

INDICATORI AMBIENTALI MICROBICI E VEGETALI PER LA DETERMINAZIONE DELLO STATO DI SALUTE AMBIENTALE IN SEGUITO A RILASCIO DI INQUINANTI DOVUTO AL “FALL OUT”

*E. Sturchio**, *P. Boccia**, *L. Casorri**, *B. Ficociello**, *M. Zanellato**,
*C. Beni***, *R. Aromolo***, *S. Marconi***, *P. Ferrazza****, *V. Leto****, *P. Ciampolillo****

Sommario – Per valutare gli effetti del rilascio di alcuni inquinanti sul sistema suolo-pianta e per identificare bioindicatori in grado di rilevare la presenza o meno di sostanze attive sul DNA in seguito all'eventuale rilascio di sostanze tossiche da una sorgente inquinante, è stata eseguita una simulazione con tre sostanze ampiamente utilizzate nelle produzioni industriali: la Formaldeide, il Fenilisocianato e il Bromo. Per rivelare i danni al DNA sono stati applicati test di mutagenesi a breve termine, come il Test della Cometa e il Test dei micronuclei in cellule meristemali di *Vicia faba* var. minor, ed inoltre sono state effettuate analisi chimico-fisiche sui suoli, sui vegetali cresciuti su questi suoli e sulle acque di percolazione campionate in un sito inquinato. I risultati ottenuti mostrano come sia possibile ricavare, da queste analisi, valide indicazioni sul livello di contaminazione di un sito esposto a sostanze tossiche. Inoltre le nostre prove hanno dimostrato che utilizzando il test della cometa, come biomarker di genotossicità, e il test dei micronuclei, per valutare il danno al DNA, è possibile ottenere un miglior quadro interpretativo della situazione riguardante gli ambienti esposti a possibili fonti di inquinamento.

MICROBIAL AND VEGETABLE ENVIRONMENTAL INDICATORS TO DETECT THE STATE OF ENVIRONMENTAL HEALTH AFTER A RELEASE OF POLLUTANTS DUE TO THE “FALL OUT”

Summary – In order to evaluate the environmental damage after an accidental release of toxic substances in the atmosphere or/and soil, a simulation was set up with three substances: Formaldehyde, Fenilisocyanate and Bromine. These dangerous substances are widely used in industrial productions and, in case of accidental release, they can cause pollution of soil (Formaldehyde) or/and atmosphere (Formaldehyde, Fenilisocyanate and Bromine). In particular Fenilisocyanate is a product of the decomposition of the chloridazon, a pesticide commonly used in agriculture; the major risk connected with this product is the possibility of fire during storage. In the experimental site the effects of the contamination on soil functional qualities and plant nutrition were evaluated, furthermore DNA damage with short-term genotoxicity tests comet assay and micronucleus test on *Vicia faba* root cells, performed on polluted soils and on gravitational water was detected. Chemical and physical characterization, nutritive and organic contents and trace elements presence were investigated. The phyto-

toxicity was also estimated by the reduction in length of the primary root of *Vicia faba* seedlings. The results showed that some of the parameters considered are applicable indicators for the evaluation of the soil-plant system pollution. The comet assay is a sensitive, rapid and economic technique for the detection of DNA damage, which is ideally suited as a biomarker of genotoxicity for biomonitoring, even though there is a need to combine the comet assay with the use of other genotoxicity tests such as the micronuclei test to get a more comprehensive understanding of the pollution situation of certain environment.

Parole chiave: formaldeide, fenilisocianato, bromo, test della cometa, test dei micronuclei; genotossicità; fitotossicità.

Keywords: formaldehyde, bromine, fenilisocyanate, comet test, micronuclei test, genotoxicity, fitotoxicity.

1. INTRODUZIONE

Nell'ambito del Progetto finalizzato “Rilascio in atmosfera di sostanze tossiche: previsione, prevenzione e protezione della salute umana”, è stata condotta una sperimentazione volta ad individuare gli effetti del rilascio di alcuni inquinanti sul sistema suolo-pianta ed ad identificare alcuni indicatori di stress da contaminazione di tipo chimico, microbico e vegetale. Gli effetti dell'inquinamento sul sistema suolo-pianta possono essere di tipo fisico, chimico e biologico.

Nel caso degli effetti di tipo fisico, i contaminanti carichi elettricamente sono in grado di spostare gli ioni dai complessi di scambio (minerali e organici), rendendoli meno disponibili per i microrganismi del suolo e per le piante spontanee o coltivate. Effetti sulle caratteristiche fisiche dei suoli possono essere legati al depauperamento delle argille, dovuto ad alcuni contaminanti organici che operano come solventi e destrutturano gli aggregati del suolo, o all'azione cementante di sostanze tossiche che presentano un'azione di tipo siccativo sul suolo.

Nel caso invece degli effetti di tipo chimico, la formazione di legami tra le molecole dei contaminanti con altre molecole, con la costituzione di complessi o chelati, rende indisponibili alcuni elementi nutritivi per microrganismi e piante. Tra gli effetti di tipo chimico vengono anche identificati quelli sulla soluzione circolante del suolo, dovuti alla solubilizzazione dei contaminanti (azione diretta) o alla lisciviazione degli ioni spostati dai complessi di scambio (azione indiretta), che causa l'inquinamento delle falde acquifere superficiali.

Gli effetti di tipo biologico sono legati alla morte di alcuni organismi del suolo sensibili e/o alla selezione di specie resistenti; al manifestarsi di fenomeni di fitotossicità, sia a livello della parte aerea della pianta, con riduzione della capacità fotosintetica, quindi della crescita, o la necrosi dei tessuti vege-

* Dott.ssa Elena Sturchio, dott.ssa Priscilla Boccia, dott.ssa Laura Casorri, dott.ssa Barbara Ficociello, dott.ssa Miriam Zanellato; ISPESL/DIPIA Via Urbana, 167 – 00184, Roma – e-mail: elena.sturchio@ispesl.gov.it.

** Dott. Claudio Beni, dott.ssa Rita Aromolo, dott.ssa Simona Marconi; CRA – ISNP – Via della Navicella 2/4 – 00184, Roma.

*** Dott. Paolo Ferrazza, dott.ssa Valeria Leto, dott.ssa Pamela Ciampolillo, Opera-Research – dipartimento di ricerca e sviluppo Genova-Roma – Via Ugo Bartolomei, 18 – 00136, Roma.

tali, che a livello radicale con ripercussioni sulla capacità della pianta di assimilare i nutrienti dal suolo.

Un altro scopo della ricerca era quello di identificare bioindicatori in grado di rilevare la presenza o meno di sostanze attive sul DNA in seguito all'eventuale rilascio di sostanze tossiche da una sorgente inquinante.

L'immissione nell'ambiente di sostanze in grado di provocare danni al patrimonio genetico degli organismi viventi nell'ecosistema (Genotossine), rappresenta un rischio per la loro capacità di intaccare direttamente i pools genetici. In questo contesto, l'uso di test biologici di genotossicità risulta di fondamentale importanza per valutare l'entità del danno negli organismi viventi. I protocolli sperimentali prevedono l'utilizzo degli apici radicali di *Vicia faba* var. *minor*, che cresce facilmente ed è utilizzata largamente nella valutazione della mutagenicità di agenti chimici, pesticidi e carcinogeni, nei classici test citogenetici.

Gli effetti di tipo genotossico sono stati valutati attraverso l'utilizzo di due tipi di metodiche di saggio a breve termine (Test della Cometa e Test dei micronuclei in cellule meristemali di *Vicia faba* var. *minor*), sia sui campioni di suolo sia sulle acque di dilavamento. Dall'esperienza pregressa si è visto che le piante si sono dimostrate organismi utili per rivelare la presenza di inquinanti ambientali genotossici, consentendo, accanto a più collaudate metodiche di tipo chimico-fisico e biologico, il controllo e lo screening in situ. L'impiego di tali test di mutagenesi a breve termine, per l'alto grado di predittività della cancerogenesi, unito alla rapidità e ai bassi costi di esecuzione, fornisce un contributo significativo alla protezione della popolazione nei confronti dell'azione tossica di agenti mutageni e cancerogeni.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Fasi del programma

Il protocollo sperimentale della prova di simulazione di incidente chimico, ha previsto le seguenti fasi:

- Semina della coltura oggetto di prova.
- Simulazione dello sversamento delle sostanze tossiche, effettuato quando le piante avevano raggiunto una altezza media di 5-10 cm. Le concentrazioni di inquinanti impiegate nella prova sono state le seguenti:
 - 1) Soluzione di Br pari a 1 ml l⁻¹ (10mM);
 - 2) Soluzione di fenilisocianato 5 mM (pari a 600 mg l⁻¹);
 - 3) Soluzione di formaldeide 2 ml l⁻¹ (10mM).
- Per ogni vasca da 0.16 m² è stata distribuita una quantità di soluzione inquinante pari ad 1 litro. Prelievo di suoli, vegetali e acque di percolazione, a distanza di venti giorni dallo sversamento.
- Preparazione dei campioni per le analisi chimiche e fisiche.
- Esecuzione delle analisi sui suoli (contenuto di sostanza organica, pH, conducibilità elettrica, respirazione, ecc.).
- Determinazioni chimiche sui vegetali (contenuto di nutrienti e di clorofilla di tipo A e B).
- Effettuazione di test biometrici sui vegetali (numero e dimensione foglie, area fogliare, lunghezza della radice primaria).

