



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DELLA
Tuscia

Azioni di monitoraggio ambientale per la valutazione dell'impatto dovuto alla riconversione a carbone della Centrale Enel di Civitavecchia "Torvaldaliga Nord" (4° Anno di indagine)

GRUPPO DI RICERCA

- **Prof. Giuseppe Nascetti*** (*Responsabile scientifico*)
- **Prof. Silvano Onofri***
- **Prof.ssa Laura Zucconi***
- **Dr.ssa Caterina Ripa***
- **Dott. Dario Angeletti***
- **Dr.ssa Claudia Sebbio***
- **Dott. Fabrizio Scialanca***
- **Dr.ssa Laura Bottacci****
- **Dr. Valerio Frau****

* *Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche – Università degli Studi della Tuscia*

** *Consorzio per la gestione dell'Osservatorio Ambientale*

Viterbo, luglio 2014

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	3
1.1 Il biomonitoraggio.....	4
1.2 I licheni come bioaccumulatori.....	5
2. MATERIALE E METODI.....	6
2.1 Bioaccumulo degli elementi in traccia.....	6
2.2.1 Raccolta dei campioni e preparazione delle “bags”.....	6
2.2.2 Esposizione delle “bags”.....	7
2.2.3 Analisi degli elementi.....	7
2.2.4 Scala di interpretazione dei dati di bioaccumulo.....	8
3. AREA DI STUDIO.....	9
3.1 Unità di Campionamento Primarie	10
3.2 Stazioni di bioaccumulo.....	10
4. RISULTATI di BIOACCUMULO.....	12
4.1 Concentrazione degli elementi e scala di interpretazione.....	12
5. CONFRONTO BIOACCUMULO CON GLI STUDI PRECEDENTI.....	15
BIBLIOGRAFIA	16

1. INTRODUZIONE

L'influenza esercitata dalle attività umane sul clima (IPCC, 2007) e sugli ecosistemi (MEA, 2005) è in costante aumento. Le emissioni di sostanze chimiche pericolose da fonti sia naturali che antropiche nei comparti acqua, suolo e aria possono causare effetti nocivi sull'ambiente e sulla salute umana. Molti ricercatori hanno evidenziato l'esistenza di una stretta correlazione tra numerose patologie e l'inquinamento atmosferico, come ad esempio l'aumento delle affezioni respiratorie in bambini in età prescolare che vivono in aree notevolmente inquinate; sono inoltre note correlazioni tra l'aumento delle crisi respiratorie in soggetti asmatici e le concentrazioni di ossidi di zolfo, ossidi di azoto, ozono e polveri. Uno studio del lontano 1997 per la Regione Veneto dimostrò una stretta correlazione tra inquinamento atmosferico, rilevato tramite licheni, e l'incidenza del carcinoma polmonare in giovani (età <55 anni) maschi residenti (Cislaghi e Nimis, 1997).

Le fonti di emissione di natura antropica sono riconducibili a cinque principali settori di attività: 1) trasporti, 2) centrali termoelettriche, 3) industria, 4) domestico e terziario, 5) agricoltura e pesca. Trasporti, domestico e terziario e agricoltura e pesca sono definite fonti di emissioni diffuse, con scarico ad altezza più o meno bassa, mentre industrie e centrali termoelettriche rappresentano le fonti di emissione concentrate, con scarico ad altezza elevata. Una volta emessi in atmosfera, gli inquinanti possono ricadere al suolo, in prossimità della fonte di emissione, o a centinaia di km di distanza. La ricaduta può avvenire in forma di *deposizione secca* (deposizione di forme residue di specie gassose o di alcuni sali sotto forma di particelle) o di *deposizione umida* (interessa gli acidi e la maggior parte dei sali e avviene essenzialmente mediante le precipitazioni piovose, nevose e le nebbie). Per alcune sostanze sono stati definiti dei valori limite di emissione che stabiliscono la concentrazione annuale di una determinata sostanza che può essere rilasciata nell'ambiente esterno e i limiti massimi di accettabilità delle concentrazioni (DPR 203/88). Per il controllo di questi parametri, a partire dagli anni '70, sono state allestite delle reti di monitoraggio che vedono l'uso di centraline automatiche di rilevamento, fisse (principalmente) e mobili. L'alto costo di acquisto, gestione e manutenzione spiega il loro numero limitato e il ridotto numero di analisi. Lo scarso numero di punti di misurazione, unito alla considerazione che le concentrazioni di inquinanti sono molto variabili nel tempo e nello spazio oltre che in funzione delle condizioni meteorologiche, e che solo alcune sostanze vengono rilevate dagli strumenti, rende il sistema ampiamente insufficiente per garantire la conoscenza approfondita della situazione reale, nonostante la precisione delle singole misure. Per questo, all'analisi chimica della composizione dell'aria, vengono sempre più spesso affiancati studi di tipo biologico (biomonitoraggio) basati sulla risposta di organismi viventi, allo scopo di integrare e completare i dati forniti dalle tradizionali centraline automatiche di

rilevamento.

Inoltre, dall'agosto 2010, un decreto legislativo stabilisce che, per gli inquinanti, il livello critico è il "livello fissato in base alle conoscenze scientifiche, oltre il quale possono sussistere effetti negativi diretti su recettori quali gli alberi, le altre piante o gli ecosistemi naturali, esclusi gli esseri umani" e che sono ammesse e "disciplinate le modalità di utilizzo dei bioindicatori per la valutazione degli effetti determinati sugli ecosistemi dai livelli di arsenico, cadmio, nichel, idrocarburi policiclici aromatici e mercurio" (Dlgs 155, 13 agosto 2010).

1.1 Il biomonitoraggio

Le tecniche di biomonitoraggio non misurano l'inquinamento ma piuttosto l'"*analisi di componenti degli ecosistemi reattivi all'inquinamento, per la stima di deviazioni da situazioni normali*" (Nimis, 1999). Tali tecniche pertanto permettono di verificare alterazioni ambientali tramite l'uso di organismi viventi e parametri biologici (ad esempio misure di biodiversità, modificazioni morfo-strutturali dell'organismo e misure delle concentrazioni degli inquinanti negli organismi stessi) e di utilizzarle per stimare gli effetti globali dell'inquinamento sulla componente biotica.

Questo tipo di applicazione offre la possibilità di ottenere rapidamente, a costi contenuti e con una elevata densità di campionamento mappe degli effetti biologici di aree a rischio. Inoltre, il biomonitoraggio consente di individuare aree con potenziale superamento di limiti soglia per alcuni inquinanti primari per una localizzazione ottimale di centraline di rilevamento (Loppi, 1999) e di individuare patterns di trasporto a lunga distanza e di deposizione degli inquinanti emessi da una sorgente analizzando la quantità di tali sostanze presente negli organismi bioaccumulatori a distanze variabili dalla stessa (Bargagli *et al.*, 1985; Gasparo *et al.*, 1989). Infine, mediante ripetute analisi nel tempo è possibile valutare, su lunghi periodi, l'efficacia di misure eventualmente adottate volte alla riduzione delle emissioni in atto.

Tra i principali limiti del biomonitoraggio troviamo (Nimis, 1999):

- l'impossibilità di applicazione di alcuni metodi in situazioni non adatte alla crescita dei biomonitors o in aree in cui scarseggiano i substrati sui quali i biomonitors crescono;
- la difficoltà di mettere in relazione risposte biologiche con concentrazioni in atmosfera di specifiche sostanze tossiche a causa degli effetti sinergici di più inquinanti;
- l'impossibilità di elaborare una scala di valutazione valida per l'intero ambito nazionale. I dati biologici, infatti, dipendono da vari fattori, tra cui quelli bioclimatici per la bioindicazione e geolitologici per il bioaccumulo, quindi, qualsiasi scala di interpretazione ha valore solo nelle condizioni in cui è stata elaborata.

Le tecniche di biomonitoraggio possono essere divise in due categorie:

- bioaccumulo: si basa su analisi chimiche e misura le quantità di sostanze assorbite dall'ambiente e accumulate in un organismo;
- bioindicazione: si basa su misure biologiche, ovvero modificazioni morfologiche, fisiologiche o genetiche a livello di organismo e variazioni nella composizione faunistica e/o floristica a livello di popolazione e comunità.

Risulta chiaro che il biomonitoraggio deve essere considerato un'integrazione e non un'alternativa al monitoraggio strumentale e che i due metodi andrebbero affiancati per avere informazioni complete (Manes, 1998).

1.2 I licheni come bioaccumulatori

Il termine bioaccumulo indica un aumento delle concentrazioni di sostanze chimiche in un organismo nel tempo in relazione alla concentrazione delle stesse nell'ambiente. Tali sostanze si accumulano negli organismi ogni volta che il loro assorbimento e stoccaggio procedono più rapidamente della loro metabolizzazione e/o escrezione.

I licheni sono ampiamente utilizzati come bioaccumulatori di elementi in traccia, tra cui metalli pesanti, radionuclidi, non metalli come zolfo e fluoro, e composti xenobiotici come gli idrocarburi clorurati. Infatti, grazie al loro metabolismo strettamente dipendente dagli apporti atmosferici e alle loro caratteristiche, possono accumulare questi elementi e mantenerli inalterati per lungo tempo senza manifestare danni (Nieboer e Richardson 1981; Garty, 1993; Sarret *et al.*, 1998). Essendo privi di meccanismi di selezione, i licheni sono caratterizzati dall'accumulare nel loro interno le sostanze aerodisperse anche quando queste sono presenti nell'ambiente solo in tracce. L'assorbimento degli elementi da parte del tallo dipende da diversi fattori ecologici, come la natura degli elementi, le caratteristiche morfologiche del tallo e i parametri ambientali. Gli elementi in traccia si depositano sulla superficie del lichene come particelle secche o materiale dissolto e /o sospeso nelle precipitazioni. Questi elementi possono essere trattenuti come particolato tra le ife, entrare in processi fisico-chimici come lo scambio ionico o essere trasportati dentro le cellule tramite trasporto attivo e passivo (Tyler, 1989).

Alcuni autori hanno mostrato come la concentrazione degli elementi in traccia riscontrata nei talli di diverse specie licheniche sia direttamente correlata con il livello ambientale di tali elementi (Sloof, 1995; Bari *et al.*, 2001). Tali analisi vengono utilizzate principalmente per stimare i livelli medi di deposizione di inquinanti emessi da sorgenti puntiformi quali inceneritori, centrali termoelettriche e miniere (Loppi, 1999), ma possono essere un utile strumento anche per stabilire il potenziale effetto

degli inquinanti su scala regionale e locale e soprattutto possono fornire informazioni sugli andamenti temporali e le interazioni reciproche degli elementi in traccia, indispensabili per le valutazioni di rischio per la salute umana (Bennett e Wetmore, 1999; Wolterbeek, 2002). Inoltre, il loro uso può riguardare programmi a breve e a lungo termine (Bennett e Wetmore, 1999; Loppi *et al.*, 1997; Loppi e Corsini, 2003).

Grazie alla relativa semplicità e rapidità del metodo, alla possibilità di utilizzare, in mancanza di flora lichenica spontanea, talli prelevati in aree non contaminate e trapiantati nell'area di studio (Bennett *et al.*, 1996; Garty *et al.*, 1996), a partire dagli anni '80 molte sono state le indagini di questo tipo condotte in Italia e all'estero soprattutto in aree industriali e urbane, ma anche naturali (Loppi, 1999). A ciò si aggiunge il vantaggio di non richiedere approfondite conoscenze lichenologiche in quanto l'indagine può essere condotta anche su una singola specie facilmente riconoscibile.

2. MATERIALE E METODI

2.1 Bioaccumulo degli elementi in traccia

2.1.1 Raccolta dei campioni e preparazione delle "bags"

Per effettuare le analisi degli elementi accumulati nei talli lichenici si è proceduto, analogamente a come operato nei 3 anni precedenti, al trapianto nell'area di studio di talli della specie *Evernia prunastri*, un lichene foglioso epifita molto usato in studi del genere ed estremamente comune nella fascia bioclimatica termomediterranea in ambienti a elevata naturalità. L'utilizzo dei trapianti (biomonitoraggio attivo) si era reso necessario perché un sopralluogo preliminare dell'area aveva 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.

Per la raccolta e la preparazione dei campioni è stato utilizzato lo stesso protocollo seguito fin dalla prima campagna di monitoraggio. I talli lichenici di *E. prunastri* sono stati raccolti il 5 giugno 2013 nella Riserva Naturale Monte Casoli di Bomarzo (VT), dove l'elevato grado di naturalità 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 all'interno di una busta sterile per evitare qualunque tipo di contaminazione; qui sono stati selezionati, puliti da eventuali impurità, lasciati asciugare all'aria su fogli di carta da filtro e collocati in "bags". Al fine di evitare ogni possibile contaminazione, i campioni sono stati manipolati con

guanti in lattice e pinzette in plastica.



Le “bags”, di dimensioni di 10×20 cm, sono state realizzate con porzioni di rete in plastica a maglie di $0,5 \times 0,5$ cm, preventivamente lavate in acqua distillata e chiuse con filo in PVC, utilizzato anche per fissarle agli alberi. Tre talli distesi sono stati posizionati in ciascuna bag, in modo da evitare sovrapposizioni dei lobi e massimizzare la superficie esposta. Alcuni dei talli raccolti sono conservati a -80°C come materiale di riferimento (“bianco”) per le analisi.

2.1.2 Esposizione delle “bags”

Per ogni stazione sono state collocate 3 bags su rami di alberi in posizione marginale e, se necessario, preventivamente ripuliti di foglie o ramificazioni secondarie, ad un’altezza da terra di 150 cm per evitare la contaminazione da parte del suolo. Tutte le bags sono state collocate al loro posto tra il 24 e il 25 giugno 2013 e sono rimaste esposte fino al 30 ottobre 2013; al momento della raccolta le bags delle diverse stazioni sono state posizionate in buste sterili separate per stazione e trasferite in laboratorio per le successive analisi.

Durante le operazioni di recupero delle bags presso l’UCP11 (La Farnesiana) è stato prelevato un campione di suolo sottostante gli alberi dove erano state posizionate le bags, con l’intenzione di verificare il contenuto di metalli dello stesso.

2.1.3 Analisi degli elementi

La polvere e il materiale estraneo depositati sui talli lichenici sono stati eliminati utilizzando pinzette di plastica e un flusso d’aria generato tramite una pompetta manuale. Successivamente i talli, raggruppati per stazione per minimizzare la variabilità intraspecifica, sono stati posti in piastre di vetro ad essiccare in stufa alla temperatura di 40°C per tre giorni. Una aliquota del materiale vegetale essiccato di ciascuna stazione è conservato presso il Laboratorio di Botanica Sistemica e Micologia dell’Università per eventuali future analisi. Una volta essiccati, tutti i campioni, quelli esposti ed il controllo non esposto, sono stati polverizzati in mulino orbitale con mortaio e sfere d’agata (Retsch 100M) in cicli di macinazione di 8 min a 400 rpm. I campioni polverizzati risultanti dal mescolamento dei diversi talli sono stati raccolti con un cucchiaino di plastica, conservati in falcon in propilene e inviati al Laboratorio ANALYSIS S.r.l. di Pantalla (PG) per la determinazione della concentrazione dei seguenti elementi: As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb.

Dopo ogni ciclo di macinazione, il mortaio e le sfere di agata sono stati puliti con acido nitrico (67-69% Super Puro SpA Romil per analisi ambientale) e risciacquati in acqua bidistillata. Tutte le operazioni sono state effettuate indossando guanti monouso al fine di escludere qualunque tipo di contaminazione. Anche il campione di suolo prelevato nell'UCP11 (loc. La Farnesiana) è stato essiccato e macinato ed inviato al laboratorio ANALYSIS S.r.l. per la determinazione del contenuto degli stessi elementi.

2.1.4 Scala di interpretazione dei dati di bioaccumulo

Per i valori di bioaccumulo esiste una scala di interpretazione che attribuisce un grado di naturalità/alterazione ad una data area in base alle concentrazioni (esprese in parti per milione = ppm) degli elementi in tracce contenuti nei talli lichenici raccolti o trapiantati nell'area in questione. Questa scala (Tab. 1), realizzata utilizzando centinaia di misure effettuate su tutto il territorio nazionale, è stata pubblicata dall'Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente (APAT, ora ISPRA) sulle linee guida per il bioaccumulo tramite licheni epifiti (Nimis e Bargagli, 1999).

Tab. 1 – Scala di interpretazione dei valori di bioaccumulo (ppm) degli elementi analizzati nei talli lichenici (da: Nimis e Bargagli, 1999).

	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb
Naturalità molto alta	<0.2	<0.2	<1.2	<7	<0.07	<1	<4
Naturalità alta	0.6	0.4	2.2	10	0.13	2	10
Naturalità media	1.2	0.8	4	15	0.20	3	25
Naturalità/Alterazione basse	1.9	1.4	6	25	0.29	5	55
Alterazione media	2.4	2	9	34	0.42	6	80
Alterazione alta	3	2.6	16	53	0.74	8	108
Alterazione molto alta	>3	>2.6	>16	>53	>0.74	>8	>108
Valore max in Italia	5.53	9.04	60.5	161	1.84	34.4	494

In generale, la composizione dei talli riflette la composizione chimica dell'atmosfera in cui i licheni crescono, ma questa relazione può essere altamente variabile perché influenzata da diversi fattori ecologici. L'assorbimento degli elementi in traccia dipende, per esempio, dalla natura dell'elemento, dalle caratteristiche morfologiche del tallo, dalla loro interazione e dai modi e tempi di permanenza degli elementi nei licheni, dalle variabili ambientali quali ad esempio frequenza ed intensità delle piogge (Garty, 2001).

3. AREA DI STUDIO

L'area di studio, comprendente i comuni di Allumiere, Civitavecchia, Santa Marinella, Tarquinia e Tolfa, rientra nella cosiddetta regione bioclimatica mediterranea (Blasi, 1994), caratterizzata dalla presenza di un periodo estivo arido con scarse precipitazioni e temperature medie elevate. In particolare, la fascia costiera appartiene alla regione mediterranea, mentre quella più interna alla regione mediterranea di transizione (Fig. 1) differenziate in funzione della latitudine, altitudine e distanza dal mare. I venti principali, a 4 m dal suolo, soffiano, per la maggior parte dell'anno, da Ovest-Nord-Ovest

(http://www.eurometeo.com/italian/climate/city_LIQJ/id_flag/meteo_civitavecchia%20italia).

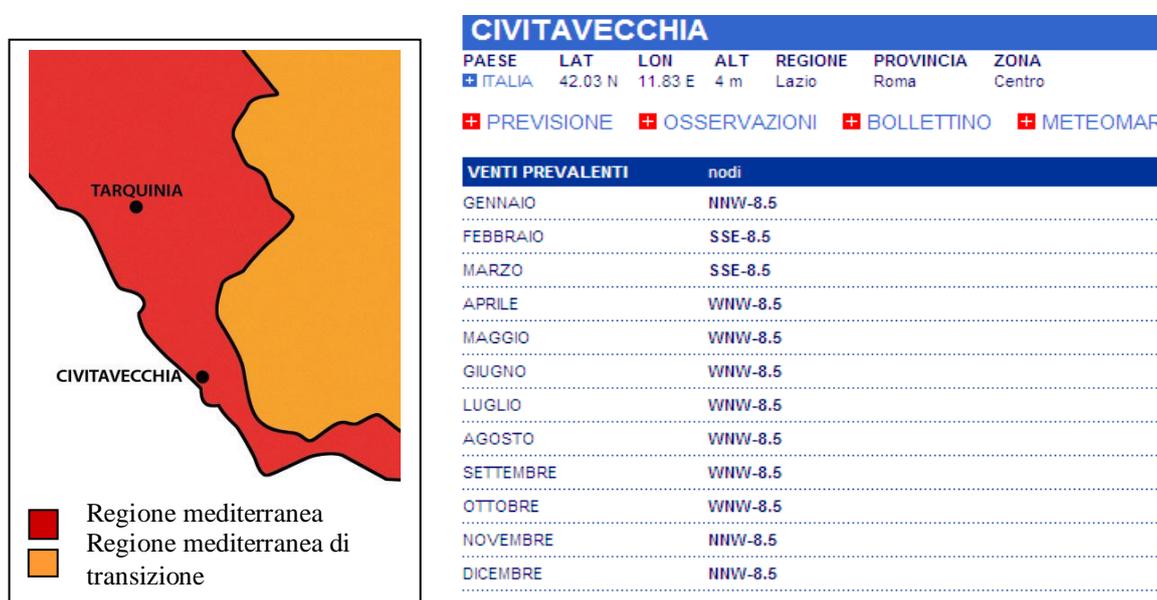


Fig. 1. Regioni fitoclimatiche e direzione prevalente dei venti.

La regione mediterranea è caratterizzata da condizioni climatiche caldo-aride, con precipitazioni annue da 649 (Isole Pontine) a 1133 mm (Agro Pontino). La regione mediterranea di transizione, invece, è caratterizzata da precipitazioni annuali comprese tra 810 e 1519 mm. La vegetazione forestale prevalente è rappresentata dalle leccete, dai querceti a roverella e dalle cerrete (Cornellini e Petrella, 2005).

Le formazioni boschive che hanno interessato questo studio sono, in zone più aperte e soleggiate, la vegetazione termofila, spesso a macchia mediterranea, con lecci (*Quercus ilex*), lentischi, eriche e numerose sughere (*Quercus suber*) sparse, mentre, nelle aree più fresche, a questi si aggiungono elementi tipici del querceto misto caducifogli come roverelle (*Quercus pubescens*), cerri (*Quercus*

cerris), aceri e frassini.

3.1 Unità di Campionamento Primarie

Le stazioni di campionamento, che verranno chiamate UCP, sono state selezionate tra i sottomultipli della rete nazionale di maglia di 18×18 km, in modo che fossero uniformemente distribuite sul territorio, ma disposte con una densità maggiore vicino alla centrale di Torrevaldaliga Nord (maglia di 3 km) e minore nelle zone più lontane dalla centrale (maglia di 9 km), anche in funzione della direzione dei venti prevalenti (Fig. 2).

