



REGIONE BASILICATA



Progetto di **M**onitoraggio della vulnerabilità geochimica
finalizzato alla corretta **G**estione dell'uso del **S**uolo in alcune
aree a rischio del Parco Nazionale del **P**ollino (Basilicata)

MoGeSPol

RELAZIONE FINALE

Dicembre 2015



INDICE

<u>Premessa</u>	<u>2</u>
<u>Inquadramento dell'area pilota e stato dell'arte</u>	<u>3</u>
<u>Attività di campionamento</u>	<u>6</u>
<u>Attività sperimentali</u>	<u>8</u>
<u>Screening preliminare della popolazione residente</u>	<u>31</u>
<u>Conclusioni</u>	<u>33</u>
<u>Bibliografia</u>	<u>36</u>

PREMESSA

Il rischio geochimico legato alla contaminazione da metalli pesanti di suoli e acque può essere associato sia a cause antropiche che a fattori geogenici, ovvero alla presenza di rocce e sedimenti che ne contengono quantità superiori rispetto alle concentrazioni medie delle crosta continentale superiore. Ad esempio, cromo, nickel e cobalto possono essere particolarmente abbondanti nelle rocce ultramafiche e ofiolitiche (serpentiniti e metabasiti) e negli gneiss, oltre che nei suoli derivanti dai relativi processi pedogenetici. Inoltre, i fenomeni di alterazione a carico di tali rocce, e in particolare delle fasi minerali che ne costituiscono le principali paragenesi, possono determinare il rilascio in forma ionica, nelle soluzioni circolanti, di elevate quantità di tali metalli, determinando anche un rischio di tipo idrogeochimico (Fantoni et al., 2002; Giammetta et al., 2004; Oze et al., 2004a; Oze et al., 2004b; Oze et al., 2007; Kierczak et al., 2007; Margiotta et al., 2012).

In tal senso, il settore centro-settentrionale del massiccio del Pollino, compreso tra il Fiume Sinni e la dorsale della Fagosa, e inserito nell'omonimo Parco Nazionale, rappresenta un importante *pilot case* a scala nazionale ed internazionale, in quanto l'intera area si caratterizza per la presenza di litotipi ofiolitiferi metamorfici e non metamorfici e di rocce cristalline di origine continentale che rappresentano serbatoi naturali di elementi (quali nickel e cromo) potenzialmente tossici e/o cancerogeni, e quindi pericolosi per la salute umana. Queste condizioni giustificano, per l'intera area, un'azione di monitoraggio mirata e prolungata nel tempo, finalizzata alla definizione della tipologia e dell'entità del rischio idrogeochimico e alla individuazione di possibili interventi di mitigazione dello stesso. Tale azione di monitoraggio è stata svolta, fino a questo momento, nell'ambito di due distinti progetti di ricerca, entrambi di durata biennale: "Progetto MASPONE: Monitoraggio ambientale e prevenzione dai rischi naturali del sistema acqua-suolo in alcune aree del Pollino" (POR BASILICATA 2000/2006), condotto nel biennio 2007-2008, e "Progetto MonIdroPol - Monitoraggio e Mitigazione del Rischio Idrogeochimico finalizzato alla corretta gestione delle risorse ambientali nel Parco Nazionale del Pollino" (PO FESR Basilicata 2007-2013), per il biennio 2011-2012. Le attività di studio e di ricerca condotte nell'ambito dei suddetti progetti hanno consentito una valutazione della qualità fisico-chimica delle acque sorgive e l'individuazione di alcune criticità ambientali, rispetto alle quali si è proceduto all'identificazione dei principali processi di interazione acqua-roccia in grado di definire, nell'area di studio, un rischio geochimico associato alla presenza di metalli pesanti nei suoli e nelle acque sotterranee.

Alla luce dei risultati ottenuti, si è ritenuto opportuno proseguire le attività di monitoraggio e ricerca al fine di individuare eventuali ulteriori criticità ambientali in aree del bacino del Sinni non monitorate nel corso dei precedenti studi, e di effettuare uno studio di maggiore dettaglio nell'area pilota di San Severino Lucano, che prevedesse la valutazione della biodisponibilità e della mobilità geochimica dei metalli pesanti,

con particolare attenzione al cromo (VI), e l'individuazione di bioindicatori e di possibili *pattern* di migrazione dei contaminanti dai suoli e dalle acque ai prodotti destinati alla nutrizione umana.

Le attività di ricerca vengono condotte presso l'Istituto di Metodologie per l'Analisi Ambientale del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IMAA-CNR) di Tito Scalo (Potenza) sotto la responsabilità tecnico-scientifica del dott. Vito Summa ed in collaborazione con il Dipartimento Ambiente, Territorio, Politiche della Sostenibilità della Regione Basilicata, l'Istituto Nazionale Infortuni sul Lavoro, Dipartimento Innovazioni Tecnologiche e Sicurezza degli Impianti, Prodotti e Insediamenti Antropici (INAIL/DIT) di Roma e il Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura, Centro di ricerca per lo studio delle relazioni tra pianta e suolo (CRA-RPS) di Roma, sotto il coordinamento della dott.ssa Elena Sturchio, con l'Associazione Italiana per lo Studio delle Argille (AISA), come membro dell'Association Internationale Pour l'Etude des Argiles (AIPEA) e con il dott. Achille Palma dell'Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale di Basilicata (ARPAB)

1. INQUADRAMENTO DELL'AREA PILOTA E STATO DELL'ARTE

L'area oggetto di studio ricade nel settore centro-settentrionale del Parco Nazionale del Pollino, e dal punto di vista geologico si caratterizza per la presenza di terreni alloctoni del Complesso Liguride, costituiti dai litotipi ofiolitiferi non metamorfici riconducibili all'Unità del Flysch calabro-lucano, e dai terreni ofiolitiferi metamorfici dell'Unità del Frido, in cui è possibile riconoscere la subunità a prevalenti argiloscisti e quella a prevalenti calcescisti (Critelli e LePera, 1998). Le rocce ofiolitiche inglobate sono costituite essenzialmente da corpi lentiformi di peridotiti cataclastiche serpentinizzate con colorazione variabile del verde al nero, e da corpi di metabasiti affioranti in scaglie tettoniche talora associate all'originaria copertura sedimentaria. Nell'area di studio si rinvencono anche rocce cristalline di origine continentale, rappresentate da gneiss granatiferi, gneiss albitici, gneiss anfibolici e anfiboliti. Tutti i litotipi sopra descritti rappresentano, come abbondantemente indicato in letteratura scientifica, potenziali serbatoi naturali di metalli, in quantità tali da poter essere considerati tossici e cancerogeni, e dunque pericolosi per la salute umana (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Vardaki e Kelepertis, 1999; Baffi, 2002; Fantoni et al., 2002; Giammetta et al., 2004; Oze et al., 2004a; Oze et al., 2004b; Kierczak et al., 2007; Margiotta et al., 2012). Nell'area di studio affiorano anche depositi pleistocenici del Bacino di S.Arcangelo, costituiti prevalentemente da sabbie e conglomerati poligenici ben cementati con clasti ben arrotondati, in sovrapposizione ai depositi calciclastici e silicoclastici tortoniani della Formazione di Perosa e ai terreni ofiolitiferi dell'Unità del Frido (Vezzani, 1966; Cavalcante et al., 2009). Anche questi conglomerati pleistocenici, come evidenziato dagli studi condotti nell'ambito del progetto "MonIdroPol - Monitoraggio e Mitigazione del Rischio Idrogeochimico finalizzato alla corretta gestione delle risorse ambientali nel Parco Nazionale del Pollino" sono, talora, in grado di rilasciare nelle

acque circolanti quantità significative di cromo esavalente, a causa di una significativa componente clastica serpentinitica. Per questo motivo, nel presente progetto si è provveduto alla individuazione, in sinistra orografica del fiume Sinni e nel bacino del Serrapotamo, di ulteriori sorgenti ricadenti in analoghi litotipi conglomeratici e ad un primo campionamento delle stesse, al fine di effettuare una valutazione preliminare della qualità di tale risorsa idrica.

La zona di San Severino Lucano è stata individuata come area pilota in corrispondenza della quale effettuare uno studio geochimico e biologico di dettaglio, finalizzato alla definizione della mobilità geochimica dei metalli correlati alle diverse fasi minerali ed organiche presenti nei suoli e alla individuazione di bioindicatori e di possibili *pattern* di migrazione dei contaminanti dai suoli e dalle acque ai prodotti destinati alla nutrizione umana. Tale area si caratterizza, infatti, per la presenza di rocce serpentinitiche cataclastiche intensamente fratturate, interstratificate con metabasiti lenticolari e tettonicamente sovrapposte ad argilloscisti e calcescisti dell'Unità del Frido. Questi ultimi terreni costituiscono un limite di permeabilità rispetto all'acquifero serpentinitico di San Severino Lucano, caratterizzato da una permeabilità piuttosto elevata per porosità secondaria, legata all'intensa fratturazione (Maggiore et al., 1993). Lungo il contatto tra le due litologie sopra descritte, comunemente obliterate da suolo agrario e da una coltre detritica ed eluvio-colluviale, sono allineate diverse sorgenti (Fosso Arcangelo, Fonte Pagnottella, Fontana Giudea, Fontana di Mezzo, Fontana Matarazzo), molte delle quali utilizzate a scopi potabili e/o irrigui, o come fonte di approvvigionamento idrico per vicine aree picnic. In corrispondenza di tali sorgenti, che presentano tenori in cromo (VI) costantemente superiori alla concentrazione soglia di contaminazione fissata dalla vigente normativa in materia di acque sotterranee destinate al consumo umano (D.Lgs. 152/2006), è anche presente un'orticoltura ben sviluppata, su suoli che presentano a loro volta concentrazioni elevate di nickel e cromo, derivando prevalentemente dall'alterazione di rocce serpentinitiche. A tale *background* naturale, si somma l'effetto legato all'utilizzo, durante il periodo estivo, dell'acqua delle vicine sorgenti per l'irrigazione delle colture.

Sono stati, inoltre, predisposti dei modelli di simulazione in laboratorio dei processi di interazione acqua-suolo, finalizzata alla valutazione della biodisponibilità e della mobilità geochimica di alcuni metalli pesanti e, in particolare, del cromo, tenendo anche conto delle possibili variabili in grado di influenzare, *in situ*, le caratteristiche composizionali dei suoli, quali le pratiche agricole di concimazione e l'irrigazione delle colture con le acque delle vicine sorgenti, contaminate da cromo esavalente.

Sono stati predisposti anche modelli di simulazione *in vivo* in laboratorio per l'esecuzione di test finalizzati alla valutazione della tossicità dei contaminanti presenti nei suoli o nelle acque su piante lasciate crescere direttamente sulla matrice solida o irrigate con la matrice acquosa. Studiare gli effetti tossici dei contaminanti sulle piante è molto importante proprio per il ruolo ecologico che esse ricoprono: essendo alla base della catena trofica, un potenziale accumulo di sostanze tossiche nei loro tessuti può diventare

una potenziale minaccia per la salute animale ed umana. I test di tossicità vengono condotti su organismi modello e consistono nel rilevamento dei cambiamenti a livello biochimico, molecolare, cellulare, tissutale o a livello di popolazione, che causano l'alterazione o compromissione di una o più funzioni come sopravvivenza, crescita, riproduzione, motilità, fotosintesi, comportamento (Maffiotti et al., 1997).

Al momento sono stati condotti test *in vivo* di fitotossicità e genotossicità su cellule meristematiche della radice primaria delle piantine di *Vicia faba* cresciute su suoli e acque contaminate. *Vicia faba* viene utilizzata come bioindicatore perché possiede grandi cromosomi suscettibili allo studio delle aberrazioni cromosomiche durante la divisione cellulare mitotica nelle cellule somatiche e dei micronuclei in cellule dell'apice radicale. Questa pianta è ampiamente utilizzata negli studi citologici e di genotossicità così come negli esperimenti di fisiologia (Kanaya et al., 1994).

Il Test di Fitotossicità (primary root length-test) fornisce una stima sugli effetti tossici che una sostanza può avere su una pianta, e che possono tradursi in danni temporanei o a lungo termine, attraverso l'analisi dello stato di crescita e della morfologia delle plantule. La fitotossicità di un'inquinante (in questo caso Cromo (VI)) è espressa in termini di riduzione della lunghezza della radice primaria delle piante di *Vicia faba* cresciute in suoli contaminati rispetto al controllo negativo (piante cresciute su suolo non inquinato). La lunghezza della radice primaria è determinata mediante misurazione con un calibro (mm) e l'errore dello strumento è pertanto di ± 1 mm (An, 2004).

Molti contaminanti ambientali, sia di origine naturale che antropica, sono potenzialmente genotossici, ovvero sono in grado di interagire con il materiale genetico, modificandolo. Il metabolismo cellulare delle sostanze genotossiche è un fenomeno relativamente complesso e la mancanza di una detossificazione completa può portare alla formazione di metaboliti elettrofili altamente reattivi, che possono attaccare i centri nucleofili di macromolecole come DNA, lipidi e proteine. L'interazione tra sostanze genotossiche e DNA si manifesta primariamente attraverso alterazioni strutturali del DNA che, se non sono riparate, possono portare alla fissazione di anomalie del materiale genetico. L'identificazione e la quantificazione delle diverse alterazioni possono essere utilizzate come biomarker in organismi esposti ad ambienti contaminati.

La maggior parte della letteratura scientifica riferita allo studio della mutagenicità e clastogenicità in suoli contaminati valuta l'induzione di mutazioni geniche, rotture del DNA/danni al DNA primario, danni citogenetici dovuti all'alterazione dell'integrità cromosomica e induzione di micronuclei (Lah et al. 2008) Per la valutazione si ricorre spesso all'utilizzo di piante sia per il loro ruolo negli ecosistemi, ma anche perché risultano facili da maneggiare, sono sensibili e possiedono cromosomi grandi e facili da analizzare. Alcuni test che vedono l'impiego di piante sono stati validati e standardizzati e tra questi il test dei micronuclei con *Vicia faba* (Kanaya et al., 1994; Ma, 1982).

La valutazione dell'attività mutagena è condotta utilizzando il test dei Micronuclei in *Vicia faba* var. minor, secondo opportuno protocollo. I micronuclei sono corpuscoli Feulgen-positivi che originano da

frammentazione di uno o più cromosomi e/o da anomala segregazione di tali frammenti o di un intero cromosoma durante la mitosi, i quali tendono a migrare indipendentemente dal resto dei cromosomi e danno luogo a corpuscoli extranucleari, osservabili al microscopio ottico mediante ingrandimento 40X.

Tale metodica è in grado di rilevare danni al DNA cromosomico, quali un non corretto svolgimento del processo mitotico, indotto dalla presenza di sostanze mutagene nel campione da esaminare. Stima, quindi, la presenza di anomalie del materiale genetico che possono essere ereditate e possono portare ad effetti a lungo termine.

L'effetto genotossico è calcolato come frequenza percentuale di cellule micronucleate sul totale delle cellule osservate (% MNC); tale frequenza è poi confrontata con quella riscontrata nel controllo negativo.

2. ATTIVITA' DI CAMPIONAMENTO

A seguito di una serie di sopralluoghi effettuati nella zona di San Severino Lucano e nelle aree limitrofe dell'alta valle del torrente Frido, e sulla base di quanto emerso dalle attività di studio condotte nella medesima aree nel corso di progetti di ricerca pregressi, è stato individuato un sito pilota ricadente in prossimità dell'abitato, caratterizzato dalla presenza di orticole impostate su terreni serpentinitici ed irrigate con acque sorgive ricche in cromo (fig.1).



Fig.1 – Sito pilota nei pressi di San Severino Lucano.

In tale sito, ritenuto particolarmente idoneo alle attività di studio e ricerca previste nell'ambito del presente progetto, sono stati realizzati due profili pedologici (S1 e S2, fig.2), in corrispondenza di ciascuno dei quali si è provveduto al prelievo di tre campioni di suolo a differenti profondità (5cm; 30 cm; 60 cm).



Fig.2 – Profilo pedologico.

Sullo stesso sito si è, inoltre, proceduto al campionamento delle acque sorgive utilizzate per irrigare i campi della zona, e alla raccolta di alcuni campioni vegetali (prodotti orticoli) in diversi periodi dell'anno, compatibilmente con la stagionalità degli stessi.

In particolare, gli ortaggi campionati sono i seguenti: broccoletto (infiorescenza e foglia), cipolla, patata, sedano (costa e foglia), rucola, rapa (cima e foglia), cavolfiore (infiorescenza e foglia), finocchio (grumolo e fusto), bietola (gambo e foglia), barbabietola (radice e foglia), lattuga (parte esterna e parte centrale), fragola, asparago, peperone, pomodoro, melanzana, cetriolo. Per ogni ortaggio sono stati effettuati due campionamenti, per un totale di n.50 campioni prelevati e analizzati.

Per i test di fitotossicità e genotossicità si è proceduto al campionamento di tre ulteriori campioni di suolo, così distribuiti:

Suolo 1 = suolo serpentinitico coltivato campionato nel sito pilota di San Severino Lucano

Suolo 2 = suolo serpentinitico incolto campionato nel sito pilota di San Severino Lucano

Suolo 3 = suolo non serpentinitico campionato esternamente al sito pilota, lungo la strada di collegamento San Severino Lucano – Colle dell'Impiso.

Si è, infine, proceduto al campionamento delle acque di n.12 sorgenti distribuite in sinistra orografica del fiume Sinni e nella Valle del Serrapotamo, tra i comuni di Calvera (Vallina 1 e 2 e San Nicola), Carbone (Mazzarella, Laccata 1 e 2, Castagni e Santo Iorio), Fardella (Spilia e Manche) e Teana (Valloni e Celemite). La scelta delle sorgenti è stata effettuata considerando la distribuzione dei conglomerati pleistocenici oggetto di studio e privilegiando, a parità di portata, quelle utilizzate da Acquedotto Lucano ad uso

potabile. Il campionamento è stato effettuato in occasione di due diverse campagne, a settembre 2014 ed aprile 2015, rappresentative rispettivamente della magra e della piena idrogeologica. Contestualmente al campionamento, sono stati anche determinati i parametri fisico-chimici in situ (pH, T e C.E.) mediante sonda multiparametrica.

3. ATTIVITA' SPERIMENTALI

3.1 MATRICE SUOLO

I sei campioni di suolo (tre per ogni profilo pedologico) sono stati sottoposti ad una caratterizzazione composizionale completa, comprensiva di analisi granulometrica, chimica e mineralogica, di seguito descritta.