- Esecuzione di analisi delle acque (contenuto di macro, meso e microelementi).
- Conduzione di test di germinazione di organismi testimoni (*Vicia Faba* L. var *minor*) impiegando le acque di percolazione dei vasi.
- Applicazione dei test di mutagenesi vegetale: test di fitotossicità e di genotossicità condotti sulle cellule meristemali di *Vicia Faba* L. var *minor*::
 1. Test dei micronuclei sui suoli e sulle acque di percolazione.
 2. Test della cometa sui suoli e sulle acque di percolazione.
- Elaborazione statistica dei risultati.
- Redazione di un rapporto sulla prova sperimentale.

2.2 Piano sperimentale

La prova di simulazione di incidente chimico è stata effettuata in due serie di vasche lisimetriche dotate di sistema drenante, di ritenzione parziale di acqua (strato di argilla espansa) e di raccolta delle acque di percolazione.

Nelle due differenti serie sono state collocate due diverse tipologie di suolo agrario, uno franco argilloso e l'altro sabbioso. Il disegno sperimentale era di tipo completamente randomizzato e ha previsto l'allestimento di 32 vasche, suddivise in un due serie da 16 vasche, con due ripetizioni.

Entrambe le serie sono state suddivise in due diversi sistemi di coltivazione, nel primo dei quali è stata seminata una specie orticola a foglia, lo spinacio (*Spinacia oleracea* L.) mentre nel secondo non è stata prevista alcuna coltivazione. Ciò per esaminare il differente effetto dell'inquinamento sul suolo in presenza o meno di copertura vegetale, oltre che per verificare l'effetto sulle piante, dal punto di vista fisiologico e produttivo.

La scelta della coltura è caduta sullo spinacio in quanto si tratta di una pianta diffusamente coltivata per produrre alimenti in Italia, caratterizzata dalla rapida crescita e dalla sensibilità a sostanze fitotossiche e genotossiche presenti nel terreno. Tale specie, inoltre, costituisce un organismo testimone largamente impiegato nei test standard di tossicità.

Nell'ambito delle due serie il trattamento delle vasche ha previsto un'ulteriore differenziazione per quanto riguarda il tipo di suolo. Infatti, sono stati impiegati due diversi suoli: un suolo sabbioso, e un suolo franco argilloso. Le sostanze inquinanti (utilizzate in forma liquida) impiegate nella prova sono state le seguenti:

- bromo;
- fenilisocianato;
- formaldeide.

La scelta di questi composti è motivata dal loro ampio utilizzo nelle produzioni industriali. In caso di rilascio accidentale, possono causare inquinamento del suolo (Formaldeide) e/o atmosfera (Formaldeide, Fenilisocianato e Bromo).

In particolare il Fenilisocianato è un prodotto di decomposizione del Cloridazon, pesticida comunemente usato in agricoltura; il principale rischio connesso con l'uso di questo prodotto è la possibilità di incendio nei locali di stoccaggio.

Al momento della simulazione d'incidente, le vasche sono state ricoperte con una campana stagna dotata di valvola per insufflazione di liquidi e due pompe centrifughe, una per l'immis-

sione della soluzione contenente i contaminanti, l'altra per il richiamo dei vapori in eccesso e la loro condensazione in un contenitore per sostanze tossiche. Per evitare l'insorgenza di rischi per il personale addetto alla prova, inoltre, le vasche sono state ricoperte con un tunnel di polietilene a bassa densità, mentre il sistema di insufflazione veniva azionato dall'esterno del tunnel. La caratterizzazione chimico-fisica delle vasche è riportata nella Tabella 1.

2.3 Analisi sui suoli

pH

La determinazione del pH viene effettuata per via potenziometrica, dopo taratura del sistema di misura, nel surmatante di una soluzione acquosa del suolo (rapporto suolo soluzione pari a 1:2.5).

Contenuto di sostanza organica

Il carbonio organico totale presente nel suolo, viene ossidato con un eccesso di potassio bicromato in ambiente acido per acido solforico. La reazione viene interrotta dopo un tempo stabilito diluendo con acqua distillata. L'eccesso di potassio bicromato, che non ha reagito, viene titolato con Ferro Ammonio Solfato (Metodo Walkley & Black). Considerando un contenuto medio in carbonio della sostanza organica pari a 580 g kg⁻¹, si introduce un secondo fattore (1.724) per trasformare il carbonio organico in sostanza organica.

Respirazione cellulare

La determinazione della concentrazione di CO₂ prodotta dalla biomassa microbica presente nel suolo, viene effettuata per via titrimetrica modificando il metodo proposto da Jenkinson (1976). I campioni di suolo sono pesati (25 g) in un becker e portati alla capacità di campo.

Successivamente sono incubati a 30° in contenitori ermetici insieme a un altro contenitore con idrossido di sodio per 30 giorni. A intervalli stabiliti (1, 2, 4, 7, 10, 14, 17, 21, 28gg dopo l'incubazione) si apre il contenitore ermetico e si titola la soluzione di soda, dopo aggiunta di cloruro di bario per la precipitazione di carbonato di bario, con acido cloridrico. Oltre ai campioni vengono preparati anche dei bianchi che saranno titolati con lo stesso procedimento. La differenza dei volumi di HCl titolante per i campioni e per il bianco dà informazioni sulla quantità di CO₂ prodotta dalla biomassa presente in ogni campione e rappresenta il valore di respirazione per quel giorno. Dalla somma dei valori giornalieri si ricava la curva dei valori cumulativi della respirazione.

2.4 Determinazioni chimiche sui vegetali

Clorofilla

La clorofilla è un pigmento, contenuto nei tessuti vegetali, in grado di assorbire la luce necessaria per la fotosintesi. L'attività fotosintetica viene normalmente riferita al contenuto in clorofilla del campione in esame; tale parametro viene ritenuto quindi un indicatore delle condizioni vegetative delle piante. Il contenuto di clorofilla nella pianta (*Spinacia oleracea* L.) viene determinato per estrazione in una soluzione acquosa di acetone e successivo dosaggio mediante spettrofotometro UV-VIS ad opportune lunghezze d'onda.

Tab. 1 – Caratteristiche chimiche dei suoli impiegati nella sperimentazione

Parametro	Franco argilloso		Sabbioso	
	Valore	Giudizio	Valore	Giudizio
pH	7,60	Subalcalino	8,30	Alcalino
Sabbia %	24,40		92,33	
Limo %	47,60		3,67	
Argilla %	28,00		4,00	
Tessitura USDA		Franco argillosa		Sabbiosa
Sostanza organica %	1,79	Bassa	0,90	Bassa
Azoto %	0,12	Mediam. fornito	0,10	Mediam. fornito
P Olsen mg kg ⁻¹	25,20	Medio	57,60	Alto
K ₂ O mg kg ⁻¹	598,14	Alto	138,08	Medio
Capacità di scambio cationico meq 100g ⁻¹	29,51	Alta	5,24	Bassa
Ca meq 100g ⁻¹	24,33		3,23	
K meq 100g ⁻¹	1,27		0,29	
Na meq 100g ⁻¹	3,21		0,12	
Mg meq 100g ⁻¹	0,70		1,60	
Cd mg kg ⁻¹	<0,05		<0,05	
Cu mg kg ⁻¹	1,03		8,01	
Fe mg kg ⁻¹	401,10		56,20	
Ni mg kg ⁻¹	0,57		<0,05	
Pb mg kg ⁻¹	2,10		1,1	
Zn mg kg ⁻¹	1,30		2,7	

Si pesano 0.5 g di foglia fresca e si omogeneizza con una soluzione di acetone all'80%. L'estratto di clorofilla viene analizzato allo spettrofotometro, contro un bianco costituito da acetone all'80%, alle lunghezze d'onda 663 nm e 645 nm.

Azoto totale

L'azoto totale è stato determinato con il metodo per distillazione secondo Kjeldahl.

Metalli e nutrienti totali

I metalli e i nutrienti totali nei vegetali sono stati analizzati, dopo digestione con acido nitrico per 20 ore a 140°C, mediante spettroscopia di emissione al plasma ICP-OES (Dual View, Thermo Jarrel).

Anioni (Cloruri, bromuri, nitrati, fosfati e solfati)

Gli anioni nei vegetali sono stati estratti in acqua, dopo aver reso omogeneo e centrifugato il campione, e analizzati mediante cromatografia ionica (Dionex 500).