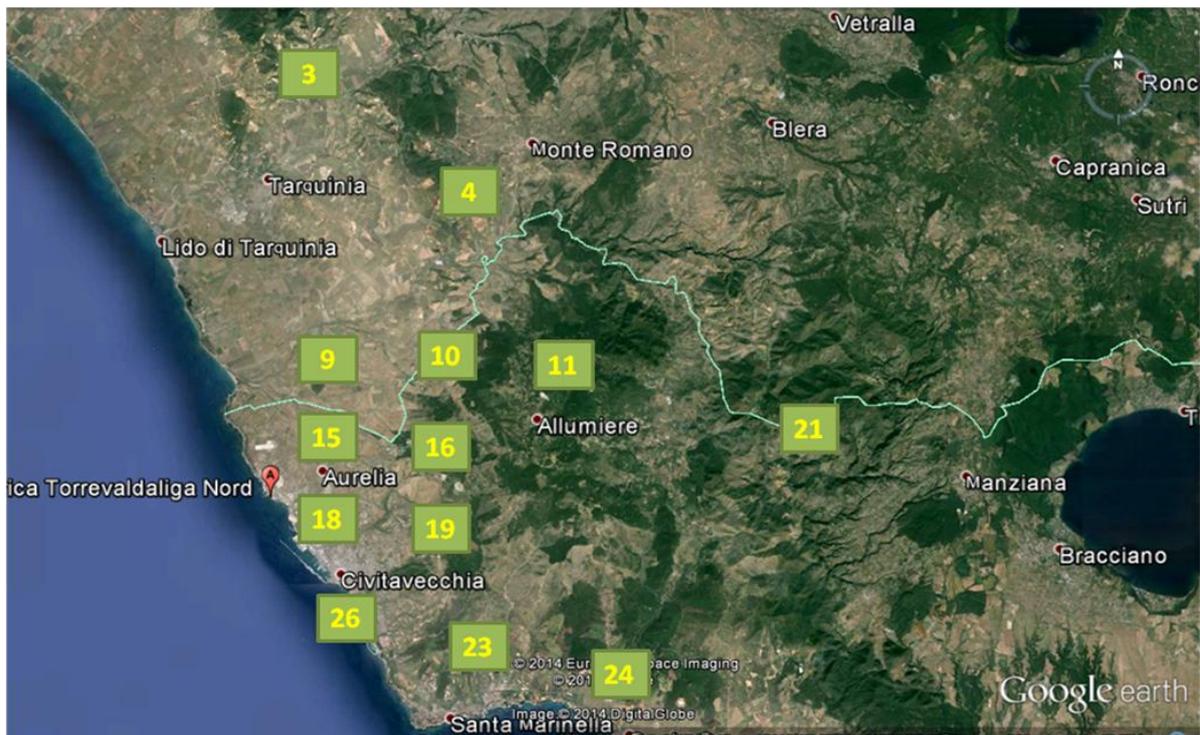


Fig. 2 - Mappa dell'area di studio con le 13 stazioni di campionamento (riquadri numerati) nell'anno 2013.

3.2 Stazioni di bioaccumulo

Per il 2013, i trapianti sono stati effettuati in 13 stazioni delle 25 originariamente monitorate, scelte in base ai criteri sopra esposti e alla luce dei risultati di bioaccumulo delle campagne precedenti. La numerazione delle 13 UCP analizzate, in numero ridotto a seguito della riduzione del finanziamento, è rimasta invariata rispetto a quella adottata nella prima campagna del 2010.

Per ogni stazione in cui sono stati trapiantati i talli lichenici, vengono di seguito fornite una foto dell'area e le coordinate degli alberi (da 1 a 3) su cui le bags sono state posizionate.



UCP 3 Tarquinia
 Bag 1: 727254, 4691060
 Bag 2: 727213, 4691032
 Bag 3: 727195, 4690992



UCP 4 Tarquinia
 Bag 1: 732250, 4682427
 Bag 2: 732079, 4682590
 Bag 3: 731922, 4682518



UCP 9 Tarquinia
 Bag 1: 728379, 4673983
 Bag 2: 728461, 4673924
 Bag 3: 728505, 4673907



UCP 10 Strada per Cencelle
 Bag 1: 732426, 4674544
 Bag 2: 732268, 4674612
 Bag 3: 732211, 4674683



UCP 11 Allumiere
 Bag 1: 734905, 4674430
 Bag 2: 734912, 4674438
 Bag 3: 734923, 4674455



UCP 15 Civitavecchia
 Bag 1: 728201, 4671331
 Bag 2: 728197, 4671329
 Bag 3: 728265, 4671413



UCP 16 Civitavecchia
 Bag 1: 728919, 4668447
 Bag 2: 728928, 4668421
 Bag 3: 728914, 4668377



UCP 18 Loc. Borgata Aurelia
 Bag 1: 732901, 4668440
 Bag 2: 732903, 4668442
 Bag 3: 732898, 4668447



UCP 19 Loc. Borgata Aurelia
 Bag 1: 732618, 4673314
 Bag 2: 732564, 4673141
 Bag 3: 732547, 4673064



UCP 21 Tolfa
 Bag 1: 735264, 4662363



UCP 23 Civitavecchia
 Bag 1: 738633, 4661373



UCP 24 S. Marinella
 Bag 1: 744373, 4667920

Bag 2: 735299, 4662365
Bag 3: 735302, 4662365

Bag 2: 738623, 4661365
Bag 3: 738608, 4661355

Bag 2: 744370, 4667922
Bag 3: 744379, 4667917



UCP 26 Civitavecchia
Bag 1: 732980, 4665039
Bag 2: 732961, 4665041
Bag 3: 732951, 4665033

4. RISULTATI di BIOACCUMULO

Ciascuno degli elementi correlati con l'utilizzo del carbone ha sull'ambiente un impatto diverso in termini di entità e tipologia che consente di attribuirgli un particolare grado di "interesse ambientale" in base al quale gli elementi possono essere classificati in (US National Research Council, 1980):

- elementi di elevato interesse (As, B, Cd, Hg, Mo, Pb, Se);
- elementi di moderato interesse (Cr, Cu, Ni, V, Zn);
- elementi di minore interesse (Ba, Co, Ge, Li, Mn, Sb, Sr);
- elementi radioattivi (Rn, Th, U);
- elementi di interesse, ma presenti in concentrazioni molto basse (Be, Sn, Te, Ti).

Le analisi effettuate sui talli lichenici trapiantati nelle 13 UCP indagate hanno riguardato elementi di "elevato interesse", quali As, Cd, Hg e Pb e di "moderato interesse" quali Cr, Cu e Ni.

4.1 Concentrazione degli elementi e scala di interpretazione

Le concentrazioni degli elementi in traccia misurate dipendono dalle caratteristiche della specie e dal tempo di esposizione, per cui non possono essere interpretate come una valutazione quantitativa delle emissioni e delle concentrazioni in aria degli elementi, ma consentono un confronto con dati pregressi laddove la specie utilizzata ed i tempi di esposizione si equivalgono.

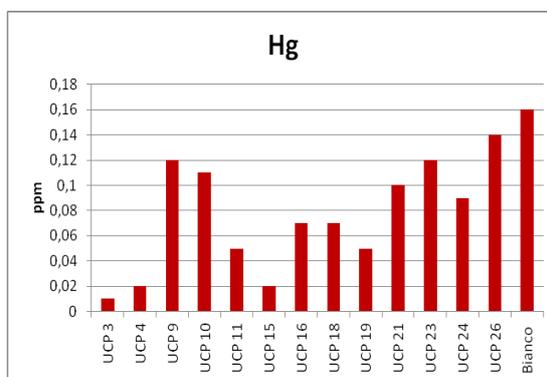
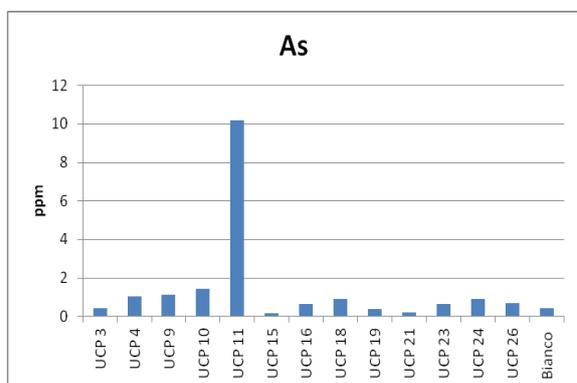
La Tab. 2 mostra i risultati dalle analisi effettuate nelle 13 UCP nel 2013. I valori riportati sono stati ottenuti sottraendo le concentrazioni del bianco. La scala di interpretazione a colori viene utilizzata per favorire una rapida identificazione delle aree con accumulo più consistente. In Fig. 3 vengono inoltre riportati, in grafici separati, i valori di concentrazione degli elementi analizzati nei talli

lichenici per ciascuna stazione, unitamente ai valori sottratti relativi al controllo (bianco),.

In generale, si può osservare che la maggior parte dei valori misurati ricade nelle fasce di naturalità da molto alta ad alta e media (Tab. 2, colori blu, azzurro e verde scuro). Risultano essere 8 le stazioni in cui almeno due elementi non corrispondono a situazioni di naturalità molto alta (UCP 4, 9, 10, 18, 21, 23, 24, 26) e 7 quelle in cui almeno un elemento individua una situazione di bassa alterazione (verde scuro) (UCP 4, 9, 16, 18, 23, 24, 26). Le due stazioni più critiche sono la 10 e 11, ove sono stati registrati i valori più alti di As; in particolare, i valori dell'UCP 11 (loc. La Farnesiana) confermano quanto già rilevato nelle campagne precedenti. Al fine di meglio interpretare questo dato, è stato campionato ed analizzato il suolo della stazione; nella Tab. 3 sono riportati i valori di concentrazione in ppm degli elementi rinvenuti nel campione e quelli relativi ai limiti di legge stabiliti dal D.M. 471/99 e il successivo D.Lgs. 152/06.

Tab. 2 – Concentrazione (ppm) degli elementi in traccia nei talli lichenici trapiantati nelle 13 UCP nel 2013 (blu=naturalità molto alta; azzurro=naturalità alta; verde scuro=naturalità media; verde chiaro=naturalità/alterazione bassa; giallo=alterazione media; arancione=alterazione alta; rosso=alterazione molto alta; n.d.=non disponibile).

	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb
3	0.42	0.01	0.02	0.97	0.01	0.15	0.95
4	1.04	0.03	0.74	3.37	0.02	1.14	1.71
9	1.11	0.03	0.92	10.57	0.12	1.17	2.67
10	1.45	0.02	0.62	6.07	0.11	1.28	1.6
11	10.17	0.01	0.39	2.75	0.05	0.59	0.8
15	0.18	0.12	0.46	7.1	0.02	0.99	1.43
16	0.63	0.02	0.42	3.28	0.07	0.72	2.32
18	0.91	0	1.55	5.47	0.07	1.33	2.13
19	0.39	0.01	0.37	3.81	0.05	0.77	4.2
21	0.21	0	0.19	3.42	0.10	0.71	0.55
23	0.65	0.01	1.06	5.24	0.12	0.97	2.85
24	0.89	0	0.18	1.37	0.09	0.16	1.38
26	0.67	0	0.52	6.21	0.14	2.01	2.61



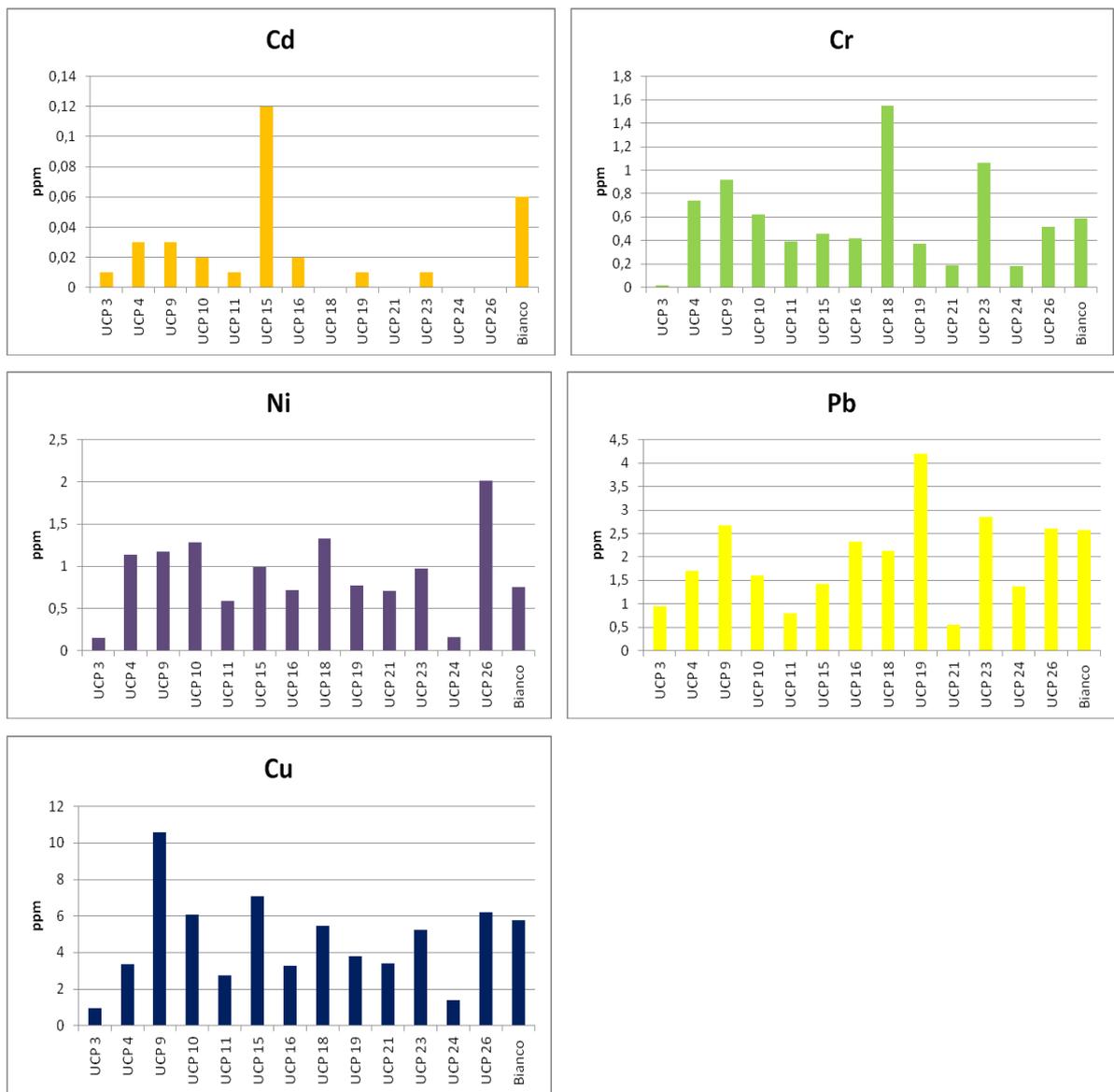


Fig. 3 – Concentrazione (ppm) degli elementi in traccia nei talli lichenici trapiantati nel 2013 dopo aver sottratto il controllo (bianco).

	As	Hg	Cd	Cr	Ni	Pb	Cu
UCP 11	25.13	0.07	0.14	17.3	32.54	17.53	18.65
Limiti di legge	20	1	2	150	120	100	120

Tab. 3 – Concentrazione (ppm) degli elementi in traccia nel campione di suolo dell'UCP 11 e limiti di legge (D.M. 471/99 e succ. D.Lgs. 152/06).

Dalla Tab. 3 emerge che i valori degli elementi analizzati si trovano tutti al di sotto dei limiti imposti dalla legge tranne per l'arsenico e ciò potrebbe spiegare l'elevato contenuto dell'elemento nei talli lichenici della zona, sia in questa campagna che nelle precedenti.

Confrontando i valori graficati in Fig. 3 con le concentrazioni misurate nel controllo, il mercurio è l'elemento più presente nell'area monitorata essendo stato registrato in tutte le stazioni, con valori di accumulo maggiore nelle stazioni poste a sud sud-est, influenzata forse dalla direzione prevalente dei venti al suolo

(http://www.eurometeo.com/italian/climate/city_LIQJ/id_flag/meteo_civitavecchia%20italia).

. Gli altri elementi mostrano un trend di distribuzione disomogeneo, con valori superiori al controllo diversamente distribuiti nell'area di studio. Il cadmio è più presente nell'UCP 15; il Cr nelle UCP 9, 18 e 23; il Ni nelle UCP 4, 9, 10, 15, 18, 23 e 26; il Pb nell'UCP 19; il Cu nelle UCP 9 e 15. La stazione 9 è quella in cui maggiore è il numero di elementi le cui concentrazioni superano quelle registrate nel controllo.

5. CONFRONTO BIOACCUMULO CON GLI STUDI PRECEDENTI

Le analisi della campagna di monitoraggio 2013 sono state condotte presso un laboratorio diverso da quello delle campagne di monitoraggio dei 3 anni precedenti. La confrontabilità diretta dei dati con quelli degli anni precedenti risulta quindi inficiata da variabili strumentali e procedurali che immancabilmente si creano durante le fasi di preparazione dei campioni. Piccole variazioni nei valori di concentrazione nei campioni biologici sono normali, e ad esse si aggiungono quelle connesse alle tecniche di mineralizzazione con cui si inorganicano gli elementi da leggere all'ICP-MS. In ogni caso la validità dei risultati mostrati in tutte le campagne, così come quelli di questo ultimo anno, è stata accertata grazie all'analisi, contemporaneamente ai campioni di licheni esposti, di un campione di lichene standard, il cui contenuto in elementi è certificato (BCR-482 Institute for Reference Materials and Measurements della Comunità Europea).

Ricordiamo che, dipendendo l'assorbimento dei diversi elementi da vari fattori ecologici (Garty, 2001) non è possibile stabilire in questo contesto una relazione quantitativa diretta tra le emissioni in aria degli elementi e le concentrazioni nei talli lichenici; pertanto valori più bassi o più alti nei talli nei diversi anni di studio non corrispondono necessariamente a emissioni più basse o più alte.

A conclusione, i risultati esposti indicano per il 2013 un trend di miglioramento generale nelle stazioni di monitoraggio studiate. I dati riscontrati in questa campagna sembrano da un lato confermare una criticità, già segnalata negli anni passati, per la stazione 9, dall'altro mostrano un trend in miglioramento nei confronti delle stazioni 3, 11 e 18 segnalate come critiche nelle

precedenti relazioni.

BIBLIOGRAFIA

- Bargagli R., Iosco F.P., Leonzio C., 1985. Monitoraggio di elementi in tracce mediante licheni epifiti. Osservazioni nell'area industriale di Rosinano Solvay. *Inquinamento* 2, 33-37.
- Bari A., Rosso A., Minciardi M.R., Troiani F., Piervittori R., 2001. Analysis of heavy metals in atmospheric particulates in relation to their bioaccumulation in explanted *Pseudevernia furfuracea* thalli. *Environmental Monitoring and Assessment* 69, 205–220.
- Blasi, 1994. Fitoclimatologia del Lazio. *Fitosociologia* 27, 151-175.
- Bennett J.P., Dibben M.J., Lyman K.J., 1996. Element concentrations in the lichen *Hipogymnia physodes* (L.) Nyl. after 3 years of transplanting along Lake Michigan. *Environmental and Experimental Botany* 36, 255-270.
- Bennett J.P., Wetmore C.M., 1999. Changes in element contents of selected lichens over 11 years in northern Minnesota, USA. *Environmental and Experimental Botany* 41, 75-82.
- Cislaghi, C., Nimis, P.L., 1997. Lichens, air pollution and lung cancer. *Nature* 387, 463–464.
- Petrella P., 2005. Lineamenti della flora e vegetazione del Lazio. In: Sauli G., Cornelini P., Preti F., *Manuale di Ingegneria Naturalistica*, vol. 3, Sistemazione dei versanti. Regione Lazio, Roma.
- Decreto legislativo n. 155, 13 agosto 2010. Qualità dell'aria ambiente - Attuazione direttiva 2008/50/Ce. <http://www.reteambiente.it/normativa/13891/>.
- Garty J., 1993. Lichens as biomonitors for heavy metal pollution. In: Markert B. (Ed.) *Plants as Biomonitors. Indicators for heavy metals in the terrestrial environment*. VCH, Weinheim, pp. 193-263.
- Garty J., 2001. Biomonitoring atmospheric heavy metals with lichens: Theory and application. *Critical Reviews in Plant Science* 20, 309–371.
- Garty J., Kauppi M., Kauppi A., 1996. Accumulation of airborne elements from vehicles in transplanted lichens in urban sites. *Journal of Environmental Quality* 25, 265-272.
- Gasparo D., Castello M., Bargagli R., 1989. Biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico tramite licheni. Studio presso un inceneritore (Macerata). *Studia Geobotanica* 9, 153-250.
- IPCC, 2007. *Climate Change 2007: The physical science basis*. In: Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis M.C., Avery K., Tignor M., Miller H.L. (Eds.) *Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press.
- Loppi S., 1999. Licheni come bioaccumulatori di elementi in traccia: stato dell'arte in Italia. In: *Atti del Workshop Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale*, Roma, 26-27

- novembre 1998. ANPA-Serie Atti, 1999: 123-143.
- Loppi S., Corsini A., 2003. Diversity of epiphytic lichens and metal contents of *Parmelia caperata* thalli as monitors of air pollution in the town of Pistoia (Central Italy). *Environmental Monitoring and Assessment* 86, 289-301.
- Loppi S., Giovannelli L., Pirintsos S.A., Putorti E., Corsini A., 1997. Lichens as bioindicators of recent changes in air quality (Montecatini Terme, Italy). *Ecologia Mediterranea*, 23: 53-56.
- Manes F., 1998. Analisi della qualità ambientale mediante studi di bioindicazione e biomonitoraggio su specie vegetali. In: Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale", Roma, 26-27 novembre 1998. ANPA Serie Atti 2/1999, pp. 267-277.
- MEA (Millennium Ecosystem Assessment), 2005. *Ecosystems and human well-being: Synthesis*. Island Press, Washington DC.
- Nieboer E., Richardson D.H.S., 1981. Lichens as monitors of atmospheric deposition. In: *Atmosphere pollutants in natural waters*. Eisenreich S.J. (Ed.) Ann. Arbor Science Publishers, 339-388.
- Nimis P.L., 1999. Il biomonitoraggio della "qualità dell'aria" in Italia. In: Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale", Roma, 26-27 novembre 1998. ANPA Serie Atti 2/1999, pp. 173-185.
- Nimis P.L., Bargagli R., 1999. Linee guida per l'utilizzo dei licheni epifiti come bioaccumulatori di metalli in traccia. Atti del workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale" Roma, 26-27 novembre 1998 – ANPA.
- Sarret G., Manceau A., Cuny D., Van Haluwyn C., Deruelle S., Hazemann J.L., Soldo Y., Eybert-Bérard L., Menthonnex J.J., 1998. Mechanism of lichen resistance to metallic pollution. *Environmental Science and Technology* 32, 3325-3330.
- Sloof J.E., 1995. Lichens as quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition, using transplants. *Atmospheric Environment* 29, 11-20.
- Tyler G., 1989. Uptake, retention and toxicity of heavy metals in lichens. A brief review. *Water, Air, and Soil Pollution* 47, 321-333.
- US National Research Council, 1980. *Trace element geochemistry of coal resource development related to environmental quality and health*. Washington, DC, USA: National Academy Press.
- Wolterbeek B., 2002. Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution* 120, 11-21.