3.1.1. Granulometria

L'analisi granulometrica, effettuata con il metodo della setacciatura in umido e della sedimentazione frazionata (Summa, 2000), ha consentito la determinazione delle percentuali in peso delle diverse frazioni granulometriche che compongono i terreni campionati. Prima di procedere alla separazione granulometrica, i campioni, prelevati e conservati in sacchetti ermetici, sono stati disgregati con un'azione meccanica molto blanda, essiccati a temperatura ambiente e sottoposti all'operazione di quartatura, che ha consentito di prelevare un piccolo quantitativo rappresentativo dell'intero campione.

Per ogni campione sono stati pesati circa 20g, successivamente posti in beaker in 40ml di acqua distillata, e la soluzione così ottenuta è stata posta in agitazione meccanica per circa 10 ore, per favorire la disgregazione di tutte le particelle.

La setacciatura in umido è stata utilizzata per la separazione delle frazioni granulometriche di diametro $>63\mu\text{m}$. In particolare, mediante l'utilizzo di setacci della serie ASTM, impilati gli uni sugli altri con maglie dall'apertura decrescente dall'alto verso il basso, sono state recuperate le seguenti frazioni granulometriche: $>2\text{mm}$; $2-1\text{mm}$; $1-0,5\text{mm}$; $0,5-0,25\text{mm}$; $250-125\mu\text{m}$; $125-63\mu\text{m}$.

La sedimentazione frazionata è stata utilizzata per separare le particelle di diametro minore di $63\mu\text{m}$ nelle seguenti frazioni: $63-32\mu\text{m}$; $32-16\mu\text{m}$; $16-8\mu\text{m}$; $8-4\mu\text{m}$; $4-2\mu\text{m}$ e $<2\mu\text{m}$. L'analisi è interamente basata sull'applicazione della legge di Stokes, che permette di correlare la granulometria del sedimento con i tempi di decantazione del sedimento stesso in una soluzione di acqua distillata alta 10cm, ad una data temperatura ambientale.

Dopo aver lasciato il campione in agitazione per qualche minuto e in decantazione per un tempo prestabilito in base alla legge di Stokes, sono state effettuate le operazioni di sifonamento per eliminare il surnatante dal beaker. L'operazione di agitazione-decantazione-sifonamento è stata ripetuta finché il surnatante non ha assunto una colorazione chiara. Il sedimento depositatosi sul fondo dei beaker è stato posto in capsule di porcellana sotto cappa a temperatura di essiccazione pari a 30-40°C e, una volta essiccato completamente, recuperato e pesato.

I risultati delle analisi granulometriche eseguite sono riportate in allegato alla presente relazione, nelle tabelle 1 e 2.

Come si evince dai risultati riportati nelle suddette tabelle, si tratta di terreni prevalentemente grossolani, in cui prevale la frazione sabbiosa in corrispondenza del livello più superficiale (top soil) e lo scheletro ghiaioso a maggiore profondità. In entrambi i profili si nota una progressiva diminuzione della frazione sabbiosa con la profondità, a vantaggio di quella ghiaiosa, mentre la componente più fine limoso-argillosa risulta costante per tutta la lunghezza dei profili, con una netta predominanza del silt sull'argilla (fig. 3-4).

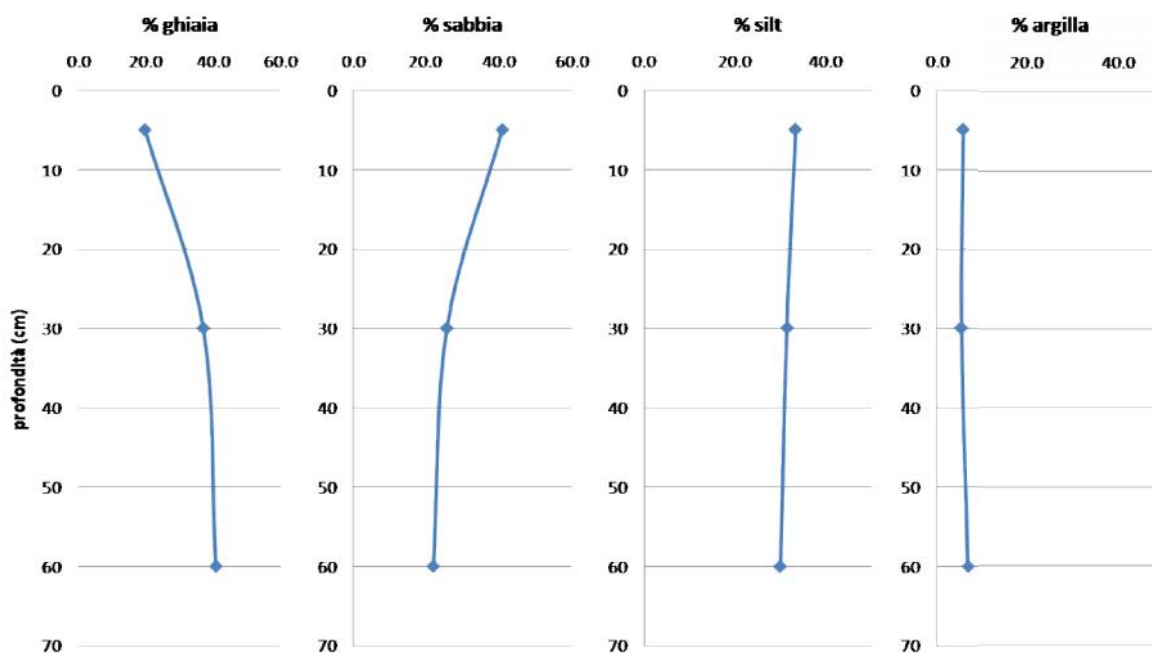


Fig.3 – Composizione granulometrica dei campioni prelevati dal profilo pedologico S1.

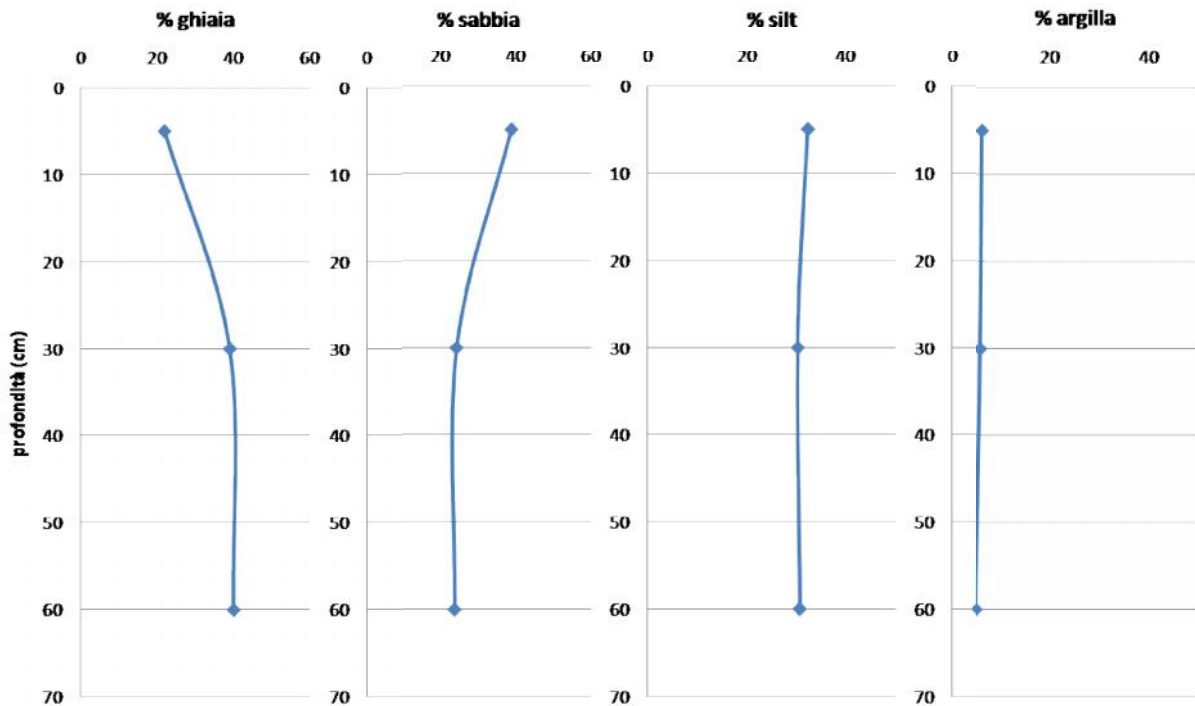


Fig.4 – Composizione granulometrica dei campioni prelevati dal profilo pedologico S2.

Sulla base dei criteri USDA, il suolo oggetto di studio può essere classificato come franco, tendente al franco-limoso all'aumentare della profondità (fig.5).

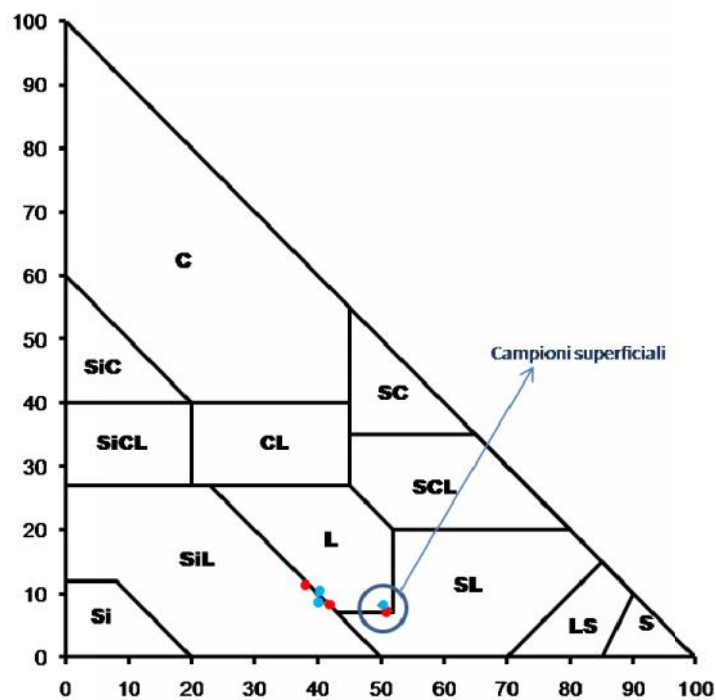


Fig.5 – Classificazione dei suoli sul triangolo tessiturale USDA. In rosso i campioni del profilo pedologico S1 e in azzurro quelli del profilo S2.

3.1.2. Mineralogia

Sugli stessi campioni è stata effettuata un'analisi mineralogica qualitativa e semi-quantitativa comprensiva della determinazione dei minerali argillosi.

Le analisi sono state effettuate con il diffrattometro Rigaku D/MAX-2200/PC in dotazione del Laboratorio di Geologia Medica e Ambientale del CNR-IMAA, con configurazione "theta-theta", corredato di monocromatore a cristallo curvo di grafite con le seguenti condizioni strumentali:

-Velocità di scansione: 3sec/step;

-Step -size: 0.02' 2θ

-Spiller: 60 giri/min;

-Tensione: 40 kW;

-Corrente: 30 mA;

-Radiazione Cu α .

La caratterizzazione mineralogica ha interessato sia i campioni tal quale che la *clay fraction*.

Prima di essere irradiati, i campioni sono stati sottoposti a diversi trattamenti di natura fisica e chimica quali essiccamento, frantumazione, quartatura e polverizzazione per i campioni totali, e saturazione con cationi bivalenti, glicolazione e riscaldamento per la frazione < 2 μ m.

Dopo una prima fase di essiccamento sotto cappa ad una temperatura di 30-40°C per alcuni giorni (Cavalcante e Belviso, 2005), i campioni sono stati disgregati con mortaio e pestello in agata con una blanda azione meccanica. Successivamente, per ottenere un'aliquota rappresentativa del campione originario, è stata eseguita l'operazione di quartatura, e circa 50g di campione sono stati polverizzati utilizzando una giara di agata dotata di dischi concentrici in un polverizzatore meccanico Retsch per circa 7 minuti, fino a raggiungere la dimensione granulometrica ottimale di 44 μ m.

Le polveri così ottenute sono state utilizzate per i preparati *random*, con il metodo delle caricate laterali (Srodon e Clauer, 2001; Cavalcante e Belviso, 2005), per mantenere una orientazione del campione quanto più casuale possibile.

Le analisi diffrattometriche sulle polveri <2 μ m sono state effettuate su preparati orientati mediante il metodo della sedimentazione di una sospensione su supporto di vetro. Il metodo prevede che una certa quantità di campione, ottenuto mediante sedimentazione frazionata, venga dispersa in acqua distillata, per poi depositare 1ml della soluzione così ottenuta su un supporto di vetro (fig. 7b), con una concentrazione pari a 5mg/cm² (Lezzerini et al., 1995).

A tal fine, i campioni sono stati sottoposti a diversi trattamenti chimici, quali saturazione con cloruro di magnesio ($MgCl_2$), glicolazione per 8 ore, a temperatura di 60°C, e riscaldamento in muffola a 375°C (Schultz, 1964; Cavalcante et al., 2007).

Ottenuti i diffrattogrammi, si è proceduto, con l'utilizzo del programma di calcolo Winfit, all'identificazione dei diversi minerali e alla misura delle aree dei riflessi più intensi (ad eccezione del quarzo, per cui è stato utilizzato il secondo riflesso per intensità).

Sul campione totale, indifferentemente dalla profondità, le principali fasi mineralogiche individuate sono le seguenti: serpentino, anfibolo, spinello, olivina, clorite, pirosseno, quarzo, brucite, ossidi e idrossidi di ferro (ematite e magnetite) e manganese. Nella frazione $<2 \mu m$, indifferentemente dalla profondità del campione, prevale nettamente il serpentino, seguito da clorite e illite, con minime quantità di interstratificati clorite-smectite.

I caratteri mineralogici dei suoli, riassunti schematicamente nelle tabella 3 e 4 in allegato alla presente relazione, non presentano differenze significative tra i due profili pedologici considerati.

3.1.3. Chimismo

Un'aliquota di ogni campione di suolo è stata macinata finemente fino a passare completamente al vaglio di 0,2mm. Per la determinazione dei metalli si è solubilizzato integralmente, a caldo, 0.5 g di materiale impiegando una miscela di 3.8 ml di acido nitrico e 5 ml fluoridrico.

Il cromo esavalente è stato estratto a caldo selettivamente con una soluzione alcalina contenente una miscela di carbonato e idrossido di sodio rispettivamente 0,28 M e 0,5 M (3 e 2 % p/v) che, durante almeno un'ora di agitazione a caldo, estrae selettivamente le forme solubili, insolubili e adsorbite di cromo esavalente presenti.

La possibilità che il cromo trivalente, presente nel campione in quantità nettamente superiore alla forma esavalente, potesse convertirsi per ossidazione in quest'ultima forma, e' stata evitata mediante aggiunta di cloruro di magnesio e tampone fosfato alla soluzione alcalina. La sospensione alcalina e' stata, infine, filtrata e, sul filtrato, si è determinato il cromo esavalente.

In entrambi i casi, le soluzioni ottenute sono state analizzate mediante uno Spettrometro di Massa Accoppiato al Plasma Induttivo (ICP-MS) modello DRCE PerkinElmer.

Per il carbonio organico/sostanza organica, azoto totale e fosforo assimilabile sono stati adoperati i metodi descritti nel Decreto Ministeriale del 13/09/1999, Approvazione dei "Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo". Allo stesso decreto si è fatto riferimento per la determinazione del pH dei suoli.

I risultati delle analisi chimiche eseguite sui sei campioni di terreno prelevati in corrispondenza dei profili pedologici S1 e S2 sono riportati in allegato alla presente relazione nelle tabelle 5 e 6.

Si osserva come i tenori di cromo e nickel nei campioni prelevati siano molto alti, superiori di due ordini di grandezza rispetto alle concentrazioni medie della crosta continentale superiore e confrontabili alle concentrazioni di elementi maggiori. Questo fa in modo che tali quantità superino abbondantemente le concentrazioni soglia di contaminazione (CSC) fissate dalla vigente normativa (D.Lgs. 152/2006), sia per i siti destinati a verde pubblico, privato e residenziale (CSC(Cr) = 150 mg/kg; CSC(Ni) = 120 mg/kg), sia per quelli ad uso commerciale ed industriale (CSC(Cr) = 800 mg/kg; CSC(Ni) = 500 mg/kg). Tuttavia, coerentemente con quanto riportato in letteratura scientifica per suoli analoghi, e sulla base di quanto già riscontrato nel corso dei progetti di ricerca pregressi condotti nell'area del Pollino, tale contaminazione non è da attribuire a cause antropiche, bensì alla composizione delle rocce madri serpentinitiche, caratterizzate dalla presenza di fasi minerali ricche in cromo e nickel (serpentino, magnetite, spinello, pirosseno, minerali argillosi derivanti dai processi pedogenetici a carico della roccia madre). Il cromo presente nei suoli è costituito quasi esclusivamente da cromo trivalente.

La sostanza organica, sia come percentuale totale che in termini di C org e N tot., è maggiore in superficie e tende a diminuire nei campioni prelevati a maggiore profondità. Lo stesso trend si osserva anche per il fosforo assimilabile

Tutti i campioni presentano valori di pH compresi tra 6.8 e 6.9, il che consente di classificarli come suoli neutri.

Sugli stessi campioni sono state eseguite analisi finalizzate alla determinazione della disponibilità dei metalli all'assorbimento radicale delle piante, valutata convenzionalmente sulla base dell'efficacia di specifiche soluzioni estraenti a rimuovere i metalli dai siti di legame dei colloidi inorganici e organici (Peijnenburg, 2002). Il metodo utilizzato ha previsto l'estrazione dei metalli con una soluzione di acido dietilentriamminopentacetico (DTPA), calcio cloruro e trietanolammina a pH 7,3. La procedura è quella proposta da Lindsay e Norwell (1969).

I risultati delle analisi sono riportati in allegato alla presente relazione, in tabella 7 e 8.