2.5 Test biometrici sui VEGETALI

Indice di Area Fogliare (LAI)

L'indice di area fogliare (LAI), rappresenta anch'esso un indicatore vegetale delle condizioni di salute della pianta.

Viene determinato in via diretta, ponendo le foglie tra due film plastici trasparenti, che scorrono su di un sistema di acquisizione delle immagini che calcola automaticamente la superficie fogliare.

Lunghezza della Radice Primaria (RAD)

Rappresenta la lunghezza massima della radice principale e viene misurata direttamente con un calibro, dopo aver lavato e fissato la radice ad una superficie piana.

2.5 Determinazioni sulle acque di lisciviazione

Metalli e nutrienti totali

Le acque sono state filtrate e analizzate mediante spettroscopia di emissione al plasma ICP-OES (Dual View, Thermo Jarrel).

Anioni (Cloruri, bromuri, nitrati, fosfati e solfati).

Le acque sono state filtrate e analizzate mediante cromatografia ionica (Dionex 500).

2.6 Test di germinazione

La germinazione del seme rappresenta l'evento fisiologico primario da cui si origina la giovane pianta; in condizioni naturali è influenzata dalle condizioni fisiche (temperatura, luce, umidità), chimiche (pH) dell'ambiente e dalla presenza di sostanze chimiche comprese quelle aventi una azione stimolante o inibente.

Il metodo si basa sulla determinazione della percentuale in numero di semi di *Vicia faba* L.

capaci di produrre germinelli vitali, in presenza delle acque liscivate, in grado poi di svilupparsi in pianta in condizioni favorevoli di coltura.

2.7 Test di Mutagenesi Vegetale

Test di genotossicità

500g di suolo di ciascuna tesi sono stati posti in vaschette di alluminio, 48 semi di *Vicia faba* (minor), vengono interrati in tale suolo ed irrigati con 120mL di H₂O_d, incubati poi per 5 giorni in camera climatica a 20°C ed U = 60%.

Trascorso tale tempo i semi germinati vengono recuperati e l'apice radicale primario misurato per il Test di fitotossicità PRL-test, l'apice è poi tagliato e fissato per il MNC-test.

Parallelamente 120 ml di acqua di lisciviazione raccolta dalle vasche lisimetriche, dopo l'inquinamento, sono stati usati per innaffiare 500 gr di suolo sabbioso (standard di laboratorio) nel quale sono stati posti a germinare 50 semi di *V.faba*. Le vaschette così preparate sono incubate 4 giorni in camera climatica (T=20°C, U=60%) al buio. Trascorso tale periodo gli apici della radice primaria sono stati prima misurati per il Test di fitotossicità PRL-test e poi trattati per il MNC-test.

PRL-test (Test di fitotossicità)

Il primary root length-test si basa sulla riduzione dell'allungamento della radice primaria (PRL) rispetto al testimone. Misurazione: il PRL è determinato mediante misurazione con righello (mm), l'errore dello strumento è pertanto ±1mm.

Trascorsi i 4 giorni le plantule sono recuperate dal terreno, sciaquate mediante acqua di rubinetto per togliere l'eccesso di

sabbia, e la lunghezza della radice primaria (PRL) misurata mediante righello (mm).

MNC-test

La valutazione dell'attività mutagenica è stata condotta utilizzando il test dei Micronuclei in *Vicia faba* var.minor. Tale metodica è in grado di rilevare danni al DNA cromosomico, quali un non corretto svolgimento del processo mitotico, indotto dalla presenza di sostanze mutagene nel campione da esaminare. Il test dei micronuclei si basa sull'incremento di cellule micronucleate (MNC) rispetto al testimone.

I micronuclei sono corpuscoli Feulgen positivi che originano da frammentazione di uno o più cromosomi e da anomala segregazione di tali frammenti durante la mitosi, i quali tendono a migrare indipendentemente dal resto dei cromosomi e danno luogo a corpuscoli extranucleari, osservabili al microscopio ottico mediante ingrandimento 40X.

Misurazione: per ogni campo osservato al microscopio vengono determinati: il numero totale delle cellule presenti nel campo ed il numero di cellule micronucleate, la frequenza di MNC è poi determinata come percentuale (%MNC = (cellule micronucleate/cellule totali) X100).

Gli apici della radice primaria sono stati tagliati e fissati in una soluzione di acido acetico glaciale e alcool etilico 3:1 (v/v). Trascorse 24 ore, gli apici sono trattati con HCl 1N a 60°C per 8 minuti e colorati con il reattivo di Schiff. Dopo successive 24 ore, gli apici vengono fissati su vetrini portaoggetti, mediante la seguente metodica: in un primo momento gli apici vengono schiacciati su vetrini portaoggetto agendo con una leggera pressione sui vetrini coprioggetto, questi ultimi sono poi rimossi dopo contatto con ghiaccio secco ed il preparato è definitivamente fissato al vetrino portaoggetto mediante due passaggi in histolemon e due in alcool etilico al 95%; per consentire l'osservazione microscopica un nuovo vetrino coprioggetto è infine incollato con balsamo del Canada sul preparato (De Marco *et al.*, 1990; De Simone *et al.*, 1992). Per ogni campione sono stati osservati 6 apici, all'interno di ciascun apice sono stati letti 5 campi ciascuno di 400-500 cellule, l'effetto genotossico è stato determinato come frequenza percentuale di cellule micronucleate sul totale delle cellule osservate (% MNC).

I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della Varianza, il confronto tra le medie è stato effettuato mediante il test LSD per p<0.05, utilizzando il pacchetto statistico SPSS 6.1 (SPSS Inc.).

Test della Cometa

Il "comet assay" o "single cell gel electrophoresis" (SGCE) è una tecnica di citogenetica molecolare, di recente applicazione, utilizzata per la valutazione del danno genetico in singole cellule e permette di studiare in cellule isolate le possibili rotture alla molecola di DNA indotte da agenti potenzialmente mutageni. Il test della cometa alcalino, data la sua semplicità, sensibilità e la necessità di poche cellule è ideale come test di genotossicità a breve termine.

Dieci apici radicali (100mg) di semi germinati di *Vicia faba* secondo le modalità utilizzate per il test dei micronuclei sono sminuzzati in 0,5ml di PBS 1X, 10mM di Na₂ EDTA, in un potter. La sospensione viene filtrata attraverso un filtro di 20mm per eliminare la maggior parte dei tessuti. Il filtrato

viene mescolato con 200 ml di LMP agarosio allo 0,5% in PBS ad una temperatura di 40°C (Angelis 2000).

I vetrini sono pretrattati con NMP agarosio all'1%, un secondo strato di 150 ml di NMP allo 0,5% viene stratificato e fatto solidificare. Si deposita la sospensione nucleare miscelata all'LMP di cui sopra sui vetrini. Si procede con la lisi (soluzione di lisi: 2,5 M NaCl, 100mM Na₂ EDTA, 10mM Tris-HCl e l'1% TritonX-100 e il 10% di DMSO, pH=10) per 1 ora a 4°C. Dopo la lisi i vetrini sono posti in camera elettroforetica con soluzione denaturante (0.3M NaOH, 5mM EDTA) per 40 minuti e si procede con l'elettroforesi per 40/50min a 300mA e 30V. Dopo elettroforesi i vetrini sono messi in un buffer di neutralizzazione (0.4M Tris-HCl, pH=7.5) a RT per 15 min. Si procede quindi alla fissazione immergendo i vetrini prima in alcool a 70°C e poi un secondo passaggio a 100°C. I vetrini così fissati possono essere conservati per una settimana e non oltre per evitare contaminazioni.

L'analisi delle comete, previa colorazione con 100ml di bromuro di etidio 20mg/ml per 7 min (Koppen 96), avviene con microscopio a fluorescenza utilizzando un filtro di 515-560 nm e un filtro barriera di 590nm. La migrazione del DNA è determinata utilizzando un sistema di analisi di immagini (IAS 2000, Delta sistemi). Per ogni cometa sono acquisiti diversi parametri quali: l'area della cellula, lunghezza della cometa, lunghezza della testa, lunghezza della coda, il momento della coda (lunghezza della coda x %DNA migrato/100), momento della cometa, fluorescenza della cometa, fluorescenza della testa, fluorescenza della coda.

La percentuale del DNA migrato è utilizzata come parametro del danno del DNA ed è impiegato il t-test di Student per valutare le differenze tra i campioni testati e i valori di controllo. L'eterogeneità dei differenti semi e le variazioni dei differenti controlli sperimentali negativi sono valutati attraverso l'analisi della varianza ad una via (ANOVA).

Analisi statistica

Tutti i dati ottenuti sono stati sottoposti all'analisi della varianza (ANOVA) con un livello di significatività pari al 95% ($p < 0.05$).