**VALUTAZIONE DEL DANNO PRIMARIO AL DNA (COMET
ASSAY) IN ORGANISMI ANIMALI “SENTINELLA”
E ANALISI DEI METALLI PESANTI**

INDICE – PARTE 2

1. INTRODUZIONE

- 1.1. Valutazione del danno primario al DNA in organismi animali “sentinella”
(‘comet assay’ o ‘single gel cell electrophoresis’SGCE).....20
- 1.2. Descrizione sintetica della tecnica del “Comet Assay”22

2. RISULTATI DEL MONITORAGGIO

- 2.1. Specie “sentinella”: *Helix aspersa*
 - 2.1.1. Cenni sulla biologia della specie.....25
 - 2.1.2. Materiali e metodi.....26
 - 2.1.3. Risultati.....28
- 2.2. Specie “sentinella”: *Aphanius fasciatus*
 - 2.2.1. Cenni sulla biologia della specie.....32
 - 2.2.2. Materiali e Metodi.....33
 - 2.2.3. Risultati.....35

3. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE.....37

BIBLIOGRAFIA.....38

4. ANALISI DEI METALLI PESANTI

- 4.1. Materiali e Metodi.....40
- 4.2. Risultati.....41
- 4.3. Conclusioni51

BIBLIOGRAFIA55

APPENDICE.....57

1 INTRODUZIONE

1.1. Valutazione del danno primario al DNA in organismi animali “sentinella” (*‘comet assay’* o *‘single gel cell electrophoresis’* SGCE)

La valutazione di esposizione precoce ad agenti mutageni è stata effettuata attraverso l’analisi del danno primario al DNA (Comet Assay) in due organismi animali “sentinella” opportunamente scelti, rappresentanti di differenti habitat presenti nel territorio potenzialmente interessato dall’impatto della centrale termoelettrica a carbone. Tali organismi sentinella sono: il pesce osseo lagunare *Aphanius fasciatus* ed il gasteropode terrestre *Helix aspersa*. Per entrambe le specie, i risultati ottenuti sono stati confrontati con i risultati inerenti le campagne degli anni precedenti, per valutare un eventuale aumento dell’esposizione di questi organismi a inquinanti ad azione genotossica.

Il “Comet Assay” o test della cometa è un biomarker di esposizione, che permette di valutare la presenza e l’incremento (con test ripetuti nel tempo) nell’ambiente di agenti mutageni a cui gli organismi sono esposti. Questi agenti mutageni possono essere di natura fisica (e.g. radiazioni) o di natura chimica (contaminanti ad azione genotossica) e presentano la comune proprietà di provocare, direttamente o indirettamente lesioni al DNA che si trova all’interno delle cellule. Tali lesioni si traducono come rotture della molecola di DNA a singolo o doppio filamento e risultano essere di diversa entità, in relazione al grado di esposizione degli organismi.

Il Comet Assay si basa quindi sulla quantificazione della frammentazione del DNA all’interno delle cellule degli organismi potenzialmente esposti a contaminanti genotossici, ed è in grado di fornire sia una risposta qualitativa (presenza/assenza di frammentazione del DNA ed esposizione a genotossici), che quantitativa (grado di frammentazione proporzionale al grado di esposizione a contaminanti genotossici). Risulta quindi una tecnica sensibile e di facile esecuzione, applicabile a qualsiasi cellula eucariote nucleata. (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, Mosesso et al., 2011).

La capacità del test della cometa di quantificare l’eventuale danno indotto da agenti genotossici è particolarmente importante ed indicata per il nostro specifico caso, in cui si ha l’obiettivo di seguire nel tempo l’eventuale incremento di esposizione degli organismi a contaminanti ambientali,

partendo da una situazione di riferimento costituita dalla Centrale Enel a carbone TVN non ancora a regime (campagna di biomonitoraggio 2010).

I dati che sono presentati in questa relazione costituiscono la quarta serie di dati, rispetto alla prima campagna di monitoraggio del 2010. Dal confronto tra le serie di dati annuali finora raccolti, è possibile stimare un'eventuale variazione dell'esposizione di questi organismi ad agenti genotossici in concomitanza con le attività di produzione della centrale Torvaldaliga nord. L'analisi dei metalli pesanti condotta nei tessuti dei medesimi organismi ha permesso, una prima valutazione di un'eventuale correlazione tra variazione del danno da esposizione (sia in termini spaziali che temporali), e presenza di elementi in traccia negli organismi.

È importante sottolineare che i dati presentati in questa relazione vanno necessariamente inquadrati in un'ottica relativa di confronto con i dati dei precedenti anni e con quelli delle future campagne di monitoraggio, tanto più che si opera in un territorio certamente non privo di impatti antropici di diversa natura.

L'obiettivo di questo monitoraggio è quindi verificare nel tempo se, con l'esercizio a regime della centrale a carbone, si verifichi un aumento statisticamente significativo nel grado di esposizione ad agenti genotossici nonché riguardo la presenza di determinati inquinanti, riferibili all'esercizio della centrale medesima.

1.2 Descrizione sintetica della tecnica del “Comet Assay”

La tecnica del Comet Assay consiste nel sottoporre il nucleo delle cellule dei tessuti opportunamente scelti ad un campo elettrico nel quale gli eventuali frammenti di DNA presenti migrano producendo delle “code” di frammenti. La quantità di DNA presente nelle code e la loro lunghezza è direttamente proporzionale al grado di frammentazione della molecola e fornisce un indice oggettivo (a parità di condizioni sperimentali) della esposizione dei singoli organismi studiati ad agenti genotossici di diversa natura.

Le diverse fasi della tecnica possono essere sinteticamente descritte come segue:

- Le cellule vengono prelevate dal tessuto prescelto (nel nostro caso sangue per *A. fasciatus* ed emolinfa per *H. aspersa*);
- Le cellule vengono mescolate con gel di agarosio a basso punto di fusione (LMPA) e tale miscela viene distesa su un vetrino già provvisto di uno stato di gel a normale punto di fusione (NMPA);
- Una volta raffreddati e solidificatosi il gel, i vetrini vengono immersi nella soluzione di lisi per un tempo prestabilito per liberare il nucleo dalle membrane nucleari ed esporre il DNA per la migrazione elettroforetica;
- Dopo la lisi i vetrini vengono posti in una camera elettroforetica specifica per il “Comet Assay”;
- I preparati, distesi nella camera elettroforetica, vengono ricoperti con il tampone a pH 13 nel quale avverrà la corsa elettroforetica. La scelta del pH della soluzione di corsa determina il grado di denaturazione del DNA e, di conseguenza, la possibilità di evidenziare solo le rotture del DNA a singolo filamento (SSB) o anche quelle a doppio filamento (DSB). Nel nostro caso è stato applicato lo standard alcalino (pH 13) che permette l’evidenziazione pressoché totale della frammentazione eventualmente presente;
- I preparati vengono lasciati immersi nel tampone di corsa per un tempo variabile tra i 5 e i 30 minuti per la denaturazione del DNA (il tempo varia a seconda della specie);
- Dopo la denaturazione viene condotta la corsa elettroforetica per un tempo variabile tra i 5 e i 30 minuti (a seconda della specie);
- Dopo la corsa il pH alcalino a cui sono stati sottoposti i preparati viene neutralizzato con opportuno tampone, fatti asciugare sotto cappa, quindi colorati con Bromuro di etidio;

- I preparati sono infine analizzati con un microscopio a fluorescenza al quale è applicata una telecamera collegata ad un computer dotato di un programma specifico di analisi di immagine per il “Comet Assay”: Comet Assay III (Perceptive Instruments Ltd).

In Figura 1 sono riportate alcune immagini al microscopio relative al nucleo di cellule in fase di analisi

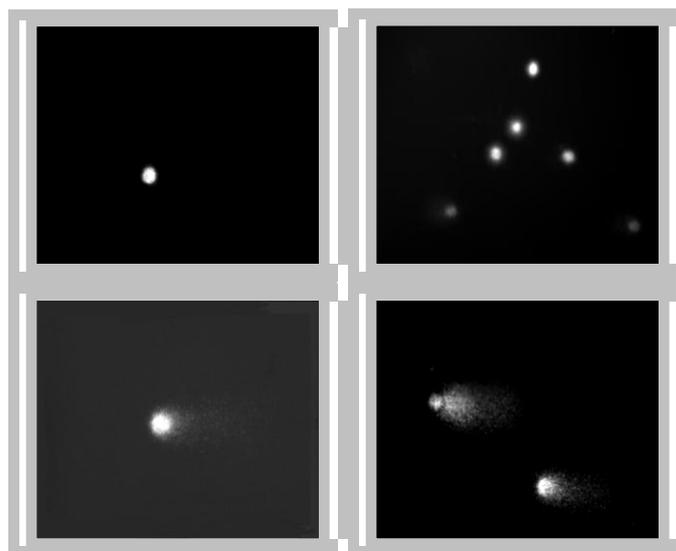


Fig.1 Nuclei di cellule sottoposte al test della cometa. In alto a sinistra un nucleo che presenta un danno nullo; in alto a destra nuclei con basso grado di frammentazione; in basso nuclei con differenti gradi di frammentazione.

Il software Comet Assay III (Perceptive Instruments Ltd) utilizzato per la lettura dei vetrini al microscopio a fluorescenza, fornisce per ogni preparato l’analisi statistica e grafica dei parametri standard indice del danno al DNA relativa a 100 cellule per individuo. I risultati ottenuti sono esposti sotto forma dei seguenti parametri:

- **Tail intensity (T.I.):** percentuale di DNA nella coda rispetto al DNA nella testa; è una misura di danno totale, indicato da Collins (1996) come il miglior parametro per descrivere il danno subito dalle cellule (espresso in %);

- **Tail lenght (T.L.):** lunghezza della coda in μm , proporzionale alla dimensione dei frammenti di DNA e all'estensione del danno e fa riferimento ai più piccoli frammenti di DNA migrati lontano dal nucleo;
- **Tail Moment (T.M.):** prodotto dei due precedenti utilizzato come indice sintetico di danno al DNA poiché mette in relazione la lunghezza della coda e la percentuale di DNA migrato (Collins et al., 1997; Collins et al., 2001).

L'utilizzo del software garantisce una raccolta dati standard per tutti i preparati e l'assenza di distorsioni soggettive imputabili all'operatore.

In Figura 2 sono mostrate le immagini del DNA da singola cellula così come vengono rilevate dal software.

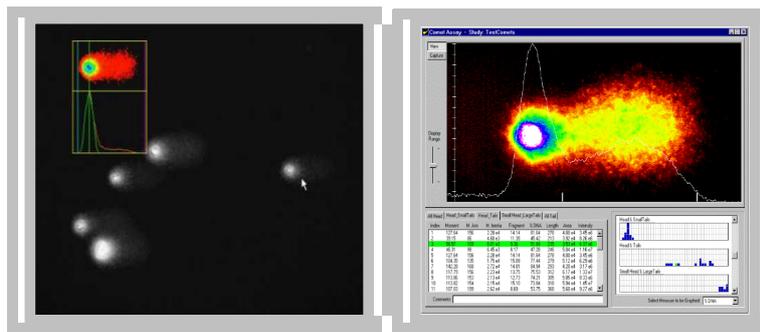


Fig.2 Immagini di nuclei sottoposti al test della cometa osservati attraverso il software di analisi di immagini dedicato. A destra è visibile la schermata completa con i valori dei parametri registrati per il DNA in osservazione (in evidenza) e la loro rappresentazione grafica.

I valori medi dei parametri citati ottenuti dall'analisi delle 100 cellule per individuo sono raccolti e confrontati tra loro con opportuni test statistici. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il test di *Kruskal-Wallis*. Il livello di significatività dei confronti è stabilito con $p < 0.05$ (dove p è la probabilità che le differenze osservate siano dovute a fattori casuali). Nei confronti con i data-set del precedente anno sono stati considerati in particolare i valori di Tail Intensity e di Tail Moment, essendo considerati nella letteratura di riferimento come i parametri più significativi ed informativi. Per la specie *Helix aspersa*, è stata eseguita un'analisi della correlazione tra la distanza dalla potenziale fonte d'inquinamento, rappresentata dalla ciminiera della centrale, e il danno primario al DNA rilevato negli organismi, applicando il coefficiente di correlazione di Spaerman.

2 RISULTATI DEL MONITORAGGIO

2.1 SPECIE SENTINELLA *Helix aspersa*

2.1.1 Cenni sulla biologia della specie

Helix aspersa (Fig.3) appartiene al phylum Mollusca, classe dei Gasteropodi, sottogruppi Polmonati, famiglia Helicidae, genere *Helix*. E' caratterizzato da un capo carnoso provvisto di un paio di tentacoli retrattili, un paio di occhi, localizzati sui tentacoli e una radula (o bocca). Il capo si unisce direttamente con il piede muscoloso, alla cui sommità si trova la conchiglia. Si muove scivolando mediante il piede che attraverso una ghiandola, secerne muco. La chiocciola è un animale ermafrodita insufficiente, non è quindi in grado di autofecondarsi, ma accoppiandosi depongono entrambe le uova.

Helix aspersa è una specie termofila e grazie alla sua resistenza e capacità di adattamento è presente in diversi habitat: nelle radure, ai margini di habitat forestali e anche in contesti antropizzati (orti, giardini, prati, campi incolti, etc.).



Fig.3 *Helix aspersa*

Quindi per il tipo di habitat colonizzato, per la scarsa mobilità e per la modalità e tipo di alimentazione, la chiocciola può fornire molte informazioni sulla qualità dell'ambiente ed essere impiegata in campagne di biomonitoraggio ambientale. In particolare le chioccioline vengono in contatto con l'inquinante attraverso tre vie: ingestione del terreno e della vegetazione, contatto cutaneo col suolo ed inalazione dell'aria e pertanto possono essere opportunamente utilizzate per stimare la biodisponibilità dei contaminanti sia nel suolo che nell'aria. La scarsa vagilità di questo animale è proverbiale, e questo ne fa un candidato ideale per le finalità di questo programma di monitoraggio, in quanto garantisce che gli individui raccolti provengono al più da habitat limitrofi a quello della stazione di campionamento prescelta, cosicché gli impatti eventualmente riscontrati sono senz'altro ascrivibili alla zona dove il mollusco è stato prelevato.

Questa specie è già stata utilizzata come organismo sentinella per il biomonitoraggio degli effetti ecotossicologici dell'inquinamento urbano (Regoli et al., 2006 e citazioni ivi contenute). Inoltre, ai fini della campagna di monitoraggio della centrale, l'applicazione della tecnica su *Helix spp.* e la sua validità ai fini del monitoraggio in corso, sono state testate attraverso una serie di esperimenti che prevedevano una fase di applicazione in condizioni di laboratorio (definizioni delle condizioni standard di laboratorio e valutazione della sensibilità del sistema a mutageni ad azione nota) ed una fase applicativa su campo (campagna di monitoraggio 2011). I risultati degli esperimenti sopra descritti sono stati proposti ed accettati per la pubblicazione sulla rivista scientifica internazionale *Environmental and Molecular Mutagenesis* (vedere bibliografia, Angeletti et al., 2013).

2.1.2. Materiali e Metodi

Area di studio e stazioni di campionamento

Sono state individuate le seguenti stazioni di campionamento. Le sigle tra parentesi identificano le corrispondenti stazioni considerate nelle analisi dei metalli pesanti (vedi capitolo 4):

- **Location a (Roc):** Tarquinia località Roccaccia, distante 20,55 Km in direzione nord rispetto alla centrale Torvaldaliga nord;
- **Location b (Sal):** Tarquinia località Saline, distante 8,72 Km in direzione nord-nordovest rispetto alla centrale;
- **Location c (Cv1):** situata a circa 1,48 Km a nord-est della centrale;
- **Location d (Cv2):** situata a 1.24 Km a sud-est della centrale;
- **Location e (Cv3):** situata a 0,27 Km ad est della centrale;
- **Location f (Tol)** in località Cencelle, situata a 11,26 Km a nord-est della centrale sui rilievi di Tolfa;
- **Location g (SP 45)** presso strada provinciale SP45, 6,60 Km a nord della centrale;
- **Location h (Via G. Luciano)** a Civitavecchia, via Graziano Luciano, 6,35 Km a sud-est della centrale.
- **Location i (M. in Toscana)** a Magliano in Toscana, **nuova stazione di controllo distante, situata a 64,75 Km** a nord-nord-ovest della centrale.

La localizzazione delle stazioni è mostrata in Figura 4 e 4 bis. Le stazioni di campionamento *f*, *g* e *h* sono aggiuntive rispetto al primo piano di campionamento; le tre stazioni sono state aggiunte nel corso della campagna 2012 allo scopo di ottenere un maggior numero di dati per questa specie, in considerazione della sensibilità ed affidabilità che ha mostrato, come organismo sentinella. Inoltre

durante questa campagna è stata aggiunta una ulteriore stazione di controllo situata in Toscana, ad oltre 60 Km di distanza dalla Centrale (Fig. 4 bis).

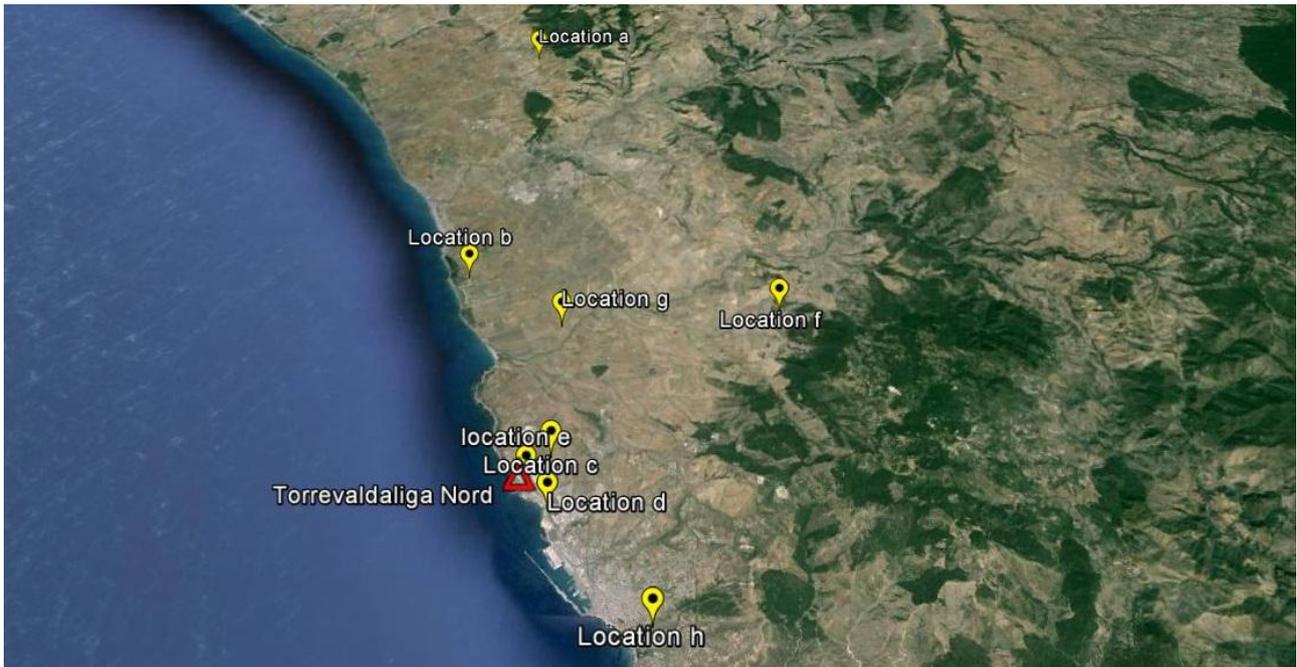


Fig.4 Stazioni di campionamento per *Helix aspersa*.

