

“OPERAZIONE POSEIDONE”

**VALUTAZIONE DELLE ESIGENZE DI RIMOZIONE DI RESIDUATI DAI FONDALI
MARINI PROSPICIENTI LE AREE ADDESTRATIVE DI CAPO TEULADA (CA) E
TORRE VENERI (LE)**

RELAZIONE CONCLUSIVA SUGLI STUDI REALIZZATI



ROMA, DICEMBRE 2019

Questa “Relazione conclusiva sugli studi realizzati” per il progetto “Valutazione delle esigenze di rimozione di residui dai fondali marini prospicienti le aree addestrative di Capo Teulada (CA) e Torre Veneri (LE)”, prima convenzione attuativa dell’“Accordo quadro in materia di tutela ambientale” stipulato tra ISPRA e Stato Maggiore dell’Esercito il 3 marzo 2016, è stata elaborata nell’ambito dell’Area emergenze ambientali in mare del Centro Nazionale per le crisi e le emergenze ambientali e il danno, diretto dall’Avv. Diana Aponte.

Avviato nel febbraio 2017, il progetto si è arricchito di competenze con la firma, nel maggio dello stesso anno, dell’Accordo tra Stato Maggiore dell’Esercito Italiano (EI), Stato Maggiore della Marina Militare (MM) e ISPRA per l’esecuzione delle attività progettuali e degli accordi stipulati nel luglio 2018 con le Agenzie regionali per la protezione dell’ambiente delle Regioni Sardegna e Puglia, componenti del Sistema nazionale a rete per la protezione dell’ambiente.

Autori:

Ezio Amato, Claudio Numa e Paola Renzi

Elaborazioni cartografiche: Raffaele Proietti e Andrea Salmeri, Centro Nazionale per la caratterizzazione ambientale e la protezione della fascia costiera e l’oceanografia operativa (ISPRA CN-COS).

Informazioni legali:

L’istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), insieme alle 21 Agenzie Regionali (ARPA) e Provinciali (APPA) per la protezione dell’ambiente, a partire dal 14 gennaio 2017 fa parte del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell’Ambiente (SNPA), istituito con la Legge 28 giugno 2016, n.132. Le persone che agiscono per conto dell’Istituto non sono responsabili per l’uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questa relazione.

ISPRA – Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale. Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma www.isprambiente.gov.it

In copertina: un esempio d’interazione tra *biota* e manufatti; una murena (*Muraena helena* L.) ha trovato rifugio in un residuo.

Dove non diversamente indicato, foto di Ezio Amato.

INDICE DEGLI ARGOMENTI TRATTATI

1	Introduzione	1
1.1	Premessa	1
1.2	Scopo del lavoro	1
1.3	Obiettivi	4
1.4	Fasi e tempi di lavoro	4
1.5	Personale	5
2	Siti di studio	7
3	Attività svolte	9
4	Risultati analisi geofisiche	18
4.1	Repertorio su munizionamento e potenziali inquinanti.....	21
4.2	Pianificazione dei campionamenti.....	24
4.3	Campagne in mare.....	27
4.3.1	Poligono di Capo Teulada	31
4.3.2	Poligono di Torre Veneri.....	35
4.4	Attività in laboratorio.....	38
5	Risultati delle analisi	38
5.1	Poligono di Capo Teulada.....	38
5.1.1	Indagini granulometriche e T.O.C	38
5.1.2	Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti (Microtox®).....	39
5.1.3	Bioassay su tessuti ittici di esemplari di <i>Conger conger</i> L. 1758 e <i>Muraena helena</i> L. 1758	40
5.1.4	Bioassay su esemplari di riccio di mare della specie <i>Paracentrotus lividus</i> (Lamark, 1816).....	41
5.1.5	Spettrometria gamma di campioni di sedimenti (indagini radiometriche)	44
5.2	Poligono di Torre Veneri	46
6	Valutazione delle esigenze di rimozione.....	47
6.1	Esigenze di rimozione di residuati dai fondali del poligono di Capo Teulada	50
6.2	Esigenze di rimozione dai fondali del poligono di Torre Veneri	52
7	Letteratura consultata	53

Allegati:

- 1 Laboratori del Dipartimento Provinciale di Cagliari ARPAS
- 2 Laboratorio di analisi di Biomarker del CN-LAB ISPRA
- 3 Sezione sperimentale di Livorno per la valutazione del rischio ecologico in aree marino-costiere del CN-COS ISPRA e Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche
- 4 Laboratorio di misure radiometriche ISIN

1 Introduzione

1.1 Premessa

Il progetto “Valutazione delle esigenze di rimozione di residuati dai fondali marini prospicienti le aree addestrative di Capo Teulada (CA) e Torre Veneri (LE)” è l’oggetto della prima convenzione attuativa dell’“Accordo quadro in materia di tutela ambientale” stipulato tra l’Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e lo Stato Maggiore dell’Esercito Italiano (SME) il 3 marzo 2016.

Avviato nel febbraio 2017, il progetto si è arricchito di competenze con la firma, nel maggio 2017, dell’Accordo tra Stato Maggiore dell’Esercito Italiano (EI), Stato Maggiore della Marina Militare (MM) e ISPRA per l’esecuzione delle attività progettuali. Questo Accordo ha previsto, tra l’altro, che le attività in programma si dovessero realizzare con il supporto di imbarcazioni idrografiche e particolari attrezzature quali *Autonomous Underwater Vehicle* (A.U.V.), con il concorso delle risorse messe a disposizione delle parti, senza altri oneri che il ristoro delle spese sostenute.

La formulazione del programma di studi qui illustrato, si è giovata di quanto osservato nel corso di una visita dei luoghi effettuata nel giugno del 2015 per la Procura della Repubblica di Cagliari con l’ausilio di Servizio Navale e Nucleo Sommozzatori dell’Arma dei Carabinieri.

1.2 Scopo del lavoro

In zone costiere prospicienti poligoni, i fondali sono spesso ingombri di residuati di origine militare che includono, a volte, ordigni inesplosi benché le attività addestrative “a fuoco” effettuate nel territorio italiano, non contemplino bersagli posti nelle acque marine costiere. Le ragioni di questa constatazione ci sono state fornite con lo studio effettuato: errori, malfunzionamenti e rimbalzi contro ostacoli naturali, ripetuti nell’arco di decenni durante le esercitazioni delle Forze Armate (FF.AA.), hanno aggiunto altri manufatti di origine militare alle migliaia di tonnellate disperse durante atti di guerra o affondate volontariamente sui fondali di tutto il pianeta (Beck *et al.*, 2018).

Gli studi sinora affrontati in Italia a proposito dell’inquinamento marino causato da residuati di origine militare (Alcaro *et al.*, 2014, 2012; Amato *et al.*, 2003, 2005, 2008 e 2001a;b; Corsi *et al.*, 2004 e 2006; Della Torre *et al.*, 2013, 2010, 2008 e 2006; Farchi *et al.*, 2003; Focardi *et al.*, 2000; Pinsino *et al.*, 2008) hanno riguardato ordigni

volontariamente rilasciati in mare (pratiche di *dumping* e *jettisoning*) sia a caricamento convenzionale che “speciale”. Nel caso di questi ultimi, per alcune tipologie di caricamento chimico in “contenitori” spessi pochi millimetri, si è potuto accertare come i fenomeni di corrosione abbiano già determinato l'esposizione agli ecosistemi bentonici marini di composti nocivi persistenti e pertanto molte munizioni a caricamento “speciale” possono essere considerate, a tutti gli effetti, “sorgenti sommerse d'inquinamento”. Considerata la pericolosità di questi residuati e i molti casi in cui operatori della pesca si sono feriti al salpamento delle reti, un apposito manuale (Amato *et al.*, 2001b) illustra alle marinerie, in particolare adriatiche, come comportarsi in queste circostanze.

Per quanto riguarda gli ordigni a caricamento “convenzionale”, alcuni degli studi sopra citati hanno riguardato munizionamento da aereo non predisposto per esplodere e fortemente danneggiato dall'impatto con il fondale marino una volta rilasciato dalla quota di volo. Queste bombe d'aereo si sono rinvenute per lo più prive del materiale esplodente (2,4,6-trinitrotoluene) che evidentemente, nel tempo, si è disperso in mare. Si è potuto riscontrare questo fenomeno d'inquinamento marino con lo studio multidisciplinare di esemplari di una specie ittica stanziale per gran parte della sua vita, il grongo *Conger conger* Linnaeus 1758 e di un riccio di mare, il *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Considerato lo stato dei residuati rinvenuti sul fondale con l'esplosivo già esposto a prescindere da fenomeni corrosivi causati dalla sommersione, le analisi hanno mostrato evidenze di effetti ragionevolmente attribuibili alle molecole nocive rilasciate dagli ordigni di tipo convenzionale dispersi sui fondali della piccola isola intorno alla quale sono stati pescati (Amato *et al.*, 2003; Corsi *et al.*, 2004; Pinsino *et al.*, 2008).

Nel caso di tratti di mare interessati dall'essere prospicienti aree addestrative, prima di affrontare gli studi qui descritti, era stato possibile indagare fondali interessati dalla cospicua presenza di residuati di origine militare non esplodenti, in sostanza rottami metallici, derivanti dalla ricaduta in mare di parti di missile e congegni a razzo. La rimozione dai fondali di questi rottami, ritenuta indispensabile perché d'impedimento ad altri usi legittimi del mare, si è compiuta seguendo le cautele ambientali descritte in apposite linee guida (Alcaro *et al.*, 2014) dove si propongono raccomandazioni e chiavi dicotomiche volte a minimizzare l'inevitabile disturbo al *biota* causato da un cantiere in mare. Nello specifico, la rimozione di questi residuati di attività addestrative avrebbe potuto causare danno a specie protette come *Posidonia oceanica* (L.) Delile, 1813 e infatti, tra le cautele raccomandate con le citate linee guida, s'illustra la necessità di verificare, prima di operare, che la rimozione di un

manufatto non danneggi i rizomi della pianta marina o distrugga popolamenti bentonici.

L'esigenza, manifestata dallo Stato Maggiore dell'Esercito (SME), di affrontare gli aspetti di tutela degli ambienti marini connessi alla presenza di detti residuati di origine militare, ha quindi offerto alla ricerca applicata l'opportunità di contribuire a colmare le conoscenze in materia di conseguenze ambientali della loro dispersione in ambienti marini costieri. Poiché gli ordigni rinvenibili integri sui fondali sono lì perché andati fuori bersaglio, ci si può attendere che quelli predisposti per esplodere giacciono inesplosi sul fondale e contengano ancora tutto il materiale potenzialmente inquinante, in particolare esplosivi e inneschi (TNT, RDX, mercurio, ecc.), che soprattutto i fenomeni corrosivi possono esporre all'ambiente acquatico. Si tratta quindi di uno scenario non incontrato con gli studi precedenti in cui i potenziali inquinanti contenuti in ordigni di varia natura, effettivamente inquinano perché già esposti all'ambiente. Infatti, nei due casi prospettati dallo SME, Capo Teulada (CA) e Torre Veneri (LE), con il programma di studi "Operazione Poseidone" si è potuto indagare, per la prima volta nelle acque marine costiere italiane, il potenziale inquinamento attribuibile al rilascio di molecole persistenti e nocive da residuati in via di corrosione e allo stesso tempo, contribuire a offrire le basi tecnico-scientifiche per assumere decisioni (foto 1).



Foto 1: bomba d'aereo a 10 m di profondità in prossimità di Cala Piombo a Capo Teulada (l'asta graduata è lunga 60 cm. Foto del 9° Reggimento "Col Moschin", Base Addestramento Incursori)

1.3 Obiettivi

Le aree di fondale che il progetto si è proposto di controllare sono interessate dalla presenza di residuati di origine militare costituiti da rottami e ordigni, tra questi alcuni esplosivi ma inesplosi. Il progetto, denominato “Operazione Poseidone”, studiando con metodologie multidisciplinari consolidate l’impatto dei potenziali inquinanti persistenti che questi residuati possono rilasciare negli ambienti marini prospicienti i due poligoni, si è prefisso i seguenti obiettivi:

- accertare la possibile nocività ambientale del materiale di origine militare accidentalmente disperso nei tratti di fondale prospicienti le aree addestrative;
- formulare una valutazione delle necessità di misure di contenimento degli eventuali impatti, inclusa la rimozione.

Il modello concettuale (figura 1) ha previsto l’acquisizione e l’elaborazione di informazioni, dati e misure inerenti ai materiali di cui sono costituiti i residuati potenzialmente presenti sui fondali interessati, alla loro effettiva distribuzione sul fondale, alle caratteristiche biologiche ed edafiche dei tratti di mare interessati, al destino ambientale dei contaminanti potenzialmente rilasciati dai residuati.

1.4 Fasi e tempi di lavoro

Il progetto è stato suddiviso in tre fasi principali che si sono sviluppate nell’arco di circa tre anni, tra febbraio 2017 e dicembre 2019:

- I. indagini sui residuati e localizzazione bersagli (2017): con la finalità di localizzare e caratterizzare le possibili sorgenti inquinanti presenti nell’area di studio. Sono state studiate le caratteristiche del munizionamento suscettibile di costituire una sorgente sommersa d’inquinanti nelle due aree d’addestramento e i rilievi elettroacustici necessari per localizzare i *target* da investigare con l’ausilio di operatori subacquei sono stati eseguiti impiegando specifici sensori operati da mezzi navali, ecoscandagli multifascio, *Remotely Operated Vehicle* (ROV) e *Autonomous Underwater Vehicle* (AUV).
- II. Indagini su matrici ambientali marine (2018): sono stati definiti i disegni di campionamento e i protocolli analitici ed effettuate campagne di prelievo di campioni per analisi e per *bioassay*.
- III. Analisi dei risultati ed elaborazione della relazione finale (2019): ottenuti e interpretati i risultati analitici, sulla base di questi e di considerazioni sito-

specifiche, è possibile indicare le esigenze di rimozione dai fondali interessati. Nella figura che segue è riportato il modello concettuale sopra descritto.



Figura 1: modello concettuale dello sviluppo del progetto

1.5 Personale

Al programma di studi hanno partecipato i seguenti tecnici e ricercatori ISPRA del Centro Nazionale per le crisi e le emergenze ambientali e il danno (CN-CRE):

Ezio Amato	R.S. del progetto	Andeka De La Fuente Origlia	CT di ricerca
Claudio Numa	R. della Convenzione	Pierpaolo Giordano	CT di ricerca
Luigi Alcaro	Ricercatore	Michela Mannozi	Ricercatore
Giampiero Baccaro	Tecnologo	Paola Renzi	Ricercatore
Simona Calà	Tecnologo	Valerio Sammarini	Ricercatore
Stefano Di Muccio	Ricercatore	Angela Sarni	CT di ricerca



Foto 2: un batiscopio (anche detto “specchio”) usato per ispezionare i bassi fondali

Le diverse pianificazioni delle attività di prelievo, conservazione e analisi dei campioni (Amato, 2019; AA.VV., 2018; Mannozi *et al.*, 2017) sono state concordate con ricercatori e tecnici dei laboratori ISPRA coinvolti che afferiscono al Centro nazionale per la rete nazionale dei laboratori (CN-LAB, Area Ecotossicologia, Laboratorio di ecotossicologia marina e microbiologia e Laboratorio di analisi di Biomarker) e al Centro Nazionale per la caratterizzazione ambientale e la protezione della fascia costiera, la climatologia marina e l’oceanografia operativa (CN-COS, Sezione sperimentale di Livorno per la valutazione del rischio ecologico in aree marino costiere) dell’ISPRA (Allegati 2 e 3).

Grazie agli accordi stipulati con le Agenzie regionali per la protezione dell’ambiente delle Regioni Sardegna e Puglia (rispettivamente, ARPAS e ARPPA), componenti del Sistema nazionale a rete per la protezione dell’ambiente (SNPA), si sono concordate con il personale tecnico e direttivo di queste anche le attività di prelievo, conservazione e analisi dei campioni di sedimento per granulometria, T.O.C. e biotest (Allegato 1). Relativamente alle misure radiometriche, le modalità di prelievo e conservazione dei campioni sono state concordate con il personale dell’Ispettorato nazionale per la sicurezza nucleare e la radioprotezione (ISIN) che ha successivamente effettuato dette analisi (Allegato 4). Ricercatori dell’Università Politecnica delle Marche, Dipartimento di Scienze della Vita e dell’Ambiente, hanno contribuito al perseguimento degli obiettivi del programma di studi realizzando, presso i loro laboratori, alcune analisi ecotossicologiche per valutare la possibile insorgenza di danno al DNA attraverso la determinazione della frequenza dei micronuclei (Allegato 3).

L’esecuzione delle campagne di prospezione, rilievi, misure e campionamenti è stata condotta con la presenza e la direzione di personale del CN-CRE e del CN-COS dell’ISPRA (foto 2) e si è giovata dell’indispensabile collaborazione di personale dell’Esercito (Stato Maggiore, 9° Reggimento d’assalto paracadutisti "Col Moschin",

1° Reggimento Corazzato, Scuola di Cavalleria, Centro Tecnico Logistico Interforze NBC, Centro di Eccellenza *Counter* IED del Comando Genio, Servizio Navale e Nucleo Sommozzatori dell'Arma dei Carabinieri) e della Marina Militare (Stato Maggiore, Istituto Idrografico, Comando delle Forze di Contromisure Mine) (foto 3). Le FF.AA. citate hanno poi curato la logistica e messo a disposizione mezzi e strumenti per le campagne di rilievo, misure e prelievo di campioni. Per operare nelle acque del poligono di Torre Veneri (LE), grazie al supporto che offre in via convenzionale con l'ARPPA Puglia, ci si è inoltre potuti avvalere del supporto logistico e operativo del personale e dei mezzi del Reparto Operativo Aeronavale del Comando Regionale Puglia della Guardia di Finanza.



Foto 3: l'idrobarca dell'Istituto Idrografico della Marina Militare "MBF-1213" mentre scandaglia i fondali prossimi a Capo Teulada

2 Siti di studio

Esaminate le linee di tiro delle diverse armi insieme alle cartografie nautiche con le aree marine interdette al transito e alla navigazione durante esercitazioni "a fuoco", considerato che a Capo Teulada è possibile che il dilavamento, per opera degli agenti meteorologici, trasporti dal terreno al mare rottami e materiale inesplosivo (foto 4 ÷ 7), si sono considerati i tratti di mare così individuati e dove è apparsa maggiore la probabilità di rinvenire residui.



Foto 4, 5, 6 e 7. Tratti della costa del poligono di Capo Teulada. Il declivio favorisce il dilavamento meteorico di residuati, dal terreno verso il mare

Tenuto conto delle limitazioni di profondità (-39 m) e tempi d'immersione legate all'operatività dei sommozzatori, si è stabilito di indagare i fondali costieri individuati con l'analisi effettuata considerando l'estensione delle aree di sgombrò, il munizionamento impiegato di cui si è avuta notizia e le modalità di tiro nei poligoni di Torre Veneri (LE) e Capo Teulada (CA), come rappresentato in figura 2.

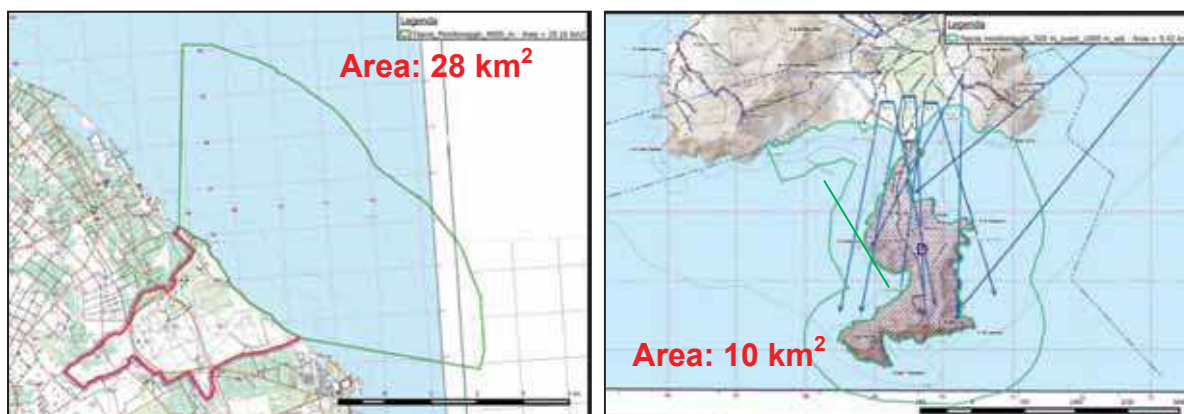


Figura 2: le linee verdi delimitano i fondali marini d'interesse di Torre Veneri (a sinistra) e Capo Teulada (a destra)

La superficie di mare coperta dalle aree così individuate è, rispettivamente, circa pari a 28 e 10 km² e comprende batimetrie che arrivano a superare i 60 m (figura 3). I

rilievi effettuati nel corso del 2017 mediante sonar a scansione laterale hanno riguardato esclusivamente fondali non più profondi di circa 40 m, considerando questa batimetrica sia nel caso di Capo Teulada sia in quello di Torre Veneri, corrispondere a una distanza dalle aree “bersaglio” ubicate sulla costa adeguata a rappresentare tutte le tipologie di residuati rinvenibili; inoltre, quello di circa -40 m è il limite di profondità oltre il quale le indagini avrebbero richiesto l’adozione di misure di sicurezza e l’impiego di risorse molto più onerose, anche in termini di tempo.

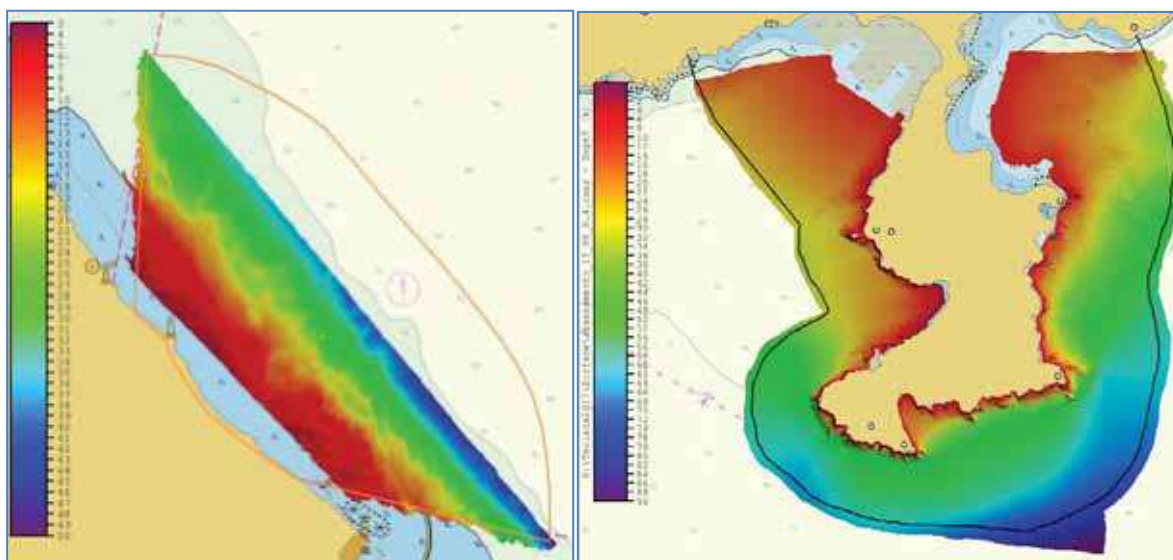


Figura 3: rilievi batimetrici effettuati a Torre Veneri e a Capo Teulada

3 Attività svolte

In generale, sono state condotte indagini relative al munizionamento accidentalmente affondato nei due poligoni, si è realizzata un’indagine bibliografica volta ad acquisire dati e informazioni circa il destino ambientale in mare degli inquinanti persistenti rilasciabili da munizioni e rottami e sulle caratteristiche biologiche ed edafiche dei fondali di Capo Teulada e Torre Veneri e quindi sono state condotte a termine campagne di prelievo campioni e biotest e analisi in laboratorio.

Le attività svolte hanno riguardato:

- l’acquisizione e lo studio della letteratura tecnico-scientifica più recente pertinente il tema del destino ambientale in mare dei materiali costituenti le munizioni e relativa alle caratteristiche biologiche ed edafiche dei siti considerati (cfr. paragrafo “Letteratura consultata”);
- la realizzazione di un repertorio su persistenza e pericolosità ambientale in mare dei costituenti delle munizioni impiegate nei due poligoni;

- la pianificazione, preparazione e realizzazione delle attività sul campo consistenti nell'individuazione e caratterizzazione di residui "potenziali sorgenti sommerse d'inquinamento" e nel prelievo di campioni di tessuti di organismi e sedimenti nelle aree marine prospicienti i due poligoni;
- la predisposizione di protocolli per i test e le analisi, la loro esecuzione, l'interpretazione dei risultati e l'elaborazione della presente relazione conclusiva.

In questi ambiti si sono tenute riunioni, visite e ispezioni dei siti ed è stato realizzato il modulo informativo¹, tenuto dai militari del Centro di Eccellenza "Counter EID", volto a preparare gli operatori subacquei alla caratterizzazione dei *target* individuati dagli strumenti elettroacustici.

Nel corso di una visita dei luoghi effettuata nel giugno del 2015 su incarico della Procura della Repubblica di Cagliari, un team dell'ISPRA, accompagnato da Carabinieri sommozzatori e muniti di ROV, ha individuato, sui fondali prossimi alle coste della penisola, una quindicina di ordigni inesplosi, in particolare bombe d'aereo e proiettili d'artiglieria. Detti oggetti apparivano integri, scarsamente colonizzati da popolamenti del macrofouling² e con segni di fenomeni di corrosione in corso. Mediante una benna tipo Van Veen sono quindi stati effettuati, "a vista", tre prelievi di sedimenti marini per saggiarne in laboratorio la compatibilità granulometrica per la ricerca di elementi in traccia e ai fini di analisi ecotossicologiche. Detti campioni sono quindi stati sottoposti ad analisi granulometrica presso l'ex Laboratorio di Sedimentologia e Micropaleontologia Ambientale ISPRA e a un saggio di tossicità mediante Microtox[®] su fase solida e a saggi algali sul cosiddetto elutriato, presso l'ex Laboratorio di Ecologia del Fitoplancton ed Ecotossicologia dell'ISPRA. La composizione granulometrica dei campioni è apparsa essere caratterizzata, per la quasi totalità, da sabbie di diametro compreso tra 1 e 3 mm e per quanto attiene i saggi biologici mediante Microtox[®] su fase solida con il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri* e utilizzando la specie *Phaeodactylum tricornutum* per i saggi algali sul cosiddetto elutriato, si è messo in luce come, nelle tre aliquote dei sedimenti testate, la tossicità risultasse assente o trascurabile. L'esiguità dei campioni analizzati non ha

¹ Modulo informativo per il riconoscimento di EO (*Explosive Ordnance*) per operatori subacquei svolto da militari del Centro di Eccellenza Counter IED del Comando Genio della durata di 5 giorni, tra il 19 e il 27 aprile 2017.

² Si definisce "*fouling*" l'insieme dei popolamenti fito- e zoobentonici in grado di insediarsi su un substrato duro naturale o artificiale. Il "*macrofouling*" è rappresentato da macroalghe e invertebrati sessili come briozoi, poriferi, idrozoi, antozoi, policheti, molluschi, cirripedi, tunicati.

permesso che di apprezzare come le principali caratteristiche dell'infralitorale superiore³ delineate nel lavoro dell'ISPRA del 2015 dedicato al Sito di bonifica di Interesse Nazionale del Sulcis – Iglesiente – Guspinese (AA.VV., 2015), abbiano trovato riscontro nei prelievi da noi effettuati sui fondali circostanti la penisola "delta". Tuttavia, insieme alle altre osservazioni che è stato possibile effettuare con l'occasione, questi risultati preliminari hanno contribuito a indirizzare la formulazione delle ipotesi scientifiche da testare con il programma di studi Operazione Poseidone.

Per quel che riguarda il munizionamento potenzialmente affondato in mare e che giace sui fondali dei due poligoni quale accidente delle esercitazioni "a fuoco", allo scopo di consentire i necessari approfondimenti per affrontare il tema del destino ambientale dei potenziali inquinanti eventualmente rilasciati sui fondali, oltre al ricorso allo studio di letteratura tecnico-scientifica, è stato fornito dallo SME un elenco del munizionamento utilizzato nelle due aree addestrative, corredato delle sue principali caratteristiche, inclusi, ove disponibili, i materiali costituenti. Questo elenco è quindi stato integrato dai ricercatori ISPRA che hanno acquisito ulteriori informazioni sul munizionamento che si sarebbe potuto trovare sui fondali, sia in termini di tipologia che di presenza di potenziali inquinanti marini.

Visite effettuate all'interno dell'area addestrativa di Capo Teulada hanno poi permesso di verificare, insieme a evidenti aspetti di pregio naturalistico (foto 8, 9 e 52), la possibilità che parte dei residui delle esercitazioni che si trovano in prossimità di tratti di costa più scoscesi possano essere stati recapitati in mare dal dilavamento meteorico o dalle deflagrazioni (foto 4 ÷ 7).

³ Il piano infralitorale è un ambiente marino del dominio bentonico perennemente sommerso e delimitato superiormente dalla presenza delle specie vegetali che non sono in grado di sopportare emersioni prolungate e inferiormente dalla profondità massima in cui è possibile la presenza della *Posidonia oceanica* (circa 35-40 m).



Foto 8 e 9: l'abbondante presenza di *Posidonia oceanica* (L.) Delile, 1813 è testimoniata anche dai poderosi accumuli di detrito vegetale depositati, indisturbati, sulle spiagge del poligono di Capo Teulada

Le attività di campo previste nell'esecuzione del progetto di cui si rende qui conto, hanno contemplato:

- indagine dell'Istituto Idrografico della Marina (IIM) con sistema *multibeam* per la caratterizzazione morfo-batimetrica dei fondali indagati;
- intervento di un team del Comando delle Forze di Contromisure Mine (MARICODRAG) della MM con due *Autonomous Underwater Vehicle* (AUV), modello "REMUS", dotati di sonar a scansione laterale per la localizzazione di bersagli sul fondale potenzialmente ascrivibili a ordigni o loro parti;
- interventi di un nucleo di incursori del 9° Reggimento "Col Moschin" dell'EI per la caratterizzazione dei bersagli individuati con sonar a scansione laterale e il prelievo di campioni di sedimento nelle immediate vicinanze di questi mediante immersioni con autorespiratore autonomo;
- effettuazione di campagne di pesca di esemplari di pesci e invertebrati.

Le prime attività sul campo sono state le campagne di rilievo batimetrico (figura 3) realizzate da personale specializzato dell'Istituto Idrografico della Marina (IIM) nel poligono di Capo Teulada utilizzando, tra il 24 maggio e il 20 giugno del 2017, il *multibeam* montato a chiglia dell'imbarcazione "MBF-1213" dello stesso Istituto (foto 3); tra il 5 settembre e il 18 ottobre dello stesso anno, con la medesima imbarcazione, si sono condotte analoghe prospezioni nel tratto di mare prospiciente il poligono di Torre Veneri. Le indagini con ecoscandaglio multifascio sono consistite nella caratterizzazione morfo-batimetrica dei fondali compresi tra la linea di costa e la profondità di circa 60 m tramite sistema *Multibeam Echosounder* (MBES) ad alta

risoluzione. I dati acquisiti mediante *multibeam* con una copertura del 100% dell'area, opportunamente elaborati, hanno consentito agli idrografi di preparare carte batimetriche (figura 3) dei fondali esplorati utili, soprattutto, a permettere al *team* REMUS di disporre della base di dati necessaria alla navigazione autonoma degli AUV. Per quanto ha riguardato la capacità dell'ecoscandaglio multifascio di evidenziare possibili *target* dispersi sul fondale, prove sperimentali eseguite nelle acque di Capo Teulada, hanno mostrato che nelle condizioni operative date, la capacità di distinguere un oggetto di circa 50 cm di lunghezza e circa 30 di diametro dalla geomorfologia di un fondale non particolarmente accidentato e interessato da rada presenza di ciuffi di *Posidonia oceanica* (L.) Delile, 1813 è limitata ai primi 12÷15 m di profondità.



Foto 10: i due AUV REMUS impiegati a Capo Teulada dai militari del Comando delle Forze di Contromisure Mine della MM

A seguire, in due *tranche*, per Capo Teulada tra il 27 giugno e il 3 luglio e poi dal 17 al 31 luglio e per il poligono di Torre Veneri, dal 9 al 13 ottobre e poi dal 30 ottobre al 28 novembre 2017, un *team* del Comando delle Forze di Contromisure Mine (MARICODRAG) della MM ha localizzato i bersagli d'interesse sui fondali tra 10 e 39 m tramite due *Autonomous Underwater Vehicle* (AUV) modello "REMUS" dotati di *side scan sonar* (foto 10). L'impiego in mare della strumentazione elettroacustica è stato sempre preceduto da misure della

velocità del suono in mare e nel caso degli AUV REMUS, anche dalla disponibilità delle acquisizioni batimetriche mediante *multibeam*.

Lo studio dei sonogrammi così ottenuti, sulla scorta dell'esperienza e delle capacità tecniche dei militari di MARICODRAG, ha permesso poi di classificare, in termini probabilistici, le ombre acustiche restituite dall'elaborazione dei dati acquisiti in categorie omogenee, associando al singolo dato anche il livello di confidenza, in alto, medio e basso (figura 10). In questo modo, tutti i bersagli identificati sul fondale sono stati classificati secondo la probabilità che si tratti di residui delle attività addestrative "a fuoco" permettendo così di decidere quali tra i bersagli evidenziati sarebbe stato più proficuo ispezionare mediante ROV e/o sommozzatori.

L'attività dei sommozzatori è consistita nel raccogliere gli elementi utili al riconoscimento dei bersagli individuati dal *side scan sonar* mediante l'acquisizione di documentazione video-fotografica e la redazione di schede di censimento. Le immersioni e le riprese ROV hanno permesso di verificare le ipotesi espresse dai tecnici militari operatori dei REMUS con la classificazione dei bersagli individuati.

Un'esposizione degli ordigni che più frequentemente sono rinvenuti nella penisola, allestita dai genieri dell'EI, ha poi permesso agli operatori subacquei di approfondire la loro preparazione nell'affrontare la caratterizzazione di specifici residui sott'acqua (foto 11).



La ricerca dei bersagli d'interesse sui fondali tramite ecoscandaglio multifascio e sonar a scansione laterale era previsto fosse preceduta o meglio accompagnata, da una campagna di misure magnetometriche. L'indisponibilità, nel periodo necessario, della strumentazione appropriata non ha consentito che ciò avvenisse ma a seguito dell'esperienza maturata con l'impiego delle metodologie sopra delineate, i risultati conseguiti mostrano che una campagna magnetometrica con gli strumenti ad oggi nella disponibilità della MM, vi avrebbe contribuito in modo poco significativo.

I risultati della ricognizione bibliografica e dello studio delle

Foto 11: esposizione degli ordigni rinvenibili nel poligono

potenziali sorgenti d'inquinamento sommerse hanno consentito di indirizzare la scelta delle metodologie che si sarebbero potute impiegare per gli accertamenti. Tra queste, la ricerca mediante analisi e *bioassay* di microinquinanti disciolti nelle acque interstiziali e adese al particolato. A tal fine, considerati i risultati della selezione operata circa i potenziali inquinanti d'interesse associabili univocamente ai residui di origine militare, in collaborazione con il personale del Centro Tecnico Logistico Interforze (CETLI) NBC dell'EI, si era elaborata una tabella (Tabella 1) dove sono riportate alcune caratteristiche delle molecole d'interesse, selezionate tra quelle dei principali componenti dei residui che ci si aspettava potessero trovarsi sui fondali costieri.