Principali caratteristiche della sabbia impiegata come standard di laboratorio

Suolo	Classif. USDA	Orizz	pH	S.O. (%)	S.U. ^a (%)	CSC (cmol kg ⁻¹)	N (%)	C/N	AR ^b (%)	LM ^c (%)	SB ^d (%)	CaCO ₃ (%)
limo	Typic Udifluent	Ap	8,5	2,02	0,81	n.d.	0,07	n.d.	7,1	33,7	59,2	49,5
sabbia	Typic Udifluent	Ap	7,6	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	4,4	5,3	90,3	8,7

Classificazione in accordo con la Soil Survey Staff (1975).
n.d., non determinato.

^a sostanze umiche; S.O. = sostanza organica.

3. RISULTATI

Effetti sul suolo

Le analisi fisico-chimiche del suolo effettuate dopo la prova di simulazione di incidente chimico hanno evidenziato che nessun effetto dovuto all'inquinamento si è manifestato sul contenuto di carbonio organico totale e di sostanza organica nei diversi trattamenti, sia in presenza che in assenza di vegetale (Tab. 2).

Tab. 2 – pH, contenuto di C organico e sostanza organica dopo l'inquinamento

Tesi	pH	C. org g/kg	s. organica %
argilloso testimone	7,3 b	13,38	2,3
argilloso testimone+vegetale	7,3 b	13,06	2,3
argilloso bromo	7,1 b	13,01	2,2
argilloso bromo+vegetale	7,1 b	13,16	2,3
argilloso isocianato	7,1 b	13,02	2,2
argilloso isocianato+vegetale	7,1 b	11,92	2,1
argilloso formaldeide	7,9 a	13,22	2,3
argilloso formaldeide+vegetale	7,8 a	13,28	2,3
sabbioso testimone	7,7 a	2,74	0,5
sabbioso testimone+ vegetale	7,7 a	2,65	0,5
sabbioso bromo	7,8 a	3,08	0,5
sabbioso bromo+vegetale	7,8 a	3,01	0,5
sabbioso isocianato	7,7 a	3,05	0,5
sabbioso isocianato+vegetale	7,8 a	2,82	0,5
sabbioso formaldeide	7,9 a	2,95	0,5
sabbioso formaldeide+vegetale	7,8 a	2,81	0,5

Lettere differenti attribuite alle diverse tesi, all'interno dello stesso parametro, indicano una differenza significativa con $p < 0,05$ (ANOVA).

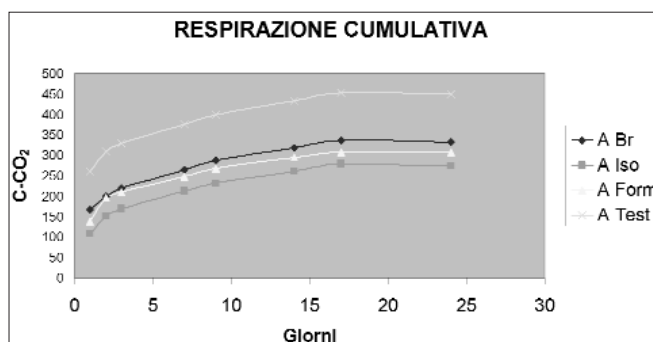


Fig. 8 – Andamento nel tempo (25 gg) delle curve di respirazione cumulata nei suoli argillosi

In seguito al trattamento con formaldeide i valori di reazione del suolo, invece, hanno presentato una lieve tendenza all'aumento nel suolo sabbioso ed un incremento statisticamente significativo nel suolo franco-argilloso.

L'andamento delle curve cumulative di CO₂ prodotta dalla biomassa microbica nei suoli franco argillosi ha evidenziato che in tutte le tesi trattate con sostanze contaminanti l'attività respiratoria dei microrganismi del suolo è stata nettamente inferiore rispetto al testimone (Fig. 8).

Nei suoli sabbiosi, invece, la maggior sensibilità della comunità microbica sembra essersi manifestata in presenza di formaldeide, mentre i suoli trattati con bromo e fenil-isocianato presentano delle curve cumulative che non differiscono da quella del suolo testimone (Fig. 9).

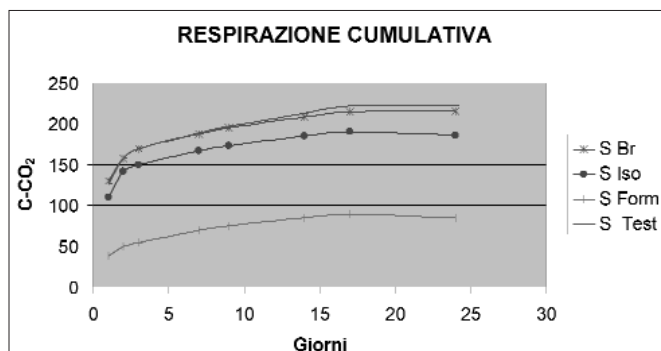


Fig. 9 – Andamento nel tempo (25 gg) delle curve di respirazione cumulata nei suoli sabbiosi

Effetti sul chimismo dei vegetali

Il trattamento con bromo ha indotto un aumento significativo dell'azoto totale e della clorofilla in tutte le sue forme, sia nel suolo franco-argilloso che in quello sabbioso, rispetto a tutte le altre tesi (Tab. 3).

Nella tesi inquinata con Br il contenuto di bromuri nei vegetali è risultato significativamente più elevato che in tutti gli altri trattamenti; in questa tesi, inoltre, si osserva anche una tendenza all'incremento dei cloruri e la totale assenza di nitrati. Il maggior contenuto di azoto totale, evidenziato in precedenza per tale trattamento, pertanto, è risultato a carico delle forme azotate ridotte, quali la nitrosa e l'ammoniacale.

La contaminazione con formaldeide, invece, ha indotto, in generale, una minore concentrazione di fluoruri, cloruri, fosfati e solfati, in entrambi i tipi di suolo.

Per quanto concerne il contenuto di elementi nutritivi nei vegetali, è interessante rilevare come nella tesi inquinata con formaldeide siano diminuiti i cationi monovalenti del complesso di scambio, Na e K, mentre è aumentata la concentrazione del Ca e si mantenuta stabile quella del Mg (Tab. 5). Questi ultimi due elementi, essendo bivalenti, manifestano una più elevata capacità di adsorbimento ai colloidi organo-minerali del suolo. Esaminando la concentrazione di metalli pesanti nei tessuti delle piante trattate, si rileva l'aumento per il Ni e il Mn nei vegetali contaminati con formaldeide (Tab. 5). Nelle altre tesi

Tab. 3 – Contenuto di azoto totale, clorofilla tipo a e b e totale nei vegetali esaminati

	clorofilla A mg/l	clorofilla B mg/l	clorofilla tot. mg/l	N tot. %
argilloso testimone+vegetale	4,4 b	1,6 b	6,0 b	1,85 b
argilloso isocianato+vegetale	4,2 b	1,6 b	5,8 b	2,27 b
argilloso bromo+vegetale	4,9 a	1,8 a	6,7 a	2,88 a
argilloso formaldeide+vegetale	4,5 b	1,5 b	6,0 b	1,83 b
sabbioso testimone+vegetale	4,2 b	1,4 b	5,6 b	1,90 b
sabbioso isocianato+vegetale	4,2 b	1,8 a	6,0 b	1,90 b
sabbioso bromo+vegetale	4,7 a	1,8 a	6,5 a	2,64 a
sabbioso formaldeide+vegetale	4,3 b	1,6 b	5,9 b	2,30 b

Lettere differenti attribuite alle diverse tesi, all'interno dello stesso parametro, indicano una differenza significativa con $p < 0,05$ (ANOVA).

non sono state evidenziate differenze significative rispetto al controllo.

Effetti sulla morfologia dei vegetali

I risultati relativi all'esame biometrico dei vegetali delle diverse tesi hanno evidenziato la forte riduzione del rapporto tra area fogliare e lunghezza della radice primaria nelle tesi inquinate rispetto al testimone, soprattutto nel terreno sabbioso, con un effetto più marcato nel caso dell'inquinamento con formaldeide (Tab. 6).

Effetti sulla composizione delle acque di lisciviazione

Nelle acque di lisciviazione è stato riscontrato un aumento della concentrazione di bromuri nella tesi inquinata con Br, in entrambi i suoli, sia in presenza che in assenza del vegetale (Tab. 7).

L'inquinamento con formaldeide ha indotto una netta diminuzione della lisciviazione di quasi tutti gli anioni, facendo supporre un conseguente effetto di immobilizzazione di questi nel suolo, dal momento che, come osservato in precedenza, la concentrazione della maggior parte degli anioni ricercati diminuiva anche nei tessuti vegetali (Tab. 4).