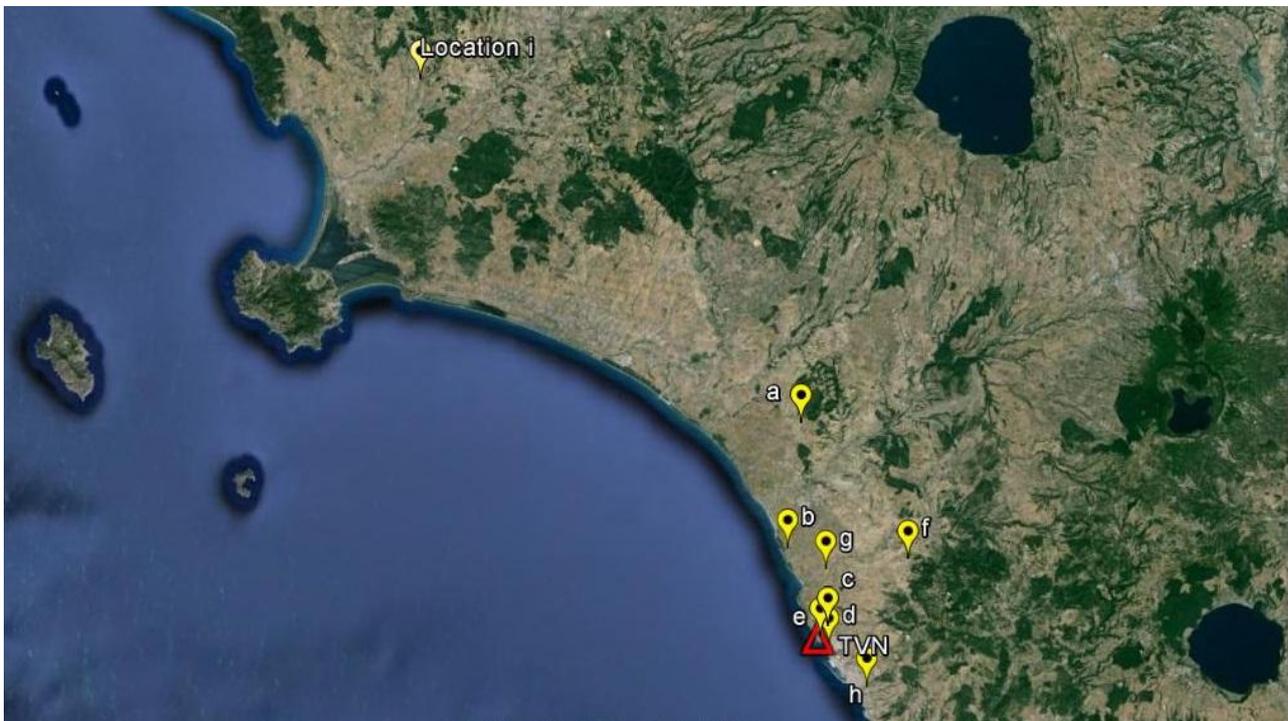


Fig.4 bis Localizzazione della nuova Stazione di Controllo 'i', situata a Magliano in Toscana.

Gli individui sono stati catturati manualmente e trasportati in laboratorio entro 2-4 ore, mantenuti in appositi contenitori e analizzati la mattina successiva. Per ogni sito sono stati analizzati dai 5 ai 10 individui, in dipendenza della qualità dei preparati.

Preparazione dei vetrini ed elettroforesi

Il test della cometa, è stato condotto sulle cellule dell'emolinfa, gli emociti, essendo questi, 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. L'emolinfa è stata prelevata con una micro siringa, dalla cavità dell'emocele, praticando un foro sulla conchiglia.

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, 60 µl di emolinfa viene aggiunta a 70 µl di agarosio a basso punto di fusione. La miscela ottenuta è stata quindi utilizzata per la preparazione, di un vetrino già provvisto di uno strato di gel di agarosio a normale punto di fusione. I vetrini così preparati, sono stati immersi "overnight" in soluzione di lisi allo scopo di liberare il nucleo dalle membrane, prima di sottoporlo al campo elettroforetico (26 V; 280 mA). Successivamente, l'elettroforesi (10 minuti di denaturazione e 10 minuti di corsa elettroforetica) e la lettura dei vetrini con l'ausilio del software dedicato Comet Assay III (Perceptive Instruments Ltd) sono state condotte secondo le modalità già descritte nel capitolo 1.2.

Raccolta dati della campagna di monitoraggio 2013

I dati della campagna di monitoraggio 2013 sono stati ottenuti applicando gli stessi protocolli sperimentali standard definiti ed applicati nelle precedenti campagne di monitoraggio.

L'applicazione delle medesime condizioni sperimentali nei 4 anni di monitoraggio fin'ora svolti ha permesso di effettuare gli opportuni confronti statistici applicando il test di *Kruskal-Wallis*.

I risultati relativi alla campagna di monitoraggio 2013 sono illustrati nel capitolo che segue. Al termine della esposizione dei risultati del 2013, i medesimi sono confrontati con le serie omologhe del 2012.

2.1.3 Risultati

Dati della campagna di monitoraggio 2013

Nella Tabella 1 vengono riportati, per ogni sito di campionamento, la media dei valori (10 individui per sito) del Tail Intensity (T.I.), Tail Length (T.L.) e Tail Moment (T.M.).

Sito	Distanza			
	Km	T.I. (%)	T.L. (μm)	T.M.
a (Roc)	20,55	4,25 (± 1)	22 ($\pm 1,9$)	0,73 ($\pm 0,2$)
b (Sal)	8,72	6,5 ($\pm 3,2$)	23,9 ($\pm 3,3$)	1,25 ($\pm 0,6$)
c (Cv1)	1,48	6,95 ($\pm 0,8$)	22,4 ($\pm 2,6$)	1,07 ($\pm 0,1$)
d (Cv2)	1,24	8,39 ($\pm 2,3$)	28,1 ($\pm 6,1$)	1,37 ($\pm 0,5$)
e (Cv3)	0,27	7,63 ($\pm 1,4$)	32,9 ($\pm 8,6$)	1,64 ($\pm 0,3$)
f (Tol)	11,26	7,9 ($\pm 1,2$)	25,4 ($\pm 6,5$)	1,27 ($\pm 0,3$)
g (SP 45)	6,6	7,17 ($\pm 0,9$)	26,8 ($\pm 8,9$)	1,15 ($\pm 0,2$)
h (Via L.)	6,35	8,36 ($\pm 1,2$)	31,46 (± 7)	1,48 ($\pm 0,3$)
i (M in T)	62,75	5,37 ($\pm 2,2$)	24,2 ($\pm 3,4$)	1,2 ($\pm 0,7$)

Tabella 1. Valori di Tail Intensity, Tail Length e Tail Moment rilevati per *Helix spp.* nelle nove stazioni di campionamento; tra parentesi sono indicate le relative deviazioni standard.

Dal confronto tra i dati rilevati nei diversi siti, emergono delle differenze significative tra il sito **a** (considerato sito di controllo fino alla precedente campagna di monitoraggio) e tutti i siti più vicini alla centrale, i quali presentano valori maggiori sia per il Tail intensity sia per il Tail moment. In particolare differenze altamente significative sono state riscontrate tra: **a** vs. **c** (T.I. $p=0.004$; T.M. $p=0.005$), **a** vs. **d** (T.I. $p=0.004$; T.M. $p=0.009$), **a** vs. **e** (T.I. $p=0.01$; T.M. $p=0.006$), **a** vs. **f** (T.I. $p=0.004$; T.M. $p=0.01$), **a** vs. **g** (T.I. $p=0.003$; T.M. $p=0.005$) ed **a** vs. **h** (T.I. $p=0.002$; T.M. $p=0.002$). Il sito **a** invece non differisce dai siti **i** e **b**. Il sito **b** presenta valori minori e “borderline significant” ($p \leq 0.1$) rispetto ai siti **c**, **d**, **f**, **g**, e **h**. Infine il nuovo sito di controllo **i** risulta avere valori di T.I. significativamente più bassi rispetto ai siti **d**, **f** ed **h** (T.I. $p \leq 0.04$).

Confronto dei dati delle campagne di monitoraggio 2012-2013

Dal confronto con i valori del Tail Intensity ottenuti nella campagna di monitoraggio precedente

(Tabella 2), si osservano incrementi significativi del danno primario al DNA in tutte le stazioni (T.I.: $0.002 < p < 0.05$), tranne per il sito di controllo a, in cui si osserva un decremento significativo sia del T.I. ($p = 0.04$) sia del T.M. ($p = 0.009$).

Sito	Distanza Km	2012			2013		
		T.I. (%)	T.L. (μm)	T.M.	T.I. (%)	T.L. (μm)	T.M.
a (Roc)	20,55	5,59 ($\pm 0,9$)	35 ($\pm 10,4$)	1,47 ($\pm 0,5$)	4,25 (± 1)	22 ($\pm 1,9$)	0,73 ($\pm 0,2$)
b (Sal)	8,72	4,88 ($\pm 1,8$)	34,1 ($\pm 7,6$)	1,2 ($\pm 0,7$)	6,5 ($\pm 3,2$)	23,9 ($\pm 3,3$)	1,25 ($\pm 0,6$)
c (Cv1)	1,48	4,23 ($\pm 0,7$)	35,9 ($\pm 6,4$)	1,13 ($\pm 0,4$)	6,95 ($\pm 0,8$)	22,4 ($\pm 2,6$)	1,07 ($\pm 0,1$)
d (Cv2)	1,24	6,20 ($\pm 1,1$)	33,5 ($\pm 8,3$)	1,37 ($\pm 0,4$)	8,39 ($\pm 2,3$)	28,1 ($\pm 6,1$)	1,37 ($\pm 0,5$)
e (Cv3)	0,27	6,11 (± 1)	27,5 ($\pm 2,2$)	1,01 (± 1)	7,63 ($\pm 1,4$)	32,9 ($\pm 8,6$)	1,64 ($\pm 0,3$)
f (Tol)	11,26	4,38 ($\pm 1,8$)	27,7 ($\pm 5,6$)	0,91 ($\pm 0,6$)	7,9 ($\pm 1,2$)	25,4 ($\pm 6,5$)	1,27 ($\pm 0,3$)
g (SP 45)	6,6	5,30 ($\pm 0,7$)	30,1 ($\pm 4,6$)	0,98 ($\pm 0,1$)	7,17 ($\pm 0,9$)	26,8 ($\pm 8,9$)	1,15 ($\pm 0,2$)
h (Via L.)	6,35	4,06 ($\pm 0,6$)	29,8 (± 5)	0,81 ($\pm 0,2$)	8,36 ($\pm 1,2$)	31,46 (± 7)	1,48 ($\pm 0,3$)
i (M in T)	62,75	-	-	-	5,37 ($\pm 2,2$)	24,2 ($\pm 3,4$)	1,2 ($\pm 0,7$)

Tabella 2. Confronto tra i valori di Tail Intensity, Tail Length e Tail Moment rilevati per *Helix spp.* nel 2013 rispetto al 2012, nelle otto stazioni di campionamento comuni tra le due campagne di monitoraggio (a, b, c, d, e, f, g, h); tra parentesi sono indicate le relative deviazioni standard.

Coefficiente di correlazione tra il danno primario e la distanza dalla centrale

Come per l'anno precedente, anche per i valori ottenuti in questa campagna di monitoraggio è stata calcolata la correlazione tra il danno primario al DNA (Tail Intensity) in *Helix spp.* e la distanza relativa di ogni sito dalla potenziale fonte di inquinamento. La correlazione è stata calcolata considerando gli otto siti comuni alle due campagne 2012 e 2013 (location **a, b, c, d, e, f, g** ed **h**), sia considerando il nuovo sito di controllo **i**. Il coefficiente di Spearman è stato calcolato considerando i singoli valori degli organismi ottenuti in ogni sito, in relazione alle relative distanze dalla centrale Enel.

In entrambi i casi si osserva una correlazione inversa statisticamente significativa ($p = 0.01$ considerando il sito di controllo **i**; $p = 0.002$ per i siti comuni alla scorsa campagna di monitoraggio; Fig. 5 e 5 bis, rispettivamente).

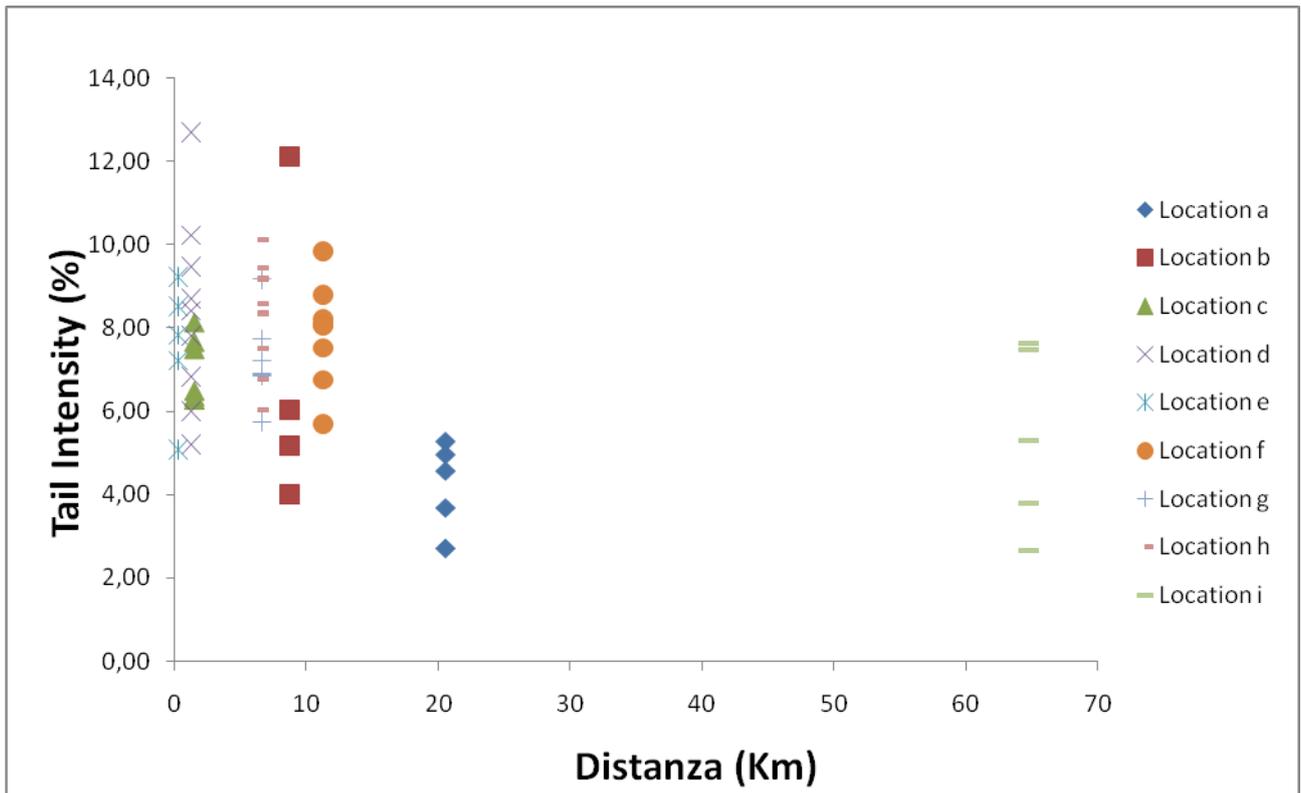


Fig. 5. Rappresentazione grafica della correlazione inversa tra distanza dalla centrale e valori di Tail Intensity degli individui di *Helix spp.*

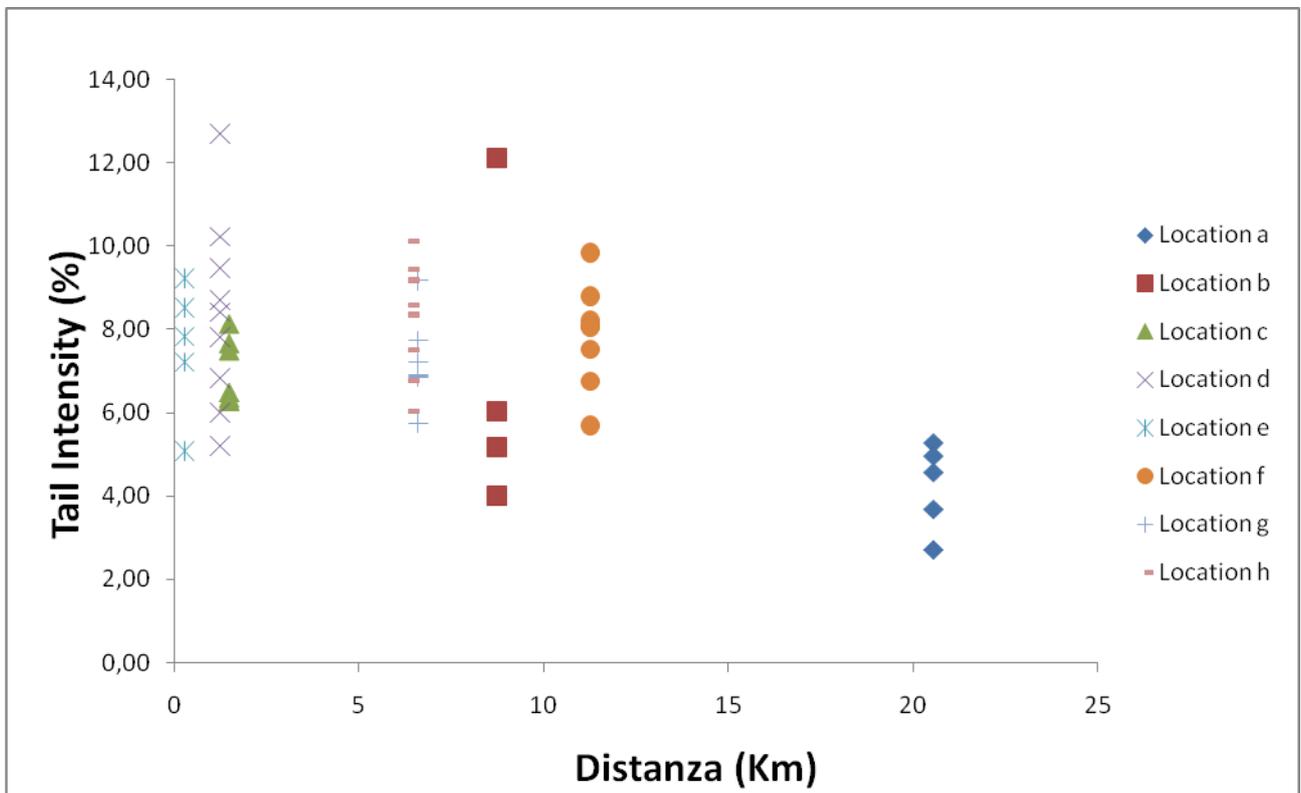


Fig. 5 bis. Rappresentazione grafica della correlazione inversa tra distanza dalla centrale e valori di Tail Intensity degli individui di *Helix spp.*, ottenuta escludendo la stazione di controllo "i"

2.2 SPECIE SENTINELLA *Aphanius fasciatus*

2.2.1 Cenni sulla biologia della specie

La specie *Aphanius fasciatus* è piuttosto diffusa lungo le nostre coste, nei canali salmastri, nelle acque lagunari, ma anche nelle acque interne. E' un piccolo pesce dal corpo piuttosto tozzo; la lunghezza totale massima nelle femmine è di 7-8 cm, mentre nei maschi è sempre inferiore, vicina ai 4-5 cm.

Presenta uno spiccato dimorfismo sessuale (Fig. 6), con marcate differenze nella livrea dei due sessi ed i maschi che presentano una evidente colorazione gialla delle pinne (Cottiglia, 1980).



Fig.6 *Aphanius fasciatus*: a sinistra un individuo maschio, a destra una femmina.

Questa specie ha una distribuzione circummediterranea ed è quindi presente lungo le coste del Mediterraneo con eccezione delle zone più occidentali ed orientali quali Penisola Iberica, Francia Occidentale e Marocco.

L'*Aphanius* si riproduce e svolge interamente il proprio ciclo vitale nelle acque salmastre (Bacci, 1954) e solitamente compie l'intero ciclo vitale nel biotopo di origine, in quanto è una specie caratterizzata da scarso potenziale per la dispersione (Maltagliati, 1998; 2003).

Questo è un elemento fondamentale per le finalità di questo programma di monitoraggio, in quanto garantisce che gli individui raccolti non provengano in realtà da altri habitat lagunari, per cui gli impatti eventualmente riscontrati sono senz'altro ascrivibili alla zona dove il pesce è stato catturato.

La calibrazione del comet test su *A. fasciatus* ai fini del biomonitoraggio è stata oggetto di una pubblicazione su una rivista scientifica internazionale di settore (Mosesso P., Angeletti D., Pepe G., Pretti C., Nascetti G., Bellacima R., Cimmaruta R. & Awadesh Jha A., 2012. The use of *Aphanius fasciatus* as sentinel organism to detect complex genotoxic mixtures in coastal lagoon ecosystems. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*).

2.2.2 Materiali e metodi

Area di studio e campionamenti

I campionamenti sono stati effettuati presso le saline di Tarquinia in due bacini dell'impianto distribuiti lungo la direttrice nord-sud (Fig.7). Inoltre altri 10 individui prelevati alle Saline di Tarquinia, sono stati mantenuti per 10 giorni in acquario contenente acqua marina artificiale decontaminata, e quindi utilizzati come controllo.

