

## **Dipartimento di Scienze della Terra, della Vita e dell'Ambiente**

***STUDIO (BIOMONITORAGGIO) SUGLI EFFETTI DEI POSSIBILI INQUINANTI,  
ANCHE IN RELAZIONE AL BIOACCUMULO IN ORGANISMI ACQUATICI DEI  
METALLI PRESENTI NELLO SCARICO DI IMMISSIONE NEL FIUME NERA***

In riferimento alla

**SPECIFICA TECNICA  
TECHNICAL SPECIFICATION  
STP EAS/010 REV.0**

COMMITTENTE INDAGINE:

**Acciai Speciali Terni S.p.A.**

**V.le B. Brin 218**

**05100 Terni**



## Indice

1. Introduzione .....	3
2. Materiali e metodi .....	4
2.1 Stazioni di prelievo .....	4
2.2 Campionamento .....	4
2.3 Analisi metalli .....	5
2.4 Biomarker .....	6
3. Risultati ed analisi statistica .....	10
3.1 Fontinalis antipyretica – metalli 2012 .....	10
3.2 Fontinalis antipyretica – metalli Tempo 2 vs metalli Tempo 0 e Tempo 1 .....	14
3.3 Fontinalis antipyretica – biomarker 2012 .....	21
3.4 Fontinalis antipyretica – biomarker Tempo 2 vs biomarker Tempo 0 e Tempo 1 .....	24
3.5 Gammaridae – metalli 2012 .....	28
3.6 Gammaridae – metalli Tempo 2 vs metalli Tempo 0 e Tempo 1 .....	31
3.7 Gammaridae – biomarker 2012 .....	35
3.8. Comunità ittica .....	38
3.8.1 Cavedano – metalli 2011 .....	39
3.9 Cavedano – metalli Tempo 2 vs metalli Tempo 0 e Tempo 1 .....	43
3.10 Cavedano – biomarker 2012 .....	49
3.11 Cavedano – biomarker Tempo 2 vs biomarker Tempo 0 e Tempo 1 .....	50
3.12 Lasca – metalli 2012 .....	54
3.13 Lasca – metalli Tempo 2 vs metalli Tempo 0 .....	58
4. Discussione e conclusioni .....	62

## 1. Introduzione

Scopo del presente studio è quello di rispondere alla prescrizione descritta nel protocollo di monitoraggio ambientale ai sensi della Determina dirigenziale N. 11027 del 03/12/2003 inerente la procedura di V.I.A. del: “*Progetto definitivo per la realizzazione di un impianto di trattamento di rifiuti pericolosi e non, denominato DORR-OLIVER, localizzato all’interno dello stabilimento delle acciaierie Acciai Speciali Terni S.p.A. sita in Terni*” integrata nel procedimento per il rilascio dell’Autorizzazione Integrata Ambientale (A.I.A.) di cui al D.L.GS. 152/06 secondo la L.R. 11/1998.

In particolare in questa fase verranno confrontati i dati relativi alle concentrazioni dei metalli ed i livelli di biomarker del 2012 (tempo 2) con i valori del 2011 (tempo1) e del 2010 (punto zero), ottenuti tramite la caratterizzazione dei siti a monte e a valle dello scarico di stabilimento.

Il servizio offerto dal DiSTeVA è stato organizzato, come da specifica tecnica, nelle seguenti attività:

- studio di bioaccumulo di Cadmio, Cromo, Ferro, Nichel, Piombo, Rame e Zinco in campioni di briofite (*Fontinalis antipyretica*), di macrobentos (Gammaridae) ed in tessuti (fegato e branchie) di Cavedano (*Leuciscus cephalus*) e Lasca (*Chondrostoma genei*).
- determinazione biomarker quali Glutazione totale, Catalasi (CAT), Glutazione S-tranferasi (GST), Glutazione reduttasi (GR), Glutazione perossidasi selenio dipendente (SeGPx), Glutazione perossidasi totale (GPx) e Superossido dismutasi (SOD) in campioni di briofite (*Fontinalis antipyretica*), ed in tessuti (fegato e branchie) di Cavedano (*Leuciscus cephalus*). Nel 2011 è stata introdotta anche la determinazione di CAT e GST nei Gammaridi al fine di integrare le informazioni del 2010 con una prima valutazione dello stato di contaminazione dei sedimenti e nel 2012 sono stati aggiunti tutti i biomarker sopraelencati al fine evidenziare eventuali differenze tra gli organismi delle due stazioni indagate.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Stazioni di prelievo

Le stazioni di prelievo nel fiume Nera sono due:

la ST\_1 è situata nei pressi del ponte di “Santa Maria Maddalena”

la ST\_2 è situata nei pressi del parco della “Villa Centurini”

Per una maggiore immediatezza nella interpretazione e visualizzazione dei dati, i siti di prelievo verranno rispettivamente denominati Stazione monte e Stazione valle rispetto allo scarico di stabilimento.

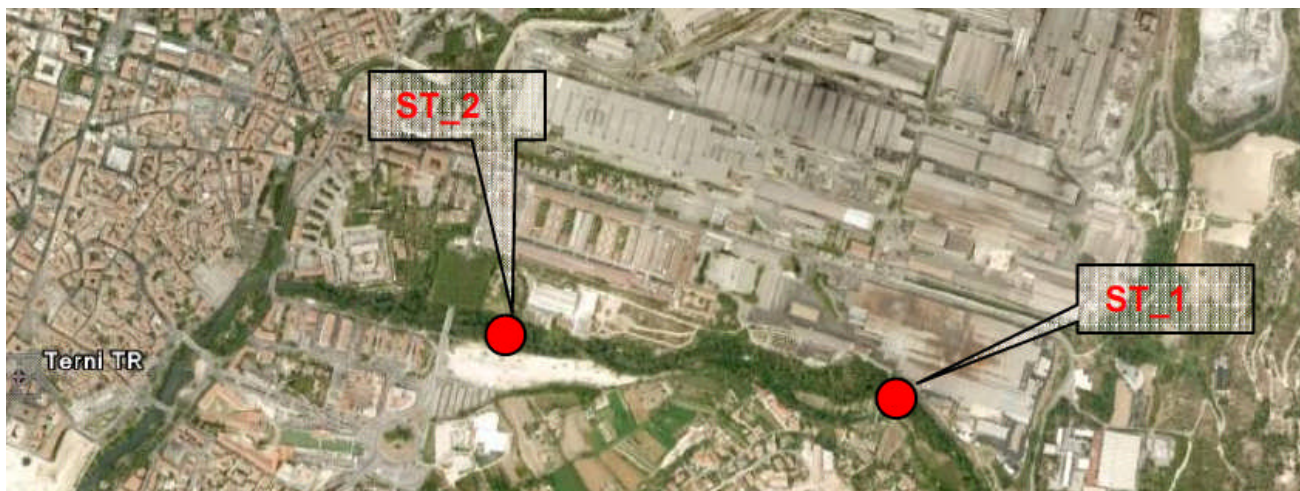


Figura 1: tratto di fiume Nera interessato dall'indagine. ST\_1 indica la Stazione monte e ST\_2 la Stazione valle rispetto allo scarico.

### 2.2 Campionamento

I prelievi delle macrofite, del macrobenthos e della fauna ittica, sono stati eseguiti in un'unica campagna in data 3-4 maggio 2012, in fase di esercizio dell'impianto.

#### Campionamento briofite

La raccolta della *Fontinalis antipyretica* è stata effettuata manualmente su entrambe le sponde dei due siti.

#### Campionamento macrobentos

La raccolta degli macroinvertebrati acquatici è stata effettuata utilizzando il retino immanicato standard dotato di rete con maglia da 21 fili/cm; l'utilizzo di questo strumento garantisce una elevata efficienza di cattura degli organismi animali bentonici.

#### Campionamento ittico

Per i campionamenti ittici, si è ritenuto opportuno mantenere la lunghezza del tratto campionato pari a 50 m in tutti i monitoraggi così da rendere i dati ottenuti confrontabili tra loro.

I campionamenti della fauna ittica sono stati realizzati utilizzando uno storditore elettrico di tipo fisso a corrente continua pulsata e/o ad impulsi (150-600 V; 0.3-6 A, 500-3500 W; 50 Kw).

L'elettropesca è un metodo che consente la cattura di esemplari di diversa taglia e appartenenti a diverse specie, per cui non risulta selettivo e consente una visione d'insieme sulla qualità e sulla quantità della popolazione ittica presente in un determinato tratto del corso d'acqua.

## 2.3 Analisi metalli

### Briofite (*Fontinalis antipyretica*) e macrobentos (GAMMARIDAE).

I campioni di briofite e Gammaridi, riconosciuti e puliti in situ, sono stati congelati e successivamente sono stati creati 4 pools di circa 1 grammo di fresco per stazione. La scelta del numero di pools è stata dettata dalla necessità di avere un numero di osservazioni statisticamente sufficiente per lo studio di eventuali differenze significative tra le stazioni.

### Cavedano (*Leuciscus cephalus*) e Lasca (*Chondrostoma genei*).

Sono stati prelevati 15 campioni di Cavedano e 6 di Lasca, appartenenti ad una classe di taglia (peso) simile a quelle scelte per i precedenti studi. La pulizia dei tessuti (fegato e branchie) è stata fatta in situ dove si è proceduto al congelamento immediato con azoto liquido ed alla conservazione in ghiaccio secco fino all'arrivo nel laboratorio di chimica analitica dell'Università di Urbino.

Successivamente, 10 fegati - 10 branchie di Cavedano e 6 fegati - 6 branchie di Lasca, precedentemente conservati in congelatore -80°C, sono stati congelati ed è stato annotato il peso fresco con una bilancia analitica stabilizzata in ambiente asciutto mediante l'uso di sali igroscopici, annotando le prime 4 cifre decimali.

### Preparazione ed analisi campioni

Tutti i campioni sono stati seccati. Eliminando l'acqua infatti, si riduce la variabilità delle misure dovuta a fattori quali habitat, condizioni di vita, pretrattamento e conservazione degli organismi dopo il campionamento (Siebert et al, 1996; Conti e Cecchetti, 2003). Per la determinazione del peso secco è stata utilizzata la tecnica della costanza di peso in capsule di quarzo, precedentemente decontaminate con HNO<sub>3</sub> al 50% per 24h. (Schlacher-Hoelinger e Schlacher, 1998; Leung, 1999).

I campioni secchi sono stati mineralizzati con il microonde CEM MDS-2100.

Di seguito sono riportate le metodiche analitiche di base utilizzate per l'analisi dei metalli. Infatti le condizioni operative sono state ottimizzate in base al recupero % (80-120%) derivante dall'analisi degli standard certificati di riferimento BCR-CRM 278 e 279.

Preparazione campione: mineralizzazione per analisi metalli	Ausili A., 2001. Analisi del contenuto di alcuni elementi chimici in <i>Mytilus galloprovincialis</i> – Bioaccumulo in bivalvi, scheda 6. In A.M. Cicero & Di Girolamo (eds), <i>Metodologie Analitiche di Riferimento del Programma di Monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001-2003)</i> . Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, ICRAM. ©ICRAM, Roma 2001.
Zinco ( $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.)	EPA 7950 <sup>a</sup>
Rame ( $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.)	EPA 7210 <sup>a</sup>
Nichel ( $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.)	EPA 7520 / EPA 7521 <sup>a</sup>
Cadmio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.)	EPA 7131A <sup>a</sup>
Cromo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.)	EPA 7191 <sup>a</sup>
Ferro ( $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.)	APAT IRSA CNR 3160 <sup>a</sup>
Piombo ( $\mu\text{g g}^{-1}$ s.s.)	EPA 7421 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Condizioni operative

## Materiali di Riferimento Certificati (CRM)

I materiali di riferimento certificati (CRM) sono degli RM accompagnati da un certificato, in cui sono elencati valori caratteristici di concentrazione di alcune sostanze all'interno di questi materiali. L'utilizzo dei CRM consiste nell'analizzarli con la stessa procedura analitica impiegata per i campioni e, successivamente, confrontare le concentrazioni ottenute con quelle certificate.

Nel presente lavoro l'accuratezza del metodo è stata controllata mediante l'uso e l'analisi dei materiali certificati di riferimenti ERM CE278 (mussel tissue) e BCR-CRM 279 (sea lettuce).

% recupero $\pm$ dev.st. (n.= 4)			
BCR-CRM 278 (mussel tissue)		BCR-CRM 279 (sea lettuce)	
Cadmio		Cadmio	
99,5 $\pm$ 1,8	certificato	92,5 $\pm$ 1,4	certificato
Cromo		Cromo	
100,2 $\pm$ 2,1	certificato	103,8 $\pm$ 1,6	indicativo
Ferro		Ferro	
	non certificato	89,6 $\pm$ 2,0	indicativo
Nichel		Nichel	
	non certificato	97,9 $\pm$ 2,0	indicativo
Piombo		Piombo	
98,5 $\pm$ 2,6	certificato	94,4 $\pm$ 1,3	certificato
Rame		Rame	
92,5 $\pm$ 1,7	certificato	100,8 $\pm$ 1,5	certificato
Zinco		Zinco	
95,2 $\pm$ 0,8	certificato	92,0 $\pm$ 1,2	certificato

## 2.4 Biomarker

### Briofite (*Fontinalis antipyretica*)

I campioni di *Fontinalis antipyretica* L. sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -80°C prima dell'analisi.

#### *Glutazione*

Per la determinazione del livello di glutazione 1 g di apice sminuzzato in azoto liquido dentro un mortaio è stato omogenato 1:10 in acido sulfosalicilico (5%). L'omogenato, filtrato attraverso una garza, è stato poi centrifugato a 14,000g per 30 minuti a 4° C. Il sovrantante è stato utilizzato per la determinazione spettrofotometrica del glutazione totale (GSH+2GSSG), seguendo il metodo di Akerboom e Sies, (1981). La riduzione di DTNB (acido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico) a TNB da parte del GSH, è seguita a 412 nm. I valori sono riportati come nmoli GSSG/g di tessuto.

*Determinazione dell'attività enzimatica di catalasi (CAT), glutazione s-transferasi (GST), glutazione reduttasi (GR), superossido dismutasi (SOD), glutazione perossidasi totale (GPx), e glutazione perossidasi selenio-dipendente (SeGPx)*

Per le analisi enzimatiche, 0.5 g di apice sminuzzati in azoto liquido dentro un mortaio sono stati omogenati 1:20 in tampone potassio fosfato 50 mM pH 7.0 contenente 1 mM EDTA e 1% PVP (pilivinilpirrolidone). L'omogenato ottenuto è stato centrifugato a 100,000g per 60 minuti a 4°C e i sovrantanti sono stati utilizzati per la determinazione delle attività enzimatiche, condotte a temperatura ambiente.

#### *Catalasi*

L'attività enzimatica della Catalasi è determinata secondo il metodo di Greenwald (1985) usando  $H_2O_2$  come substrato e utilizzando un tampone potassio fosfato 50 mM pH 7.0. Il consumo di  $H_2O_2$  era determinato spettrofotometricamente a 240 nm ( $\epsilon = -0,04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### *Glutazione s-transferasi*

L'attività enzimatica della Glutazione S-transferasi (GST) è stata misurata secondo il metodo di Habig et al. (1974) usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) come substrato. La miscela di reazione conteneva tampone sodio fosfato 100 mM pH 6,5, CDNB 1 mM, GSH 1 mM e un'opportuna aliquota di campione. Una unità di enzima è definita come la quantità che produce 1  $\mu\text{mol}/\text{min}$  del tioetere dal CDNB ed è stata misurata spettrofotometricamente a 340 nm ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### *Glutazione reduttasi*

L'attività della Glutazione reduttasi è stata determinata secondo il metodo di Chung et al. (1991) valutando l'ossidazione di NADPH in presenza di GSSG. La miscela di reazione includeva, in un volume finale di 1 ml: tampone potassio fosfato 50 mM pH 7.8 contenente NaEDTA 2 mM, 0.5 mM GSSG, 0.15 mM NADPH e un'opportuna aliquota di campione. La reazione è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm ( $\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### *Superossido dismutasi*

L'attività della Superossidi dismutasi è stata determinata mediante azione inibitoria della SOD della riduzione fotochimica di nitro blu di tetrazolio (NBT). (Giannopolitis and Ries, 1977). La miscela di reazione conteneva, in un volume finale di 1 ml, tampone potassio fosfato 50 mM pH 7.8, 13 mM metionina, 75  $\mu\text{M}$  NBT, 2  $\mu\text{M}$  riboflavina, 0.2 mM EDTA. La reazione era seguita spettrofotometricamente a 560 nm per 6-8 diversi volumi di campione e una unità (U) di enzima SOD era definita come la quantità di enzima per mg di proteine che inibisce la riduzione di NBT del 50% nelle condizioni di dosaggio.

#### *Glutazione Perossidasi Totale e Glutazione Perossidasi Selenio-Dipendente*

Le attività enzimatiche della Glutazione perossidasi (Se-GPx) e della Glutazione perossidasi totale sono state determinate usando, rispettivamente, perossido di idrogeno e cumene idroperossido come substrati, secondo il metodo di Lawrence e Burk (1976). Tale metodica consiste in un saggio enzimatico accoppiato che determina l'ossidazione del NADPH a 340 nm in presenza di Glutazione reduttasi (GR) che catalizza la riduzione del GSSG prodotto dall'attività della Glutazione perossidasi (GPx). La reazione inizia con l'aggiunta del perossido e il decremento del NADPH viene seguito spettrofotometricamente a 340 nm ( $\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### *Dosaggio proteico*

La determinazione delle proteine totali citosoliche è stata condotta con il metodo di Lowry et al. (1951) utilizzando come standard albumina sierica bovina.

### Gammaridi

Le metodiche impiegate sono le stesse utilizzate per i tessuti dei pesci.

I campioni di Gammaridi sono stati congelati in azoto liquido e conservati a  $-80^\circ\text{C}$ , successivamente si è proceduto all'analisi di: Glutazione totale, Catalasi (CAT), Glutazione S-transferasi (GST), Glutazione reduttasi (GR), Glutazione perossidasi selenio dipendente (SeGPx), Glutazione perossidasi totale (GPx) e Superossido dismutasi (SOD).

### Cavedano (*Leuciscus cephalus*)

I tessuti di branchia e fegato, prelevati da esemplari di Cavedano (*Leuciscus cephalus* Linnaeus, 1758), sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -80°C prima dell'analisi.

#### *Glutazione*

Per la determinazione del livello di glutazione 0,5 g di tessuto sono stati omogenati (1:4 per fegato e 1:2 per branchia) in acido sulfosalicilico (5%) ed EDTA 4 mM. L'omogenato è stato lasciato in ghiaccio per 30 minuti e successivamente centrifugato a 30,000g per 30 minuti a 4° C. Il sovrinatante è stato utilizzato per la determinazione spettrofotometrica del glutazione totale (GSH+2GSSG), seguendo il metodo di Akerboom e Sies, (1981). La riduzione di DTNB (acido 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoico) a TNB da parte del GSH è seguita a 412 nm. I valori sono riportati come nmoli GSSG/g di tessuto.

*Determinazione dell'attività enzimatica di catalasi (CAT), glutazione s-transferasi (GST), glutazione reduttasi (GR), superossido dismutasi (SOD), glutazione perossidasi totale (GPx), e glutazione perossidasi selenio-dipendente (SeGPx)*

Per le analisi enzimatiche, il tessuto del peso di 0,5-1 g circa è stato omogenato 1:5 in tampone Tris 100 mM, pH 7,8, contenente 100 µM di fenilmetilsulfonilfluoride (PMSF), bacitracina (0.1 mg/ml) e aprotinina (0.008 U/ml). L'omogenato ottenuto è stato centrifugato a 100,000g per 60 minuti a 4°C e i sovrinatanti sono stati utilizzati per la determinazione delle attività enzimatiche, condotte a temperatura ambiente.

#### *Catalasi*

L'attività enzimatica della Catalasi è determinata secondo il metodo di Greenwald (1985) usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> come substrato e utilizzando un tampone potassio fosfato 50 mM pH 7.0. Il consumo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> era determinato spettrofotometricamente a 240 nm ( $\epsilon = -0,04 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### *Glutazione s-transferasi*

L'attività enzimatica della Glutazione S-transferasi (GST) è stata misurata secondo il metodo di Habig et al. (1974) usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) come substrato. La miscela di reazione conteneva tampone sodio fosfato 100 mM pH 6,5, CDNB 1 mM, GSH 1 mM e un'opportuna aliquota di campione. Una unità di enzima è definita come la quantità che produce 1 µmol/min del tioetere dal CDNB ed è stata misurata spettrofotometricamente a 340 nm ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### *Glutazione reduttasi*

L'attività della Glutazione reduttasi è stata determinata secondo il metodo di Chung et al. (1991) valutando l'ossidazione di NADPH in presenza di GSSG. La miscela di reazione conteneva, in un volume finale di 1 ml: tampone sodio fosfato 100 mM pH 7.0, 1 mM GSSG, 60 µM NADPH e un'opportuna aliquota di campione. La reazione è stata seguita spettrofotometricamente a 340 nm ( $\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### *Superossido dismutasi*

L'attività della Superossidi dismutasi è stata determinata mediante azione inibitoria della SOD sull'ossidazione della quercitina (Kostyuk and Potapovic, 1989). La miscela di reazione conteneva, in un volume finale di 1 ml, tampone 30 mM Tris-HCl pH 10.0, 0.5 mM EDTA, 0.8 mM Temed, 0.05 mM quercitina e diversi volumi di sovrinatante (1-100 µl). La reazione era seguita spettrofotometricamente a 406 nm per 6-8 diversi volumi di campione e una unità (U) di enzima SOD era definita come la quantità di enzima per mg di proteine che inibisce l'ossidazione della quercitina del 50% nelle condizioni di dosaggio.