Tab. 4 – Contenuto di anioni nei vegetali

	Fluoruri mg kg ⁻¹	cloruri mg kg ⁻¹	bromuri mg kg ⁻¹	nitrati mg kg ⁻¹	fosfati mg kg ⁻¹	solfati mg kg ⁻¹
argilloso testimone+vegetale	4,7 b	148,1 a	2,8 b	2,5	163,9 a	26,4 b
argilloso bromo+vegetale	25,8 a	205,2 a	45,3 a	0,0	189,9 a	48,6 a
argilloso isocianato+vegetale	27,9 a	174,0 a	1,7 b	0,8	176,9 a	22,6 b
argilloso formaldeide+vegetale	6,8 b	94,0 b	4,0 b	2,5	85,3 b	26,7 b
sabbioso testimone+vegetale	21,5	132,0	2,0 b	0,1	171,8 b	26,7
sabbioso bromo+vegetale	21,4	161,7	33,7 a	0,0	331,6 a	27,8
sabbioso isocianato+vegetale	16,3	112,9	3,4 b	2,2	227,2 b	17,6
sabbioso formaldeide+vegetale	16,1	100,1	1,8 b	0,0	206,0 b	20,0

Tab. 5 – Contenuto di elementi nutritivi e metalli pesanti nei vegetali (mg kg⁻¹)

Tesi	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Ni	Na	Pb	P	Zn
A test V	8087,5 a	0,27	11,00 a	3109,5	20795,0 a	2855,0	113,3 a	6,4 b	1230,5 a	10,0	2350,5	32,3
A Iso V	7855,0 a	0,27	9,25 b	2230,0	21422,5 a	2522,5	84,8 b	10,0 b	1212,3 a	13,8	2281,3	24,3
A Br V	6660,0 b	0,27	7,40 b	1496,0	23126,3 a	2506,8	59,5 b	8,5 b	1229,3 a	4,5	2255,8	22,5
A form V	8603,5 a	0,22	12,55 a	4097,0	11505,0 b	2484,3	138,8 a	84,4 a	961,0 b	7,0	2110,0	30,3
S test V	10622,8 a	0,21	12,0 b	944,3	15967,5	3496,5	84,8 b	8,8 b	3080,0 a	1,6	2796,5	37,0
S Iso V	10716,8 a	0,19	16,8 b	3977,8	15667,5	3235,0	87,8 b	5,5 b	1502,5 b	2,1	2496,0	37,8
S Br V	8207,5 b	0,25	14,3 b	751,0	19270,0	3477,5	71,0 b	2,1 b	1746,0 b	1,2	3655,0	51,0
S form V	12177,5 a	0,23	22,0 a	1407,8	15425,0	3345,0	113,3 a	21,8 a	1196,5 c	4,5	3680,0	45,8

Tab. 6 – Rapporto tra area fogliare e lunghezza della radice principale (LAI/RAD)

argilloso T V	1,48 a
argilloso Br V	1,03 b
argilloso form V	0,39 c
argilloso Iso V	1,19 b
sabbioso T V	1,67 a
sabbioso Br V	0,59 b
sabbioso form V	0,15 c
sabbioso Iso V	0,42 b

Lettere differenti attribuite alle diverse tesi, all'interno dello stesso parametro, indicano una differenza significativa con $p < 0,05$ (ANOVA).

Per quanto riguarda la concentrazione di elementi nutritivi lisciviati, si è osservato nella tesi inquinata con formaldeide un aumento tendenziale per il Na e il K (Tab. 8), a causa dello spostamento dal complesso di scambio di questi cationi, confermato anche dall'aumento di assimilazione di tali elementi da parte delle piante (Tab. 5), come osservato in precedenza. Nella stessi tesi si è rilevata la diminuzione del Ca lisciviato, ciò rafforzando l'ipotesi della più elevata capacità di adsorbimento di tale catione ai colloidali organo-minerali del suolo.

I metalli pesanti sono risultati pressoché assenti nelle acque di lisciviazione, in tutte le tesi (Tab. 8).

Test di Germinazione

I risultati dei test di germinazione hanno mostrato, dopo 96 ore, una netta riduzione del numero di semi vitali germinati con le acque liscivate raccolte nelle tesi inquinate rispetto a quelle prelevate nel testimone, esclusivamente su suolo sabbioso, con un effetto più marcato in assenza della copertura vegetale (Tab. 9).

Fitotossicità

Per quanto riguarda il PRL-test (Fig. 10) si evidenzia una significativa riduzione della lunghezza della radice primaria nei

Tab. 7 – Contenuto di anioni nelle acque di lisciviazione

Tesi	Fluoruri mg l ⁻¹	cloruri mg l ⁻¹	bromuri mg l ⁻¹	nitrati mg l ⁻¹	fosfati mg l ⁻¹	solfati mg l ⁻¹
A test	0	129,4 a	1,4 b	48,5 a	0	253,2 a
A Br	0	102,9 a	17,7 a	33,2 a	0,1	231,7 a
A Iso	0	96,1 a	1,6 b	34,4 a	0,2	250,0 a
A form	0	6,2 b	1,1 b	1,1 b	0,2	42,6 b
A test V	0	237,5 a	1,5 b	35,9 a	0,1	224,4 a
A Br V	0	256,1 a	25,0 a	2,8 b	0,4	223,4 a
A Iso V	0	267,6 a	1,4 b	14,7 a	0,9	244,2 a
A Form V	0	15,4 b	0,4 c	0,0 c	0,4	44,3 b
S test	0,0	148,5 a	1,9 b	16,8 a	2,3	334,8 a
S Br	0,0	143,8 a	52,8 a	27,7 a	2,6	309,4 a
S Iso	0,0	54,3 b	1,7 b	2,2 b	9,8	162,5 b
S form	0,0	2,5 c	1,4 b	0,0 c	5,1	24,1 c
S test V	0,0	277,9 a	2,0 b	0,7 a	1,4	367,2 a
S Br V	0,2	207,5 a	39,6 a	1,2 a	1,6	222,4 a
S Iso V	0,0	208,7 a	1,9 b	1,0 a	2,7	357,6 a
S form V	0,0	17,0 b	0,8 b	0,0 b	2,7	39,5 b

Lettere differenti attribuite alle diverse tesi, all'interno dello stesso parametro, indicano una differenza significativa con $p < 0,05$ (ANOVA).

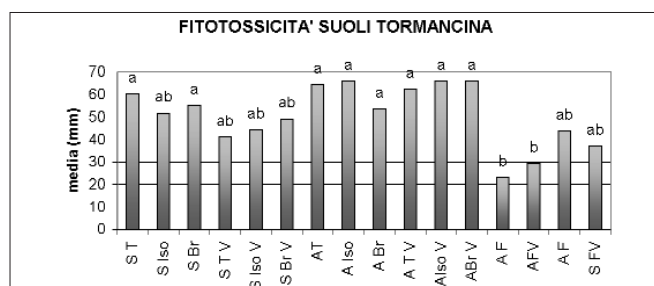


Fig. 10 – (Legenda: S: sabbioso, A: argilloso, Iso: fenilisocianato, Br: Bromo, F: Formaldeide, T: testimone, V: vegetale)

Tab. 8 – Contenuto di elementi nutritivi e metalli pesanti nelle acque di lisciviazione (mg l⁻¹)

Tesi	Ca	Cd	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	P	Pb	Zn
A T	149,9	0,0	0,2	0,0	34,2	22,6	0,0	16,9	0,0	0,1	0,0	0,3
A Br	136,7	0,0	0,0	0,0	43,2	19,1	0,0	17,9	0,0	0,0	0,0	0,1
A Iso	137,8	0,0	0,0	0,0	43,0	20,5	0,0	20,1	0,0	0,0	0,0	0,1
A Form	132,2	0,0	0,0	0,0	48,7	20,7	0,0	25,3	0,0	0,0	0,0	0,0
A T V	167,4	0,0	0,0	0,0	33,9	32,9	0,0	45,6	0,0	0,0	0,0	0,1
A Br V	174,6	0,0	0,0	0,0	33,1	35,9	0,0	46,2	0,0	0,0	0,0	0,0
A Iso V	205,7	0,0	0,1	0,0	33,2	38,5	0,0	47,2	0,0	0,0	0,0	0,1
A Form V	145,3	0,0	0,0	0,0	37,6	37,8	0,0	50,1	0,0	0,0	0,0	0,0
S T	162,7	0,0	0,0	0,0	45,3	43,8	0,0	45,1	0,0	0,5	0,0	0,1
S Br	170,5	0,0	0,0	0,0	60,5	42,9	0,0	54,4	0,0	0,6	0,0	0,1
S Iso	232,9	0,0	0,0	0,0	44,7	39,7	0,0	77,6	0,0	0,6	0,0	0,1
S Form	156,6	0,0	0,0	0,0	63,2	40,6	0,0	92,2	0,0	0,5	0,0	0,0
S T V	197,2	0,0	0,1	0,0	32,5	60,7	0,0	119,8	0,0	0,3	0,0	0,1
S Br V	216,6	0,0	0,1	0,0	31,8	50,3	0,0	119,9	0,0	0,3	0,0	0,2
S Iso V	172,5	0,0	0,1	0,0	42,1	45,0	0,0	130,2	0,0	0,5	0,0	0,1
S Form V	179,2	0,0	0,0	0,0	45,3	57,9	0,0	141,7	0,0	0,5	0,0	0,0

Tab. 9 – Risultati del test di germinazione dopo 24, 48 e 96 ore

	24h	48h	96h
argilloso T	15,0	80,0	81,7 a
argilloso Br	10,0	68,3	83,3 a
argilloso form.	18,3	66,7	76,7 a
argilloso Iso	18,3	70,0	80,0 a
argilloso T V	18,3	68,3	71,7 a
argilloso Br V	15,0	61,7	65,0 a
argilloso Form. V	20,0	71,7	73,3 a
argilloso Iso V	11,7	65,0	75,0 a
sabbioso T	23,3	60,0	86,7 a
sabbioso Br	20,0	51,7	70,0 c
sabbioso form.	30,0	61,7	75,0 b
sabbioso Iso	40,0	68,3	76,7 b
sabbioso T V	35,0	63,3	78,3 a
sabbioso Br V	21,7	55,0	71,7 b
sabbioso Form. V	31,7	53,3	68,3 b
sabbioso Iso V	21,7	55,0	70,0 b

Lettere differenti attribuite alle diverse tesi, all'interno dello stesso parametro, indicano una differenza significativa con $p < 0,05$ (ANOVA).