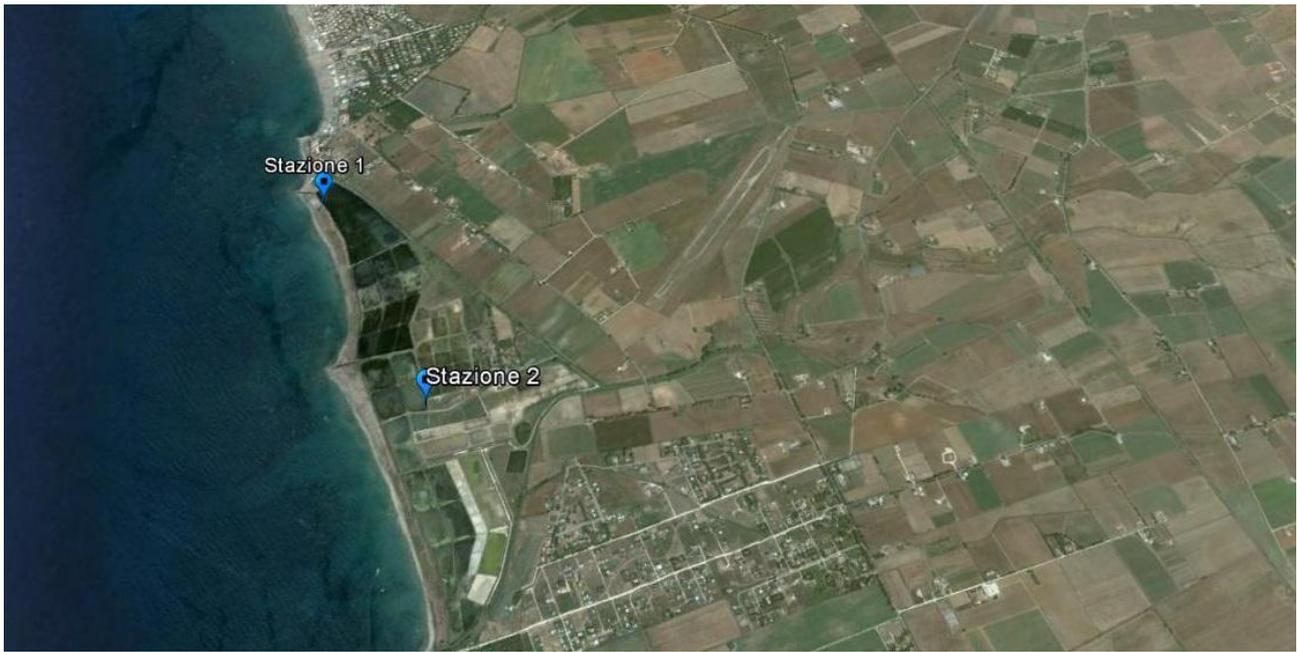


Fig.7 Stazioni di campionamento di *Aphanius fasciatus* presso le Saline di Tarquinia.

I campionamenti sono stati effettuati utilizzando 10 trappole (nasse) con struttura metallica e rete di maglia 0,5 x 0,5 cm. Le nasse sono state posizionate nei punti di campionamento preventivamente individuati all'interno dell'area di monitoraggio e recuperate il giorno successivo; da queste è stato prelevato di volta in volta il numero di individui necessario a condurre il test mentre gli individui eccedenti sono stati rilasciati. Gli animali sono stati quindi mantenuti vivi in recipienti ossigenati contenenti acqua prelevata nel punto di campionamento, quindi trasportati in laboratorio per essere analizzati. Per ogni sito sono stati analizzati 10 individui.

Preparazione dei vetrini per l'elettroforesi

Il test è stato condotto sul 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. In laboratorio gli animali sono stati sacrificati per dislocamento

cervicale ed un campione di sangue di circa 10 µl per ogni animale è stato 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 10 µl PBS, viene aggiunto a 80 µl di agarosio a basso punto di fusione. La miscela ottenuta è stata quindi utilizzata per la preparazione, distendendola su un vetrino già provvisto di uno strato di gel di agarosio. I vetrini così preparati, sono stati lasciati “overnight” in soluzione di lisi allo scopo di liberare il nucleo dalle membrane, prima di sottoporlo al campo elettroforetico (30 V; 280 mA). Successivamente l’elettroforesi (10 minuti di denaturazione e 10 minuti di corsa elettroforetica) e la lettura dei vetrini con l’ausilio del software dedicato Comet Assay III (Perceptive Instruments Ltd) sono state condotte secondo le modalità già descritte nel capitolo 1.2.

Raccolta dati campagna di monitoraggio 2013

I dati della campagna di monitoraggio 2013 sono stati ottenuti applicando gli stessi protocolli definiti nei report precedenti.

L'applicazione delle medesime condizioni sperimentali nei 4 anni di monitoraggio fin'ora svolti ha permesso di effettuare gli opportuni confronti statistici applicando il test di *Kruskal-Wallis*.

I risultati relativi alla campagna di monitoraggio 2013 sono illustrati nel capitolo che segue. Al termine dell’esposizione dei risultati del 2013, i medesimi sono confrontati con le serie omologhe del 2012.

2.2. Risultati

Dati della campagna di monitoraggio 2013

Nella Tabella 3 vengono riportati, per ogni sito di campionamento (10 individui per stazione), la media e le deviazioni standard dei valori di Tail Intensity (T.I.), Tail Length (T.L.) e Tail Moment (T.M.).

	Stazioni di campionamento		
	Stazione Nord 1	Stazione Sud 2	Controllo
Tail Intensity (%)	5,48 ($\pm 1,18$)	7,18 ($\pm 2,82$)	4,97 ($\pm 0,89$)
Tail Length (μm)	23,1 ($\pm 2,29$)	23,3 ($\pm 2,65$)	25,1 ($\pm 2,25$)
Tail Moment	0,92 ($\pm 0,29$)	1,29 ($\pm 0,64$)	0,9 ($\pm 0,18$)

Tabella 3. Valori di Tail Intensity, Tail Length e Tail Moment rilevati per *Aphanius fasciatus* nelle due stazioni di campionamento e nel campione di controllo; tra parentesi sono indicate le relative deviazioni standard.

Non emergono differenze significative né tra le due stazioni di campionamento, né nel confronto con il controllo.

Confronto dei dati delle campagne di monitoraggio 2012 – 2013

Dal confronto dei valori del Tail Intensity e del Tail Moment ottenuti nella campagna di monitoraggio 2013 rispetto a quelli dell'anno precedente 2012, emergono differenze significative sia a Nord per il Tail Intensity ($p= 0,018$) e per il Tail Moment ($p= 0,009$), che a Sud per il Tail Intensity ($p= 0,0006$) e per il Tail Moment ($p= 0,0004$), con un decremento dei valori del 2013 rispetto al 2012. I dati sono mostrati in Tabella 4.

	2012		2013	
	Stazione Nord 1	Stazione Sud 2	Stazione Nord 1	Stazione Sud 2
Tail Intesity (%)	8,28 ($\pm 2,2$)	15,13 ($\pm 3,9$)	5,48 ($\pm 1,18$)	7,18 ($\pm 2,82$)
Tail Lenght (μm)	30,6 ($\pm 3,2$)	38,43 ($\pm 3,6$)	23,1 ($\pm 2,29$)	23,3 ($\pm 2,65$)
Tail Moment	1,71 ($+0,7$)	3,83 ($\pm 1,2$)	0,92 ($+0,29$)	1,29 ($\pm 0,64$)

Tabella 4. Valori di Tail Intensity, Tail Lenght e Tail Moment rilevati per *Aphanius fasciatus* nelle due stazioni di campionamento nelle campagne 2012 e 2013; tra parentesi sono indicate le relative deviazioni standard.

Inoltre se si considerano i campioni delle due stazioni come un unico gruppo rappresentativo di tutta la salina per ognuno dei due anni, nel confronto tra i due anni emergono differenze altamente significative per il Tail Intensity ($p= 0,000008$) e significative per il Tail Moment ($p= 0,000003$) con un evidente decremento di tutti i valori dell'attuale campagna 2013 rispetto a quella del 2012. (Tabella 5).

	2012	2013
Tail Intesity (%)	12,56 ($\pm 4,7$)	6,38 ($\pm 2,5$)
Tail Lenght (μm)	35,51 ($\pm 6,3$)	23,22 ($\pm 2,4$)
Tail Moment	3,03 ($+1,4$)	1,11 ($\pm 0,23$)

Tabella 5. Valori di Tail Intensity, Tail Lenght e Tail Moment rilevati per *Aphanius fasciatus* nelle campagne 2012 e 2013 (dati cumulati per anno); tra parentesi sono indicate le relative deviazioni standard.

3 CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Per *Helix* si assiste ad un incremento generale significativo del danno al DNA rilevato nel 2013 rispetto al 2012. Inoltre si conferma la correlazione inversa e statisticamente significativa tra danno rilevato e distanza dalla potenziale fonte di inquinamento. Si noti che la nuova stazione di controllo *i* situata a più di 60 Km dalla centrale, presenta valori in linea con alcune delle stazioni più distanti (e.g. *a* e *b*) confermando che la zona dove gli organismi sono risultati maggiormente esposti, ricade in un raggio di circa 10 km rispetto alla zona urbana di Civitavecchia. Si sottolinea che malgrado evidenti parallelismi tra aumento del danno al DNA in *Helix* e incremento di alcuni metalli pesanti negli stessi organismi (vedere Capiolo 4), non si può determinare quanto del danno rilevato sia dovuto ad altri fattori inquinanti presenti nel perimetro urbano di Civitavecchia. Si noti inoltre che la stazione *b* “Saline di Tarquinia” risulta al limite di questa area di “maggior impatto”, per cui il monitoraggio di questa stazione può risultare particolarmente indicativo per evidenziare eventuali incrementi in senso spaziale delle ricadute di inquinanti.

Aphanius fasciatus presenta nel 2013 una diminuzione del danno al DNA sia nella stazione a nord che in quella a sud delle Saline di Tarquinia rispetto allo scorso anno, nonostante l'aumento rilevato di alcuni metalli (vedere Capiolo 4). Questo dato può essere dovuto ad un adattamento degli organismi ai fattori genotossici, fenomeno già documentato in altre specie (vedere ad esempio: Vasseur and Bonnard, 2014). Per verificare questa ipotesi dovrebbero essere condotte prove sperimentali in ambiente controllato. Inoltre per quanto riguarda il monitoraggio su campo, sarebbe utile applicare l'analisi dei micronuclei, “biomarker di effetto” capace di rilevare l'accumulo di danno permanente al DNA dovuto a genotossici, oltre a quello rilevato dal comet assay che può essere in parte transitorio e causato da fenomeni di esposizione temporanea acuta.

BIBLIOGRAFIA

- Angeletti D. and Carere C. 2014. Comparative ecogenotoxicology: Monitoring the DNA of wildlife. *Curr. Zool.* 60, 252 – 254.
- Angeletti D., Sebbio C., Carere C., Cimmaruta R., Nascetti G., Pepe G., Mosesso P., 2013. Terrestrial gastropods (*Helix spp*) as sentinels of primary DNA damage for biomonitoring purposes: a validation study. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 54:204-2012.
- 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.
- Bacci G., 1954. Alcuni rilievi sulle faune di acque salmastre. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, 25 (2), pp: 380-396
- Clements C., Ralph S. and Petras M., 1997. Genotoxicity of selected herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 29, 277–288.
- Collins A., Dusinskà M., Franklin M., Somorovská M., Petrovská H., Duthie S, Fillion L., Panayiotidis M., Raslovà K., Vaughan N., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications, *Environ. Mol. Mutagen.* 30: 139-146.
- Collins A., Dusinska M., Horvathova E., Munro E., Savio M., Stetina R., 2001. Inter-individual differences in DNA base excision repair activity measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis*; 16: 297–301.
- Cottiglia M., 1980. Pesci lagunari. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane. Vol. 1 ed. CNR, 141 pp.
- 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.
- F. Frontalini, R. Coccioni, C. Bucci, 2009, Benthic foraminiferal assemblages and trace element contents from the lagoons of Orbetello and Lesina, *Environ. Monit. Assess.* DOI 10.1007/s10661-009-1229-6.
- 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: 43 – 64.

- Maltagliati F., 1998. Does the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Teleostei: Cyprinodontidae) fit the one-dimensional stepping-stone model of gene flow? *Environ Biol Fish* 53:385-392
- Maltagliati F., 2003. Diversità genetica a diverse scale spaziali nel ciprinodontide *Aphanius fasciatus* di biotope salmastri mediterranei – Genetica della Conservazione- Stato della Ricerca in Italia – Firenze 14-15 /02/2003
- 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.
- Mosesso P., Angeletti D., Pepe G., Pretti C., Nascetti G., Bellacima R., Cimmaruta R. & Awadesh Jha A., 2012. The use of *Aphanius fasciatus* as sentinel organism to detect complex genotoxic mixtures in coastal lagoon ecosystems. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. ISSN: 1383-5718.
- 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, et al., 2006. Use of the Land Snail *Helix aspersa* as Sentinel Organism for Monitoring Ecotoxicologic Effects of Urban Pollution: An Integrated Approach. *Environ Health Perspect* 114(1): doi:10.1289/ehp.8397
- Sebbio C, Carere C, Nascetti G, Bellisario B, Mosesso P, Cimmaruta R, Angeletti D. 2014. Interspecies variation in DNA damage induced by pollution. *Curr. Zool.* 60: 308–321.
- 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.
- Vasseur, P. and Bonnard M., 2014. Ecogenotoxicology in earthworms: A review. *Curr. Zool.* 60, 255 – 262.

4. ANALISI DEI METALLI PESANTI

I metalli pesanti sono componenti naturali della crosta terrestre. Non possono essere degradati o distrutti. In piccola misura entrano nel nostro corpo via cibo, acqua ed aria. Come elementi in tracce, alcuni metalli pesanti (per esempio rame, selenio, zinco) sono essenziali per mantenere il metabolismo del corpo umano. Tuttavia, a concentrazioni più alte possono portare ad avvelenamento. Esso potrebbe derivare, per esempio, da contaminazione dell'acqua potabile (per esempio da tubature in piombo), da alte concentrazioni nell'aria ambiente vicino alle fonti di emissione, o assunzione tramite il ciclo alimentare. Una caratteristica che li rende pericolosi è la tendenza, che hanno in comune agli inquinanti organici persistenti, di accumularsi in alcuni tessuti degli esseri viventi (bioaccumulo) provocando effetti negativi alla salute umana e all'ambiente in generale. Nell'atmosfera le sorgenti predominanti di origine antropica di metalli pesanti sono la combustione e i processi industriali. I metalli pesanti, come del resto gli inquinanti organici persistenti, in atmosfera si trovano prevalentemente nel particolato. Avendo riconosciuto che l'inquinamento da particolato – soprattutto da particolato fine – è un fenomeno che interessa scale spaziali da decine a centinaia di chilometri, ormai si parla addirittura di inquinamento emisferico fino ad un livello transfrontaliero.

4.1. Materiale e Metodi

I metalli pesanti presi in considerazione in questa ricerca sono: Arsenico, Mercurio, Cadmio, Cromo, Nichel Piombo e Rame. I vari campioni, dei diversi organismi sentinella, sono stati omogeneizzati accuratamente con idonea apparecchiatura, dopo aver rimosso le parti da non considerare nell'analisi. Sono stati pesati alla bilancia analitica 0,5 g di campione in falkon monouso da 50 ml; sono stati aggiunti 10 ml di acido nitrico concentrato 65% iperpuro. Successivamente si è posto il falkon a bagnomaria bollente per 30 minuti, facendo attenzione allo sviluppo di fumi tossici: operazione eseguita sempre sotto cappa chimica. Una volta attesa l'estinzione dei vapori tossici, si è lasciato raffreddare a temperatura ambiente e si è trasferita quantitativamente la soluzione acida in matraccio tarato da 50 ml; si è portato a volume con acqua demineralizzata iperpura per l'analisi dei metalli in tracce. Sono state eseguite delle prove in bianco e sono stati anche preparati dei campioni fortificati con gli analiti di interesse per ogni serie analitica. La soluzione minerale è stata poi analizzata allo spettrofotometro ad Assorbimento Atomico con le diverse metodiche in base all'elemento da tracciare.

Tutte le metodiche analitiche sono state reperite nei diversi Rapporti ISTISAN 96/34 dell'Istituto Superiore di Sanità.

4.2. Risultati

Per la campagna di monitoraggio dei metalli pesanti nei diversi organismi sentinella (il limite di quantificazione "L.Q." è 0,005 mg/Kg), i risultati analitici vengono descritti in dettaglio nelle Tabb. 1-5 (in Appendice) e quelli più importanti vengono di seguito riportati in forma grafica:

- *Aphanius fasciatus*:

Per quanto riguarda l'analisi dei metalli pesanti rilevati nell'*Aphanius fasciatus* sono stati processati 20 esemplari provenienti dalle Saline di Tarquinia e prelevati in diverse vasche delle Saline stesse. Osservando la figura 1 si nota come l'Arsenico nell'*A. fasciatus* si presenti con una concentrazione alquanto elevata, con un valore minimo di circa 4,50 mg/Kg sul tal quale e un valore massimo di 11,65 mg/Kg rilevato nel sito Saline di Tarquinia Nord.

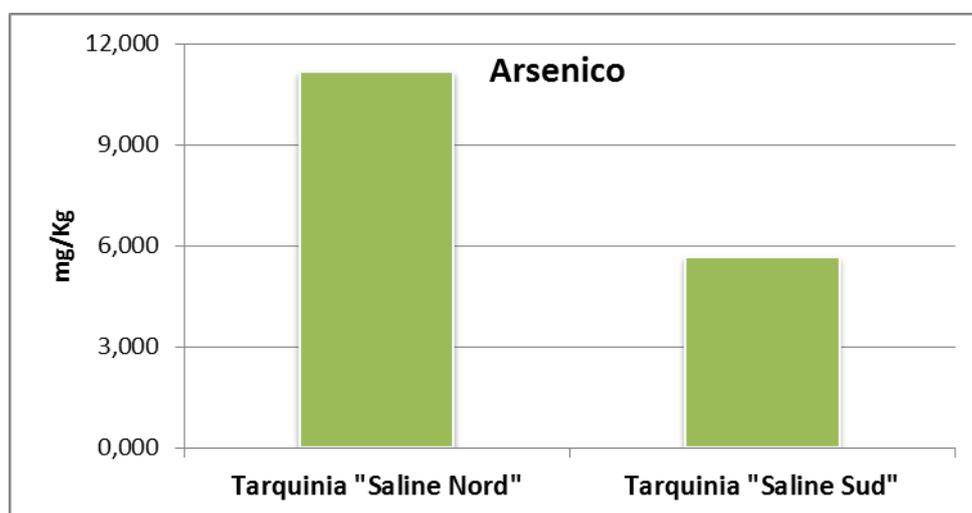


Fig. 1 – *Aphanius fasciatus*. Variazioni delle concentrazioni di Arsenico nelle diverse località di studio.

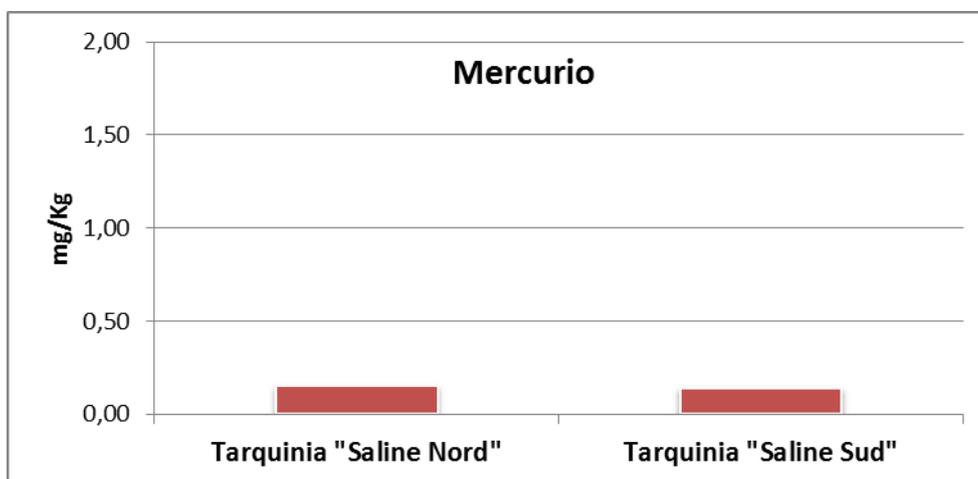


Fig. 2 – *Aphanius fasciatus*. Variazioni delle concentrazioni di Mercurio nelle diverse località di studio.

Durante questa campagna di indagine è stata rilevata (per la prima volta) la presenza di Mercurio nei campioni di *Aphanius fasciatus* prelevati dalle Saline di Tarquinia con una concentrazione piuttosto modesta (Fig. 2).

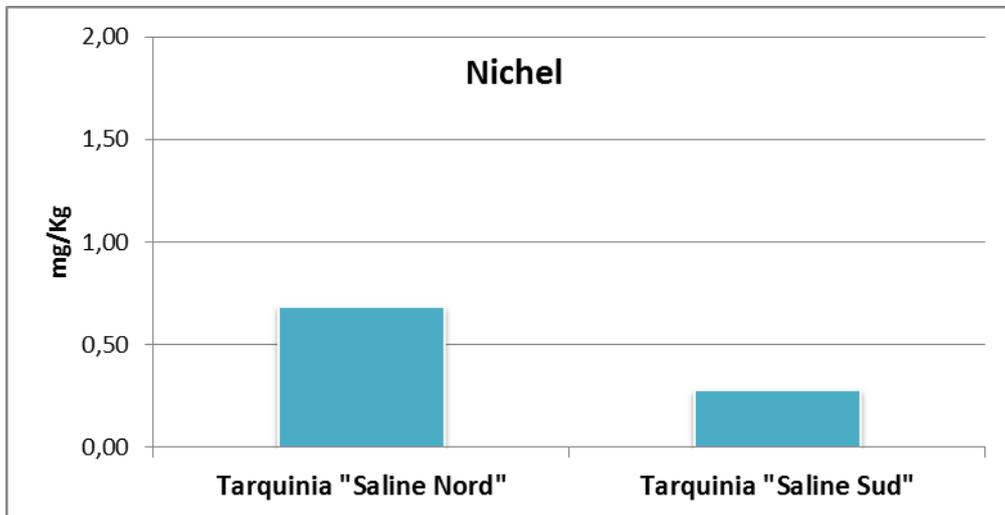


Fig. 3 – *Aphanius fasciatus*. Variazioni delle concentrazioni di Nichel nelle diverse località di studio.