*Glutazione perossidasi totale e Glutazione perossidasi selenio-dipendente*



Le attività enzimatiche della Glutazione perossidasi selenio dipendente (Se-GPx) e della Glutazione perossidasi totale sono state determinate usando, rispettivamente, perossido di idrogeno e cumene idroperossido come substrati, secondo il metodo di Lawrence e Burk (1976). Tale metodica consiste in un saggio enzimatico accoppiato che determina l'ossidazione del NADPH a 340 nm in presenza di Glutazione reduttasi (GR) che catalizza la riduzione del GSSG prodotto dall'attività della Glutazione perossidasi (GPx). La reazione inizia con l'aggiunta del perossido e il decremento del NADPH viene seguito spettrofotometricamente a 340 nm ( $\epsilon = -6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### *Dosaggio proteico*

La determinazione delle proteine totali citosoliche è stata condotta con il metodo di Lowry et al. (1951) utilizzando come standard albumina sierica bovina.

### 3. Risultati ed analisi statistica

#### 3.1 Fontinalis antipyretica – metalli 2012

In tabella 1 sono riportate le concentrazioni di Cadmio, Cromo, Ferro, Nichel, Piombo, Rame e Zinco nei campioni (pools) della briofita espressi come  $\mu\text{g g}^{-1}$  di peso secco

<i>Fontinalis antipyretica</i>							
Stazione monte							
Campione	Cadmio	Cromo	Ferro	Nichel	Piombo	Rame	Zinco
	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$
1	0,09	1,83	1469,5	3,66	18,73	14,02	75,37
2	0,08	0,76	1358,1	3,11	20,86	13,79	76,69
3	0,09	1,50	1434,5	3,75	16,86	13,34	76,31
4	0,12	2,07	1165,5	3,95	14,50	15,20	76,22
Stazione valle							
Campione	Cadmio	Cromo	Ferro	Nichel	Piombo	Rame	Zinco
	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$
1	0,22	287,33	3343,7	279,79	10,22	31,50	148,23
2	0,22	492,43	3543,6	342,87	10,72	38,01	178,74
3	0,26	288,92	3226,3	263,79	8,78	31,31	142,88
4	0,25	366,07	3209,1	298,70	11,73	34,67	148,95

Tabella 1: concentrazioni ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) di Cd, Cr, Fe, Ni, Pb, Cu e Zn in campioni di *Fontinalis a.* prelevati nelle st. monte e st. valle.

Al fine di testare la significatività statistica delle differenze delle concentrazioni tra le due stazioni in esame, è stato applicato il test non parametrico di Mann-Whitney per ogni singolo metallo.

### Cadmio

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

### Cromo

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

### Ferro

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

### Nichel

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05

Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%.

Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione  $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. **La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.**

### Piombo

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione minori della st. monte.</b>	

### Rame

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

### Zinco

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

Dall'analisi statistica dei dati si evidenzia che le due stazioni prese in esame mostrano livelli di contaminazione significativamente differenti per tutti i metalli analizzati. Le briofite della stazione monte infatti, ad esclusione del Pb, restituiscono concentrazioni decisamente più basse rispetto a quelle della st. valle (figura 2), confermando, in parte, i dati del 2010 e 2011.

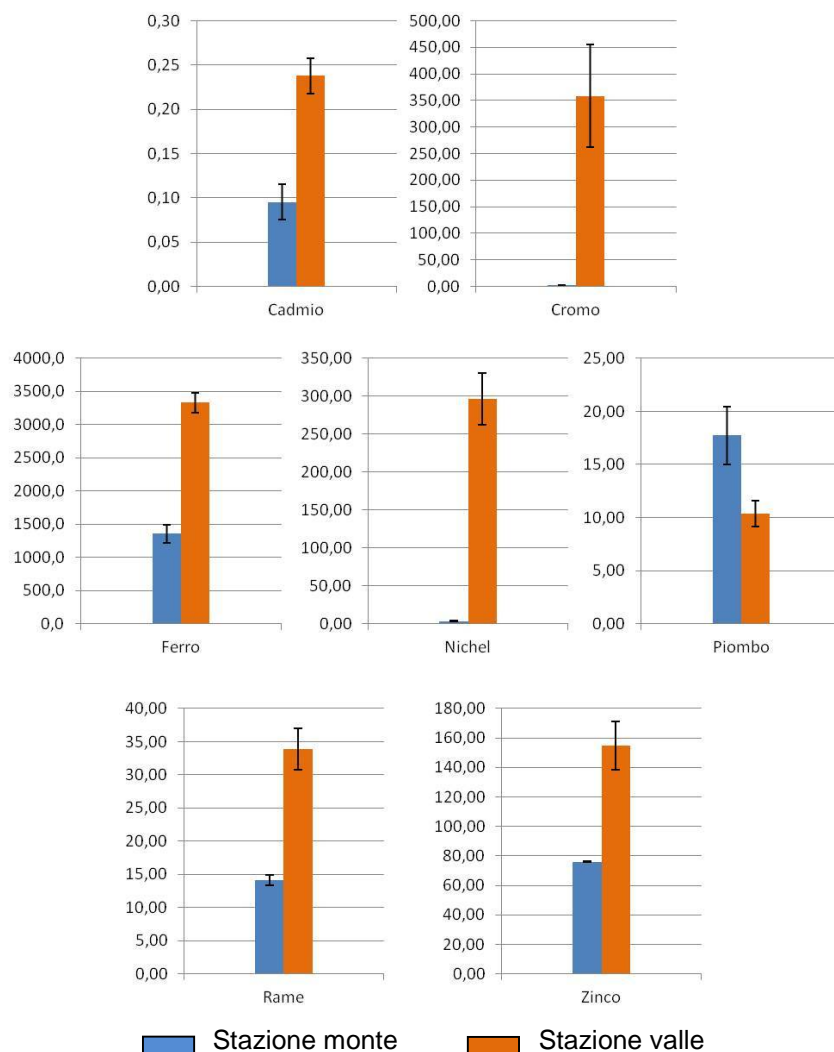


Figura 2: concentrazioni medie (µg/g d.w.) in asse y, dei 7 metalli investigati in campioni di *Fontinalis antipyretica* L. per la stazione monte e la stazione valle. Le barre di errore esprimono le rispettive deviazioni standard delle n=4 determinazioni per metallo.

<i>Fontinalis antipyretica</i>							
	<b>Cadmio</b>	<b>Cromo</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>
	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.
<b>Stazione monte</b>	0,10 ± 0,02	1,54 ± 0,57	1356,9 ± 135,8	3,62 ± 0,36	17,74 ± 2,71	14,09 ± 0,80	76,15 ± 0,56
<b>Stazione valle</b>	0,24 ± 0,02	358,69 ± 96,44	3330,7 ± 154,0	296,29 ± 34,18	10,36 ± 1,23	33,87 ± 3,16	154,70 ± 16,26

Tabella 2: concentrazioni medie (µg/g per peso secco) dei metalli ± dev.st. ottenute dall'analisi di 4 campioni di *Fontinalis a.* per singola stazione.

Nella *Fontinalis* la sequenza di accumulo è diversa per i due siti di raccolta :

stazione monte → Ferro>Zinco> Piombo>Rame>Nichel>Cromo> Cadmio

stazione valle → Ferro> Cromo>Nichel>Zinco> Rame>Piombo>Cadmio

L'ordine di accumulo conferma i dati del 2011: per la stazione valle è esattamente lo stesso, mentre per la stazione monte la differenza sta in una maggiore presenza di Pb.

### 3.2 Fontinalis antipyretica – metalli Tempo 2 vs metalli Tempo 0 e Tempo 1

Uno degli scopi fondamentali del presente studio di biomonitoraggio è quello di valutare l'evoluzione nel tempo dei livelli di metalli nei tessuti considerati. E' stato quindi effettuato uno studio statistico atto ad evidenziare la significatività delle differenze riscontrate tra le concentrazioni ottenute nel 2012 contro quelle relative al 2011 ed al 2010, per singola stazione. Per brevità si riportano solo i risultati di suddetta analisi.

#### Cadmio

Stazione monte	Stazione valle
La stazione monte 2011 e monte 2012 non sono significativamente differenti.	La stazione valle 2012 e 2011 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della valle 2012.
La stazione monte 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2010 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2012.	La stazione valle 2010 e valle 2012 non sono significativamente differenti.

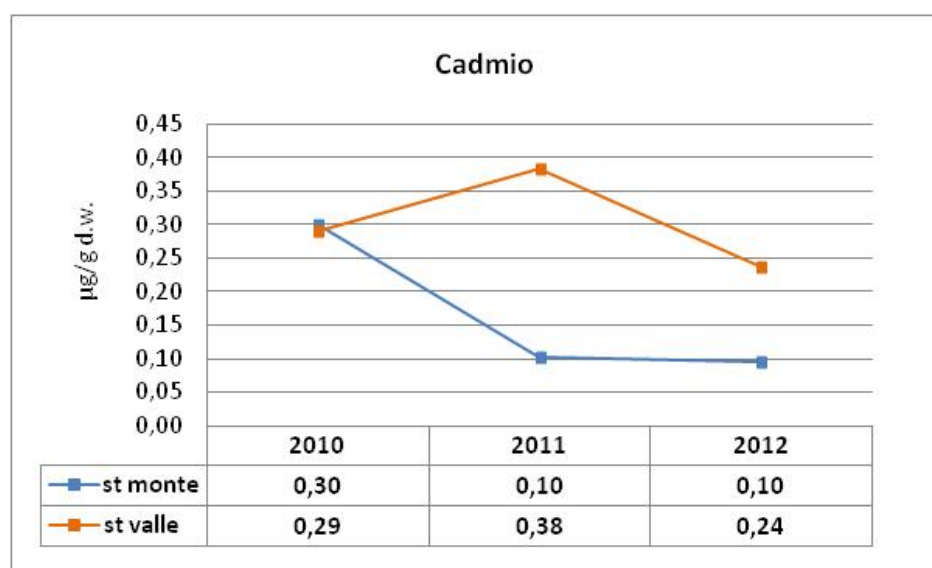


Figura 3: andamento delle concentrazioni medie di Cd ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Dall'analisi dei dati si evince che la concentrazione media di Cadmio nei tessuti della briofita, raccolti a monte dello scarico, diminuisce dall'anno 2010 al 2011 per poi rimanere invariata nel 2012. Viceversa, a valle dello stesso scarico, si verifica un aumento della concentrazione di Cd dal 2010 al 2011 ed una successiva diminuzione che riporta i valori del 2012 al livello dei dati ottenuti nel 2010 (tempo 0).

## Cromo

Stazione monte	Stazione valle
La stazione monte 2011 e 2012 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2012.	La stazione valle 2012 e 2011 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della valle 2012.
La stazione monte 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2010 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2012.	La stazione valle 2010 e valle 2012 non sono significativamente differenti.

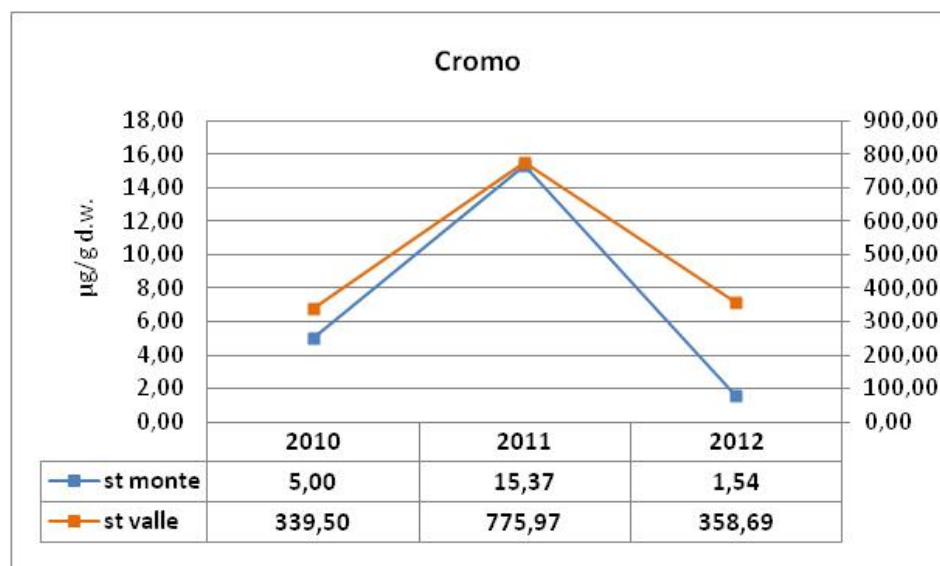


Figura 4: andamento delle concentrazioni medie di Cr ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

I livelli di Cr delle due stazioni mostrano, seppur su diversa scala, lo stesso andamento nel tempo: vi è un aumento dal 2010 al 2011 ed una successiva diminuzione che riporta i valori di concentrazione del 2012 sullo stesso ordine di grandezza del 2010. In particolare, è interessante notare come la stazione valle al tempo 2 sia statisticamente uguale al tempo 0, cioè prima dell'avvio dell'impianto.

## Ferro

Stazione monte	Stazione valle
La stazione monte 2011 e 2012 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2012.	La stazione valle 2012 e 2011 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della valle 2012.
La stazione monte 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2010 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2012.	La stazione valle 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2010 mostra livelli di contaminazione maggiori della valle 2012.

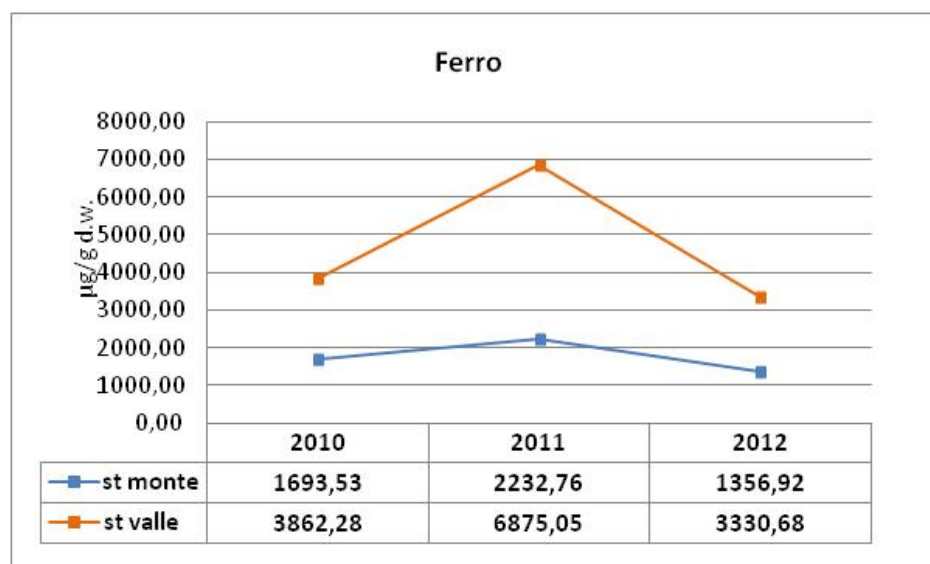


Figura 5: andamento delle concentrazioni medie di Fe ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

I dati del Fe seguono un andamento simile al Cr. La concentrazione aumenta dal 2010 al 2011 per poi diminuire nell'anno successivo fino ad arrivare a livelli più bassi di quelli del tempo 0.



## Nichel

Stazione monte	Stazione valle
La stazione monte 2011 e 2012 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2012..	La stazione valle 2012 e 2011 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della valle 2012.
La stazione monte 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2010 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2012.	La stazione valle 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2010 mostra livelli di contaminazione minori della valle 2012.

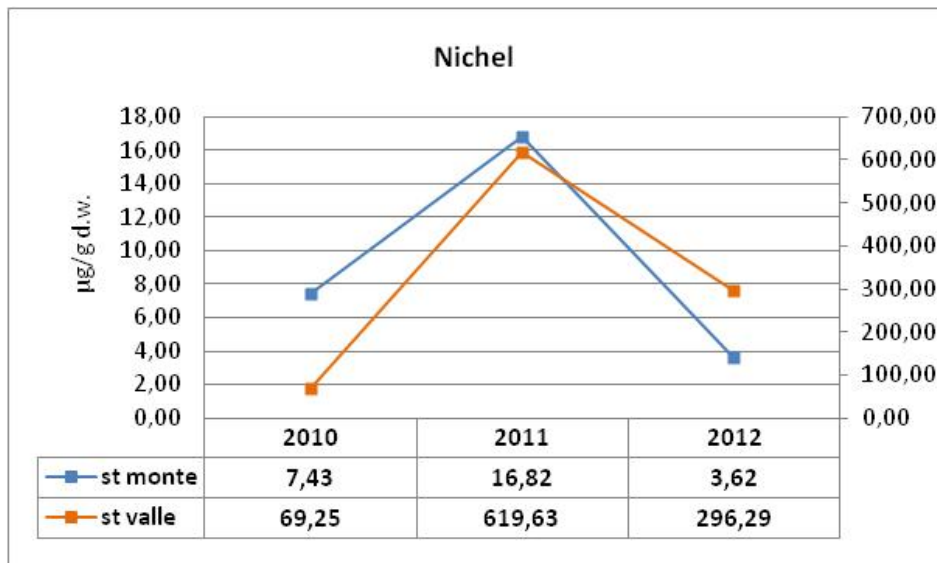


Figura 6: andamento delle concentrazioni medie di Ni ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Il Ni della stazione monte mostra la stessa tendenza del Fe e del Cr, mentre per la stazione valle si nota una forte diminuzione dal 2011 al 2012 senza però arrivare alle più basse concentrazioni del tempo 0.

## Piombo

Stazione monte	Stazione valle
La stazione monte 2011 e 2012 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2012 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2011.	La stazione valle 2012 e 2011 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della valle 2012.
La stazione monte 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2010 mostra livelli di contaminazione minori della monte 2012.	La stazione valle 2012 e 2010 non sono significativamente differenti.

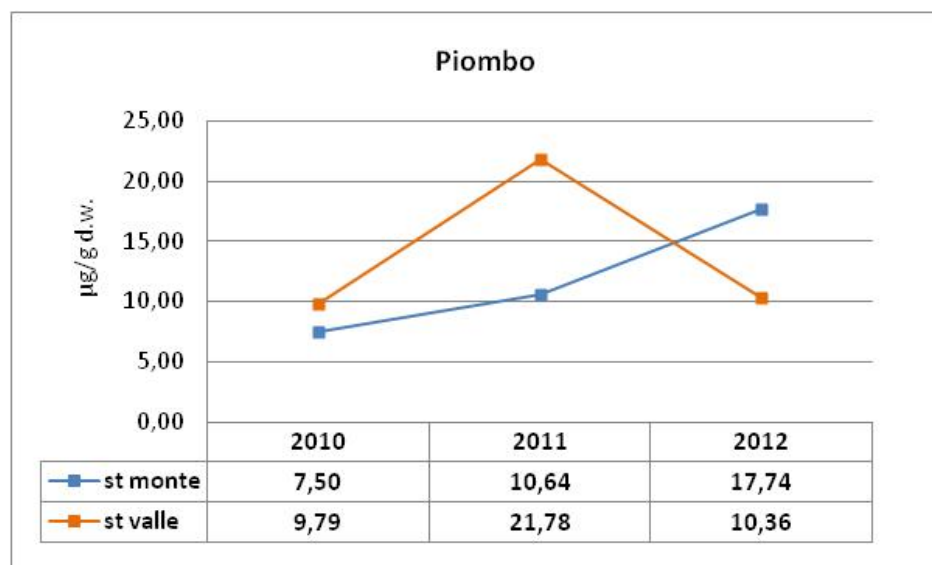


Figura 7: andamento delle concentrazioni medie di Pb ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

La concentrazione media di Piombo nei tessuti della briofita aumenta nel tempo nella stazione monte, mentre nella stazione valle si comporta esattamente come il Cromo.

## Rame

Stazione monte	Stazione valle
La stazione monte 2011 e 2012 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2012.	La stazione valle 2012 e 2011 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della valle 2012.
La stazione monte 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2010 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2012.	La stazione valle 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2010 mostra livelli di contaminazione maggiori della valle 2012.

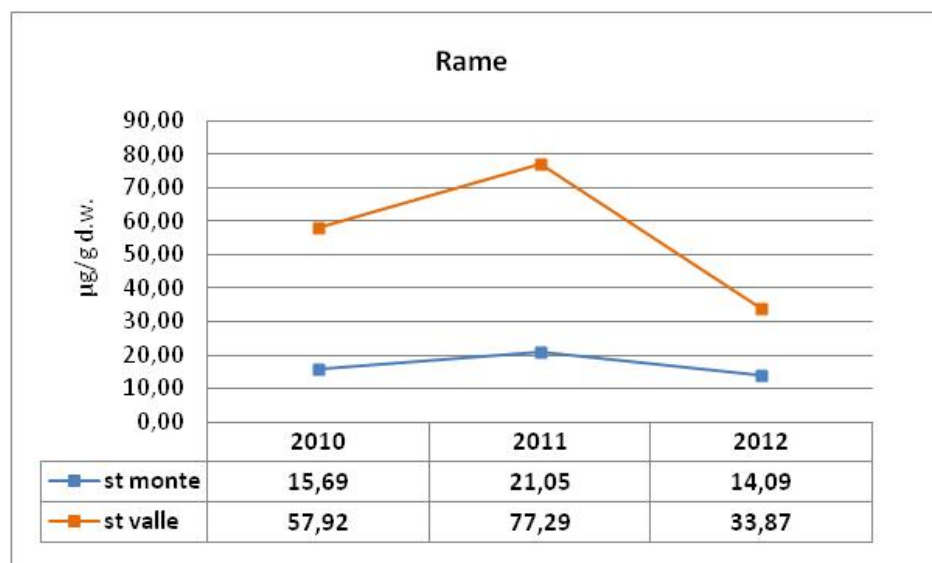


Figura 8: andamento delle concentrazioni medie di Cu ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

La concentrazione media di Rame nei tessuti della briofita tende a diminuire significativamente nel tempo in entrambe le stazioni.

## Zinco

Stazione monte	Stazione valle
La stazione monte 2011 e 2012 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della monte 2012.	La stazione valle 2012 e 2011 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2011 mostra livelli di contaminazione maggiori della valle 2012.
La stazione monte 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la monte 2010 mostra livelli di contaminazione minori della monte 2012.	La stazione valle 2012 e 2010 sono significativamente differenti. In particolare la valle 2010 mostra livelli di contaminazione maggiori della valle 2012.