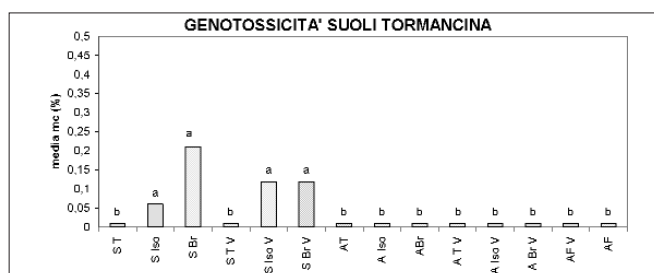


Fig. 11 – Test dei micronuclei sui suoli di Tormancina (Legenda: S: sabbioso, A: argilloso, Iso: fenilisocianato, Br: Bromo, F: Formaldeide, T: testimone, V: vegetale)

suoli argillosi (con e senza vegetale) inquinati con la formaldeide (AF e AFV).

L'MNC-test (Fig. 11) mette in luce un leggero incremento della frequenza delle cellule micronucleate, nei campioni di suolo sabbioso trattati con: fenilisocianato e bromo con e senza copertura vegetale.

Nella Figura 12 è riportato l'andamento della frequenza delle cellule micronucleate negli apici primari delle radici di *V.faba* cresciute a contatto con le acque di percolazione. Risultano indurre fenomeno di genotossicità le acque provenienti dalle vasche con suolo sabbioso inquinato con: fenilisocianato, bromo (con e senza vegetale) come pure le acque di lisciviazione dei suoli argillosi trattati con bromo.

Test della Cometa

L'analisi statistica, effettuata con il test ANOVA univariata, mostra risultati significativi, rispetto al controllo negativo, per

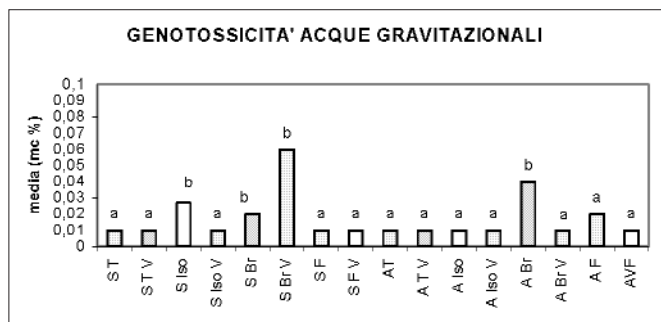


Fig. 12 – Test dei micronuclei su suoli inquinati con acque gravitazionali (Legenda: S: sabbioso, A: argilloso, Iso: fenilisocianato, Br: Bromo, X: Formaldeide, T: testimone, V: vegetale)

i campioni di suolo sia argillosi che sabbiosi, trattati con formaldeide (lettera b nel grafico, Fig. 13).

Esempi di nuclei danneggiati dei campioni argillosi trattati con formaldeide (Fig. 13a,b).

I risultati del test della Cometa sui suoli inquinati con bromo e fenilisocianato sono significativi in particolare per il suolo argilloso con copertura vegetale inquinato con fenilisocianato. (Fig. 14).

I risultati del Test della Cometa effettuato sulle acque di percolazione provenienti dai vasi trattati con formaldeide e fenilisocianato sono significativi per i suoli sabbiosi trattati con entrambe le sostanze, mentre per i suoli argillosi solo il campione con copertura vegetale inquinato con fenilisocianato risulta significativo (Fig. 15).

Per quanto riguarda i test effettuati sui suoli inerti inquinati con le acque di percolazione contenenti Bromo, sono stati ottenuti risultati significativi in particolare per il suolo argilloso come mostrato nelle Figure 16, 16a, 16b.

4. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti, in seguito al trattamento con le tre sostanze tossiche, mostrano come sia possibile ricavare valide indicazioni sul livello di contaminazione di un sito attraverso le analisi dei suoli, dei vegetali cresciuti su questi e delle acque di percolazione campionate in un sito inquinato.

In particolare, le variazioni della reazione del terreno, nel caso della formaldeide, e della CO₂ emessa dalla biomassa microbica, soprattutto nei suoli franco-argillosi, potrebbero essere impiegati come indicatori chimici e biologici di contaminazione dei suoli.

Anche il chimismo e l'analisi morfologica dei vegetali, con particolare riferimento al contenuto di azoto totale, di clorofilla, di alcuni anioni e cationi e al rapporto tra la superficie fogliare e la lunghezza della radice principale, possono essere convenientemente utilizzati per identificare le piante oggetto di contaminazione, una volta noti gli standard di concentrazione fogliare e biometrici di individui cresciuti in ambienti non inquinati (organismi testimoni). Da questo punto di vista, è disponibile una vasta bibliografia sulle piante coltivate, mentre gli studi concernenti le specie spontanee sono rari e limitati ad ambiti territoriali ristretti. Molte piante spontanee potreb-

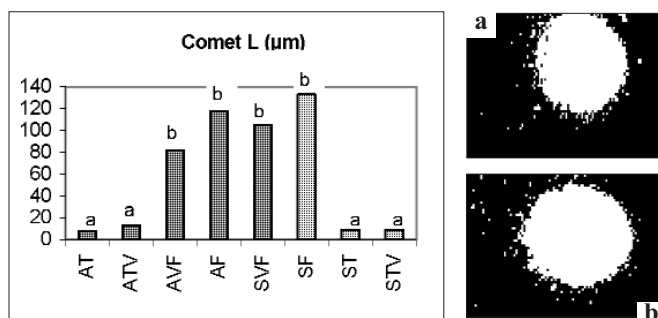


Fig. 13 – Test della Cometa sui suoli trattati con formaldeide (Legenda: S: sabbioso, A: argilloso, Iso: fenilisocianato, Br: Bromo, F: Formaldeide, T: testimone, V: vegetale)

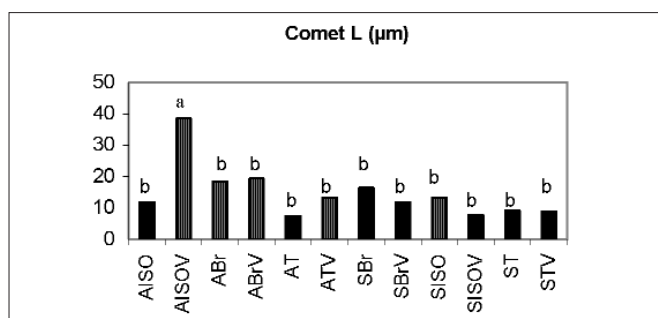


Fig. 14 – Test della Cometa sui suoli trattati con Bromo e Fenilisocianato (Legenda: S: sabbioso, A: argilloso, Iso: fenilisocianato, Br: Bromo, F: formaldeide, T: testimone, V: vegetale)

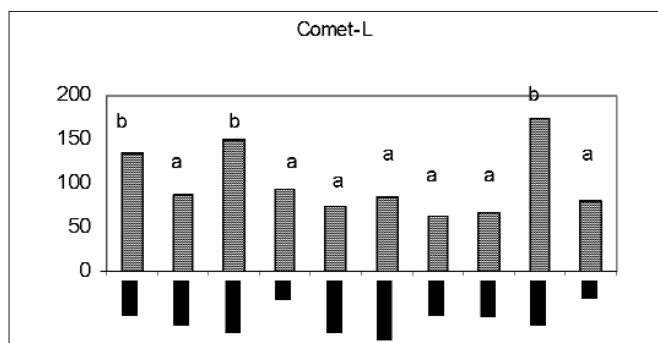


Fig. 15 – Test della Cometa effettuato sulle acque di percolazione (Legenda: S: sabbioso, A: argilloso, Iso: fenilisocianato, F: formaldeide, T: testimone, V: vegetale)

bero rappresentare in tal modo, degli efficienti indicatori di inquinamento per gli ambienti naturali abituali.