MOLECOLA	NOTE	Metodi analitici US EPA
2,4,6-TRINITROTOLUENE (TNT) E PRODOTTI DI DEGRADAZIONE		
2,4,6-trinitrotoluene (2,4,6-TNT)	Esplosivo	USEPA Method 8330B with HPLC-UV and LC-MS/MS
2-ammino-4,6-dinitrotoluene (2-Am-DNT)	Prodotto di degradazione TNT	USEPA Method 8330B with HPLC
4-ammino-2,6-dinitrotoluene (4-Am-DNT)	Principale prodotto di degradazione del TNT	USEPA Method 8330B with HPLC
2,4-diamino-6-dinitrotoluene (2,4-DANT)	Principale prodotto di degradazione del TNT	USEPA Method 8330B with HPLC
2,6-diamino-4-dinitrotoluene (2,6-DANT)	Prodotto di degradazione TNT	USEPA Method 8330B with HPLC
2,4-dinitrotoluene (2,4-DNT)	Prodotto di degradazione TNT; anche componente di propellenti a singola base	USEPA Method 8330B with HPLC-UV and LC-MS/MS
2,6-dinitrotoluene (2,6-DNT)*	Prodotto di degradazione TNT; anche componente di propellenti a singola base	USEPA Method 8330B with HPLC-UV and LC-MS/MS
2-nitrotoluene	Prodotto di degradazione TNT e del 2,6-DNT	USEPA Method 8330B with HPLC-UV
3-nitrotoluene	Prodotto di degradazione TNT	USEPA Method 8330B with HPLC-UV GC-MS EPA529-
4-nitrotoluene	Prodotto di degradazione TNT	USEPA Method 8330B with HPLC-UV GC-MS EPA529
1,3-dinitrobenzene (1,3-DNB)	Prodotto di degradazione TNT	USEPA Method 8330B with HPLC-UV and LC-MS/MS
1,3,5-trinitrobenzene (1,3,5-TNB)	Prodotto di degradazione TNT; anche componente di propellenti a singola base	USEPA Method 8330B with HPLC-UV and LC-MS/MS
3,5-dinitroanilina (3,5-DNA)	Prodotto di degradazione del TNB	USEPA Method 8330B with HPLC-UV and LC-MS/MS
nitrobenzene	Prodotto di degradazione del TNT	USEPA Method 8330B with HPLC-UV
ALTRI COMPOSTI NITRO AROMATICI		
2,4,6-trinitrofenolo (ac. picrico o melinite, ekrasite)	Esplosivo; è anche prodotto di idrolisi del Tetryl in acqua di mare	USEPA Method 8330B with HPLC-MS/MS
2-amino-4,6-dinitrofenolo (ac. picramico)	Prodotto di decomposizione dell'acido picrico	USEPA Method 8330B with HPLC-MS/MS
2,4-dinitrofenolo	Prodotto di decomposizione dell'acido picrico	USEPA Method 8330B with HPLC-MS/MS
Metil-2,4,6-trinitrofenilnitrammina (Tetryl)*	Esplosivo usato nei detonatori e nei <i>booster</i>	USEPA Method 8330B with HPLC-UV and LC-MS/MS
NITROSAMMINE		
Ottaidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocina (HMX)	Impurezze RDX ma anche esplosivo (nitro cicloammine)	USEPA Method 8330B with HPLC-UV and LC-MS/MS
Esaidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) (hexogen)	Esplosivo (nitro cicloammine)	USEPA Method 8330B with HPLC-UV and LC-MS/MS
PROPELLENTI, PLASTIFICANTI, STABILIZZANTI		
Nitrocellulosa	Propellente	modified USEPA Method 353.2
Nitroglicerina (NG)	Propellente	USEPA Method 8330B with HPLC-UV
Nitroguanidina (NQ)	Propellente	USEPA Method 8330B with HPLC-UV
Difenilamina (DPA)	Stabilizzante di esplosivi alla nitrocellulosa	USEPA Method 8270 with GC/MS
n-nitrosodifenilammina (NDPA)	Propellente	USEPA Method 8270 with GC/MS
Tetranitrato di pentaeritrite (PETN)	<i>Primer, booster charge, demolition</i>	USEPA Method 8330B with HPLC-UV and LC-MS/MS

Tabella 1: elenco delle molecole possibili oggetto di analisi

Un test effettuato nei laboratori del CETLI alla ricerca di alcune delle molecole in tabella 1 in alcuni campioni di sedimento ha consentito di affinare le tecniche analitiche ma i risultati non hanno mostrato presenza dei composti ricercati. Tra le condizioni necessarie per poter condurre analisi di elementi in traccia nella matrice “sedimenti” è che questi siano costituiti da una frazione fine in percentuale sufficiente a conservarli. Allo scopo quindi di verificare la sussistenza di questa condizione, esaminata la letteratura reperita ed effettuate le prime visite dei luoghi, si è deciso di condurre uno studio sulla composizione granulometrica dei sedimenti presenti nei tratti di mare d'interesse (figure 6÷8).

Nel corso del 2018 e del 2019 sono state eseguite la seconda e terza fase previste dal progetto, ovvero le indagini su matrici ambientali marine allo scopo di contribuire a valutare se ed eventualmente quanto, i residuati accidentalmente dispersi sui fondali possano costituire una minaccia sensibile per gli ambienti marini.

Per la migliore conduzione di queste fasi, ISPRA, componente del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente, ha sottoscritto un accordo tecnico-scientifico con l'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna (ARPA Sardegna) e l'Agenzia Regionale per la Prevenzione e Protezione dell'Ambiente della Puglia (ARPPA Puglia), volto a condividere l'approccio metodologico, a supportare in loco le attività di prelievo, trasporto e conservazione dei campioni, per l'esecuzione di saggi biologici su matrici marine e l'interpretazione dei relativi risultati analitici.

Grazie alle informazioni e ai dati acquisiti con le campagne in mare già effettuate nelle due aree addestrative studiate, individuati i *target* d'interesse, si sono predisposti i piani di prelievo di campioni nelle aree oggetto di studio e sono stati concordati con i laboratori coinvolti, i protocolli di prelievo, conservazione e analisi per studiare la granulometria di campioni di sedimento, il tenore in carbonio organico totale (T.O.C.), il potenziale tossico mediante *bioassay* con *Vibrio fischeri* (Microtox®) e la spettrometria gamma. Analogamente, in accordo con i laboratori ISPRA di ecotossicologia marina e microbiologia e di analisi di biomarker del CN-LAB e della Sezione sperimentale di Livorno per la valutazione del rischio ecologico in aree marino costiere del CN-COS, si sono stabiliti protocolli per l'esecuzione di *bioassay* sui tessuti ittici, nonché su esemplari di riccio di mare della specie *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) nel tratto di mare antistante la costa tra Capo Teulada e Capo Spartivento (CA).



Foto 12: con il miniROV dell'ISPRA si esplorano i fondali di Cala Piombo (Capo Teulada)

Le aliquote di sedimento utilizzate per le analisi granulometriche e chimiche e per condurre saggi biologici in laboratorio sono state prelevate dagli operatori subacquei del 9° Reggimento d'assalto incursori paracadutisti "Col Moschin", con ricercatori ISPRA del CN-CRE e con l'assistenza di mezzi e personale del 1° Reggimento Corazzato a Torre Veneri e del Reparto Operativo Aeronavale della Guardia di Finanza, per il tramite dell'ARPPA di Bari, nelle acque di Torre Veneri. La numerosità delle stazioni di campionamento, in entrambi i siti in studio e nei limiti batimetrici d'immersione degli operatori (-39 m), è stata determinata dall'esigenza che i campioni rappresentassero significativamente l'area indagata e che fosse alta la probabilità che potessero riferirsi a potenziali sorgenti sommerse d'inquinamento di natura chimica o

radiologica. Le ispezioni effettuate in immersione e con l'ausilio di un miniROV (foto 12, 13 e 14) e le analisi granulometriche in laboratorio hanno poi mostrato come la granulometria dei sedimenti fosse, in genere, piuttosto grossolana e quindi non una matrice ottimale per analisi di microinquinanti organici.



Foto 13 e 14: osservazioni del fondale mediante miniROV

I residuati identificati si sono presentati agli osservatori in condizioni e di tipologia molto diversificate. Lo stato di corrosione e l'abbondante *fouling* notato su alcuni di essi attestano gli anni trascorsi dal loro affondamento e ne impediscono l'identificazione (da guerra, da esercitazione, fumogeno, illuminante, ecc.) (foto 15).



Foto 15: ordigno difficilmente identificabile a causa dei popolamenti incrostanti

4 Risultati analisi geofisiche

Durante le campagne in mare sono stati individuati circa 600 bersagli nell'area esplorata a Capo Teulada e circa 200 nell'area esplorata a Torre Veneri, a profondità comprese tra i 10 e i 40 m di profondità.

Di questi, a seguito delle attività di immersione dei sommozzatori dell'EI, sono risultati di interesse per il progetto, circa 200 bersagli a Capo Teulada (figura 4) e circa 55 a Torre Veneri (figura 5). I bersagli rivelatesi non essere oggetti d'interesse per la ricerca erano costituiti principalmente da attrezzature da pesca, in particolare nasse abbandonate sul fondale; la circostanza evidenzia come le vigenti interdizioni alla pesca non siano sempre rispettate.

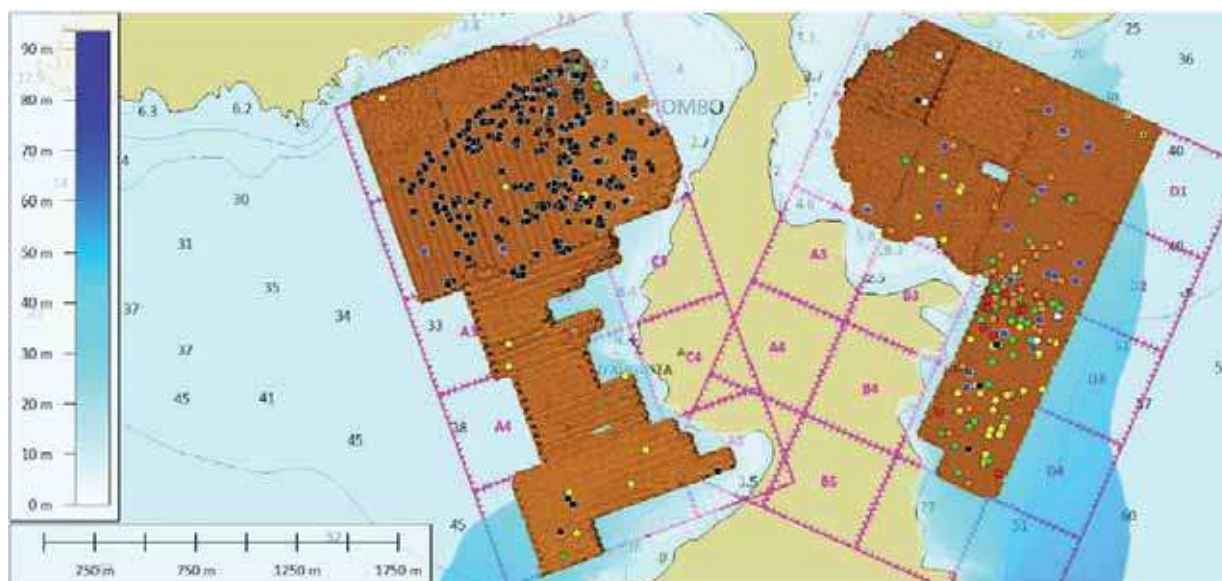


Figura 3: oggetti (circa 600) localizzati sui fondali di Capo Teulada. Il diverso colore indica una certa probabilità che il target sia un ordigno

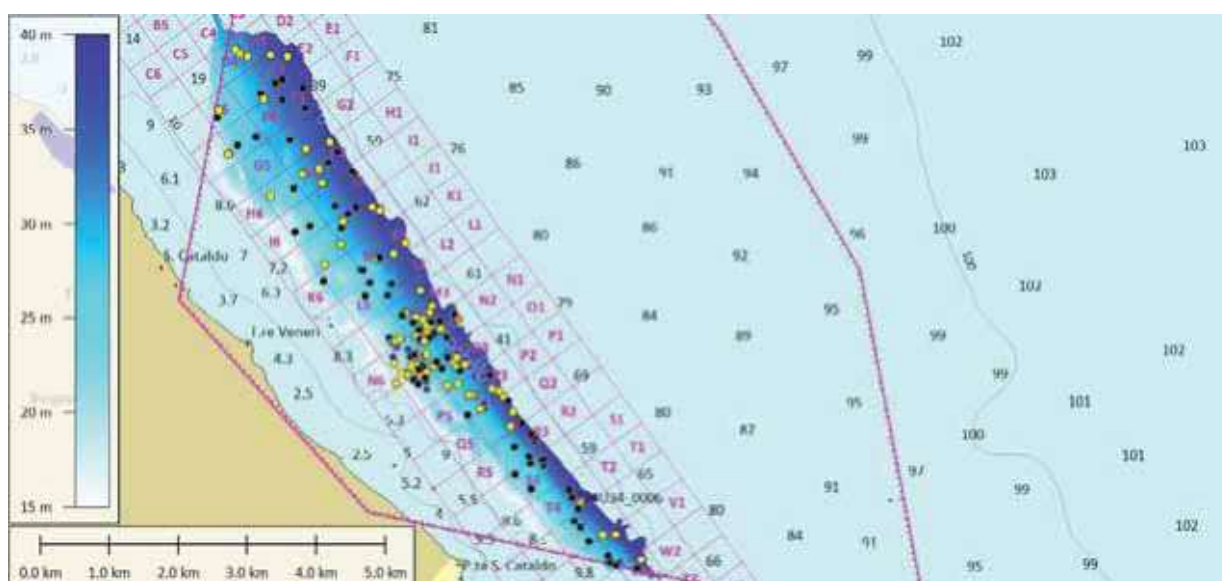


Figura 4: oggetti (circa 200) localizzati a Torre Veneri. Il diverso colore indica una certa probabilità che il target sia un ordigno

Le stazioni di campionamento sono state comunque localizzate sia in stazioni interessate dalla presenza di rottami sia in stretta prossimità di residuati non esplosi, cercando di raccogliere il sedimento più fine a una distanza non superiore al metro dall'ordigno e curando di non prelevare i sedimenti superficiali più grossolani che l'idrodinamismo accumula a contatto con l'oggetto (Foto 16 ÷ 20).



Foto 16: esempio di giacitura di ordigno sul fondale a circa 26 m di profondità (Foto del 9° Reggimento “Col Moschin”, Base Addestramento Incursori)



Foto 17, 18, 19 e 20: residui delle attività addestrative sui bassi fondali di C. Teulada

Per quel che riguarda i prelievi di tessuti da pesci e ricci di mare, si è chiesta e ottenuta dalla Capitaneria di Porto competente (CA) l'autorizzazione alla pesca per fini scientifici e quindi acquisite attrezzature da pesca (foto 21 e 22) e materiale di consumo per i prelievi.



Foto 21 e 22: nasse impiegate per le attività di cattura di esemplari di grongo e murena

4.1 Repertorio su munizionamento e potenziali inquinanti

Per selezionare i potenziali inquinanti d'interesse, vale a dire ascrivibili in via esclusiva alle attività esercitative "a fuoco" svolte, è stato necessario tentare di conoscere dettagli circa i costituenti del munizionamento adoperato nei due poligoni nel corso degli anni. Allo scopo, si è fatto ricorso a un elenco di tipologie e caratteristiche fornito dallo SME, a ricerche bibliografiche sui materiali e sulle metodologie d'impiego del munizionamento lì elencato come sulla persistenza e nocività ambientale delle molecole che gli ordigni rinvenibili sul fondale possono rilasciare in ambiente marino. Lo studio effettuato ci permette di evidenziare l'esigenza di prevenzione a tutela dell'ambiente che il munizionamento da impiegarsi in attività esercitative debba essere formalmente certificato per la qualità dei materiali costituenti le diverse componenti, quanto più possibile non potenzialmente inquinanti.

L'elenco fornito all'ISPRA dallo SME ha incluso il munizionamento di cui questo ha conoscenza, non quindi da considerarsi esaustivo perché mancano dettagli circa attività "a fuoco" svolte decenni addietro e perché non ogni tipo di munizione è corredato da schede che ne illustrino e descrivano i materiali utilizzati per la loro

costruzione e utilizzo. Inoltre, molte delle ditte produttrici che nei decenni hanno fornito munizionamento, non sono più operative.

Per ovviare per quanto possibile a queste limitazioni, specialisti dell'El operativi nei due poligoni dove si sta svolgendo lo studio, si sono impegnati a integrare le conoscenze disponibili con la loro esperienza, contribuendo così alla realizzazione di un repertorio che, sempre suscettibile d'integrazioni e correzioni, ha consentito di selezionare per l'interesse dell'indagine, tipi di munizione da ritenersi sufficientemente rappresentativi dei fenomeni indagati.

Si è così creato un repertorio contenente informazioni su:

- tipologia del munizionamento;
- dimensioni;
- materiali costruttivi;
- potenziali inquinanti, inclusi prodotti di degradazione (molecole nocive e persistenti in ambiente marino);
- metodologie analitiche adeguate a evidenziarne la presenza in tracce nei sedimenti e nelle acque interstiziali (le molecole ricercate non sono bioaccumulabili).

Dalle indagini sui potenziali inquinanti persistenti che potrebbero essere rilasciati da ordigni e rottami di origine militare a causa dei fenomeni corrosivi o in conseguenza di deflagrazioni e rotture, sono state escluse le munizioni di piccolo calibro (foto 23 e 24) perché essenzialmente costituite da pallottole metalliche considerate di dimensioni troppo piccole per essere rilevate sistematicamente e il cui apporto al tenore in metalli in traccia dei siti, sarebbe molto difficile distinguere.



Foto 23 e 24: residui di munizioni di piccolo calibro rinvenute a pochi metri di profondità (penisola di Capo Teulada, costa orientale)

Lo studio ha permesso di identificare numerose molecole persistenti e potenzialmente nocive per l'ambiente. Tra queste figurano metalli quali piombo, antimonio, zinco, rame, mercurio, torio (ossidi), tungsteno, gli esplosivi quali 2,4,6-trinitrotoluene, nitroglicerina e RDX e componenti di propellenti come dinitrotoluene (DNT), difenilammina (DPA) e dibutilftalato (DBP). Sono altresì dannosi in ambienti marini, componenti di materiale pirico quali esacloroetano e sali di bario e stronzio rinvenibili nei proiettili traccianti e nelle composizioni per illuminazione. Alcuni ordigni hanno poi importanti componenti in materiali plastici persistenti in ambiente marino (foto 25).



Foto 25: particolare di residuo in materiale plastico (penisola di Capo Teulada).

Come sopra accennato a proposito delle munizioni di piccolo calibro, si è ritenuto di escludere i metalli in traccia dal programma di analisi di laboratorio. La ragione di questa scelta risiede nella difficoltà che si sarebbe incontrata nell'ascrivere qualsiasi risultato analitico a uno dei metalli in traccia costituenti i residui affondati, non potendo conoscere, con sufficiente dettaglio, gli altri potenziali apporti, soprattutto quelli naturali di origine biogeochimica. Altra considerazione a supporto di questa decisione risiede nel fatto che si prevedeva di utilizzare approcci ecotossicologici in grado quindi di evidenziare, per confronto con un "bianco", l'eventuale sussistenza, nei siti indagati, di condizioni di stress ambientale generate da ogni sorgente sito-specifica, inclusi i metalli in traccia.

Dal repertorio su munizionamento e potenziali inquinanti sono quindi state selezionate, per ricercarne caratteristiche chimico-fisiche, prodotti di degradazione,

destini ambientali e metodologie analitiche, prodotti persistenti e nocivi di natura organica univocamente ascrivibili alla presenza degli ordigni, in particolare sostanze esplosive con i loro prodotti di degradazione.

4.2 Pianificazione dei campionamenti

Sulla base dei bersagli individuati nei poligoni di Capo Teulada e Torre Veneri (figure 4 e 5) e sulla base della classificazione degli stessi (figura 10), sono stati predisposti i piani di campionamento per le due aree di interesse (figure 6-8), considerando anche i punti di prelievo localizzati nel tratto di mare prossimo a Capo Spartivento (figura 8 e foto 26), considerato quale controllo rispetto alla presenza di possibili inquinanti rilasciati a seguito delle attività “a fuoco” nei sedimenti di Capo Teulada (Mannozi *et al.*, 2017).

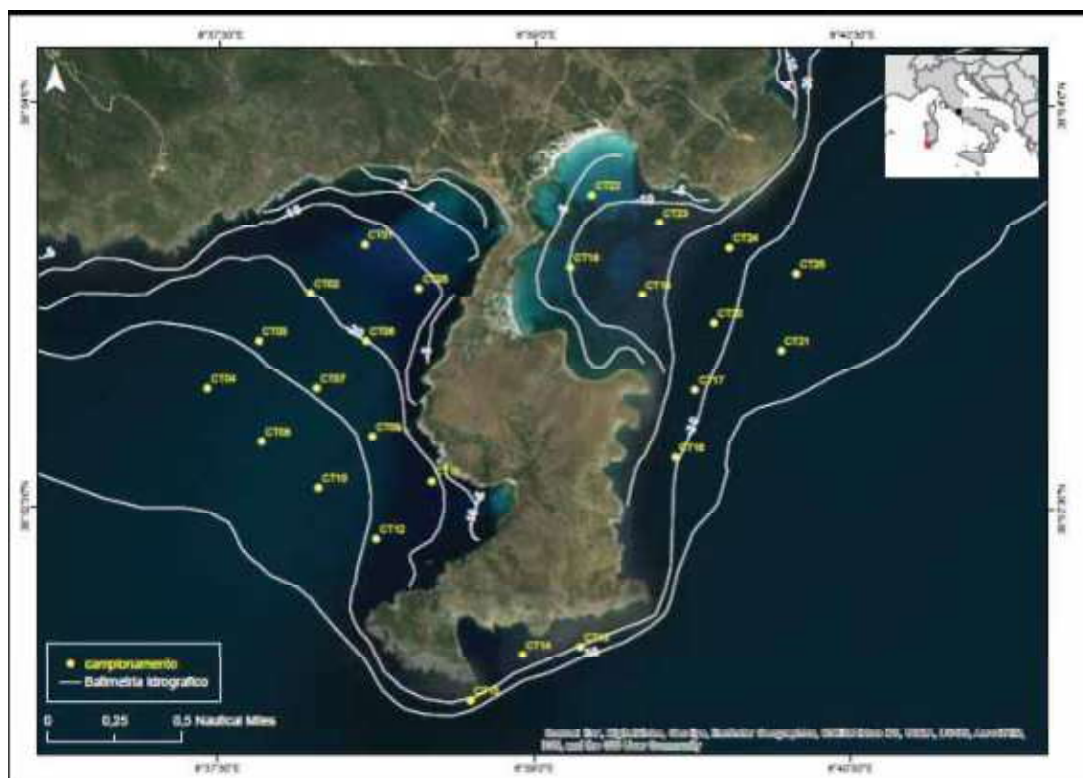


Figura 6: distribuzione dei punti di prelievo di sedimenti per lo studio della loro granulometria nell'area di Capo Teulada



Figura 8 e Foto 26: distribuzione dei punti di prelievo di sedimenti e organismi nell'area di Capo Spartivento e il faro che li sovrasta

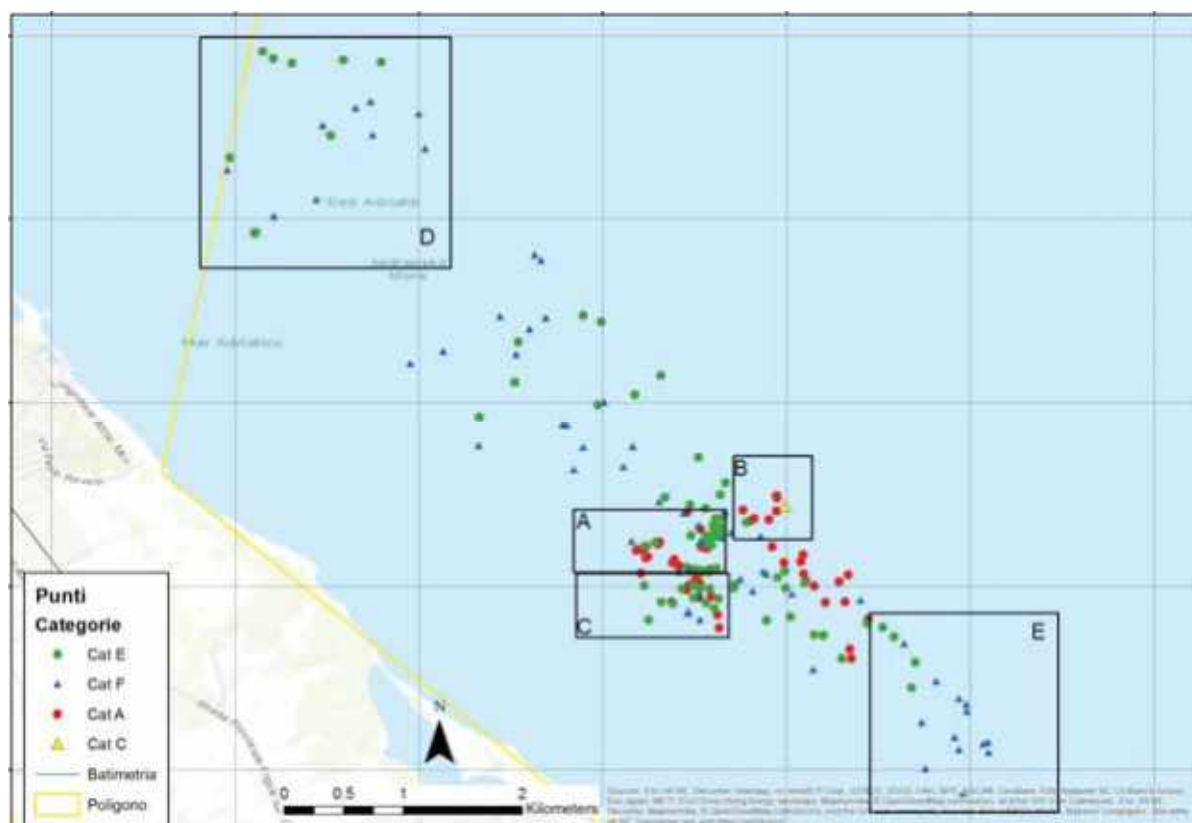


Figura 9: bersagli e aree selezionate nel poligono di Torre Veneri

Il piano di caratterizzazione dell'area a mare prospiciente il poligono di Torre Veneri ha preso in considerazione i *target* potenziali che sono stati individuati oltre la batimetria dei 15 metri, questo in considerazione del fatto che l'area è sottoposta a interventi periodici di rimozione di residui dai fondali compresi tra la battigia e 15 metri. Grazie ai risultati di uno di questi interventi di rimozione operato nelle acque antistanti le piazzole di tiro della spiaggia di Torre Veneri (foto 42 ÷ 45) è stato possibile constatare che tutti i residui raccolti in quella fascia batimetrica erano dello stesso tipo (TP-T M 490 105/52 e TP-T 120/44, foto 41) di quelli caratterizzati sott'acqua dai sommozzatori. Questa evidenza ci ha quindi portato al convincimento che non vi fossero altri potenziali inquinanti da ricercare che gli involucri di detti residui, privi della possibilità di rilasciare in ambiente marino altro che metalli e composti delle vernici che sono apparse persistenti.

Categoria	Tipo	L (cm)	Ø (cm)	Colore	
A	Proiettile di artiglieria	69-90	12-20	Rosso	
	Bombe da mortaio	35-90	8-12		
	RPG	50-90	10-12		
	RPG	50	10		
B	Missile	80-130	10-20	Rosso	
	Razzi	60-180	7-12		
C	Bombe d'aereo	180-400	35-50	Arancio	
	Mk 84	328 (257)*	45		
	Mk 83	300 (187)*	35		
	Mk 82	221 (146)*	27		
	Mk 81	188	23		
	CBU-87	234	40		
	Missile	350-400	27-30		
D	Altri ordigni			Rosso	
E	Non ordigni / Antropico			Verde	
F	Non antropico			Blu	
Bersagli attesi per categoria					
Cat A	Cat B	Cat C	Cat D	Cat E	Cat F
54	0	1 ⁴	0	91	76

Figura 10: esempio di classificazione dei bersagli individuati mediante strumentazione elettroacustica a Torre Veneri. Il diverso colore indica una certa probabilità che il *target* sia un ordigno (elaborazione di personale del Comando delle Forze di Contromisure Mine)

4.3 Campagne in mare

Le uscite in mare per il prelievo di campioni e la caratterizzazione di bersagli, sono state condotte nel periodo compreso tra l'11 giugno e il 23 luglio 2018 nelle aree tra Capo Teulada e Capo Spartivento (CA) e tra il 21 settembre e l'11 ottobre nel tratto di mare prospiciente il poligono di Torre Veneri (LE).

Ai prelievi di campioni, alla loro preparazione e conservazione e alle caratterizzazioni dei bersagli hanno partecipato tecnici e ricercatori ISPRA del Centro Nazionale per le crisi e le emergenze e il danno, personale dell'Esercito Italiano e delle Agenzie regionali del Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente (SNPA) di Sardegna e Puglia. Inoltre, il progetto ha potuto avvalersi del supporto offerto dal Reparto Operativo Aeronavale del Comando Regionale Puglia della Guardia di Finanza all'ARPPA Puglia per le attività di prelievo e caratterizzazione sui fondali di Torre Veneri (foto 27 e 28).

⁴ N.B.: tra i bersagli individuati mediante sonar a scansione laterale e/o *multibeam* nelle aree studiate si sono individuati anche residui estranei alle attività addestrative ma risalenti al secondo conflitto mondiale.



Foto 27 e 28: Una delle motovedette in dotazione al 1° Reggimento Corazzato dell'EI impiegata per le attività svolte nelle acque di Capo Teulada e a sinistra, una del Reparto Operativo Aeronavale del Comando Regionale Puglia della GdF utilizzata per le attività svolte nelle acque di Torre Veneri

I rilievi subacquei e i prelievi di sedimento sono stati effettuati dai sommozzatori del 9° Reggimento “Col Moschin” nel corso di 43 immersioni a Capo Teulada e 47 a Torre Veneri (foto 29 e 30).

Le attività sono state condotte con il supporto logistico, inclusa la disponibilità di locali adeguati alla preparazione e conservazione temporanea dei campioni, offerto dal personale specialistico del 1° Reggimento Corazzato a Capo Teulada e della Scuola di Cavalleria di Lecce.



Foto 29 e 30: sommozzatori del 9° Reggimento “Col Moschin” (a destra foto del 9° Reggimento “Col Moschin”, Base Addestramento Incursori)

Le attività di campionamento dei sedimenti hanno riguardato il prelievo di campioni destinati ad analisi di granulometria, T.O.C., analisi chimiche e saggi ecotossicologici, secondo il piano di campionamento elaborato da ISPRA per le aree d'interesse. La scelta dei punti d'immersione si è basata su considerazioni circa la

probabilità che il *target* individuato fosse un ordigno, la densità spaziale dei *target* e la profondità al quale si è rinvenuto, non superiore a 40 m.

I campioni per l'analisi della granulometria sono stati prelevati manualmente dagli operatori subacquei mediante barattoli in polipropilene (PP) da 100 ml, etichettati con i relativi codici (es. TV01- data- località, analisi) su tappo e barattolo, sigillati e lasciati a temperatura ambiente per essere poi, accompagnati dalla relativa scheda di consegna, affidati al laboratorio.

I campioni per analisi di T.O.C. e per altre possibili analisi chimiche sono stati prelevati dagli operatori subacquei con provette (tubi a fondo conico "BD Falcon") da 50 ml in PP, etichettati con i relativi codici (es TV01- data- località, analisi) su tappo e provetta, sigillati e conservati in congelatore a -20 °C per essere anche essi poi consegnati in laboratorio, sempre accompagnati dalla relativa scheda.

In campo, sono state compilate delle "schede di campionamento" dove sono state indicate le date e gli orari di prelievo, il codice del campione, le batimetrie, le aliquote destinate alle differenti indagini analitiche, le aree di prelievo ed eventuali note. Successivamente, si sono eseguite foto ai campioni con detta scheda (Foto 31 e 32).

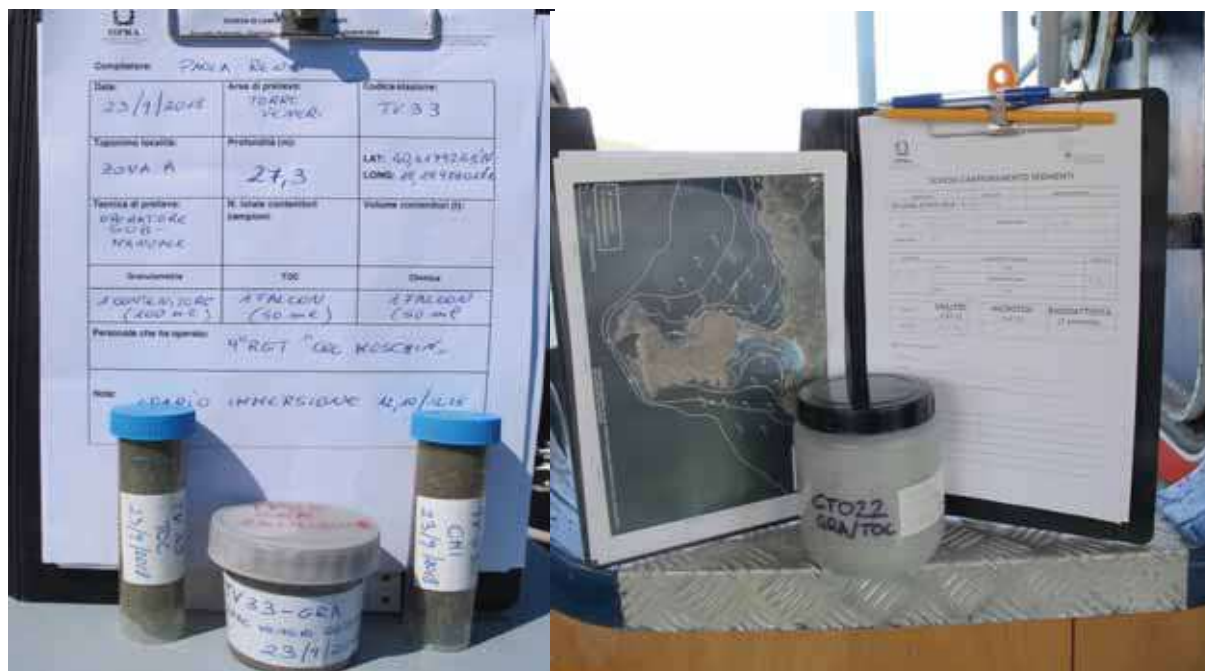


Foto 31 e 32: esempio di schede di campionamento e campioni destinati alle analisi

I prelievi per le analisi radiometriche su campioni di sedimento sono stati effettuati dai medesimi operatori subacquei del 9° Rgt. "Col Moschin" a mezzo carotiere manuale in stazioni ubicate sia sui fondali del poligono di Capo Teulada che di Capo Spartivento (stazioni di controllo).

Sui fondali indagati a Capo Teulada i prelievi sono stati tutti eseguiti in prossimità di residuati di ordigni in forma di rottami metallici (tra questi, il missile anticarro MILAN, foto 33 e 34), in particolare a Punta di Aligusta e Punta Tonnara, su tratti di fondale dove è risultata maggiore la loro densità spaziale a seguito delle indagini svolte nelle campagne precedenti.

Repliche dei campioni sono state prelevate per i *bioassay* mediante Microtox[®] previa analisi granulometrica. I prelievi sono stati conservati in contenitori in polietilene da 500 cm³ a temperature comprese tra 0 e 4 °C.



Foto 33 e 34: probabile rottame di missile MILAN rinvenuto a circa 10 m di profondità in prossimità di Cala Piombo, Capo Teulada (l'asta graduata è lunga 60 cm. Foto del 9° Reggimento "Col Moschin", Base Addestramento Incursori)

Per la campagna di pesca sono stati catturati esemplari di *Conger conger* Linnaeus 1758 e *Muraena helena* Linnaeus 1758 e da questi prelevati organi e tessuti nel laboratorio approntato dal Comando del poligono di Capo Teulada presso il 1° reggimento corazzato (foto 35 ÷ 38).



Foto 35, 36, 37, 38: prelievo di organi e tessuti da esemplari di grongo e murena nel laboratorio allestito in caserma

4.3.1 Poligono di Capo Teulada

I fondali circostanti la penisola di Capo Teulada sono caratterizzati dalla presenza di *Posidonia oceanica* (L.) Delile, 1813 in praterie e su roccia e la granulometria dei sedimenti è apparsa sempre prevalentemente grossolana, anche a profondità superiori a 30 m. Tra i rizomi delle piante di *P. oceanica*, il sedimento è costituito, in prevalenza, da detrito organogeno. Nelle località individuate quali maggiormente interessate dalla presenza di residui delle attività “a fuoco”, nei pressi di Punta d’Aligusta e Punta Tonnara, sino a circa 10 m di profondità, il fondale è caratterizzato dalla prevalenza di ciottoli e rocce franate dalla costa scoscesa.