Anche per quanto riguarda la concentrazione di Nichel, in tutti i campioni di *A. fasciatus* analizzati, si è rilevata piuttosto contenuta, con un valore medio di circa 0,60 mg/Kg sul tal quale.

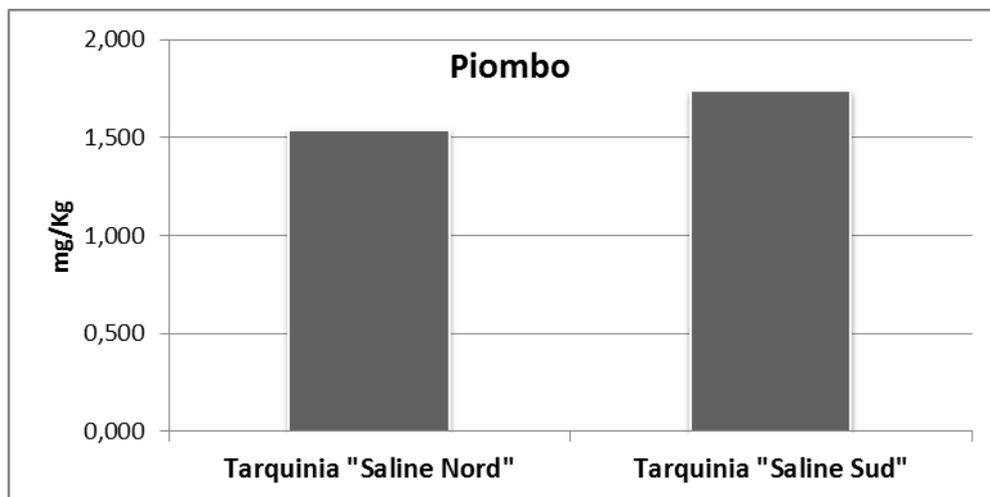


Fig. 4 – *Aphanius fasciatus*. Variazioni delle concentrazioni di Piombo nelle diverse località di studio.

Nella figura 4 viene riportata la variazione della concentrazione di Piombo e si può notare come i valori siano piuttosto elevati con un massimo di circa 1,7 mg/Kg rilevato nel sito delle Saline Sud.

Anche la concentrazione di Cromo (Fig. 5) è risultata piuttosto contenuta con un valore medio di circa 0,45 mg/Kg. Per quanto riguarda il Cadmio, in tutti i campioni analizzati non è mai stata rilevata la sua presenza, poiché i risultati sono stati sempre al di sotto del limite di quantificazione della strumentazione utilizzata.

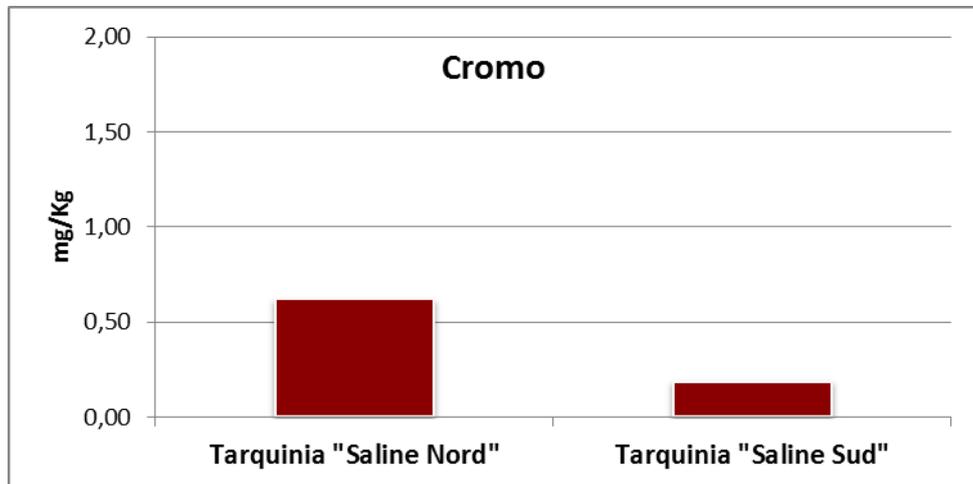


Fig. 5 – *Aphanius fasciatus*. Variazioni delle concentrazioni di Cromo nelle diverse località di studio.

- *Helix aspersa*:

Per quanto riguarda la concentrazione dei metalli pesanti rilevati nell'*Helix aspersa* sono stati analizzati 90 individui provenienti da Civitavecchia (Sito 3, Sito 2 e Sito 1), da Civitavecchia – Via Graziano Luciano, dalla Strada Provinciale SP45, dalle Saline di Tarquinia, da Tolfa, dalla zona della Roccaccia, e un sito più lontano dalla Centrale di TVN, denominato Magliano in Toscana.

Nella figura 6 vengono riportate le variazioni della concentrazione di Arsenico rilevata nelle diverse località: si nota come nel sito di Tarquinia ritroviamo i valori relativamente più alti di tutti quelli rilevati altrove con un picco massimo di 0,66 mg/Kg sul tal quale.

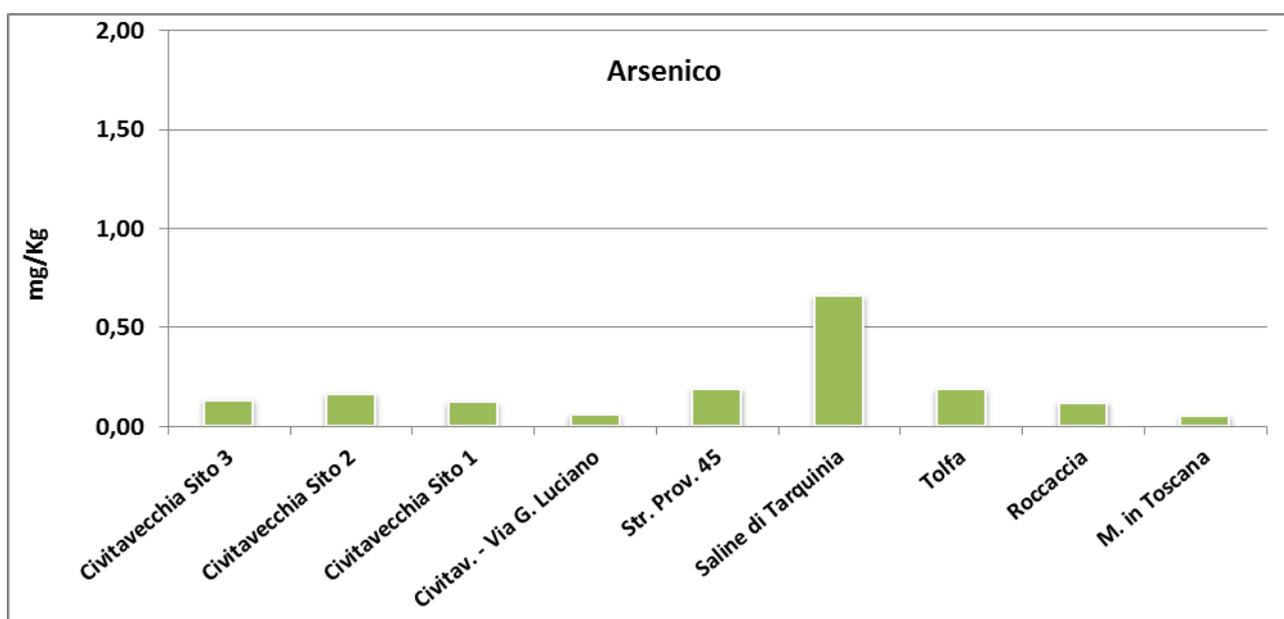


Fig. 6 – *Helix aspersa*. Variazioni delle concentrazioni di Arsenico nelle diverse località di studio.

La concentrazione di Mercurio (Fig. 7) nelle lumache (rinvenuta quest'anno per la prima volta) è risultata sempre molto contenuta, con un valore massimo di circa 0,13 mg/Kg rilevato nel Sito di Tolfa.

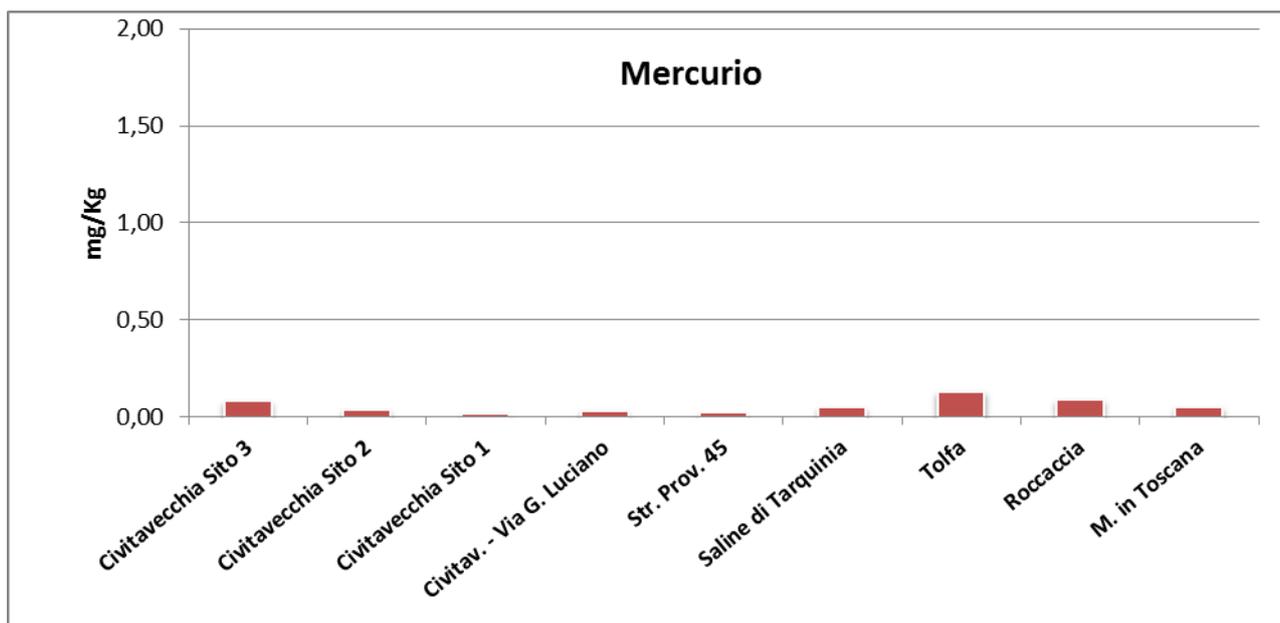


Fig. 7 – *Helix aspersa*. Variazioni delle concentrazioni di Mercurio nelle diverse località di studio.

I valori riscontrati nelle concentrazioni di Cadmio (Fig. 8), hanno oscillato da valori più elevati (Civitavecchia Sito 3 pari a 0,83 mg/Kg e Roccaccia con un valore di 0,78 mg/Kg), a valori più bassi rinvenuti nel Sito 1 di Civitavecchia, in Strada Farnesiana e alle Saline di Tarquinia.

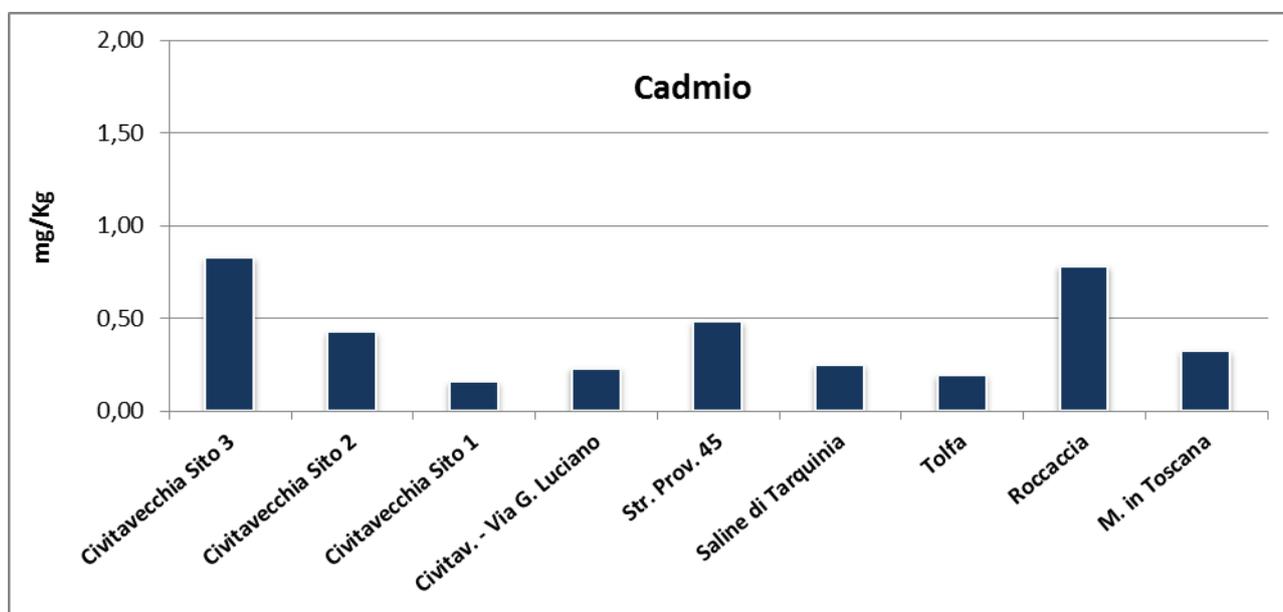


Fig. 8 – *Helix aspersa*. Variazioni delle concentrazioni di Cadmio nelle diverse località di studio.

Per quanto riguarda le concentrazioni di Cromo (Fig. 9) si rilevano dei valori leggermente più elevati nelle Saline di Tarquinia, nel Sito 2 di Civitavecchia ed in quello della Roccaccia.

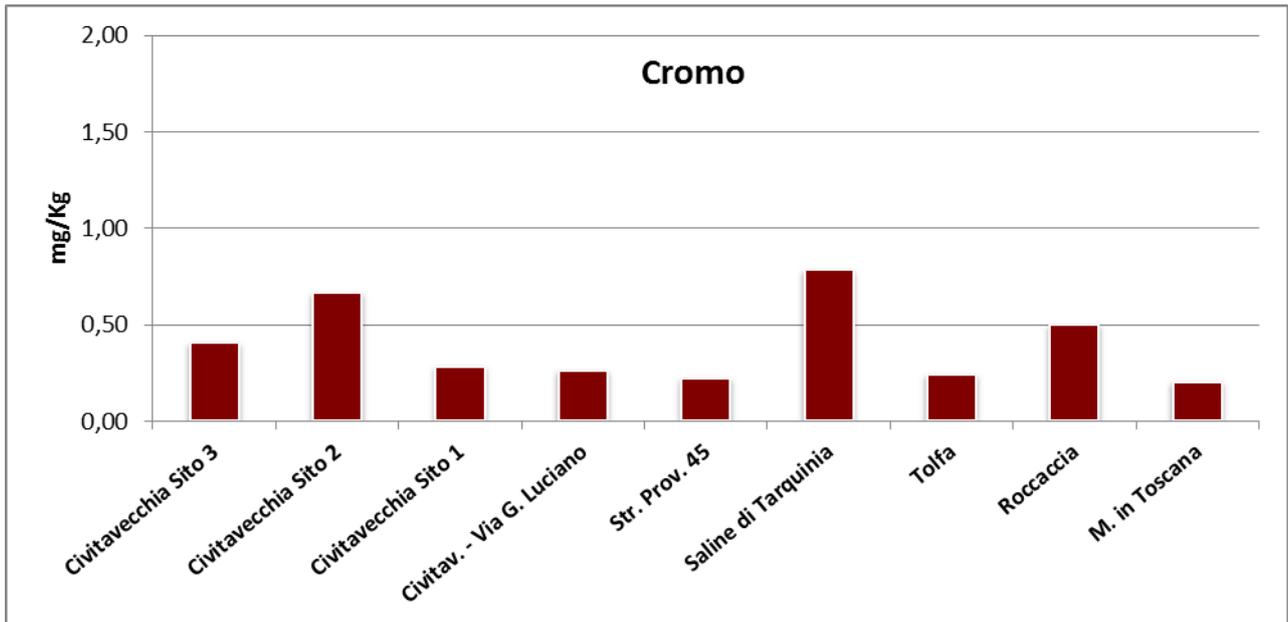


Fig. 9 – *Helix aspersa*. Variazioni delle concentrazioni di Cromo nelle diverse località di studio.

Le concentrazioni di Nichel (Fig. 10) rilevate in alcune località di studio mostrano valori poco al di sopra di 0,5 mg/Kg sul tal quale.

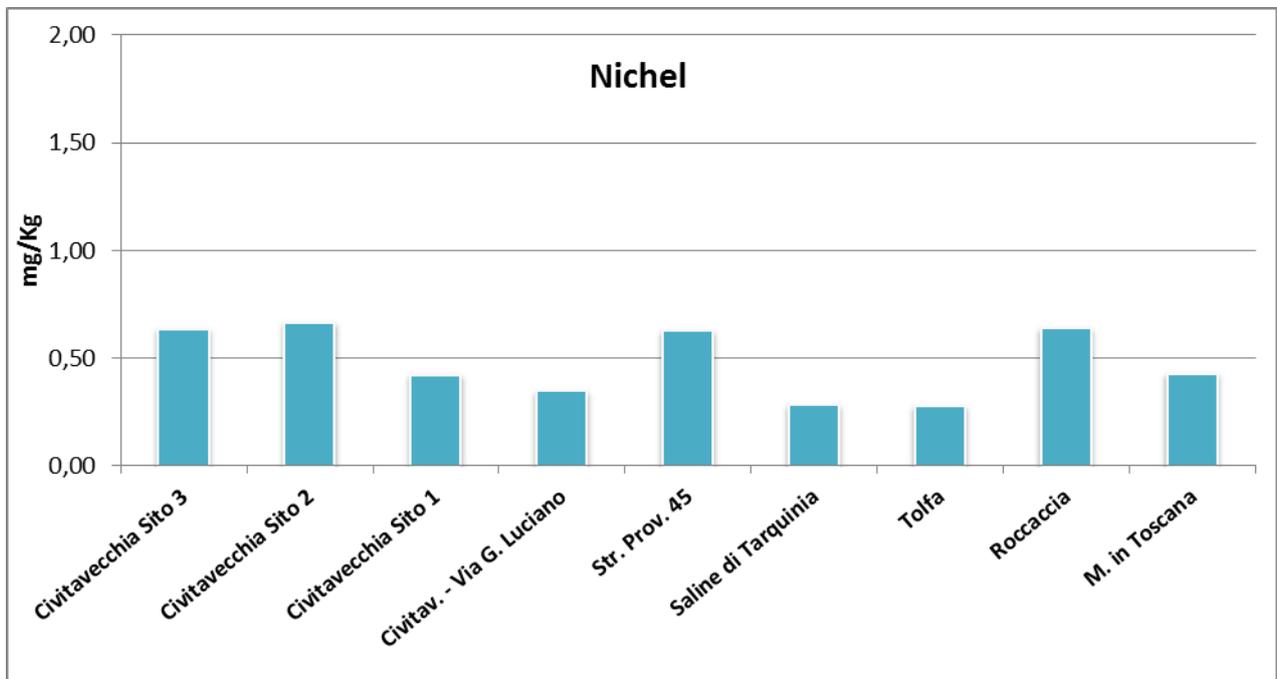


Fig. 10 – *Helix aspersa*. Variazioni delle concentrazioni di Nichel nelle diverse località di studio.

Prendendo in considerazione le variazioni della concentrazione di Piombo (Fig. 11) si nota come questo metallo sia abbastanza presente in tutti i siti indagati, con un massimo di circa 2,4 mg/Kg sul tal quale, nel Sito 2 di Civitavecchia.

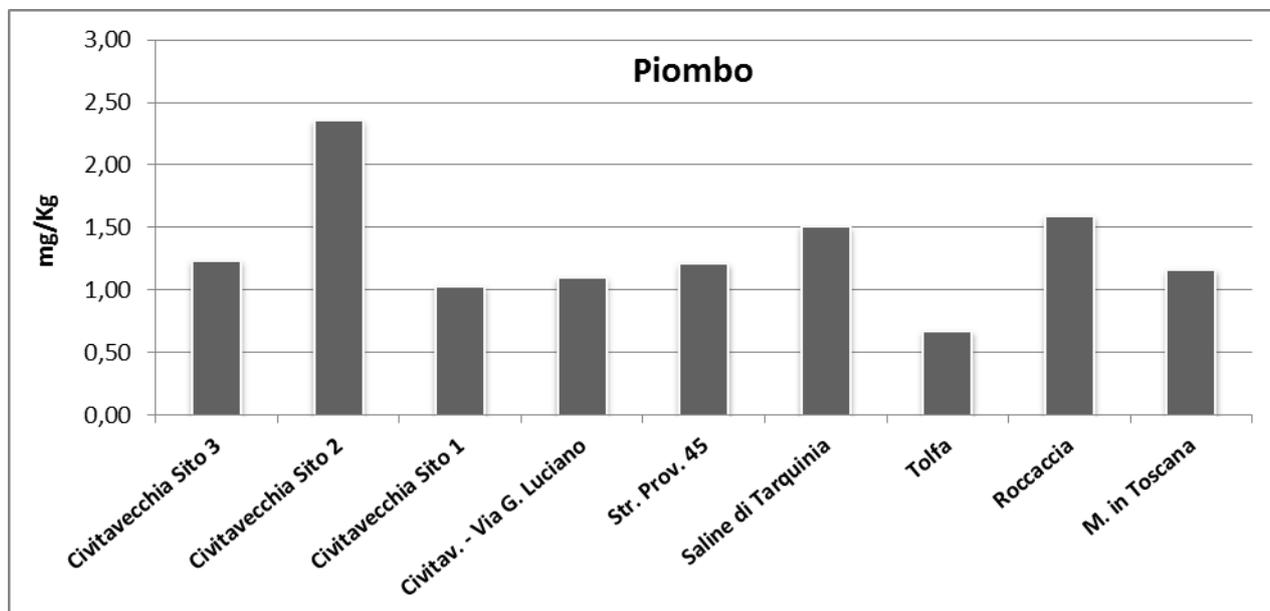


Fig. 11 – *Helix aspersa*. Variazioni delle concentrazioni di Piombo nelle diverse località di studio.