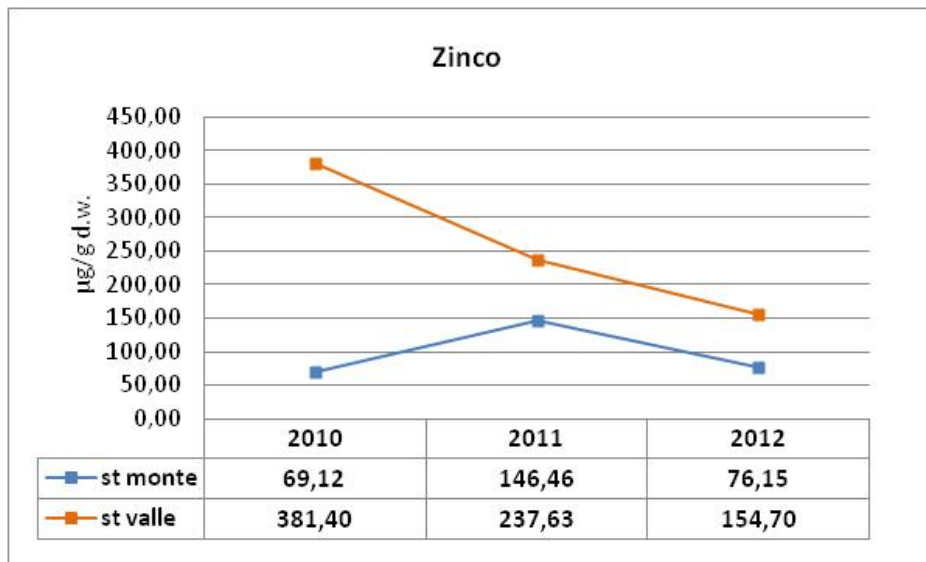


Figura 9: andamento delle concentrazioni medie di Zn ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Lo Zinco nella st. monte diminuisce dal 2011 al 2012 avvicinandosi ai tenori del 2010 mentre nella st. valle mostra un deciso decremento nei tre anni.

### 3.3 Fontinalis antipyretica – biomarker 2012

In tabella 3 sono riportati i valori dei sette biomarker ricercati, per le due stazioni.

<i>Fontinalis antipyretica</i>							
<b>Stazione monte</b>							
Campione	Glutazione	Catalasi	Glutazione S-transferasi (GST)	Glutazione reduttasi (GR)	Glutazione perossidasi (SeGPx)	Glutazione perossidasi (GPx)	Superossido dismutasi (SOD)
	(nmoli/mg prot)	( $\mu$ moli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(U/mg prot)
1	1,27	10,87	31,40	16,05	0,04	0,23	11,23
2	1,17	8,03	41,45	16,29	0,04	0,24	10,58
3	1,43	12,68	38,19	15,50	0,04	0,25	12,79
4	1,30	19,57	51,21	27,56	0,06	0,26	9,74
<b>Stazione valle</b>							
Campione	Glutazione	Catalasi	Glutazione S-transferasi (GST)	Glutazione reduttasi (GR)	Glutazione perossidasi (SeGPx)	Glutazione perossidasi (GPx)	Superossido dismutasi (SOD)
	(nmoli/mg prot)	( $\mu$ moli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(U/mg prot)
1	1,23	10,08	27,31	32,51	0,04	0,13	5,80
2	1,13	15,19	32,65	33,11	0,04	0,20	7,491
3	1,30	16,90	23,83	28,52	0,04	0,18	5,85
4	1,33	11,71	30,39	33,20	0,05	0,25	8,04

Tabella 3: risultati analisi biomarker in *Fontinalis a.*

### Glutazione

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	10,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,686
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 68,57%	
Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione alfa=0,05, è possibile accettare l'ipotesi nulla H0.	
<b>La stazione monte e valle non sono significativamente differenti.</b>	

### Catalasi

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	7,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,886
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 88,57%.	
Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia alfa=0,05, è possibile accettare l'ipotesi nulla H0.	
<b>La stazione monte e valle non sono significativamente differenti.</b>	

### GST

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	15,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,057
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 5,71%	
Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione alfa=0,05, è possibile accettare l'ipotesi nulla H0.	
<b>La stazione monte e valle non sono significativamente differenti.</b>	

### GR

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029

alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione alfa=0,05, non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha.	
<b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti.</b>	

### SeGPx

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	7,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,886
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 88,57%.	
Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia alfa=0,05, è possibile accettare l'ipotesi nulla H0.	
<b>La stazione monte e valle non sono significativamente differenti.</b>	

### GPx

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	14,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,114
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 11,47%.	
Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia alfa=0,05, è possibile accettare l'ipotesi nulla H0.	
<b>La stazione monte e valle non sono significativamente differenti.</b>	

### SOD

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	16,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 2,86%.	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione della soglia alfa=0,05, non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha.	
<b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti.</b>	

Dall'analisi statistica dei dati risulta esserci una differenza significativa tra la stazione monte e valle (tabella 4) nel caso del Glutazione reduttasi (GR) e della Superossido dismutasi (SOD).

Glutazione, Catalasi, Glutazione S-transferasi (GST), Glutazione perossidasi selenio dipendente (SeGPx) e Glutazione perossidasi (GPx) non mostrano differenze.

<i>Fontinalis antipyretica</i>							
	Glutazione	Catalasi	Glutazione S-transferasi (GST)	Glutazione reduttasi (GR)	Glutazione perossidasi (SeGPx)	Glutazione perossidasi (GPx)	Superossido dismutasi (SOD)
	(nmoli/mg prot)	( $\mu$ moli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(U/mg prot)
<b>Stazione monte</b>	1,29 $\pm$ 0,11	12,79 $\pm$ 4,91	40,56 $\pm$ 8,24	18,85 $\pm$ 5,81	0,05 $\pm$ 0,01	0,25 $\pm$ 0,01	11,08 $\pm$ 1,29
<b>Stazione valle</b>	1,25 $\pm$ 0,09	13,47 $\pm$ 3,12	28,55 $\pm$ 3,83	31,83 $\pm$ 2,23	0,04 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,05	6,79 $\pm$ 1,14

Tabella 4: valori medi  $\pm$  dev. st. di n. 4 campioni di *Fontinalis a.*

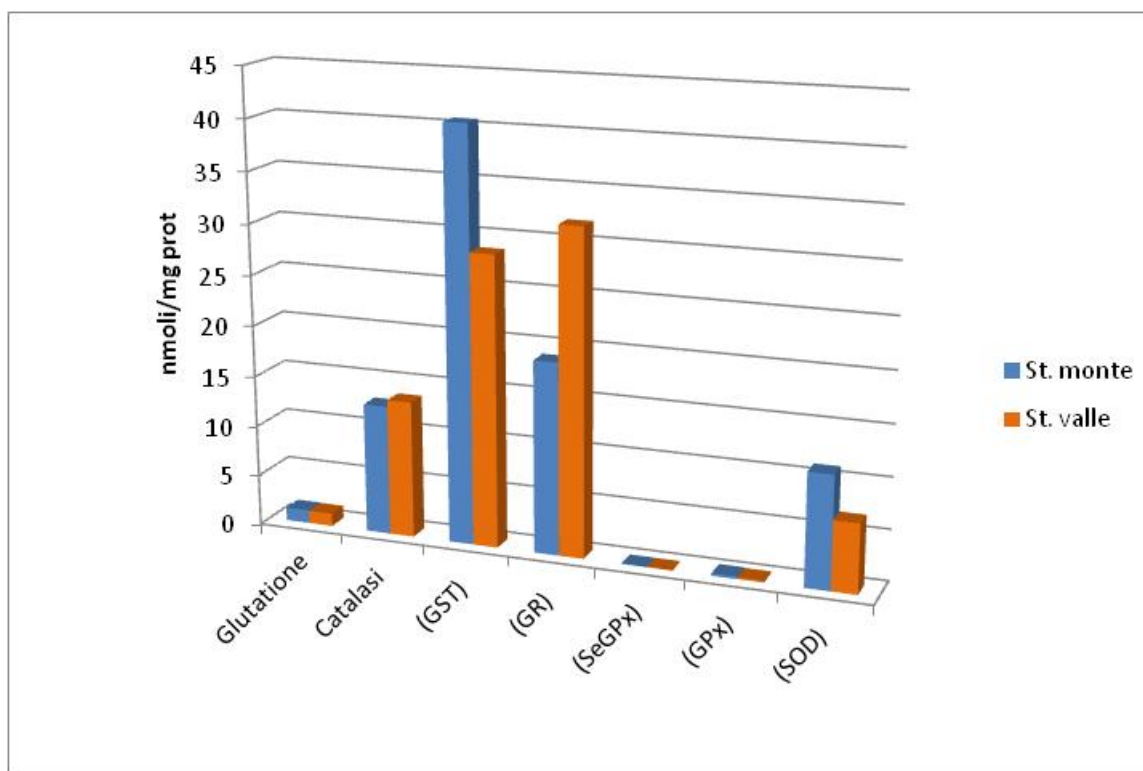


Figura 10: biomarker nella *Fontinalis* della stazione monte e valle; la Catalasi è espressa in  $\mu$ moli/mg prot e la SOD in U/mg proteina.

### 3.4 Fontinalis antipyretica – biomarker Tempo 2 vs biomarker Tempo 0 e Tempo 1

E' stato effettuato uno studio statistico atto ad evidenziare la significatività delle differenze riscontrate tra i livelli di biomarker ottenuti nel 2012 contro quelli relativi al 2010 ed al 2011, per singola stazione. Per brevità si riportano solo i risultati di suddetto studio.

#### Glutazione

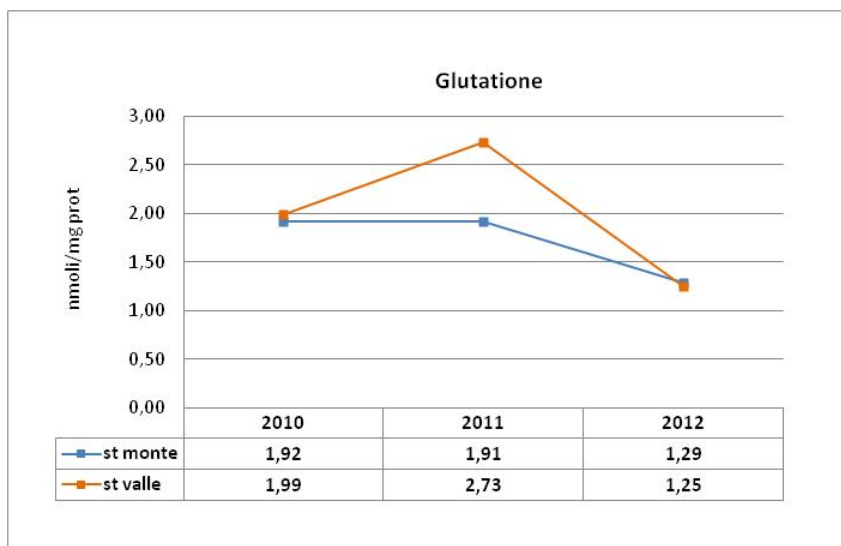


Figura 11: andamento del Glutazione nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

L'analisi dei dati mostra un decremento significativo dei livelli di Glutazione, presente nei tessuti della briofita, dal 2011 al 2012 ed anche nel confronto di quest'ultimo anno con il tempo 0 (2010).

#### Catalasi

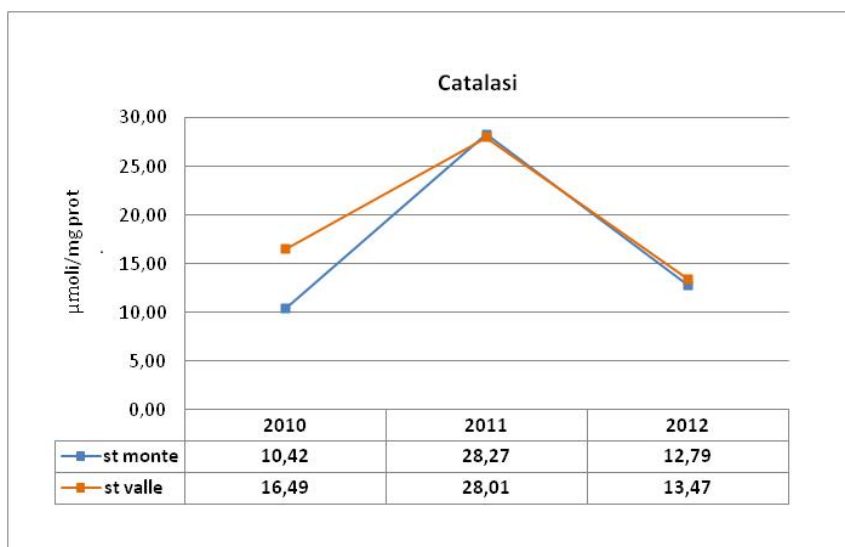


Figura 12: andamento della Catalasi nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.



Vi è un aumento dei livelli di Catalasi, dal 2010 al 2011, ed una successiva diminuzione nel 2012 che riporta le concentrazioni del biomarker sui valori del 2010.

### GST

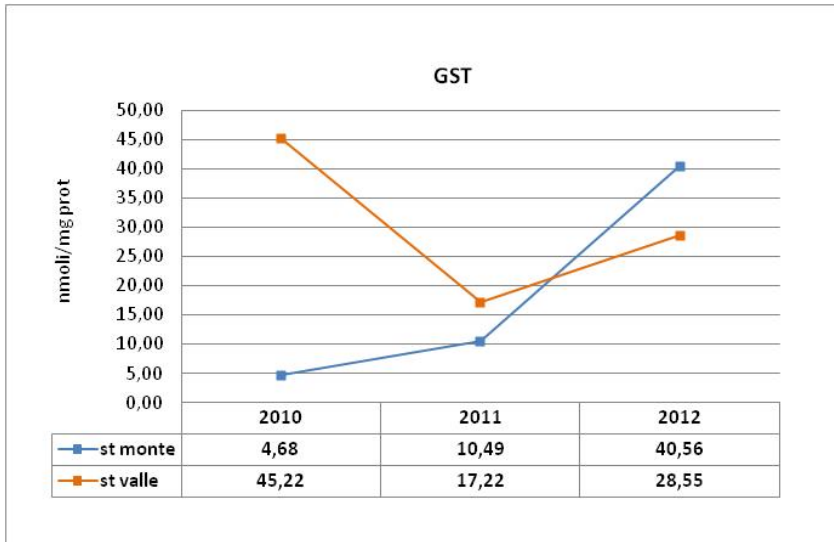


Figura 13: andamento del GST nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

L'analisi dei dati mostra un aumento dei livelli di GST, dal 2010 al 2012, nella stazione a monte, mentre nella stazione valle, dopo un'iniziale diminuzione si evidenzia un aumento dal 2011 al 2012.

### GR

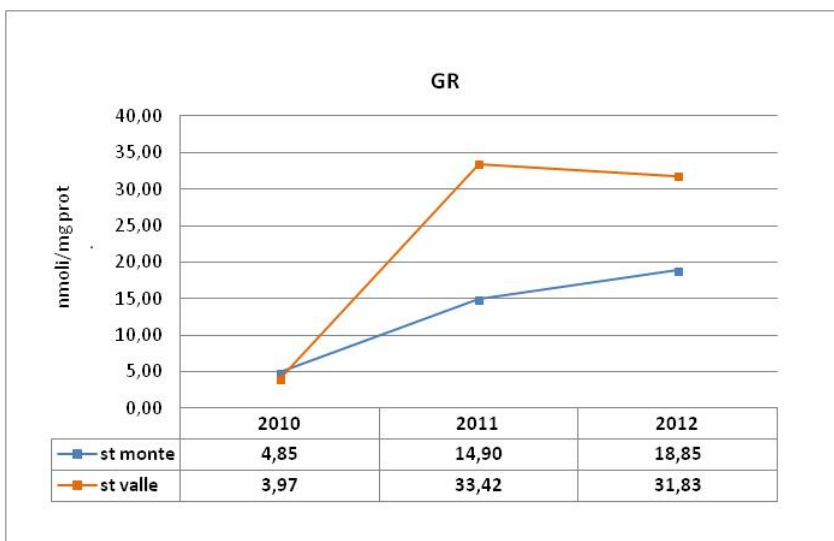


Figura 14: andamento del GR nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

L'analisi statistica dei dati non ha restituito alcuna differenza significativa tra il biomarker del 2011 e quello del 2012, per entrambe le stazioni. I livelli di GR di quest'ultimo anno sono decisamente più alti di quelli rilevati nel 2010.

## SeGPx

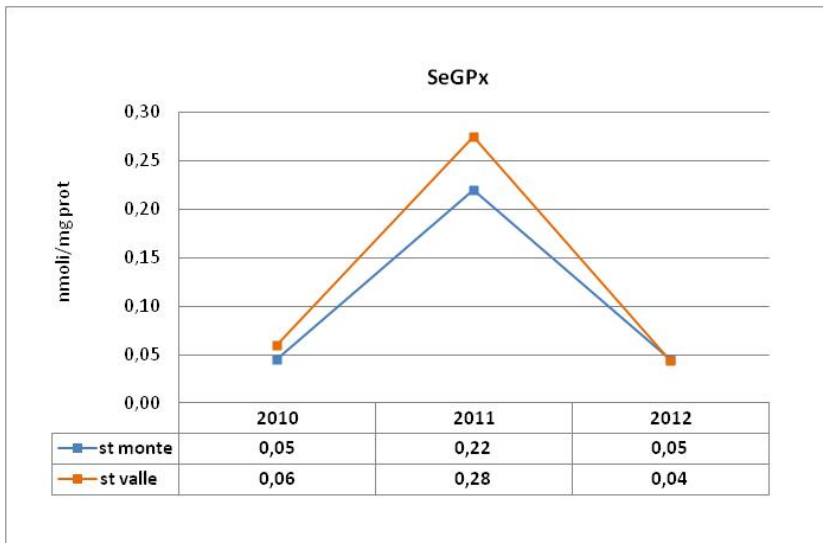


Figura 15: andamento del SeGPx nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

La Glutazione perossidasi selenio dipendente (SeGPx) si comporta come il Glutazione totale, ad esclusione della st. monte dove il valore raggiunto nel 2012 è uguale a quello del tempo 0.

## GPx

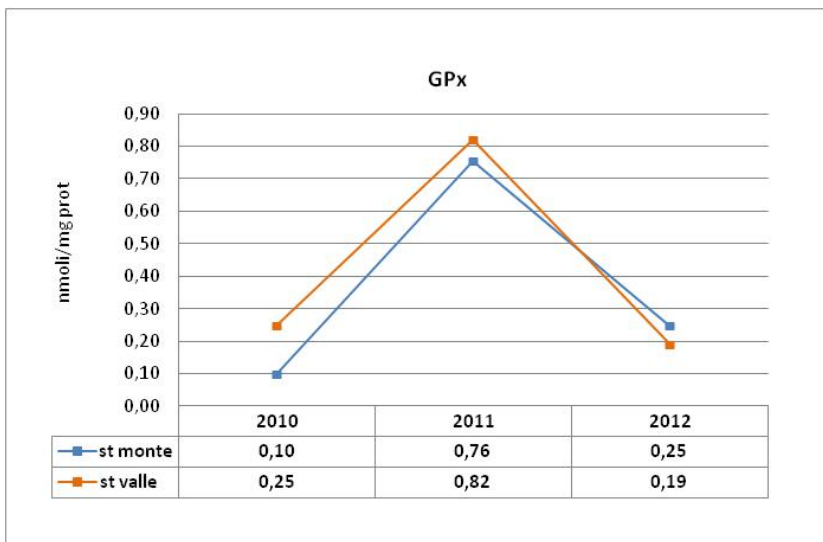


Figura 16: andamento del GPx nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Dal 2011 al 2012 si verifica una diminuzione significativa di GPx nei tessuti della *Fontinalis a.*; in particolare nella st. valle si arriva a tenori minori del tempo 0 mentre in quella a monte i valori sono più alti del 2010.

## SOD

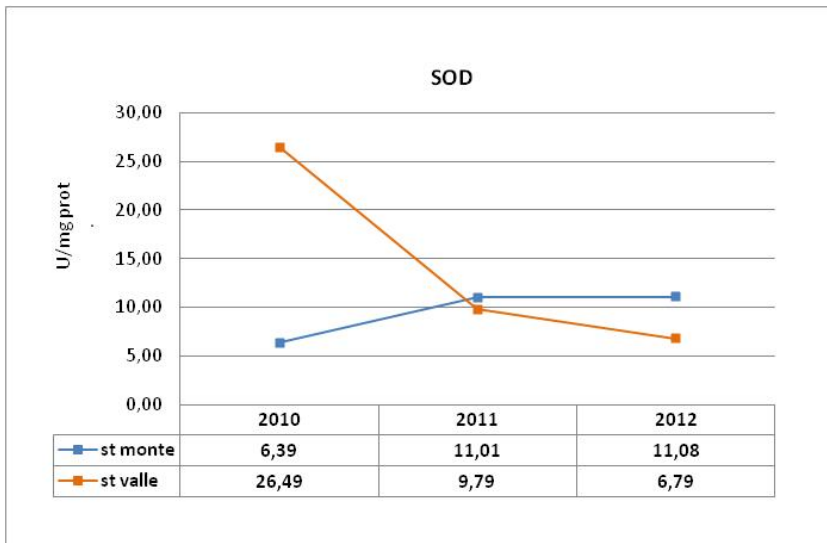


Figura 17: andamento della SOD nei tessuti di *Fontinalis a.* delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

La SOD della st. valle diminuisce in modo significativo dal 2010 al 2012, mentre nella stazione monte, dopo un iniziale aumento si stabilizza mantenendo la stessa concentrazione media dal 2011 al 2012.