Su un'ulteriore aliquota degli stessi campioni sono state effettuate estrazioni sequenziali secondo la procedura indicata nel protocollo BCR (Community Bureau of Reference) come idonea alla speciazione dei metalli presenti in sedimenti e suoli (Tessier et al., 1979; Hlavay et al., 2004). Tale procedura si basa su una

estrazione sequenziale selettiva multi-steps che consente di distinguere, per alcuni metalli pesanti, la frazione scambiabile e legata ai carbonati, la frazione legata agli ossidi ed idrossidi facilmente riducibili e quella legata alla sostanza organica, utilizzando diversi reagenti chimici. I costituenti dei minerali silicatici e di altre fasi accessorie non disgregabili con i reagenti, e non disponibili per la matrice biologica, vengono dedotti dall'analisi dei residui completamente digeriti con attacco acido.

I risultati delle analisi chimiche effettuate sui diversi estratti, ognuno rappresentativo delle diverse frazioni sopra citate, sono riportati in allegato alla presente relazione, in tabella 9.

3.2. MATRICE ACQUA E MODELLI SPERIMENTALI DI INTERAZIONE ACQUA-ROCCIA

L'elenco delle acque sorgive campionate ed analizzate, con riferimento sia alle acque di irrigazione in corrispondenza del sito sperimentale sia alle sorgenti del bacino del torrente Serrapotamo e della sinistra orografica del fiume Sinni, viene di seguito riportato.

Denominazione	Comune
Spilia	Fardella
Manche	Fardella
Valloni	Teana
Celemite	Teana
Vallina 1	Calvera
Vallina 2	Calvera
San Nicola	Calvera
Mazzarella	Carbone
Laccata 1	Carbone
Laccata 2	Carbone
Castagni	Carbone
Santo Iorio	Carbone
Acqua irrigazione orto	San Severino Lucano
Acqua irrigazione orto, filtrata	San Severino Lucano

Nell'allegato analitico alla presente relazione, in tabella 10 e 11, per i due diversi campionamenti, vengono riportati i parametri fisico-chimici misurati in situ contestualmente alle operazioni di campionamento. I risultati delle analisi chimiche sono, invece, riportate in tabella 12 e 13.

Un'aliquota dei campioni di suolo prelevati in corrispondenza dei due profili pedologici realizzati nel sito pilota è stata utilizzata per la predisposizione di n. 24 modelli sperimentali secondo lo schema indicato in figura 6. Tale schema, rappresentativo dei campioni prelevati nel profilo S1, è ovviamente valido anche per il profilo S2. In particolare, per ciascun campione, sono state utilizzate quattro aliquote da 200g ciascuna, di cui due mantenute *tal quale* ed altre due trattate con l'aggiunta di 1g di NH_4NO_3 per ognuna, a simulare le operazioni di concimazione in situ.

Le due aliquote tal quale sono state poi allocate in appositi contenitori e mescolate con 200cc di acqua distillata e acqua sorgiva. Lo stesso è stato fatto per le due aliquote trattate con NH_4NO_3 , ottenendo quindi per ogni campione 4 modelli sperimentali. Considerando tre campioni per ogni profilo pedologico, si è, quindi, giunti a 12 modelli sperimentali per ogni profilo e a 24 modelli complessivi (fig.6).

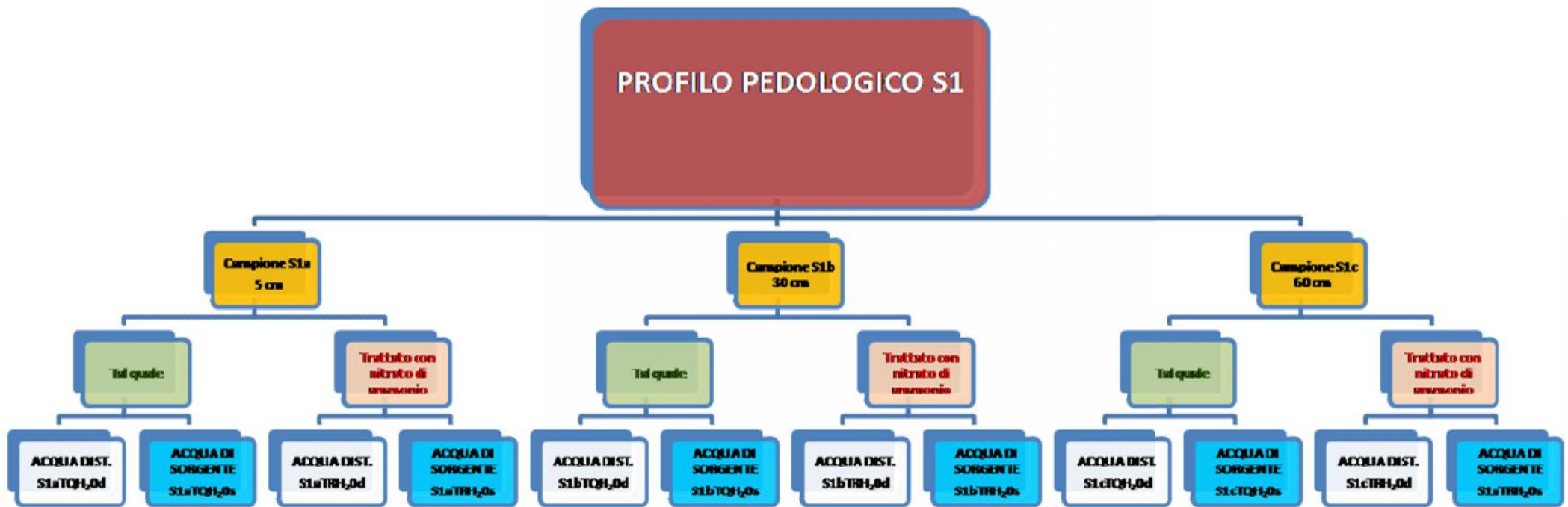


Fig. 6 – Diagramma di flusso illustrante le diverse fasi della procedura di predisposizione in laboratorio dei modelli sperimentali.

La durata complessiva della sperimentazione è stata di sette mesi, al termine dei quali si è proceduto alle seguenti operazioni di pre-trattamento ed analisi:

- Separazione solido-liquido mediante siringatura, centrifugazione ed essiccamento.
- Analisi mineralogica sui 24 campioni solidi, con le medesime metodologie e tecniche precedentemente descritte (tabella 14 in allegato).
- Determinazione di azoto totale, pH, fosforo assimilabile, con le medesime metodologie e tecniche precedentemente descritte (tabella 15 in allegato).
- Estrazioni mediante DTPA. Secondo la procedura precedentemente descritta (tabella 16 in allegato).
- Estrazioni sequenziali multi-step secondo il protocollo BCR-701, così come precedentemente descritto (tabella 17 in allegato).
- Analisi chimica completa sui 24 campioni solidi, secondo la procedura precedentemente descritta (tabella 15 in allegato).
- Analisi chimica completa sui 24 campioni acquosi, ovvero sulle soluzioni che hanno interagito per sette mesi con i rispettivi suoli (tabella 18 in allegato).

3.3. MATRICE BIOLOGICA

3.3.1. Analisi chimiche sui prodotti orticoli

Utilizzando la tecnica analitica della spettrometria di massa, su tutti i campioni vegetali è stato effettuato il dosaggio dei seguenti metalli pesanti: cadmio, cromo, rame, nickel, piombo e zinco, con la determinazione del cromo esavalente. Le metodiche utilizzate sono le stesse di quelle descritte per i suoli, con la sola differenza che il metodo per il dosaggio dei metalli è stato adattato alle necessità strumentali ed alla minore concentrazione di metalli, impiegando un cocktail formato da 8 ml di acido nitrico, 1,5 ml di acqua ossigenata e 0,5 ml di acido fluoridrico per 0,5 g di campione essiccato, oppure 2-3 g di prodotto fresco. I risultati sono riferiti a quello essiccato.

I risultati di tali analisi, riportate in tabella 18, mostrano come il metallo più abbondante sia mediamente lo zinco, con quantità particolarmente elevate nell'asparago (105.4 mg/kg). Il rame risulta invece particolarmente abbondante nella lattuga (72.8 mg/kg). Cadmio e piombo sono i metalli presenti in

quantità più basse. I campioni su cui sono state rilevate le quantità maggiori sono quelli di lattuga (sia cadmio che piombo) e rucola (cadmio).

Per quanto riguarda il cromo, gli ortaggi che ne presentano le maggiori quantità sono finocchio (25.05 mg/kg), cetriolo (13.3 mg/kg) e peperone (12.5 mg/kg). La fragola, invece, ne risulta del tutto priva. Il cromo è presente prevalentemente nella sua forma trivalente, dal momento che il dosaggio del cromo esavalente ha indicato per tutti gli ortaggi analizzati concentrazioni inferiori al limite di rilevabilità strumentale. Il finocchio risulta anche l'ortaggio più ricco in nickel (26.28 mg/kg).

3.3.2. Prove in vivo su *vicia faba*

La sperimentazione riguardante i test di fito e genotossicità ha avuto inizio il 26/09/2014.

I test hanno previsto l'allestimento di vaschette di alluminio contenenti ciascuna un'aliquota di uno dei suoli campionati (250 gr), sulla quale sono stati lasciati germinare 25 semi di *Vicia faba*. Per ciascuna tipologia di suolo campionato sono state allestite due tesi, una delle quali ha previsto che i semi fossero irrigati con 50 ml acqua locale, e l'altra che fossero irrigati con 50 ml di acqua distillata. Allo stesso modo, sono state allestite altre 2 tesi che prevedevano però l'utilizzo di sabbia di quarzo inerte, anziché suolo. In totale, quindi, sono state allestite otto tesi differenti (fig. 7). Ogni prova è stata effettuata in triplo.

	Acqua locale	Acqua distillata
Sabbia	Sabbia + Acqua locale	Sabbia + Acqua distillata
Suolo 1	Suolo 1 + Acqua locale	Suolo 1 + Acqua distillata
Suolo 2	Suolo 2 + Acqua locale	Suolo 2 + Acqua distillata
Suolo 3	Suolo 3 + Acqua locale	Suolo 3 + Acqua distillata

Fig. 7 - Schema delle tesi proposte.

Le vaschette sono state quindi coperte da parafilm forato e i semi lasciati germinare per 5 giorni a temperatura e umidità controllate ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$).

Il quinto giorno d'incubazione i semi sono stati prelevati per eseguire i test di fitotossicità ed il test di genotossicità (test del micronucleo).

Per la valutazione della fitotossicità sono state misurate le lunghezze delle radici primarie e presa nota del numero di semi germinati per il calcolo della **percentuale di germinazione** (Correa et al, 2000):

(numero dei semi germinati/numero dei semi totali utilizzati per il test)*100

È stata effettuata anche la stima **dell'indice di germinazione %**, che prende in considerazione, oltre all'allungamento della radice primaria, anche il numero dei semi germinati:

$$\frac{(\text{media lunghezza radice primaria campione}) * \text{numero semi germinati campione}}{(\text{media lunghezza radice primaria controllo}) * \text{numero semi germinati controllo}} * 100$$

Questo valore si è dimostrato essere un parametro molto sensibile nel rilevare la tossicità di un potenziale tossico, in quanto riesce a rilevare sia i bassi livelli di tossicità, che colpiscono soprattutto la crescita radicale, sia la tossicità più elevata, che colpisce in particolar modo la germinazione dei semi (Zucconi et al., 1981).

Per il test dei micronuclei è stato utilizzato come riferimento il protocollo di (De Marco et al., 1990).

Gli apici radicali sono stati recisi e conservati in una soluzione di acido acetico-etanolo (1:3) a 4 °C.

Il giorno successivo gli apici radicali sono stati idrolizzati con acido cloridrico (37%) 1N per 8 minuti a 60 °C. Successivamente, alle radici è stato aggiunto il reattivo di Schiff, un colorante costituito da fucsina basica solforata che colora il DNA. In seguito, la parte dell'apice contenente il meristema è stata recisa con una lama sterile, posti su dei vetrini e coperti dal vetrino coprioggetto, per essere schiacciati fino ad ottenere un monostrato cellulare. La conta delle cellule micronucleate è stata effettuata al microscopio ottico con ingrandimento 40x. Sono state osservate almeno 15000 cellule per ogni campione (15 apici radicali per campione, 1000 cellule per apice).

I risultati sono stati espressi come **frequenza % di micronuclei**:

$$(\text{numero delle cellule micronucleate} / \text{numero totale delle cellule}) * 100$$

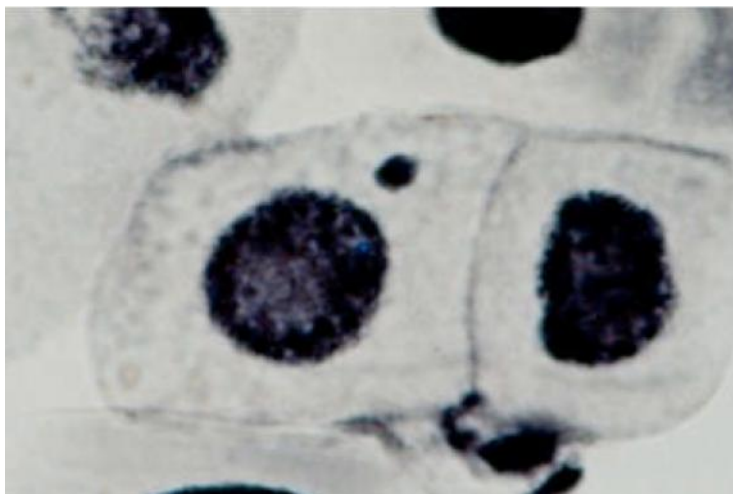


Fig.8 - Cellula micronucleata dell'apice radicale di *V. faba*.

Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi statistica utilizzando il Pacchetto software SPSS. L'eterogeneità dei risultati tra le differenti tesi sperimentali è valutata attraverso l'analisi della Varianza a due vie (ANOVA) con un livello di significatività pari al 95% ($p < 0.05$) seguito da test di Dunnett.

3.3.2.1 Fitotossicità

Da un primo dato ottenuto, si osserva che per ciascuna tipologia di suolo e per la sabbia di quarzo il numero dei semi germinati è statisticamente simile tra la tesi irrigata con acqua contenete Cr esavalente e quella irrigata con acqua distillata (fig. 9).

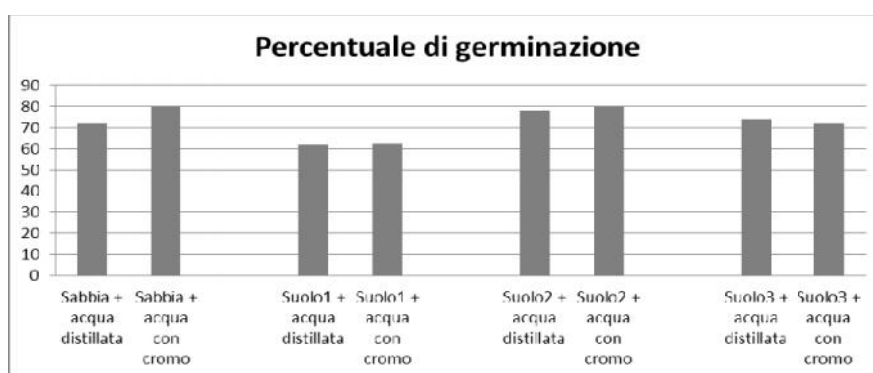


Fig.9 - Percentuale di germinazione

Osservando i dati ottenuti soltanto dalle due tesi "Sabbia", concentriamo l'attenzione sul potenziale effetto fitotossico dell'acqua contaminata, al netto dell'influenza dei suoli. Dalla Figura 2 (test di fitotossicità e indice di germinazione) si osserva che non c'è nessuna differenza significativa tra i risultati ottenuti dai campioni irrigati con acqua distillata e quelli ottenuti dai campioni irrigati con acqua contaminata. Ciò sta a dimostrare che, su un substrato inerte quale la sabbia di quarzo, la potenziale fitotossicità del cromo contenuto dell'acqua locale campionata non è sufficiente per manifestarsi in *Vicia faba* (fig. 10).

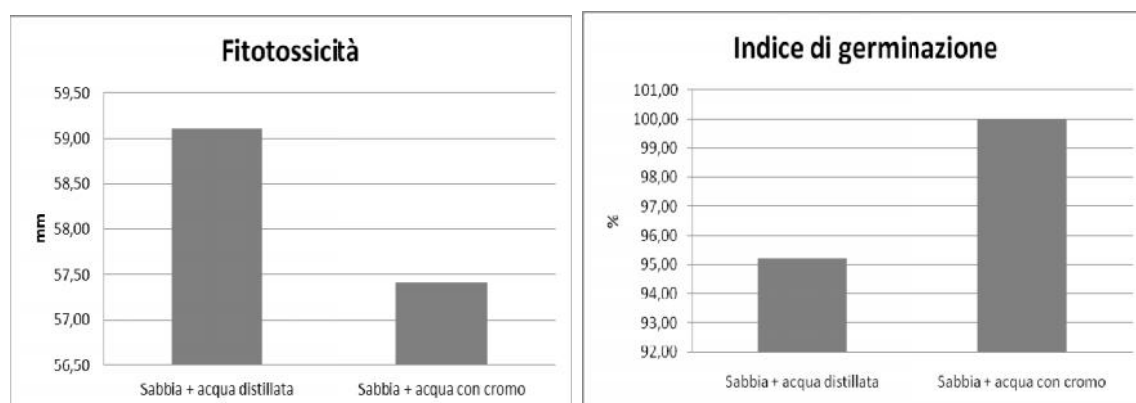


Fig. 10 - Grafici di fitotossicità e dell'indice di germinazione ottenuti dai semi cresciuti in sabbia ed irrigati con acqua distillata e acqua campionata contenente cromo. Il colore nero sta a significare che il campione in questione è stato utilizzato come controllo nel calcolo degli indici e nell'esame statistico.

Allo stesso tempo, osservando il parametro della fitotossicità e l'indice di germinazione delle tesi "Suolo 1", "Suolo2" in confronto alle due tesi "Sabbia" utilizzate come controllo negativo (fig. 11), concentriamo l'attenzione sui possibili effetti causati dal cromo contenuto in un suolo serpentinitico. Non soltanto non si osservano effetti fitotossici nei semi cresciuti nei suoli, ma contrariamente appare un significativo aumento del numero di semi germinati e della lunghezza media della radice primaria. Probabilmente l'effetto che ha portato all'incremento di questi valori è imputabile alla stessa natura fertile di un suolo, rispetto ad una sabbia che è inerte e priva di micro e macronutrienti. Questa supposizione è confermata dal fatto che lo stesso effetto si riscontra anche nella tesi "Suolo3", che si tratta di un suolo privo di serpentinite e quindi presumibilmente povera in cromo. Anche in questo caso ciò sta a dimostrare che il potenziale fitotossico del cromo contenuto in suoli serpentinitici sembra non essere sufficientemente alto da manifestarsi in *Vicia faba*.