La composizione delle acque di percolazione prelevate nei siti inquinati può rappresentare un ulteriore indicatore dell'avvenuto incidente chimico, come dimostrato dalle variazioni osservate nella lisciviazione osservata soprattutto a carico degli elementi nutritivi per le piante e di alcuni anioni.

I test di germinazione effettuati con tali acque, infine, hanno mostrato la loro efficacia nei suoli sabbiosi, nei quali la minore

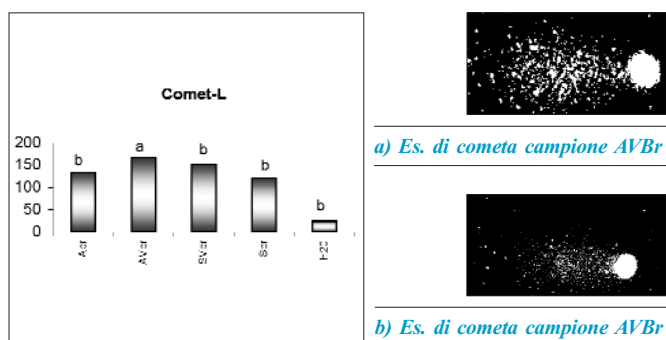


Fig. 16 – Test della Cometa effettuato sulle acque di percolazione contenenti Bromo (Legenda: S: sabbioso, A: argilloso, Iso: fenilisocianato, Br: Bromo, F: formaldeide, T: testimone, V: vegetale)

capacità di adsorbimento fa sì che la concentrazione di elementi lisciviati sia maggiore rispetto ai suoli franco-argillosi, amplificando gli effetti dovuti alla contaminazione con tutte le sostanze indagate nel corso della ricerca.

I test di mutagenesi considerati utilizzano bioindicatori vegetali; le piante si sono dimostrate organismi utili per rivelare la presenza di inquinanti ambientali genotossici, consentendo, accanto a più collaudate metodiche di tipo chimico-fisico e biologico, il controllo e lo screening in situ. I nostri studi dimostrano come il test della cometa sia sensibile, rapido ed economico per l'identificazione del danno al DNA, e può essere usato come biomarker di genotossicità per studi di biomonitoraggio. Questo test rileva il danno indotto anche da basse dosi di mutageno in ogni singola cellula permettendo un'analisi dell'effetto su una popolazione cellulare più estesa. Il test della Cometa sembra essere più sensibile del test dei micronuclei nel valutare il danno al DNA indotto da mutageni, anche se è importante valutare che gli effetti a carico del DNA sono rilevati dalle due metodiche a diversi endpoints genetici. Il test dei micronuclei infatti permette di evidenziare gli effetti mutageni di tipo clastogeno e di danneggiamento delle strutture deputate alla corretta segregazione di cromatidi fratelli in anafase, dovuti all'azione di agenti mutageni chimici o fisici. I micronuclei rappresentano l'immediata evoluzione del danno mutageno nella generazione successiva all'evento mutazionale e vengono eliminati nell'arco di poche generazioni. In conclusione, dal momento che il test dei Micronuclei identifica lesioni che sopravvivono almeno per un ciclo mitotico, mentre il test della cometa identifica lesioni riparabili del DNA, è necessario utilizzare entrambe le metodiche in modo da ottenere un miglior quadro interpretativo della situazione di specifici ambienti sottoposti a possibili fonti di inquinamento.

BIBLIOGRAFIA

- Angelis K.J., Dušinska M., Collins A.R.**, Single cell gel electrophoresis: Detection of DNA damage at different levels of sensitivity. *Electrophoresis* (1999), 20, pp. 2133-2138.
- Angelis K.J., McGouffie M., Menke M., Schubert I.**, Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the comet assay. *Envir. Mol. Mutagenesis*. (2000), 36: pp. 146-150.
- Bianco V.V., Pimpini F.**, Spinacio (*Spinacia oleracea L.*), *Orticoltura* (1991), pp. 270-355.
- De Marco A., Boccardi P., De Simone C., Piccolo A., Raglione M., Testa A., Trinca S.**, Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated in different soils with the herbicide alachlor. *Mutation Res.* (1990), 241: pp. 1-6.
- De Simone C., Piccolo A., De Marco A.**, Genotoxic effect induced by erbicides atrazine glyphosate in plants of *Vicia faba* grown in different soil. *The Sci. of the Total Environ.* (1992), 233: pp. 123-124.
- De Simone C., Tomati U., Galli E., Owczarek M., De Marco A., D'Ambrosio C., Alianello F., Cortellini L.**, Evaluation of genotoxic activity of eleven composts from different origin. *Fresenius Environ. Bull.* (1999), 9: pp. 683-690.
- Koppen G., Verschaevae L.**, The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutation Res.* (1996), 360: pp. 193-200.
- Menke M., Angelis K.J., Schubert I.**, Detection of Specific DNA Lesions by a Combination of Comet Assay and FISH in Plants, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, (2000), 35: pp. 132-138.
- Manahan S.E.**, *Environmental Chemistry*, Lewis Publishers, (1994) pp. 258.
- VV.AA.**, *Metodi Ufficiali di Analisi Chimica del Suolo*, Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali (1994).
- VV.AA.**, *Determination of total organic carbon (TOC) in sludge*, Europ standard cen. (1999).
- Kalra Y.P.**, *Determination of cadmium, chromium, cobalt, lead and nickel in plant tissue*, Reference Methods for Plant Analysis, (1998), pp. 193-197.
- Kalra Y.P.**, *Determination of total nitrogen in plant tissue*, Reference Methods for Plant Analysis, (1998), pp. 75-81.

CURRICULA

Elena Sturchio – Laureata in Scienze Biologiche presso l'Università di Roma "La Sapienza" il 10/04/1990 con la votazione di 106/110. Specializzazione: in Patologia Clinica conseguita presso l'Università di Roma "La Sapienza" con la votazione di 70/70 e lode. Ricercatore presso l'Istituto Superiore per la Prevenzione E la Sicurezza del Lavoro (ISPESL), IV Unità Funzionale (Attività Speciali e Biotecnologie) del Dipartimento Insediamenti Produttivi ed Interazione con l'Ambiente (DIPIA). Responsabile Scientifico del Progetto finalizzato 2001 – Finanziamento 1% Ministero della Sanità dal titolo: "Rilascio in atmosfera di sostanze tossiche: previsione, prevenzione e protezione della salute umana". Attualmente è membro della Commissione Interministeriale di Valutazione per le Biotecnologie: applicazione dei decreti legislativi 206/2001 (in materia di uso confinato di microrganismi geneticamente modificati) e 224/2003 (per il rilascio deliberato di organismi geneticamente modificati).

Priscilla Boccia – Laureata in Scienze Biologiche, indirizzo bio-ecologico, presso l'Università di Roma "La Sapienza" il 23/04/01, con votazione 100/110 con una tesi in Biologia marina, ha sostenuto l'esame di stato per l'abilitazione alla professione il 27/11/01. Il 23/02/06 termina il "Master in Applicazioni e Controlli Biotecnologici" presso l'Università "La Sapienza" di Roma. Attività di ricerca e collaborazioni: Dipartimento di Biologia e Animale dell'Uomo dell'Università di Roma "La Sapienza" – Dipartimento di Zoologia; Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo (Rieti); l'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL/DIPIA-Roma). Frutto di tali collaborazioni sono le pubblicazioni e le diverse partecipazioni a congressi.

Laura Casorri – Laureata in Scienze biologiche il 21/04/1994 presso l'Università degli Studi di Roma "La Sapienza" con la votazione di 110/110 e lode, con tesi sperimentale in patologia vegetale svolta presso l'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale di Roma, ed abilitata alla professione di biologo presso la suddetta università. Corso di perfeziona-

mento in "Tecniche" presso l'Università degli Studi di Roma "La Sapienza". Attività di ricerca svolta presso i seguenti enti o istituti: collaborazione con Opera Research S.r.l. di Genova; borsista e poi contrattista presso l'ISPESL di Roma; borsista presso il C.R. ENEA Casaccia di S. Maria di Galeria (Roma); borsista e collaboratrice presso l'Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale (ISPaVe) di Roma. Insegnamento saltuario presso scuole medie statali inferiori e superiori di Roma.