Per quanto riguarda la concentrazione di Rame, considerato uno dei componenti essenziali nelle lumache, non si denotano particolari situazioni di preoccupazione essendo i risultati in media con analisi fatte su questi organismi e riportati nella letteratura scientifica.

- *Paracentrotus lividus*

Sono stati presi in considerazione i metalli pesanti presenti in 20 esemplari di Ricci di mare (*Paracentrotus lividus*) provenienti dal mare antistante di Santa Severa, di S. Agostino, dalle Saline di Tarquinia e da una località vicino all'Isola di Giannutri.

La concentrazione di Arsenico rinvenuta nei Ricci di mare (Fig. 12) mostra dei valori moderatamente elevati (superiori a 2,0 mg/Kg), nelle tre zone più vicino alla Centrale TVN e dei livelli abbastanza contenuti in quelli prelevati nei pressi dell'isola di Giannutri (circa 0,5 mg/Kg). Anche per il Riccio di mare, come per altri invertebrati marini, le concentrazioni di Arsenico sono abbastanza elevate, ma pressoché in linea con le medie rinvenute in altri siti italiani.

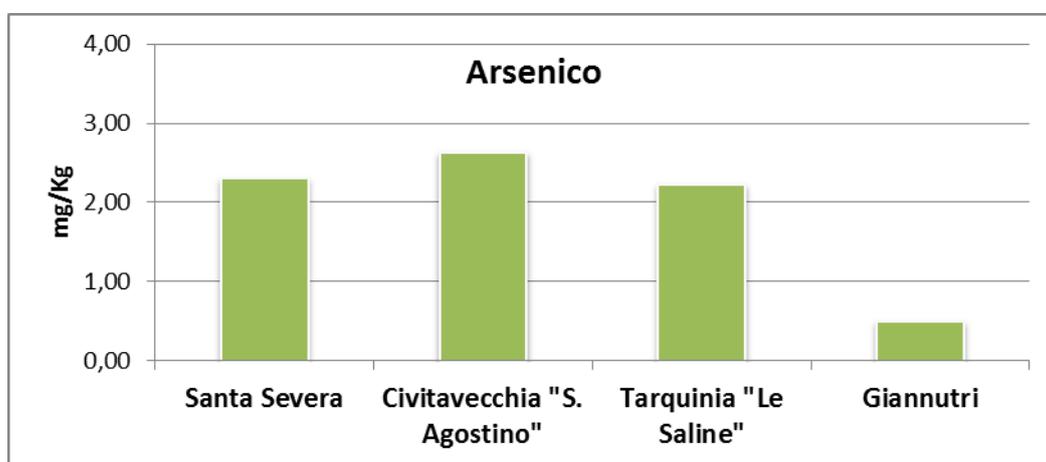


Fig. 12 – *Helix aspersa*. Variazioni delle concentrazioni di Arsenico nelle diverse località di studio.

Nella figura 13 vengono riportate le concentrazioni di Mercurio rilevate nei Ricci di mare: si può osservare come queste siano piuttosto basse (ma mai osservate nelle precedenti campagne di indagine), con un picco leggermente più alto nel sito di Civitavecchia S. Agostino (0,102 mg/Kg) sul tal quale.

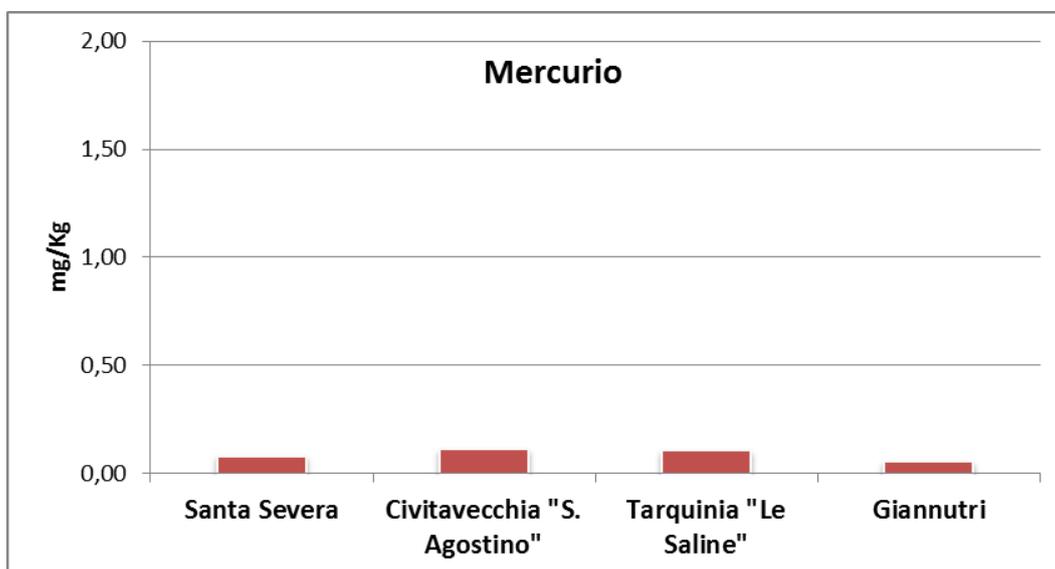


Fig. 13 – *Paracentrotus lividus*. Variazioni delle concentrazioni di Mercurio nelle diverse località di studio.

Nella figura 14 sono riportate le variazioni di Cadmio nel Riccio di mare. Come si può osservare i risultati sono quasi abbastanza contenuti, tranne quelli rilevati a Santa Severa con un picco leggermente più elevato di 0,26 mg/Kg sul tal quale.

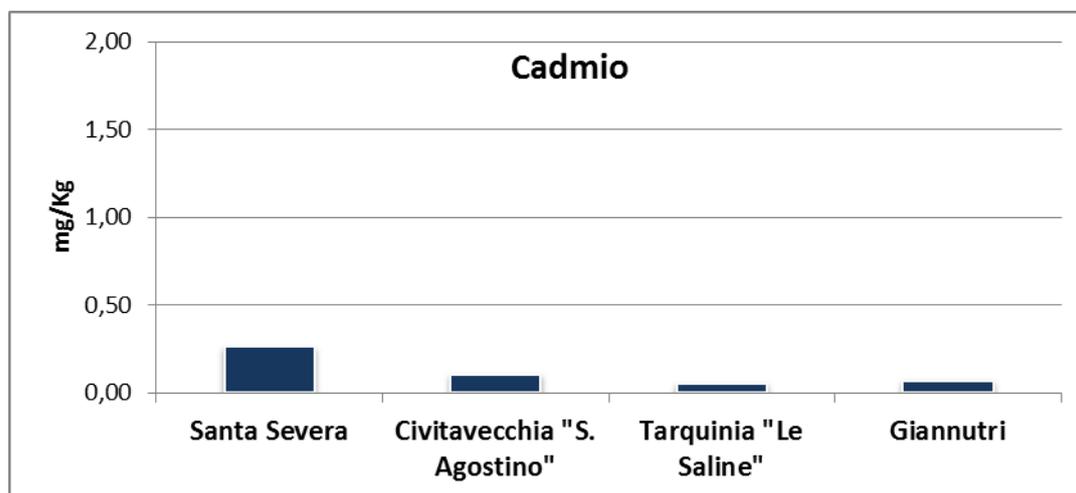


Fig. 14 – *Paracentrotus lividus*. Variazioni delle concentrazioni di Cadmio nelle diverse località di studio.

Le concentrazioni di Nichel nel *P. lividus*, riportate nella figura 15, evidenziano dei valori piuttosto alti (massimo di 2,36 mg/Kg) rilevato a Santa Severa e valori leggermente più bassi registrati negli altri tre siti di campionamento.

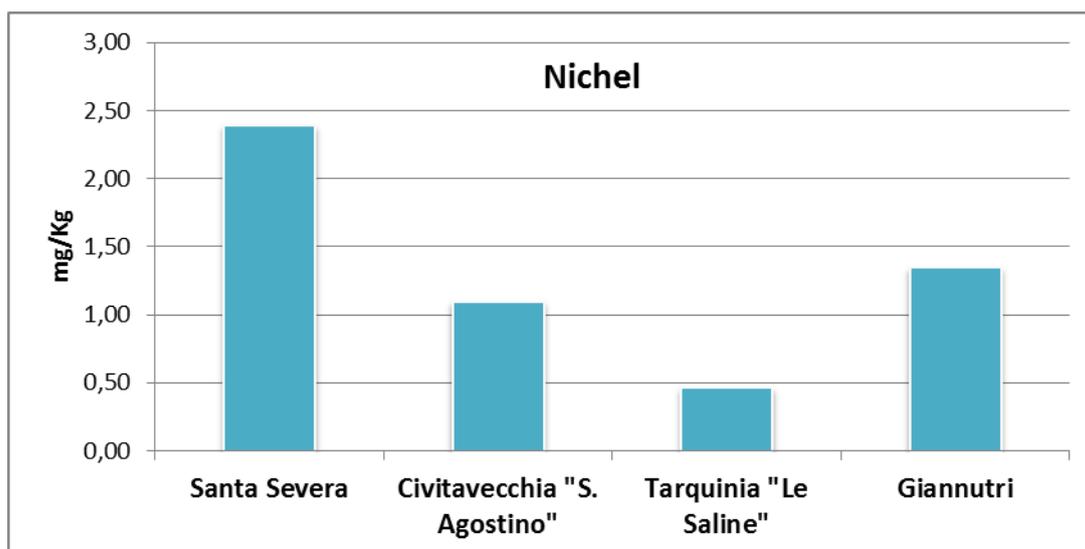


Fig. 15 – *Paracentrotus lividus*. Variazioni delle concentrazioni di Nichel nelle diverse località di studio.

Per quanto riguarda la concentrazioni di Piombo (Fig. 16) si osservano dei valori tutti al di sopra di 1,00 mg/Kg, tranne in quelli prelevati nei pressi dell'Isola di Giannutri.-

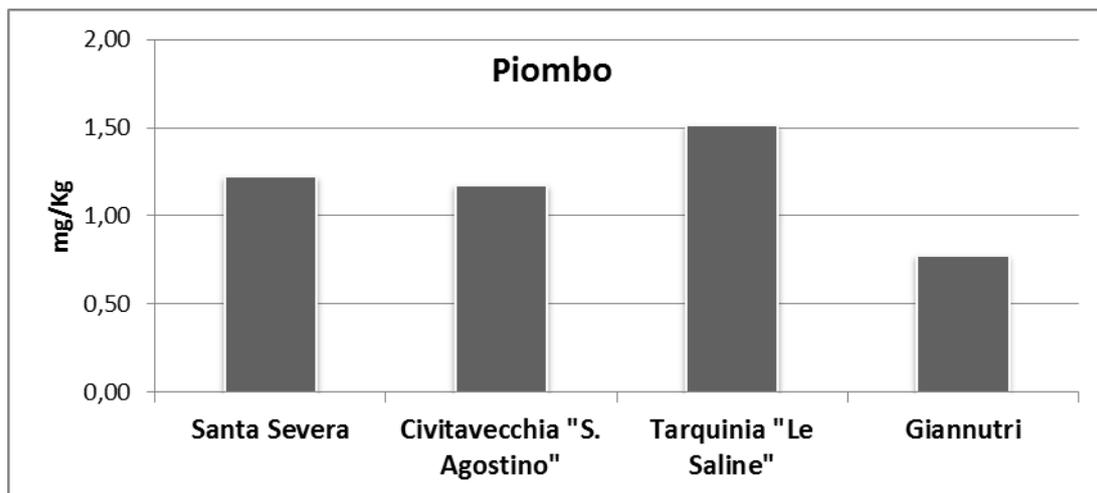


Fig. 16 – *Paracentrotus lividus*. Variazioni delle concentrazioni di Piombo nelle diverse località di studio.

I dati ottenuti sul Cromo (Fig. 17) nel Riccio di mare evidenziano un valore massimo rilevato a Civitavecchia S. Agostino (circa 1,00 mg/Kg) e un valore minimo registrato a Giannutri (0,26 mg/Kg).

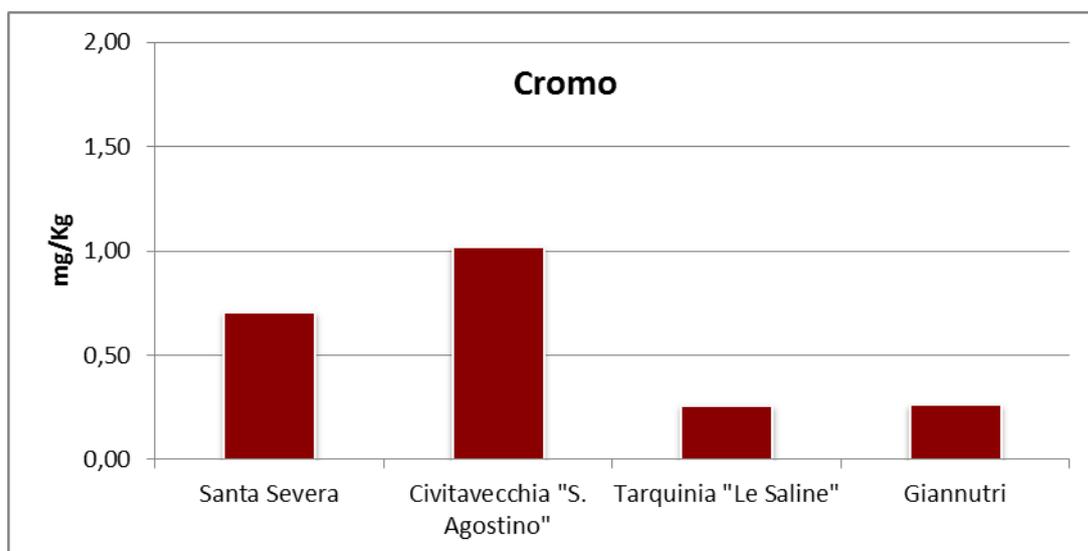


Fig. 17 – *Paracentrotus lividus*. Variazioni delle concentrazioni di Cromo nelle diverse località di studio.

4.3. Conclusioni

Dall'analisi dei principali metalli pesanti rilevati nella matrice biologica degli organismi sentinella, emerge un quadro ambientale ancora non gravemente disturbato, anche se si assiste ad un aumento rilevante di alcuni metalli pesanti quali ad esempio l'arsenico ed il piombo, rispetto agli anni precedenti, ed alla comparsa, per la prima volta, di tracce di mercurio.

A titolo di confronto vengono inserite di seguito alcune figure che illustrano le principali differenze rilevate nei diversi organismi sentinella durante i quattro anni di studio (2010, 2011, 2012 e 2013).

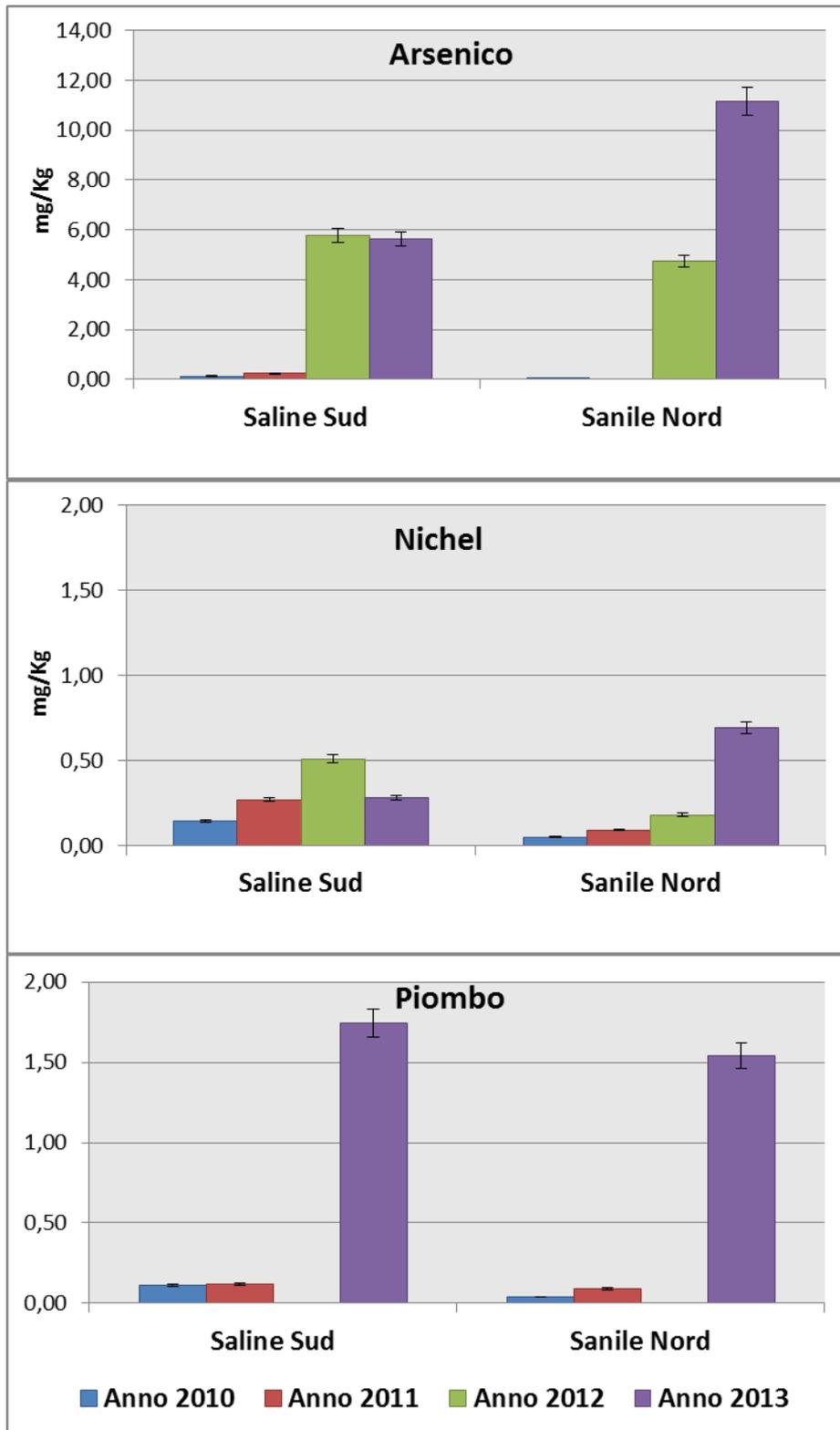


Fig. 18 – *Aphanius fasciatus* - Confronti dei principali metalli pesanti rilevati nei tre anni di monitoraggio.

Da quanto emerge dal confronto dei dati di alcuni metalli pesanti (Fig. 18), relativi all' *A. fasciatus*, si riscontra innanzitutto un notevole aumento nella concentrazione dell'Arsenico e del Piombo soprattutto negli ultimi due anni. Per quanto riguarda il Nichel si registra un trend in aumento solo

nella vasca posta a nord delle Saline e per il Piombo, nell'anno 2013, si assiste ad un picco piuttosto elevato in entrambe le vasche.

Nella chiocciola (*Helix aspersa*, Fig. 19) andando a confrontare in particolare le diverse concentrazioni di Arsenico, Cadmio e Piombo nei quattro anni di studio si può notare un netto aumento di tali metalli nei diversi siti di campionamento.

Quindi, il trend di aumento di alcuni metalli pesanti è abbastanza evidente, e va tenuto sotto controllo nei prossimi anni, tenendo conto, come rilevato da alcune riviste internazionali che hanno pubblicato una parte di questi dati, che soprattutto due delle specie sentinella scelte (*Helix aspersa* e *Aphanius fasciatus*), sono risultati degli ottimi bioindicatori.