### 3.5 Gammaridae – metalli 2012

In tabella 5 sono riportate le concentrazioni di Cadmio, Cromo, Ferro, Nichel, Piombo, Rame e Zinco nei campioni (pools) di macrobentos (Gammaridae) espressi come  $\mu\text{g g}^{-1}$  di peso secco

<i>Gammaridae</i>							
<b>Stazione monte</b>							
<b>Campione</b>	<b>Cadmio</b>	<b>Cromo</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>
	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$
1	0,05	1,61	350,38	5,24	3,63	76,35	69,95
2	0,06	1,23	533,42	3,79	3,68	73,46	80,38
3	0,04	1,56	345,99	3,04	3,27	72,62	67,08
4	0,06	1,03	390,00	5,18	3,43	74,57	76,51
<b>Stazione valle</b>							
<b>Campione</b>	<b>Cadmio</b>	<b>Cromo</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>
	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$	$\mu\text{g/g d.w.}$
1	0,07	173,44	3005,3	189,80	6,28	100,76	101,18
2	0,13	141,35	2772,9	168,50	9,53	100,79	103,07
3	0,09	148,37	3058,2	168,43	7,10	105,16	107,04
4	0,08	163,13	2586,6	195,50	8,92	106,74	117,38

Tabella 5: concentrazioni ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) di Cd, Cr, Fe, Ni, Pb, Cu e Zn in campioni di Gammaridi prelevati nelle st. monte e st. valle.

Al fine di testare la significatività statistica delle differenze delle concentrazioni tra le due stazioni in esame, è stato applicato il test non parametrico di Mann-Whitney per ogni singolo metallo.

**Cadmio**

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

**Cromo**

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

**Ferro**

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

**Nichel**

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%.	

Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione  $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. **La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.**

**Piombo**

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%.	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

**Rame**

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%.	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

**Zinco**

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è inferiore a 2,86%.	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha. <b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti. In particolare la st. valle mostra livelli di contaminazione maggiori della st. monte.</b>	

Tutti i metalli mostrano concentrazioni significativamente maggiori nella stazione valle rispetto a quella a monte.

<i>Gammaridae</i>							
	<b>Cadmio</b>	<b>Cromo</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>
	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.
<b>Stazione monte</b>	0,05 ± 0,01	1,36 ± 0,27	404,94 ± 87,91	4,31 ± 1,08	3,50 ± 0,19	74,25 ± 1,61	73,48 ± 6,06
<b>Stazione valle</b>	0,09 ± 0,03	156,57 ± 14,45	2855,7 ± 218,1	180,56 ± 14,16	7,95 ± 1,52	103,36 ± 3,06	107,17 ± 7,23

Tabella 6: concentrazioni medie (µg/g per peso secco) dei metalli ± dev.st. ottenute dall'analisi di 4 pools di Gammaridi per singola stazione.

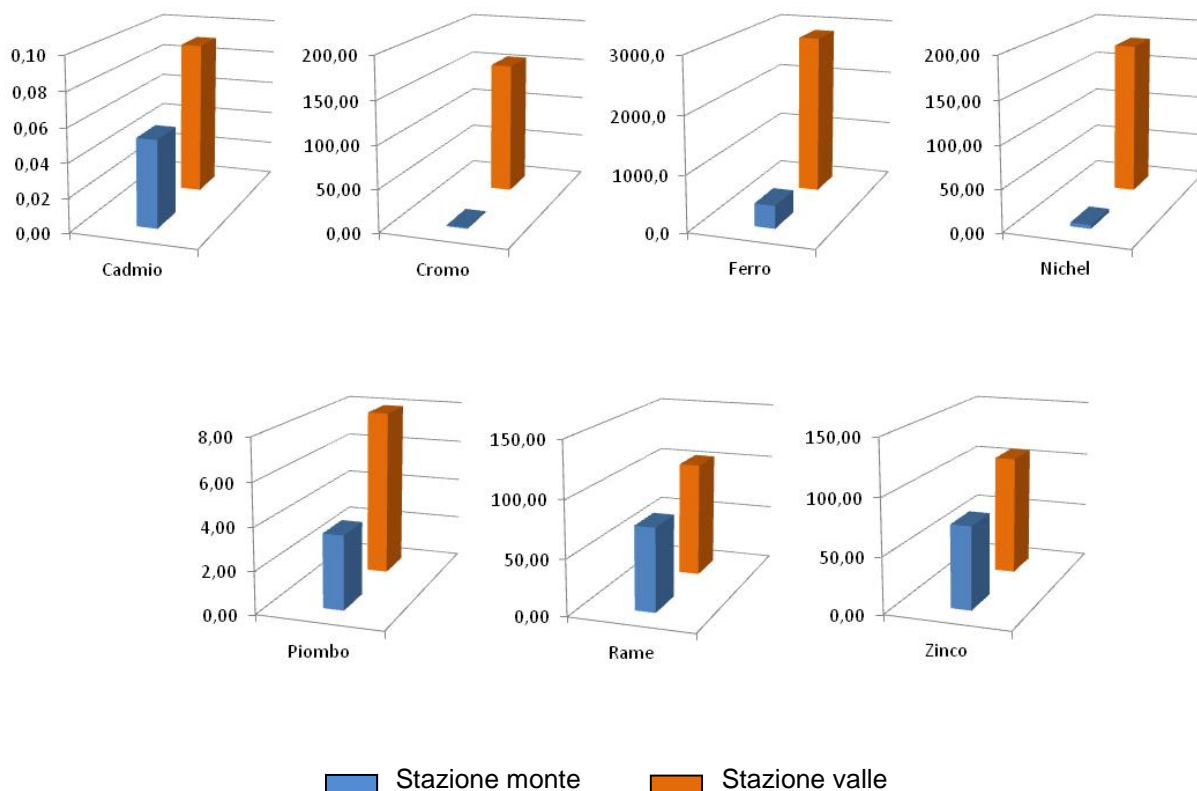


Figura 18: concentrazioni medie (µg/g d.w.) in asse y, dei 7 metalli investigati in campioni di Gammaridi per la stazione monte e la stazione valle.

Per il macrobentos come per le briofite l'ordine di bioaccumulo cambia tra i due siti di campionamento:

stazione monte → Ferro > Rame > Zinco > Nichel > Piombo > Cromo > Cadmio

stazione valle → Ferro > Nichel > Cromo > Zinco > Rame > Piombo > Cadmio

La sequenza di bioaccumulo, per la st. valle, è sostanzialmente differente da quella ottenuta nel 2011, ma del tutto simile al 2010; mentre per la stazione monte abbiamo la stessa identica situazione tra il 2012 ed 2010 ed un'unica differenza nella posizione del Pb tra il 2012 ed il 2011.

### 3.6 Gammaridae – metalli Tempo 2 vs metalli Tempo 0 e Tempo 1

L'analisi statistica è stata applicata nel confronto tra il 2011 ed il 2012, viceversa, dato il ridotto numero di campioni del 2010, si è proceduto al confronto grafico delle medie.

#### Cadmio

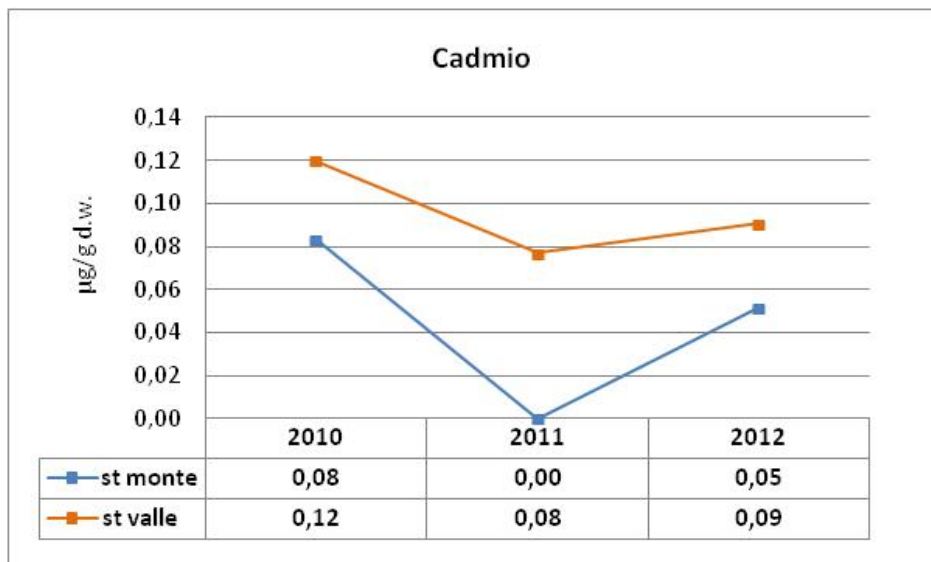


Figura 19: andamento delle concentrazioni medie di Cd ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei Gammaridi delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Il test statistico è stato applicato solo alla stazione valle e non evidenzia alcuna differenza tra il 2011 ed il 2012. Si può notare come i tenori di Cd sono minori nel 2012 rispetto al 2010 per entrambe le stazioni.

## Cromo

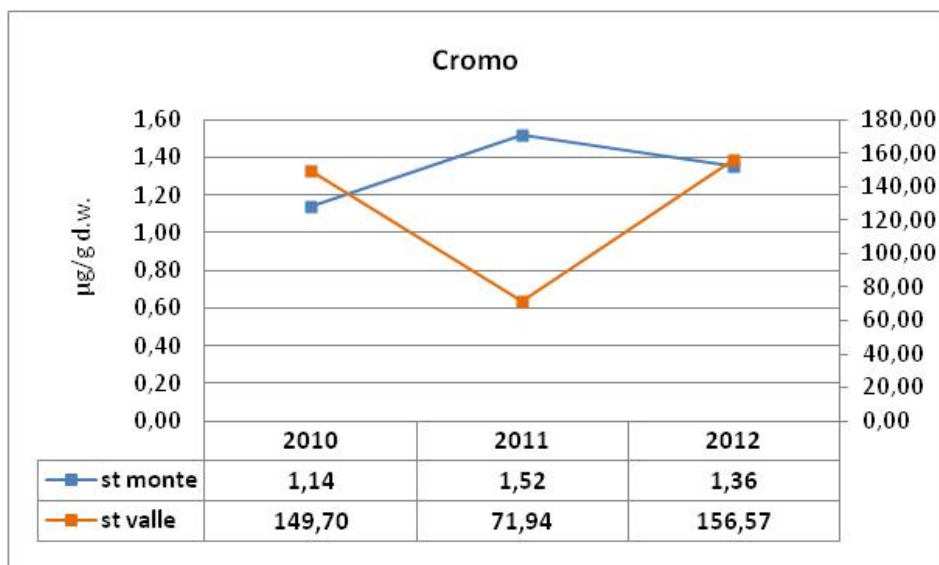


Figura 20: andamento delle concentrazioni medie di Cr ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei Gammaridi delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Il Cromo non mostra variazioni a monte dello scarico dal 2011 al 2012, mentre nella stazione valle il metallo aumenta fino ad avvicinarsi ai livelli del 2010.

## Ferro

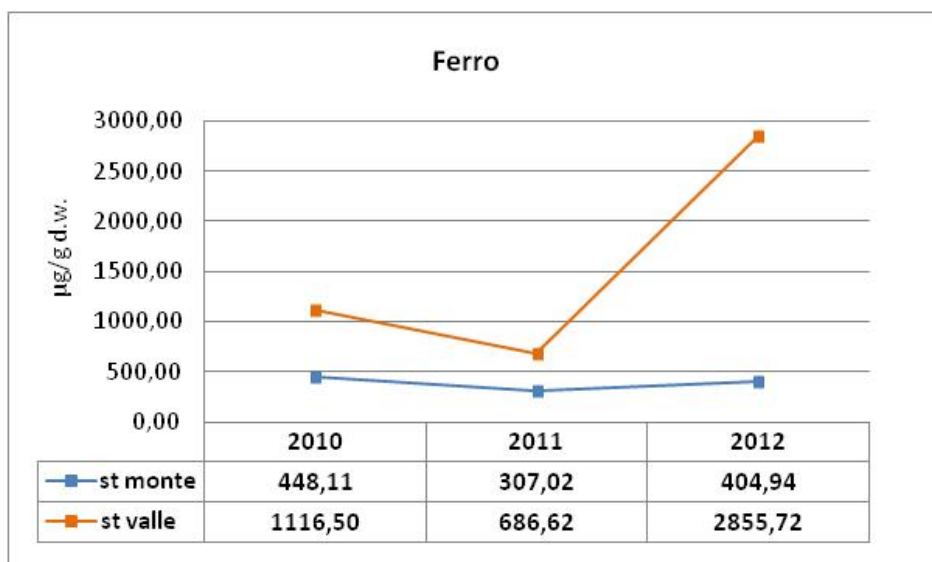


Figura 21: andamento delle concentrazioni medie di Fe ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei Gammaridi delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Il Ferro, dal 2011 al 2012, mostra un aumento significativo in entrambe le stazioni.



## Nichel

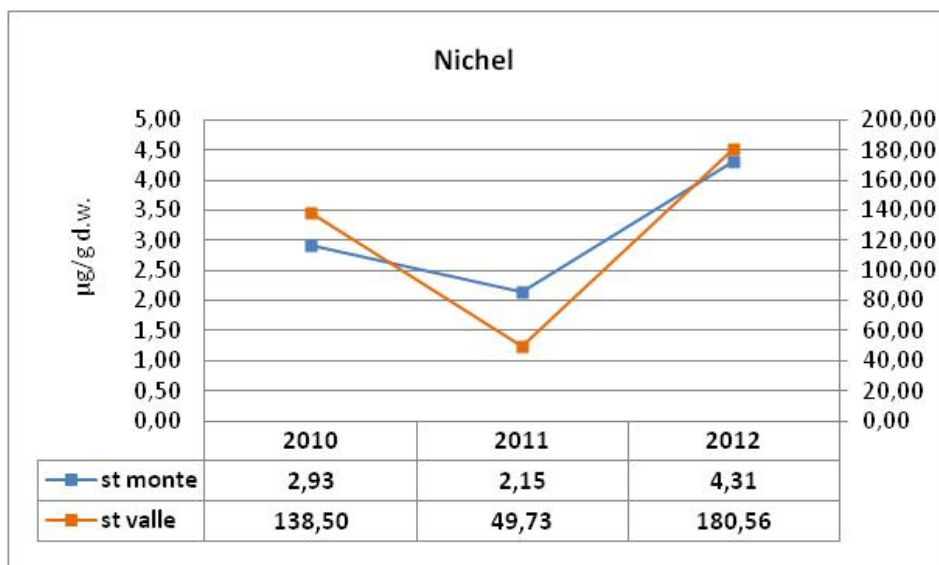


Figura 22: andamento delle concentrazioni medie di Ni ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei Gammaridi delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Dal 2011 al 2012 vi è un aumento significativo di Nichel per entrambe le stazioni. Le medie ottenute sono più alte anche di quelle relative al tempo 0.

## Piombo

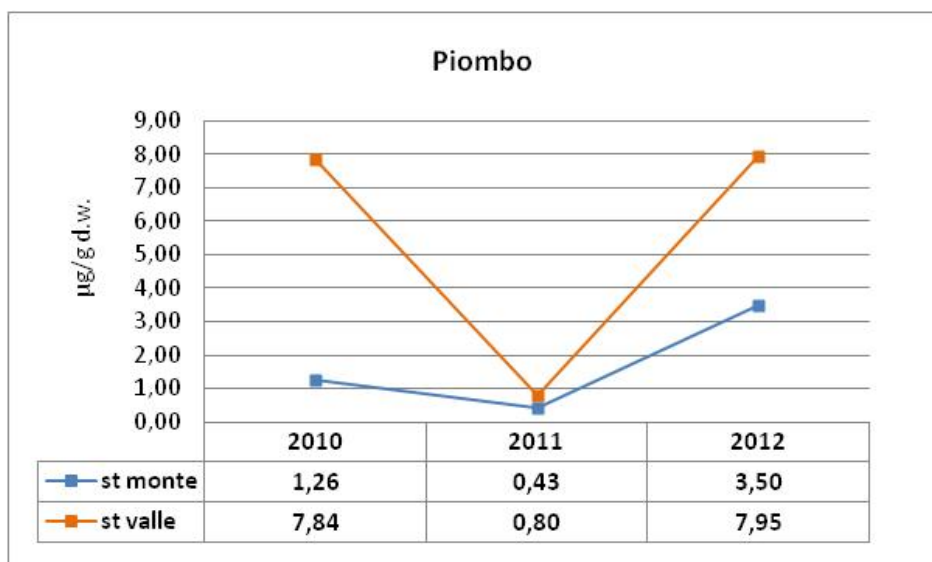


Figura 23: andamento delle concentrazioni medie di Pb ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei Gammaridi delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Il Piombo aumenta in modo significativo: tornando ai livelli del tempo 0 per la stazione valle e raddoppiando per quella a monte. In accordo con la *Fontinalis*, tale andamento potrebbe indicare un apporto di piombo a monte dello scarico.

## Rame

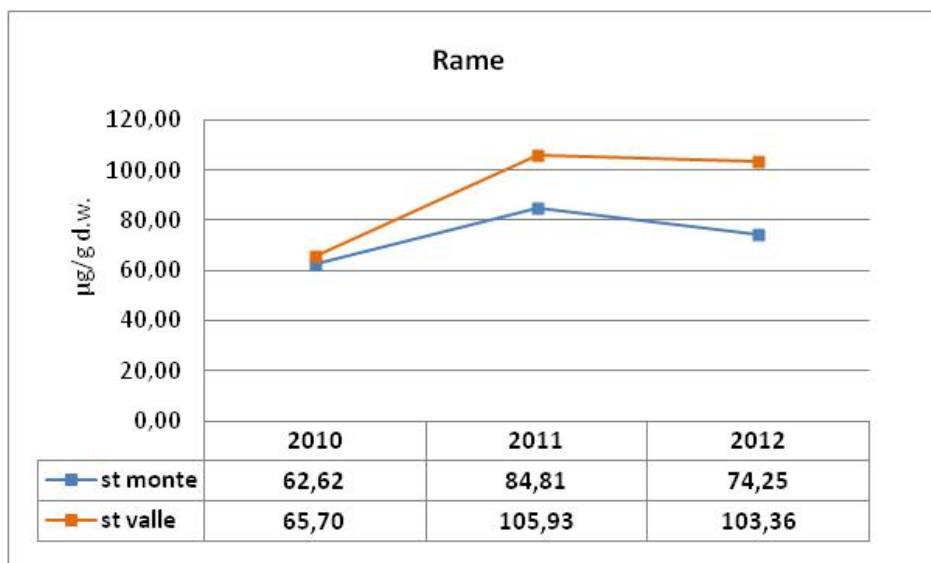


Figura 24: andamento delle concentrazioni medie di Cu ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei Gammaridi delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Per il Rame si verifica una diminuzione significativa per la st. monte mentre la st. valle non cambia nel passaggio dal 2011 al 2012.

## Zinco

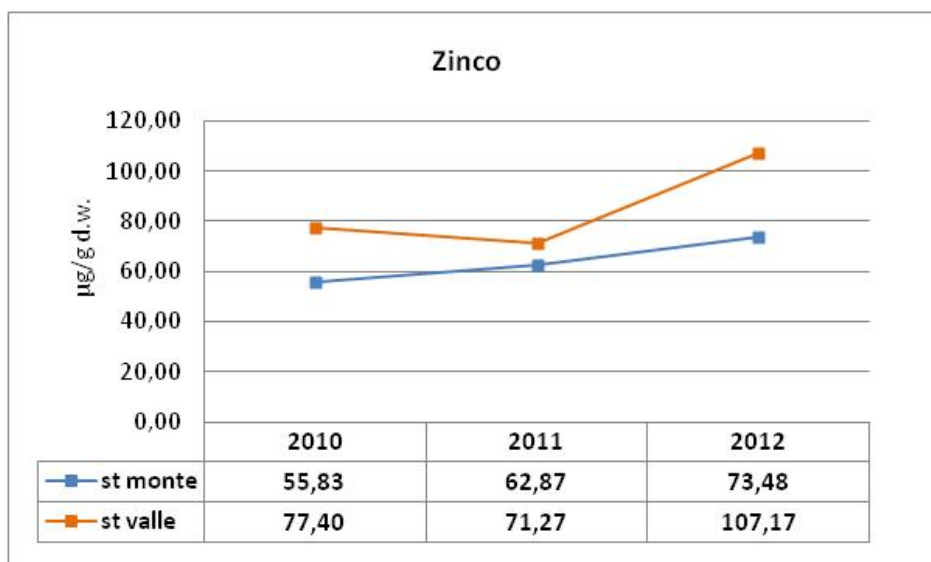


Figura 25: andamento delle concentrazioni medie di Zn ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei Gammaridi delle stazioni monte e valle, negli anni 2010-2011-2012.

Lo Zinco mostra un aumento significativo dal 2011 al 2012.

### 3.7 Gammaridae – biomarker 2012

Nello studio del 2012 (tabella 7) sono stati analizzati anche i livelli di tutti i biomarker presi in considerazione per la *Fontinalis a.* e per il Cavedano, al fine di evidenziare l'eventuale presenza di differenze significative tra gli organismi delle due stazioni.