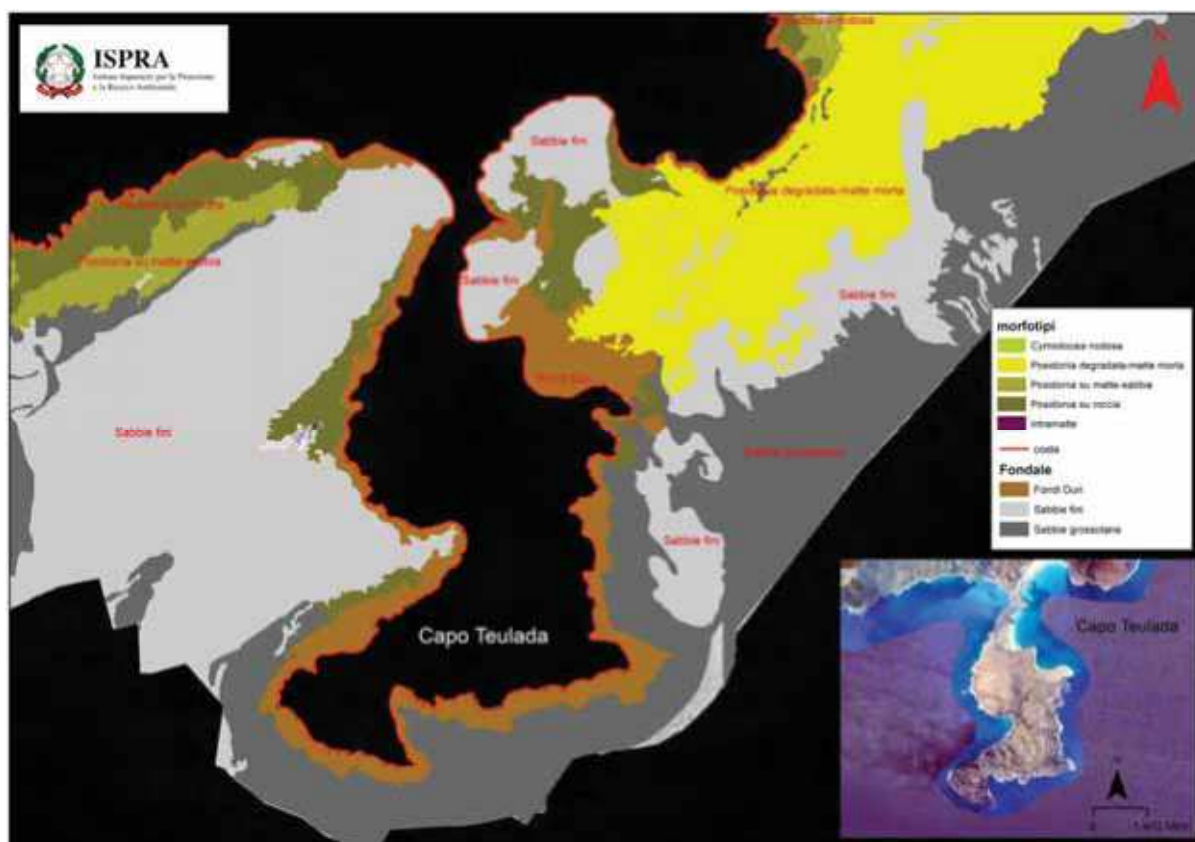


Figura 11: Mappa delle tipologie di fondale presenti nell'area di Capo Teulada

Nelle aree marine prospicienti il poligono di Capo Teulada (Fig. 11) e sui fondali dell'area di controllo, Capo Spartivento (foto 39), si sono effettuati prelievi di campioni di sedimento destinati alle analisi granulometriche, radiologiche ed ecotossicologiche con la numerosità illustrata nella tabella che segue:

	Granulometria e C organico totale	Ecotossicologia	Radiometria
Capo Teulada	25	17	17
Capo Spartivento	6	4	4

Nelle medesime aree, in prossimità della costa e di residuati identificati sui fondali di Capo Teulada, sono stati catturati esemplari delle specie ricercate (grongo e murena). Da questi sono stati prelevati i tessuti d'interesse ecotossicologico, otoliti, vertebre e gonadi, con la numerosità indicata nelle tabelle che seguono.

C. Teulada	n° es.	Fegato + cistifellea	Cervello	Branchie	Gonadi	Muscolo	Sangue	Vertebre + otoliti
<i>C. conger</i>	11	11+11	11	11	11	11	11	11+9
<i>M. helena</i>	9	9+7	5	9	-	9	9	9+8

C. Spartivento	n° es.	Fegato + cistifellea	Cervello	Branchie	Gonadi	Muscolo	Sangue	Vertebre + otoliti
<i>C. conger</i>	2	2+2	2	2	2	2	2	2+2
<i>M. helena</i>	10	10+9	10	10	1	10	10	10+9

Nel marzo del 2019 è stata portata a termine anche la campagna di prelievo di ricci di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (foto 41) per consentire l'esecuzione di *bioassay* per il controllo delle condizioni ambientali rilevabili con questo approccio nei tratti di mare antistanti le coste di Capo Teulada e Capo Spartivento.

Gli echinodermi sono stati prelevati in quattro stazioni (figura 12), due ricadenti nell'area del Poligono di capo Teulada (Cala Aligusta e Punta Tonnara) e due, in qualità di controllo, posizionate lungo la costa est, esternamente all'area del poligono (Porto Tramatzu e Capo Spartivento).

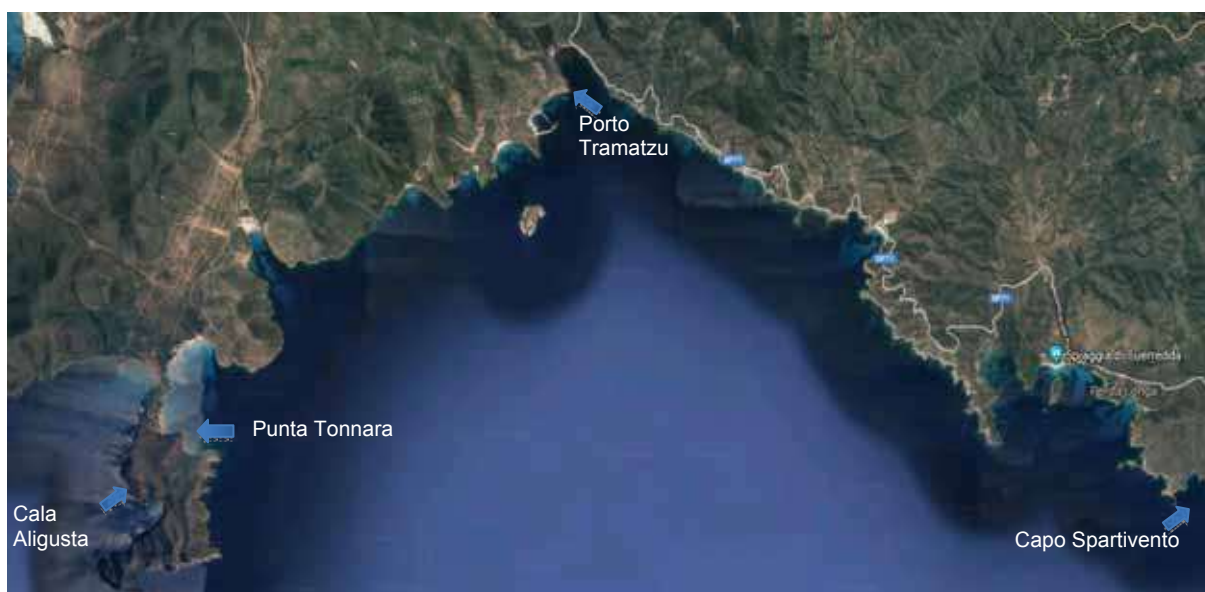


Figura 12: stazioni di prelievo dei ricci di mare

In ogni stazione sono stati raccolti circa 30 individui adulti di *P. lividus*. Gli organismi sono stati collocati in un contenitore di plastica e ricoperti con abbondante carta bibula umida per minimizzare lo stress da trasporto ed evitare così possibili emissioni di gameti. Gli organismi sono quindi stati trasportati in laboratorio, climatizzato a 18 ± 1 °C, in attesa del loro utilizzo per l'allestimento delle prove di fecondazione e di sviluppo embrionale.



Foto 39: Capo Teulada visto da Capo Spartivento



Foto 40: esemplari di *Paracentrotus lividus* (Lamark, 1816) dei due sessi (Foto Silvia Giuliani)

4.3.2 Poligono di Torre Veneri

Nel tratto di mare prospiciente il poligono di Torre Veneri sono state effettuate immersioni per il riconoscimento dei bersagli che erano stati individuati con le campagne di prospezioni elettroacustiche e contestualmente si sono effettuati i prelievi di sedimento destinati ad analisi granulometriche, tenori in C organico totale ed eventuali contaminanti in tracce.

Le immersioni sono state distribuite come nel seguito:

Punti di immersione: 49	Granulometria: 46	Analisi chimiche: 30	T.O.C.: 29
-------------------------	-------------------	----------------------	------------

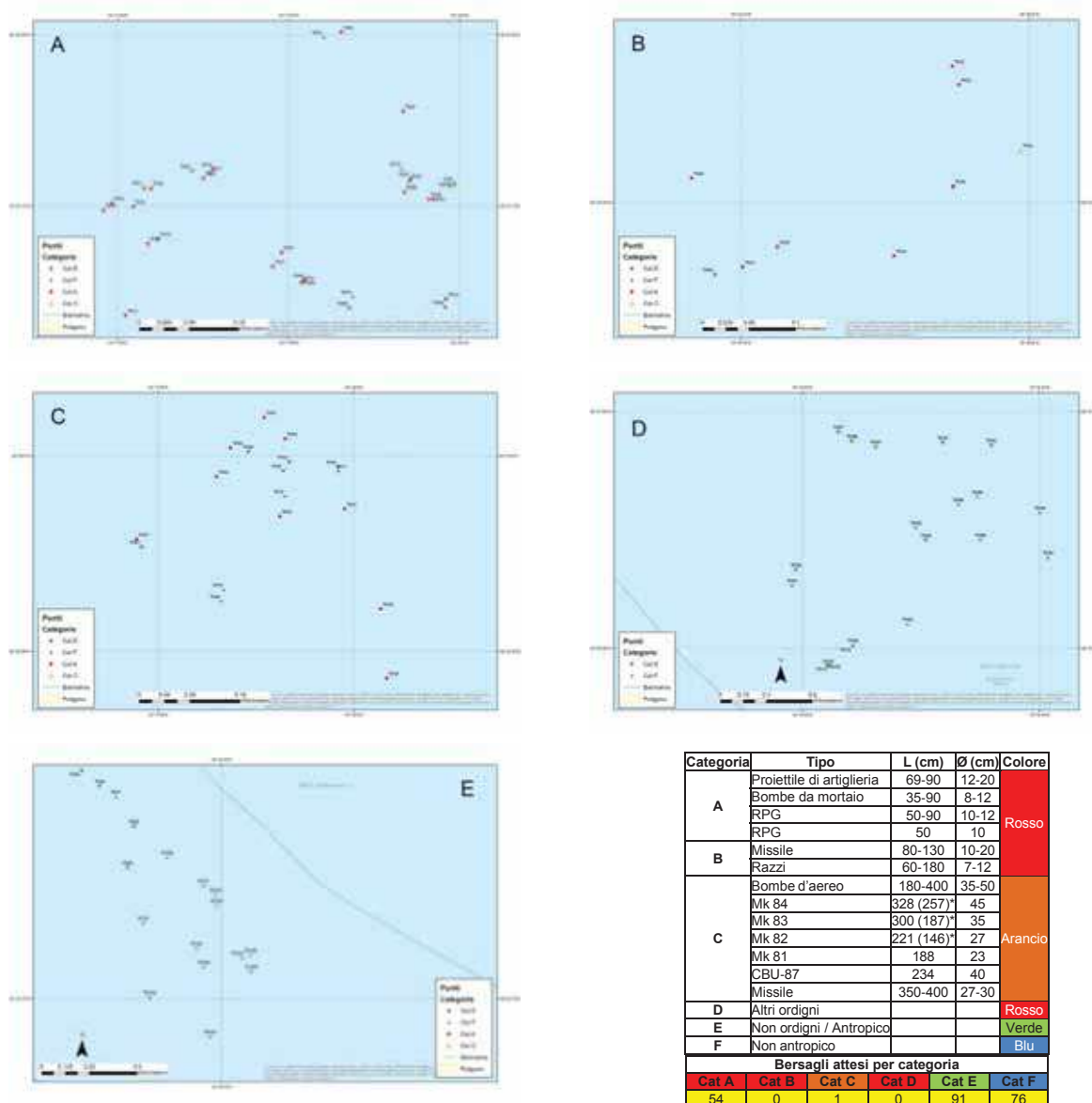


Figura 13: classificazione dei potenziali *target* localizzati a Torre Veneri (circa 200)

Le attività di ricognizione subacquea dei *target* scelti tra le diverse categorie secondo la classificazione fatta sulla base delle indagini elettroacustiche (figura 13, circa 200 *target*, 55 classificati possibili ordigni e rottami), ha permesso di rilevare la presenza sui fondali indagati solo di residui di munizionamento di tipo 105/52 e 120/44, invariabilmente colonizzati da organismi incrostanti. Stessa tipologia di residuati, identificata con certezza, si è constatato che ingombrano i bassi fondali (sino a circa 15 m di profondità) del tratto di costa antistante le piazzole di tiro dell'area addestrativa di Torre Veneri. Il rinvenimento è il risultato dell'opera di raccolta effettuata da ditta specializzata con una periodicità circa semestrale. I rottami prelevati dal fondale a seguito dell'ultima campagna di pulizia (foto 42 ÷ 45), erano conservati in appositi spazi a terra ed è quindi stato possibile apprezzare come il munizionamento di origine fossero proiettili da addestramento con tracciante: TP-T (*Target Practice-Tracer*) M 490 105/52 e TP-T (*Target Practice-Tracer*) 120/44 (corrispondenti ai proiettili colorati di azzurro in foto 41).



Foto 41: le due principali categorie di proiettili rinvenuti sui fondali di Torre Veneri

Vista la natura dei residuati, consistenti in quanto rimasto di proiettili da addestramento, assimilabili ora a rottami ferrosi che non contengono contaminanti appartenenti alla famiglia degli esplosivi, non si è ritenuto utile effettuare delle analisi chimiche sui sedimenti alla ricerca di residui di questi composti o di elementi in traccia. Per quanto riguarda questi ultimi, si è ritenuto, come nel caso di Capo Teulada, di non affrontarne la ricerca in quanto non univocamente riferibili alle attività addestrative “a fuoco”, anche in considerazione delle scarse conoscenze disponibili sulla biogeochimica dei siti d’indagine.

La constatazione dell’importante bioconcrezionamento osservato su detti rottami (foto 42 ÷ 45) ha portato a ritenere che giacessero sul fondale da tempi certamente superiori a sei mesi; si pensa, dunque, che sui fondali più prossimi alla costa, non interessati direttamente dalle nostre indagini, si trovino grandi quantità di residuati del tipo citato e che le attività di pulizia sinora svolta non abbiano comportato una rimozione completa dei rottami.



Foto 42, 43, 44 e 45: bioconcrezioni sui rottami asportati dai bassi fondali di T. Veneri

4.4 Attività in laboratorio

Sono state completate nei laboratori dell'ISPRA le analisi dei tessuti ittici per ricerca di *biomarker* e nel Laboratorio di misure radiometriche ex ISPRA, ora ISIN, le misure di spettrometria gamma sui sedimenti prelevati a Capo Teulada e a Capo Spartivento. Presso i laboratori del Dipartimento Provinciale di Cagliari dell'ARPA Sardegna si sono concluse le analisi dei sedimenti prelevati durante la campagna dell'estate 2019 a Capo Teulada per granulometria, T.O.C. e test con il batterio bioluminescente *Vibrio fischeri*. Si sono poi pianificate e condotte le attività di *bioassay* su esemplari del riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) prelevati a Capo Teulada e Capo Spartivento e si sono elaborati i risultati a cura della Sezione sperimentale di Livorno per la valutazione del rischio ecologico in aree marino costiere del CN-COS ISPRA.

5 Risultati delle analisi

Nelle righe che seguono si rende conto dei risultati delle analisi svolte nei diversi laboratori che hanno cooperato nelle indagini, presentati nel contesto di ciascuno dei siti di studio (foto 46 e 47). Allegate alla presente relazione si possono trovare le relazioni elaborate da ciascuno dei laboratori che hanno partecipato allo studio.



Foto 46 e 47: tratti di costa nell'area del poligono di Capo Teulada e di Torre Veneri

5.1 Poligono di Capo Teulada

5.1.1 Indagini granulometriche e T.O.C

L'analisi granulometrica ha consentito la determinazione delle percentuali in peso delle diverse frazioni granulometriche, evidenziando una prevalenza nei campioni di frazioni sabbiose e frazioni > 0,063 mm (ghiaia + sabbia) in tutti i campioni prelevati.

Tale evidenza, correlata al dato di T.O.C. (*Total Organic Carbon*), ha consentito di escludere l'esecuzione di analisi volte alla ricerca di contaminanti in traccia in quanto quelli da noi ricercati hanno scarsa affinità con i sedimenti del tipo riscontrato con le analisi granulometriche.

In tutti i campioni analizzati è stato valutato il contenuto di materia organica totale espresso come T.O.C., utile per valutare la potenzialità di rinvenire microinquinanti nel sedimento. Le attività messe in atto per queste analisi dai laboratori del Dipartimento Provinciale di Cagliari dell'ARPAS sono descritte nella relazione in allegato 1.

5.1.2 Saggio di tossicità acuta con batteri bioluminescenti (*Microtox*®)

Sull'elutriato dei campioni pervenuti è stato eseguito il test di tossicità con *Vibrio fischeri*. Nello specifico, è stato utilizzato il ceppo NRRL-B-11177, un batterio marino Gram-negativo, mobile appartenente alla famiglia delle *Vibrionaceae*. Il batterio, dalle caratteristiche proprietà bioluminescenti, si muove per mezzo di flagelli e in natura si trova in simbiosi con vari animali marini. L'emissione di luce è mediata dall'enzima luciferasi e l'intensità dell'emissione è proporzionale all'entità del metabolismo energetico; qualunque alterazione del metabolismo comporta una variazione dell'emissione luminosa (sia in aumento che in diminuzione). Il test consente di valutare la tossicità acuta dei campioni, utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dal *Vibrio fischeri*.

I risultati analitici hanno messo in evidenza che sia nei campioni del sito in esame (Capo Teulada) che nei campioni del sito preso come "controllo" (paraggi di Capo Spartivento), si è verificata una reazione paradosso di ormesi⁵ (Amendola *et al.*, 2008; Calabrese e Baldwin, 2002), ovvero un aumento di bioluminescenza dovuto, molto probabilmente, alla presenza di nutrienti che causano biostimolazione nei batteri bioluminescenti accelerandone il metabolismo e determinando così un aumento dell'emissione luminosa. Non si è comunque evidenziata una differenza significativa nelle reazioni dei batteri bioluminescenti esposti ai substrati dei due siti.

Le attività messe in atto per questi *bioassay* dai laboratori del Dipartimento Provinciale di Cagliari dell'ARPAS sono descritte nella relazione in allegato 1.

⁵ L'ormési dal verbo greco *ormao*, che significa stimolare, è una relazione dose/risposta caratterizzata da un effetto bifasico; molti organismi/sistemi biologici esposti ad un'ampia gamma di stimoli mostrano risposte opposte a seconda della dose. Può essere considerata una funzione adattativa caratterizzata da una risposta bifasica dose-dipendente, che si manifesta come conseguenza dell'esposizione a un *range* molto ampio di stimoli (Calabrese e Baldwin, 2002; Amendola, Cerioli, Migliore, 2008).

5.1.3 Bioassay su tessuti ittici di esemplari di *Conger conger* L. 1758 e *Muraena helena* L. 1758

Al fine di valutare gli effetti ecotossicologici sul *biota* riconducibili alla presenza di residuati di origine militare presenti sul fondale marino prossimo al poligono di Capo Teulada, sono stati analizzati i *biomarker* in due specie ittiche dalle abitudini stanziali rappresentative dell'area di studio, *Conger conger* L. 1758 (grongo) e *Muraena helena* L. 1758 (murena).

Per *biomarker* si intende una variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo la quale fornisce l'evidenza di un'esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti.

Una prima valutazione dello stato di salute degli organismi è stata effettuata utilizzando l'indice epatosomatico (HSI: peso fegato/peso intero animale x 100), che fornisce una stima dello sviluppo del fegato, organo in cui sono concentrate molte delle attività di detossificazione dell'organismo. Questo indice può essere considerato tra gli indicatori biologici che si manifestano a livello fisiologico nell'organismo, non è specifico per una determinata classe di contaminanti ed assume generalmente valori più elevati in organismi che vivono in condizioni più stressanti. Tuttavia, esso può dipendere anche da altri fattori quali età degli individui, lo stato nutrizionale e la quantità di ormoni riproduttivi in circolo.

Oltre all'indice sopracitato, sugli organismi catturati nell'area di studio sono state eseguite le analisi di *biomarker* finalizzate alla valutazione dei seguenti effetti:

- a) neurotossicità, misurata nel cervello mediante l'inibizione dell'acetilcolinesterasi (AChE);
- b) genotossicità, misurata nelle cellule eritrocitiche mediante la frequenza dei micronuclei (MN);
- c) biotrasformazione, mediante analisi dell'attività dell'7-etoxiresorufina O-deetilasi (EROD, fase I) e delle glutathione-S transferasi (GSTs, fase II).

Oltre alle analisi sopracitate, è stata misurata anche l'attività della catalasi (CAT), quale indicazione di un eventuale stress ossidativo. In totale sono stati prelevati organi e/o tessuti da 13 esemplari appartenenti alla specie *Conger conger* e 19 esemplari appartenenti alla specie *Muraena helena* distribuiti tra l'area di Capo Teulada ed il sito di "controllo" Capo Spartivento.

I risultati ottenuti dalle analisi dei *biomarker* effettuate nelle due specie ittiche stanziali catturate nell'area di Capo Teulada, *C. conger* e *M. helena*, hanno evidenziato l'assenza di effetti rilevanti per le risposte biologiche ricercate rispetto a quanto misurato in organismi prelevati nell'area di Capo Spartivento. Tali risultati sono in accordo con l'assenza di differenze rilevanti nell'indice epatosomatico calcolato nelle due aree per ciascuna delle due specie catturate.

In particolare, non sono stati rilevati effetti di neurotossicità né di stress ossidativo né è stata rilevata alterazione nel sistema di biotrasformazione, sia al livello di enzimi coinvolti nella fase I che di enzimi coinvolti nella fase II del processo. Anche per ciò che concerne la genotossicità, non sono stati misurati aumenti della frequenza di micronuclei nelle cellule eritrocitiche.

Rispetto alle specie indagate e ai *biomarker* analizzati, i risultati dello studio non hanno evidenziato alcun tipo di effetto biologico e permettono di escludere in conseguenza, effetti dovuti alla presenza dei residui bellici nell'area di Capo Teulada.

Le attività messe in atto per questi *bioassay* dal Laboratorio di analisi di Biomarker del CN-LAB dell'ISPRA sono descritte nella relazione in allegato 2.

5.1.4 Bioassay su esemplari di riccio di mare della specie *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816)

Sono stati condotti ulteriori test biologici avvalendosi di bioindicatori quali i ricci di mare, la cui affidabilità è riconosciuta a livello mondiale: i test di fecondazione e di sviluppo embrionale, infatti, risultano essere i più attendibili per il monitoraggio dell'inquinamento marino. La specie *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) è stata studiata quale specie sentinella in grado di fornire, tramite lo studio dello sviluppo larvale, importanti informazioni su possibili fattori di stress presenti nell'area di raccolta degli organismi (foto 48 e 49).

Il saggio biologico di sviluppo embrionale con il riccio di mare ha come *endpoint* lo sviluppo della larva di *P. lividus* nella forma di pluteo a quattro braccia. Il saggio di sviluppo embrionale con *P. lividus* è stato eseguito sulla base delle metodiche riportate nel quaderno di ecotossicologia ISPRA n. 11/2017 (Sartori *et al.*, 2017).



Foto 48 e 49: uova e sperma di *Paracentrotus lividus* (Foto Silvia Giuliani, ISPRA)

I risultati del test di sviluppo embrionale con *P. lividus* condotto su esemplari prelevati in due aree all'interno del Poligono militare di Capo Teulada e in due aree limitrofe esterne al poligono non hanno evidenziato particolari criticità. Nel complesso, sulla base delle percentuali di plutei normoformati e dei valori di EC_{50} ottenuti con il tossico di riferimento ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$), la popolazione di ricci di mare che vive negli specchi acquei del poligono di tiro e nelle aree limitrofe, gode di buona salute (figura 14).

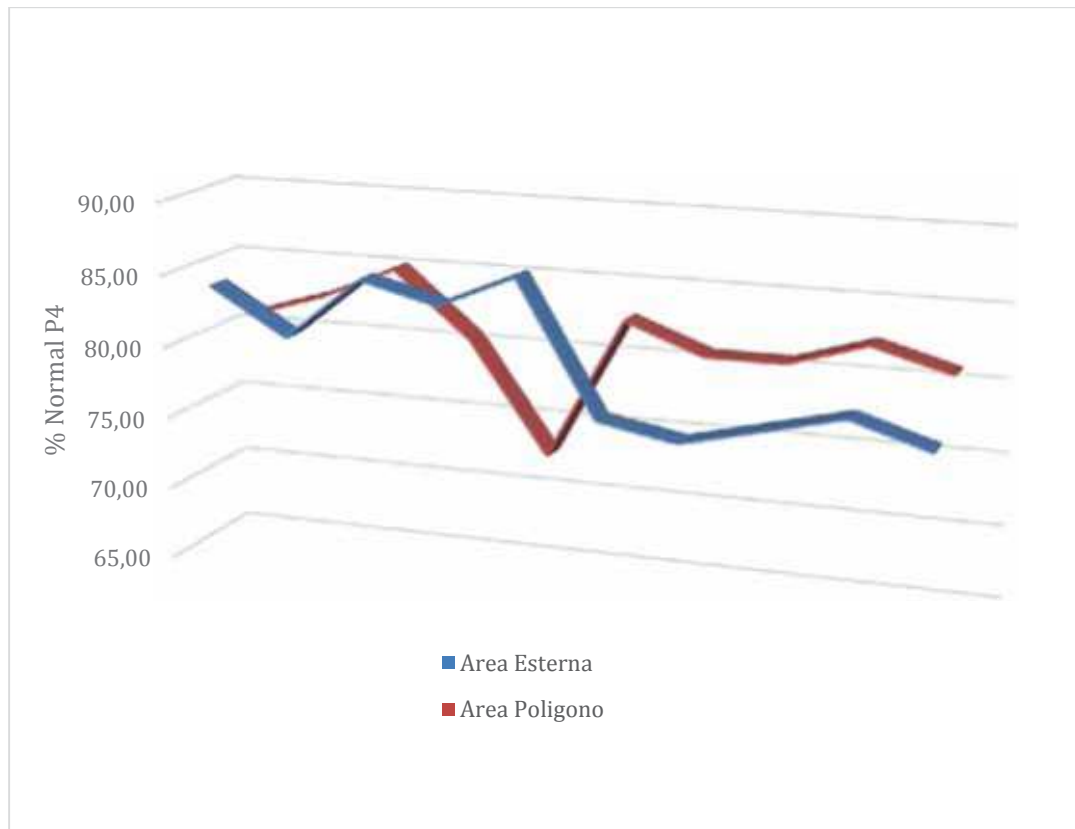


Figura 54: percentuali plutei normoformati (P4) nelle prove condotte su individui di *P. lividus* prelevati all'interno e all'esterno del poligono di Capo Teulada

Lo studio dell'insorgenza del danno al DNA attraverso la determinazione della frequenza dei micronuclei, condotto con la collaborazione di ricercatori dell'Università Politecnica delle Marche, Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente, non ha purtroppo dato risultati apprezzabili a causa di impedimenti incontrati durante la fase di test. Nello studio gli embrioni della specie *P. lividus* sono stati esposti ad alcune delle matrici ambientali da testare in modo da ottenere delle informazioni preliminari anche sui loro possibili effetti genotossici. Pur non permettendo di acquisire il dato come "probante", a causa della sua inconsistenza statistica, si può notare che i pochi campioni analizzati hanno fornito una risposta al test analoga in entrambi i siti di confronto.

Le attività messe in atto per questi *bioassay*, condotti in collaborazione con colleghi della Sezione sperimentale di Livorno per la valutazione del rischio ecologico in aree marino-costiere del CN-COS ISPRA e del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche, sono descritte nella relazione in allegato 3.

5.1.5 Spettrometria gamma di campioni di sedimenti (indagini radiometriche)

Le analisi radiometriche hanno riguardato la presenza di Th-232 in quanto notoriamente utilizzato nei contesti addestrativi del poligono di Capo Teulada fino alla fine degli anni 90. In merito agli isotopi dell'uranio, se pure mai utilizzato nei poligoni militari italiani, si è ritenuta comunque opportuna una determinazione analitica al fine di un controllo. Si fa presente che tutti gli isotopi in esame sono presenti in natura.

Uranio

L'uranio è un elemento chimico di origine naturale, presente in concentrazioni molto variabili in tutti i comparti dell'ambiente, ivi inclusi gli organismi viventi. In natura sono presenti tre isotopi dell'uranio: Uranio-234 (U-234), Uranio-235 (U-235) e Uranio-238



Foto 50: l'interno del missile anticarro MILAN

Il torio è un elemento metallico radioattivo che nella crosta terrestre raggiunge una percentuale di 0,002%. In natura si trova con un'abbondanza relativa maggiore del 99%, sotto forma di Th-232, i principali minerali che contengono torio sono la torite e la monazite.

(U-238). In ambito militare viene utilizzato l'uranio impoverito (DU) (e le leghe di uranio-titanio associate) che si distingue dall'uranio naturale per un più basso contenuto di U-235 e di U-234 e un più alto contenuto di U-238. L'uranio impoverito è impiegato in ambito militare come componente delle blindature dei carri pesanti e nelle munizioni perforanti delle blindature. L'elevata densità ($19,0 \text{ g/cm}^3$), resistenza, le sue proprietà piroforiche e l'elevato punto di fusione, consentono l'impiego del DU come perforatore cinetico in munizioni di vario tipo e fanno del DU un efficace materiale per realizzare le armi anti-carro.

Torio

Il torio è un elemento metallico

In ambito militare il Torio-232 (Th-232) è stato utilizzato nei missili MILAN (acronimo del francese *Missile d'Infanterie Léger ANTichar*, ovvero missile filoguidato anticarro per fanteria leggera) non per le sue proprietà radioattive, ma nel sistema di guida notturna del missile (foto 50 e 51). Nei missili prodotti fino all'anno 1999 era infatti presente un componente a forma di "lunetta" costituito da una miscela contenente torio sotto forma di ossido (torina) che aveva il compito, una volta "accesa", di surriscaldare una lastra composta da Ta (tantalio) che, portato alle alte temperature, emetteva radiazione infrarossa che veniva utilizzata come tracciante notturno per la guida dell'arma. Ogni lunetta di torio delle dimensioni di qualche centimetro, conteneva complessivamente circa tre grammi di ossido di torio per un'attività complessiva di circa 20.000 Becquerel. Dopo il 2000 tutte le partite di missili MILAN in dotazione alle varie Forze armate francesi, italiane e di altri eserciti sono state ritirate perché l'amministrazione della Difesa francese aveva segnalato la presenza del Th-232 e aveva ritenuto opportuno ritirare questo tipo di armamento e impedirne l'uso.



Foto 51: il militare mostra come nell'alloggiamento della lunetta di torina di un rottame di missile MILAN non si rilevi radioattività gamma anomala

Il Th-232, l'U-238 e l'U-235 sono noti come radionuclidi primordiali, ovvero presenti sin dal momento della formazione della terra. Se non intervengono eventi alteranti che introducono o sottraggono radionuclidi delle catene radioattive, come fattori ambientali che agiscono dinamicamente attraverso processi chimico-fisici (solubilità, trasporto, diffusione, etc.) oppure fattori antropici, queste serie si trovano in condizione di equilibrio secolare ossia l'attività del discendente è uguale a quella del progenitore.

Serie del Th-232

Considerando i valori di concentrazione di attività dei radionuclidi della serie del Th-232 nel sito di Capo Teulada paragonabili a quelli rilevati nel sito di Capo Spartivento e la condizione di equilibrio riscontrata in tutti i campioni, non è osservabile allo stato attuale e nei limiti della sensibilità strumentale, un eventuale contributo antropico derivante dall'uso di missili MILAN nel poligono.

Serie del U-238

Analizzando i risultati della serie dell'U-238 si osserva un disequilibrio tra i radionuclidi della catena. Ciò è evidente sia nei campioni prelevati nel sito d'indagine che in quelli del sito di confronto. Si ritiene che il disequilibrio sia dovuto alle dinamiche chimico-fisiche ambientali. In un ambiente come quello marino, infatti, dove sussistono continui scambi dinamici tra i comparti (sedimenti, acqua, biota, etc.) l'equilibrio tra gli elementi della serie dell'U-238 può essere alterato dai diversi coefficienti di solubilità dei composti del radio rispetto a quelli del torio, dell'uranio e del piombo. Comunque, le concentrazioni di U-238 nei campioni prelevati nel sito d'indagine sono confrontabili con i valori di concentrazione di U-238 dei campioni del sito di confronto. In merito al rapporto isotopico tra l'U-238 e l'U-235, indicatore della presenza di uranio impoverito, confrontando i valori di concentrazione di attività dell'U-235 e dell'U-238 in tutti i campioni, si osserva che il loro rapporto isotopico, entro le incertezze analitiche, è in linea con la tipica abbondanza isotopica che si trova in natura. Pertanto, non risulta osservabile la presenza di Uranio impoverito.

Le attività messe in atto per queste analisi, condotte dai colleghi del laboratorio di misure radiometriche ex ISPRA, ora ISIN, sono descritte nella relazione in allegato 4.

5.2 Poligono di Torre Veneri

Analogamente a quanto fatto per i fondali del poligono di Capo Teulada, l'esame della letteratura reperita, le visite dei luoghi, le prospezioni elettroacustiche e infine, le immersioni sui bersagli selezionati, hanno consentito di affinare e adattare il piano degli accertamenti delle esigenze ambientali di rimozione.

Verificato che i residuati presenti sui fondali esplorati sono ascrivibili a un'unica tipologia di munizionamento e che questo, per sua costruzione, non può rilasciare alcuna delle molecole inquinanti che avremmo potuto ricercare mediante analisi chimiche o saggiarne gli effetti sul *biota* mediante biotest, si è concluso che dette analisi non fossero necessarie. Purtuttavia, durante le verifiche in mare dei bersagli cartografati, sono stati prelevati i campioni di sedimento di cui si è reso conto nei paragrafi precedenti. Detti campioni, prelevati nelle immediate vicinanze dei residuati caratterizzati in immersione e conservati nei laboratori ISPRA, sarebbero stati destinati alle analisi granulometriche e per il rilievo del carbonio organico totale ma a seguito di quanto sopra, annotate le loro caratteristiche visibili a occhio nudo, si è ritenuto non necessario e proficuo procedere.

6 Valutazione delle esigenze di rimozione

Secondo la definizione formulata dal gruppo di esperti incaricato dalle Nazioni Unite denominato GESAMP (IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP *joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Pollution*), l'inquinamento marino consiste "... nell'introduzione diretta o indiretta da parte dell'uomo nell'ambiente marino di sostanze o di energia capaci di produrre effetti negativi sulle risorse biologiche, sulla salute umana, sulle attività marittime, incluse quelle alieutiche e sulla qualità delle acque".

Gli studi multidisciplinari da noi intrapresi allo scopo di fornire elementi di conoscenza ai decisori attengono alle questioni di se e quanto i residuati di origine militare dispersi a seguito di attività esercitative sui fondali antistanti i due poligoni siano inquinanti marini secondo la definizione data dal GESAMP. Nel contesto dato, tenuto anche conto delle restrizioni alla frequentazione di questi tratti di fondale marino a tutela della pubblica incolumità, le "esigenze di rimozione" di cui tener conto non possono che riferirsi alla "qualità" degli ambienti marini sottoposti a questa peculiare forma di "pressione". Se infatti, secondo la definizione di inquinamento marino sopra riportata, entrambi i siti sarebbero "inquinati" perché vi sono impediti alcune "attività marittime" e l'esplosione accidentale di un residuo potrebbe senz'altro anche "... produrre effetti negativi ... sulla salute umana ...", queste eventualità sono superate dall'essere le aree in questione adibite a un uso precipuo e ritenuto prevalente e precluse alla frequentazione di persone estranee a detto uso. Appare evidente, in quest'accezione, che il tipo di "inquinamento marino" riscontrabile nei due siti, a prescindere dai risultati delle nostre indagini e quindi dall'eventualità che siano

riscontrabili “... effetti negativi sulle risorse biologiche ...”, non possa sostenere di per sé la rimozione delle sue cause, vale a dire la presenza di residuati.

Nel caso di Capo Teulada, considerate anche polveri e detriti che gli agenti meteorici e le deflagrazioni recapitano in mare dalla penisola (Kirchner *et al.*, 1993), a causa del forte idrodinamismo che caratterizza le acque che la circondano, i potenziali inquinanti che interessano le acque e i fondali non si è rilevato che possano persistere in questi comparti tanto da esercitare e permettere di rilevare alcuno degli effetti delineati nella definizione di inquinamento marino, in particolare “... produrre effetti negativi sulle risorse biologiche ... e sulla qualità delle acque”. Tuttavia, è innegabile che anche la sola presenza di manufatti sul fondale possa essere causa di nocimento al *biota* come al godimento di beni ambientali quali il paesaggio sottomarino. Come riscontrato durante le indagini, i residuati interagiscono con il *biota* in varie forme; ad esempio, offrendo sostegno e riparo a organismi bentonici e bentonectonici che non avrebbero potuto popolare quei fondali in assenza di substrati duri.