Tuttavia, osservando sempre la figura 11, si nota che l'indice di germinazione ottenuto nella tesi "Suolo 1" non è aumentato significativamente rispetto a quello ottenuto dalla tesi "Sabbia". Il Suolo 1 ricordiamo essere un suolo serpentinitico adibito ad uso agricolo. È possibile che la perdita di questo effetto rispetto ai campioni "Suolo 2" e "Suolo 3" sia legata allo sfruttamento prolungato delle risorse che generalmente si riscontra in un terreno agricolo.

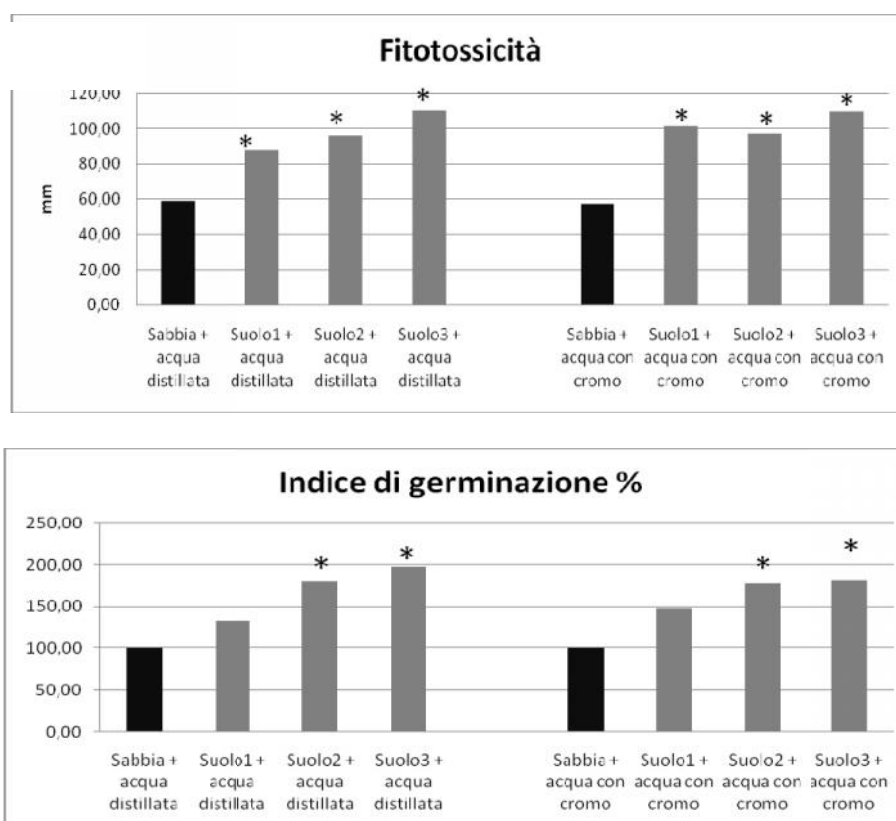


Fig. 11 - Grafici di fitotossicità e dell'indice di germinazione ottenuto dai semi cresciuti sui suoli ed in sabbia ed irrigati con acqua distillata e acqua campionata contenente cromo. Il colore nero sta a significare che il campione in questione è stato utilizzato come controllo nel calcolo degli indici e nell'esame statistico.

A questo punto l'attenzione si è concentrata sulle diverse tipologie di suolo. Dalla figura 12 si evince che non ci sono particolari differenze significative tra gli effetti fitotossici provocati da diverse tipologie di suolo. Ciò sta a dimostrare che né la natura serpentinitica di un suolo, né il grado di sfruttamento e lavorazione dei suoli agrari, sono in grado di provocare effetti fitotossici evidenti in *Vicia faba*.

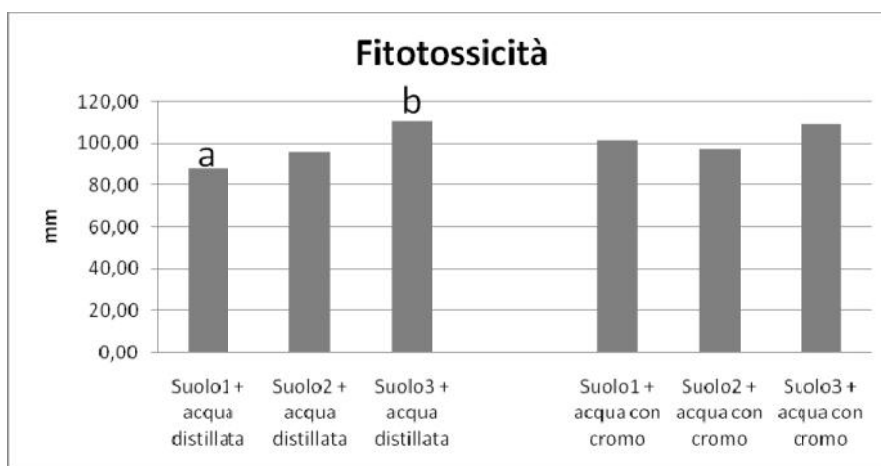


Fig. 12 - Grafici di fitotossicità ottenuto dai semi cresciuti sui suoli campionati irrigati con acqua distillata e acqua campionata contenente cromo. Le lettere a e b stanno ad indicare una differenza statisticamente significativa tra i campioni.

3.3.2.2. Genotossicità

In questo esperimento non è stata riscontrata alcuna differenza significativa nella comparsa dei micronuclei, e quindi nessun danno permanente al DNA, essendo stati rinvenuti con una frequenza prossima allo zero per ogni tesi (fig. 13).

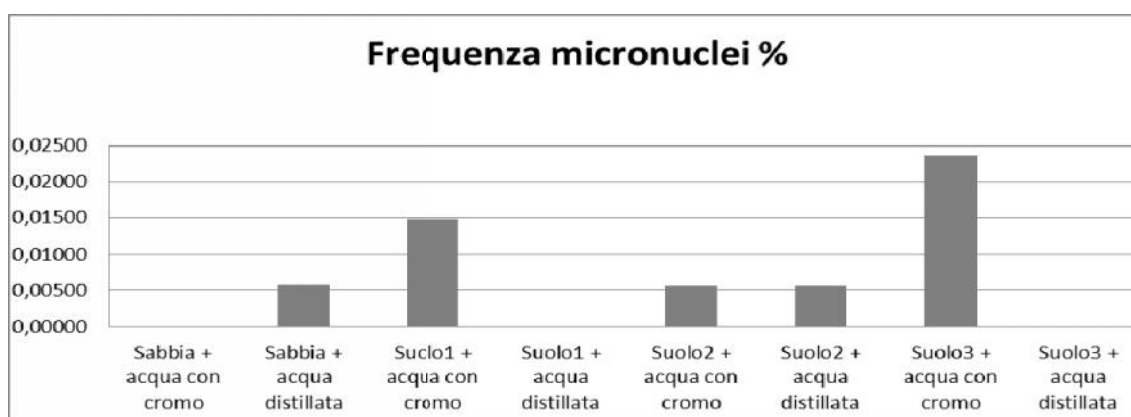


Fig. 13 - Frequenza % dei micronuclei calcolata per ogni tesi.

3.3.3. Prove in vitro su linee cellulari (HepG2)

Studio di nuovi marcatori molecolari di esposizione al Cromo attraverso analisi *in vitro* (linee cellulari): test genotossicità e analisi dei profili di espressione dei microRNA. È stato studiato l'effetto del Cromo su linee cellulari del carcinoma epatico umano HepG2.

Sebbene il cromo è stato oggetto di importanti ricerche tossicologiche, non esiste un adeguato modello *in vitro* per comprendere il meccanismo alla base di effetti citotossici, stress ossidativo, e danno al DNA. Vi è anche una scarsità di dati scientifici relativa alla sua tossicità in sistemi *in vitro* (Patlolla et al., 2009). Pertanto, nell'ambito del progetto è stato intrapreso uno studio al fine di approfondire i meccanismi che sono alla base del danno al DNA e stress ossidativo in cellule HepG2 esposte a cromo esavalente.

Questa proposta sperimentale ha come obiettivo quello di supportare l'idea che il danno al DNA possa essere utilizzato come biomarcatore di esposizione.

Anche l'analisi dei profili di espressione dei micro RNA può dare indicazioni utili al fine di sviluppare indicatori precoci di esposizione a Cromo.

3.3.4. Preparazione e allestimento della prova

Per studiare gli effetti citotossici e genotossici del Cr(VI), in accordo da Patlolla et al. (2009), è stata utilizzata una linea cellulare di carcinoma epatico umano, HepG2 (Sigma Aldrich).

Le cellule appartenenti a questa linea crescono adese in terreno di coltura Dulbecco's Modification of Minimum Essential Medium (DMEM- Sigma Aldrich), complementato con siero fetale bovino (FCS) al 10%, Glutamina 100X e Penicillina/Streptomycin (Sigma Aldrich). Le HepG2 sono cellule che crescono adese al fondo della fiasca fino ad occupare l'intera superficie disponibile: questo stadio si definisce "coltura confluenta". A confluenza la crescita si arresta e le cellule devono essere trasferite in nuove piastre per evitare che vengano favoriti eventuali mutanti capaci di crescere a multistrato. Per il trasferimento è necessario staccare le cellule dal fondo della piastra con una soluzione di acido etilendiamminotetraacetico (EDTA, 200 mg/l) e tripsina (500 mg/l), previo lavaggio con tampone fosfato (PBS), necessario a rimuovere completamente il siero e i cationi bivalenti presenti nel terreno. L'EDTA chela gli ioni calcio e magnesio, indispensabili all'adesione, mentre la tripsina degrada le proteine della matrice che mantengono le cellule aderenti. Una volta ottenuto il distacco delle cellule, l'azione della tripsina e dell'EDTA viene neutralizzata con l'aggiunta di terreno completo che contiene sia un eccesso di ioni calcio che inibitori specifici della tripsina (contenuti nel siero). Le cellule vengono quindi seminate in nuove fiasche e fatte crescere per il tempo necessario. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37°C e in un'atmosfera arricchita di CO₂ al 5%.

Le cellule sono state seminate in numero uguale nei pozzetti delle piastre di coltura allo scopo di procedere alla elaborazione di curve di crescita relative sia alle cellule di controllo che alle cellule trattate.

3.3.5. Esposizione a Cr(VI)

Sono state preparate le soluzioni di terreno con soluzioni di Potassio Cromato (10g/L- Sigma Aldrich) a diverse concentrazioni (2 e 4 μM a 24 e 144h). Data l'elevata mortalità riscontrata dopo l'esposizione alle concentrazioni più elevate e ai tempi di esposizioni più lunghi, si è deciso di abbassare le concentrazioni da testare a 0.5 e 1 μM per 24 h.

Sono state predisposte tre piastre Costar, due per l'estrazione dell'RNA per lo studio dei microRNA e l'altra per l'esecuzione del test della Cometa, seminando, dopo conta con camera di Burker, circa 700.000 cellule. L'esperimento è stato ripetuto tre volte.

Le cellule sono state contate al microscopio, con camera di Burker. Si procede poi al calcolo poi il numero di cellule per mL secondo la formula:

$$\text{n}^\circ \text{cellule contate} : 6 \times 10.000 \times \text{fattore di diluizione}$$

Moltiplicando il numero delle cellule ottenuto per gli mL totali di terreno contenete le cellule raccolte si ottiene il numero di cellule disponibili. Dopo centrifugazione si risospende il pellet di cellule in modo da ottenere la prestabilita quantità di cellule per mL.

3.3.6. Test della Cometa

Trascorso il tempo prestabilito si è proceduto alla conta delle cellule trattate e di controllo. E' stato utilizzato il kit commerciale della Fpg FLARE™ Assay Kit-TREVIGEN. Risultati ottimali sono stati ottenuti con 400-800 cellule per area di campione dei vetrini. Usando 40 μl di una sospensione cellulare di 1.10^5 cellule per ml combinata con 400 μl di LM agarosio si ottiene la corretta concentrazione di agarosio e densità cellulare.

IL protocollo utilizza condizioni alcaline per l'elettroforesi, che evidenziano rotture a singolo e doppio filamento e siti purinici e apurinici. Mentre le condizioni neutre permettono, infatti, la determinazione delle doppie rotture al filamento di DNA (Klaude et al., 1996), le condizioni di media alcalinità (pH> 12,3) permettono di evidenziare le singole rotture (Singh et al.,1988), e condizioni di forte alcalinità (pH>13) rendono evidenti anche i siti alcali liberi (Collins et al., 1997).

Il protocollo del kit è stato seguito senza apportare sostanziali modifiche. L'esperimento è stato ripetuto tre volte.

Parallelamente al test della cometa classico è stato eseguito il test con uno step addizionale utilizzando un'endonucleasi, formamidopirimidine glicosilasi (FPG) fornita nel kit. Tale enzima è isolato da batteri che contengono plasmidi che sovraesprimono tali enzimi.

La FPG riconosce le purine alterate, in particolare il prodotto di ossidazione dell'8-ossiguanina e dell'8-ossiadenina e anche le formamidopirimidine (che sono forme ad anello aperte della guanina e dell'adenina). Rilascia la base dal suo deossiribosio attraverso un attacco nucleofilo al C₁ del deossiribosio. Come altre glicosilasi, può rompere la catena del polinucleotide al 3' o al 5' del deossiribosio attraverso una β/d-eliminazione. L'idrolisi finale permette il rilascio dell'enzima dal deossiribosio sia dopo il primo step sia dopo la rottura della catena di tale zucchero.

Questa metodica complementare permette di identificare oltre a tali specifiche lesioni al DNA anche la cinetica del riparo del DNA. In particolare con l'utilizzo di tale enzima può essere studiata la capacità cellulo-specifica di rimuovere tali rotture. Ne risulta che a stadi precoci si può rilevare un danno maggiore mentre negli stadi più tardivi si può monitorare l'andamento del riparo.

Per quanto riguarda il test condotto utilizzando l'enzima di riparo sono state allestite due prove in triplicato. In ogni prova i campioni sono stati trattati con enzima indiluito (500 U/150 μl), con concentrazione dimezzata dell'enzima (250 U/150 μl) e con Buffer di diluizione senza enzima, come controllo interno per 30 minuti.

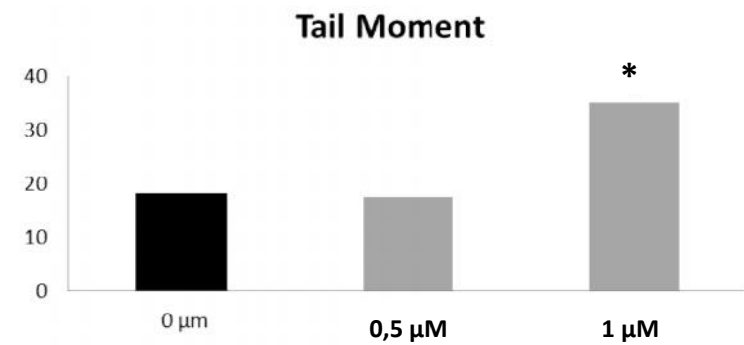
In seguito alla colorazione dei vetrini con Bromuro d'Etidio e alla fissazione con etanolo (70% e 96%) si è proceduto all'analisi dei vetrini con microscopio a fluorescenza. La migrazione del DNA è stata determinata utilizzando un sistema di analisi d'immagini (Komet 5.5). Per ogni cometa sono stati acquisiti diversi parametri: area della cellula, lunghezza della cometa, lunghezza della testa, lunghezza della coda, il momento della coda (lunghezza della coda per percentuale DNA migrato diviso 100), momento della cometa, fluorescenza della cometa, fluorescenza della testa, fluorescenza della coda. Sono utilizzati quali parametri del danno al DNA, la percentuale del DNA migrato (F.T/F tot), il Tail-M e il Comet L. La significatività dei diversi trattamenti rispetto ai controlli è stata valutata attraverso l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) e le medie sono state confrontate utilizzando il test di Dunnett (p<0.05).

In questo studio abbiamo analizzato il potenziale genotossico di Cr (VI) nella linea cellulare HepG2.

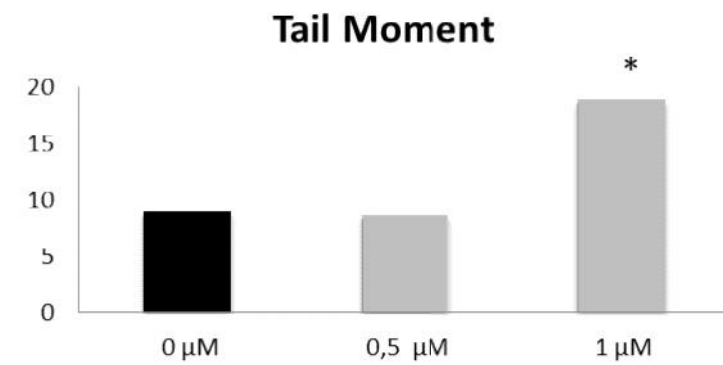
Sono stati effettuate delle prove per individuare delle concentrazioni subletali. I risultati del test della cometa dimostrano che il Cr (VI) induce un effetto citotossico alle concentrazioni più elevate (2 e 4 μM) e al tempo di esposizione più lungo (144 h). In seguito è stato scelto un range di concentrazioni più basso (0.5 e 1 μM) per cui si è evidenziato un danno al DNA significativo solo alla concentrazioni di 1 μM dopo 24h di esposizione.