<i>Gammaridae</i>							
Stazione monte							
Campione	Glutazione	Catalasi	Glutazione S-transferasi (GST)	Glutazione reduttasi (GR)	Glutazione perossidasi (SeGPx)	Glutazione perossidasi (GPx)	Superossido dismutasi (SOD)
	(nmoli/mg prot)	( $\mu$ moli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(U/mg prot)
1	16,36	16,83	55,42	13,33	5,07	7,55	0,25
2	13,41	16,19	68,97	13,17	5,91	8,71	0,28
3	15,02	16,42	58,16	13,72	5,76	8,35	0,22
4	15,22	16,40	65,75	12,48	5,07	7,96	0,27
Stazione valle							
Campione	Glutazione	Catalasi	Glutazione S-transferasi (GST)	Glutazione reduttasi (GR)	Glutazione perossidasi (SeGPx)	Glutazione perossidasi (GPx)	Superossido dismutasi (SOD)
	(nmoli/mg prot)	( $\mu$ moli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	U/mg prot)
1	1,45	11,76	29,75	12,36	4,84	7,51	0,54
2	1,31	11,09	25,44	13,63	3,99	8,99	0,51
3	1,18	11,76	26,10	14,14	4,08	7,29	0,50
4	1,33	11,49	26,44	14,25	4,04	7,52	0,52

Tabella 7: risultati analisi biomarker in Gammaridi

### Glutazione

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	16,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha.	
<b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti.</b>	

### Catalasi

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	16,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	11,857
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 2,92%.	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha.	
<b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti.</b>	

### GST

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	16,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 2,86%	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha.	
<b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti.</b>	

### GR

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	5,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,486
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 48,57%	
Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia $\alpha=0,05$ , è possibile accettare l'ipotesi nulla H0.	
<b>La stazione monte e valle non sono significativamente differenti.</b>	

### SeGPx

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	16,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	11,857
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 2,94%.	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha.	
<b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti.</b>	

### GPx

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	12,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,343
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 34,29%.	
Considerando che il p-value calcolato è superiore al livello di significazione della soglia $\alpha=0,05$ , è possibile accettare l'ipotesi nulla H0.	
<b>La stazione monte e valle non sono significativamente differenti.</b>	

### SOD

Test di Mann-Whitney / Test bilaterale:	
U	0,000
Valore atteso	8,000
Varianza (U)	12,000
p-value (bilaterale)	0,029
alfa	0,05
Il rischio di rifiutare l'ipotesi nulla H0 mentre è vera è 2,86%.	
Considerando che il p-value calcolato è inferiore al livello di significazione $\alpha=0,05$ , non è possibile accettare l'ipotesi nulla H0 ma bisogna accettare l'ipotesi alternativa Ha.	
<b>La stazione monte e valle sono significativamente differenti.</b>	

Dall'analisi statistica si evince che Glutazione totale, Catalasi, GST, SeGPx e SOD determinati nei Gammaridi, prelevati a monte ed a valle, sono significativamente differenti.

<i>Gammaridae</i>							
	Glutazione	Catalasi	Glutazione S-transferasi (GST)	Glutazione riduttasi (GR)	Glutazione perossidasi (SeGPx)	Glutazione perossidasi (GPx)	Superossido dismutasi (SOD)
	(nmoli/mg prot)	( $\mu$ moli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(U/mg prot)
<b>Stazione monte</b>	15,00 $\pm$ 1,21	16,46 $\pm$ 0,27	62,08 $\pm$ 6,34	13,17 $\pm$ 0,52	5,45 $\pm$ 0,44	8,14 $\pm$ 0,50	0,25 $\pm$ 0,03
<b>Stazione valle</b>	1,32 $\pm$ 0,11	11,52 $\pm$ 0,32	26,93 $\pm$ 1,93	13,60 $\pm$ 0,87	4,24 $\pm$ 0,41	7,83 $\pm$ 0,78	0,52 $\pm$ 0,02

Tabella 8: valori medi  $\pm$  dev. st. di n. 4 pools di Gammaridi.

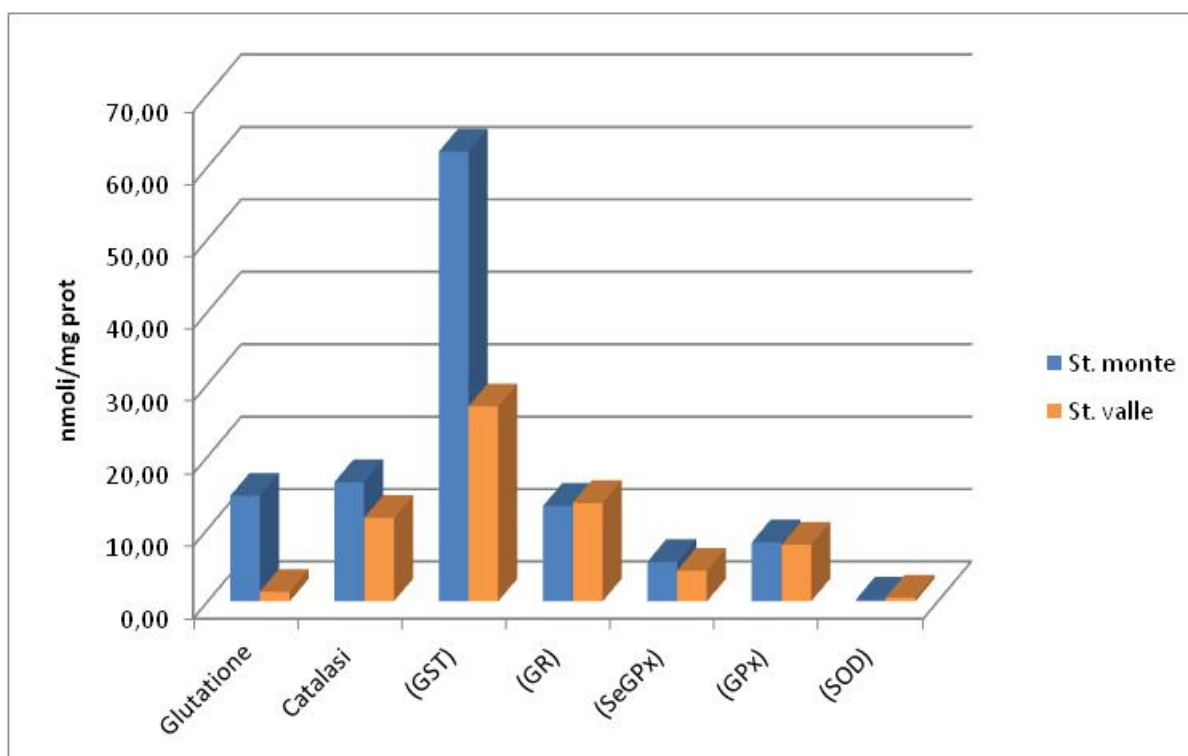


Figura 26: biomarker nei Gammaridi della stazione monte e valle; la Catalasi è espressa in  $\mu$ moli/mg prot e la SOD in U/mg proteina

### 3.8. Comunità ittica

#### Stazione monte

In questo tratto il fiume Nera ha una larghezza media di circa 6 m, una velocità della corrente relativamente elevata e con discreta turbolenza. Il substrato è caratterizzato principalmente da ghiaia con la presenza di ciottoli e grossi massi.

La comunità analizzata è costituita da tre specie: trota fario (*Salmo [trutta] trutta*), vairone (*Leuciscus souffia*) e anguilla (*Anguilla anguilla*), appartenenti a tre famiglie diverse rispettivamente: Salmonidi, Ciprinidi e Anguillidi. Per quanto riguarda la trota fario si tratta di una discreta presenza di esemplari di diverse taglie di lunghezza, anche la popolazione di vairone è strutturata ma più abbondante in numero di esemplari (indice Moyle 4), mentre per quanto riguarda l'anguilla è stato osservato un solo individuo adulto.

#### Stazione valle

In questo tratto il Fiume Nera ha le caratteristiche tipiche del corso d'acqua di pianura con una sezione larga (15 m) e un fondo ghiaioso - sabbioso.

Le specie rinvenute durante il monitoraggio sono state 7 ed appartengono alle famiglie dei: Ciprinidi ed Anguillidi. La specie dominante è il cavedano, presente con un indice di abbondanza elevato e con una popolazione ben strutturata in diverse classi d'età. Si evidenzia inoltre che la lasca, alloctona per questo fiume, ha una popolazione più numerosa rispetto al 2011, dove era stato rinvenuto solo un esemplare adulto. Tra le altre specie monitorate sono inoltre presenti alcuni esemplari di barbo comune con una popolazione poco numerosa ma discretamente strutturata, alborella, anguilla, vairone e triotto sono presenti con pochi individui per specie.

### 3.8.1 Cavedano – metalli 2011

In tabella 9 sono riportate le concentrazioni dei 7 metalli trovate nelle 10 branchie di Cavedano analizzate.

<i>Cavedano</i>							
<b>Tessuto branchie</b>							
<b>Campione</b>	<b>Cadmio</b>	<b>Cromo</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>
	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.
1	<0,01	3,44	177,80	7,23	1,30	3,21	253,64
2	<0,01	5,10	160,10	3,56	2,68	4,21	277,36
3	<0,01	5,15	368,33	8,65	2,94	4,60	230,42
4	<0,01	2,28	165,96	3,78	1,49	3,95	220,24
5	<0,01	2,97	317,47	7,33	1,73	4,28	224,80
6	<0,01	1,69	197,60	2,21	1,19	2,83	250,68
7	<0,01	3,78	236,50	6,08	2,88	4,34	246,32
8	<0,01	4,98	202,97	5,34	1,68	3,20	274,87
9	<0,01	6,07	148,11	7,35	1,15	1,83	318,09
10	<0,01	4,40	173,35	3,46	1,21	3,50	242,85

Tabella 9: concentrazioni (µg/g d.w.) dei 7 metalli in branchie (n=10) di Cavedano

#### Relazioni tra metalli nelle branchie

<b>Matrice di correlazione (Pearson)</b>							
<b>Variabili</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Cromo</b>	<b>Cadmio</b>
<b>Rame</b>	1						
<b>Zinco</b>	-0,73	1					
<b>Ferro</b>	0,61	-0,54	1				
<b>Nichel</b>	0,11	0,05	0,59	1			
<b>Piombo</b>	0,76	-0,19	0,54	0,29	1		
<b>Cromo</b>	-0,16	0,66	-0,02	0,44	0,29	1	
<b>Cadmio</b>	-	-	-	-	-	-	1

Tabella 10: matrice di correlazione (Pearson) dei metalli trovati nelle branchie di Cavedano

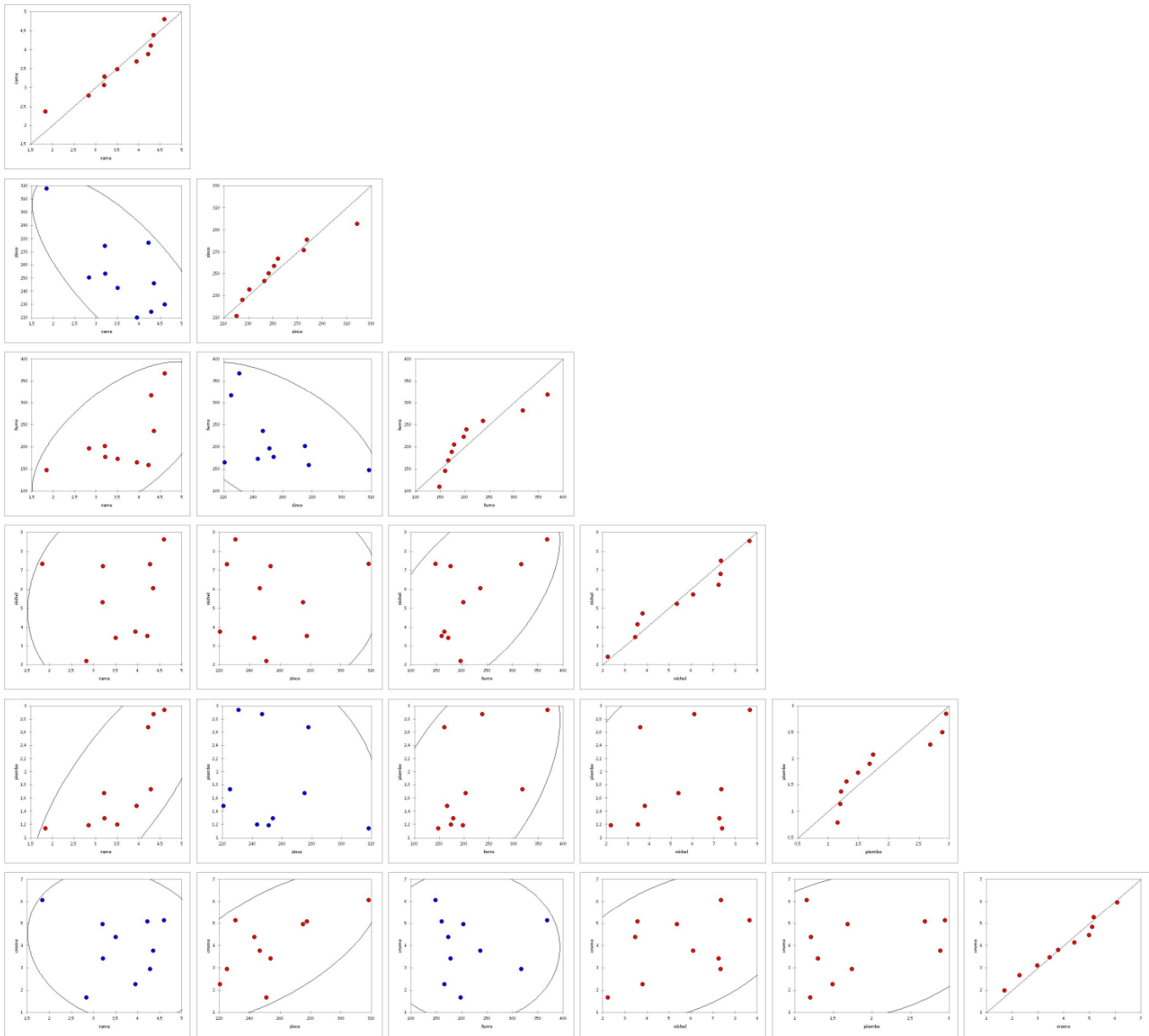


Figura 27: scatter plots



<i>Cavedano</i>							
<b>Tessuto fegato</b>							
<b>Campione</b>	<b>Cadmio</b>	<b>Cromo</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>
	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.
1	0,34	1,41	239,32	0,46	2,32	29,99	91,40
2	0,38	1,96	112,74	1,22	0,92	56,73	168,10
3	0,37	4,63	366,68	1,80	0,77	88,49	134,53
4	0,33	3,59	482,98	1,50	1,19	15,91	105,08
5	0,32	1,33	286,68	1,08	0,98	43,06	172,68
6	0,27	1,38	291,34	0,33	0,89	47,00	99,88
7	0,53	4,21	139,66	0,40	0,92	40,44	194,02
8	0,57	1,38	162,10	0,69	1,48	54,47	128,51
9	0,42	0,69	101,74	0,64	0,65	67,69	189,17
10	0,46	2,65	532,42	1,82	0,94	58,80	198,26

Tabella 11: concentrazioni (µg/g d.w.) dei 7 metalli nei fegati (n=10) di Cavedano

#### Relazioni tra metalli nei fegati

<b>Matrice di correlazione (Pearson):</b>							
<b>Variabili</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Cromo</b>	<b>Cadmio</b>
<b>Rame</b>	1						
<b>Zinco</b>	0,38	1					
<b>Ferro</b>	-0,15	-0,18	1				
<b>Nichel</b>	0,31	0,19	0,69	1			
<b>Piombo</b>	-0,52	-0,59	-0,02	-0,31	1		
<b>Cromo</b>	0,09	0,07	0,40	0,49	-0,23	1	
<b>Cadmio</b>	0,20	0,47	-0,30	-0,08	0,01	0,14	1

Tabella 12: matrice di correlazione (Pearson) dei metalli trovati nei fegati di Cavedano

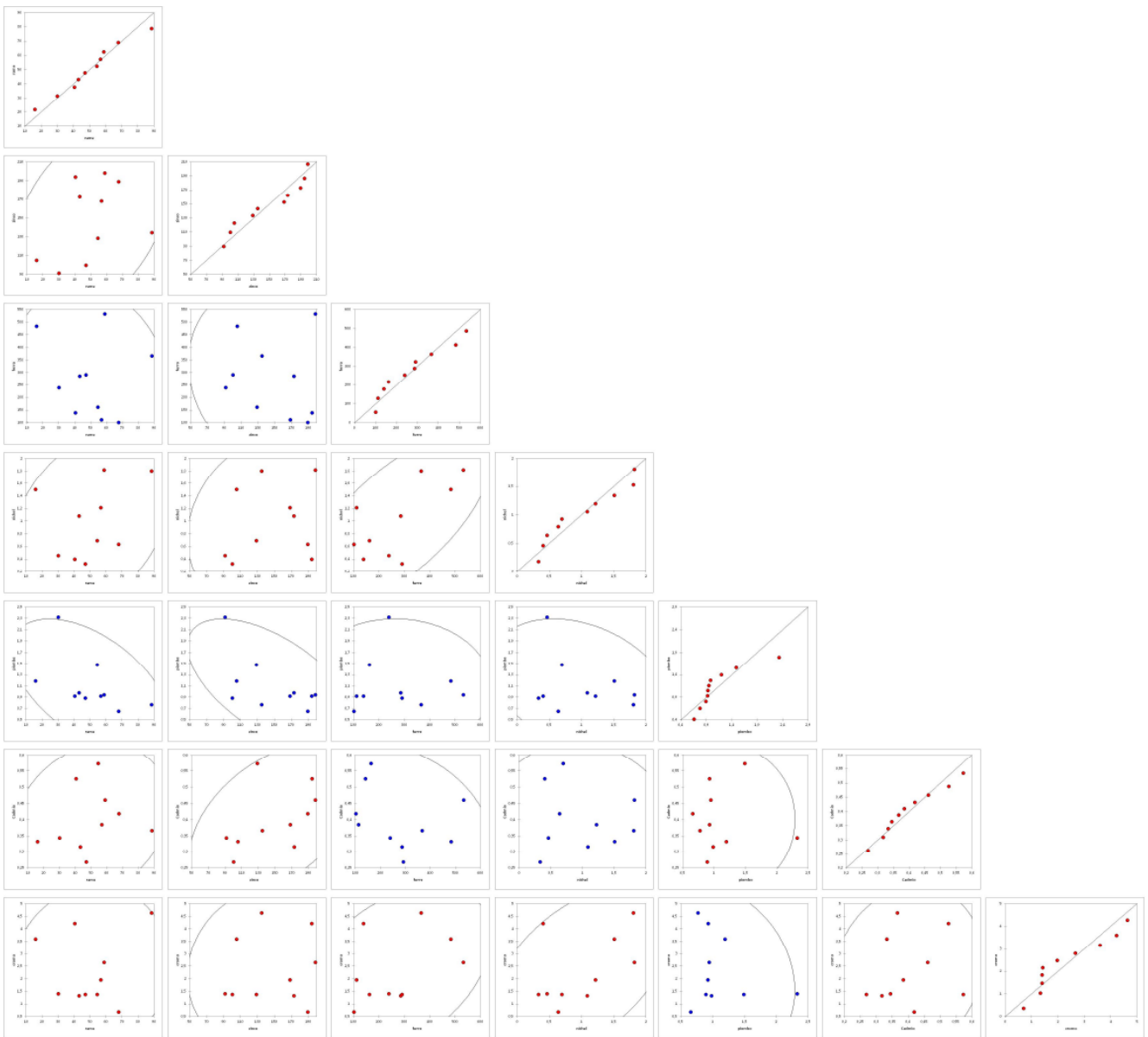


Figura 28: scatter plots

Non si evidenziano correlazioni significative comuni ad entrambi i tessuti.

<i>Cavedano</i>							
	<b>Cadmio</b>	<b>Cromo</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>
	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.
<b>Branchie</b>	<0,01	3,99 ± 1,40	214,82 ± 72,98	5,50 ± 2,15	1,83 ± 0,73	3,59 ± 0,85	253,93 ± 29,50
<b>Fegato</b>	0,40 ± 0,10	2,32 ± 1,37	271,56 ± 151,62	0,99 ± 0,57	1,11 ± 0,48	50,26 ± 20,13	148,16 ± 41,20

Tabella 13: concentrazioni medie (µg/g per peso secco) dei metalli ± dev.st. ottenute dall'analisi di 10 campioni di fegato e 10 di branchie per la specie Cavedano (*Leuciscus cephalus*).

### 3.9 Cavedano – metalli Tempo 2 vs metalli Tempo 0 e Tempo 1

Come per la briofita, la significatività delle eventuali differenze di concentrazione dei metalli tra i tessuti dei pesci campionati nel 2012 e quelli del 2010 e 2011, è stata analizzata con il metodo statistico di Mann-Whitney. Di seguito si riportano solo le considerazioni conclusive

#### Cadmio

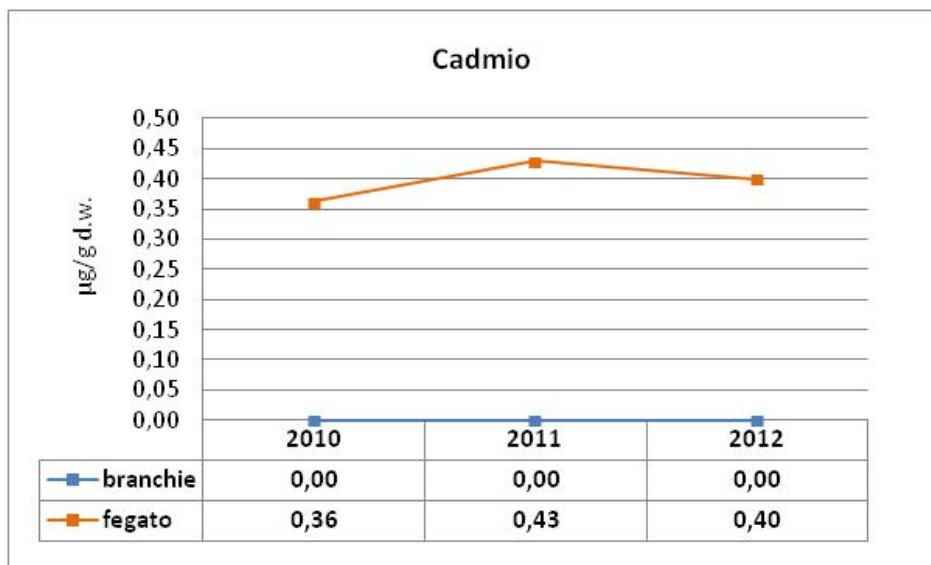


Figura 29: andamento delle concentrazioni medie di Cd ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Cavedano negli anni 2010-2011-2012.

Dall'analisi dei dati si evince che la concentrazione media di Cadmio nei tessuti dei pesci campionati rimane invariata nel tempo.