Nei casi in esame, in particolare per quel che riguarda il poligono di Torre Veneri con una prevalenza di fondali mobili, un effetto negativo sull'ambiente del tipo ora delineato, l'alterazione persistente di habitat, è atteso a prescindere dalla verifica della potenziale capacità di questi manufatti di rilasciare molecole inquinanti, capaci quindi di arrecare nocimento al *biota* per gli effetti fisiologici, comportamentali, ecc. che possono arrecarvi. Nei casi in esame, i risultati delle analisi e dei test effettuati mostrano che questa evenienza non è stata rilevata; anche polveri e detriti che gli agenti meteorici e le deflagrazioni recapitano in mare dalla penisola di Capo Teulada, al pari dei residuati sommersi, non hanno fatto rilevare effetti oggi misurabili in termini ecotossicologici e non sono rilevabili con la ricerca per via analitica di concentrazioni di elementi in traccia in matrici marine (organismi, sedimenti, acqua), soprattutto a causa del forte idrodinamismo che caratterizza le acque che la circondano e delle caratteristiche chimico-fisiche delle molecole da ricercarsi (scarsamente bioaccumulabili e solubili).

Nel caso di Capo Teulada, dove sui fondali sono risultati dispersi anche alcuni ordigni inesplosi, si ritiene dunque che gli effetti della corrosione marina sul contenuto potenzialmente inquinante di questi non siano sensibili. Vale a dire che le condizioni edafiche presenti sui bassi fondali del Capo sono tali da non consentire l'accumulo di possibili inquinanti persistenti, ascrivibili ai residuati, nei sedimenti e i

risultati dello studio sulla distribuzione granulometrica di questi e i biotest confermano questa conclusione.

Nel caso di Torre Veneri, si è accertato che i bersagli individuati sui fondali con le prospezioni elettroacustiche sono residui di munizioni costituiti principalmente da alluminio e privi di carica esplosiva. Un'indagine sul tenore di alluminio come di altri metalli nei sedimenti non sarebbe stata proficua perché l'alluminio è ubiquitario e individuare anomalie nel tenore di altri metalli, ipoteticamente in relazione con le attività "a fuoco" del poligono, avrebbe richiesto la conoscenza delle caratteristiche biogeochimiche del sito. Si è quindi stabilito di non effettuare analisi di alcun tipo. Si è escluso, infatti, che i metalli eventualmente riferibili al munizionamento da carri, tungsteno e uranio impoverito tra questi, possano essere reperibili sui fondali indagati dato il fatto che la gittata di munizioni di questo tipo, qualora siano state utilizzate nel poligono di Torre Veneri, raggiungerebbe distanze dalla costa ben di là dalle capacità d'indagine messe in campo. Inoltre, la dispersione casuale di questi ipotetici oggetti in un'area di fondale tanto più vasta, tanto più è lontana dalla costa dalla quale sono stati sparati, rende inconsistente la possibilità che una minaccia d'inquinamento o un effettivo inquinamento da metalli sia concreta o comunque rilevabile.

I residui del munizionamento affondati a Torre Veneri non possono dunque essere considerati una minaccia ambientale per la loro capacità di rilasciare inquinanti benché riteniamo che le vernici utilizzate per colorare i proiettili da addestramento meritino approfondimenti. I tentativi sin qui esperiti per ottenere dai costruttori delle due tipologie di munizioni oggi in uso, dettagli sulla composizione di dette vernici non hanno avuto successo e vorremmo valutare le ragioni e l'opportunità di eseguire, anche alla luce dei risultati di questi auspicati approfondimenti, analisi mediante l'impiego di "campionatori passivi" (Rosen *et al.*, 2018), volti alla quantificazione dei tenori di alcuni contaminanti in stazioni selezionate nelle acque marine dei poligoni da investigare e in siti di controllo.

Nelle righe che seguono, si delineano, per i due poligoni, le conclusioni cui ci portano i risultati delle indagini sin qui effettuate. In generale, si ritiene che i risultati ottenuti sostengano con robustezza le ipotesi formulate in fase di progettazione e poi testate con l'esecuzione del programma. Gli studi qui presentati, a parere di chi scrive, hanno anche offerto l'opportunità di contribuire a colmare alcune conoscenze circa il destino ambientale dei contaminanti e inquinanti che possono essere rilasciati in ambienti marini costieri da residuati di origine militare. In particolare, possiamo

affermare che la risposta al quesito postoci dallo SME è, in gran parte, legata alle condizioni edafiche del sito e alla tipologia di ordigni che possono “interagirvi”, quindi sito-specifica.

Nel credere di essere stati capaci di sviluppare un approccio metodologico innovativo e di aver applicato strumenti d'indagine efficaci nelle circostanze date, vorremmo poter verificare i nostri convincimenti sperimentando l'approccio in condizioni edafiche e di tipologia di residuati molto differenti da quelle incontrate con questo studio. Arricchendo le nostre esperienze con l'affrontare, ad esempio, la presenza di residuati in tratti di mare costieri caratterizzati da fondali mobili costituiti prevalentemente da peliti, ci consentirebbe di traguardare l'obiettivo di poter sempre meglio contribuire alla tutela degli ambienti marini e costieri e alla ricerca della sostenibilità ambientale, anche di attività apparentemente difficilmente compatibili.

6.1 Esigenze di rimozione di residuati dai fondali del poligono di Capo Teulada

Le indagini svolte sul campo a Capo Teulada hanno consentito di evidenziare aspetti e caratteristiche ambientali marine non già descritte nelle poche osservazioni scientifiche condotte sinora nei tratti di mare d'interesse. Per quel che riguarda il territorio nel quale insiste il Poligono, caratteristiche naturalistiche, dettagli sull'uso e notizie d'interesse si trovano nel lavoro di Sirigu *et al.* del 2014 ma per quel che riguarda i fondali si sono reperite poche descrizioni degne di nota; tra queste uno studio, anche questo del Dipartimento Provinciale di Cagliari dell'ARPAS, sulle macroalghe che popolano il versante occidentale della penisola cosiddetta “delta” che ha fatto rilevare “... sulla base dell'EQB Macroalghe⁶ ... uno stato ecologico elevato” (Anedda *et al.*, 2014).

I risultati degli studi effettuati sulla distribuzione granulometrica dei sedimenti, sul tenore di radionuclidi in essi e sugli effetti di eventuali inquinanti specialmente presenti nelle acque e nei sedimenti di Capo Teulada attestano che non vi sono evidenze di inquinamento di natura chimica che possa essere ascrivibile alle esercitazioni “a fuoco” condotte con un'ampia varietà di munizionamento.

⁶ La Direttiva Quadro sulle acque (2000/60/CE) recepita con D.lgs. 152/06 e s.m.i., prevede l'impiego d'indicatori biologici per la classificazione dello stato ecologico dei corpi idrici. La stessa Direttiva indica nelle macroalghe uno tra gli elementi di Qualità Biologica (EQB) da utilizzare per la classificazione dello stato ecologico delle acque marino-costiere nel monitoraggio effettuato dalla Regione Sardegna. Il D.M. 260/2010 prevede, per la classificazione in base a tale EQB, l'utilizzo dell'indice CARLIT (Ballesteros *et al.*, 2007).

Rispetto alle metodologie impiegate, si può concludere che queste si sono rilevate efficaci nel contesto nel quale si sono adoperate; nel caso di Capo Teulada, perché i sedimenti nei quali si sarebbero potute trovare tracce di inquinanti hanno una componente fine scarsa, insufficiente a far ritenere plausibile che l'analisi di elementi in traccia possa evidenziare eventuali contaminazioni attribuibili alle molecole elencate in tabella 1. Questa constatazione trova giustificazione, ragionevolmente, nelle caratteristiche idrologiche del sito; le forti correnti che interessano il Capo rimuovono le particelle di sedimento più fini e con esse i possibili microinquinanti trasportando e disperdendo, le une e gli altri, in aree distanti dalla costa dove la velocità della corrente ne consente la deposizione (AA.VV., 2015).

Resta quindi da considerare se vi sono altri possibili "effetti nocivi" sugli ambienti marini interessati. Appare evidente che, esclusa la possibilità che quanto rilasciato in mare a causa di esplosioni, deflagrazioni e degli effetti di fenomeni di corrosione marina e lisciviazione possa essere rintracciato, rimangono da considerare soprattutto gli effetti sugli habitat. Quelli sommersi incontrati nel sito di Capo Teulada, sono caratterizzati da una prevalenza di substrati duri e sabbie grossolane, ambienti che offrono, quindi, possibilità d'insediamento e rifugio a organismi del benthos e bentonectonici, quasi al pari di quanto possa fare un manufatto, nel caso specifico, un residuo di origine militare. Tuttavia, benché queste presenze non possano essere ritenute "sorgenti sommerse d'inquinamento" e nella maggior parte dei casi osservati sia apparso evidente che non costituiscono un'alterazione significativa di habitat naturali, i residui sui fondali costieri rappresentano una minaccia ambientale sufficiente a giustificare la programmazione di interventi di rimozione per prevenire possibili fenomeni inquinanti. Misure di prevenzione da questa minaccia sono, innanzitutto, l'impegno a far sì che sempre meno oggetti potenzialmente inquinanti finiscano accidentalmente in mare, imponendo, ad esempio, l'impiego di munizionamento da esercitazione meglio compatibile con la possibilità di sua dispersione negli ambienti. Per quanto riguarda le attività di rimozione, queste assumono la valenza di misure di prevenzione e tutela dello stato ecologico degli ambienti e delle qualità paesaggistiche, anche sommerse, del sito costiero; infatti ordigni e rottami presenti nelle fasce batimetriche più prossime alla costa potrebbero essere interessati dalla movimentazione verso il bagnasciuga a opera dei marosi. Detti residui, anche se non capaci di produrre gli effetti conseguenti a un'esplosione, possono comunque arrecare danni meccanici e localmente, inquinamento chimico dovuto al rilascio "massivo" di molecole potenzialmente inquinanti conseguente alla rottura dell'eventuale contenitore.

La rimozione di ordigni e rottami si raccomanda sia eseguita adottando cautele ottimizzate per le caratteristiche ambientali del sito (foto 52). In particolare, ogni cautela dovrebbe essere volta a evitare che ne soffrano i popolamenti animali e vegetali, qui anche costituiti da specie di particolare pregio come *Posidonia oceanica* (L.) Delile, in conseguenza di esplosioni per eliminare ordigni esplodenti e di fenomeni sensibili di intorbidamento, rottura meccanica, seppellimento, ecc.



Foto 52: un cartello in prossimità del porto turistico mostra le principali caratteristiche del Sito di Importanza Comunitaria ITB040024 "Isola Rossa e Capo Teulada"

6.2 Esigenze di rimozione dai fondali del poligono di Torre Veneri

Nel caso dei fondali su cui si affaccia il poligono di Torre Veneri, le indagini esperite con i sommozzatori del 9° Reggimento "Col Moschin" e la constatazione che i residui del munizionamento che accidentalmente è possibile rinvenire sui fondali costieri è costituito prevalentemente da alluminio e che non è possibile rilasciare molecole di esplosivi o altri inquinanti rintracciabili, considerato che non è stato possibile conoscere la composizione delle vernici che li contraddistinguono e di conseguenza, ipotizzare che questa possa costituire una sorgente sommersa d'inquinamento "tracciabile", si possono esprimere le valutazioni che seguono.

I residui dei colpi di artiglieria che si sono accumulati nel tempo in prossimità della battaglia costituiscono, per sé, una forma d'inquinamento di fondali mobili. Laddove

organismi bentonici sessili non avrebbero avuto modo di insediarsi (ad esempio, gli Anellidi tubicoli e le forme sessili e incrostanti evidenti nelle fotografie dei residuati; foto 42 ÷ 45), grazie alla presenza di substrati duri artificiali persistenti nel tempo, un'alterazione dell'habitat naturale dovuta alla presenza dei residuati, possono svilupparsi in popolamenti e comunità *fouling*. La valutazione del fatto se un'alterazione di questo tipo di un ambiente naturale possa o non possa offrire anche benefici, è questione aperta e non attinente agli scopi del progetto.

Si raccomanda, quindi, di porre in essere la rimozione dei residuati presenti sui bassi fondali, di natura mobile, antistanti il poligono. Al fine di evitare che detta rimozione possa causare effetti collaterali nocivi sui popolamenti naturali, tra questi anche costituiti da specie di particolare pregio, ad esempio *Cymodocea nodosa* (Ucria) Asch. e *Posidonia oceanica* (L.) Delile, ogni cautela ambientale dovrebbe essere volta a limitare se non impedire, fenomeni di intorbidamento, rotture meccaniche, seppellimento, ecc.

7 Letteratura consultata

Le informazioni che è stato possibile desumere dalla letteratura sinora reperita, integrate dalle conoscenze acquisite con le campagne svolte in mare, hanno permesso di selezionare le matrici biologiche d'interesse analitico e gli approcci metodologici, d'individuare metodologie di accertamento ed elaborare disegni di campionamento. Nella lista che segue, si citano i lavori che si sono consultati più di recente inerenti ai diversi aspetti di una valutazione del se e del quanto i residui delle esercitazioni “a fuoco” possano causare effetti deleteri sensibili a carico degli organismi che popolano i fondali interessati.

AA.VV., 2018. Pr. Poseidone: preparazione campioni per analisi di biomarker su fauna ittica. Laboratorio Analisi Biomarker, CN-LAB_ECO maggio 2018.

AA.VV., 2015. Caratterizzazione ambientale dell'area marino costiera prospiciente il sito di bonifica di interesse nazionale del Sulcis – Iglesiente – Guspinese. Risultati analitici e valutazione dei dati. Relazione tecnica Progetto CII-Pr-SA-SI-01.08. ISPRA, novembre 2015.

AA.VV., 2003. Collection and preparation of bottom sediment samples for analysis of radionuclides and trace elements. IAEA-TECDOC-1360 ISBN 92-0-109003-X ISSN 1011-4289. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.

Alcaro L., Della Torre C., Petochi T., Sammarini V., Matiddi M., Corsi I., Baroni D., Giordano P., Marino G., Focardi S., Amato E., 2012. Studies on Environmental Effects of Underwater Chemical Munitions in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea). *Marine Technology Society Journal*, 46 (3): 10÷20.

Alcaro L., Amato E., Giordano P., Mannozi M., Torri G., Innocenzi V., Innocenzi P., 2014. Linee guida e cautele ambientali per la rimozione di rottami metallici dai fondali prossimi al poligono sperimentale e di addestramento interforze Salto di Quirra (PISQ). ISPRA (non disponibile al pubblico).

Amato E., 2019. Progetto “Poligoni”: prelievi per analisi radiometriche su campioni di sedimento dei fondali marini del Poligono militare di Capo Teulada (CA).

Amato E., 2008. Ammunitions Dumping Sites into the Mediterranean Sea. Report. UNEP/MAP, Athens.

Amato E., Alcaro L., Corsi I., Della Torre C., Farchi C., Focardi S., Marino G., Tursi A., 2005. An integrated ecotoxicological approach to assess the effects of pollutants released by unexploded chemical ordnance dumped in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea). *Marine Biology* 149 (1), 17÷23.

Amato E., Alcaro L., Della Torre C., Farchi C., Penna M., 2003. Contaminanti rilasciati dalla corrosione di residui bellici sui fondali dell'isola Pianosa (Isole Tremiti): bioaccumulo e biomarker in *Conger conger* (L., 1758). ICRAM, Relazione Finale del P.R. 160 “ACAB II” (Armi Chimiche Affondate e Benthos, fase II). <http://www.isprambiente.gov.it/files/temi/emergenze-ambientali-in-mare/ACABII.pdf>

Amato E., Alcaro L., Focardi S., Marino G., Tursi A., Farchi C., Corsi I., Borghini F., 2001a. Fate of Persistent Chemical Warfare Agents in a Benthic Ecosystem of the Southern Adriatic Sea. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, 36: 105.

Amato E., Alcaro L., 2001b. Manuale illustrativo delle misure precauzionali da adottare in caso di salpamento di residui bellici mediante reti da traino. Con particolare riferimento a quelli a “caricamento speciale” affondati nel Basso Adriatico. ICRAM e Ministero dell'Ambiente. 42 pp. www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/manuali-lineeguida/ACABmanual.pdf.

Amendola A., Cerioli N. L., Migliore L., 2006. Ormesi: la rivoluzione dose/risposta. Monografie APAT, pp. 1÷31.

Anedda R., Cadeddu R., Braglia A., Puddu M., Farris C., 2014. Monitoraggio corpi idrici marino-costieri D.Lgs. 152/06 e s.m.i.. Monitoraggio EQB Macroalghe - metodo CARLIT. ARPA Sardegna – Stagione primaverile 2013. Dipartimento Provinciale di Cagliari dell'Agenzia Regionale per la Protezione dell'ambiente della Sardegna (ARPAS).

Ballesteros E., Torras X., Pinedo S, García M., Mangialajo L., Torres de M. A, 2007. New methodology based on littoral community cartography for the implementation of the European Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin*, 55: 172÷180.

Beck A.J., Gledhill M., Schlosser C., Stamer B., Böttcher C., Sternheim J., Greinert J., Achterberg E.P., 2018. Spread, Behavior, and Ecosystem Consequences of Conventional Munitions Compounds in Coastal Marine Waters. *Front. Mar. Sci.* 5:141. doi: 10.3389/fmars.2018.00141.

Bełdowski J., Been R., Turmus E. K. editors, 2018. Towards the Monitoring of Dumped Munitions Threat (MODUM). A Study of Chemical Munitions Dumpsites in the Baltic Sea. NATO Science for Peace and Security Series - C: Environmental Security. PP 240, Published by Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Calabrese E.J., Baldwin L.A., 2002. Defining hormesis, *Human and Experimental Toxicology*, Vol. 21, pp. 91÷97.

Corsi I., Bonacci S., Chiea R., Farchi C., Della Torre C., Amato E., Focardi S., 2004. Application of a multimarkers approach for the assessment of TNT-exposure in fish: a case study in the Tremiti Islands marine protected area. *Biol. Mar. Medit.*, 11 (2): 65÷69.

Della Torre C., Petochi T., Corsi I., Dinardo M.M., Baroni D., Alcaro L., Focardi S., Tursi A., Marino G., Frigeri A., Amato E., 2010. DNA damage, severe organ lesions and high muscle levels of As and Hg in two benthic fish species from a chemical warfare agent dumping site in the Mediterranean Sea. *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 2136÷2145.

Della Torre C., Corsi I., Alcaro L., Amato E., Focardi S., 2006. Explosive research: acute sub-lethal responses in eels exposed to 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). Laboratory and field study. *Marine Environmental Research* 62 (6): S399.

Della Torre C., Petochi T., Farchi C., Corsi I., Dinardo M.M., Sammarini V., Alcaro L., Mechelli L., Focardi S., Tursi A., Marino G., Amato E., 2013. Environmental hazard of yperite released at sea: sublethal toxic effects on fish. *J. Hazard. Mater.*, 246÷253. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.003>

Della Torre C., Petochi T., Corsi I., Dinardo M.M., Baroni D., Alcaro L., Focardi S., Tursi A., Marino G., Frigeri A., Amato E., 2010. DNA damage, severe organ lesions and high muscle levels of As and Hg in two benthic fish species from a chemical warfare agent dumping site in the Mediterranean Sea. *Sci. Total Environ.* 408, 2136÷2145.

Della Torre C., Corsi I., Arukwe A., Alcaro L., Amato E., Focardi S., 2008. Effects of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) on phase I and phase II biotransformation enzymes in European eel [*Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758)]. *Marine Environmental Research.* 66, 1: 9÷11.

Della Torre C., Corsi I., Alcaro L., Amato E., Focardi S., 2006. Explosive research: acute sub-lethal responses in eels exposed to 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT). Laboratory and field study. *Marine Environmental Research* 62 (6): S399.

Department of the Army, 2012. Ordnance Reef (HI-06) technology demonstration for the Remotely Operated Underwater Munitions Recovery System (ROUMRS) and Energetics Hazard Demilitarization System (EHDS). Report of Findings. Office of the Assistant Secretary of the Army for Installations, Energy and Environment. Final Report. October 2012.

Farchi C., Alcaro L., Corsi I., Della Torre C., Penna M., Balocchi C., Bonacci S., Amato E., Rinaldi A., Focardi S., 2003. Biomarkers d'esposizione e d'effetto in *Conger conger* (L.) in relazione alla presenza di residuati bellici sui fondali dell'isola di Pianosa (Arcipelago delle isole Tremiti): analisi preliminare. *Biol. Mar. Medit.*, 10 (2): 392÷395.

Focardi S., Corsi I., Borghini F., Amato E., Alcaro L., Bagni M., Tursi A., Mastrototaro F., 2000. Risk assessment on fish exposed to "mustard gas" in the Adriatic Sea: a preliminary study. *Global Environmental Issues in the 21st Century: Problems, Causes and Solutions*. Tenth Annual Meeting of SETAC Europe, Brighton (UK) 2000, pp. 209-210. (Abstract).

Gębka K., Beldowski J., Beldowska M., 2016. The impact of military activities on the concentration of mercury in soils of military training grounds and marine sediments. *Environ Sci Pollut Res* (2016) 23:23103. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7436-0>.

Hawari, J., Bhushan B., Monteil-Rivera F., Zhao Jian-Shen, 2006. (Bio)Degradation of RDX and HMX in marine/estuarine water and sediments. (GRANT N00014-03-1-0269). Performing Organization Biotechnology Research Institute, National Research Council of Canada, Montreal (Quebec), Canada.

Kirchner D.B., Gaydos J.C., Battigelli M.C., 1993. Combustion products of propellants and ammunition. In Occupational Health: The Soldier and the Industrial Base. Chapter 10, Vol. 2 of the Textbook of Military Medicine series [Part III. Disease and the Environment]. R Zajtchuk, senior editor, Office of the Surgeon General, The Borden Institute, Walter Reed Army Medical Center, Washington, DC, 1993.

Kotwicki L., Grzelak K., Beldowski J., 2016. Benthic communities in chemical munitions dumping site areas within the Baltic deeps with special focus on nematodes. Deep-Sea Res. II (2016), <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.12.012i>.

Lotufo G. R., George R. D., Belden J. B., Woodley C. M., Smith D. L., Rosen G., 2018. Investigation of polar organic chemical integrative sampler (POCIS) flow rate dependence for munition constituents in underwater environments. Environ. Monit. Assess. (2018) 190:171. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6558-x>.

Lotufo G. R., Chappell M. A., Price C. L., Ballentine M. L., Fuentes A. A., Bridges T. S., George R. D., Glisch E. J. and Carton G., 2017. Review and Synthesis of Evidence Regarding Environmental Risks Posed by Munitions Constituents (MC) in Aquatic Systems. The U.S. Army Engineer Research and Development Center (ERDC), Prepared for Strategic Environmental Research and Development Program (SERDP) Under Project ER-2341.

Lotufo G. R., Belden J. B., Fisher J. C., Chen Shou-Feng, Mowery R. A., Chambliss C. K., Rosen G., 2016. Accumulation and depuration of trinitrotoluene and related extractable and non-extractable (bound) residues in marine fish and mussels. Environmental Pollution 210 (2016) 129e136. 0269-7491/Published by Elsevier Ltd. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.11.049>.

Mannozi M., De la Fuente Origlia A., Alcaro L., Amato E., 2017. Trattamento, conservazione e analisi di campioni di sedimenti marini prelevati a Capo Teulada mediante operatori subacquei. Area “emergenze ambientali in mare”, Centro Nazionale per le crisi e le emergenze ambientali e il danno. Roma, 1 novembre 2017.

Nzengung V. A., Ben Redmond B., 2016. On-Site Neutralization of Civil War Munitions Recovered From an Underwater Environment. Marine Technology Society Journal. November/December 2016, Volume 50, Number 6.

Pascoe G. A., Kroeger K. Leisle D., Feldpausch R. J., 2010. Munition constituents: preliminary sediment screening criteria for the protection of marine benthic invertebrates. U.S. Navy Research. 40. <http://digitalcommons.unl.edu/usnavyresearch/40>.

Pinsino A., Della Torre C., Sammarini V., Bonaventura R., Amato E., Matranga V., 2008. Sea urchin coelomocytes as a novel cellular biosensor of environmental stress: a field study in the Tremiti Island Marine Protected Area, Southern Adriatic Sea, Italy. *Cell Biol Toxicol* (2008) 24:541–552. DOI [10.1007/s10565-008-9055-0](https://doi.org/10.1007/s10565-008-9055-0).

Rosen G., George R., Wild W., Lotufo G., Smith D., Belden J., 2018. Validation of Passive Sampling Devices for Monitoring of Munitions Constituents in Underwater Environments. Cost & Performance Report. U.S. Department of Defense, Environmental Restoration Project #ER-201433. February 2018. SPAWAR Systems Center, San Diego (CA) per Environmental Security Technology Certification Program (ESTCP), Alexandria, VA, U.S. <https://apps.dtic.mil/dtic/tr/fulltext/u2/1064244.pdf>

Rosen G., Colvin M., George R., Lotufo G., Woodley C., Smith D., Belden J., 2017. Technical Report 3076, Validation of Passive Sampling Devices for Monitoring of Munitions Constituents in Underwater Environments. SPAWAR Systems Center, San Diego (CA) per Environmental Security Technology Certification Program (ESTCP) Project ER-201433. September 2017. Space and Naval Warfare Systems Center Pacific (SSC Pacific), San Diego (CA), U.S.

Sartori D., Macchia S., Vitiello V., Morroni L., Onorati F., Pellegrini D., 2017. Saggio di fecondazione e saggio di sviluppo embrionale con il riccio di mare *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea). ISPRA, Quaderni Ricerca Marina n. 11/2017. A cura di Macchia S., Sartori D., Roma, pp 60. ISBN 978-88-448-0870-9. http://www.isprambiente.gov.it/files2017/pubblicazioni/quaderni/Quad_RicMar_11_17_Fecondaz_Riccio.pdf

Sirigu E., Boi M., Cappai M., 2014. La Penisola di Capo Teulada. Analisi preliminare dello stato ambientale. Relazione Tecnica. Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Sardegna – ARPAS, Dipartimento Provinciale di Cagliari, Servizio Energia. Maggio 2014.

Steevens J. A., Duke B. M., Lotufo G. R. and Bridges T. S., 2002. Toxicity of the explosives 2,4,6-Trinitrotoluene, Hexahydro-1,3,5- Trinitro-1,3,5-Triazine, and Octahydro-1,3,5,7-Tetranitro-1,3,5,7- Tetrazocine in sediments to *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca*: low-dose hormesis and high-dose mortality. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 21, No. 7, pp. 1475–1482.

Smith, R.W., Vlahos P., Tobias C., Ballentine M., Ariyaratna T., Cooper C., 2013. Removal rates of dissolved munitions compounds in seawater. Chemosphere, [http://dx.doi.org/ 10.1016/j.chemosphere.2013.02.049](http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.049).

Tranel M. A., Kimmel R. O., 2009. Impacts of Lead Ammunition on Wildlife, the environment, and human health—A literature review and implications for Minnesota. In R. T. Watson, M. Fuller, M. Pokras, and W. G. Hunt (Eds.). Ingestion of Lead from Spent Ammunition: Implications for Wildlife and Humans. The Peregrine Fund, Boise, Idaho, USA. DOI [10.4080/ilsa.2009.0307](https://doi.org/10.4080/ilsa.2009.0307)

Allegato 1

Laboratori del Dipartimento Provinciale di Cagliari ARPAS



REGIONE AUTÒNOMA DE SARDIGNA

REGIONE AUTONOMA DELLA SARDEGNA

AGENZIA REGIONALE PRO S'AMPARU DE S'AMBIENTE DE SARDIGNA
AGENZIA REGIONALE PER LA PROTEZIONE DELL'AMBIENTE DELLA SARDEGNA

ARPAS

Servizio Rete Laboratori e Misure in Campo

Servizio Laboratorio di Cagliari

**Collaborazione ARPAS per l'attuazione della Convenzione tra E.I.
ed ISPRA al fine di realizzare il Progetto “Valutazione delle
esigenze di rimozione di residui dai fondali marini prospicienti
l'area addestrativa di Capo Teulada (CA)”**

Servizio Rete Laboratori e Misure in Campo – Servizio Laboratorio di Cagliari



Indice

1.	INTRODUZIONE	2
2.	ANALISI ECOTOSSICOLOGICHE	2
2.1	Saggio biologico con <i>Vibrio fischeri</i>	3
3.	GRANULOMETRIA E CARBONIO ORGANICO TOTALE	7
3.1.	Granulometria	9
3.2.	Carbonio Organico Totale	12
4.	CONCLUSIONI	13



1. INTRODUZIONE

Nell'ambito del Progetto "Valutazione dell'esigenza di rimozione di residui dai fondali marini prospicienti l'area addestrativa di Capo Teulada (CA) e Torre Veneri (LE)", è stato attivato un rapporto di collaborazione tra ISPRA, ARPA Sardegna ed ARPA Puglia.

Il piano di campionamento e la tipologia di analisi da effettuare sono state stabilite da ISPRA.

La collaborazione di ARPA Sardegna ha riguardato le seguenti analisi sulla matrice "sedimento marino":

- Test di tossicità con *Vibrio fischeri*;
- Granulometria;
- Carbonio Organico Totale (TOC).

A seguito di accordi con ISPRA, il personale ARPAS ha provveduto al ritiro dei campioni presso il 1° RGT Corazzato di Capo Teulada ed al loro relativo trasporto, con borse refrigerate, al Laboratorio di Cagliari.

2. ANALISI ECOTOSSICOLOGICHE

Sull'elutriato dei campioni pervenuti è stato eseguito il test di tossicità con *Vibrio fischeri*.

Nell'intervallo di tempo intercorso tra l'11 ed il 18 luglio 2018, sono stati prelevati n.21 campioni di sedimenti del fondale marino:

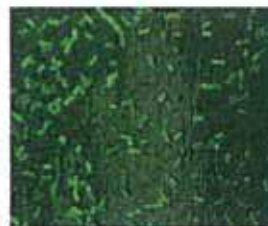
- n.17 nell'area a sud, est ed ovest del promontorio di Capo Teulada, area gravata dalla presenza di residui dovuti all'attività addestrativa militare;
- n.4 nell'area di Capo Spartivento, area individuata da ISPRA come "confronto bianco".

I batteri rappresentano una componente essenziale di tutte le reti trofiche, sia in termini quantitativi per la elevata biomassa, sia per il loro ruolo di decompositori.

Nello specifico, è stato utilizzato il *Vibrio fischeri* ceppo NRRL-B-11177, un batterio marino Gram-negativo, mobile appartenente alla famiglia delle Vibrionaceae (foto serc.carleton.edu)

Il batterio, dalle caratteristiche proprietà bioluminescenti, si muove per mezzo di flagelli e, in natura, si trova prevalentemente in simbiosi con vari animali marini, come il calamaro Bobtail che usa questo microbo per far funzionare il suo organo luminescente.

L'emissione di luce è mediata dall'enzima luciferasi e l'intensità dell'emissione è proporzionale all'entità del metabolismo energetico; qualunque alterazione del metabolismo comporta una variazione dell'emissione luminosa (sia in aumento che in diminuzione).



Il test, eseguito secondo il metodo 8030 APAT – IRSA – CNR 29/03, consente di valutare la tossicità acuta dei campioni utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dal *Vibrio fischeri*.

2.1 Saggio biologico con *Vibrio fischeri*

I campioni pervenuti in laboratorio sono stati conservati in frigorifero alla temperatura di 4°C, fino alla preparazione dell'elutriato effettuata prima possibile ed in ogni caso non oltre i 7 giorni dal campionamento.

Prima di eseguire il saggio si è proceduto alla determinazione del peso secco necessario per stabilire la quantità di diluente da utilizzare per la preparazione dell'elutriato.

Il calcolo del peso secco, è stato effettuato, in doppio, su un'aliquota del campione, accuratamente omogeneizzato e preventivamente privato delle componenti di dimensioni superiori ai 5 mm e successivamente essiccato in stufa a 105°C per 24 ore.

La quantità di sedimento umido tal quale, utilizzata per preparare l'elutriato, è stata di circa 100 grammi (anche in funzione del quantitativo di campione a disposizione). Il campione è stato poi diluito in rapporto 1:4 (equivalente in peso secco / volume d'acqua) utilizzando una soluzione di INSTANT OCEAN con salinità 35‰.

L'elutriato è stato ottenuto sottoponendo il campione ad energica agitazione per un'ora alla temperatura di circa 20°C.

Il campione, che dopo sedimentazione a 4°C appariva limpido, è stato suddiviso in aliquote senza necessità né di filtrazione, né di centrifugazione. Subito dopo è stato sottoposto ad analisi.

Prima dell'esecuzione del saggio sono stati determinati: la salinità, l'ossigeno disciolto ed il pH.

In 4 su 21 campioni, si è reso necessario modificare il pH, prima di sottoporli al test con *Vibrio fischeri*.

Il test è stato effettuato seguendo il metodo 8030 del manuale APAT – IRSA – CNR 29/03, utilizzando il protocollo analitico denominato "comparison test" della Microtox.

Nell'ambito del vasto panorama di saggi biologici oggi disponibili, il Microtox è uno dei test acuti di routine più diffuso, in quanto rispondente alla maggior parte dei requisiti richiesti per l'attendibilità di un test tossicologico: standardizzazione, sensibilità, potere discriminatorio, riproducibilità, semplicità di utilizzo.

Tale protocollo analitico prevede l'utilizzo di due batch di partenza, uno del campione che s'intende analizzare ad una data concentrazione, ed uno di un campione di riferimento, che deve essere il più possibile simile al primo. Come soluzione di riferimento è stata utilizzata la stessa acqua utilizzata per la preparazione dell'elutriato. Cinque aliquote identiche di campione e cinque del controllo (soluzione di riferimento) sono messe a contatto con la sospensione batterica diluita, su cui si è precedentemente

effettuata la lettura della I_0 . (lettura al tempo zero della luminescenza emessa dal solo ceppo batterico prima del contatto con il campione). Le letture della I_t sono state effettuate dopo 5 e 15 minuti di incubazione.

La lettura della luminescenza è stata effettuata con il luminometro M 500 (sistema Microtox, Azur Environmental) (Fig. 1)

Fig.1



Segue la tabella recante tutti i dati relativi alla preparazione degli elutriati (TAB.1) e la tabella relativa ai test ecotossicologici eseguiti (TAB.2).