Per quanto riguarda il test con endonucleasi una sola prova ha fornito risultati valutabili. Risultati significativi si sono ottenuti nei campioni trattati con Cr(VI) alla concentrazione di 1μM dopo incubazione con Fpg 250U/ μl. Ulteriori studi sono necessari per standardizzare la metodica, in particolare risulta necessario individuare i parametri ottimali (tempo di esposizione e concentrazione dell'enzima) per valutare lo stress ossidativo indotto dallo xenobiotico. Infatti l'esposizione di una linea cellulare allo

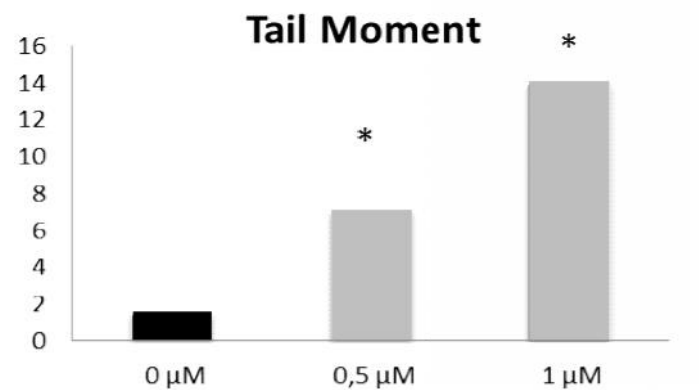
xenobiotico oggetto dello studio deve essere tale che i parametri di danno del test della cometa (% di DNA nella coda o Tail Moment) in assenza di FPG siano significativamente inferiori a quella delle cellule esposte a FPG.



A)



B)



C)

Figura 14 - Test della cometa. A) I prova. B) II prova. C) III prova

3.3.7. Analisi dell'espressione dei microRNA

Estrazione dell'RNA da coltura cellulare

Per l'estrazione dell'RNA totale è stato utilizzato il kit commerciale MiRVana (AMBION™) seguendo la procedura specifica per l'estrazione da cellule aderenti riportata nel protocollo allegato. Il materiale estratto è stato quantificato tramite Nanofotometro UV/Vis (IMPLEMEN).

Megaplex RT

L'RNA estratto è stato in seguito retrotrascritto utilizzando il Taqman Megaplex RT kit (Thermo Fisher Scientific) e i primers relativi ai due pools di microRNA umani (Megaplex™ RT Primers, Human Pool A/Pool B) seguendo il profilo termico indicato nel protocollo allegato al kit.

Preamplificazione

In seguito si procede ad una preamplificazione del cDNA, step necessario quando si ha una concentrazione di RNA totale inferiore a 35 ng, quindi compresa tra 1-35 ng.

E' stato utilizzato la TaqMan® PreAmp Master Mix e i Megaplex™ PreAmp Primers, Human Pool A/Pool B. I campioni infine sono stati diluiti aggiungendo 75 µL di H₂O nucleasi free.

Real time PCR

Per l'amplificazione del cDNA sono state utilizzate le TaqMan® Array Human MicroRNA A/B che contengono 384 TaqMan® MicroRNA Assays che permettono la quantificazione di 377 microRNAs umani. E' stato utilizzato lo strumento della Thermo Fisher Scientific, 7900HT Fast Real-Time PCR System.

I dati relativi all'amplificazione sono stati normalizzati utilizzando il software RQ Manager.

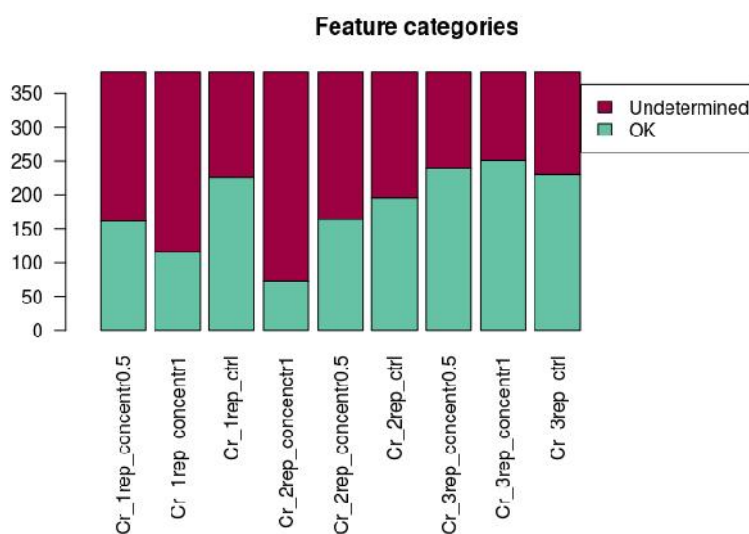


Fig. 15 - Distribuzione della qualità dei dati

Nel grafico 1 si vede, campione per campione, il numero dei microRNA che lo strumento non è riuscito a quantificare. Si evidenzia come la replica 2 è quella con la qualità di dati peggiore. Sono stati scartati quindi tutti quei miRNA con il flag di "undetermined" e tutti quelli con poca variazione tra trattamenti rimanendo con un subset di 97 miRNA da testare statisticamente.

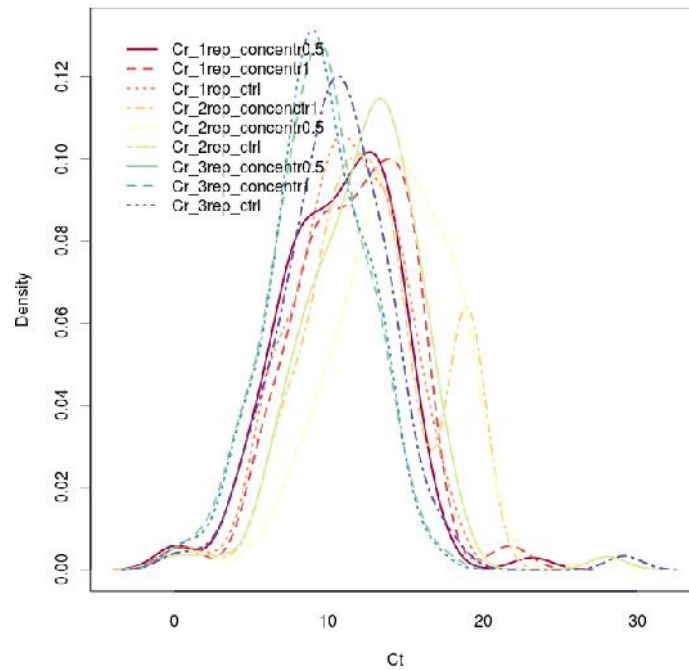


Fig. 16 - Density plot.

Con il density plot vediamo la distribuzione dei Ct nei campioni normalizzati: se le curve fossero state tutte identiche e sovrapposte questo avrebbe voluto dire che il trattamento con il Cr non avrebbe indotto alcun cambiamento di espressione dei microRNA. In realtà le curve hanno un bel movimento quindi dimostrano che si verifica un cambiamento nel profilo di espressione dei microRNA.

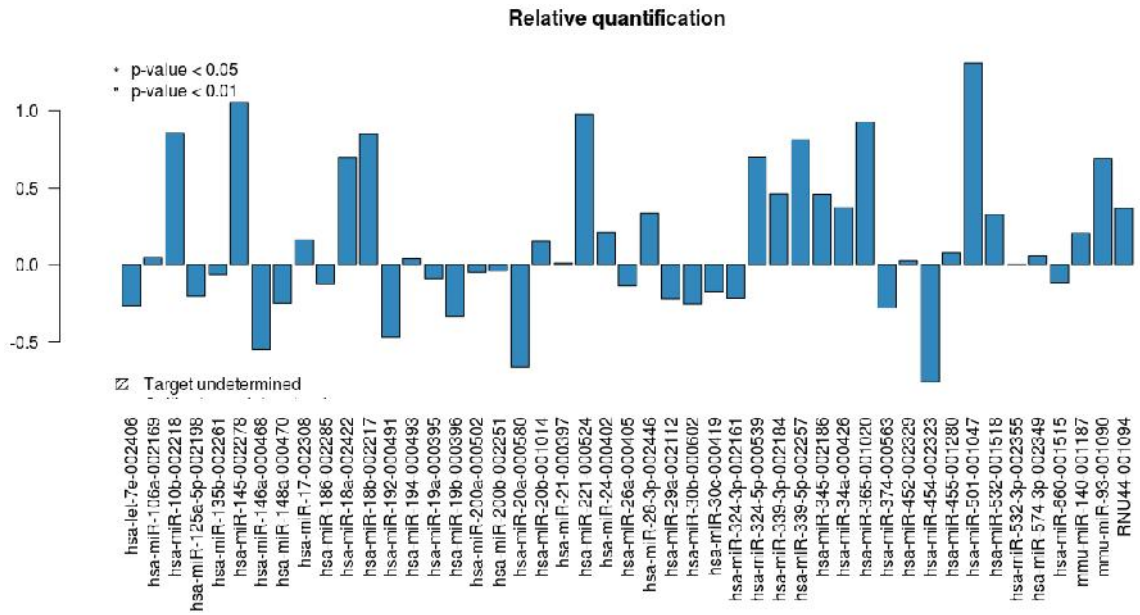


Fig. 17 - Fold change dei cambiamenti di espressione dei microRNA a 0.5 μ M.

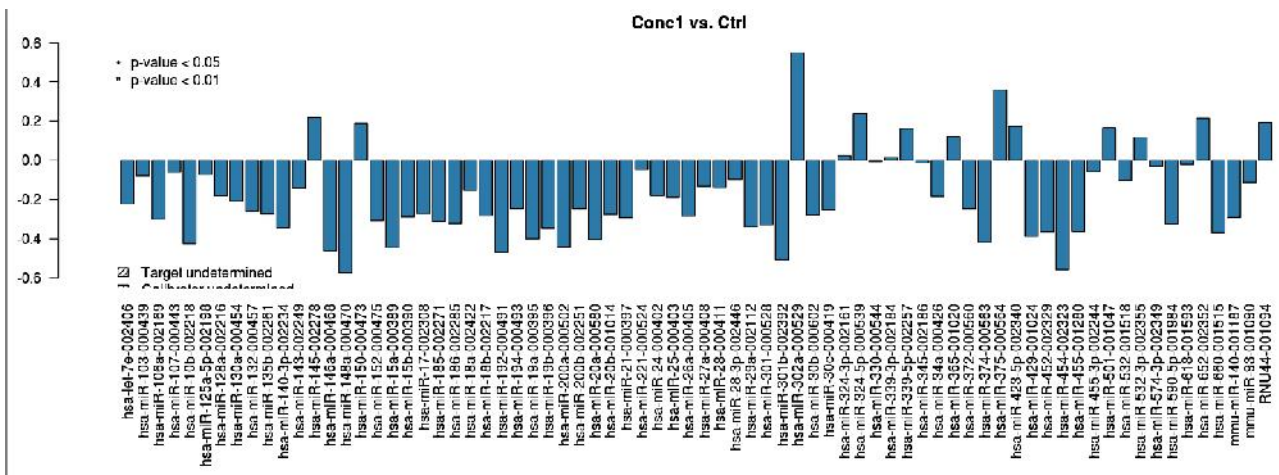


Fig. 18 - Fold change dei cambiamenti di espressione dei microRNA a 1 μ M.

Nei grafici in figura 17 e 18 vengono plottati i fold change dei cambiamenti dei profili di espressione dei MicroRNA in seguito ai diversi trattamenti. Il test ANOVA non ha individuato adjusted p-values statisticamente significativi (sicuramente per via della seconda replica da ripetere). Comunque è chiaro dal plot, mediando i Fold change, che si producono cambiamenti nei profili di espressione dei microRNA in seguito all'esposizione con Cromo esavalente rispetto ai controlli.

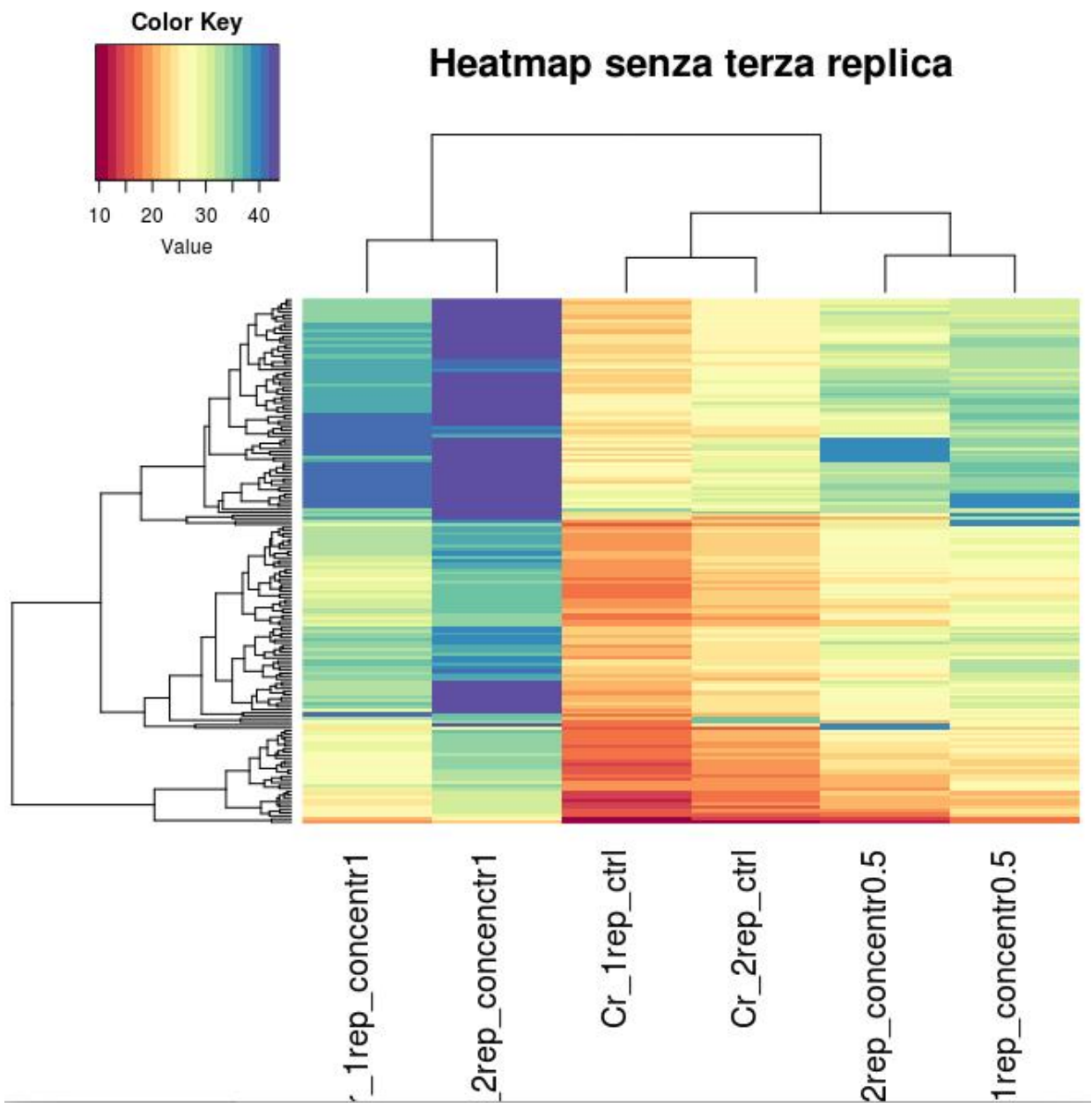


Fig. 19 - Heatmap dei campioni delle prime due repliche.

Nella heatmap in figura 19 è interessante notare come, togliendo la terza replica biologica, in cui sembra che i trattamenti con Cromo non abbiano avuto effetto, i campioni della prima e seconda replica biologica clusterizzano tra loro coerentemente e con effetto dose dipendente. Risulta quindi di interesse ripetere gli esperimenti, secondo opportune modifiche del protocollo, per poter vedere cambiare dei profili dei microRNA in modo statisticamente significativo.

4. MONITORAGGIO BIOLOGICO DELLA POPOLAZIONE RESIDENTE

I questionari sono stati somministrati ai residenti nel comune di San Severino Lucano, equamente distribuiti tra il centro e la frazione di Mezzana. Nei questionari sono stati proposti diversi quesiti finalizzati ad acquisire informazioni circa le abitudini alimentari, la sussistenza di particolari malattie (con particolare attenzione rivolta alla calcolosi), l'esposizione a metalli ed altre abitudini di vita (es. fumo, attuale e/o pregresso).

Ferma restando la necessità di approfondire tale studio, acquisendo una casistica statisticamente più rappresentativa, i primi dati a disposizione hanno comunque consentito di effettuare una serie di considerazioni preliminari utili ad orientare meglio il prosieguo delle attività di studio e ricerca nell'area d'interesse.

Il grafico in figura 20 evidenzia come nell'area pilota sia consuetudine molto diffusa quella di consumare vegetali di origine locale, coltivati in orti della zona. La quasi totalità degli intervistati (35 su 40) ha anche fornito un'indicazione sufficientemente precisa dell'ubicazione degli orti di provenienza dei prodotti consumati (fig. 21), permettendo di evincere una certa predominanza di San Severino Lucano rispetto a Mezzana (63% e 37% rispettivamente). Questo si giustifica alla luce del fatto che alcuni degli intervistati residenti a Mezzana hanno dichiarato di consumare prodotti orticoli provenienti dall'area di San Severino.

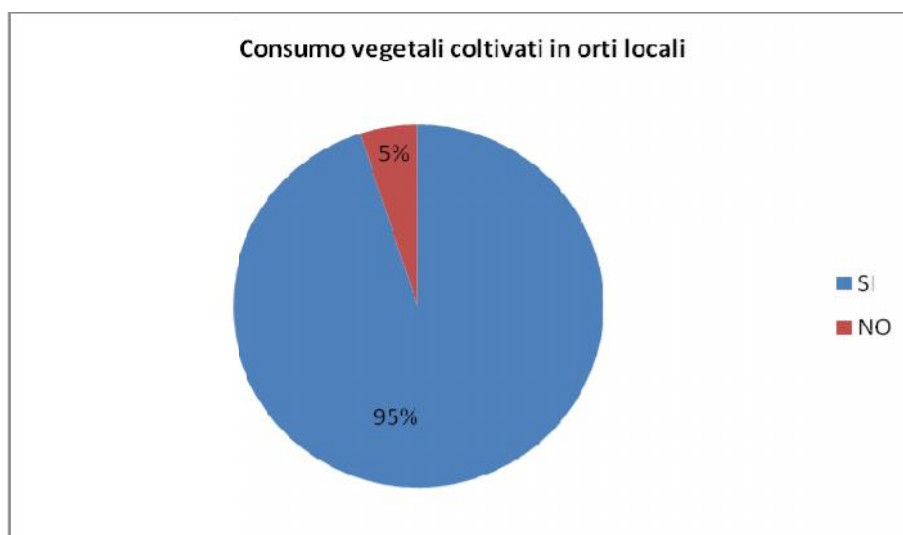


Fig. 20 – Grafico a torta illustrante come una netta maggioranza del campione intervistato abbia dichiarato di consumare alimenti vegetali di origine locale.