## Cromo

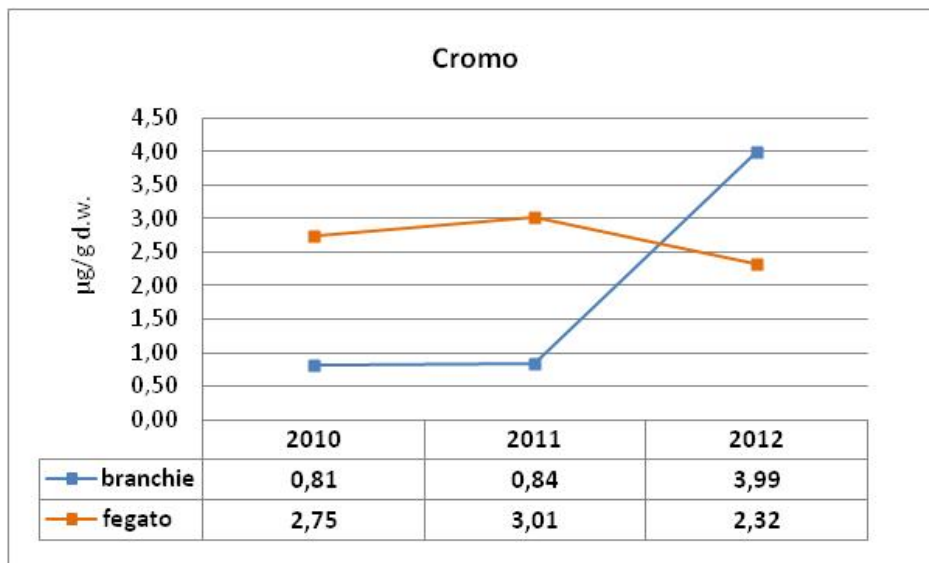


Figura 30: andamento delle concentrazioni medie di Cr ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Cavedano negli anni 2010-2011-2012.

Nell'anno 2012 si verifica un aumento significativo di Cromo nelle branchie, rispetto al tempo 1 ed al tempo 0 mentre il tessuto epatico non mostra variazioni.

## Ferro

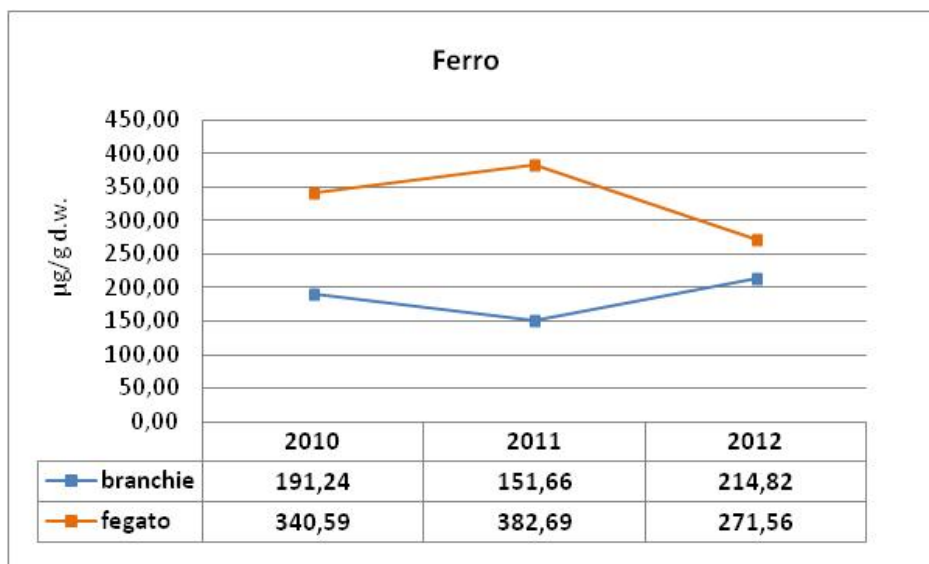


Figura 31: andamento delle concentrazioni medie di Fe ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Cavedano negli anni 2010-2011-2012.

Il Ferro non mostra variazioni significative nel fegato, mentre nelle branchie vi è un aumento significativo.

## Nichel

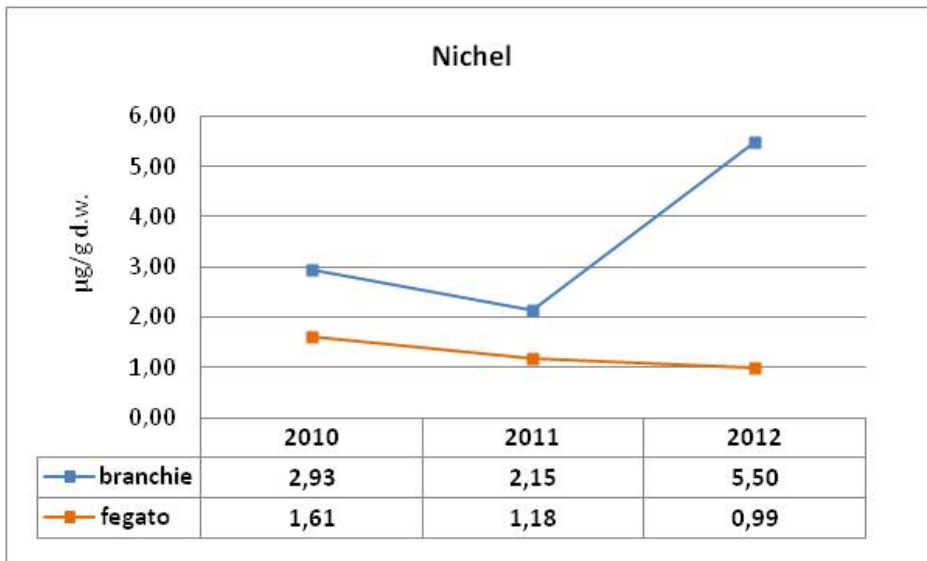


Figura 32: andamento delle concentrazioni medie di Ni ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Cavedano negli anni 2010-2011-2012.

Nel 2012 si verifica un aumento di Nichel bioaccumulato nelle branchie mentre non vi è alcuna variazione statisticamente significativa nel tessuto epatico.

## Piombo

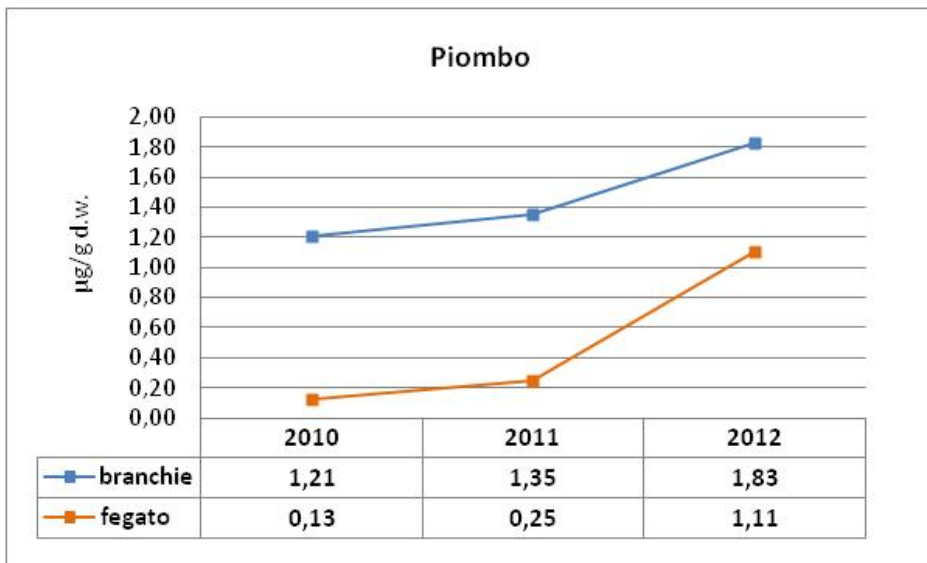


Figura 33: andamento delle concentrazioni medie di Pb ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Cavedano negli anni 2010-2011-2012.

La concentrazione media di Piombo aumenta in entrambi i tessuti, ma l'unico incremento significativo è quello che si verifica nel fegato.

## Rame

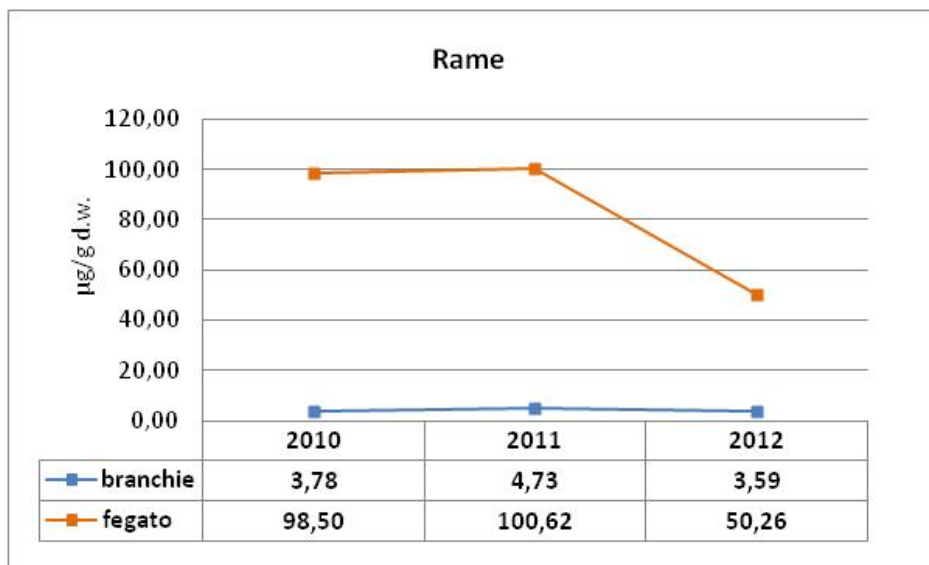


Figura 34: andamento delle concentrazioni medie di Cu ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Cavedano negli anni 2010-2011-2012.

Dall'analisi dei dati si evince che la concentrazione media di Rame nel 2012 diminuisce in modo significativo in entrambi i tessuti. In particolare nelle branchie al tempo 2 è minore di quella al tempo 1 e simile alla concentrazione trovata nel tempo 0, mentre nei fegati la diminuzione è significativa rispetto ai due anni precedenti.

## Zinco

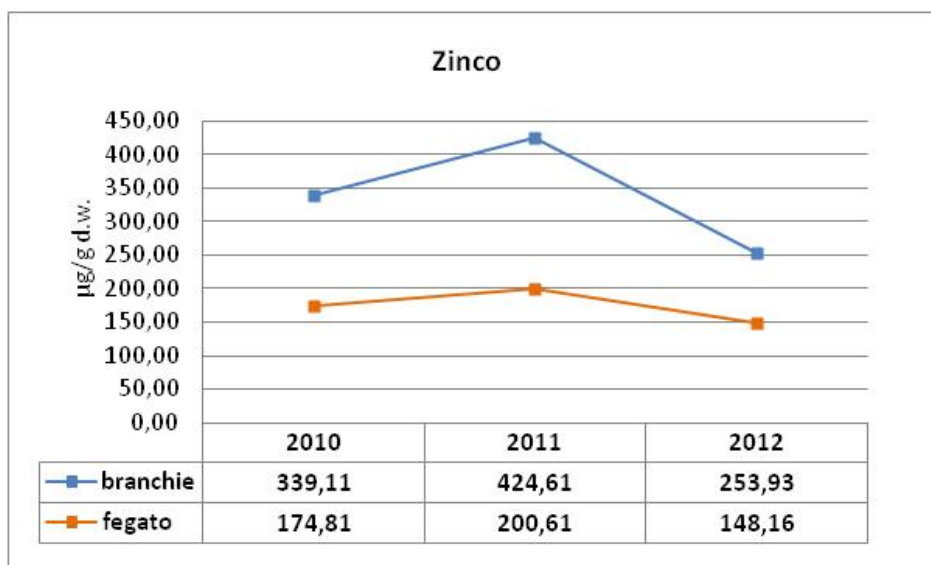


Figura 35: andamento delle concentrazioni medie di Zn ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Cavedano negli anni 2010-2011-2012.

Nelle branchie si verifica un decremento significativo di zinco, mentre il contenuto del metallo nel fegato non mostra variazioni nel tempo.



### 3.10 Cavedano – biomarker 2012

In tabella 14 sono riportati i valori dei sette biomarker ricercati, per i due tessuti.

<i>Cavedano</i>							
<b>Tessuto branchie</b>							
campione	<b>Glutazione</b>	<b>Catalasi</b>	<b>Glutazione S-transferasi (GST)</b>	<b>Glutazione reduttasi (GR)</b>	<b>Glutazione perossidasi (SeGPx)</b>	<b>Glutazione perossidasi (GPx)</b>	<b>Superossido dismutasi (SOD)</b>
	(nmoli/mg prot)	( $\mu$ moli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(U/mg prot)
1	46,83	8,97	79,26	8,98	6,39	87,98	2,11
2	73,35	5,69	61,77	11,85	5,60	75,64	2,22
3	55,82	4,72	67,92	9,28	7,49	72,67	2,19
4	53,13	6,05	88,04	10,13	8,32	78,38	2,53
5	60,00	5,67	74,58	12,15	7,19	75,02	2,71
<b>Tessuto fegato</b>							
campione	<b>Glutazione</b>	<b>Catalasi</b>	<b>Glutazione S-transferasi (GST)</b>	<b>Glutazione reduttasi (GR)</b>	<b>Glutazione perossidasi (SeGPx)</b>	<b>Glutazione perossidasi (GPx)</b>	<b>Superossido dismutasi (SOD)</b>
	(nmoli/mg prot)	( $\mu$ moli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(U/mg prot)
1	134,30	24,76	142,72	12,20	9,80	18,66	2,08
2	108,01	24,87	144,72	7,75	9,45	20,67	1,36
3	155,54	22,09	141,22	6,76	10,20	20,46	1,23
4	143,02	24,32	128,22	11,11	14,31	27,51	1,50
5	135,65	20,53	92,33	13,70	8,32	19,69	1,52

Tabella 14: contenuti di Glutazione, Catalasi, Glutazione S-transferasi (GST), Glutazione reduttasi (GR), Glutazione perossidasi selenio dipendente (SeGPx), Glutazione perossidasi (GPx), Superossido dismutasi (SOD), in branchie (n=5) e in fegato (n=5) di Cavedano (*Leuciscus cephalus*).

### 3.11 Cavedano – biomarker Tempo 2 vs biomarker Tempo 0 e Tempo 1

E' stato effettuato uno studio statistico atto ad evidenziare la significatività delle differenze riscontrate nei livelli di biomarker ottenute nel 2012 contro quelli relativi al 2011 ed al 2010.

#### Glutazione

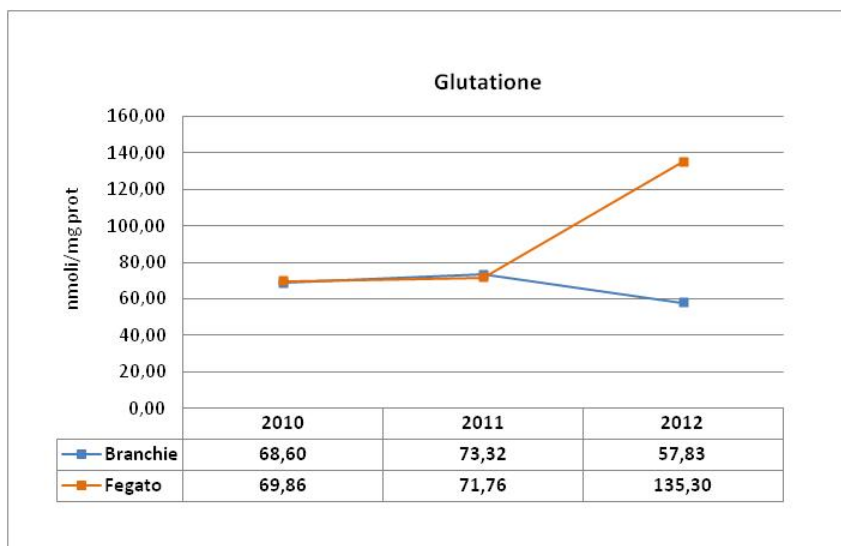


Figura 36: andamento del Glutazione nei tessuti di Cavedano, negli anni 2010-2011-2012.

Il Glutazione non mostra variazioni significative nelle branchie, viceversa aumenta nel fegato.

#### Catalasi

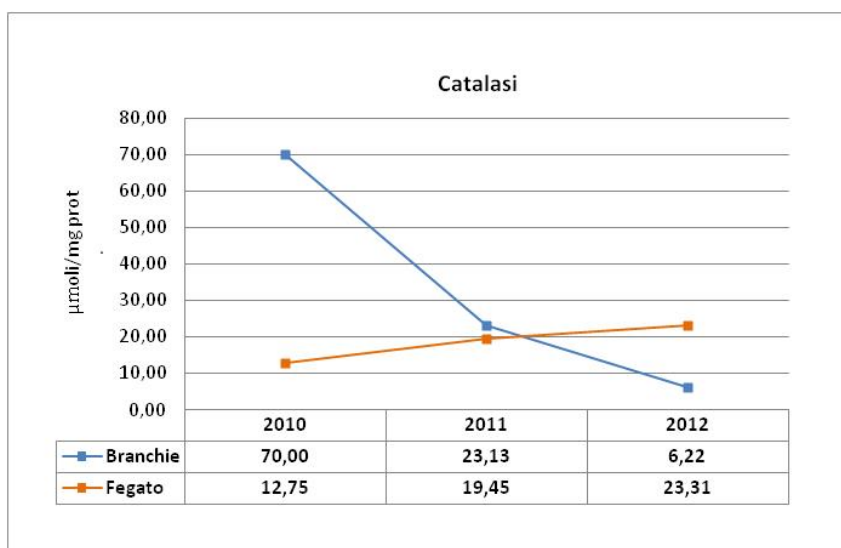


Figura 37: andamento di Catalasi nei tessuti di Cavedano, negli anni 2010-2011-2012.

L'analisi dei dati mostra una forte diminuzione di Catalasi, dal 2010 al 2012, nelle branchie, mentre nel fegato non restituisce differenze significative tra il 2011 ed il 2012, anche se vi è un aumento rispetto al tempo 0.

## GST

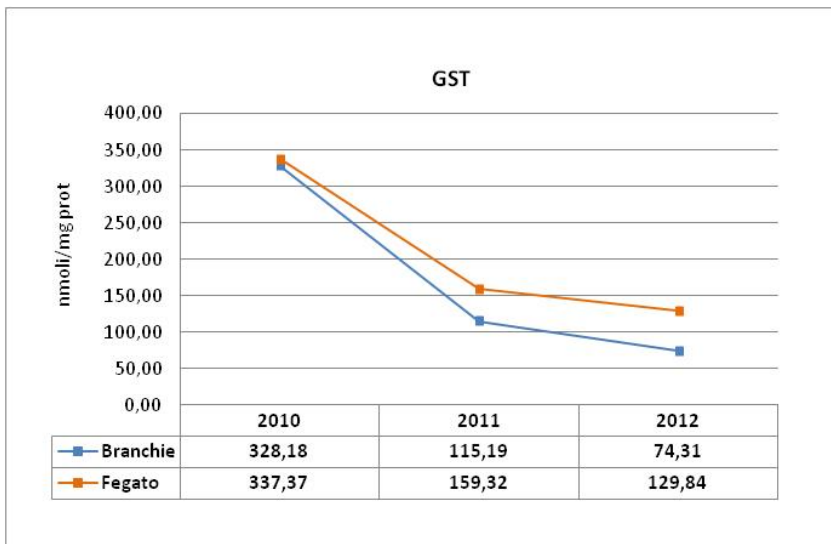


Figura 38: andamento del GST nei tessuti di Cavedano, negli anni 2010-2011-2012.

L'analisi dei dati mostra un deciso calo dei livelli di GST, dal 2010 al 2012 in entrambi i tessuti.

## GR

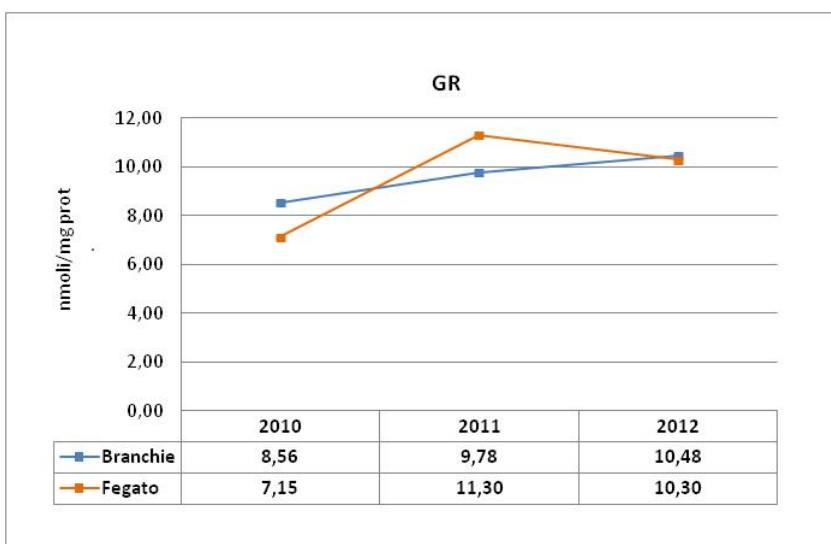


Figura 39: andamento di GR nei tessuti di Cavedano, negli anni 2010-2011-2012.

L'analisi dei dati di GR non mostra variazioni significative nei tre anni successivi.