TAB. 1

n. Reg.	n. Staz.	n. Prolab	REPLICHE	TARA	CAMPIONE	PESO LORDO	PESO SECCO	PESO SECCO	PESO SECCO	UMIDITA'	ELUTRIATO per g100 di campione		ELUTRIATO (inserire i grammi di campione pesati)	
				g	peso g	(camp. secco) g	(lordo secco - tara) g	%	Media %	Media %	(Peso secco medio %) * 4	Diluente da aggiungere	grammi pesati	Diluente da aggiungere
SED1	Capo Teulada - Punta Tonnara B2 EST 0001	18CA03496	a	56,35	10,00	54,41	8,06	80,00						
			b	47,90	10,00	75,51	7,61	76,10		78,35	21,65	313,40	291,75	100
SED2	Capo Teulada - Punta Tonnara B2 EST 0008	18CA03499	a	67,14	10,00	74,08	6,94	69,40						
			b	66,78	10,00	73,94	7,16	71,60		70,50	29,50	282,00	252,50	100
SED3	Capo Teulada - Punta Tonnara B2 EST 0012	18CA03500	a	67,40	10,00	75,12	7,72	77,20						
			b	54,25	10,00	61,85	7,60	76,00		76,60	23,40	306,40	283,00	100
SED4	Capo Teulada - Punta Tonnara C1 EST 0004	18CA03502	a	67,36	10,00	73,48	6,10	61,00						
			b	52,97	10,00	59,13	6,16	61,60		61,30	38,70	245,20	206,50	100
SED5	Capo Teulada - Punta Tonnara C2 EST 0007	18CA03503	a	58,60	10,00	66,25	7,65	76,50						
			b	55,28	10,00	63,00	7,72	77,20		76,85	23,15	307,40	284,25	100
SED6	Capo Teulada - Punta Tonnara C3 EST 0005	18CA03504	a	67,31	10,00	75,23	7,92	79,20						
			b	56,55	10,00	64,84	8,39	83,90		81,55	18,45	306,20	307,75	100
SED7	Capo Teulada - Punta D'Algheta ABC5 OVEST 0001	18CA03506	a	68,00	10,00	75,81	7,81	78,10						
			b	54,88	10,00	62,77	7,89	78,90		78,50	21,50	314,00	292,50	100
SED8	Capo Teulada - Punta D'Algheta ABC5 OVEST 0003	18CA03507	a	68,64	10,00	77,62	8,38	83,80						
			b	55,34	10,00	63,70	8,36	83,60		83,70	16,30	334,80	318,50	100
SED9	Capo Teulada - Punta D'Algheta ABC5 OVEST 0006	18CA03509	a	67,88	10,00	74,50	6,62	66,20						
			b	55,91	10,00	62,65	6,74	67,40		66,80	33,20	267,20	234,00	150
SED10	Capo Teulada - Punta D'Algheta ABC5 OVEST 0011	18CA03510	a	68,72	10,00	76,58	7,86	78,60						
			b	56,28	10,00	64,16	7,87	78,70		78,65	21,35	314,60	293,25	100
SED11	Capo Spartivento C5-MR-01	18CA03633	a	56,35	10,00	63,58	7,23	72,00						
			b	67,90	10,00	75,06	7,16	71,60		71,80	28,20	287,20	259,00	100
SED12	Capo Spartivento C5-MR-02	18CA03634	a	67,14	10,00	74,88	7,74	77,40						
			b	66,77	10,00	74,52	7,75	77,50		77,45	22,55	309,80	287,25	100
SED13	Capo Spartivento C5-MR-03	18CA03635	a	67,40	10,00	74,62	7,22	72,20						
			b	54,25	10,00	61,44	7,19	71,90		72,05	27,95	288,20	260,25	100
SED14	Capo Spartivento C5-MR-04	18CA03636	a	62,97	10,00	60,21	7,24	72,40						
			b	55,34	10,00	62,54	7,20	72,00		72,20	27,80	288,60	261,00	100
SED15	Capo Teulada - Punta Tonnara C2 EST 0022	18CA03637	a	58,60	10,00	63,57	4,97	49,70						
			b	55,28	10,00	60,27	4,98	49,80		49,80	50,20	109,20	149,00	100
SED16	Capo Teulada - Punta Tonnara C2 EST 0023	18CA03638	a	67,30	10,00	73,28	5,99	59,90						
			b	56,55	10,00	62,51	5,96	59,60		59,75	40,25	239,00	198,75	100
SED17	Capo Teulada - Punta Tonnara C2 EST 0025	18CA03639	a	68,00	10,00	75,01	7,01	70,10						
			b	54,88	10,00	61,90	7,02	70,20		70,15	29,85	280,60	250,75	100
SED18	Capo Teulada - Punta D'Algheta CT-MR-01	18CA03640	a	68,64	10,00	73,94	5,30	53,00						
			b	55,91	10,00	62,36	6,45	64,50		58,75	41,25	335,00	193,75	100
SED19	Capo Teulada - Punta D'Algheta CT-MR-02	18CA03641	a	67,88	10,00	75,28	7,40	74,00						
			b	68,74	10,00	75,51	6,77	67,70		70,85	29,15	283,40	254,25	100
SED20	Capo Teulada - Punta D'Algheta CT-MR-03	18CA03642	a	80,96	10,00	88,31	7,35	73,50						
			b	56,29	10,00	63,66	7,37	73,70		73,60	26,40	294,40	268,00	100
SED21	Capo Teulada - Punta D'Algheta CT-MR-04	18CA03643	a	68,11	10,00	74,61	6,50	65,00						
			b	69,62	10,00	76,45	6,83	68,30		66,65	33,35	208,60	233,25	100



TAB. 2			data prelievo	PARAMETRI ELUTRIATO			NOTE	Microtox test con <i>Vibrio fischeri</i>	
n. Reg.	n. Staz.	n. Prolab		pH	O ₂ %	salinità ‰		data test	
SED1	Capo Teulada - Punta Tonnara B2 EST 0001	18CA03496	11.07.18	7,40	93,9	34,6		17.07.2018	ommesi -76,66
SED2	Capo Teulada - Punta Tonnara B2 EST 0008	18CA03499	11.07.18	7,58	96,0	35,3		17.07.2018	ommesi -70,59
SED3	Capo Teulada - Punta Tonnara B2 EST 0012	18CA03500	11.07.18	7,76	84,3	35,2		17.07.2018	ommesi -84,40
SED4	Capo Teulada - Punta Tonnara C1 EST 0004	18CA03502	11.07.18	7,73	99,0	35,8		17.07.2018	ommesi -49,45
SED5	Capo Teulada - Punta Tonnara C2 EST 0007	18CA03503	11.07.18	8,23	91,2	35,3	pH portato a 7,47	17.07.2018	ommesi -60,24
SED6	Capo Teulada - Punta Tonnara C3 EST 0085	18CA03504	11.07.18	7,87	84,8	35,2		17.07.2018	ommesi -84,84
SED7	Capo Teulada - Punta D'Aligusta ABCS OVEST 0001	18CA03506	12.07.18	7,90	104,0	35,7		17.07.2018	ommesi -50,02
SED8	Capo Teulada - Punta D'Aligusta ABCS OVEST 0003	18CA03507	12.07.18	8,23	98,2	35,4	pH portato a 7,30	17.07.2018	ommesi -45,22
SED9	Capo Teulada - Punta D'Aligusta ABCS OVEST 0006	18CA03509	12.07.18	7,93	97,8	35,8		17.07.2018	ommesi -47,98
SED10	Capo Teulada - Punta D'Aligusta ABCS OVEST 0011	18CA03510	12.07.18	8,19	110,1	35,5	pH portato a 7,31	17.07.2018	ommesi -62,68
SED11	Capo Spartivento CS-MR-01	18CA03633	16.07.18	7,36	80,1	36,0	BIANCO	23.07.2018	ommesi -40,20
SED12	Capo Spartivento CS-MR-02	18CA03634	16.07.18	7,53	84,4	35,9	BIANCO	23.07.2018	ommesi -21,33
SED13	Capo Spartivento CS-MR-03	18CA03635	16.07.18	7,53	80,6	35,7	BIANCO	23.07.2018	ommesi -18,22
SED14	Capo Spartivento CS-MR-04	18CA03636	16.07.18	7,72	78,5	35,8	BIANCO	23.07.2018	ommesi -37,66
SED15	Capo Teulada - Punta Tonnara C2 EST 0022	18CA03637	17.07.19	7,81	87,5	36,3		23.07.2018	ommesi -38,32
SED16	Capo Teulada - Punta Tonnara C2 EST 0023	18CA03638	17.07.20	7,92	84,3	36,1		23.07.2018	ommesi -26,14
SED17	Capo Teulada - Punta Tonnara C2 EST 0025	18CA03639	17.07.21	7,91	81,4	35,9		23.07.2018	ommesi -24,18
SED18	Capo Teulada - Punta D'Aligusta CT-MR-01	18CA03640	18.07.22	7,94	104,4	35,2		24.07.2018	ommesi -3,924
SED19	Capo Teulada - Punta D'Aligusta CT-MR-02	18CA03641	18.07.23	7,98	106,6	35,0		24.07.2018	ommesi -14,32
SED20	Capo Teulada - Punta D'Aligusta CT-MR-03	18CA03642	18.07.24	8,21	106,3	35,3	pH portato a 7,10	24.07.2018	ommesi -19,22
SED21	Capo Teulada - Punta D'Aligusta CT-MR-04	18CA03643	18.07.25	7,74	101,8	35,6		24.07.2018	ommesi -30,92



3. GRANULOMETRIA E CARBONIO ORGANICO TOTALE

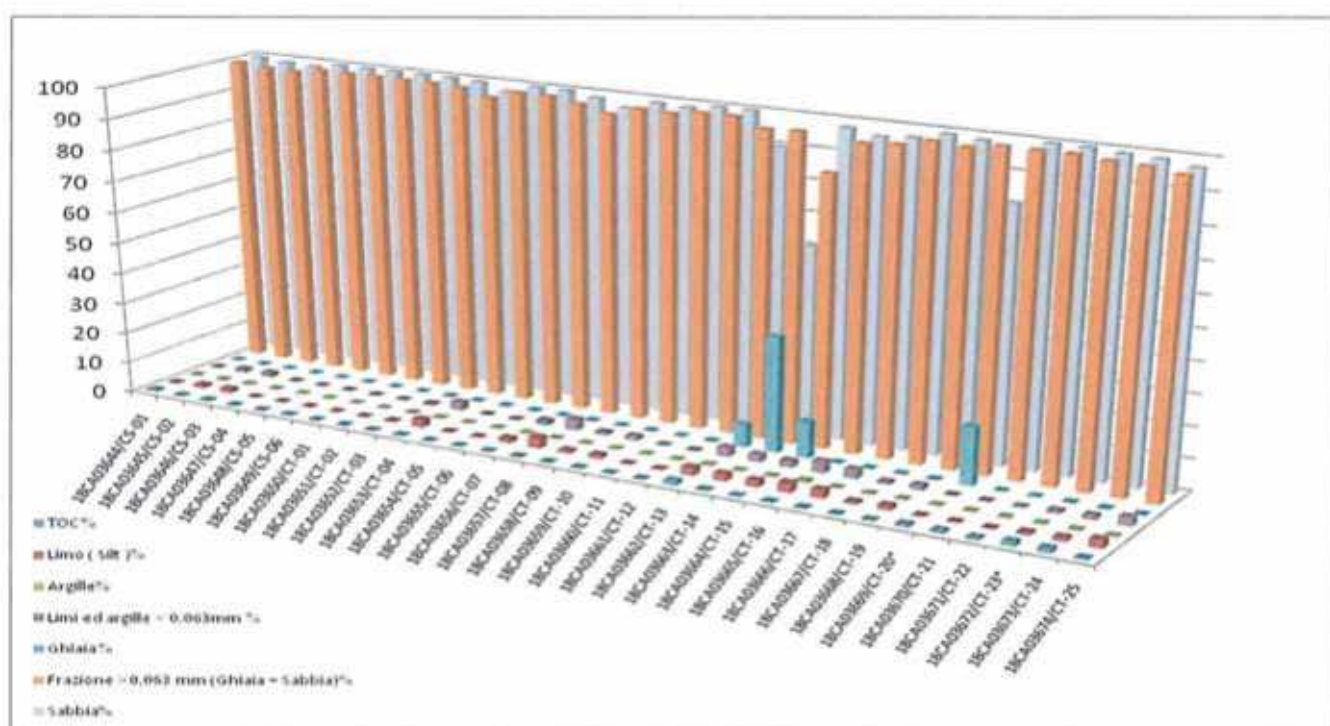
I metodi utilizzati per la determinazione sono quelli riportati in tabella.

N° Prot.	Codice stazione	Metodi utilizzati						
		EN 1484	ICRAM - Sedimenti - Scheda 3 - 2001 Setacciatura			ICRAM - Sedimenti - Scheda 3 - 2001 Granulometro laser		ICRAM - Sedimenti - Scheda 3 - 2001 Setacciatura
		TOC %	Ghiaia %	Frazione > 0,063 mm (Ghiaia + Sabbia) %	Sabbia %	Limo (Silt) %	Argille %	Limi ed argille < 0.063mm %
18CA03644	CS-01	0,63	< 0,1	99,8	99,8	0,2	< 0,1	0,2
18CA03645	CS-02	0,17	< 0,1	98,9	98,9	1,1	< 0,1	1,1
18CA03646	CS-03	0,21	< 0,1	98,7	98,7	1,3	< 0,1	1,3
18CA03647	CS-04	0,16	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03648	CS-05	0,14	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03649	CS-06	0,21	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03650	CT-01	0,15	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03651	CT-02	0,15	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03652	CT-03	0,14	< 0,1	99,6	99,6	0,4	< 0,1	0,4
18CA03653	CT-04	0,22	< 0,1	97,5	97,5	2,5	< 0,1	2,5
18CA03654	CT-05	0,11	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03655	CT-06	0,11	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03656	CT-07	0,17	< 0,1	98,6	98,6	1,4	< 0,1	1,4
18CA03657	CT-08	0,19	< 0,1	96,5	96,5	3,5	< 0,1	3,5
18CA03658	CT-09	0,13	< 0,1	99,1	99,1	0,9	< 0,1	0,9
18CA03659	CT-10	0,1	< 0,1	98,8	98,8	1,2	< 0,1	1,2
18CA03660	CT-11	0,15	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03661	CT-12	0,12	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03662	CT-13	1,37	7,3	97,3	90	2,5	0,2	2,7
18CA03663	CT-14	0,37	37,2	97,8	60,6	2,2	< 0,1	2,2
18CA03664	CT-15	0,25	11,6	86,4	98	2	< 0,1	2
18CA03665	CT-16	0,27	< 0,1	96,4	96,4	3,1	0,5	3,6
18CA03666	CT-17	0,24	< 0,1	97,2	97,2	2,7	0,1	2,8
18CA03667	CT-18	0,12	< 0,1	99,3	99,3	0,7	< 0,1	0,7
18CA03668	CT-19	0,16	< 0,1	98,6	98,6	1,4	< 0,1	1,4
18CA03669	CT-20*	0,83	18,6	100	81,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03670	CT-21	0,82	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03671	CT-22	0,59	< 0,1	100	100	< 0,1	< 0,1	< 0,1
18CA03672	CT-23*	1,37	< 0,1	99,2	99,2	0,8	< 0,1	0,8
18CA03673	CT-24	1,27	< 0,1	98,8	98,8	1,2	< 0,1	1,2
18CA03674	CT-25	0,22	< 0,1	97,5	97,5	2,5	< 0,1	2,5

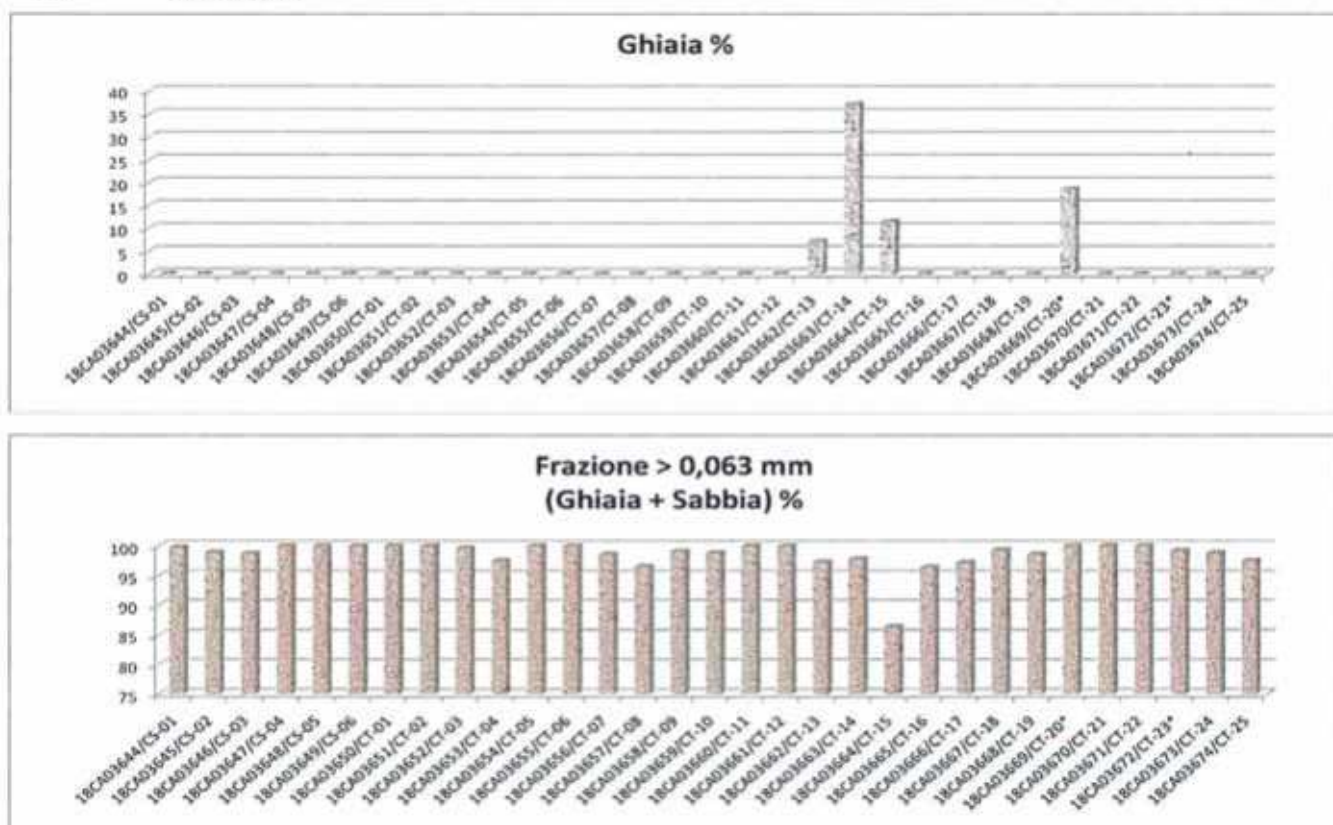
* campioni non bene identificati, entrambi con la stessa sigla CT20 come da verbale di accompagnamento.

L'analisi granulometrica mette in evidenza, in tutti i campioni, una prevalenza delle frazioni di ghiaia e sabbia.

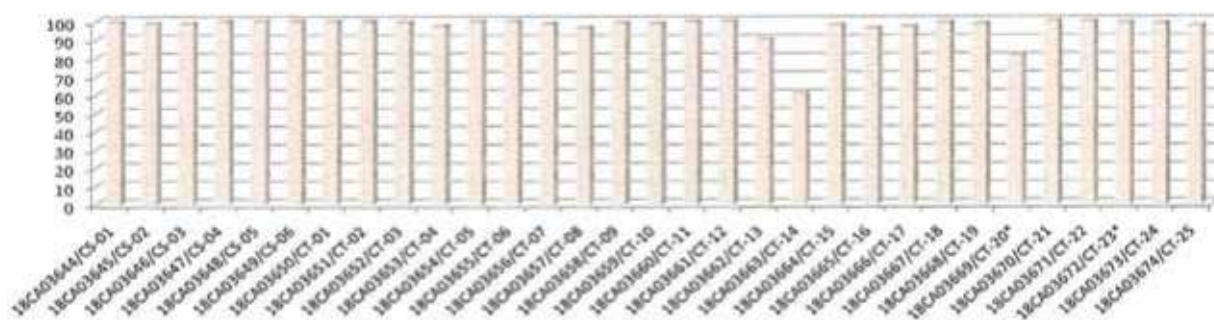




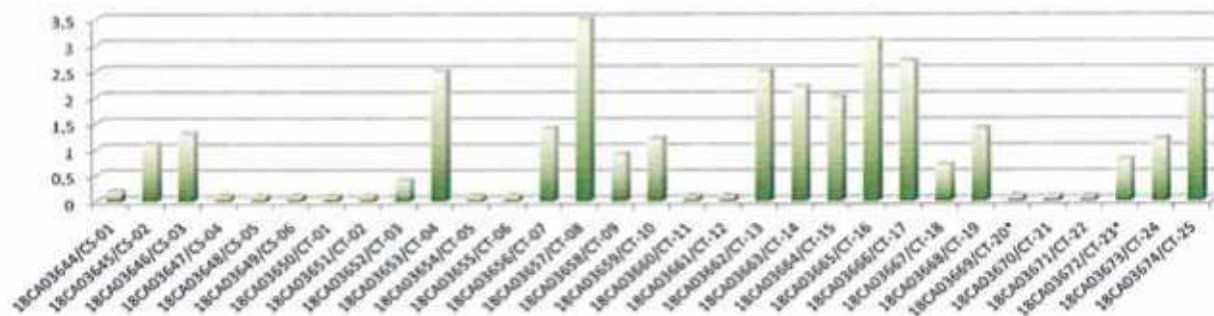
3.1. Granulometria

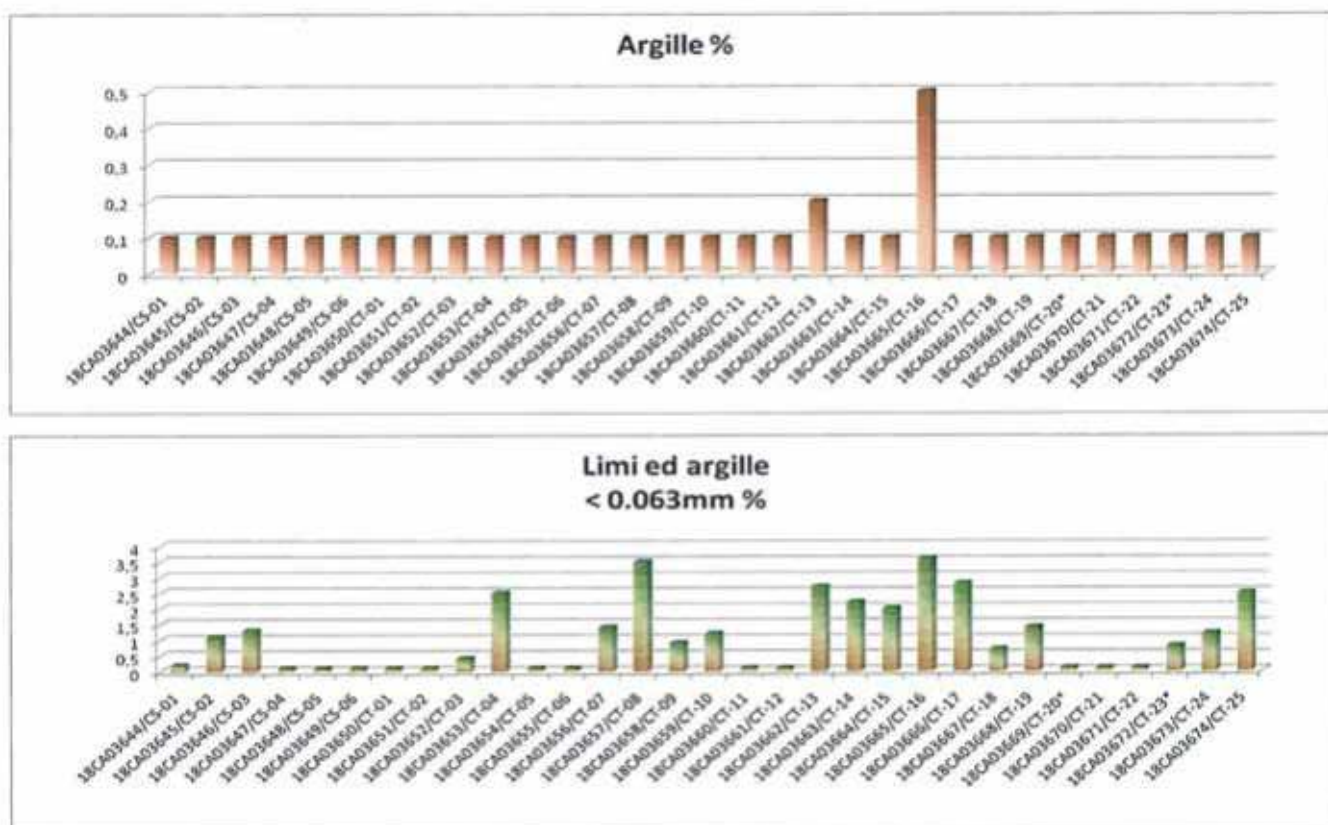


Sabbia %

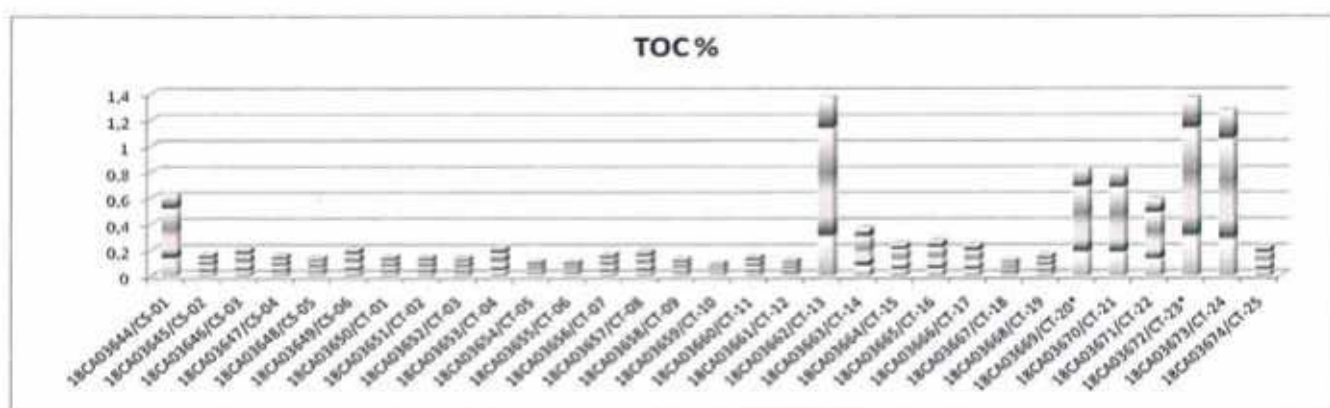


Limo (Silt) %





3.2. Carbonio Organico Totale



4. CONCLUSIONI

Per quanto riguarda le analisi ecotossicologiche, i dati analitici hanno messo in evidenza che sia nei campioni del sito in esame (zona Capo Teulada), che nei campioni del sito preso come "controllo bianco" (zona Capo Spartivento), si è verificata una reazione paradosso di ormesi, ovvero un aumento della bioluminescenza.

Allegati:

Rapporti di Prova

Cagliari, 5/03/2019

I tecnici del laboratorio

M. Serenella Cappai

Raffaele Cardia

Mauro Dentoni

Patrizia Dessi

Andrea Ligas

Giovanna Madeddu

Alberto Mariani

M. Luisa Nughes

[Handwritten signatures of the laboratory technicians]
M. Serenella Cappai
Raffaele Cardia
Mauro Dentoni
Patrizia Dessi
Andrea Ligas
Giovanna Madeddu
Alberto Mariani
M. Luisa Nughes

La Direttrice del Laboratorio

Rosina Anedda

Allegato 2

Laboratorio di analisi di Biomarker del CN-LAB ISPRA

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI ECOTOSSICOLOGICI SU SPECIE ITTICHE ASSOCIABILI ALLA PRESENZA DI ORDIGNI BELLICI

Progetto POLIGONI- Operazione POSEIDONE



Relazione tecnica – Analisi di biomarker

CN-LAB

Responsabile laboratorio biomarker	Ginevra Moltedo
Collaboratori	Barbara Catalano; Giacomo Martuccio
Responsabile Area Ecotossicologia	Fulvio Onorati

Giugno 2019

Indice

Premessa	3
1. Introduzione	4
2. Area di studio e campionamento	5
3. Materiali e metodi	7
3.1 Analisi statistica	9
4. Risultati	10
5. Conclusioni	16
Bibliografia	16

Premessa

Nell'ambito delle attività previste dal Progetto “*Valutazione delle esigenze di rimozione di residui dai fondali marini prospicienti le aree addestrative di Capo Teulada (CA) e Torre Veneri (LE)*”, denominato “**Operazione Poseidone**”, facente parte della “*Convenzione attuativa dell'Accordo Quadro in materia di tutela ambientale*” stipulato tra ISPRA e lo Stato Maggiore dell'Esercito (SME) il 3 Marzo 2016, è stata attuata una collaborazione tra il Centro Nazionale del Sistema Nazionale dei Laboratori (Area Ecotossicologia) e il Centro Nazionale Emergenze (CN-CRE) dell'ISPRA.

La presente relazione tecnica descrive metodologie e risultanze ottenute presso il laboratorio analisi Biomarker dell'Area Ecotossicologia per lo studio della valutazione degli effetti ecotossicologici di residui in mare su specie ittiche dell'area di competenza del poligono militare presso Capo Teulada (CA)

1. Introduzione

Secondo la definizione di Depledge (1994) per Biomarker si intende “...*quella variazione biochimica, cellulare, fisiologica o comportamentale, che può essere misurata in un tessuto, in un fluido biologico o a livello dell'intero organismo la quale fornisce l'evidenza di un'esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti.*”.

Al fine di valutare gli effetti ecotossicologici sul biota riconducibili alla presenza di residui bellici presenti sul fondale marino del poligono di Capo Teulada, sono stati analizzati i biomarker in due specie ittiche rappresentative dell'area di studio.

Come organismi bioindicatori su cui valutare gli effetti tossicologici dei residui sono state scelte due specie dalle abitudini stanziali. In particolare, sopralluoghi precedentemente effettuati da CN-CRE nell'area di studio avevano evidenziato la presenza di *Conger conger* (grongo) e *Muraena helena* (murena). *C. conger* è stata utilizzata in studi simili precedentemente effettuati da ISPRA (già ICRAM) (Amato *et al.*, 2006; Della Torre *et al.*, 2010). Una prima valutazione dello stato di salute degli organismi è stata effettuata utilizzando l'indice epatosomatico (HSI: peso fegato/peso intero animale x 100), che fornisce una stima dello sviluppo del fegato, organo in cui sono concentrate molte delle attività di detossificazione dell'organismo. Questo indice può essere considerato tra gli indicatori biologici che si manifestano a livello fisiologico nell'organismo, non è specifico per una determinata classe di contaminanti ed assume generalmente valori più elevati in organismi che vivono in condizioni più stressanti. Tuttavia, esso può dipendere anche da altri fattori quali età degli individui, lo stato nutrizionale e la quantità di ormoni riproduttivi in circolo (Perin, 2004)

Oltre all'indice sopracitato, sugli organismi catturati nell'area di studio sono state eseguite le analisi di biomarker richieste da CN-CRE, finalizzate alla valutazione dei seguenti effetti:

1. neurotossicità, misurata nel cervello mediante l'inibizione dell'acetilcolinesterasi (AChE);
2. genotossicità, misurata nelle cellule eritrocitiche mediante la frequenza dei micronuclei (MN);
3. biotrasformazione, mediante analisi dell'attività dell'7-etoxiresorufina O-deetilasi (EROD, fase I) e delle glutathione-S transferasi (GSTs, fase II).

Oltre alle analisi concordate con il CN-CRE, di iniziativa e approfondimento dei laboratori dell'area ecotossicologia, è stata misurata anche l'attività della catalasi (CAT), quale indicazione di un eventuale

stress ossidativo. In particolare, l'**acetilcolinesterasi (AChE)** è un enzima implicato nella trasmissione dell'impulso nervoso in molti Phyla (Walker e Thompson, 1991) che viene solitamente inibita dalla presenza di pesticidi organofosforici e carbamati (Day e Scott, 1990), ma anche di altri contaminanti quali metalli pesanti (Najimi *et al.*, 1997), detergenti, idrocarburi, PCB (Amiard-Triquet *et al.*, 2013).

La comparsa dei **micronuclei (MN)** riflette un'alterazione dell'equilibrio fra processi di rottura e riparo del DNA, a favore dei primi, con un accumulo delle rotture. In queste circostanze si possono avere conseguenze rilevanti per processi essenziali del ciclo cellulare, come la non-corretta segregazione del materiale genetico durante la mitosi e la comparsa di micronuclei (MN), cioè di piccoli frammenti di cromatina fisicamente separati dal nucleo principale.

Il **citocromo P450** è un complesso multi enzimatico implicato nei processi di biotrasformazione dei contaminanti organici (fase I). Tale complesso catalizza una reazione di idrossilazione attraverso la quale i composti lipofili sono resi maggiormente idrosolubili e più facilmente espellibili dall'organismo (Goeptar *et al.*, 1995). L'elevata inducibilità del citocromo P450, in presenza di contaminanti xenobiotici, è ampiamente dimostrata sia nei pesci che in altri vertebrati (Bucheli & Fent, 1995) e per questo utilizzata come biomarker di esposizione nei confronti dei contaminanti organici.

Le **glutazione S-transferasi (GSTs)** sono enzimi che detossificano composti xenobiotici organici catalizzando reazioni di coniugazione del cofattore glutazione ai gruppi elettrofili di tali molecole organiche (fase II del sistema di biotrasformazione), rendendole idrosolubili e quindi facilmente eliminabili.

La **catalasi (CAT)** è un enzima implicato nel sistema antiossidante ed è associato principalmente ai perossisomi dove agisce detossificando il perossido di idrogeno (H_2O_2) derivante dall'ossidazione degli acidi grassi (Fahimi and Sies, 1987) formando l'acqua.

2. Area di studio e campionamento

Come area di controllo è stata indicata dal CN-CRE la zona di Capo Spartivento, adiacente all'area di studio, ma non coinvolta dalle esercitazioni militari, sebbene non ci risulti sia stato effettuato uno studio preliminare volto alla verifica delle "somiglianza" delle caratteristiche chimico-fisiche a quelle dell'area di indagine e dell'assenza di contaminazione.

Le campagne di prelievo delle 2 specie ittiche sono state eseguite nei mesi di Luglio-Agosto 2018 presso Capo Teulada e Capo Spartivento, a cura del personale di CN_CRE mediante ausilio di nasse.

In figura 12.1 è riportata una mappa del sito di campionamento.



Fig. 2.1 – Area di studio. Capo Teulada e Capo Spartivento – Sardegna (Fonte: Google Earth).

Al fine di agevolare le fasi preparative dei campioni, il laboratorio analisi di biomarker ha fornito al personale del CN-CRE la “*Procedura per la preparazione dei campioni per analisi di Biomarker su fauna ittica*” (**Allegato 1**) raccomandandosi che tale procedura venisse seguita scrupolosamente al fine di ottenere campioni idonei per le analisi.

Inoltre sono state fornite le “*Scheda di campionamento*” in cui riportare, per ciascun esemplare, peso e lunghezza (**Allegato 2**), informazioni importanti nella valutazione ed elaborazione delle risultanze.

Alla consegna, avvenuta l'8 agosto 2018, i campioni dei vari tessuti di cervello e fegato delle 2 specie da analizzare risultavano correttamente conservati in azoto liquido ed i campioni di sangue a +4°C, come richiesto dalle procedure fornite.

3. Materiali e metodi

Per la determinazione dell'attività AChE sono stati preparati omogenati 1:5 (rapporto peso:volume) dei campioni di cervello in tampone Tris-HCl 0,1 M (pH 7,0), saccarosio 0,25 M. Dopo centrifugazione per 5 minuti a 5000 x g, la frazione citosolica è stata aliquotata e conservata a -80 °C, fino al momento dell'analisi.

Per la determinazione delle attività enzimatiche delle GSTs e CAT sono stati preparati omogenati 1:5 (rapporto peso/volume) dei campioni di fegato, in tampone K-fosfato 100 mM (pH 7,5), NaCl 1,8%, bacitracina (0,1 mg/ml) ed inibitori di proteasi: aprotinina (0,008 TIU/ml), leupeptina (1 µg/ml), pepstatina (0,5 µg/ml). Dopo centrifugazione a 100.000 x g per 1 h e 10 min a 4°C, la frazione citosolica è stata aliquotata e conservata a -80°C, fino al momento dell'analisi (IO.CN-LAB.ECO.04). Per la determinazione dell'attività del citocromo P450, sono stati preparati omogenati 1:3 (rapporto peso/volume) dei campioni di fegato, in un working-buffer contenente tampone K-fosfato 100 mM (pH 7,4), KCl 150 mM, EDTA 1 mM, Dithiothreitol 1 mM. Gli omogenati così ottenuti sono stati centrifugati a 10.000 x g per 20 minuti a 4°C e il sovrantante (S9) è stato aliquotato in Eppendorff e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi. Infine, per la valutazione della genotossicità, non è stato necessario effettuare ulteriore preparazione del campione conservato a 4°C, ad eccezione di un cambio di fissativo dopo la sedimentazione delle cellule sul fondo della provetta.

L'attività di **AChE** è stata determinata nel cervello degli organismi, secondo il metodo di Ellman *et al.* (1961), con alcune modifiche. Il campione è stato letto spettrofotometricamente (CARY50) in 1 minuto, utilizzando come mezzo di reazione il buffer Na-fosfato 50 mM (pH 7,4) e come substrato l'acetilcolina iodide (0,5 mM). Quest'ultima viene convertita dall'enzima in tiocolina la quale a sua volta reagisce con l'acido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB 0,2 mM), dando origine ad un anione giallo che assorbe alla lunghezza d'onda di 412 nm ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). L'attività è stata quindi quantificata

rispetto alle proteine totali misurate con metodo Lowry (Lowry, 1951) utilizzando BSA (Bovine Serum Albumine) come standard ed è stata espressa in nmoli/min/mg proteine.

Gli effetti sul DNA sono stati misurati negli eritrociti mediante la **frequenza dei micronuclei (MN)**, secondo il metodo di Gorbi *et al.*, 2009, leggermente modificato. Le sospensioni cellulari sono state strisciate su vetrini da microscopia, allestiti in duplicato e colorate con un colorante specifico per il DNA (DAPI 1 µgml⁻¹). I vetrini sono stati esaminati al microscopio a fluorescenza per determinare la percentuale delle cellule contenenti MN sulle cellule totali. I risultati sono espressi come percentuale di cellule con micronuclei, su un totale di 2000 cellule contate per ogni campione.

I valori ottenuti, sono stati valutati sia rispetto a quelli ottenuti in organismi prelevati dall'area di controllo, sia rispetto ai valori soglia indicati da Piva *et al.*, 2011, sebbene a specie diverse da quelle utilizzate in questo studio (Tabella 3.1).

Tabella 3.1 – Valori di riferimento per la valutazione di MN secondo Piva *et al.*, 2011.

Frequenza MN ‰	media	Classe di danno biologico
< 0,5		assente
0,5 ≤ 0,9		lieve
0,9 ≤ 1,5		moderato
1,5 < 2,5		grave
≥ 2,5		molto grave

L'inducibilità del citocromo P450 è stata misurata in termini di attività della 7-etoxiresorufina O-deetilasi (attività **EROD**), secondo la metodica descritta da Stagg *et al.* (2016). L'attività EROD è misurata dal consumo di 7-etoxiresorufina, substrato modello per la reazione con il sistema enzimatico del citocromo P450, con conseguente produzione di resorufina che viene misurata spettrofluorimetricamente (lunghezza d'onda d'eccitazione pari a 535 nm e lunghezza d'onda d'emissione pari a 585 nm). L'attività EROD è stata quantificata in funzione della resorufina prodotta durante 1 minuto di reazione a 25 °C in cui 50 µl di campione sono stati inseriti in un volume finale di 2 ml contenente tampone K-fosfato 100 mM (pH 7,4), 7-etoxiresorufina 2 µM e NADPH 0,25 mM. La resorufina prodotta è stata quantificata utilizzando una retta standard di calibrazione, costruita con

concentrazioni note di tale sostanza; i valori ottenuti sono stati riferiti alle proteine totali contenute nel campione, analizzate secondo il metodo di Lowry *et al.* (1951) e l'attività EROD è stata espressa in pmoli/min/mg di proteine.