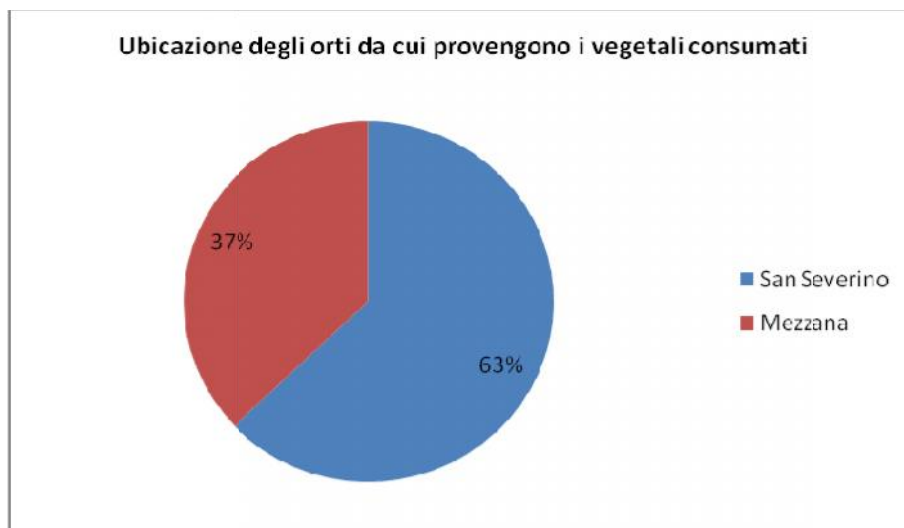


Fig. 21 – Gli alimenti vegetali consumati dal campione intervistato provengono prevalentemente da orti ubicati in prossimità di San Severino Lucano.

Il grafico in figura 22, oltre a fornire ulteriori indicazioni circa le abitudini alimentari del campione intervistato (la patata risulta essere il prodotto orticolo maggiormente consumato, seguito da lattuga, pomodoro e legumi), evidenzia come tali abitudini non si discostino in maniera significativa tra i soggetti interessati o meno da calcolosi, ad eccezione di un minor utilizzo di lattuga e un maggiore consumo di frutta nei soggetti “sani”. La lattuga è uno dei vegetali su cui sono state effettuate le analisi chimiche finalizzate al dosaggio di alcuni metalli pesanti d’interesse, ed è risultato il più ricco in rame e piombo ed uno dei più ricchi in cromo totale e cadmio.

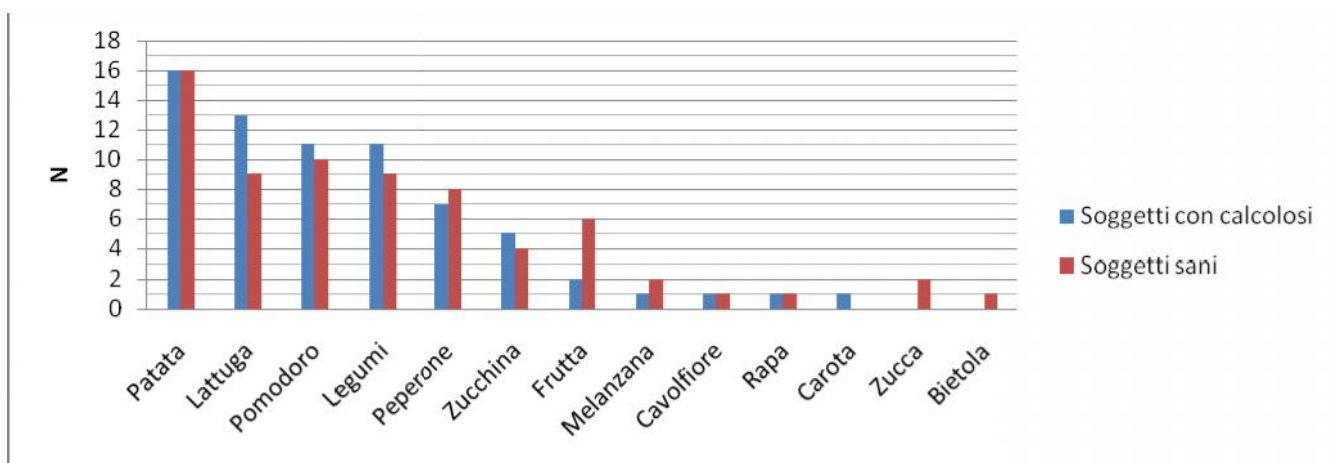


Fig. 22 – Gli alimenti vegetali consumati dal campione intervistato, in ordine decrescente di frequenza e distinti tra soggetti affetti o meno da calcolosi.

Limitatamente al campione intervistato, l’utilizzo di fontane pubbliche quali fonti di approvvigionamento di acqua potabile risulta essere nullo. Il grafico in figura 23 evidenzia come venga privilegiata, a tali scopi, l’acqua di rubinetto (a Mezzana) e l’acqua minerale (a San Severino Lucano).

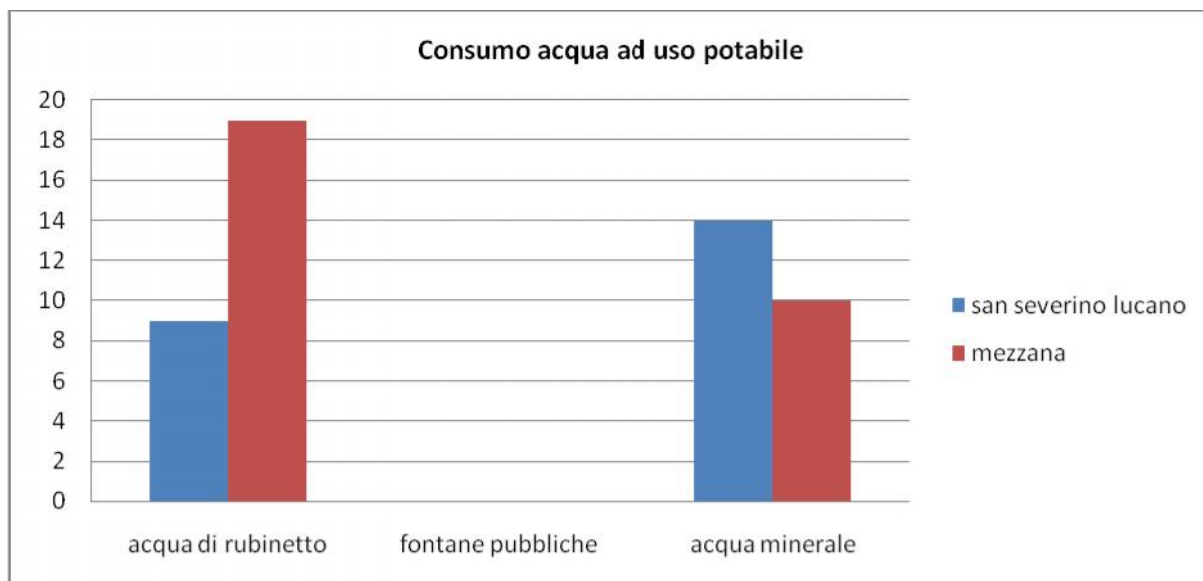


Fig. 23 – Diagramma di frequenza illustrante i consumi di acqua a scopo potabile limitatamente al campione intervistato.

Le acque sotterranee locali, attraverso pozzi privati e sorgenti naturali, sembrano quindi essere utilizzate dalla popolazione locale prevalentemente a scopo irriguo. Si ritiene, tuttavia, necessario, a tal proposito, ulteriori approfondimenti attraverso la somministrazione di ulteriori questionari e l'ampliamento della popolazione campione.

5. CONCLUSIONI

I suoli del sito pilota sono prevalentemente grossolani, con una prevalenza della frazione sabbiosa in corrispondenza del livello più superficiale (*top soil*) e di quella ghiaiosa a maggiore profondità, mentre, la *clay fraction* si attesta su percentuali generalmente molto basse. Ciò indica un grado di alterazione chimico-fisica mediamente basso, e comunque più intenso in corrispondenza degli orizzonti più superficiali, con una maggiore intensità dei processi di weathering in grado di incrementare la mobilità geochimica. La paragenesi mineralogica prevalente è caratterizzata da una netta predominanza di minerali del gruppo del serpentino, cui si accompagnano anfiboli, pirosseni, olivina, spinello, ossidi e idrossidi di ferro, manganese e magnesio (ematite, magnetite, brucite). Sono presenti anche quarzo, clorite, illite e tracce di interstratificati clorite-smectite. Le concentrazioni di cromo e nickel sono molto alte, compatibilmente con le fasi mineralogiche osservate, e risultano essere superiori alle concentrazioni soglia di contaminazione fissate dalla normativa vigente per i suoli, considerando sia i valori relativi ai siti ad uso verde pubblico, privato e residenziale che quelli meno restrittivi dei siti ad uso commerciale e industriale.

Inoltre, le acque sorgive utilizzate per l'irrigazione delle colture nel sito pilota di San Severino Lucano mostrano, coerentemente con quanto riscontrato nel corso delle attività di ricerca pregresse condotte nella zona, concentrazioni piuttosto elevate di cromo totale, che rimangono tuttavia abbondantemente inferiori alla concentrazione soglia di contaminazione. Quasi tutto il cromo in soluzione è presente, però, nella sua forma esavalente, cosa abbondantemente riscontrata anche in letteratura scientifica per contesti geologici analoghi a quelli in oggetto di studio, e questo fa in modo che tali acque superino la concentrazione soglia di contaminazione fissata dalla normativa vigente per il cromo esavalente, pari a soli 5 µg/L.

Per quanto riguarda i vegetali coltivati nell'area pilota, i risultati delle analisi chimiche hanno mostrato come il metallo più abbondante sia lo zinco, con quantità particolarmente elevate nell'asparago. Il rame risulta più abbondante nella lattuga rispetto alla concentrazione media nei vegetali testati. Cadmio e piombo sono i metalli presenti in quantità più basse. I campioni su cui sono state rilevate le quantità maggiori sono quelli di lattuga (sia cadmio che piombo) e rucola (cadmio).

Per quanto riguarda il cromo, esso è presente nella matrice vegetale prevalentemente nella sua forma trivalente. I vegetali caratterizzati dalle concentrazioni più alte sono finocchio, cetriolo e peperone, mentre la fragola ne risulta del tutto priva. Il finocchio risulta anche l'ortaggio più ricco in nickel (26.28 mg/kg).

Mediamente, le concentrazioni di cromo e nickel nei vegetali testati risultano essere piuttosto elevati rispetto ai valori caratteristici dei medesimi ortaggi riscontrabili in letteratura, a dimostrazione del fatto che tali metalli, presenti in grande quantità nei suoli di San Severino Lucano e nelle acque utilizzate a scopo irriguo, sono in grado di passare con una certa facilità nella matrice vegetale. Da sottolineare come i vegetali testati siano in gran parte utilizzati a scopo alimentare e che l'analisi dei questionari somministrati indichi un largo utilizzo, da parte della popolazione residente, di ortaggi di origine locale. Per valutare se tale consumo possa effettivamente rappresentare un rischio per la salute umana sarà, tuttavia, necessario un prosieguo delle attività di studio e ricerca che consentano di valutare la capacità di migrazione di tali metalli dagli alimenti all'uomo e le relative modalità (in termini di speciazione, soprattutto per quanto riguarda il cromo, e di assimilazione ed accumulo degli stessi). Nell'ambito di tali valutazioni, sarà necessario considerare anche la possibilità concreta che questi accumuli di cromo e nickel nella matrice vegetale interessino non soltanto le orticole, ma anche la vegetazione spontanea. Il consumo di alimenti animali di origine prettamente locale (es. uova, latte, formaggi), anch'essa abbastanza diffusa nell'area di studio sulla base di quanto emerso dai questionari, potrebbe infatti a sua volta contribuire all'assimilazione di cromo e nickel attraverso la catena alimentare.

Dai risultati di fito e genotossicità ottenuti nella fase preliminare sembra evidente che la tossicità del cromo contenuto sia nei suoli che nell'acqua campionati non sia sufficiente ad indurre effetti rilevabili con i test *in*

vivo su *Vicia faba*. Probabilmente la composizione geochimica dei suoli e i processi naturali quali l'attività microbica e i processi biochimici nelle piante potrebbero influenzare la tossicità di cromo (VI).

Sebbene il cromo è stato oggetto di importanti ricerche tossicologiche, non esiste un adeguato modello *in vitro* per comprendere il meccanismo alla base di effetti citotossici, stress ossidativo, e danno al DNA. Vi è anche una scarsità di dati scientifici relativa alla sua tossicità in sistemi *in vitro* (Patlolla et al., 2009). Pertanto, nell'ambito del progetto è stato intrapreso uno studio al fine di approfondire i meccanismi che sono alla base del danno al DNA e stress ossidativo in cellule HepG2 esposte a cromo esavalente. I test condotti su tali linee cellulari hanno mostrato l'elevata citotossicità del Cr(VI) che ha indotto morte cellulare ad elevate concentrazioni (2-4 μM) e un danno al DNA significativo a concentrazioni sub letali (0.5-1 μM). In particolare risulta di particolare rilevanza la concentrazione di 1 μM a cui sono state esposte le cellule per un tempo di 24 h, e che può essere utilizzato come valore soglia di indicazione del danno da esposizione.

L'esposizione a cromo esavalente di cellule HepG2 induce una modifica nei profili di espressione dei microRNA. Infatti, al fine di individuare nuovi marcatori molecolari di esposizione di Cr (VI), sono stati studiati i profili di espressione dei microRNA in cellule HepG2 esposte a cromo esavalente. L'analisi ha evidenziato come il cromo esavalente alle due concentrazioni testate produca cambiamenti interessanti nei profili di espressione di microRNA. Non è stato possibile al momento identificare microRNA da considerare come biomarcatori di esposizione per via di una replica non utilizzabile nell'analisi statistica e quindi da ripetere. Importante comunque notare come l'esposizione a cromo esavalente provochi una modifica dell'espressione dei microRNA nella cellula, che probabilmente sono coinvolti nella risposta alla sostanza tossica. La ripetizione di un'ulteriore replica biologica, tutt'ora in corso, potrà fornire risultati significativi dell'esperimento. Per quanto riguarda invece gli aspetti di tossicità del cromo nell'ambiente, allo scopo di valutare gli effetti diretti di tossicità del contaminante, al netto delle matrici ambientali e delle interazioni che esse hanno con il metallo e che ne influenzano la biodisponibilità, proseguiranno gli studi relativi ai test di fitotossicità e genotossicità su piante di *Vicia faba* lasciate crescere su sabbia di quarzo ed irrigate con un soluzioni a concentrazioni prestabilite di Cromo (III) e Cromo (VI) a diverse concentrazioni. Diversi autori sostengono che nella tossicità del cromo (VI) siano implicate le specie reattive dell'ossigeno (ROS) e che la loro formazione sia il meccanismo molecolare comune del Cr (VI) attraverso il quale induca tossicità e danno cellulare (Patlolla et al. 2009). Secondo questa ipotesi, il cromo (VI) in sé non è un agente citotossico ma piuttosto un generatore di radicali liberi dell'ossigeno attraverso la sua riduzione cellulare. Allo scopo di approfondire i meccanismi relativi allo stress ossidativo sarà di nostro interesse effettuare nuovi studi con le specifiche endonucleasi già testate ma che al momento non hanno dato risultati significativi.

Nelle linee delle nuove attività di ricerca si prevede anche di studiare e approfondire l'aspetto della epimutagenesi, in particolare studiare le epimutazioni e le modifiche che avvengono a livello cellulare a causa dei cambiamenti molecolari indotti dal cromo al fine di sviluppare strategie preventive e terapeutiche nell'uomo.

Le modifiche epigenetiche del DNA, degli istoni e dei microRNA determinano il profilo di espressione genica di una cellula, che è principalmente di natura tessuto-specifica. La disregolazione in questo profilo epigenetico normale può portare a diversi esiti dalla malattia della cellula ad uno sviluppo anormale, alla proliferazione o alla morte cellulare. Nell'uomo esposto a composti tossici quali l'arsenico, sono stati osservati esiti negativi gravi a volte attribuibili ad una disregolazione del profilo epigenetico e a schemi di espressione genica anormale (S. Paul et al. 2015).

6. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Adriano D.A (2001). Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals. Second Edition.
- Aitio A., Jarvisalo J. (1986). Levels of welding fume components in tissue and body fluids. In: R.M Stern, A. Berlin, A.C. Flethcher, J. Jarvisalo (eds.) Health hazards and biological effects of welding fumes and gases. Excerpta Medica, International Congress Series 676, Amsterdam. Pp. 169-179.
- Aiyar, J., De Flora, S., Wetterhahn, K.E. (1992). Reduction of chromium(VI) to chromium(V) by rat liver cytosolic and microsomal fractions: is DT-diaphorase involved? *Carcinogenesis*,13(7): 1159-1166.
- An YJ. (2004). Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environ. Pollut.* 127: 21-26.
- Anderson R.A., Bryden N.A., Polansky M.M., (1997). Lack of toxicity of chromium chloride and chromium(III) picolinate in rats. *Journal of the American College of Nutrition*, 16, 273-279.
- Anderson RA. (1981). Nutritional role of chromium, *Sci. Total Environ.* 17: 13–29.
- ANPA (2002). Inquinamento delle matrici ambientali (aria, acqua, suoli) [On-line] consultabile su <http://www.galileo2001/materiali/documenti/ambiente>.
- Apostoli, P., Maranelli, G., Duca, P.G., Bavazzano, P., Bortoli, A., Cruciatti, A., Elia, G., Minoia, C., Piccinini, R., Sabbioni, E., Sciarra, G., Soave, C. (1997). Reference values of urinary chromium in Italy. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 70: 173-179.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), (2000). Toxicology Profile for Chromium US Department of Health and Human Services. Public Health Service: Agency for Toxic Substances and Diseases Registry.