## SeGPx

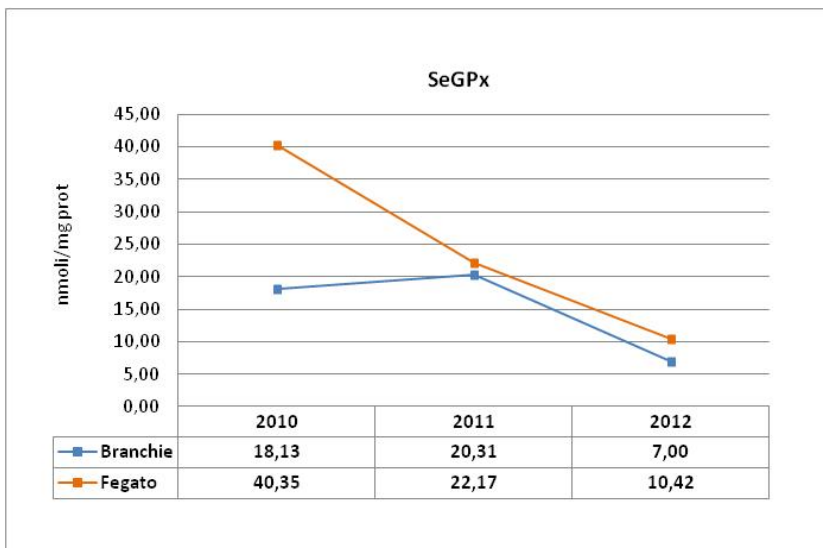


Figura 40: andamento di SeGPx nei tessuti di Cavedano, negli anni 2010-2011-2012.

L'analisi dei dati mostra una decisa diminuzione dei livelli di SeGPx in entrambi i tessuti dal 2010 al 2012.

## GPx

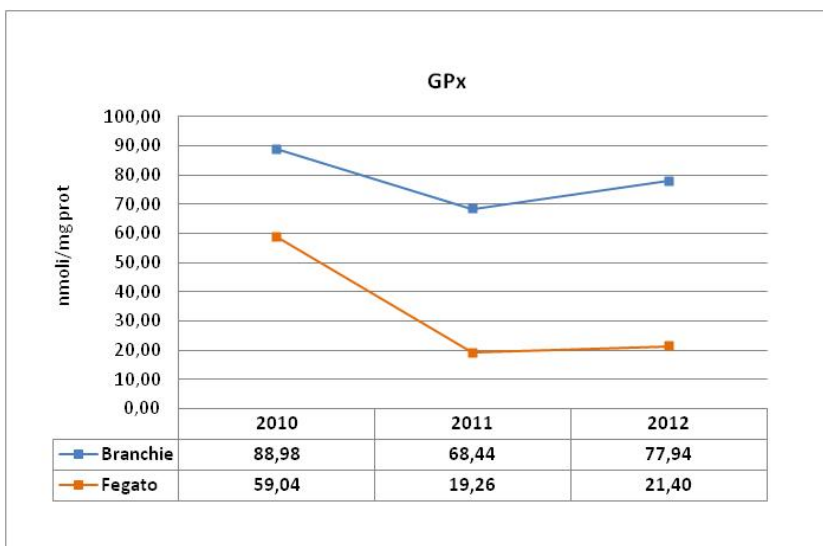


Figura 41: andamento di GPx nei tessuti di Cavedano, negli anni 2010-2011-2012.

Le medie di GPx non evidenziano variazioni significative nelle branchie mentre, pur non mostrando differenze nel fegato dal 2011 al 2012, in tale tessuto si verifica una marcata diminuzione dal 2010 ad oggi.

## SOD

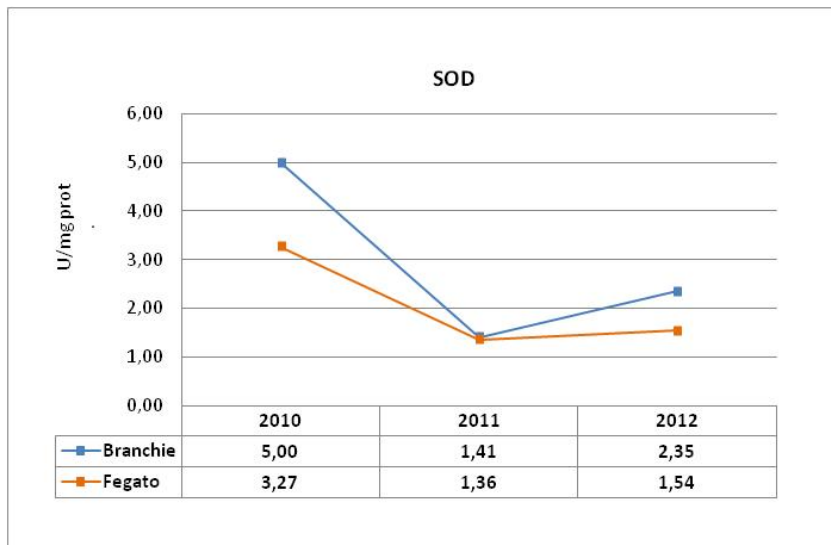


Figura 42: andamento della SOD nei tessuti di Cavedano, negli anni 2010-2011.

Dopo un iniziale diminuzione, la SOD nelle branchie tende ad aumentare nuovamente, mentre nei fegati rimane invariata.

<i>Cavedano</i>							
Tessuto	Glutazione	Catalasi	Glutazione S-transferasi (GST)	Glutazione reduttasi (GR)	Glutazione perossidasi (SeGPx)	Glutazione perossidasi (GPx)	Superossido dismutasi (SOD)
	(nmoli/mg prot)	( $\mu$ moli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(nmoli/mg prot)	(U/mg prot)
<b>Branchie</b>	57,83 $\pm$ 9,91	6,22 $\pm$ 1,61	74,31 $\pm$ 10,14	10,48 $\pm$ 1,45	7,00 $\pm$ 1,04	77,94 $\pm$ 5,97	2,35 $\pm$ 0,25
<b>Fegato</b>	135,31 $\pm$ 17,43	23,32 $\pm$ 1,92	129,84 $\pm$ 21,95	10,70 $\pm$ 3,21	10,42 $\pm$ 2,29	21,40 $\pm$ 3,51	1,54 $\pm$ 0,33

Tabella 15: valori medi biomarker  $\pm$  dev. st. nei tessuti di Cavedano.

### 3.12 Lasca – metalli 2012

A differenza del 2011, sono stati ritrovati e campionati 6 esemplari di Lasca. In tabella 16 sono riportate le concentrazioni dei 7 metalli trovati nelle 6 branchie.

<i>Lasca</i>							
<b>Tessuto branchie</b>							
<b>Campione</b>	<b>Cadmio</b>	<b>Cromo</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>
	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.
1	<0,01	1,38	138,51	3,70	1,18	2,21	84,73
2	<0,01	1,15	148,44	2,86	1,30	1,47	86,20
3	<0,01	32,85	646,25	33,54	2,31	2,01	91,04
4	<0,01	13,99	266,95	10,52	1,69	0,89	76,32
5	<0,01	1,39	111,26	1,23	0,81	1,52	68,18
6	<0,01	11,96	318,62	8,31	2,38	0,84	64,37

Tabella 16: concentrazioni (µg/g d.w.) dei 7 metalli in branchie (n=6) di Lasca

#### Relazioni tra metalli nelle branchie

<b>Matrice di correlazione (Pearson)</b>							
<b>Variabili</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Cromo</b>	<b>Cadmio</b>
<b>Rame</b>	1						
<b>Zinco</b>	0,70	1					
<b>Ferro</b>	0,12	0,37	1				
<b>Nichel</b>	0,25	0,49	0,98	1			
<b>Piombo</b>	-0,29	0,02	0,82	0,71	1		
<b>Cromo</b>	0,05	0,33	0,99	0,98	0,79	1	
<b>Cadmio</b>	-	-	-	-	-	-	1

Tabella 17: matrice di correlazione (Pearson) dei metalli trovati nelle branchie di Lasca

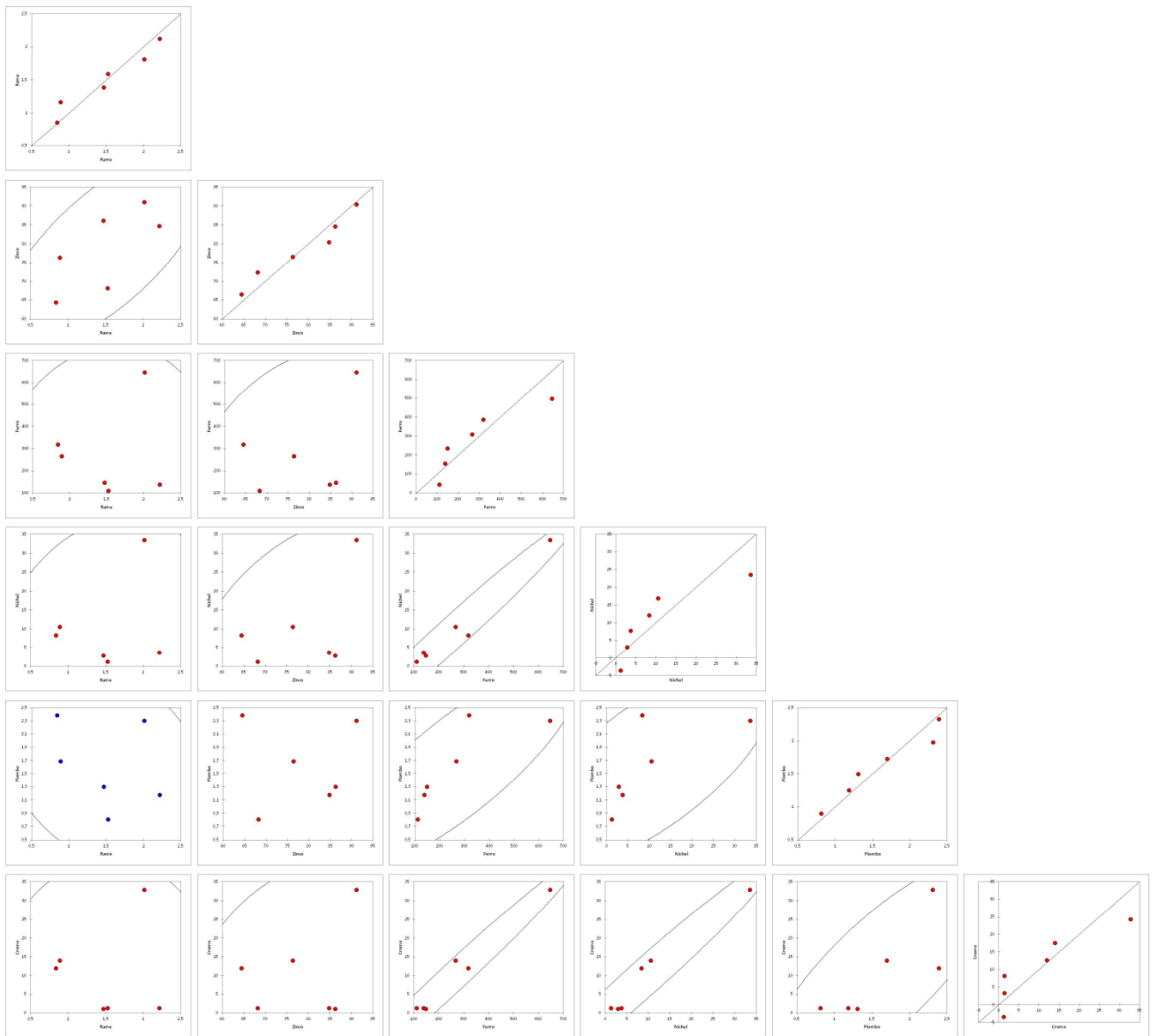


Figura 43: Scatter plots

In tabella 18 sono riportate le concentrazioni dei 7 metalli trovati nei 6 fegati analizzati.

<i>Lasca</i>							
<b>Tessuto fegato</b>							
<b>Campione</b>	<b>Cadmio</b>	<b>Cromo</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>
	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.	µg/g d.w.
1	<0,01	14,58	871,98	8,52	0,33	59,67	125,78
2	<0,01	10,17	384,30	5,00	0,89	56,22	89,19
3	<0,01	10,47	1888,1	5,12	0,96	43,93	86,38
4	<0,01	14,32	408,57	9,51	0,23	42,45	69,29
5	<0,01	21,99	461,32	8,41	0,29	45,58	61,71
6	<0,01	18,78	2194,3	5,31	3,66	311,33	108,46

Tabella 18: concentrazioni (µg/g d.w.) dei 7 metalli nei fegati (n=6) di Lasca

#### Relazioni tra metalli nei fegati

<b>Matrice di correlazione (Pearson)</b>							
<b>Variabili</b>	<b>Rame</b>	<b>Zinco</b>	<b>Ferro</b>	<b>Nichel</b>	<b>Piombo</b>	<b>Cromo</b>	<b>Cadmio</b>
<b>Rame</b>	1						
<b>Zinco</b>	0,42	1					
<b>Ferro</b>	0,69	0,44	1				
<b>Nichel</b>	-0,41	-0,25	-0,59	1			
<b>Piombo</b>	0,97	0,39	0,78	-0,61	1		
<b>Cromo</b>	0,38	-0,20	0,01	0,40	0,22	1	
<b>Cadmio</b>	-	-	-	-	-	-	1

Tabella 19: matrice di correlazione (Pearson) dei metalli trovati nei fegati di Lasca.

L'unica relazione comune tra i due tessuti è quella Ferro – Piombo.



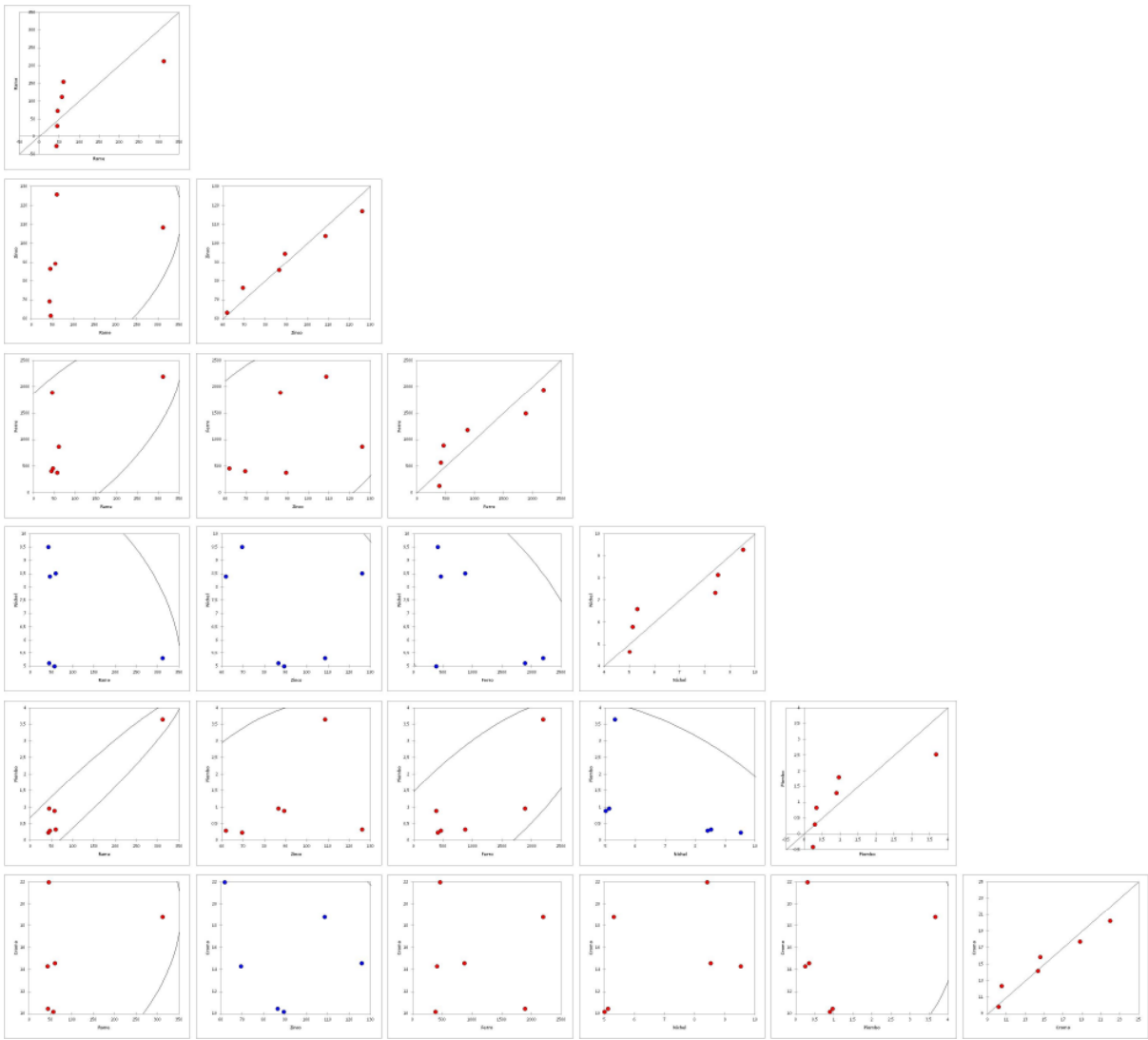


Figura 44: scatter plots

### 3.13 Lasca – metalli Tempo 2 vs metalli Tempo 0

La significatività delle eventuali differenze di concentrazione dei metalli tra i tessuti dei pesci campionati nel 2012 e quelli del 2010 è stata analizzata con il metodo statistico di Mann-Whitney. Di seguito si riportano solo le considerazioni conclusive.

#### Cadmio

Questo metallo non è stato mai ritrovato nei tessuti di Lasca.

#### Cromo

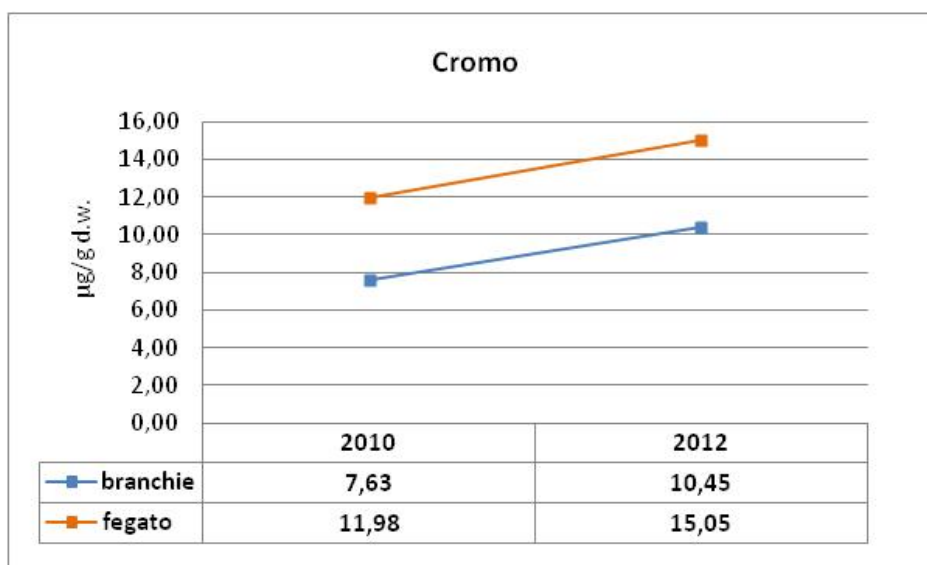


Figura 45: andamento delle concentrazioni medie di Cr ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Lasca negli anni 2010-2012.

Nell'anno 2012 si verifica un aumento non significativo di Cromo per entrambi i tessuti, rispetto al tempo 0.

## Ferro

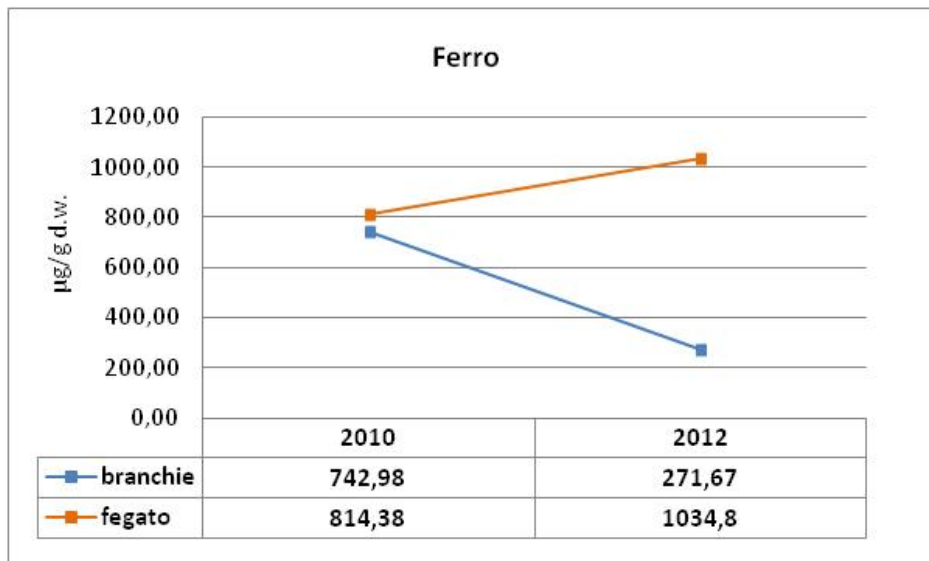


Figura 46: andamento delle concentrazioni medie di Fe ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Lasca negli anni 2010-2012.

Il Ferro aumenta significativamente nei fegati e diminuisce nelle branchie.

## Nichel

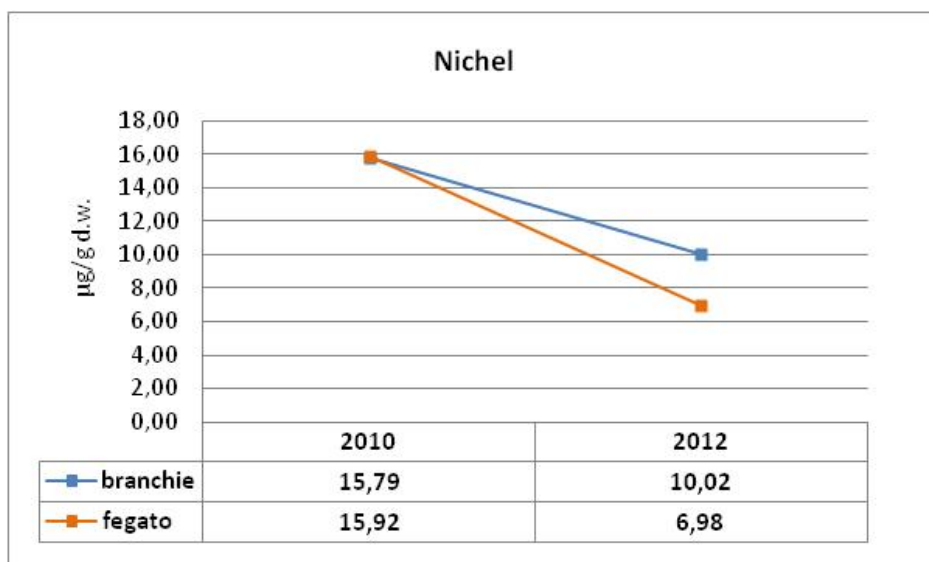


Figura 47: andamento delle concentrazioni medie di Ni ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Lasca negli anni 2010-2012.