L'attività delle **GSTs** è stata misurata spettrofotometricamente (CARY50) tramite metodo di Habig *et al.* (1974) leggermente modificato e Regoli *et al.* (2012) (in: Abele *et al.*, 2012) su campioni di estratti citosolici. La reazione avviene a 18 °C in un buffer K-fosfato 100 mM pH 6,5, al quale viene aggiunto CDNB 1,5 mM, GSH 1,5 mM e l'estratto citosolico del campione da misurare. Il prodotto di trasformazione del substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), in presenza di glutatione (GSH), assorbe ad una lunghezza d'onda di 340 nm. L'attività è stata normalizzata per il contenuto totale di proteine (misurato mediante metodo di Lowry (1951) ed espressa in nmoli/min/mg proteine.

L'attività della **catalasi (CAT)** è stata misurata seguendo la diminuzione di assorbanza (rilevata a $\lambda = 240$ nm; $\epsilon = -0,04$ mM⁻¹cm⁻¹) dovuta alla decomposizione del perossido di idrogeno. Il saggio enzimatico è stato condotto per un minuto, in un volume finale di 1 ml di tampone K-fosfato (100 mM) a pH 7,0, con H₂O₂ (12 mM) e aliquote opportune di campione. L'attività dell'enzima è stata quantificata spettrofotometricamente e calcolata rispetto alle proteine totali.

3.1 Analisi statistica

Per ciascun biomarker e per l'indice epatosomatico, al fine di valutare la significatività statistica delle differenze tra le risposte biologiche misurate nelle 2 specie ittiche catturate nelle 2 aree, è stata prima di tutto verificata la distribuzione dei dati (test di Shapiro Wilk). Nel caso di dati distribuiti normalmente è stato utilizzata l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) e, come post-hoc, il test di Newmann Keuls; nel caso di dati non distribuiti normalmente è stato utilizzato il test non parametrico Kruskal Wallis e, come post-hoc, il test U di Mann Whitney. I dati relativi gli organismi pescati presso Capo Teulada sono stati confrontati con i dati di organismi pescati a Capo Spartivento.

Come livello di significatività è stato utilizzato $p < 0,05$.

4. Risultati

In totale sono stati prelevati organi e/o tessuti da 13 esemplari appartenenti alla specie *Conger conger* e 19 esemplari appartenenti alla specie *Muraena helena* distribuiti tra l'area di Capo Teulada ed il sito di "controllo" Capo Spartivento.

Il dettaglio dei parametri biometrici relativi alle catture effettuate nelle due aree sono riportati in Tabella 4.1, mentre i valori medi delle risposte biochimiche analizzate nei tessuti di *C. conger* e *M. helena* prelevati nelle 2 aree nell'estate 2018, sono riportati nella Tabella 4.2 (a e b) e in Figura 4.1 e 4.2.

Relativamente a *C. conger*, la lunghezza totale degli individui catturati è risultata distribuita tra 60 e 94,5 cm, con una lunghezza media di 73,3 cm ($\pm 24,4$ cm). Le catture di grongo sono avvenute principalmente nella zona di Capo Teulada ed hanno interessato individui di sesso femminile. E' noto, infatti, come gli esemplari di sesso maschile, praticamente assenti nelle aree di piattaforma continentale, popolino per lo più aree a profondità maggiori (400 - 1000 m) rispetto all'area di studio (Cau, 1983). L'indice epatosomatico ha presentato valori piuttosto omogenei per le due aree investigate pari a 0,90 e privi di differenze significative.

Relativamente a *M. helena*, la lunghezza totale degli individui catturati è risultata compresa tra 52 e 104 cm, presentando una lunghezza media di 65,5 cm ($\pm 11,8$ cm). Anche in questo caso le catture hanno interessato principalmente individui di sesso femminile ma distribuite abbastanza uniformemente tra i due siti investigati. L'indice epatosomatico anche in questo caso non è risultato statisticamente differente tra le due aree, attestandosi per entrambe su valori di circa 1,3.

Per quanto riguarda le analisi delle risposte biochimiche l'attività dell'**AChE** è risultata, in generale, compresa tra 21,4 e 48,7 nmoli/min/mg prot in *M. helena*, e tra 17,8 e 36,7 nmoli/min/mg prot in *C. conger*, con valori medi leggermente più elevati presso C. Teulada in entrambe le specie.

La frequenza dei **MN** è risultata compresa tra 0 e 1,0 ‰ in entrambe le specie, con valori medi leggermente più elevati a C. Teulada per *M. helena*, e a C. Spartivento per *C. conger*.

L'attività delle **GSTs** è risultata compresa tra 399,7 e 1530,4 nmoli/min/mg prot in *M. helena* e tra 466,9 e 1420,6 nmoli/min/mg prot in *C. conger*, con valori medi leggermente più elevati a C. Teulada per entrambe le specie. L'**EROD** è risultato compreso tra 0,5 e 3,5 pmol/min/mg prot per *M. helena* e tra

0,9 e 7,3 pmol/min/mg prot per *C. conger*, con valori medi leggermente più elevati a C. Spartivento per entrambe le specie.

L'attività della **CAT** è risultata compresa tra 121,2 e 303,2 μ mol/min/mg prot in *M. helena* e 117,0 e 323,0 μ mol/min/mg prot in *C. conger*, con valori medi leggermente più elevati a C. Teulada per *M. helena* e a C. Spartivento per *C. conger*.

Sebbene per entrambe le specie i valori della maggior parte dei biomarker analizzati siano risultati leggermente più elevati nei pesci catturati nell'area di capo Teulada rispetto a quelli dell'area di capo Spartivento, tali differenze non sono statisticamente significative. In particolare il confronto statistico rispetto al controllo dei valori riscontrati in organismi catturati a C. Teulada non ha evidenziato alcun effetto statisticamente significativo di inibizione dell'AChE, né di alterazione dell'attività dell'enzima del sistema antiossidante CAT, né dell'attività di enzimi coinvolti nel sistema di biotrasformazione fase I e II (EROD e GSTs rispettivamente), né tanto meno un effetto di danno al DNA (MN). Inoltre tutti i valori di MN rilevati in entrambe le specie delle due aree, sono rientrati nella classe di danno "lieve", ad eccezione dei valori relativi a *M. helena* prelevata presso C. Spartivento che rientrano nella classe di danno "assente" (Piva *et al.*, 2011).

Rel. Analisi di biomarker in specie ittiche di Capo Teulada (2019)

Tabella 4.1. – Parametri morfometrici delle specie ittiche *C. conger* e *M. helena* pescate a capo Teulada e capo Spartivento, Sardegna (anno 2018). N: numero individui; M: maschi; F: femmine; n.d.: non determinato.

Specie	Sito	lunghezza (cm)		peso organismo (g)		peso fegato (g)		peso gonadi (g)		N	M	F	n.d.	Indice epatosomatico
		media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.					
<i>C. conger</i>	C. Teulada	91,3	13,5	1672	809	17,1	7,8	2,3	1,3	11	0	9	2	0,903
	C. Spartivento	77,3	24,4	1047	1013	8,7	7,6	1,1	1,0	2	0	2	0	0,902
<i>M. helena</i>	C. Teulada	66,4	5,0	536	110	7,3	2,4	0,7	0,5	9	2	6	1	1,340
	C. Spartivento	64,7	16,0	685	763	8,5	6,7	0,6	0,6	10	2	4	4	1,369

Tabella 4.2a – Risultati analisi di biomarker in *C. onger*. Media $\pm$ deviazione standard opp. errore standard (anno 2018). CT: Capo Teulada; CS: Capo Spartivento. n.s.: non significativo.

Specie	<i>C. Conger</i>	Area: CS					Area: CT					Confronto statistico
Biomarker	u.m.	N	Media	Minimo	Massimo	d.s./s.e.m	N	Media	Minimo	Massimo	d.s./s.e.m	p
ACHe	nmoli/ min/ mg prot	2	28,97	23,11	34,83	8,29	11	29,44	17,82	36,66	6,33	n.s.
MN	‰	2	0,8	0,5	1,0	0,1	11	0,5	0,0	1,0	0,1	n.s.
GSTs	nmoli/ min/ mg prot	2	737,30	677,52	797,07	84,54	11	923,54	466,86	1420,62	298,12	n.s.
EROD	pmol/ min/ mgrot	2	3,86	2,29	5,43	2,22	11	2,98	0,91	7,29	1,82	n.s.
CAT	µmoli/ min/ mg prot	2	209,03	197,39	220,67	16,46	11	201,33	116,97	323,00	52,96	n.s.

Tabella 4.2b – Risultati analisi di biomarker in *M. helena*. Media $\pm$ deviazione standard opp. errore standard (anno 2018). CT: Capo Teulada ; CS: Capo Spartivento. n.s.: non significativo.

Specie	<i>M. helena</i>	Area: CS					Area: CT					Confronto statistico
Biomarker	u.m.	N	Media	Minimo	Massimo	d.s./s.e.m	N	Media	Minimo	Massimo	d.s./s.e.m	p
ACHe	nmoli/ min/ mg prot	10	31,44	21,36	40,92	6,58	9	32,90	27,86	48,66	6,84	n.s.
MN	‰	10	0,3	0,0	0,5	0,1	9	0,6	0,0	1,0	0,1	n.s.
GSTs	nmoli/ min/ mg prot	10	1024,48	399,70	1344,69	278,11	9	1112,07	791,14	1530,42	217,15	n.s.
EROD	pmol/ min/ mgrot	10	2,03	0,50	3,54	0,91	9	1,45	0,87	2,41	0,49	n.s.
CAT	µmoli/ min/ mg prot	10	175,92	121,21	270,97	46,31	9	197,74	149,21	303,19	49,12	n.s.

Figura 4.1 – Boxplot per gruppo dell'Attività dell'acetilcolinesterasi (AChE), dell'attività della catalasi (CAT), dell'attività delle glutazione S-transferasi (GSTs), dell'attività della 7-etoxiresorufina O-deetilasi (EROD), frequenza di micronuclei (MN) in *C. conger* espressi come media $\pm$ deviazione standard opp. errore standard (N=2-11).

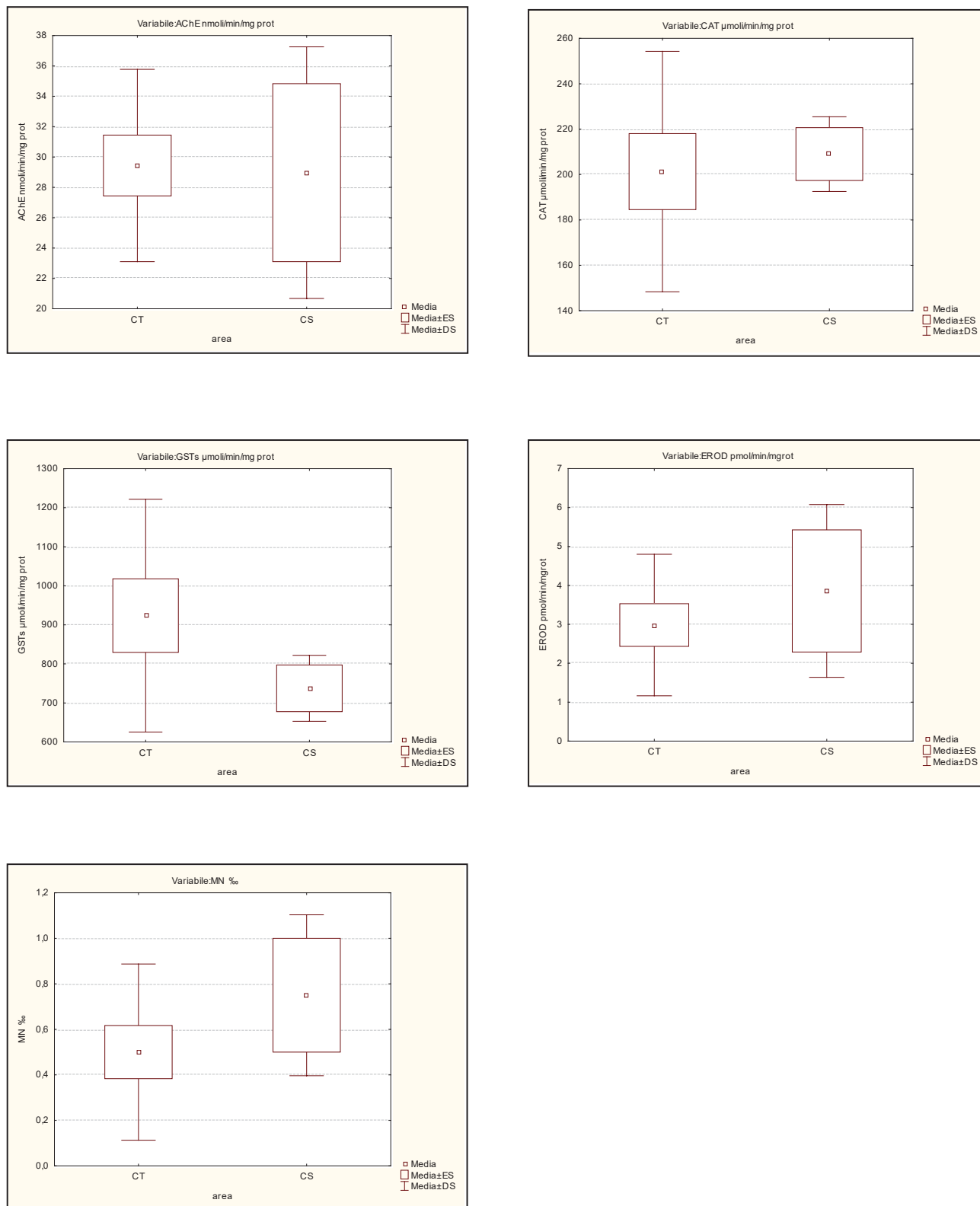
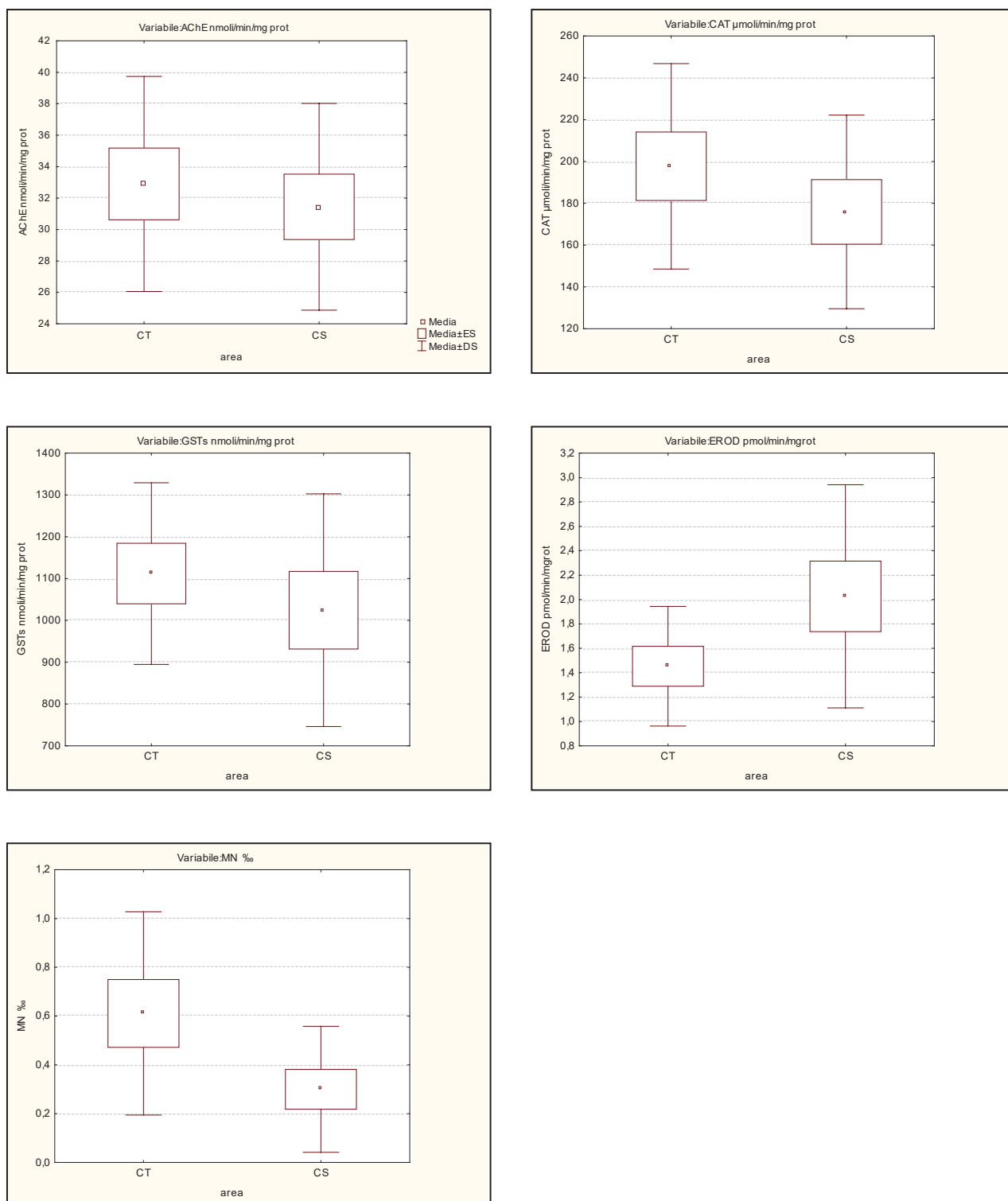


Figura 4.2 – Boxplot per gruppo dell'Attività dell'acetilcolinesterasi (AChE), dell'attività della catalasi (CAT), dell'attività delle glutazione S-transferasi (GSTs), dell'attività della 7-etoxiresorufina O-deetilasi (EROD), frequenza di micronuclei (MN) in *M. helena* espressi come mediane $\pm$ deviazioni standard opp. errore standard (N=9).



5. Conclusioni

I risultati ottenuti dalle analisi dei biomarker effettuate nelle due specie ittiche stanziali catturate nell'area di Capo Teulada *C. conger* e *M. helena* hanno evidenziato l'assenza di effetti rilevanti per le risposte biologiche ricercate rispetto a quanto misurato in organismi dell'area di Capo Spartivento. Tali risultati sono in accordo con l'assenza di differenze rilevanti nell'indice epatosomatico calcolato nelle due aree per ciascuna delle due specie catturate.

In particolare, non sono stati rilevati effetti di neurotossicità, né di stress ossidativo, né è stata rilevata alterazione nel sistema di biotrasformazione, sia al livello di enzimi coinvolti nella fase I che di enzimi coinvolti nella fase II del processo. Anche per ciò che concerne lagenotossicità, non sono stati misurati aumenti della frequenza di micronuclei nelle cellule eritrocitiche.

Rispetto alle specie indagate e ai biomarker analizzati, i risultati del presente studio non hanno evidenziato alcun tipo di effetto biologico e permettono di escludere in conseguenza, effetti dovuti alla presenza dei residui bellici nell'area di Capo Teulada.

Bibliografia

- Abele, D., Vasquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T. 2012. Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems. Blackwell Publishing Ltd. Pp. 524.
- Amato, E., Alcaro, L., Corsi, I., Della Torre, C., Farchi, C., Focardi, S., Marino, G., Tursi, A., 2006. An integrated ecotoxicological approach to assess the effects of pollutants released by unexploded chemical ordnance dumped in the southern Adriatic (Mediterranean Sea). *Marine Biology* 149, 17–23.
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J-C, Rainbow, P.S., 2013. Ecological biomarkers: indicators of ecotoxicological effects. CRC Press. Taylor and Francis Group. Pp. 450.
- Bucheli, T. D., Fent, K., 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 25, 201-268.
- Cau, A., Manconi, P. 1983. Sex-ratio and spatial displacement in *Conger conger* (L.). *Rapports Commission internationale Mer Méditerranée* 28, 93-96.

- Day, K.E., Scott, I.M., 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphate insecticides. *Aquatic Toxicology* 18, 101-113.
- Della Torre, C., Petochi, T., Corsi, I., Dinardo, M.M., Baroni, D., Alcaro, L., Focardi, S., Tursi, A., Marino, G., Frigeri, A., Amato, E. DNA damage, severe organ lesions and high muscle levels of As and hg in two benthic species from a chemical warfare agent dumping site in the Mediterranean Sea. *Science of the Total Environment* 408, 2136-2145.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Bioc. Pharmacology* 7, 89-95.
- Fahimi, H.D. and Sies, H. (eds) 1987. *Peroxisomes in Biology and Medicine*. New York: Springer-Verlag.
- Goeptar, A. R., Scheerens, H., Vermeulen, N.P.E., 1995. Oxygen reductase and substrate reductase activity of cytochrome P450. *Critical Review in Toxicology* 25, 25-65.
- Gorbi, S., Benedetti, M., Virno Lamberti, C., Pisanelli, B., Moltedo, G., Regoli, F., 2009. Biological effects of diethylene glycol (DEG) and produced waters (PWs) released from offshore activities: A multi-biomarker approach with the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Environmental Pollution* 157, 3166–3173.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry* 193, 266-275.
- Najimi, S., Bouhaimi, S., Daubeze, M., Zekhnini, A., Pellerin, J., Narbonne, J.F., Moukrin, A., 1997. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution of Agadir marine bay (South Morocco). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 901-912.
- Perin, G. 2004. *Ambiente e Salute*. Venezia, Cà Foscari, vol. 2, pp. 1-400.
- Piva, F., Ciapriani, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., Regoli, F., 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere* 83, 475-485.
- Regoli, F. and Winston, G.W., 1999. Quantification of Total Oxidant Scavenging Capacity of Antioxidants for Peroxynitrite, Peroxyl Radicals, and Hydroxyl Radicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* 156, 96–105.
- Regoli, F., Bocchetti, R., Filho, D.W., 2012. Spectrophotometric assay of antioxidants. In: Abele, D., Vasquez-Medina, J.P., Zenteno-Savin, T. (Eds), *Oxidative Stress in Aquatic Ecosystems*. Blackwell Publishing Ltd. Pp. 367-380.

- Stagg, R., McIntosh, A. and Gubbins, M.J., 2016. Determination of CYP1A-dependent mono-oxygenase activity in dab by fluorimetric measurement of EROD activity in S9 or microsomal liver fractions. ICES TIMES 57, 21 pp.
- Walker, C.H., Thompson, H.M., 1991. Phylogenetic distribution of cholinesterase and related esterases. In: Mineau P. (Ed), Cholinesterase-inhibiting Insecticides, Chemicals in Agriculture. Elsevier, Amsterdam. Vol.2: 1-17.

Allegato 1 - “Preparazione campioni per analisi di Biomarker su fauna ittica”

Operazioni da eseguire prima del prelievo di organi/tessuti

- Per ciascuna stazione registrare, nella “Scheda di campionamento”, i parametri relativi alle catture effettuate (data, coordinate stazione, n. animali, specie *et al.*) ed identificare ciascun esemplare con codice univoco (si consiglia di seguire un ordine cronologico a prescindere dalla stazione in cui sono state effettuate).
- Per ciascun individuo riportare nella “Scheda di campionamento” i seguenti parametri: lunghezza totale (TL) (in centimetri), peso dell'animale (in grammi), sesso (Femmina o Maschio), peso delle gonadi (in grammi), maturità delle gonadi (secondo “Scala di maturità” MEDITS allegata), peso del fegato (in grammi), descrizione dell'aspetto esteriore dell'esemplare, annotando la presenza di eventuali lesioni esterne, malformazioni, parassiti.
- Per ciascuna stazione e ciascun individuo preparare i barattoli in cui conservare i tessuti/organi scrivendo, con pennarello indelebile, il codice scelto per identificare ciascun individuo con l'aggiunta dell'iniziale del tessuto prelevato (C: cervello; F: fegato; S: sangue; B: bile). Es. “ME001-C”: cervello di *Muraena helena* esemplare 1; “ME001-F”: fegato di *M. helena* esemplare 1 (stesso esemplare),

Prelievo tessuti/organi (dissezione)

- Gli esemplari di fauna ittica, una volta catturati, vanno mantenuti vivi fino al momento del prelievo dei tessuti e, in ogni caso, dissezionati non oltre 10 minuti dall'uccisione dell'organismo.
- Prima del prelievo, gli esemplari dovranno essere storditi/anestetizzati (non utilizzando farmaci ma mantenendo gli animali in ghiaccio fino a completo stordimento oppure, qualora non si stordiscano con il ghiaccio, stordirli con una “botta in testa”, oppure decapitazione)
- Durante le operazioni di dissezione, mantenere il tessuto prelevato sempre in ghiaccio, fino al momento del trattamento in azoto e conservazione a -80°C.

Conservazione campioni

Una volta eseguita la dissezione, mettere ciascun tessuto appartenente a ciascun animale nella provetta corrispondente e immergerlo in **azoto liquido** prima possibile (circa -195 °C). Qualora fosse più comodo per il trasporto, inserire i campioni immediatamente nel *dewar* contenente azoto liquido nel cestello corrispondente alla stazione e conservarli lì fino a consegna al laboratorio di Roma - C. Romano (o fino a spostamento in ghiaccio secco, esclusivamente per il trasporto). I campioni dovranno essere sempre completamente immersi in azoto liquido.

Qualora il trasporto dei campioni al laboratorio sia previsto dopo un periodo superiore alle 24 ore, controllare giornalmente il livello dell'azoto liquido e rabboccarlo se necessario.

Tab. 1 - Indicazioni di prelievo e di conservazione campioni.

Tessuto	Prelievo	Conservazione	Trasporto	Note
Sangue	Estrarre il sangue (almeno 200µl) dalla vena caudale mediante una siringa eparinizzata (precedentemente avvinata con eparina)	Provetta (Falcon) da 15ml con tappo a vite (possibilmente anche con parafilm intorno al tappo), a cui deve essere aggiunto Carnoy*. Mantenere in ghiaccio o in frigo (4°C). Rapporto sangue:Carnoy = circa 1:10 (es. 200µl di sangue a cui viene aggiunto Carnoy fino a 2 ml).	T a 4°C (es. in borse frigo con siberini)	Porre uno strato di scotch trasparente sul codice scritto sulla provetta al fine di evitare la sua possibile cancellazione a causa del Carnoy. Utilizzare una siringa (con ago) “nuova” per ciascun animale
Cervello	Tagliare la scatola cranica e prelevare con le pinzette l'intero organo	Eppendorf da 2 ml forata o provetta tipo Kartell da 7 ml forata (in base alle dimensioni del tessuto). Congelamento immediato in azoto liquido	T < -80°C (in azoto liquido o in ghiaccio secco)	
Fegato	Sezionare il pesce e prelevare con le pinzette il fegato dalla cavità addominale, facendo attenzione ad eliminare altri tessuti non appartenenti al fegato	Provetta (es. Kartell) da 7-22 ml forata sul tappo (scegliere in base alle dimensioni del tessuto). Congelamento immediato in azoto liquido	T < -80°C (in azoto liquido o in ghiaccio secco)	Qualora l'organo fosse particolarmente voluminoso, utilizzare più provette opportunamente siglate (es. 1/2; 2/2)
Cistifellea (se possibile)	Prelevare la cistifellea dalla cavità addominale, facendo attenzione a non romperla	Provetta (eppendorf) da 2 ml, oppure provetta (Kartell) da 7 ml forata sul tappo (scegliere in base alle dimensioni del tessuto). Congelamento immediato in azoto liquido	T < -80°C (in azoto liquido o in ghiaccio secco)	Porre attenzione a non rompere il sacco della bile durante il prelievo, al fine di evitare la contaminazione di altri organi presenti nella cavità addominale (es. fegato)

* Il Carnoy è costituito da ac. acetico:etanolo = 1:3 (es. 3 ml ac. acetico +9 ml etanolo=12ml tot)

Trasporto campioni

Trasportare i campioni di cervello, fegato (e cistifellea) direttamente nel dewar contenente azoto liquido oppure in contenitori termicamente isolati contenenti ghiaccio secco in quantità opportuna.

Nel caso di campioni di sangue il trasporto delle provette (falcon) deve avvenire in borse frigo provviste di siberini (in quantità sufficiente perché si mantenga la temperatura richiesta fino a consegna al laboratorio biomarker di Roma - C. Romano).

Il trasporto deve avvenire in tempi stretti (massimo 48 ore) onde evitare lo scongelamento dei campioni causa evaporazione del mezzo di conservazione.

Soluzioni, reagenti e sostanze necessarie

- Carnoy (soluzione 25% di acido acetico e 75% di etanolo)
- Eparina
- Azoto liquido (Quantità necessaria affinché i campioni siano sempre completamente immersi, fino all'arrivo in laboratorio a Roma - C. Romano)
- Ghiaccio normale (per mantenere i pesci prima della dissezione, per mantenere i tessuti durante la dissezione e per i campioni di sangue)
- Ghiaccio secco (eventuale, per trasporto campioni)

Materiale necessario

- Bisturi, forbici, pinzette per dissezione (sciacquate tra un campione e l'altro)
- Siringhe sterili da 1 e 2 ml usa e getta (una per ogni animale)
- Aghi per siringa misure 22G e 26G (da selezionare a seconda della specie pescata)
- Contenitore in polistirolo per mantenere i tessuti in ghiaccio.
- Contenitore in polistirolo (o altro contenitore idoneo) con relativo tappo per trattamento di crioconservazione in azoto liquido
- Eppendorf da 2 ml (tappo a pressione) a cui precedentemente è stato apportato un piccolo foro (con la punta di una pinzetta) sul tappo e sulle pareti esterne
- Provette Falcon da 15 ml (con tappo a vite)
- Contenitori tipo Kartell in polietilene con tappo a pressione da 7 e da 22 ml (v. foto sotto) a cui precedentemente è stato apportato un piccolo foro (con la punta di una pinzetta) sul tappo e sulle pareti esterne della provetta (necessario per l'utilizzo in azoto liquido)
- Pennarello indelebile
- Contenitore dove mantenere gli esemplari vivi fino a dissezione
- Ittiometro/rondella metrica
- Bilancia tecnica
- "Scheda di campionamento"
- Dewar per azoto liquido provvisto di cestelli idonei
- Carta da laboratorio
- Borse frigo con siberini (numero sufficiente a mantenere la T idonea fino ad arrivo in laboratorio a Roma- C. Romano)

[illegible]

Allegato 3

Sezione sperimentale di Livorno per la valutazione del rischio ecologico in aree marino-costiere del CN-COS ISPRA e Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente dell'Università Politecnica delle Marche

Progetto POLIGONI - Operazione POSEIDONE

Studio dello sviluppo larvale e dell'insorgenza di alterazioni genotossiche nell'echinoide *Paracentrotus lividus*



Relazione tecnica

Silvia Giuliani e Davide Sartori

CN-COS ISPRA Sezione sperimentale per la valutazione del rischio ecologico in aree marino costiere - Livorno

Maura Benedetti e Francesco Regoli

Laboratori dell'Università Politecnica delle Marche, Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente

Luglio 2019

1 Saggio di embriotossicità

L'affidabilità del riccio di mare come bioindicatore è riconosciuta a livello mondiale e già a partire dagli anni '80 i test di fecondazione e di sviluppo embrionale sono stati inclusi nella lista ICES (1997) dei test biologici più attendibili per il monitoraggio dell'inquinamento marino. Protocolli standard per i test di fecondazione e di sviluppo embrionale sono stati messi a punto per le specie della costa orientale (*Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus droebachiensis*) e occidentale (*Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus droebachiensis*, *Dendraster excentricus*) degli Stati Uniti (USEPA 1995, ASTM, 1995) e per il Canada (Environment Canada, 1992).

In Italia, la specie autoctona *Paracentrotus lividus*, ha trovato applicazione in campo ecotossicologico ed è stata impiegata sia nella valutazione della qualità di matrici ambientali quali acque e sedimenti marini (Giuliani *et al*, 2002) sia nella stima della tossicità di sostanze o preparati solubili in acqua di mare.

I saggi di tossicità comunemente svolti su matrici varie impiegano gameti recuperati da organismi prelevati in aree lontane da impatti antropici e o mantenuti in sistemi di stabulazione.

Nel seguente studio, la specie *P. lividus* è stata studiata quale specie sentinella in grado di fornire, tramite lo studio dello sviluppo larvale, importanti informazioni su possibili fattori di stress presenti nelle aree di raccolta degli organismi.

2 Insorgenza del danno al DNA attraverso la determinazione della frequenza dei micronuclei

I micronuclei, osservati per la prima volta da Howell nel 1891, sono delle piccole porzioni di nucleo, identici al nucleo principale che si trovano nel citoplasma delle cellule e che sono espressione sia di eventi di rottura del DNA che di perdita cromosomica (Fenech, 2007). Lo studio di questa tipologia di danno al DNA ha trovato larga applicazione in ambito ecotossicologico, poiché molte sostanze xenobiotiche ne causano un aumento e per questo motivo viene considerato un

valido biomarker utile per la determinazione della genotossicità dei contaminanti ambientali. Vista la sua sensibilità di risposta e la sua facile applicabilità, da oltre 30 anni questo test è utilizzato su un'ampia varietà di tipi cellulari e di specie appartenenti anche all'ambiente acquatico, tra cui pesci, molluschi bivalvi, crostacei ed echinodermi (Fenech *et al.*, 2003; Saotome *et al.* 1999). In particolare, negli echinodermi il test è stato anche effettuato negli embrioni del riccio di mare allo stato di blastula, circa 256 cellule con una durata dell'esposizione di circa una notte (Saotome *et al.*, 1999).

In questo studio pilota, gli embrioni della specie *P. lividus* sono stati esposti ad alcune delle matrici ambientali da testare in modo da ottenere delle informazioni preliminari anche sui loro possibili effetti genotossici.

3 Raccolta organismi

Gli echinodermi sono stati prelevati in quattro stazioni (figura 1); due ricadenti nell'area del Poligono di capo Teulada (Cala Aligusta e Punta Tonnara) e due, in qualità di controllo, posizionate nella costa est esternamente all'area del del poligono (Porto Tramatzu e Capo Spartivento).



Figura 1: aree di prelievo degli esemplari di riccio

In ogni stazione sono stati raccolti circa 30 individui adulti di *P. lividus*. Gli organismi sono stati collocati in un contenitore di plastica ricoperti con abbondante carta bibula umida per minimizzare lo stress da trasporto ed evitare così possibili emissioni di gameti. Gli organismi sono stati così trasportati in laboratorio opportunamente climatizzato a 18 ± 1 °C, in attesa del loro utilizzo per l'allestimento delle prove.

3.1 Procedura del test di embriotossicità

Il saggio biologico di sviluppo embrionale con il riccio di mare ha come *endpoint* lo sviluppo della larva di *P. lividus* a pluteo a quattro braccia (P4). Il saggio di sviluppo embrionale con *P. lividus* è stato eseguito sulla base delle metodiche riportate nel quaderno di ecotossicologia ISPRA n. 11/2017 (ISPRA, Quaderni –Ricerca Marina n. 11/2017) e riportate brevemente di seguito.

Gli esemplari di *P. lividus* di sesso maschile e femminile, in numero uguale e non inferiori a 5 esemplari per sesso, sono stati stimolati all'emissione dei gameti mediante l'iniezione nel celoma, attraverso la membrana peristomale, di 1 ml di una soluzione di KCl 0,5 M. Per assicurare una buona qualità dei gameti (sperma vitale e uova mature), sono stati raccolti soltanto i gameti rilasciati durante i primi 30 minuti dopo l'iniezione.

Le uova sono state recuperate in *beaker* di vetro da 100 ml riempiti con acqua di mare (Foto 1), posizionando la femmina con il poro genitale rivolto verso l'acqua.

Lo sperma è stato recuperato “a secco”, direttamente dai gonopori dell'animale tramite aspirazione con una pipetta Pasteur di vetro (Foto 3). Lo sperma prelevato dai 5 individui adulti è stato unito a formare un unico *pool* e conservato a 4 °C in un tubo da 1,5 ml (tipo Eppendorf®).

Le uova sono state preliminarmente osservate al microscopio per valutarne la qualità prelevandone una piccola quantità mediante una pipetta Pasteur in plastica (Foto 2) e osservandole su un vetrino da orologio al microscopio (obiettivi 4x e 10x). Sono state scartate le uova che ad un controllo ottico a campione si presentavano vacuolate, irregolari o piccole.



Foto 1: Raccolta delle uova



Foto 2: Lavaggio delle uova raccolte

È stata inoltre effettuata una prova di fecondazione aggiungendo ad ogni sub-campione di uova, prelevato da ogni singolo esemplare femmina, una piccola quantità di sperma diluito in acqua di mare. Il gruppo di uova che non è stato interamente fecondato nel volgere di 1 minuto è stato scartato.