- ATSDR, (2012). Toxicological profile of chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services. Available online: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp7.pdf>.
- Baffi C. (2002). La nutrizione delle piante tipiche di suoli ofiolitici. In: La conservazione della risorsa suolo. Guida all'escursione pedologica, Convegno Società Italiana della Scienza del Suolo, Piacenza, 8-10 Giugno 2002, 54-59.
- Banks M.K., Schwab A.P., Henderson C., (2006). Leaching and reduction of chromium in soil as affected by soil organic content and plants. *Chemosphere* 62: 255-264.
- Baranowska - Dutkiewicz, B. (1981). Absorption of hexavalent chromium by skin in man. *Arch. Toxicol.*, 47: 46-50.
- Barcelò J. and Poschenrieder C. (1997). Chromium in plants. *Chromium Environmental Issues*. Ed. Franco Angeli pag 103-129.
- Barcelò J., Poschenrieder Ch., Gunsè B. (1985). Effect of chromium(VI) on mineral element composition of bush beans. *J. Plant. Nutr.* 8, 211-217.
- Barcelò J., Poschenrieder Ch., Gunsè B. (1987). El impacto del cromo en el medio ambiente. II. El Cr en los organismos vivos. *Circular Farmacéutica (Barcelona)* 293, 31-48.
- Barcelò J., Poschenrieder Ch., Vázquez M.D., Gunsè B. (1993). Beneficial and toxic effects of chromium in plants: solution culture, pot and field studies. In: *Environmental Contamination. Studies in Environmental Science* 55. Ed. J-P Vernet. Pp 147-171. Elsevier, Amsterdam.
- Barceloux D.G. (1999). Chromium. *Clinical Toxicology*, 37 :173-194.
- Bartlett R. J. (1991). Chromium cycling in soils and water: links, gap and methods, «*Environmental Health Perspectives*», Vol. 92, pp. 17-24.
- Bianchi V. and Levis AG., (1988). Review of genetic effects and mechanisms of action of chromium compounds, *Sci. Total Environ.* 71: 351–355
- Blasiak J., Kowalik J. (2000). A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium, *Mutat. Res.* 469: 135–145.
- Bock, M., Schmidt, A., Bruckner, T., Diepgen, T.L. (2003). Occupational skin diseases in the construction industry. *Br. J. Dermatol.* 149: 1165-1171.
- Bourque G. and Weinberg P. (1967). Uptake of ⁵¹Cr as an indicator of metabolic change in wheat root tips. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 45, 235-239.
- Bridgewater LC., Manning FC., and Patierno SR. (1994). Base-specific arrest of in vitro DNA replication by carcinogenic chromium: relationship to DNA interstrand crosslinking. *Carcinogenesis*. 15(11): 2421-7.
- Cavalcante F., Belviso C. (2005). Trattamenti e metodi di preparazione di campioni di materiali argillosi per l'analisi diffrattometrica. In: *Argille e Minerali delle argille*, vol.V, Analisi di materiali argillosi per diffrazione di raggi X e microscopia elettronica a scansione. Teoria ed applicazioni, AISA onlus, pp.23-50.

- Cavalcante F., Belviso C., Finizio F., Lettino A., Fiore S. (2009). In: Fiore S. (ed.), Carta Geologica delle Unità Liguridi dell'area del Pollino (Basilicata): nuovi dati geologici, mineralogici e petrografici. ISBN: 978-88-7522-026-6.
- Cavalcante F., Fiore S., Lettino A., Picarreta G., Tateo F. (2007). Illite-Smectite mixed layers in sicilide shales and piggy-back deposits of the Gorgoglione formation (Southern Appennines): geological inferences. *Boll. Soc. Geol. It.* Vol.126, pp. 241-254.
- Cairns, J. JR., Bidwell, J.R., Arnegard, M.E. (1996). Toxicity testing with communities: microcosms, mesocosms and wholesystem manipulations. *Rev. Environ. Contamino Toxicol.*, 147, 45-69.
- Cary E.E. e Kubota J. (1990). Chromium concentration in plants: effects of soil chromium concentration and tissue contamination by soil. *J. Agric. Food Chem.* 38, 108-114.
- Cary E.E., Allaway W.H. and Olson O. (1977a). Control of chromium concentrations in food plants. 1. Absorption and translocation of chromium by plants. *J. Agric. Food Chem.* 25, 300-304.
- Cary E.E., Allaway W.H., Olson O.E. (1977b). Control of chromium concentrations in food plants. 2. Chemistry of chromium in soils and its availability to plants, «*Journal of Agricultural and Food Chemistry*», Vol. 25, 2, pp. 305-309.
- Cervantes C., Campos-García J., Devars S., Gutiérrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J.C., Moreno-Sanchez R. (2001). Interaction of chromium with microorganisms and plants, «*FEMS Microbiology Reviews*», Vol. 25, 3, pp. 335-347.
- Chaney R.L. (1980). health risks associated with toxic metals in municipal sludge. In *sludge: health risks of land application*. Ed G. Britton. Pp. 58-83. Ann Arbor Science Publications, Ann Arbor, Michigan, USA.
- Chen Y., Watson H. M., Gao J., Halder Sinha S., Cassady C. J., Vincent J. B. (2011). Characterization of the Organic Component of Low-Molecular-Weight Chromium-Binding Substance and Its Binding of Chromium *J. Nutr.* vol. 141 no. 7 1225-1232.
- Choppala G., Bolan N., Mallavarapu M., Chen Z. (2010). Sorption and mobility of chromium species in a range of soil types, in *Proceedings of the 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World*, 1-6 Agosto 2010, Brisbane, pp. 239-242.
- Ciavatta C. e Sequi P. (1989). Evaluation of chromium release during the decomposition of leather meal fertilizers applied to the soil. *Fertilizer Research* 19: 7-11.
- Ciavatta C., Gessa C. (1997). Chromium-Containing Fertilizers and their production, in: *Chromium Environmental Issues*, a cura di Canali S., Tittarelli F., Sequi P., Franco-Angeli Editore, Bologna, pp. 61-82.
- Ciavatta C., Manoli C., Cavani L., Franceschi C., Sequi P. (2012). Chromium-containing organic fertilizers from tanned hides and skins: a review on chemical, environmental, agronomical and legislative aspects, «*Journal of Environmental Protection*», 3, pp. 1532-1541.
- Cieslak- Golonka M. (1995). Toxic and mutagenic effects of chromium (VI). A Review, *Polyhedron* vol. 15 n°21 pp. 3667-3689.

- Cohen MD., Kargacin B., Klein CB. and Costa M. (1993). Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity, *Crit. Rev. Toxicol.* 23: 255–281.
- COM (Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment), (2004), Annual Report, UK, p. 133-170 Available online: <http://cot.food.gov.uk/pdfs/comsection.pdf>
- Corradi M.G., Bianchi A., Albasini A. (1993). Chromium toxicity in *salvia sclarea*. I. Effects of hexavalent chromium on seed germination and seedling development. *Env. Exp. Bot.* 33, 405-413.
- Correa JF., Souza IF., Ladeira AM. and Young MCM. (2000). Allelopathic potential of *Eupatorium maximiliani* Schrad. Leaves. *Allelopathy J*, 7: 225–234.
- Critelli S., LePera E. (1998). Post-Oligocene sediment-dispersal system and unroofing history of the Calabrian microplate, Italy. *International Geology Reviews* 40, 609-637.
- Danadevi K., Rozati R., Banu B.S., Grover P. (2004). Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays, *Mutagenesis* 19: 35–41.
- Dayan AD. and Paine AJ. (2001). Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000, *Hum. Exp. Toxicol.* 20: 439–451.
- De Flora S. (2000). Threshold mechanisms and site specificity in chromium (VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* ,21(4):533-541.
- De Flora S., Banasco M., Serra D. and Zancchi P., (1990). Genotoxicity of chromium compounds: a review, *Mutat. Res.* 238: 99–112.
- De Flora, S., Badolati, G.S., Serra, D., Picciotto, A., Magnolia, M.R., Savarino, V. (1987). Circadian reduction of chromium in the gastric environment. *Mutat. Res.*, 192(3): 169-174.
- De Marco A., Boccardi P., De Simone C., Piccolo A., Raglione M., Testa A., Trinca S. (1990). Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated in different soils with the herbicide alachlor. *Mutat. Res.*, 24, 6-11.
- Debetto P. and Luciani S. (1988). Toxic effect of chromium on cellular metabolism, *Sci. Total Environ.* 71: 365–377.
- Decreto Legislativo 2 febbraio 2001, n. 31 "Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano" pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 52 del 3 marzo 2001 - Supplemento Ordinario n. 41.
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152 "Norme in materia ambientale" pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96.
- Decreto Legislativo n. 99 del 1992, attuazione della direttiva 86/278/CEE concernente la protezione dell'ambiente in particolare del suolo, nell'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura. *Gazzetta Ufficiale* n. 38 del 15 febbraio 1992.
- Direttiva 2003/53/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 giugno 2003 che modifica per la ventesima volta la direttiva 76/769/CEE del Consiglio relativamente alle restrizioni in materia di

immissione sul mercato e di uso di talune sostanze e preparati pericolosi (nonilfenolo, nonilfenolo etossilato, cemento).

Direttiva 2011/65/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio Sulla restrizione dell'uso di determinate sostanze pericolose nelle apparecchiature elettriche ed elettroniche (rifusione), Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea il 1° luglio 2011.

Donaldson R.M., Jr. and Barreras R.F. (1966). Intestinal absorption of trace quantities of chromium. *Journal of laboratory and Clinical Medicine*, 68, 484-493.

EFSA (European Food Safety Authority), (2009b), Chromium picolinate, zinc picolinate and zinc picolinate dihydrate added for nutritional purposes in food supplements. Scientific opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food. *The EFSA Journal* 2009, 1113, 1-41.

EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), (2010a), Scientific Opinion on the safety of chromium picolinate as a source of chromium added for nutritional purposes to foodstuff for particular nutritional uses and to foods intended for the general population. *EFSA Journal* 2010;8(12):1883, 49 pp. doi:10.2903/j.efsa.2010.1883.

EFSA, (2014), Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water *EFSA Journal* 2014;12(3):3595.

Elias Z., Schneider O., Aubry F., Daniere MC. and Poirot O. (1983). Sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells treated with the trivalent chromium compounds chromic chloride and chromic oxide, *Carcinogenesis* 4: 605–611.

Ellis A.S., Johnson T.M., Bullen T.D. (2002). Chromium Isotopes and the Fate of Hexavalent Chromium in the Environment, *Science* Vol. 295, 5562: 2060-2062.

EPA (1998). Toxicological review of hexavalent chromium. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS), August 1998, U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC, (CAS No. 18540-29-9).

EPA "Toxicological Review Of Hexavalent Chromium" - Settembre 2010.

EVM (Expert Group on Vitamins and Minerals), (2002). Expert Group on Vitamins and Minerals Secretariat. Review of chromium. UK: EVM/99/26. REVISED AUG 2002, 25.

EVM (2003). Risk assessment: Chromium. In: Safe Upper Levels for Vitamins and Minerals. Report on the Expert Group on Vitamins and Minerals (EVM). U.K. Food Standards Agency (FSA), Committee on Nutrition (SACN), Expert Group on Vitamins and Minerals (EVM), London, England, p. 172-179. Available online: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/vitmin2003.pdf>.

Fantoni D., Brozzo G., Canepa M., Cipolli F., Marini L., Ottonello G., Vetuschi Zuccolini M. (2002). Natural hexavalent chromium in groundwaters interacting with ophiolitic rocks. *Environmental Geology* 42, 871-882.

- Fendorf S.E. (1995). Surface reactions of chromium in soils and waters, *Geoderma*, Vol. 67, No. 1-2, pp. 55-71.
- Foà, V., Riboldi, L., Patroni, M., Zocchetti, C., Sbrana, C., Mutti, A. (1988). Effects derived from long-term low-level chromium exposure in ferro-alloy metallurgy. Study of absorption and renal function in workers. *Sci. Tot. Environ.*, 71: 389-396.
- Franchini, I., Mutti, A. (1988). Selected toxicological aspects of chromium(VI) compounds. *Sci. Tot. Environ.*, 71: 379-387.
- Friedman J., Shabtai F., Levy LS. and Djaldetti M. (1987) Chromium chloride induces chromosomal aberrations in human lymphocytes via indirect action, *Mutat. Res.* 191: 207–210.
- Gambelunghe A., Piccinini R., Ambrogi M., Villarini M., Moretti M., Marchetti C., Abbritti G., Muzi G., (2003). Primary DNA damage in chrome-plating workers, *Toxicology* 188: 187–195.
- Gazzetta Ufficiale N.337 del 9.12.1981, Elenco "Industrie Insalubri di Prima Classe".
- Gedic CM, Ewen SWB, Collins AR. (1992). Single cel gel electrophoresis applied to analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol*; 62:313-20.
- Giammetta R., Telesca A., Mongelli G. (2004). Serpentinites-water interaction in the San Severino area, Lucanian Apennines, southern Italy. *GeoActa*, 3, 25-33.
- Giacometti C., Cavani L., Gioacchini P., Ciavatta C., Marzadori C. (2011). Soil application of tannery land plaster: effects on nitrogen mineralization and soil biochemical properties, «*Applied and Environmental Soil Science*», 2012, pp. 1-9.
- Govi M., Ciavatta C., Sitti L., Bonoretti G., Gessa C. (1996). Influence of leather meal fertilizer on soil organic matter: a laboratory study, «*Fertilizer Research*», Vol. 44, pp. 65-72.
- Guertin J., Jacobs J.A., Avakian C.P. (2004). *Chromium (VI) Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press, pp. 800.
- Gutteridge JMC. and Quinlan GJ. (1983). Malondialdehyde formation from lipid peroxides in thiobarbituric acid test. The role of lipid radicals, iron salts and metal chelator. *J. Appl. Biochem.* 5: 293-299.
- Hall R., Rhodes D., Page E. (2005). Evaluation of worker exposures during the manufacturing of high quality corrosive resistant stainless steel products and fabricated piping systems. *American Industrial Hygiene Conference and Expo*, Anaheim, CA: May 21–26, 2005. Fairfax, VA: American Industrial Hygiene Association, pp. 59.
- Henrotin Y., Deby-Dupont G., Deby C., Franchimont P. and Emerit I. (1992). Active oxygen species, articular inflammation and cartilage damage. *EXS*, 62: 308-322.
- Hlavay J., Prohaska T., Weisz M, Wenzel W.W., Stinger G.J. (2004). Determination of trace elements bound to soils and sediment fractions (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, vol.76, no.2, 415-442.
- Holvoet P. and Collen D. (1998). Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 137: 33-38.

- Huffman JR. E.W., Allaway W.H., (1973). Chromium in plants: distribution in tissues, organelles and extracts, and availability of bean leaf Cr to animals, «Journal of Agricultural and Food Chemistry», Vol. 21, 6, pp. 982-986.
- IARC (1990). International Agency for Research on Cancer. Chromium, nickel and welding, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 49, Lyon.
- IARC. Chromium (VI) compounds on line: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-9.pdf>
- Ishihara N. and Matsushiro T. (1986). Biliary and urinary excretion of metals in humans. Archives of Environmental Health, 41, 324-330.
- Jaiswal P.C e Misra S.G (1984), Available Fe in soil as influenced by chromium (VI) application. J. Plant Nutr. 7, 541-546.
- Jeejeebhoy K.N., Chu R.C., Marliss E.B., Greenberg G.R., Bruce-Robertson A. (1977). Chromium deficiency, glucose intolerance and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition, «The American Journal of Clinical Nutrition», Vol. 30, pp. 531-538.
- Kabata-Pendias A., Pendias H. (1992). Trace elements in soils and plants. 2nd edition, CRC Press, Boca Raton, pp. 565.
- Kanaya N., Gill B.S., Grover I.S., Murin A., Osiecka R., Sandhu S.S., Andersson H.C. (1994). *Vicia faba* chromosomal aberration assay. Mutat. Res. 310: 231-247.
- Khan FH., Ambreen K., Fatima G., Kumar S. (2012). Assessment of health risks with reference to oxidative stress and DNA damage in chromium exposed population. Sci Total Environ. 430:68-74.
- Kierczak J., Neel C., Bril H., Puziewicz J. (2007). Effect of mineralogy and pedoclimatic variations on Ni and Cr distribution in serpentine soils under temperate climate. Geoderma 142 (2007), 165 – 177.
- Koppen G., Verschaeve L. (1996). The alkaline comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. Mutat Res. 360(3):193-200.
- Kornhauser C., Wrobel K., Wrobel K., Malacara JM., Nava LE., Gomez L. and Gonzalez R. (2002). Possible adverse effect of chromium in occupational exposure of tannery workers, Ind. Health 40: 207–213.
- Kotaś J. and Stasicka Z. (2000). Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. Environ Pollut. 107(3):263-83.
- Krystek P. and Ritsema R. (2007). Monitoring of chromium species and 11 selected metals in emission and immission of airborne environment. Int J Mass Spectrom, 265: 23–29. doi:10.1016/j.ijms.2007.05.003.
- Lah B., Vidic T., Glasencnik E., Cepeljnik T., Gorjanc G., Marinsek-Logar R. (2008). Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia* micronucleus assay. Environ. Monit. Assess. 139: 107-118.
- Lahouti M. and Peterson P.J. (1979). Chromium accumulation and distribution in crop plants. J. Sci. Fd. Agric. 30, 136-142.

- Langard S. (1980). A survey of respiratory symptoms and lung function in ferro-chromium and ferrosilicon workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 46: 1-9.
- Langard S. (1982). Absorption, transport and excretion of chromium in man and animals. In: Langård S (ed) *Biological and Environmental Aspects of Chromium*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp. 149-169.
- Leonard A. and Bernard A. (1993). Biomonitoring exposure to metal compounds with carcinogenic properties. *Environ Health Prospect*; 101: 127-33.
- Levina A and Lay PA (2005). Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. *Coord Chem Rev*; 249: 281-98.
- Lezzerini M., Sartori F., Tamponi M. (1995). Effect of amount of material used on sedimentation slides in the control of illite "crystallinity" measurement. *European Journal of Mineralogy*, pp.7, 819-823.
- Lide D.R. (2008). *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 88th ed. New York, NY: CRC Press, Taylor & Francis Group, pp. 4–50.
- Lim T.H., Sargent T., 3rd, Kusubov N. (1983). Kinetics of trace element chromium(III) in the human body. *American Journal of Physiology*, 244, R445-454.
- Lindsay W.L. and Norvell W. (1978). Development of a DTPA test for Zinc, Iron, Manganese and Copper. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42 (3), 421-428.
- Ma TH. (1982). *Vicia* cytogenetic tests for environmental mutagens. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 99: 257- 271.
- Maffiotti A., Bona F., Volterra L. (1997). Introduzione all'ecotossicologia. Analisi e recupero dei sedimenti marini. *Quaderni di Tecniche di Protezione Ambientale*. Pitagora (Ed.), Bologna, pp. 139.
- Maggiore M. Santaloia F., Vurro F. (1993). Hydrogeological and geochemical study of the springs in S. Severino Lucano territory (southern Italy). *Environ. Geol.*, 21, 871-882.
- Margiotta S., Mongelli G., Summa V., Paternoster M., Fiore S. (2012). Trace element distribution and Cr(VI) speciation in Ca-HCO₃ and Mg-HCO₃ spring waters from the northern sector of the Pollino massif, southern Italy. *Journal of Geochemical Exploration* 115, 1-12.
- Marnett L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-370.
- McGrath S.P. (1982). The uptake and translocation of tri- and hexavalent chromium and effects on the growth of Oat in flowing nutrient solution and soil, «*New Phytologist*», Vol. 92, 3, pp. 381- 390.
- Medeiros MG., Rodrigues AS. and Batoreu MC. (2003). Elevated levels of DNA–protein crosslinks and micronuclei in peripheral lymphocytes of tannery workers exposed to trivalent chromium, *Mutagenesis* 18: 19–24.
- Meibian Z., Zhijian C., Qing C., Hua Z., Jianlin L., Jiliang H. (2008). Investigating DNA damage in tannery workers occupationally exposed to trivalent chromium using comet assay *Mutation Research* 654: 45–51.
- Mertz W. (1969) Chromium occurrence and function in biological systems, *Physiol. Rev.* 49: 163–239.