Nel 2012 si verifica una diminuzione generale di Nichel bioaccumulato ma solo nei fegati tale decremento è statisticamente significativo.

## Piombo

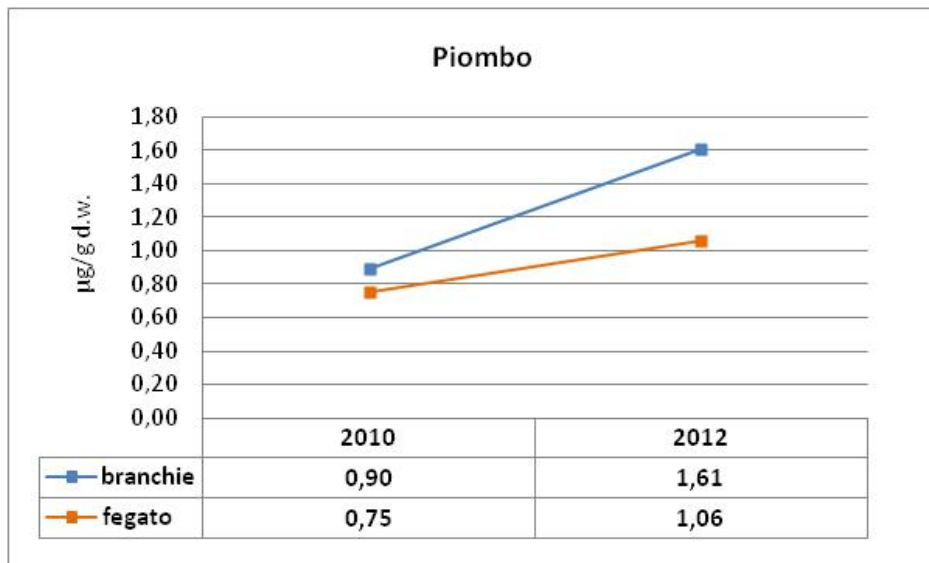


Figura 48: andamento delle concentrazioni medie di Pb ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Cavedano negli anni 2010-2012.

La concentrazione media di Piombo aumenta in entrambi i tessuti, ma l'unico incremento significativo è quello che si verifica nelle branchie.

## Rame

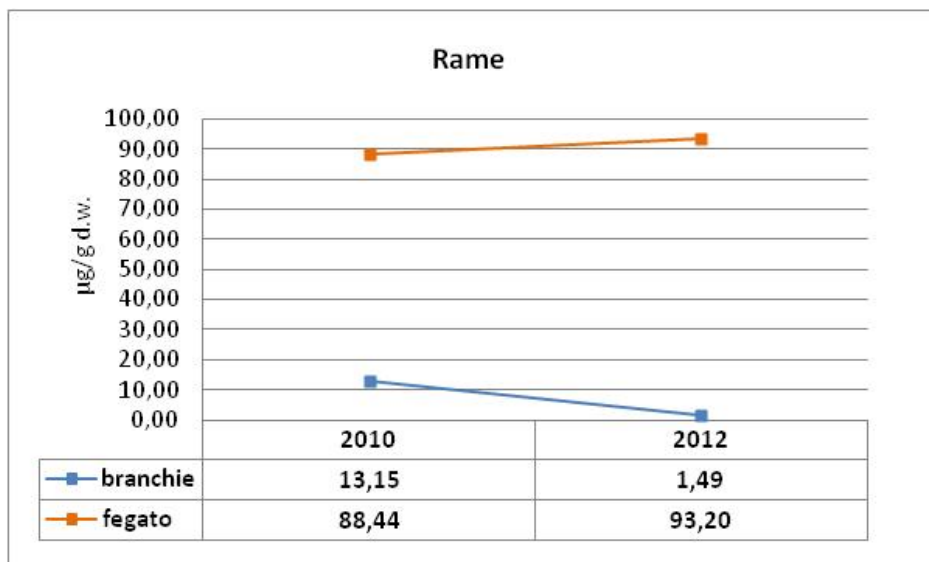


Figura 49: andamento delle concentrazioni medie di Cu ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Lasca negli anni 2010-2012.

Il Rame diminuisce nelle branchie ma rimane pressoché invariato nei fegati di Lasca.

## Zinco

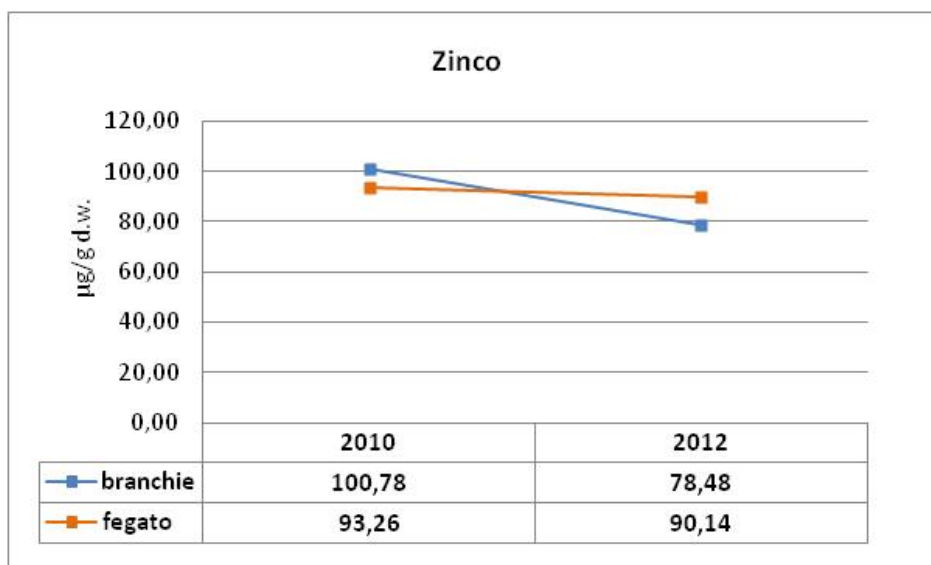


Figura 50: andamento delle concentrazioni medie di Zn ( $\mu\text{g/g d.w.}$ ) nei tessuti di Lasca negli anni 2010-2012.

Nelle branchie si verifica un decremento significativo di Zinco, mentre il contenuto del metallo nel fegato non mostra variazioni nel tempo.

## 4. Discussione e conclusioni

Per poter trarre delle conclusioni generali sull'effetto dell'impianto Dorr-Oliver nel tratto del fiume Nera interessato dallo scarico di stabilimento nel quale confluisce anche quello dell'impianto suddetto, sono stati monitorati, per due anni consecutivi a partire dal suo avvio (tempo 0), i contenuti di metalli pesanti e la risposta enzimatica, nei tessuti di diversi organismi.

Gli scopi di tale biomonitoraggio possono essere riassunti come segue:

- 1- fissare un livello di fondo, sia dei metalli sia dei biomarker, con i quali confrontare i dati dei successivi monitoraggi;
- 2- verificare eventuali differenze di contaminazione tra un sito posto a monte ed uno a valle dello scarico Dorr-Oliver;
- 3- controllare l'andamento nel tempo dei parametri indagati nei due siti scelti.

Le specie utilizzate, possono essere divise in due gruppi:

- 1- organismi sedentari e sempre presenti in entrambi i siti di campionamento: *Fontinalis antipyretica* (briofita) e Gammaridae (macrobentos);
- 2- organismi con mobilità elevata e presenti solo a valle dello scarico: Cavedano (*Leuciscus cephalus*) e Lasca (*Chondrostoma genei*).

Nella prima fase dello studio, oltre alla definizione dei livelli di fondo, era stata evidenziata una probabile contaminazione da Cromo, Ferro e Nichel comune alle briofite ed al macrobentos della stazione valle.

Nel 2011 è stata confermata la differenza tra la stazione monte e valle e, confrontando i dati con i livelli di fondo si notava che:

- nella *Fontinalis* vi era un generale aumento delle concentrazioni di metalli bioaccumulati e della risposta enzimatica;
- nei Gammaridi c'era una tendenza inversa, cioè i metalli, ad esclusione del Cu, tendevano a diminuire;
- nei tessuti di Cavedano le concentrazioni rimanevano sostanzialmente invariate ad eccezione del Cu e dello Zn che aumentavano nelle branchie ed il Pb nel fegato.

Per le specie del gruppo 1, in tutti i casi in cui si verificava un aumento significativo nel tempo, dei metalli, nella stazione a valle, contemporaneamente si ritrovava lo stesso aumento nella stazione monte.

Con il presente studio, fase finale del monitoraggio, si riconferma una maggiore contaminazione a valle per le specie sedentarie con l'unica eccezione del Pb nella *Fontinalis a*.

Inoltre, osservando la tabella 20 (a- specie gruppo 1, b- specie gruppo 2), che riassume l'andamento dei singoli metalli e dei biomarker dal 2010 al 2012 si evince quanto segue.

Andamento nel tempo - dal 2010 al 2012								
Metalli		Cd	Cr	Fe	Ni	Pb	Cu	Zn
<b>Fontinalis a.</b>	St. monte	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑
	St. valle	≈	≈	↓	↑	≈	↓	↓
Biomarker		Glut.	CAT	GST	GR	SeGPx	GPx	SOD
<b>Fontinalis a.</b>	St. monte	↓	≈	↑	↑	≈	↑	↑
	St. valle	↓	≈	↓	↑	↓	↓	↓
Metalli		Cd	Cr	Fe	Ni	Pb	Cu	Zn
<b>Gammaridi</b>	St. monte	≈	≈	≈	↑	↑	↑	↑
	St. valle	≈	≈	↑	↑	≈	↑	↑

Tabella 20 a: andamento dei metalli e dei biomarker dal 2010 al 2011 nelle specie del gruppo 1; ↑ = aumento, ↓ = diminuzione, ≈ = circa uguale.

#### Fontinalis antipyretica - Metalli

Nella stazione monte le concentrazioni di Pb e Zn sono significativamente maggiori nel 2012 rispetto al 2010, mentre i restanti metalli sono a livelli più bassi di quelli definiti "di fondo". Ciò potrebbe indicare un possibile contributo antropico di Pb e Zn a monte dello scarico. Nella stazione valle, l'unico metallo che aumenta dal 2010 al 2012 è il Ni, anche se in quest'ultimo anno la sua concentrazione si è più che dimezzata rispetto al tempo 1.

#### Fontinalis a. - Biomarker

La relazione dose-risposta risulta spesso di difficile interpretazione a causa di fattori mascheranti od inibitori che possono interferire con l'induzione del biomarker. In ambienti ricchi di metalli si può avere cross talk tra le risposte dei diversi biomarker. Nel caso dei campioni di briofita *Fontinalis antipyretica* la diminuzione di glutazione riportata sia a monte che a valle confrontando i dati 2010-2012 potrebbe essere relativa all'aumento di composti tiolici quali le fitochelatine che appartengono alla famiglia delle metallotioneine di classe III e giocano un ruolo importante nella strategia di difesa adottata dalle piante per difendersi dall'azione nociva dei cosiddetti "metalli pesanti" (Dazy et al., 2008; 2009). La diminuzione di glutazione potrebbe inoltre essere ricondotta all'aumento dell'attività della glutazione perossidasi (SeGPx e GPx) in risposta all'aumento della concentrazione di Cr (sia a monte che a valle, picco nell'anno 2011) che rimane più alta nella stazione a monte mentre a valle ritorna ai valori iniziali dell'anno 2010. Andamento simile si registra per la catalasi che ritorna ai valori basali del 2010 ma aumenta in entrambi i punti di campionamento nel 2011. L'andamento dell'attività enzimatica di GST che aumenta nella stazione a monte è probabilmente relativa all'aumento della concentrazione di Pb che nella stazione a monte aumenta ulteriormente nel 2012 mentre nella stazione a valle ritorna ai valori basali dell'anno 2010 (stesso andamento della GST a valle).

Nel complesso i dati ottenuti dalla *Fontinalis a.* campionata nella stazione a valle indicano che questi muschi rispondono all'aumento nella concentrazione di metalli quali Nichel, Piombo e

Cromo attivando meccanismi di difesa antiossidante rappresentati principalmente da glutazione, catalasi, GSR, GST e GPx, ritornando comunque alle attività enzimatiche basali relative all'anno 2010.

### Gammaridae – Metalli

Sottolineando che il confronto tra le concentrazioni del 2010 con quelle del 2012 non è stato affrontato con uno studio statistico ma solo sulla base dell'osservazione dei valori medi, dall'analisi di tali organismi deriva che in entrambe le stazioni, Cd e Cr rimangono invariati nel tempo e Ni, Cu e Zn aumentano; il Piombo, come per la *Fontinalis*, aumenta decisamente nella stazione monte rimanendo pressoché invariato a valle, questo a conferma di un sempre più probabile contributo antropico; il Fe bioaccumulato cresce nel tempo solo nella stazione valle.

Andamento nel tempo - dal 2010 al 2012								
Metalli		Cd	Cr	Fe	Ni	Pb	Cu	Zn
Cavedano	Branchie	≈	↑	↑	↑	≈	≈	↓
	Fegato	≈	≈	≈	≈	↑	↓	≈
Biomarker		Glut.	CAT	GST	GR	SeGPx	GPx	SOD
Cavedano	Branchie	≈	↓	↓	≈	↓	≈	↓
	Fegato	↑	↑	↓	≈	↓	↓	↓
Metalli		Cd	Cr	Fe	Ni	Pb	Cu	Zn
Lasca	Branchie	<LdR	≈	↓	≈	↑	↓	↓
	Fegato	<LdR	≈	↑	↓	≈	≈	≈

Tabella 20 b: andamento dei metalli e dei biomarker dal 2010 al 2011 nelle specie del gruppo 2; ↑ = aumento, ↓ = diminuzione, ≈ = circa uguale.

### Cavedano - Metalli

Nelle branchie del Cavedano si verifica un aumento nel tempo di Cr, Fe e Ni, lo Zn diminuisce e Cd, Cu e Pb rimangono sostanzialmente allo stesso livello. Viceversa, nei fegati, l'unico metallo bioaccumulato che mostra una crescita è il Pb.

### Cavedano – Biomarker

La modulazione dell'attività enzimatica nei tessuti di cavedano è meno chiara della stessa nella *Fontinalis a.* Come evidenziato recentemente la risposta dei biomarker nei tessuti di cavedano risulta essere particolarmente eterogenea. Questo potrebbe essere relativo alla complessità delle miscele chimiche presenti nell'ambiente di studio e dei conseguenti effetti interattivi nei tessuti dei pesci probabilmente dovuti anche agli effetti di contaminanti presenti e non considerati (Fonseca et al., 2011). Il fegato è più sensibile ai metalli rispetto ad altri tessuti perché sede di reazioni ossidative multiple e massima generazione di radicali liberi. (Atli e Canli, 2011).



Prendendo in considerazione i risultati ottenuti, la stimolazione della catalasi del fegato (aumenta progressivamente dal 2010 al 2012) potrebbe essere il segnale di risposta alla contaminazione a lungo termine da metalli tipica dell'ambiente considerato e potrebbe essere relativa all'attivazione di un efficace meccanismo di difesa antiossidante che agisce in risposta allo stress ossidativo e che compensa la diminuzione nell'attività di altri enzimi antiossidanti quali GPx e SOD che diminuiscono progressivamente nel fegato ma anche nella branchia. L'attivazione della GR (fegato anno 2011, branchia aumento progressivo 2010-2012) indicano una maggiore capacità dell'enzima di rigenerare la forma ridotta di glutazione, si registra infatti un aumento del tiolo nel fegato nell'ultimo anno. L'induzione dei sistemi antiossidanti può riflettere quindi una situazione di adattamento delle specie che vivono in ambienti contaminati.

#### Lasca – Metalli

A differenza del Cavedano, l'unico metallo che mostra un incremento significativo nelle branchie della Lasca è il Pb, mentre gli altri metalli, nel passaggio dal 2010 al 2012 o diminuiscono o rimangono sostanzialmente invariati. Allo stesso modo nel fegato si verifica un aumento del Fe ed una diminuzione del Ni.

#### Conclusioni

Dallo studio e l'analisi delle quattro matrici biologiche considerate non si può giungere ad un'unica conclusione relativa agli effetti dello scarico dell'impianto Dorr–Oliver sull'ecosistema indagato.

Sulla base della risposta della briofita (gruppo 1), nella stazione valle, l'unico incremento eventualmente attribuibile all'avvio dell'impianto sopracitato potrebbe essere quello del Nichel, anche se osservando l'andamento di tale metallo (Fig.6) la concentrazione relativa al 2012 probabilmente è un "effetto memoria" del picco del 2011. Infatti la capacità di detossificazione di uno stesso organismo può variare in modo sensibile a seconda dell'elemento considerato.

Relativamente alla componente macrobentonica, il Ferro è l'unico metallo che mostra un incremento temporale nella stazione posta a valle dello scarico, rimanendo invariato a monte. Anche in questo caso le marcate differenze di concentrazione tra le due postazioni di prelievo è in parte attribuibile alle rispettive caratteristiche dei due siti, in particolare del substrato. Infatti i gammaridi, classificati come raschiatori-triturator-collettori di detrito organico, nel bioaccumulo di inquinanti, risentono sicuramente della componente sedimento che è diversa nelle due stazioni a causa delle differenze fisiche ed idrodinamiche che le caratterizzano. Il substrato della stazione monte è caratterizzato principalmente da ghiaia con la presenza di ciottoli e grossi massi mentre nella stazione valle il fondo è principalmente ghiaioso-sabbioso.

Più difficile è l'interpretazione dei dati relativi ai pesci in quanto questi non essendo sedentari sono in genere poco rappresentativi dell'area di raccolta. Le concentrazioni di inquinanti negli organismi che percorrono lunghe distanze diventa, infatti, una funzione dello spazio (dove sono stati) e del tempo (quanto a lungo sono stati in una determinata area) e, questi due fattori, non possono essere separati ne sempre determinati. Gli individui di Cavedano e di Lasca sono stati ritrovati solo a valle in un tratto di fiume dove la presenza di inquinanti biodisponibili per queste specie non è unicamente attribuibile allo scarico indagato soprattutto in un'ottica che considera la mobilità dei pesci.

Inoltre, a causa delle diversità "ambientali" tra le due stazioni, non è stato possibile campionare le stesse specie a monte, mancando quindi un bianco di paragone. Durante le fasi di cattura si era potuto notare come il tratto di monte risultasse inforato con un larghezza media di circa 6 m e rocce affioranti in alveo; erano presenti numerose pozze alcune con profondità elevate non campionabili. In questo tratto, dalle caratteristiche in prevalenza rithrali, è quindi, attendibile una comunità ittica salmonicola ben strutturata, mentre nel tratto di valle dalle caratteristiche più potamali, larghezza media 15 m profondità media circa 60 cm substrato ghiaioso-sabbioso e prevalenza di correntini, ci si attende una comunità ittica mista (ciprinicola- salmonicola). Le stazioni di monte e di valle sono difficilmente confrontabili in termini di analisi delle strutture e composizioni dei popolamenti ittici rilevati in quanto presentano condizioni ambientali e comunità ittiche notevolmente diversificate. Si può pertanto affermare che l'analisi dei tessuti dei pesci fornisce un contributo ben poco significativo nella caratterizzazione dell'eventuale impatto del Dorr-Oliver sullo stato di qualità del tratto di fiume indagato.

Direttore di Dipartimento  
Prof. Riccardo Cuppini

Più difficile è l'interpretazione dei dati relativi ai pesci in quanto questi non essendo sedentari sono in genere poco rappresentativi dell'area di raccolta. Le concentrazioni di inquinanti negli organismi che percorrono lunghe distanze diventa, infatti, una funzione dello spazio (dove sono stati) e del tempo (quanto a lungo sono stati in una determinata area) e, questi due fattori, non possono essere separati ne sempre determinati. Gli individui di Cavedano e di Lasca sono stati ritrovati solo a valle in un tratto di fiume dove la presenza di inquinanti biodisponibili per queste specie non è unicamente attribuibile allo scarico indagato soprattutto in un'ottica che considera la mobilità dei pesci.

Inoltre, a causa delle diversità "ambientali" tra le due stazioni, non è stato possibile campionare le stesse specie a monte, mancando quindi un bianco di paragone. Durante le fasi di cattura si era potuto notare come il tratto di monte risultasse inforato con un larghezza media di circa 6 m e rocce affioranti in alveo; erano presenti numerose pozze alcune con profondità elevate non campionabili. In questo tratto, dalle caratteristiche in prevalenza rithrali, è quindi, attendibile una comunità ittica salmonicola ben strutturata, mentre nel tratto di valle dalle caratteristiche più potamali, larghezza media 15 m profondità media circa 60 cm substrato ghiaioso-sabbioso e prevalenza di correntini, ci si attende una comunità ittica mista (ciprinicola- salmonicola). Le stazioni di monte e di valle sono difficilmente confrontabili in termini di analisi delle strutture e composizioni dei popolamenti ittici rilevati in quanto presentano condizioni ambientali e comunità ittiche notevolmente diversificate. Si può pertanto affermare che l'analisi dei tessuti dei pesci fornisce un contributo ben poco significativo nella caratterizzazione dell'eventuale impatto del Dorr-Oliver sullo stato di qualità del tratto di fiume indagato.

Direttore di Dipartimento  
Prof. Riccardo Cuppini

*M. Gu.*