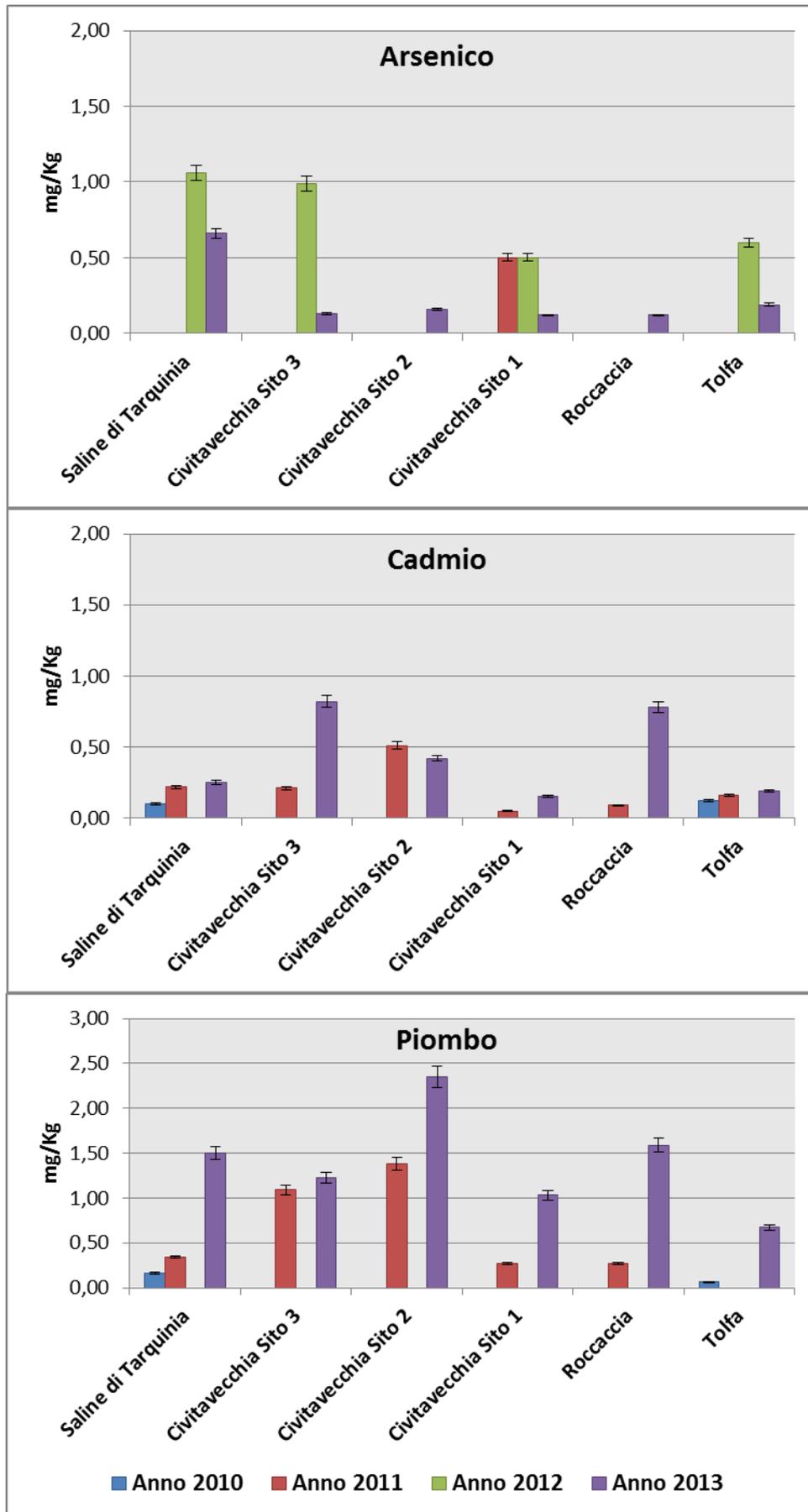


Fig. 19 – *Helix aspersa* – Confronto nella concentrazione di Arsenico, Cadmio e Piombo nei 4 anni di monitoraggio.

BIBLIOGRAFIA

- 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.
- Bacci G., 1954. Alcuni rilievi sulle faune di acque salmastre. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli*, 25 (2), pp: 380-396
- Clements C., Ralph S. and Petras M., 1997. Genotoxicity of selected herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 29, 277–288.
- Collins A., Dusinskà M., Franklin M., Somorovskà M., Petrovskà H., Duthie S, Fillion L., Panayiotidis M., Raslovà K., Vaughan N., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications, *Environ. Mol. Mutagen.* 30: 139-146.
- Collins A., Dusinska M., Horvathova E., Munro E., Savio M., Stetina R., 2001. Inter-individual differences in DNA base excision repair activity measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis*; 16: 297–301.
- Cottiglia M., 1980. Pesci lagunari. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane. Vol. 1 ed. CNR, 141 pp.
- 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.
- F. Frontalini, R. Coccioni, C. Bucci, 2009, Benthic foraminiferal assemblages and trace element contents from the lagoons of Orbetello and Lesina, *Environ. Monit. Assess.* DOI 10.1007/s10661-009-1229-6.
- 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: 43 – 64.
- Maltagliati F., 1998. Does the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* (Teleostei: Cyprinodontidae) fit the one-dimensional stepping-stone model of gene flow? *Environ Biol Fish* 53:385-392

- Maltagliati F., 2003. Diversità genetica a diverse scale spaziali nel ciprinodontide *Aphanius fasciatus* di biotope salmastri mediterranei – Genetica della Conservazione- Stato della Ricerca in Italia – Firenze 14-15 /02/2003
- 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.
- Mosesso P., Angeletti D., Pepe G., Pretti C., Nascetti G., Bellacima R., Cimmaruta R. & Awadesh Jha A., 2011. The use of *Aphanius fasciatus* as sentinel organism to detect complex genotoxic mixtures in coastal lagoon ecosystems. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* (Submitted). ISSN: 1383-5718.
- 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, et al., 2006. Use of the Land Snail *Helix aspersa* as Sentinel Organism for Monitoring Ecotoxicologic Effects of Urban Pollution: An Integrated Approach. *Environ Health Perspect* 114(1): doi:10.1289/ehp.8397
- 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.

APPENDICE II – RISULTATI ANALITICI

<i>H. aspersa</i>	Saline di Tarquinia						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	0,450	0,300	0,050	0,320	2,340	1,380	12,8
N° 2	0,870	0,180	0,050	0,260	0,740	0,220	10,4
N° 3	0,670	0,280	0,040	0,280	1,900	0,850	10,4
N° 4	0,770	0,250	0,045	0,250	1,580	0,920	11,5
N° 5	0,850	0,290	0,051	0,310	1,230	1,050	11,9
N° 6	0,480	0,250	0,048	0,300	0,900	1,200	12,0
N° 7	0,480	0,280	0,050	0,250	1,580	0,250	12,5
N° 8	0,720	0,300	0,045	0,280	0,980	0,550	11,8
N° 9	0,660	0,190	0,050	0,300	1,590	0,660	12,0
N° 10	0,700	0,180	0,050	0,300	2,200	0,750	11,9
Valore medio	0,665	0,250	0,048	0,285	1,504	0,783	11,7
Dev. Standard	0,151	0,049	0,004	0,025	0,543	0,380	0,79
Valore minimo	0,450	0,180	0,040	0,250	0,740	0,220	10,4
Valore massimo	0,870	0,300	0,051	0,320	2,340	1,380	12,8
<i>H. aspersa</i>	Civitavecchia Sito 3						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	0,150	0,670	0,050	0,300	1,250	0,450	64,1
N° 2	0,130	0,830	0,100	1,040	1,280	0,400	58,4
N° 3	0,100	1,120	0,130	0,500	1,300	0,550	56,0
N° 4	0,090	0,540	0,020	0,780	1,250	0,340	54,8
N° 5	0,170	0,990	0,080	0,670	1,210	0,250	56,5
N° 6	0,150	1,100	0,050	0,800	1,100	0,380	55,0
N° 7	0,120	0,980	0,050	1,010	1,200	0,480	63,2
N° 8	0,130	0,580	0,060	0,280	1,240	0,400	61,2
N° 9	0,150	0,670	0,095	0,400	1,310	0,590	56,9
N° 10	0,160	0,770	0,080	0,600	1,220	0,210	64,6
Valore medio	0,135	0,825	0,072	0,638	1,236	0,405	59,1
Dev. Standard	0,026	0,212	0,032	0,272	0,060	0,120	3,84
Valore minimo	0,090	0,540	0,020	0,280	1,100	0,210	54,8
Valore massimo	0,170	1,120	0,130	1,040	1,310	0,590	64,6
<i>H. aspersa</i>	Civitavecchia Sito 2						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	0,220	0,550	0,040	0,930	1,060	0,390	82,9
N° 2	0,110	0,170	0,030	0,390	3,680	0,920	65,1
N° 3	0,170	0,430	0,037	0,650	2,730	0,650	75,4
N° 4	0,180	0,500	0,040	0,720	2,880	0,700	77,8
N° 5	0,210	0,600	0,030	0,830	1,500	0,540	80,5
N° 6	0,160	0,134	0,032	0,400	2,400	0,400	68,4
N° 7	0,150	0,420	0,034	0,450	1,900	0,800	66,9
N° 8	0,110	0,560	0,040	0,780	1,090	0,450	81,5
N° 9	0,130	0,650	0,030	0,760	3,500	0,880	83,2
N° 10	0,200	0,220	0,040	0,760	2,800	0,900	77,5
Valore medio	0,164	0,423	0,035	0,667	2,354	0,663	75,9
Dev. Standard	0,039	0,186	0,005	0,190	0,937	0,209	6,79
Valore minimo	0,110	0,134	0,030	0,390	1,060	0,390	65,1
Valore massimo	0,220	0,650	0,040	0,930	3,680	0,920	83,2

Tab. 1 – Risultati analitici dei principali metalli pesanti rilevati in diverse località negli organismi sentinella.

<i>H. aspersa</i>	Civitavecchia Sito 1						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	0,110	0,140	0,010	0,429	1,100	0,170	19,0
N° 2	0,140	0,155	0,020	0,380	1,050	0,260	18,9
N° 3	0,130	0,170	0,010	0,430	1,200	0,270	17,4
N° 4	0,110	0,145	0,010	0,410	1,240	0,350	21,2
N° 5	0,130	0,170	0,020	0,440	0,850	0,320	22,3
N° 6	0,110	0,160	0,020	0,430	0,840	0,330	15,2
N° 7	0,120	0,150	0,010	0,440	0,900	0,300	16,4
N° 8	0,130	0,140	0,020	0,435	1,100	0,250	15,8
N° 9	0,150	0,150	0,010	0,430	1,050	0,280	20,1
N° 10	0,110	0,170	0,010	0,430	0,980	0,290	15,4
Valore medio	0,124	0,155	0,014	0,425	1,031	0,282	18,2
Dev. Standard	0,014	0,012	0,005	0,018	0,138	0,051	2,51
Valore minimo	0,110	0,140	0,010	0,380	0,840	0,170	15,2
Valore massimo	0,150	0,170	0,020	0,440	1,240	0,350	22,3
<i>H. aspersa</i>	Roccaccia						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	0,120	0,750	0,130	0,620	1,550	0,450	38,4
N° 2	0,130	0,780	0,090	0,980	1,650	0,540	115,2
N° 3	0,090	0,800	0,020	0,340	0,188	0,550	17,3
N° 4	0,180	0,850	0,090	0,650	2,100	0,480	21,6
N° 5	0,100	0,700	0,080	0,770	2,000	0,550	25,6
N° 6	0,150	0,750	0,100	0,450	1,990	0,580	75,4
N° 7	0,090	0,800	0,090	0,380	1,680	0,440	35,2
N° 8	0,095	0,690	0,100	0,870	1,310	0,560	21,8
N° 9	0,100	0,870	0,090	0,800	1,160	0,250	18,9
N° 10	0,170	0,800	0,080	0,560	2,290	0,590	25,5
Valore medio	0,123	0,779	0,087	0,642	1,592	0,499	39,5
Dev. Standard	0,034	0,058	0,028	0,214	0,607	0,102	31,59
Valore minimo	0,090	0,690	0,020	0,340	0,188	0,250	17,3
Valore massimo	0,180	0,870	0,130	0,980	2,290	0,590	115,2
<i>H. aspersa</i>	Magliano in Toscana						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	0,050	0,380	0,040	0,440	1,250	0,210	18,1
N° 2	0,055	0,400	0,050	0,480	1,220	0,200	19,1
N° 3	0,050	0,350	0,060	0,450	1,480	0,250	17,2
N° 4	0,060	0,440	0,050	0,390	0,960	0,180	17,5
N° 5	0,060	0,240	0,040	0,490	0,980	0,170	18,7
N° 6	0,050	0,300	0,040	0,400	1,100	0,150	18,5
N° 7	0,055	0,250	0,050	0,380	1,050	0,240	19,3
N° 8	0,060	0,240	0,060	0,450	1,360	0,250	17,1
N° 9	0,050	0,320	0,040	0,430	1,250	0,180	18,0
N° 10	0,060	0,290	0,050	0,400	0,950	0,200	19,0
Valore medio	0,055	0,321	0,048	0,431	1,160	0,203	18,3
Dev. Standard	0,005	0,070	0,008	0,038	0,181	0,035	0,81
Valore minimo	0,050	0,240	0,040	0,380	0,950	0,150	17,1
Valore massimo	0,060	0,440	0,060	0,490	1,480	0,250	19,3

Tab. 2 – Risultati analitici dei principali metalli pesanti rilevati in diverse località negli organismi sentinella.

<i>H. aspersa</i>	Civitavecchia - Via Graziano Luciano						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	0,050	0,260	0,040	0,350	1,240	0,270	19,6
N° 2	0,055	0,200	0,020	0,340	1,220	0,250	21,2
N° 3	0,050	0,240	0,020	0,330	1,270	0,260	20,2
N° 4	0,060	0,250	0,040	0,350	1,280	0,250	21,0
N° 5	0,060	0,200	0,030	0,350	0,910	0,280	20,3
N° 6	0,050	0,210	0,030	0,320	0,940	0,290	19,8
N° 7	0,055	0,230	0,040	0,370	0,980	0,220	19,5
N° 8	0,060	0,250	0,040	0,380	1,200	0,280	22,0
N° 9	0,050	0,200	0,025	0,360	0,900	0,240	21,9
N° 10	0,060	0,230	0,040	0,350	1,100	0,270	18,5
Valore medio	0,055	0,227	0,033	0,350	1,104	0,261	20,4
Dev. Standard	0,005	0,023	0,009	0,018	0,157	0,021	1,12
Valore minimo	0,050	0,200	0,020	0,320	0,900	0,220	18,5
Valore massimo	0,060	0,260	0,040	0,380	1,280	0,290	22,0
<i>H. aspersa</i>	Strada Provinciale - SP 45						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	0,120	0,510	0,020	0,970	0,630	0,180	25,6
N° 2	0,210	0,460	0,010	0,260	1,830	0,260	20,2
N° 3	0,170	0,510	0,020	0,900	1,250	0,250	23,1
N° 4	0,210	0,420	0,020	0,560	1,100	0,190	22,5
N° 5	0,180	0,500	0,020	0,340	1,230	0,240	21,6
N° 6	0,210	0,460	0,010	0,650	0,950	0,260	22,8
N° 7	0,200	0,500	0,020	0,730	0,980	0,180	25,8
N° 8	0,190	0,520	0,030	0,620	1,100	0,250	20,7
N° 9	0,180	0,450	0,020	0,780	1,850	0,260	21,8
N° 10	0,210	0,490	0,020	0,450	1,250	0,180	22,0
Valore medio	0,188	0,482	0,019	0,626	1,217	0,225	22,6
Dev. Standard	0,028	0,033	0,006	0,231	0,377	0,037	1,85
Valore minimo	0,120	0,420	0,010	0,260	0,630	0,180	20,2
Valore massimo	0,210	0,520	0,030	0,970	1,850	0,260	25,8
<i>H. aspersa</i>	Tolfa						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	0,150	0,190	0,140	0,300	0,690	0,240	16,0
N° 2	0,220	0,200	0,120	0,270	0,650	0,230	15,4
N° 3	0,160	0,160	0,150	0,250	0,760	0,250	16,1
N° 4	0,200	0,200	0,120	0,310	0,640	0,260	14,8
N° 5	0,190	0,180	0,140	0,280	0,740	0,220	17,1
N° 6	0,220	0,200	0,130	0,300	0,660	0,250	15,4
N° 7	0,210	0,190	0,120	0,230	0,770	0,260	17,1
N° 8	0,180	0,180	0,140	0,320	0,720	0,230	16,3
N° 9	0,190	0,200	0,120	0,240	0,500	0,250	14,6
N° 10	0,170	0,210	0,160	0,320	0,600	0,240	16,3
Valore medio	0,189	0,191	0,134	0,282	0,673	0,243	15,9
Dev. Standard	0,024	0,014	0,014	0,033	0,082	0,013	0,86
Valore minimo	0,150	0,160	0,120	0,230	0,500	0,220	14,6
Valore massimo	0,220	0,210	0,160	0,320	0,770	0,260	17,1

Tab. 3 – Risultati analitici dei principali metalli pesanti rilevati in diverse località negli organismi sentinella.

<i>P. lividus</i>	Santa Severa						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	2,300	0,330	0,100	2,350	1,100	0,900	3,0
N° 2	2,200	0,190	0,050	2,400	1,100	0,800	3,1
N° 3	2,400	0,220	0,100	2,450	1,400	0,900	2,5
N° 4	2,400	0,280	0,080	2,430	1,250	0,600	2,5
N° 5	2,500	0,300	0,075	2,200	1,220	0,500	2,9
Valore medio	2,360	0,264	0,081	2,366	1,214	0,740	2,800
Dev. Standard	0,114	0,058	0,021	0,100	0,124	0,182	0,283
Valore minimo	2,200	0,190	0,050	2,200	1,100	0,500	2,500
Valore massimo	2,500	0,330	0,100	2,450	1,400	0,900	3,100
<i>P. lividus</i>	Civitavecchia "S. Agostino"						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	1,700	0,090	0,120	1,080	1,160	1,000	3,3
N° 2	3,000	0,100	0,130	1,040	1,210	1,020	3,1
N° 3	2,700	0,090	0,090	1,010	1,000	1,010	3,4
N° 4	2,800	0,110	0,090	1,230	1,300	1,000	2,8
N° 5	2,900	0,120	0,120	1,090	1,250	1,020	2,9
Valore medio	2,620	0,102	0,110	1,090	1,184	1,010	3,100
Dev. Standard	0,526	0,013	0,019	0,085	0,115	0,010	0,255
Valore minimo	1,700	0,090	0,090	1,010	1,000	1,000	2,800
Valore massimo	3,000	0,120	0,130	1,230	1,300	1,020	3,400
<i>P. lividus</i>	Tarquinia "Le Saline"						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	2,400	0,050	0,100	0,430	1,600	0,270	2,3
N° 2	2,500	0,060	0,110	0,540	1,350	0,280	2,7
N° 3	2,400	0,060	0,100	0,480	1,450	0,300	2,6
N° 4	1,980	0,050	0,100	0,500	1,580	0,270	2,4
N° 5	2,000	0,040	0,110	0,420	1,600	0,200	2,3
Valore medio	2,256	0,052	0,104	0,474	1,516	0,264	2,460
Dev. Standard	0,246	0,008	0,005	0,050	0,112	0,038	0,182
Valore minimo	1,980	0,040	0,100	0,420	1,350	0,200	2,300
Valore massimo	2,500	0,060	0,110	0,540	1,600	0,300	2,700
<i>P. lividus</i>	Giannutri						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	0,900	0,071	0,050	1,050	0,800	0,280	2,1
N° 2	0,330	0,075	0,060	1,480	0,800	0,250	2,2
N° 3	0,300	0,065	0,060	1,500	0,900	0,260	2,2
N° 4	0,800	0,075	0,050	1,100	0,900	0,270	2,1
N° 5	0,200	0,060	0,060	1,580	0,810	0,250	2,1
Valore medio	0,506	0,069	0,056	1,342	0,842	0,262	2,104
Dev. Standard	0,320	0,007	0,005	0,247	0,053	0,013	0,050
Valore minimo	0,200	0,060	0,050	1,050	0,800	0,250	2,050
Valore massimo	0,900	0,075	0,060	1,580	0,900	0,280	2,160

Tab. 4 – Risultati analitici dei principali metalli pesanti rilevati in diverse località negli organismi sentinella.

<i>A. fasciatus</i>	Tarquinia "Saline Nord"						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	11,000	0,150	0,150	0,600	1,550	0,650	3,9
N° 2	10,500	0,110	0,100	0,750	1,650	0,670	4,0
N° 3	11,400	0,100	0,090	0,590	1,540	0,800	4,2
N° 4	11,500	0,090	0,150	0,550	1,450	0,550	3,5
N° 5	9,550	0,110	0,140	0,800	1,350	0,560	3,2
N° 6	11,500	0,100	0,150	0,780	1,650	0,650	3,1
N° 7	11,000	0,120	0,170	0,750	1,760	0,700	4,3
N° 8	11,600	0,090	0,180	0,650	1,450	0,800	3,9
N° 9	11,650	0,100	0,170	0,680	1,550	0,400	4,5
N° 10	11,800	0,110	0,140	0,700	1,450	0,400	4,0
Valore medio	11,150	0,108	0,144	0,685	1,540	0,618	3,9
Dev. Standard	0,684	0,018	0,029	0,086	0,122	0,142	0,46
Valore minimo	9,550	0,090	0,090	0,550	1,350	0,400	3,1
Valore massimo	11,800	0,150	0,180	0,800	1,760	0,800	4,5
<i>A. fasciatus</i>	Tarquinia "Saline Sud"						
	As (mg/Kg)	Cd (mg/Kg)	Hg (mg/Kg)	Ni (mg/Kg)	Pb (mg/Kg)	Cr (mg/Kg)	Cu (mg/Kg)
N° 1	6,000	<L.Q.	0,16	0,300	1,800	0,200	2,2
N° 2	5,500	<L.Q.	0,14	0,270	1,750	0,100	3,0
N° 3	6,500	<L.Q.	0,15	0,250	1,900	0,200	2,5
N° 4	4,800	<L.Q.	0,16	0,340	1,650	0,100	2,6
N° 5	5,300	<L.Q.	0,15	0,260	1,500	0,150	2,8
N° 6	4,500	<L.Q.	0,15	0,350	1,800	0,200	3,0
N° 7	5,680	<L.Q.	0,14	0,300	1,900	0,220	2,5
N° 8	5,660	<L.Q.	0,17	0,270	1,550	0,210	2,0
N° 9	6,000	<L.Q.	0,13	0,250	1,670	0,250	2,0
N° 10	6,500	<L.Q.	0,15	0,190	1,850	0,240	1,9
Valore medio	5,644	-	0,149	0,278	1,737	0,187	2,4
Dev. Standard	0,657	-	0,149	0,047	0,140	0,053	0,42
Valore minimo	4,500	-	0,150	0,190	1,500	0,100	1,9
Valore massimo	6,500	-	0,150	0,350	1,900	0,250	3,0

Tab. 5 – Risultati analitici dei principali metalli pesanti rilevati in diverse località negli organismi sentinella.