", "Borgata Aurelia" e "La Scaglia" (comune di Civitavecchia). Altri 80 campioni sono stati finora raccolti in quattro stazioni "distanti" (20 per ogni punto di campionamento), localizzate rispettivamente in località "Saline" (Tarquinia), Strada Roccaccia (Tarquinia), Tolfa e Allumiere.