Foto 3: Recupero dei gameti di *P. lividus*: emissione dello sperma e raccolta dello sperma

Le uova risultate idonee sono state trasferite in *beaker* di vetro da 500 mL contenente FSW (Filtered Sea Water) mediante pipette Pasteur in plastica. Le uova sono state successivamente sottoposte a 3 lavaggi lasciandole decantare ed eliminando delicatamente metà del volume presente nel *beaker* in modo tale da eliminare le uova deformi, danneggiate o immature (che generalmente galleggiano) consentendo l'accumulo sul fondo del contenitore di quelle in buone condizioni. Al termine di ogni lavaggio è stata aggiunta acqua di mare filtrata riportando il volume dell'acqua nel *beaker* al livello iniziale. Durante e dopo i lavaggi, le uova sono state conservate a 18 ± 1 °C. Le sospensioni di uova sono state diluite o concentrate fino a raggiungere una densità di 1000 uova/mL.

Per il seguente studio, per ogni stazione di campionamento, sono state complessivamente preparate 5 sospensioni di uova mantenendo separate le uova emesse da ciascun esemplare femmina e una sospensione ottenuta unendo un'aliquota di uova prelevata da ciascuna delle 5 femmine.

Le sospensioni di uova ottenute sono state fecondate aggiungendo pochi μL di sperma. Trascorsi 20 minuti, per ciascun gruppo di uova è stato verificato che la totalità delle uova fosse effettivamente fecondata. Il saggio di embriotossicità è stato eseguito incubando 1 mL di ciascuna soluzione di uova fecondate per 72 h in 10 ml di acqua di mare e una equivalente in un tossico di riferimento. In particolare, le uova fecondate di ciascuna femmina e dei *pool* di queste, sono state mantenute in acqua di mare filtrata a $0.45\ \mu\text{m}$ (FSW) per valutare la qualità dei gameti dei ricci prelevati all'interno (Cala Aligusta, Punta di Tonnara) e all'esterno del poligono (Porto Tramatzu, Capo Spartivento); parallelamente, al fine di valutare la sensibilità dei gameti, è stato allestito un controllo positivo mediante l'esposizione delle uova fecondate al tossico di riferimento Nitrato di Rame ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$).

Normalmente, gli zigoti si sviluppano e raggiungono lo stadio larvale in 48h ma il tempo di esposizione scelto per il test garantisce che tutti gli zigoti raggiungano lo stadio di larva (pluteo) nel controllo negativo. Il test è stato fissato con poche gocce di soluzione di Lugol forte.

Al termine del saggio sono state determinate le % di larve che si sono sviluppate normalmente.

Per ottenere una stima più accurata degli effetti embriotossici, si distinguono le anomalie dello sviluppo distinguendo tra plutei malformati, cioè larve sviluppate ma che presentano malformazioni scheletriche e/o all'apparato digerente e fasi pre-larvali di blastula, gastrula, prisma e pluteo precoce che si sono bloccate prima del raggiungimento del completo sviluppo.

Al fine di considerare la percentuale di effetto nelle soluzioni test, tenendo conto dell'effetto del controllo negativo, è stata utilizzata la “correzione di Abbott” (Finney, 1971), mediante la seguente formula:

$$\text{Abbott} = (X - Y) \times 100$$

dove: X = % di effetto nel campione testato; Y = % di effetto nel controllo.

In tal maniera viene raggiunta la normalizzazione delle percentuali di effetto nella sostanza tossica o nel campione ambientale testato rispetto al controllo negativo e i valori così ottenuti possono essere utilizzati sia per determinare il valore di EC20 e dell'EC50 (programma Tox Calc 5.0) sia per la restituzione della percentuale “netta” di sviluppo larvale da impiegare per le comparazioni tra le diverse prove.

3.2 Procedura del test di determinazione della frequenza dei micronuclei

Per questo studio pilota, uova fecondate di riccio, ottenute come indicato nel punto precedente, sono state esposte all'acqua di mare filtrata proveniente da Capo Spartivento e Punta Tonnara; trascorsi 2 giorni, gli embrioni sono stati fissati in alcool etilico e formalina (3:1) e mantenuti a +4°C fino al momento delle analisi.

Al momento dell'analisi i campioni fissati sono stati centrifugati a 1000 x g per 5 minuti e il *pellet* ottenuto è stato lavato con una soluzione fisiologica (NaCl 436 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, MgSO₄ 53 mM, a pH 7.3, con D-glucosio 10 mM). Dopo due cicli di lavaggi e centrifugazione, il *pellet* ottenuto è stato risospeso con 200µl di collagenasi (2mg/ml) e mantenuto in agitazione in un bagnetto termostato a 37°C per 2 ore. Trascorse le due ore, al fine di facilitare la separazione cellulare, i campioni sono stati filtrati con filtri per Falcon® del diametro di 70µm utilizzando come soluzione di lavaggio la soluzione fisiologica precedentemente impiegata e poi centrifugati a 1000 x g per 10 minuti. Dopo la centrifugazione, i *pellet* ottenuti sono stati risospesi con la soluzione tampone (NaCl 436 mM, KCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, MgSO₄ 53 mM, a pH 7.3, con D-glucosio 10 mM), strisciati sul vetrino da microscopia e fatti asciugare. Una volta asciutti, i vetrini sono stati colorati con una goccia di colorante fluorescente il 4', 6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI), alla concentrazione di 100 ng/ml ed osservati al microscopio a fluorescenza al 40X.

4 Risultati

4.1 Test di sviluppo embrionale

I risultati del test di sviluppo embrionale con *P. lividus* condotto su esemplari prelevati in due aree all'interno del Poligono militare di Capo Teulada e in due aree limitrofe esterne al poligono, non hanno evidenziato particolari criticità e nel complesso possiamo affermare che sulla base delle percentuali di plutei normoformati (P4) (figura 2) e dei valori di EC₅₀ ottenuti con il tossico di riferimento (Cu(NO₃)₂·3H₂O) (figura 3), la popolazione di ricci di mare che vive negli specchi acquei del poligono di tiro e nelle aree limitrofe, gode di buona salute.

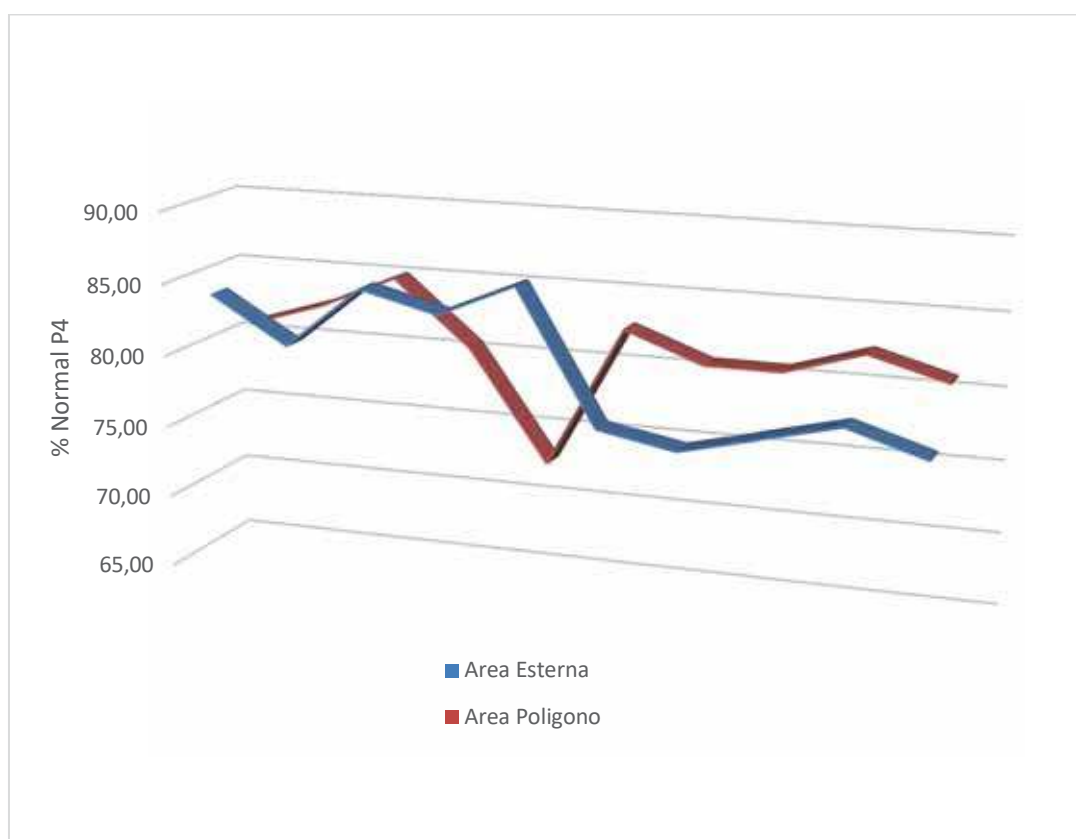


Figura 2: percentuali plutei normoformati (P4) nelle prove condotte su individui di *P. lividus* prelevati all'interno e all'esterno del poligono di Capo Teulada

Il valore dell'EC₅₀ con il tossico di riferimento (Cu(NO₃)₂·3H₂O) varia tra 18,34 (15,10 ÷ 21,06) e 24,63 (22,64 ÷ 26,24) µg/L⁻¹ per gli organismi prelevati nelle acque del Poligono di Capo Teulada e tra 19,31 (15,93 ÷ 22,02) e 26,26 (23,89 ÷ 28,16) µg/L⁻¹

¹ per gli organismi prelevati nelle aree di controllo (Figura 3). I valori ottenuti non evidenziano differenze significative tra l'area del poligono e l'area di controllo e risultano in linea con i dati riportati in letteratura scientifica per questa specie (Warnau *et al.*, 1996; Arizzi Novelli *et al.*, 2001; Fernandez and Beiras 2001; Radenac *et al.*, 2001; Sartori *et al.*, 2015; 2016).

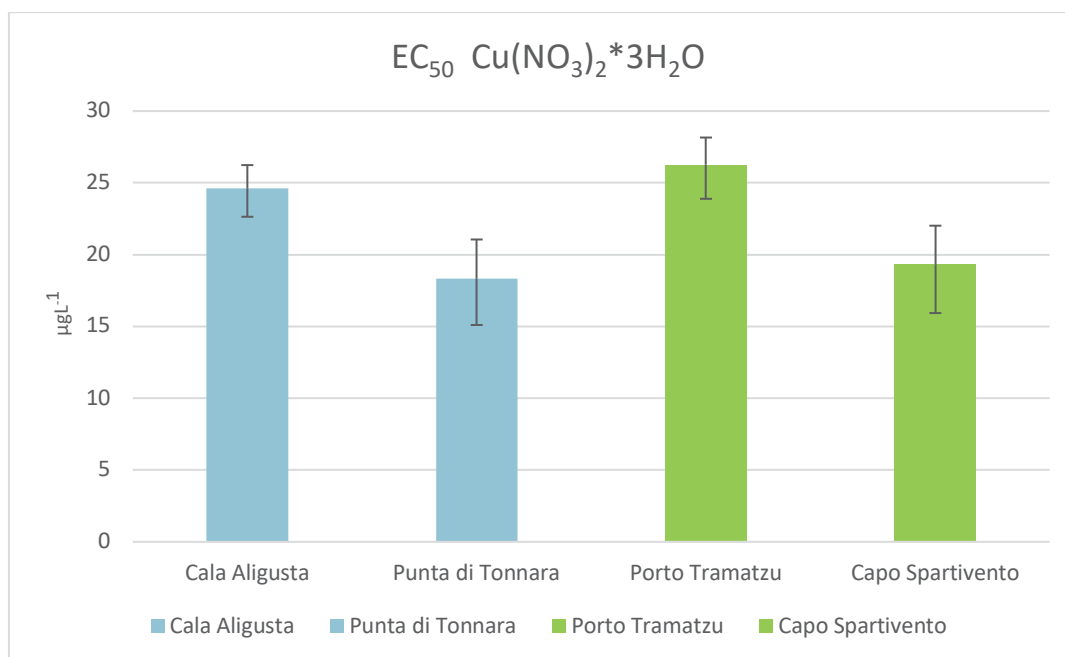


Figura 3: valori di EC₅₀ ottenuti con il tossico di riferimento per gli organismi prelevati nelle acque del poligono di Capo Teulada e nelle aree di controllo

Scendendo nel dettaglio, per gli esemplari di riccio prelevati nell'area del poligono, la percentuale di plutei normoformati è risultata, sia per il sito di Punta di Tonnara sia per Cala Aligusta, superiore all'80% ad eccezione di un solo esemplare prelevato nell'ara di cala Aligusta per il quale la percentuale di plutei normoformati è risultata essere del 73% (Figura 4 e Figura 5).

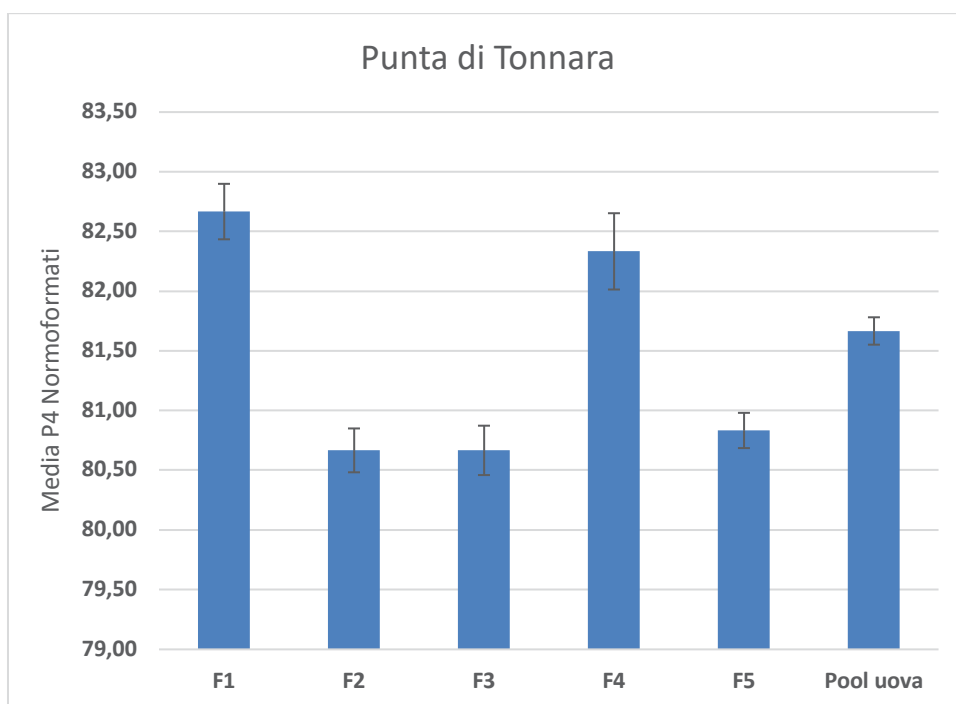


Figura 4: percentuale media di plutei normoformati ottenuta per gli esemplari di *P. lividus* prelevati nell'area di Punta Tonnara.

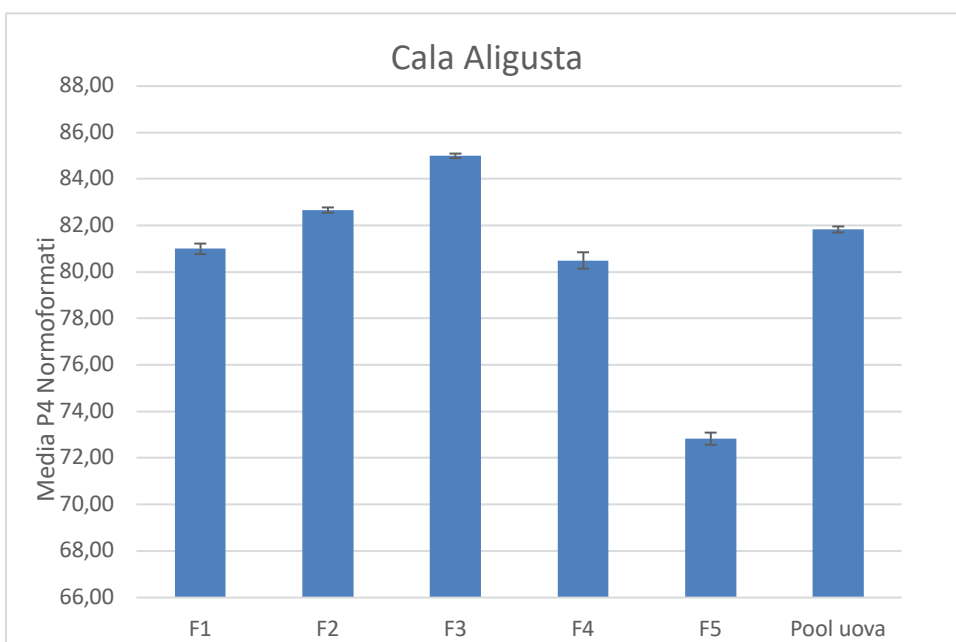


Figura 5: percentuale media di plutei normoformati ottenuta per gli esemplari di *P. lividus* prelevati nell'area di Cala Aligusta

Per gli organismi prelevati nelle acque esterne all'area del poligono e in particolare per i ricci di mare provenienti dall'area di Capo Spartivento, la percentuale di plutei normoformati ottenuti mediante il saggio di sviluppo embrionale oscilla tra il 76 e il 79%. Tale percentuale risulta, seppur di poco, inferiore al valore soglia di

accettabilità, convenzionalmente fissato all'80% per un controllo negativo (test allestito in presenza di sola acqua di mare filtrata) (Figura 6).

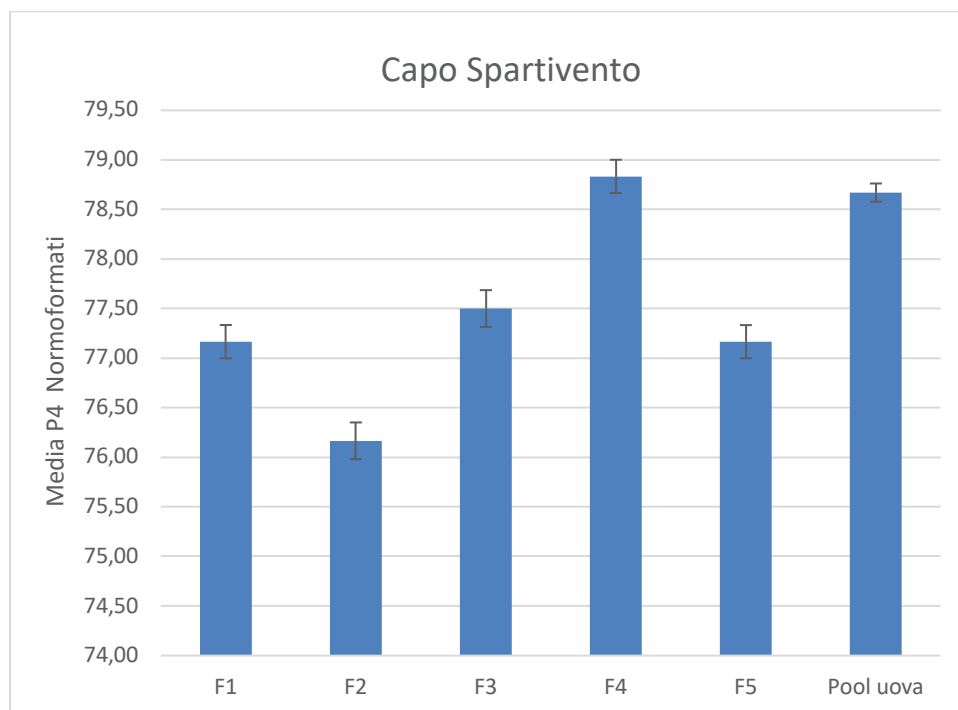


Figura 6: percentuale media di plutei normoformati ottenuta per gli esemplari di *P. lividus* prelevati nell'area di Capo Spartivento

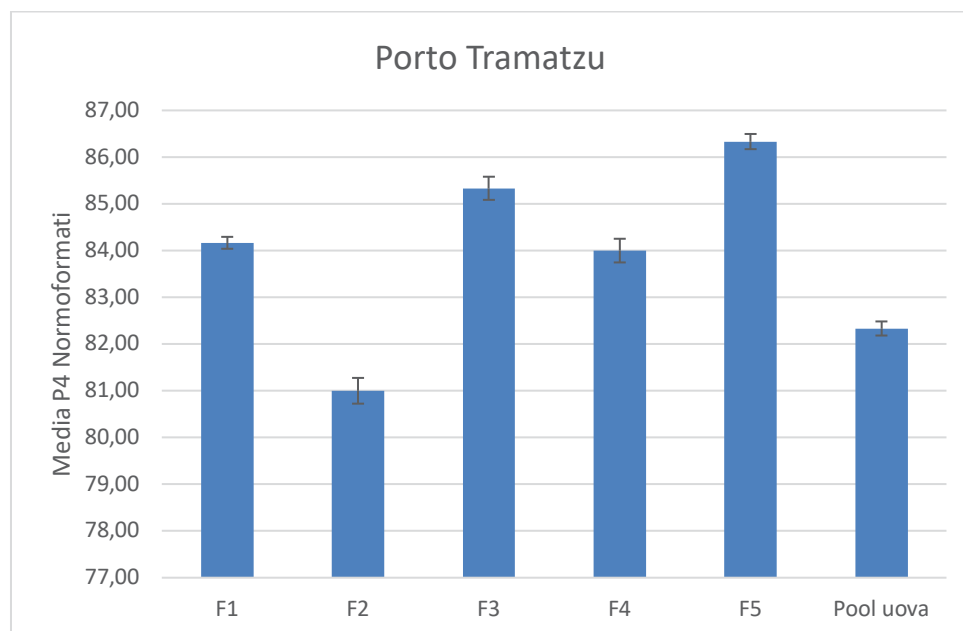


Figura 7: percentuale media di plutei normoformati ottenuta per gli esemplari di *P. lividus* prelevati nell'area di Porto Tramatzu

Per gli esemplari di *P. lividus* prelevati nell'area di Porto Tramatzu, la percentuale di plutei normoformati è risultata superiore all'80%, confermando l'assenza di evidenze significative tra i ricci di mare catturati all'interno e all'esterno del poligono dei Capo Teulada (Figura 7).

A margine dei risultati del test di sviluppo embrionale, è importante sottolineare come le dimensioni medie degli organismi raccolti nelle stazioni di controllo al di fuori della zona di interdizione del poligono militare, sia di gran lunga inferiore rispetto agli organismi prelevati nell'area del Poligono. La causa può essere riconducibile all'intenso sforzo di pesca sulle popolazioni di ricci di questo tratto di litorale. L'ipotesi, tuttavia da confermare, è che l'interdizione alla normale fruizione dell'area del poligono, possa favorire un effetto protezione similmente a quanto avviene nelle zone di riserva integrale delle aree marine protette.

4.2 Analisi sulla frequenza dei micronuclei

Per quanto riguarda l'analisi sulla frequenza dei micronuclei, i risultati preliminari sono riportati in figura 8. Questo tipo di approccio è stato applicato in via sperimentale, al fine di provare ad ottenere, sugli embrioni di questi organismi, anche un'informazione di tipo cellulare di danno al DNA. Purtroppo, nonostante la metodologia sia ampiamente utilizzata in attività di monitoraggio ambientale e scientificamente validata, alcune problematiche avvenute durante la fase sperimentale hanno reso possibile analizzare la frequenza dei micronuclei solamente negli embrioni esposti alle acque di Capo Spartivento (controllo) e Punta Tonnara (poligono). In generale, i valori basali della frequenza dei micronuclei che risultano essere elevati se confrontati con quelli che si osservano in altre specie marine, come pesci e molluschi bivalvi, sono paragonabili con quelli misurati, in altri studi, sugli embrioni di questa specie (Saotome *et al.*, 1999). Tuttavia, pur misurando un lieve aumento della frequenza dei micronuclei nel sito di Punta Tonnara rispetto al sito di riferimento (Capo Spartivento), il risultato, che è stato ottenuto su un basso numero di cellule per campione, risulta poco significativo dal punto di vista biologico ed ecologico e necessita di ulteriori investigazioni, rendendo di fatto impossibile considerare le due aree diverse tra loro.

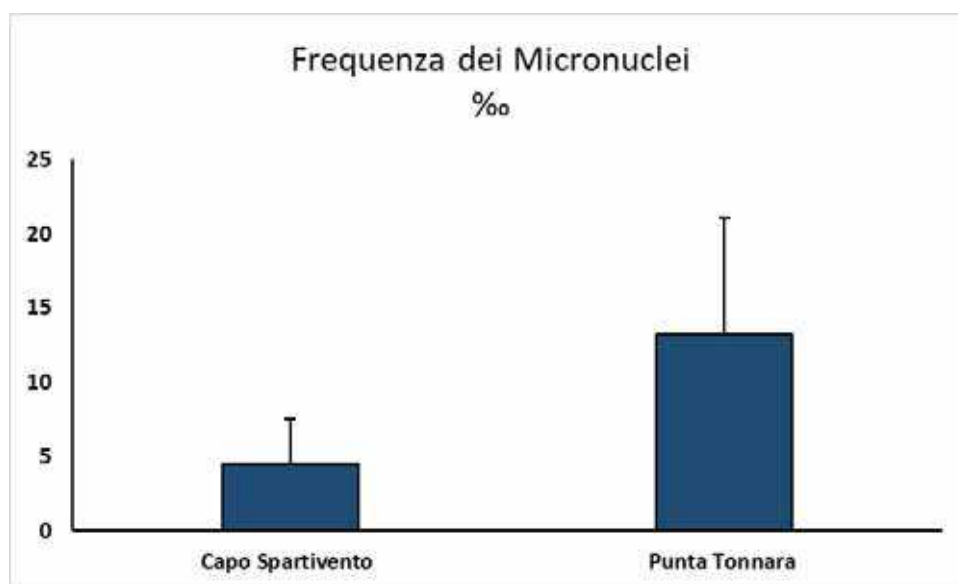


Figura 8: frequenza dei micronuclei in embrioni di *P. lividus* esposti a campioni di acqua proveniente da Capo Spartivento e Punta Tonnara. Valori espressi come media $\pm$ SEM.

5 Bibliografia

- Arizzi Novelli, A., Volpi Ghirardini, A., Giuliani, S., Falugi, C., Pagano, G., Iaccarino, M. (2001). Valutazione della tossicità di acque e sedimenti costieri con gameti e embrioni di specie autoctone di ricci di mare utilizzando metodiche differenziate. *Biol. Mar. Medit.*, **8** (2): 41-59.
- ASTM (1995). Standard guide for conducting static acute toxicity tests with echinoid embryos- E 1563-95. pp. 1029-1046.
- Chapman, G.A. (1995). Sea urchin sperm cell test. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate and Risk Assessment*. Edited by G.M. Rand, II Edition, Taylor and Francis, Bristol, PA. pp. 189-205.
- Dinnel, P.A., Pagano, G., & Ossida, P.S. (1988). A sea urchin test system for marine environmental monitoring. In: *Echinoderm Biology. Proceedings of the Sixth International Echinoderm Conference*. Edited by R.D. Burke, P.V. Mladenov, & R.L Parsley. Balkema, Rotterdam. pp. 611-619.
- Fernández N, Beiras R (2001) Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology* 10: 263-271.
- Environment Canada (1992) “Biological Test Method: Fertilization Assay Using Echinoids (Sea Urchins and Sand Dollars)”, Environment Canada, Conservation and Prot., Ottawa, Ontario, Report EPS 1/RM/27, 97p.
- Fenech M (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2(5):1084-104.
- Fenech M1, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534(1-2):65-75.
- Finney, D. J.: 1971, *Probit Analysis*, Cambridge University Press, London, UK.
- Giuliani S., Ennas C., Pellegrini D., Kozinkova L., (2002). The bioassay with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: different end-point to be applied to different environmental studies. *Fresenius Environmental Bulletin*. Vol. 11 (10): 806-809.
- His E, Heyvang I, Geffard O, De Montaudouin X (1999) A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassay for toxicological studies. *Water Res* 33: 1706-1718.
- ICES (1997). *Report of the ICES Advisory Committee on the Marine Environment*.
- ISPRA, Quaderni – Ricerca Marina 11/2017 - ISBN 978-88-448-0870-9

- Kobayashi, N. (1984). Marine ecotoxicological testing with echinoderms. In: *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*. Edited by G. Persoone, E. Jaspers, C. Claus. State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, Belgium. pp. 341-405.
- Lera S., Macchia S. And Pellegrini D. (2006). Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus Lividus*. *Environ. Monitoring and Assessment* 122: 101-109
- Radenac G, Fichet D, Miramand P (2001) Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo. *Mar Environ Res* 51: 151-166.
- Saotome K, Sofuni T, Hayashi M (1999). A micronucleus assay in sea urchin embryos. *Mutat. Res.* 446(1):121-7.
- Sartori D, Scuderi A, Sansone G, Gaion A (2015) Echinoculture: the rearing of *Paracentrotus lividus* in a recirculating aquaculture system. Experiments of artificial diets for the maintenance of sexual maturation. *Aquacult Int* 23: 111-125.
- Sartori D, Pellegrini D, Gaion A (2016) Analysis of Variability in Embryological Response of Two Sea Urchin Species to Spatial and Temporal features-Can these Factors Influence Responses in Standardized Ecotoxicological Assays?. *Expert Opin Environ Biol*. S1.
- US EPA. Chapman, G.A., Denton, D.L., & Lazorchak, J.M. (1995). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving water to West Coast marine and estuarine organisms. U.S. EPA, 600/R-95/136, Cincinnati, Ohio.
- Warnau M, Iaccarino M, DeBiase A, Temara A, Jangoux M, et al. (1996) Spermiotoxicity and embryotoxicity of heavy metals in the echinoid *Paracentrotus lividus*. *Environ Toxicol Chem* 15: 1931-1936.

Allegato 4

Laboratorio di misure radiometriche ISIN



Ispettorato nazionale
per la sicurezza nucleare
e la radioprotezione

Misure radiometriche su sedimenti marini prelevati nei fondali del Poligono Militare di Capo Teulada



Rapporto tecnico

----- Ottobre 2019 -----

Informazioni legali

L'Ispettorato nazionale per la sicurezza nucleare e la radioprotezione (ISIN) e le persone che agiscono per suo conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo rapporto.

ISIN - Ispettorato nazionale per la sicurezza nucleare e la radioprotezione

Via Capitan Bavastro, 116 – 00154 Roma

Sede laboratori: Via di Castel Romano, 100 – 00128 Roma

www.isinucleare.it

Riproduzione autorizzata citando le fonti

Autori

Buchetti Monica, Conti Daniela, Fontani Sonia, Innocenzi Valeria, Magro Leandro, Mariani Sara, Menna Giuseppe, Torri Giancarlo.

Indice

1. Introduzione.....	5
2. Sito di indagine	6
2.1. Poligono Militare di Capo Teulada.....	6
2.2. Area marina di Capo Spartivento	9
3. Radioisotopi di interesse.....	9
3.1. Uranio	10
3.2. Torio	11
4. Campionamento.....	12
5. Misure di spettrometria gamma	13
5.1. Preparazione dei campioni.....	13
5.2. Strumentazione e metodo di misura	13
5.3. Risultati delle misure	14
6. Analisi dei risultati e conclusioni	18
7. Riferimenti bibliografici	20
8. Allegati	21

1. Introduzione

Nell'ambito dell'“Accordo quadro in materia di tutela ambientale” stipulato tra l'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) e lo Stato Maggiore dell'Esercito (SME) il 3 marzo 2016, una prima convenzione attuativa ha riguardato il progetto “Valutazione delle esigenze di rimozione di residui dai fondali marini prospicienti le aree addestrative di Capo Teulada (CA) e Torre Veneri (LE)” denominato “Operazione Poseidone”, gestito dal “Centro Nazionale per le crisi e le emergenze ambientali e il danno” (CN-CRE) dell'ISPRA.

Attraverso uno studio multidisciplinare, il progetto si prefigge di accertare la possibile nocività ambientale del materiale di origine militare affondato nei tratti di fondale interessati dalle attività addestrative delle F.A., di valutare le necessità di rimozione di detto materiale e di formulare ipotesi di misure di contenimento degli impatti. Sono state richieste all'ISIN (al tempo Area Fisica del Centro Nazionale per la rete nazionale dei laboratori dell'ISPRA) misure radiometriche per la determinazione di Torio-232 (Th-232) e di radioisotopi di uranio.

Il presente rapporto riporta i risultati delle misure radiometriche di spettrometria gamma effettuate in 17 campioni di sedimento marino prelevati nei fondali del Poligono Militare di Capo Teulada e in 4 campioni prelevati nell'area marina di Capo Spartivento, individuata dal CN-CRE quale sito di confronto.

Nel rapporto sono riportati anche i risultati delle misure radiometriche dei principali radionuclidi naturali rilevati, del Cesio-137 (Cs-137) e dell'Americio-241 (Am-241). Non è stata rilevata la presenza di ulteriori radionuclidi artificiali gamma emettitori superiore alla minima attività rilevabile.

2. Sito di indagine

2.1. Poligono Militare di Capo Teulada

Il Poligono Militare di Capo Teulada è stato fondato nel 1959 ed è gestito dal 1° Reggimento Corazzato Teulada. L'area del Poligono è ubicata nel settore sud-occidentale della Sardegna nell'area di Capo Teulada e ricade interamente all'interno del Comune di Teulada (Figura 1).



Figura 1– Inquadramento generale del Poligono Militare di Capo Teulada.

Il Poligono di Capo Teulada comprende:

- una parte a terra di circa 72 km², appartenente al demanio dello Stato (Figura 2);
- una parte a mare comprendente l'area prospiciente la costa, nella quale l'ancoraggio, la balneazione e la pesca sono permanentemente interdetti. In base al tipo di esercitazione programmata la predetta area viene ampliata mediante l'interdizione di aree prestabilite, C311, E311 e T811 (Figura 3);
- uno spazio aereo regolamentato.

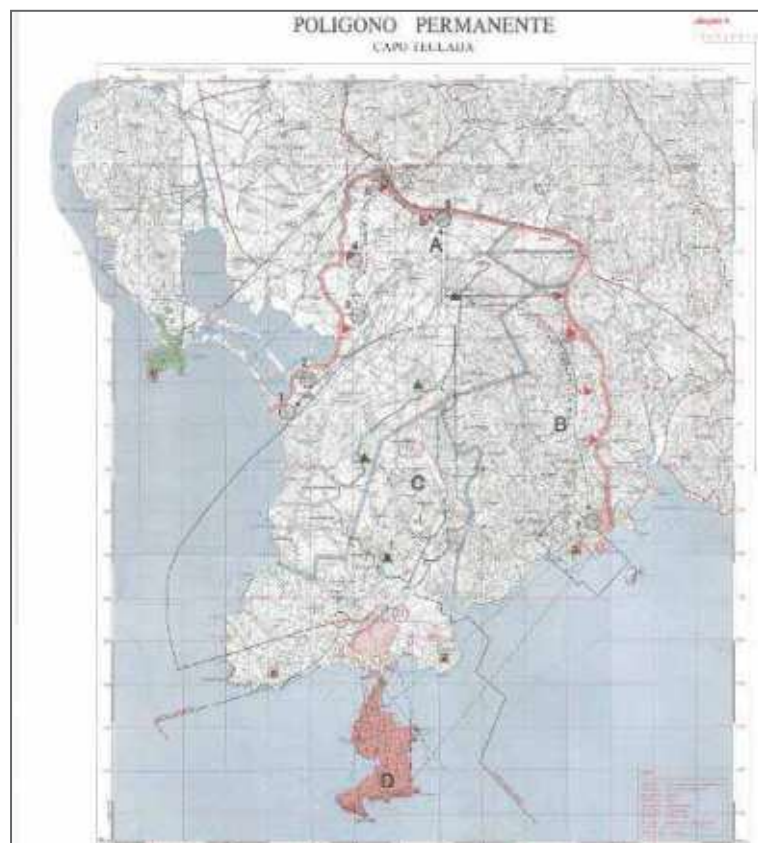


Figura 2 – Parte a terra del Poligono Militare di Capo Teulada con indicazione delle diverse aree addestrative.

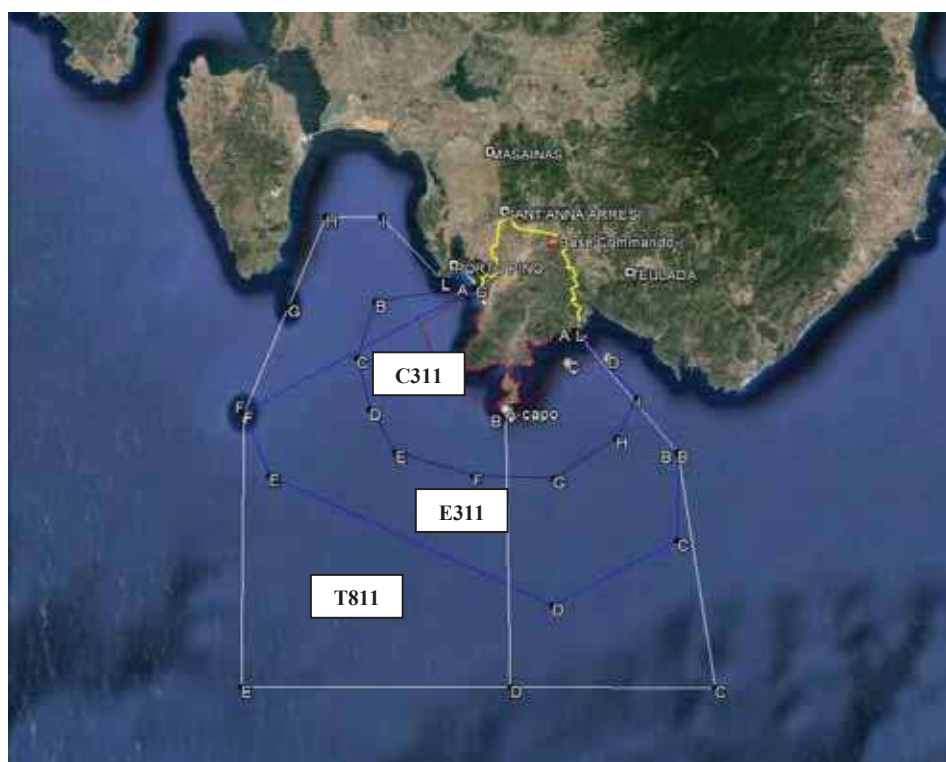


Figura 3 – Poligono Permanente di Capo Teulada: delimitazione delle aree di sgombero a mare.