- Mikoczy Z. and Hagmar L. (2005). Cancer incidence in the Swedish leather tanning industry: Updated findings 1958-99. *Occup Environ Med.*; 62: 461–4.
- Mimmo T., Cavani L., Reggiani R., Marzadori C., Gessa C. (2008). Interactions of organic and inorganic chromium species with Ca-polygalacturonate, «Biology and Fertility of Soil», Vol. 44, 3, pp. 521-526.
- Minoia, C., Vescovi, L., Canedoli, S., Ronchi A., Apostoli, P., Pozzoli, L., Sabbioni, E., Manzo, L., (1989). Determinazione diretta di elementi in traccia in acque minerali mediante analisi in ETA-ASS Zeeman. Ed. Libreria cortina Padova, Vol. 1°.
- Misra S.G. and Jaiswal P.C. (1982). Absorption of Fe by spinach on chromium (VI) application. *J. Plant Nutr.* 5, 755-760.
- Mordenti A., Piva G. (1997). Chromium in animal nutrition and possible effects on human health, in *Chromium Environmental Issues*, a cura di Canali S., Tittarelli F., Sequi P., Franco-Angeli Editore, Bologna, pp. 131- 151.
- Mukherjee, A. B., (1998), Chromium in the environment of Finland, *Sci. Total Environ.*, 217, 9.
- Murray R.K.; Granner DK.; Mayes PA. and Rodwell VW. (1988). *Harper's Biochemistry*, 21st Edition; Prentice Hall: NJ, USA, pp. 138-139.
- Mutti A., Cavatorta A., Cosi A., Lucertini S., Olivetti G., Franchini I. (1979). Atteinte tubulaire rénale après intoxication expérimentale par le chrome. *Arch. Hyg. Rada Toksikol.*, 30: 289-296.
- Myttenaere C. and Mousny J.M. (1974). The distribution of chromium-51 in lowland rice in relation to chemical form and the amount of stable chromium in the nutrient solution. *Plant and Soil*, 41, 65-72.
- Nordberg J and Arner ES. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biol. Med.*, 31: 1287-1312.
- NTP (2005). NTP 11th Report on Carcinogens Rep Carcinog, 11: 1–A32. PMID:19826456.
- NTP (2008). Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Sodium Dichromate Dihydrate in F344/N Rats and B6C3F1 Mice. NTP TR 546. NIH Publication No. 07-5887, National Toxicology Program, Research Triangle Park, North Carolina. Available online: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr546.pdf.
- NTP (2010). NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of Chromium Picolinate Monohydrate (CAS No. 27882-76-4) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). Department of Health and Human Services. Research Triangle Park, North Carolina. NTP Technical Report Series, No. 556. Available online: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/TR556.pdf.
- O'Flaherty EJ. (1996). A physiologically-based model of chromium kinetics in the rat, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138: 54–64.
- Offenbacher E.G. (1994). Promotion of chromium absorption by ascorbic acid. *Trace Elements and Electrolytes*, 11, 178-181.

- OHCOW (2005). Hexavalent Chromium. Ontario, Canada: Occupational Health Clinics for Ontario Workers Inc.
- Olaguibel J.M., Basomba A. (1989). Occupational asthma induced by chromium salts. *Allergol. Immunopatol.*, 17: 133-136.
- OSHA (2006). Occupational exposure to hexavalent chromium. Final rule. *Fed Regist*, 71: 10099–10385. PMID:16528853.
- Ozawa T. and Hanaki A. (1990). Spin-trapping studies on the reactions of Cr (III) with hydrogen peroxide in presence of biological reductants: is Cr (III) nontoxic. *Biochem Int*; 22: 343-52.
- Oze C., Fendorf S., Bird D.K., Coleman R.G. (2004a). Chromium geochemistry of serpentine soils. *International Geology Review* 46, 97-126.
- Oze C., Fendorf S., Bird D.K., Coleman R.G. (2004b). Chromium geochemistry in serpentinized ultramafic rocks and serpentine soils from the Franciscan Complex of California. *American Journal of Science* 304, 67-101.
- Oze C., Bird D.K., Fendorf S. (2007). Genesis of hexavalent chromium from natural sources in soil and groundwater. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 6544-6549.
- Palmer C.D., Wittbrodt P.R., (1991), Processes affecting the remediation of chromium contaminated sites, «*Environmental Health Perspectives*» Vol. 92, pp. 25- 40.
- Parent M.E., Hua Y., Semiatycki J. (2000). Occupational risk factors for renal cell carcinoma in Montreal. *Am. J. Ind. Med.*, 38(6): 609-618.
- Patlolla AK., Barnes C., Hackett D., Tchounwou PB. (2009). Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health*. 6(2): 643-53.
- Paustenbach D., Finley B., Mowat F., Kerger B. (2003). Human Health Risk and Exposure Assessment of Chromium (VI) in Tap Water, *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*, Volume 66, Number 14, pp. 1295-1339(45).
- Pechova A., Pavlata L., (2007). Chromium as an essential nutrient: a review, «*Veterinarni Medicina*», 52, pp. 1-18.
- Peijnenburg, W.J.G.M. (2002). Bioavailability of metals to soil invertebrates. In: Allen, H.E. (Ed.). *Bioavailability of Metals in Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning for Bioavailability to Invertebrates, Microbes, and Plants*. SETAC Press, Pensacola, FL, USA, pp. 89.
- Petrilli F.L., De Flora S. (1988). Metabolic reduction of chromium as a threshold mechanism limiting its in vivo activity. *Sci Total Environ.*, 71(3): 357-364.
- Poschenrieder Ch., Vázquez M.D., Bonet A. and Barcelò J. (1992). Beneficial effects of low chromium (III) concentration in iron deficient maize plants. *Suelo y Planta* 2, 605-615.

- Proctor J. and Nagy L. (1992). Ultramafic rocks and their vegetation: an overview. In Baker, A.J.M., Proctor, J. and Reeves, R.D. (Eds.) *The vegetation of ultramafic (serpentine) soils*. Intercept, Handover, UK,) pp. 469-494.
- Proctor J., and Woodell S.R.J. (1975). The ecology of serpentine soils. *Advances in Ecological Research* 9:255–366.
- Quiévryn G., and Zhitkovich A. (2002). Carcinogenic chromium (VI) induces cross-linking of vitamin C to DNA in vitro and in human lung A549 cells. *Biochemistry* 41: 3156-67
- Reinds G.J., Groenenberg J.E., de Vries W. (2006). Critical loads of copper, nickel zinc, arsenic, chromium and selenium for terrestrial ecosystems at a European scale: A preliminary assessment (Alterra Report 1355). Wageningen, pp. 45.
- Roberts, B.A. (1980). "Some Chemical and Physical Properties of Serpentine Soils from Western Newfoundland", *Can. J. Soil Sci.*, 60: 231-240.
- Rodia D. (1979). Sources and levels of human exposure to chromium and nickel. *Trace Metals: exposure and metal effects*. Ed. Ferrante, Pergamon Press, 117-134.
- Rowbotham A.L., Levy L.S., Shuker L.K., (2000). Chromium in the environment: an evaluation of exposure of the UK general population and possible adverse health effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 3: 145–178. doi:10.1080/10937400050045255 PMID:10911983.
- Rudolf E., Cervinka M. (2003). Chromium (III) produces distinct type of cell death in cultured cell. *Acta Medica*; 46: 139-46.
- Santoprete G. (1997). Total chromium content in foodstuffs and evaluation of the average amount of chromium uptake, in *Chromium Environmental Issues*, a cura di Canali S., Tittarelli F., Sequi P., Franco-Angeli Editore, Bologna, pp. 153-179.
- Sauerbeck D.R. (1989). *Der Transfer von Schwermetallen in die Pflanze*. Dechema: Beurteilung von Schwermetallkontaminationen in Böden. Stuttgart, Mainz, 259.
- Sauerbeck D.R. (1991). Plant, element and soil properties governing uptake and availability of heavy metals derived from sewage sludge, «Water, Air and Soil Pollution», Vol. 57-58, 1, pp. 227- 237.
- Sayato Y., Nakamuro K., Matsui S., Ando M. (1980). Metabolic-fate of chromium compounds. 1. Comparative behavior of chromium in rat administered with (Na₂CrO₄)-Cr-51 and (CrCl₃)-Cr-51. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, 3, 17-23.
- SCF (2003). Opinion of the Scientific Committee on Food on the tolerable upper intake level of chromium (expressed on 4 April 2003). European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General, Directorate C - Scientific Opinions, C2 - Management of scientific committees; scientific co-operation and networks.
- Schroeder H.A. (1968). The role of chromium in mammalian nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 21, 230-244.

- Schultz L.G. (1964). Quantitative interpretation of mineralogical composition from X-ray and chemical data for the Pierre shale. U. S. Geol. Surs. Prof. Paper, pp. 391-C:1-31.
- Sedman R.M., Beaumont J., McDonald T.A., Reynolds S., Krowech G., Howd R. (2006). Review of the evidence regarding the carcinogenicity of hexavalent chromium in drinking water. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 24: 155–182. PMID:16690539.
- Seoane AI. and Dulout FN. (2001). Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay, *Mutat. Res.* 49: 99–106.
- Sequi P., (1992). Sostanza organica del terreno: proprietà agronomiche, funzioni ambientali. Ed per l'agricoltura Reda.
- Shanker A.K., Cervantes C., Loza-Tavera H, Avudainayama S. (2005). Chromium Toxicity in Plants, «*Environment International*», Vol. 31, 5, pp. 739-753.
- Shupack, S.I. (1991). The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environ. Health Perspect.*, 92: 7-11.
- Silva S. and Beghi B. (1979). The use of chromium containing organic manures in rice fields, *Riso* 28, 105-113; *Abstr. Soil Fert.* 43, 4100.
- Silva S. (1977). Impiego di concimi organici a base di cuoio torrefatto, determinazione delle concentrazioni di cromo nei vegetali e valutazione delle possibilità di inquinamento delle falde freatiche, in «*Annali della Facoltà di Agraria dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, Sede di Piacenza*», Vol. 17, pp. 1-38.
- Silva S. (2003). *Elementi di chimica del suolo*.
- Silva S., Baffi C., Beone G.M. (1997). Agronomical trias with the use of chromiumcontaining fertilizers. *Chromium Environmental Issues* pp. 85-99.
- Singh NP., Carlisle DL., Pritchard DE., Paterno SR. (1998). Chromium induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis. *Oncol Rep* 5:1307-18
- Sinha S., Mallick S., Misra R.K. (2007). Uptake and translocation of metals in *Spinacia oleracea* L. grown on tannery sludge-amended and contaminated soils: effect on lipid peroxidation, morpho-anatomical changes and antioxidants. *Chemosphere* 67, 176-187.
- Skeffington R.A., Shewry P.R., Petersen P.J. (1976). Chromium Uptake and Transport in Barley Seedlings (*Hordeum vulgare*), «*Planta*», Vol. 132, 3, pp. 209-214.
- Somnath P., Giri A.K. (2015). Epimutagenesis: A prospective mechanism to remediate arsenic-induced toxicity. *Environment International* 81 (2015) 8–17.
- Spiteller, G (2001). Lipid peroxidation in aging and age-dependent diseases. *Exp. Gerontol.*, 36: 1425-1457.
- Srodon J., Clauer N. (2001). Diagenetic history of Lower Paleozoic sediments in Pomerania (Northern Poland), traced across the Teisseyre-Tornquist tectonic zone using mixed layer illite-smectite. *Clay Min.*, pp.36, 15-27.

- Stearns D.M., Courtney K.D., Giangrande, P.H., Phieffer L.S., Wetterhahn K.E. (1994). Chromium(VI) reduction by ascorbate - role of reactive intermediates in DNA-damage in-vitro. *Environmental Health Perspectives*, 102, 21-25.
- Sugden K.D., Martin B.D. (2002). Guanine and 7,8-dihydro-8-oxo-guanine-specific oxidation in DNA by chromium (V). *EHP Supplement*, vol. 110(supplement 5) October 2002.
- Sumino K., Hayakawa K., Shibata T., Kitamura S. (1975). Heavy-metals in normal Japanese tissues - amounts of 15 heavy-metals in 30 subjects. *Archives of Environmental Health*, 30, 487-494.
- Summa V. (2000). Analisi granulometrica dei sedimenti. In: *Incontri Scientifici*, vol. II, S. Fiore (ed.), Istituto di Ricerca sulle Argille, pp. 19-29.
- Teschke K., Ahrens W., Andersen A., Boffettad P., Finchame S., Finkelsteinf M., Henneberg P., Kauppinen T., Kogevinasi M., Korhonenj K., Lissf G., Liukkonen T., Osvollk P., Savelah A., Szadkowska-Stanczyk I., Westbergm H., Widerkiewiczn K. (1999). Occupational exposure to chemical and biological agents in the nonproduction departments of pulp, paper, and paper product mills: an international study. *Am Ind Hyg Assoc J*, 60: 73-83. PMID:10028618.
- Tessier A., Campbell P.G.C. e Bisson M. (1979). Sequential extraction procedure for speciation of particulate traces metals. *Analytical Chemistry* 51 (7), 844-851.
- Tice RR. (1995). The single cell gel/comet: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips DH, Venitt S, editors. *Environmental mutagenesis*. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers; 315-39.
- Turner M.A. and Rust R.H. (1971). Effects of chromium on growth and mineral nutrition of soybeans. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 35, 755-758.
- Vàzquez M.D., Poschenrieder Ch., Barcelò J. (1987). Chromium (VI) induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Bot.* 59, 427-438.
- Verdaki C. e Kelepertis A. (1999). Environmental impact of heavy metals (Fe, Ni, Cr, Co) in soils, waters and plants of Triada in Euboea from ultrabasic rocks and nickeliferous mineralization. *Envir. Geochem. & Health*, 21, 211-226.
- Vernay P., Gauthier-Moussard C., Jean L., Bordas F., Faure O., Ledoigt G., Hitmi A. (2008). Effect of chromium species on phytochemical and physiological parameters in *Datura innoxia*. *Chemosphere* 72: 763-771.
- Vezzani L. (1966). La sezione tortoniana di Perosa sul fiume Sinni presso Episcopia (Potenza). *Geologica Romana* V, 263-290.
- Vincent J.B. (2004). Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium, «*Proceedings of the Nutrition Society*», Vol. 63, 1, pp. 41-47.
- Vincent J.B. (2013). Chromium: is it essential, pharmacologically relevant, or toxic? *Met Ions Life Sci.*, 13:171-98.

- Voitkun V., Zhitkovich A. and Costa M.. (1998). Cr (III)-mediated crosslinks of glutathione or amino acids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells. *Nucl Acids Res*; 26: 2024-30.
- Wallace A., Soufi S. M., Cha J.W. and Romney E.M. (1976). Some effects of chromium toxicity on bush bean plants grown in soil. *Plant and soil* 44, 471-473.
- Weiderpass E., Vainio H., Kauppinen T., Vasama-Nauvonen K., Partanen T., Pukkala E. (2003). Occupational exposures and gastrointestinal cancers among Finnish women. *J. Occup. Environ. Med.*, 45(3): 305-315.
- WHO (1996). Chromium in Drinking-water, Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol. 2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva.
- WHO Regional Office For Europe (2000). Inorganic pollutants, in Air quality guide-lines for Europe, Seconda Edizione, WHO Regional Publications, European Series, No. 91, Copenaghen, pp. 123-135.
- WHO (1996b). Trace elements in human nutrition and health (A report of a re-evaluation of the role of trace elements in human health and nutrition). Geneva. Available online: http://whqlibdoc.who.int/publications/1996/9241561734_eng.pdf.
- WHO (2003). Chromium in drinking water — Background document for development of WHO —Guidelines for drinking-water quality . WHO/SDE/WSH/03.04/04, World Health Organization (Geneva). Available online: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/chromium.pdf.
- WHO/IPCS (2009a). Inorganic chromium(III) compounds, Concise International Chemical Assessment Document 76. Available online: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad76.pdf>.
- WHO/IPCS (2013). Inorganic chromium (VI) compounds. Concise International Chemical Assessment Document 78. Available online: http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/cicad_78.pdf.
- Zayed A., Lytle C.M., Qian J.H, Terry N. (1998). Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops, «Planta», Vol. 206, 2, pp. 293-299.
- Zayed A.M., Terry N. (2003). Chromium in the environment: factors affecting biological remediation, «Plant and Soil», Vol. 249, 1, pp. 139-156.
- Zhitkovich A., Shrager S., Messer J. (2000). Reductive metabolism of Cr (VI) by cysteine leads to the formation of binary and ternary Cr-DNA adducts in the adsence of oxidative DNA damage. *Chem res Toxicol*; 13: 1114-24.
- Zhitkovich A., Song Y., Quievryn G., Voitkun V. (2001). Non-oxidative mechanisms are responsible for the induction of mutagenesis by reduction of Cr(VI) with cysteine: role of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis. *Biochemistry*, 40: 549-60.
- Zucconi F., Pera A., Forte M. and de Bertoldi M. (1981). Evaluating toxicity of immature compost. *BioCycle*, 22 (4): 54–57.