Barbara Ficociello – Si laurea in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi "La Sapienza" (110/110 Lode) con tesi sperimentale: "Presenza di molecole di membrana cellulare sul virus HIV-1 come espressione del tropismo cellulare". Consegue l'abilitazione all'esercizio della professione di biologo (125/150esimi) e dal Settembre 1996 è iscritta all'albo professionale dei biologi. Consegue il Diploma di Specializzazione in Microbiologia e Virologia presso l'Università degli Studi "La Sapienza" (70/70 Lode). Attività scientifica: Consegue borsa di ricerca dall'Istituto Pasteur Fondazione Cenci-Bolognetti fruita presso l'Istituto di Virologia della Facoltà di Medicina Università degli Studi "La Sapienza", per attività di ricerca virologica (direzione: Prof. F. Dianzani); consegue borsa di studio per la lotta all'AIDS assegnata dall'Istituto Superiore di Sanità per il progetto di ricerca: "Interazioni di membrana coinvolte nei meccanismi di induzione di Interferon da parte di HIV"; Svolge attività di ricerca e diagnostica presso il laboratorio di Virologia dell'I.R.C.C.S. L. Spallanzani con borsa di studio; Frequenta il laboratorio di Patologia Clinica dell'Ospedale "San G. Calibita" Fatebenefratelli; consegue borsa di studio presso l'I.R.C.C.S. Ospedale Bambin Gesù, laboratorio di Microbiologia e Virologia diretto dal Dott. D. Menichella; consegue borsa di studio presso il DIPIA dell'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro (ISPESL); consegue incarico di ricerca presso il DIPIA dell'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro (ISPESL).

Miriam Zanellato – Laureata in Tecniche di Laboratorio Biomedico, presso l'Università di Roma "La Sapienza", il 27/04/04, con votazione 110/110 e lode con una tesi in Biologia Molecolare, tutt'ora frequenta il corso di laurea in Biotecnologie Mediche presso l'università degli studi di Roma "Tor Vergata". Attività di ricerca e collaborazioni: Durante il tirocinio previsto dal corso di laurea, ha collaborato con il Prof. Mario Pezzella presso i laboratori di Biologia Molecolare del Dipartimento di Malattie Infettive e Tropicali del Policlinico Umberto I di Roma ed ha collaborato allo svolgimento di alcuni progetti I.S.P.E.S.L., svolti presso tali laboratori. Nel maggio 2005 è vincitrice di una borsa di studio erogata dall'I.N.B.B. (Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi) per una collaborazione con l'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro I.S.P.E.S.L. Nel Giugno 2004 è vincitrice di una borsa di studio dell'Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL). Frutto di tali collaborazioni sono le pubblicazioni e le diverse partecipazioni a congressi.

Claudio Beni – Laureato in Scienze Agrarie presso l'Università degli Studi della Tuscia nel 1987, specializzato in "Economia del sistema agroalimentare" presso la CCIAA di Viterbo nel 1988, successivamente è stato consulente del Dipartimento di Scienze Economiche ed Estimative della Facoltà di Agraria dell'Università di Viterbo nel corso del 1989 e responsabile dell'Osservatorio Economico dell'Unione Nazionale delle Associazioni di Produttori Ortofrutticoli e Agrumari (UNAPOA), fino al giugno 1990. Divenuto ricercatore nei ruoli del Ministero dell'Agricoltura, ha prestato servizio dapprima nell'Istituto Sperimentale per la Meccanizzazione Agricola fino al marzo 1998 ed è stato in seguito trasferito all'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante, dove si trova attualmente. Confluito attualmente nei ruoli del Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura (CRA), conduce ricerche volte alla conservazione della fertilità fisico-chimica dei suoli agrari e alla definizione di indici di contaminazione relativi ai comparti ambientali suolo e acqua e agli organismi vegetali.

Rita Aromolo – Si è laureata in Scienze Biologiche presso l'Università La Sapienza di Roma e si è specializzata presso la stessa Università in Patologia Generale. Ha lavorato presso l'Istituto sperimentale Lattiero-Caseario di Lodi come tecnologo di III livello. Ha collaborato per tre anni con l'Istituto Nazionale della Nutrizione per un progetto finalizzato CEE. Lavora presso l'Istituto sperimentale Nutrizione delle Piante di Roma dove collabora con la sezione di Nutrizione minerale, effettuando ricerche sui metalli pesanti e su parametri chimico-fisici per valutare l'impatto ambientale; ha un'esperienza sull'uso agricolo di fanghi di depurazione e compost e sul monitoraggio di alcuni parametri del suolo e delle colture, quali dinamica degli elementi inde-

siderati, modificazioni delle caratteristiche chimico-fisiche dei suoli e dello stato nutrizionale del sistema suolo-pianta per lo studio dell'uso del suolo. Dal 1996 collabora al Progetto di Monitoraggio ambientale della Tenuta Presidenziale di Castelporziano. Collabora a diversi progetti di ricerca sia come responsabile di schede di ricerca nell'ambito dell'attività ordinaria dell'Istituto, sia partecipando a progetti di attività straordinaria sulla valorizzazione agricola di biomasse di rifiuto, sugli effetti di alcuni parametri chimici e fisici sulla fertilità del suolo e sulla dinamica degli elementi indesiderati.

Simona Marconi – Laureata in Scienze Naturali presso l'Università degli Studi La Sapienza di Roma nel 2002. È stata intestataria dell'assegno di ricerca (convenzione ISPESL) dal titolo: "Test di mutagenesi in sistemi vegetali problematiche inerenti all'inquinamento del suolo da parte di idrocarburi aromatici e metalli pesanti" presso l'Istituto per lo Studio e la Difesa del Suolo di Rieti. Successivamente ha avuto un rapporto di collaborazione nell'ambito del programma di ricerca progetto finalizzato Parsifal: "Procedure avanzate di recupero sostenibile per l'impiego fertilizzante e di analisi di laboratorio" sempre nello stesso Istituto. Specializzata in studi di fitotossicità e genotossicità di compost o biomasse provenienti da scarti agro-industriali, è in grado di applicare: i test del PRL (primary root length), dei micronuclei e delle anafasi irregolari su *Allium cepa* e *Vicia faba*., prove sperimentali sull'attività antimutagenica indotta da acidi umici estratti e purificati da compost.; test di tossicità su suoli inquinati da contaminanti di origine organica ed inorganica (metalli pesanti, erbicidi, Idrocarburi Policiclici Aromatici...) e prove sull'attività antimutagenicità dovuta all'impiego agronomico di biomasse di diversa origine. Attualmente ha un rapporto di collaborazione nell'ambito della ricerca "Indagini sulle relazioni esistenti tra i parametri di fertilità chimico-fisica dei suoli e le fitoplasmosi del pero e dell'albicocco" afferente al progetto finalizzato Frutticoltura meridionale (FR.U.MED.) presso il CRA – Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante.e conduce principalmente analisi fisiologiche ed analitiche sui suoli.

Paolo Ferrazza – Laureato nel 1984 in scienze biologiche, indirizzo biochimico fisiologico, con tesi sperimentale in biologia evolutivistica presso il dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo. Dedicato alla ricerca di base in Biologia Molecolare sia in campo umano che ambientale presso vari laboratori pubblici e privati. Consulente, cultore della materia, ricercatore in vari istituti come: Centro Acidi Nucleici – Università "La Sapienza" Roma; Dipartimento di Biologia Evolutivistica – Università "La Sapienza" Roma; Istituto di Zoologia – Università "La Sapienza" Roma; Biologia Generale – Facoltà di Medicina Università "La Sapienza" Roma; Ematologia e Oncologia – Istituto Superiore di Sanità Roma; Dipartimento Biotecnologie – Menarini ricerche sud Roma; Whistar Institute – Philadelphia; Malattie Infettive – Facoltà di Medicina Università "La Sapienza" Roma; Istituto Sperimentale Nutrizione Piante Roma; Agenzia di Ricerca Opera Research Dipartimento ricerca e sviluppo Genova-Roma.

Valeria Leto – Laureata in Scienze biologiche indirizzo biologico-ecologico presso l'Università di Roma "La Sapienza" con una tesi di laurea sperimentale svolta presso il "Bioparco Giardino zoologico di Roma" dal titolo: Effetti dell'arricchimento ambientale in elefanti asiatici (*Elaphas maximus*) in cattività. Collabora con il Museo Civico di Zoologia di Roma come guida didattica. Titolare di una borsa di studio della Fondazione Biomedica Europea nel campo della ricerca clinica nell'anno 2004, confermata per meriti nel 2005. Attualmente impiegata in un laboratorio presso agenzia di ricerca Opera Research S.r.l. dipartimento ricerca e sviluppo e frequenta un tirocinio pratico nel reparto di Diagnostica del Policlinico militare del Celio di Roma.

Pamela Ciampolillo – Laureata in Scienze biologiche indirizzo biotecnologico presso l'Università di Roma "La Sapienza" con una tesi di laurea sperimentale svolta presso il Dipartimento di Genetica e Biologia molecolare. Nel 2003 titolare di una borsa di studio di ricerca nel laboratorio di Biofisica, presso il Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologia (Università "La Sapienza" di Roma). Dal 2003 al 2005 svolta attività di traduzione di brevetti internazionali tecnici (biologia, chimica e medicina) dall'inglese all'italiano e dall'italiano all'inglese. Dal 2005 collaborazione con l'agenzia di ricerca Opera Research S.r.l., dipartimento ricerca e sviluppo, con l'incarico di monitoraggio e coordinamento dei Centri sperimentali dell'Italia Centrale e Meridionale nell'ambito dei progetti in campo neurologico.