Dal documento “Progetto “Poligoni” – Operazione “Poseidone” “Valutazione delle esigenze di rimozione di residui dai fondali marini prospicienti le aree addestrative di Capo Teulada (CA) e Torre Veneri (LE)” Indagine su matrici ambientali marine a Capo Teulada: campionamenti, saggi biologici e analisi di laboratorio Gennaio 2018”, risulta che l’area di fondale oggetto dell’indagine è stata individuata dal CN-CRE di ISPRA considerando l’area di sgombro a mare durante le attività addestrative, il munizionamento impiegato di cui si ha notizia e le modalità di tiro durante le esercitazioni militari (Figura 4). La sua estensione è di circa 10 km² e comprende batimetrie che arrivano a superare i 60 m. I fondali sono caratterizzati dalla presenza di *Posidonia oceanica* in praterie e su roccia. La granulometria dei sedimenti è prevalentemente grossolana, anche a profondità superiori a 30 m e tra le piante di *P.oceanica* il sedimento è detrito organogeno. Nelle località individuate quali maggiormente interessate dalla presenza di residui delle attività a fuoco nei pressi di Punta Aligusta e Punta Tonnara, sino a circa 10 m di profondità, il fondale è caratterizzato dalla presenza di ciottoli e rocce franate della costa scoscesa.

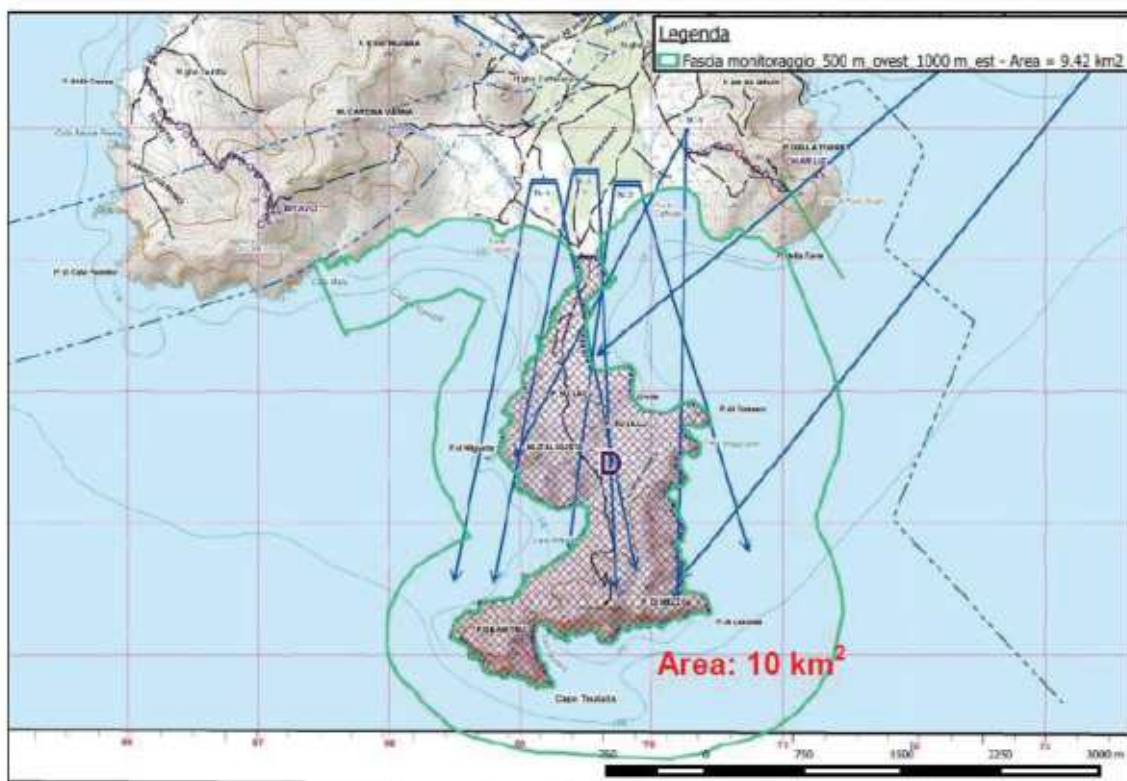


Figura 4 – Area dei fondali del Poligono Militare di Capo Teulada oggetto d’indagine (linea verde).

2.2. Area marina di Capo Spartivento

Dallo stesso documento dell'ISPRA, richiamato nel paragrafo precedente, risulta che l'area marina di Capo Spartivento è stata scelta quale sito di confronto per le caratteristiche edafiche e per la distanza da Capo Teulada, ritenuta sufficiente a escludere che esemplari delle specie stanziali analizzate nel presente studio possano popolare i fondali di entrambe nell'arco della vita (Figura 5). L'area non è stata individuata specificamente quale area di confronto relativamente alla presenza di torio e di isotopi di uranio, tuttavia non è stata oggetto di attività addestrative collegate al poligono.

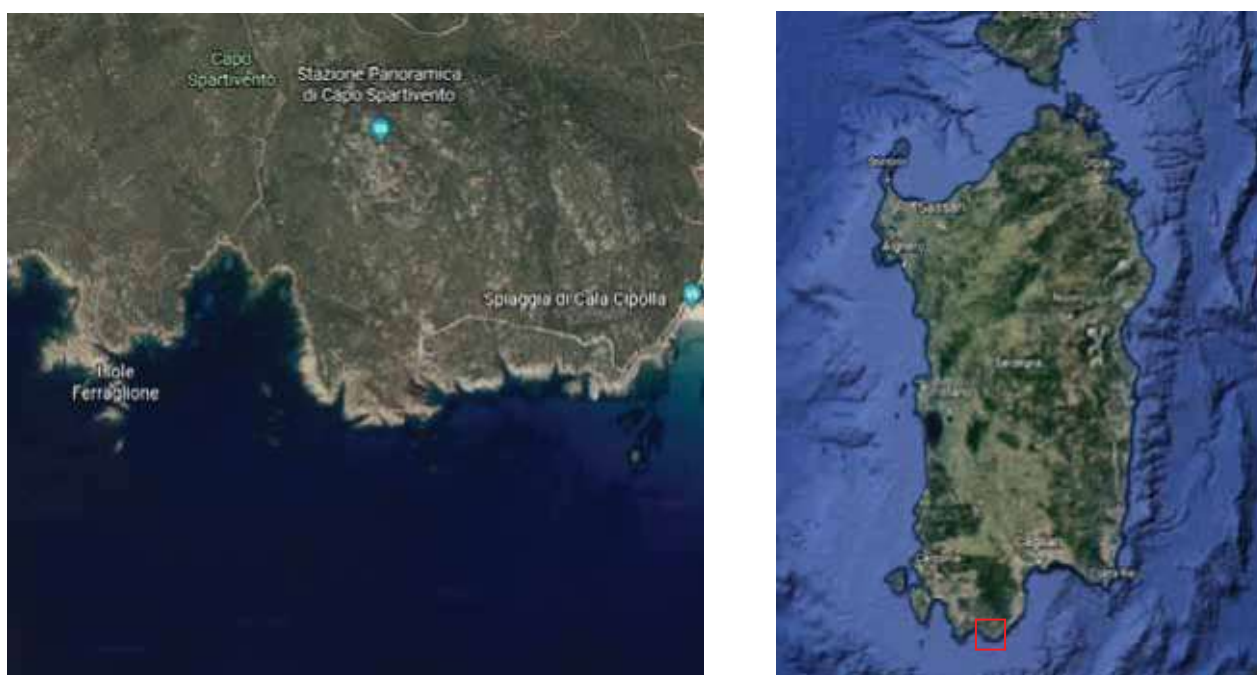


Figura 5 - Area di Capo Spartivento.

3. Radioisotopi di interesse

Le analisi radiometriche hanno riguardato la presenza di Th-232 in quanto notoriamente utilizzato nei contesti addestrativi del Poligono di Capo Teulada fino alla fine degli anni 90. In merito agli isotopi dell'uranio, se pure mai utilizzato nei poligoni militari italiani (vedi dichiarazione dell'Ammiraglio Giampaolo Di Paola, allora Ministro della Difesa, al Paragrafo 3.1) si è ritenuto comunque opportuna una determinazione analitica al fine di un controllo. Si fa presente che tutti gli isotopi in esame sono presenti in natura.

3.1.Uranio

L'uranio è un elemento chimico di origine naturale, presente in concentrazioni molto variabili in tutti i comparti dell'ambiente, ivi inclusi gli organismi viventi. In natura sono presenti tre isotopi dell'uranio: Uranio-234 (U-234), Uranio-235 (U-235) e Uranio-238 (U-238) [1] [2]. L'uranio si trova in tutti i tipi di roccia con concentrazioni medie di attività di U-238 di circa 30 Bq/kg e che variano da alcune unità di Bq/kg fino a centinaia di Bq/kg in funzione della litologia [3]. Le più basse concentrazioni di uranio si trovano nelle rocce magmatiche basiche, mentre le rocce magmatiche acide contengono le concentrazioni più alte [4] [5]. In ambito militare viene utilizzato l'uranio impoverito (DU) (e le leghe di uranio-titanio associate) che si distingue dall'uranio naturale per un più basso contenuto di U-235 e di U-234 e un più alto contenuto di U-238 (Tabella 1).

Tabella 1 - Tipica abbondanza isotopica nell'uranio naturale e nell'uranio impoverito per scopi civili e militari.

Isotopi	Abbondanza (in peso)	
	URANIO NATURALE	URANIO IMPOVERITO
U-234	0.0058%	0.001%
U-235	0.72%	0.2%
U-238	99.28%	99.8%

L'uranio impoverito è impiegato in ambito militare come componente delle blindature dei carri pesanti e nelle munizioni perforanti delle blindature [6][7]. L'elevata densità (19.0 g/cm^3), resistenza, le sue proprietà piroforiche e l'elevato punto di fusione consentono l'impiego del DU come perforatore cinetico in munizioni di vario tipo e fanno del DU un efficace materiale per realizzare le armi anti-carro. L'uso di munizionamento al DU è stato riconosciuto in una serie di conflitti militari tra cui la guerra del Golfo, Bosnia e Kosovo e in vari poligoni di tiro militari non italiani.

In merito all'utilizzo di tali munizionamenti presso i poligoni italiani, nella Commissione parlamentare d'inchiesta istituita con deliberazione del Senato del 16 marzo del 2010 si riporta (pag.31) che l'Ammiraglio Giampaolo Di Paola, (allora Ministro della Difesa), nell'audizione del 19 dicembre 2012 *“ha affermato che le Forze Armate Italiane non hanno mai impiegato munizionamento all'uranio impoverito sia in attività addestrative, per lo svolgimento delle quali ha assicurato il pieno rispetto delle normative vigenti, sia fuori dai confini nazionali. L'utilizzo del munizionamento all'uranio impoverito ha, inoltre, precisato il ministro, non è consentito nei poligoni in uso alle Forze Armate Italiane e, anche i paesi alleati o amici che utilizzano tali installazioni, sono vincolati all'osservanza dei regolamenti d'uso, in cui sono elencati sia la tipologia di armamento che il munizionamento impiegabile”*.

3.2. Torio

Il torio è un elemento metallico radioattivo che nella crosta terrestre raggiunge una percentuale di 0,002%. In natura si trova, con un'abbondanza relativa maggiore del 99%, sotto forma di Th-232. E' presente in tutte le rocce e suoli con concentrazioni medie di attività di circa 40 Bq/kg e che variano da alcune unità di Bq/kg fino a centinaia di Bq/kg in funzione della litologia [3]. I principali minerali che lo contengono sono la torite e la monazite.

In ambito militare il Torio-232 (Th-232) è stato utilizzato nei missili MILAN (acronimo del francese *Missile d'Infanterie Léger ANTichar*, ovvero missile filoguidato anticarro per fanteria leggera) non per le sue proprietà radioattive, ma nel sistema di guida notturna del missile (Figura 6). Nei missili prodotti fino all'anno 1999 era, infatti, presente un componente a forma di "lunetta" costituito da una miscela contenente torio sotto forma di ossido (torina) che aveva il compito, una volta "accesa", di surriscaldare una lastra composta da Ta (tantalio) che, portato alle alte temperature, emetteva radiazione infrarossa che veniva utilizzata come tracciante notturno per la guida dell'arma. Ogni lunetta di torio delle dimensioni di qualche centimetro, conteneva complessivamente circa tre grammi di ossido di torio per un'attività complessiva di circa 20.000 Becquerel. Dopo il 2000 tutte le partite di missili Milan in dotazione alle varie Forze armate francesi, italiane e di altri eserciti, sono state ritirate perché l'amministrazione della Difesa francese aveva segnalato la presenza del Th-232 e aveva ritenuto opportuno ritirare questo tipo di armamento e impedirne l'uso.

Il Comando del Poligono Militare di Capo Teulada ha dichiarato che dal 1991 al 2004 sono stati utilizzati nel Poligono 4.242 missili con la sorgente di torio (Commissione parlamentare di inchiesta sugli effetti dell'utilizzo dell'uranio impoverito, Seduta n.32 del 20 luglio 2016).



Figura 6 - Missile Milan.

4. Campionamento

I campioni di sedimento analizzati in questa indagine sono 21, di cui 17 prelevati nei fondali del Poligono Militare di Capo Teulada e 4 nei fondali dell'area di Capo Spartivento (stazioni di controllo) (Tabella 2).

I prelievi sono stati realizzati mediante operatori subacquei del 9° Reggimento d'Assalto "Col Moschin" e a mezzo di carotiere manuale tra il giorno 11 luglio e il giorno 18 luglio 2018. Nei fondali di Capo Teulada i campionamenti sono stati eseguiti in prossimità di residui di ordigni rinvenuti in particolare a Punta Aligusta e Punta Tonnara, tratti di fondale dove risulta maggiore la loro densità spaziale.

Tabella 2 – Piano di campionamento di sedimento marino.

ID campione	Data	Località	ID stazione	Latitudine	Longitudine	Profondità (m)
1900013	11/07/2018	P.ta Tonnara	B2 Est 0001	*	*	11.3
1900014	11/07/2018	P.ta Tonnara	C2 Est 0007	*	*	30.2
1900015	11/07/2018	P.ta Tonnara	C1 Est 0004	*	*	32.0
1900016	11/07/2018	P.ta Tonnara	B2 Est 0012	*	*	23.4
1900017	11/07/2018	P.ta Tonnara	C3 Est 0085	*	*	27.7
1900018	11/07/2018	P.ta Tonnara	B2 Est 0008	*	*	14.4
1900019	12/07/2018	P.ta Aligusta	ABC5 Ovest 0003	38.87174433	8.636705667	38.5
1900020	12/07/2018	P.ta Aligusta	ABC5 Ovest 0006	38.87392067	8.640721167	25.5
1900021	12/07/2018	P.ta Aligusta	ABC5 Ovest 0011	38.87541833	8.64151	23.7
1900022	12/07/2018	P.ta Aligusta	ABC5 Ovest 0001	38.870677	8.636852333	39.6
1900023	16/07/2018	C.Spartivento	CS MR 01	38.52343	8.50221	25.6
1900024	16/07/2018	C.Spartivento	CS MR 02	38.52354	8.50102	24.1
1900025	16/07/2018	C.Spartivento	CS MR 03	38.52312	8.50263	25.6
1900026	16/07/2018	C.Spartivento	CS MR 04	~ 38.52312	~ 8.50263	22.0
1900027	17/07/2018	P.ta Tonnara	C2 Est 0025	38.88384917	8.661153	22.5
1900028	17/07/2018	P.ta Tonnara	C2 Est 0022	38.88328667	8.662522833	28.4
1900029	17/07/2018	P.ta Tonnara	C2 Est 0023	38.88329067	8.662498333	28.4
1900030	18/07/2018	P.ta Aligusta	CT MR 04**	38.52536	8.38244	18.2
1900031	18/07/2018	P.ta Aligusta	CT MR 03	38.52523	8.38254	17.3
1900032	18/07/2018	P.ta Aligusta	CT MR 02	38.52506	8.3826	14.4
1900033	18/07/2018	P.ta Aligusta	CT MR 01	38.52494	8.38239	13.5

* Dati non determinati perché prelievi effettuati in prossimità di P.ta Tonnara in tre immersioni condotte a partire da punti poco distanti tra loro laddove reperibili sedimenti di granulometria non grossolana.

**Il prelievo è stato effettuato in prossimità dei residui di un missile Milan.

5. Misure di spettrometria gamma

5.1. Preparazione dei campioni

I campioni sono stati essiccati in stufa a circa 105°C fino a costanza di peso. Successivamente circa 100 cc di campione essiccato sono stati trasferiti nei contenitori per la misura di spettrometria gamma e sono stati sigillati per evitare la fuoriuscita del gas radon e consentire il raggiungimento dell'equilibrio secolare tra Ra-226 e i suoi prodotti di decadimento (circa 30 giorni).

5.2. Strumentazione e metodo di misura

La strumentazione utilizzata per le misure di spettrometria gamma è prodotta dalla CANBERRA ed è costituita da rivelatori a semiconduttore di germanio iperpuro ad alta risoluzione (HPGe), sistema di raffreddamento ad azoto liquido, pozzetti di piombo (schermature), elettronica digitale (LYNX) e software di acquisizione ed analisi (Genie 2000 versione 3.3).

I rivelatori sono caratterizzati dalla casa madre per l'uso del software di simulazione LABSOCS, atto alla determinazione della curva di taratura in efficienza. Le tarature in energia sono ottenute con sorgenti di calibrazione certificate e i fondi ambientali sono acquisiti su base mensile.

Le analisi sono state effettuate usando una libreria specifica contenente i radionuclidi gamma emettitori della serie dell'Uranio-238 (U-238), della serie dell'Uranio-235 (U-235), della serie del Torio-232 (Th-232) e i radionuclidi gamma emettitori Cesio-137 (Cs-137) e Potassio-40 (K-40). In Allegato 1 sono riportate le tre catene di decadimento delle serie U-238, U-235 e Th-232.

Ogni spettro acquisito è stato, inoltre, esaminato individualmente per identificare eventuali altri radionuclidi gamma emettitori.

Ai fini della valutazione dei dati si evidenzia che:

- la concentrazione di attività del Th-232 si ricava indirettamente dalla misura dell'Attinio-228 (Ac-228) nell'ipotesi che il Radio-228 (Ra-228), progenitore dell'Ac-228, sia in equilibrio con il capostipite della catena di decadimento (Th-232);
- la concentrazione di attività di Torio-228 (Th-228) si ricava dalla media pesata delle concentrazioni di attività di Piombo-212 (Pb-212), Bismuto-212 (Bi-212) e Tallio-208 (Tl-208);
- la concentrazione di attività di U-238 si ricava dalla media pesata delle concentrazioni di attività di Torio-234 (Th-234) e di Protoattinio-234 metastabile (Pa-234m) (quando la debole riga di emissione di quest'ultimo è osservabile nel campione);
- la concentrazione di attività di Torio-230 (Th-230) è misurata direttamente dall'intensità della riga di emissione a 67.7 keV (quando la debole riga di emissione è misurabile nel campione).

- la concentrazione di attività del Radio-226 (Ra-226) si ricava dalla media pesate delle concentrazioni di attività di Bismuto-214 (Bi-214) e di Piombo-214 (Pb-214);
- la concentrazione di attività di Piombo-210 (Pb-210) si ricava direttamente a partire dalla riga di emissione a 46.5 keV;
- la concentrazione di attività dell'Uranio-235 (U-235), quando possibile, si determina direttamente dalle emissioni gamma derivanti dal decadimento radioattivo di tale isotopo.

5.3. Risultati delle misure

Si riportano in Tabella 3, Tabella 4, Tabella 5 e Tabella 6 i risultati delle misure di spettrometria gamma eseguite nei campioni prelevati nel sito d'indagine. I risultati delle misure di spettrometria gamma eseguite nei campioni prelevati nel sito di confronto sono presentati in Tabella 7, Tabella 8, Tabella 9 e Tabella 10.

I valori delle misure sono riferiti alla data di campionamento dei singoli campioni.

Le concentrazioni di attività dei vari radionuclidi sono riferite al peso secco dei campioni. L'incertezza estesa è determinata da un'incertezza di tipo composta con un fattore di copertura $k=2$ (livello di fiducia 95%).

I rapporti di analisi sono conservati presso la sede dei laboratori ISIN in Via di Castel Romano 100, Roma.

Le attività di misura sono state gestite conformemente alla norma ISO 9001:2015.

Tabella 3 – Determinazione dei radionuclidi della serie del Th-232 (Bq/kg) nei sedimenti dei fondali del Poligono Militare di Capo Teulada.

ID campione	Th-232			Th-228		
1900013	15.6	±	1.1	16.34	±	0.82
1900014	12.09	±	0.85	12.65	±	0.61
1900015	8.39	±	0.64	8.84	±	0.49
1900016	8.87	±	0.64	9.48	±	0.46
1900017	13.82	±	0.97	14.26	±	0.68
1900018	8.91	±	0.65	9.21	±	0.47
1900019	9.55	±	0.68	10.16	±	0.52
1900020	9.64	±	0.70	9.87	±	0.52
1900021	9.97	±	0.75	11.18	±	0.64
1900022	7.41	±	0.62	8.12	±	0.46
1900027	6.96	±	0.65	8.00	±	0.50
1900028	4.12	±	0.43	5.22	±	0.31
1900029	6.23	±	0.52	6.95	±	0.35
1900030	9.79	±	0.69	10.14	±	0.53
1900031	9.44	±	0.77	10.64	±	0.60
1900032	9.34	±	0.50	9.82	±	0.33
1900033	1.58	±	0.27	1.92	±	0.16

Tabella 4 – Determinazione dei radionuclidi della serie dell'U-238 (Bq/kg) nei sedimenti dei fondali del Poligono Militare di Capo Teulada.

ID campione	U-238			Ra-226			Pb-210		
1900013	18.0	±	3.3	12.19	±	0.56	23.2	±	7.1
1900014	17.5	±	3.2	9.93	±	0.51	30.3	±	9.2
1900015	24.6	±	4.1	6.73	±	0.40	41	±	13
1900016	18.2	±	3.2	7.33	±	0.40	36	±	11
1900017	16.9	±	3.2	10.97	±	0.53	27.0	±	8.2
1900018	15.5	±	3.4	7.05	±	0.40	24.9	±	7.6
1900019	11.5	±	2.5	9.29	±	0.44	13.4	±	4.1
1900020	12.0	±	2.7	8.27	±	0.45	15.5	±	4.8
1900021	11.3	±	2.7	8.82	±	0.47	11.6	±	3.7
1900022	10.2	±	2.8	7.25	±	0.49	9.4	±	3.8
1900027	14.5	±	3.7	6.84	±	0.50	25.7	±	8.2
1900028	15.4	±	3.4	3.21	±	0.26	43	±	13
1900029	16.0	±	2.9	5.49	±	0.30	25.9	±	5.3
1900030	16.8	±	3.0	10.58	±	0.49	35	±	11
1900031	11.3	±	3.2	9.29	±	0.55	33	±	10
1900032	14.1	±	2.0	9.55	±	0.34	29.1	±	5.2
1900033	6.7	±	1.9	8.19	±	0.30	14.9	±	3.4

Tabella 5 – Determinazione dell'U-235 (Bq/kg) nei sedimenti dei fondali del Poligono Militare di Capo Teulada.

ID campione	U-235		
1900013	0.83	±	0.16
1900014	0.76	±	0.31
1900015	1.06	±	0.46
1900016	-		
1900017	-		
1900018	0.76	±	0.29
1900019	0.59	±	0.22
1900020	-		
1900021	-		
1900022	-		
1900027	-		
1900028	-		
1900029	-		
1900030	0.83	±	0.27
1900031	-		
1900032	0.58	±	0.40
1900033	-		

Tabella 6 – Determinazione del K-40 (Bq/kg), Cs-137 (Bq/kg) e Am-241 (Bq/kg) nei sedimenti dei fondali del Poligono Militare di Capo Teulada.

ID campione	K-40			Cs-137			Am-241		
1900013	575	±	49	0.227	±	0.065	-		
1900014	561	±	48	0.157	±	0.064	-		
1900015	216	±	19	0.341	±	0.072	0.298	±	0.089
1900016	326	±	28	0.163	±	0.058	-		
1900017	448	±	38	0.131	±	0.051	-		
1900018	306	±	26	-			-		
1900019	319	±	27	0.1097	±	0.0047	-		
1900020	388	±	33	-			-		
1900021	406	±	35	0.103	±	0.060	-		
1900022	-			-			-		
1900027	221	±	19	-			-		
1900028	80.8	±	7.5	0.251	±	0.079	-		
1900029	163.0	±	7.9	0.261	±	0.089	-		
1900030	234	±	20	0.197	±	0.059	-		
1900031	247	±	21	0.239	±	0.088	-		
1900032	231	±	11	-			-		
1900033	32.8	±	2.2	-			-		

Tabella 7 – Determinazione dei radionuclidi della serie del Th-232 (Bq/kg) nei sedimenti dei fondali di Capo Spartivento.

ID campione	Th-232			Th-228		
1900023	15.5	±	1.1	16.82	±	0.85
1900024	14.6	±	1.1	17.27	±	0.91
1900025	12.27	±	0.82	13.63	±	0.60
1900026	15.2	±	1.1	17.10	±	0.84

Tabella 8 – Determinazione dei radionuclidi della serie dell'U-238 (Bq/kg) nei sedimenti dei fondali di Capo Spartivento.

ID campione	U-238			Ra-226			Pb-210
1900023	19.1	±	4.0	14.84	±	0.72	30.0 ± 9.2
1900024	17.8	±	3.8	11.68	±	0.60	35 ± 11
1900025	13.7	±	3.5	12.38	±	0.58	24.4 ± 7.1
1900026	15.6	±	4.0	15.65	±	0.78	27.6 ± 8.8

Tabella 9 – Determinazione dell'U-235 (Bq/kg) nei sedimenti dei fondali di Capo Spartivento.

ID campione	U-235		
190023	0.59	±	0.49
190024	0.82	±	0.44
190025	-		
190026	-		

Tabella 10 – Determinazione del K-40 (Bq/kg), Cs-137 (Bq/kg) e Am-241 (Bq/kg) nei sedimenti dei fondali di Capo Spartivento.

ID campione	K-40			Cs-137			Am-241
190023	820	±	70	0.170	±	0.074	-
190024	588	±	50	-			-
190025	775	±	63	0.299	±	0.096	-
190026	834	±	71	-			-

6. Analisi dei risultati e conclusioni

Il Th-232, l'U-238 e l'U-235 sono noti come radionuclidi primordiali, ovvero presenti sin dal momento della formazione della terra. Sono capostipiti delle serie radioattive rispettivamente del torio, dell'uranio e dell'attinio¹ (Allegato 1).

Se non intervengono eventi alteranti che introducono o sottraggono radionuclidi delle catene radioattive, come fattori ambientali che agiscono dinamicamente attraverso processi chimico-fisici (solubilità, trasporto, diffusione, etc.) oppure fattori antropici, queste serie si trovano in condizione di equilibrio secolare ossia l'attività del discendente è uguale a quella del progenitore.

Serie del Th-232

Dall'analisi dei risultati della concentrazione di attività della serie del Th-232 (Tabella 3 e Tabella 7) si evince che:

- nei campioni del sito d'indagine i valori di Th-232 ($1.58 \div 15.6$ Bq/kg) sono in linea con i valori misurati nei campioni del sito di riferimento ($12.27 \div 15.5$ Bq/kg);
- nei campioni del sito d'indagine i valori di Th-232 sono comparabili, entro l'incertezza di misura, con i valori di Th-228. La stessa condizione si rileva anche nei campioni prelevati nel sito di riferimento. Questo indica una condizione di equilibrio nella catena di decadimento del Th-232;
- in tutti i campioni non si osserva una prevalenza di Torio rispetto al Radio.

Pertanto, considerando i valori di concentrazione di attività dei radionuclidi della serie del Th-232 nel sito di Capo Teulada paragonabili a quelli rilevati nel sito di Capo Spartivento e la condizione di equilibrio riscontrata in tutti i campioni, non è osservabile allo stato attuale e nei limiti della sensibilità strumentale, un eventuale contributo antropico derivante dall'uso di missili MILAN nel poligono.

Serie dell'U-238

Analizzando i risultati della serie dell'U-238 (Tabella 4 e Tabella 8) si osserva un disequilibrio tra i radionuclidi della catena. Ciò è evidente sia nei campioni prelevati nel sito d'indagine che in quelli del sito di confronto. Si ritiene che il disequilibrio sia dovuto alle dinamiche chimico-fisiche ambientali. In un ambiente come quello marino, infatti, dove sussistono continui scambi dinamici tra i comparti (sedimenti, acqua, biota, etc.) l'equilibrio tra gli elementi della serie dell'U-238 può essere alterato dai

¹ Per serie o famiglia radioattiva si intende l'insieme dei nuclidi derivanti dallo stesso capostipite attraverso una catena di processi di decadimento successivi l'uno all'altro che determinano fra essi veri e propri rapporti di filiazione (Allegato 1)

diversi coefficienti di solubilità dei composti del radio rispetto a quelli del torio, dell'uranio e del piombo [8].

Comunque le concentrazioni di U-238 ($6.7 \div 24.6$ Bq/kg), di Ra-226 ($3.21 \div 12.19$ Bq/kg) e di Pb-210 ($9.4 \div 43$ Bq/kg) nei campioni prelevati nel sito d'indagine sono confrontabili con i valori di concentrazione di U-238 ($13.7 \div 19.1$ Bq/kg), di Ra-226 ($11.68 \div 15.65$ Bq/kg) e di Pb-210 ($24.4 \div 35$ Bq/kg) dei campioni del sito di confronto.

In merito al rapporto isotopico tra l'U-238 e l'U-235, indicatore della presenza di uranio impoverito, come descritto nel Paragrafo 3.1., confrontando i valori di concentrazione di attività dell'U-235 e dell'U-238 in tutti i campioni, si osserva che il loro rapporto isotopico, entro le incertezze analitiche, è in linea con la tipica abbondanza isotopica che si trova in natura. Pertanto non risulta osservabile la presenza di Uranio impoverito.

Per quanto riguarda i valori di K-40 si riscontra una variabilità della concentrazione di attività ($32.8 \div 575$ Bq/kg) normalmente osservabile per questo tipo di matrice.

Relativamente ai radionuclidi artificiali si sono riscontrate tracce di Cesio-137 e, in un campione, tracce di Americio-241, in concentrazioni compatibili con le ricadute al suolo conseguenti ai test nucleari in atmosfera e all'incidente di Chernobyl del 1986 [9].

7. Riferimenti bibliografici

- [1] Periodic Table, A Resource for Elementary, Middle School and High School Students, Los Alamos National Laboratory's Chemistry Division, 2000.
- [2] Meinrath A., Schneider P., Meinrath G, Uranium ores and depleted uranium in the environment, with a reference to uranium in the biosphere from the Erzgebirge/Sachsen, Germany, J. Environ. Radioact. 64 (2003) 175-193.
- [3] UNSCEAR 2008 United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation Report to the General Assembly, with scientific annexes Vol. I annex B 2008.
- [4] NCRP, Exposures from the uranium series with emphasis on radon and its daughter, NCRP Report No.77, National Council on Radiation Protection and Measurements, Bethesda, MD, 1984.
- [5] Stokinger H.E., Uranium, U, in: C.D. Clayton, F.E. Clayton (Eds.), Industrial Hygiene and Toxicology, vol. 2A, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1981, pp. 1995-2013.
- [6] AEPI, U.S. Army Environmental Policy Institute. Health and Environmental Consequences of Depleted Uranium. Use in the U.S. Army: Technical Report, 2007 (U.S. Department of Defense, Washington).
- [7] Rao S.S. and Balakrishana Bhat T., 1997. Depleted Uranium Penetrators – Hazards & Safety, Defence Science Journal, Vol. 47, No. I, January 1997, pp. 97-105.
- [8] Sara Mariani. Misure di radioattività naturale attraverso la spettrometria gamma ed analisi statistica dei dati. Tesi stage ISPRA, Tema Radiazioni Ionizzanti, Anno 2011.
- [9] Rajdeep Sidhu, 2004. Extraction Chromatographic Separation of Sr, Pu and Am in Environmental Samples. Series of dissertations submitted to the Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Oslo No.339.

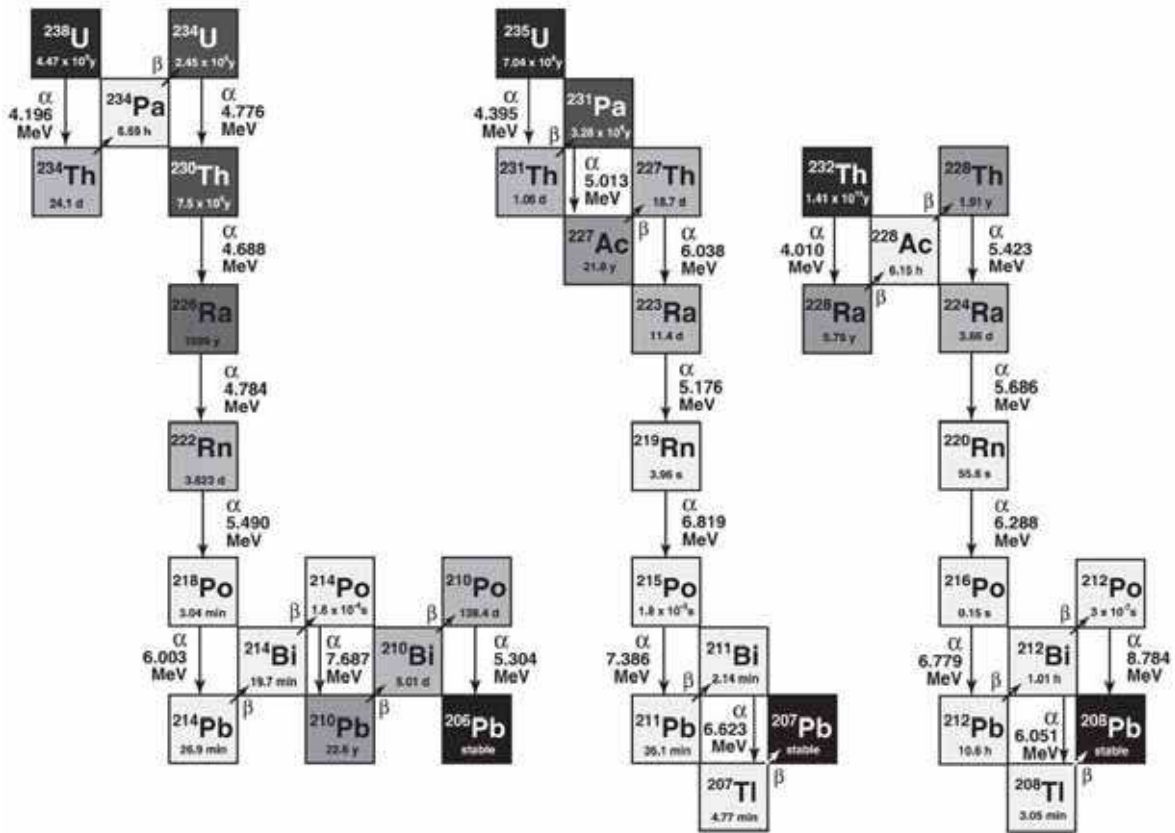
8. Allegati

Allegato 1 – Serie dell'Uranio-238, Uranio-235 e del Torio-232.

Allegato 2 – Elenco rapporti di analisi di spettrometria gamma.

Allegato 1

Serie dell'Uranio-238, Uranio-235 e del Torio-232.



Allegato 2

Elenco rapporti di analisi di spettrometria gamma:

ID 191015113225

ID 191015114544

ID 191015115231

ID 191015120216

ID 191015120943

ID 191015121918

ID 191015123855

ID 191015124935

ID 191015125423

ID 191015134557

ID 191017102924

ID 191015140344

ID 191015141809

ID 191015142327

ID 191015142932

ID 191015143718

ID 191017104006

ID 191017112030

ID 191017113144

ID 191017115225

ID 191017115936

I rapporti di analisi sono conservati presso la sede dei laboratori ISIN in Via di Castel Romano 100, Roma.