

I micromammiferi del Parco Nazionale del Circeo.

II. Studio di fattibilità per il monitoraggio genotossico

Luisa Anna Ieradi^{1*}, Simona Fiacco², Flavia Annesi²,
Sergio Zerunian³, Mauro Cristaldi², Javier Bravo²

¹ Università Sapienza, Istituto per lo studio degli Ecosistemi (CNR), via A. Borelli, 50 - 00161 Roma

² Università Sapienza, Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, via A. Borelli 50 - 00161 Roma

³ Corpo Forestale dello Stato, Ufficio territoriale per la biodiversità di Fogliano; Borgo Fogliano - 04100 Fogliano (Latina)

Referente per la corrispondenza: luisanna.ieradi@uniroma1.it

Pervenuto il 15.6.2008; accettato il 27.7.2008

Riassunto

L'obiettivo del lavoro è quello di valutare la possibilità di effettuare un monitoraggio genotossico nel Parco Nazionale del Circeo (PNC) utilizzando micromammiferi selvatici come bioindicatori. Lo studio è stato condotto in 4 località utilizzando per la cattura di animali vivi la tecnica CMR (cattura-marcatura-ricattura). Il test dei micronuclei è stato applicato al sangue periferico di due specie di Roditori Murini (*Apodemus sylvaticus*, *Rattus rattus*). I risultati ottenuti, sia nel sangue periferico di *A. sylvaticus* che nel midollo osseo di *R. rattus*, mostrano che le frequenze medie di micronuclei, pur mantenendosi intorno a valori non elevati (valori medi pari rispettivamente a $1,71 \pm 1,64$ e $1,41 \pm 1,52$), sono maggiori di quelle rilevate in individui delle medesime specie raccolti in altre aree protette del Lazio e dell'Abruzzo. I risultati ottenuti in *A. sylvaticus*, e in misura minore in *R. rattus*, mostrano un maggiore impatto genotossico, come si evidenzia dalle frequenze medie di micronuclei più elevate, nei siti Villa Domiziano (valore medio di $2,00 \pm 2,24$), Fosso del Bufalo (valore medio di $1,97 \pm 1,51$) e Pantani (valore medio di $1,70 \pm 1,24$), mentre il sito Peretto, più isolato e meno soggetto ad impatto antropico, presenta una frequenza di micronuclei più bassa (valore medio di $1,23 \pm 1,10$), un range di valori più ristretto (0-3,5) e il maggiore numero di individui privi di micronuclei (23%). Una causa probabile di induzione del danno genotossico può essere imputata alla presenza di pesticidi nelle acque o nel terreno. In conclusione, dallo studio emergono le necessità di considerare all'interno del PNC il problema del rischio di contaminazione ambientale di origine soprattutto agricola e di effettuare il monitoraggio genotossico con regolarità sia nelle aree critiche che in quelle di controllo.

PAROLE CHIAVE: Parco Nazionale Circeo / micronuclei / *Apodemus sylvaticus* / *Rattus rattus*

Small mammals in the Circeo National Park. II. Feasibility study of genotoxic monitoring

The aim of this work is to carry out a genotoxic biomonitoring in Circeo National Park using free living small mammals as bioindicators. Four localities were chosen and live animals were collected using the Capture-Marking-Recapture method. Micronucleus test was applied to the peripheral blood of two rodent species (*Apodemus sylvaticus*, *Rattus rattus*) and in bone marrow only in *R. rattus*. Results obtained in the blood of *A. sylvaticus* and in the bone marrow of *R. rattus* show that the values of the mean micronuclei frequencies, even though relatively low (mean value of $1,71 \pm 1,64$ and $1,41 \pm 1,52$, respectively), are higher than those observed in the same species collected in other protected areas in Lazio and Abruzzo. Results obtained in *A. sylvaticus*, but also in *R. rattus*, show high genotoxic impact, as indicated by the higher values present in Villa Domiziano (mean value $2,00 \pm 2,3$), Fosso del Bufalo (mean value $1,97 \pm 1,50$) e Pantani (mean value $1,70 \pm 1,24$), whereas in Peretto site, being more isolated and less exposed to anthropic impact, micronuclei frequency (mean value $1,23 \pm 1,20$), range of values (0-3,5) and number of animals without micronuclei (23%) show values lower than those observed in the other sites. This genotoxic damage may be due to the presence of pesticides in water and soil. In conclusion this investigation shows the need for studying the environmental pollution impact from agricultural areas, and in order to evaluate the risk, genotoxic biomonitoring should be carried out both in risk and control areas.

KEY WORDS: Circeo National Park / micronuclei / *Apodemus sylvaticus* / *Rattus rattus*

INTRODUZIONE

La presenza di micromammiferi in un determinato territorio è di particolare importanza non solo per il ruolo trofico che essi rivestono (sono la base alimentare per numerosi predatori quali Ofidi, Falconiformi, Strigiformi, Canidi, Felidi, Mustelidi, ecc.), ma anche per la loro azione di disseminazione sotterranea di semi e ghiande (WOLFF, 1996) e di rimescolamento del terreno, efficace mezzo per il rinnovamento della vegetazione. Inoltre, la loro capacità di dispersione nell'ambiente, quale componente mobile degli ecosistemi, e di concentrazione nei tessuti di sostanze inquinanti, quali metalli pesanti, pesticidi ecc., li rende efficaci bioindicatori, capaci di fornire, quindi, importanti informazioni sullo stato di salute dell'ambiente stesso (IERADI, 1993; CRISTALDI e IERADI, 2002).

Il presente lavoro si propone di effettuare uno studio di fattibilità di un monitoraggio genotossico nel Parco Nazionale del Circeo (PNC) utilizzando come bioindicatori, tra le specie di Roditori ivi presenti (AMORI *et al.*, 2005), quelle provviste delle caratteristiche più idonee per numerosità e distribuzione: il topo selvatico (*Apodemus sylvaticus*) e il ratto nero (*Rattus rattus*). Questa scelta è stata motivata dall'interesse di ricavare dati di riferimento per la ricerca di effetti genetici indotti da agenti genotossici eventualmente presenti o che potrebbero venire introdotti in futuro, in un contesto generale in cui il rischio di contaminazione ambientale, soprattutto di origine antropica, sembra destinato ad aumentare. Per questo scopo il test dei micronuclei, rapido ed efficace test di mutagenesi *in vivo*, è stato applicato a popolazioni di Roditori viventi in alcune aree situate all'interno del Parco, caratterizzate da differente impatto antropico. Le frequenze di micronuclei rilevate nelle specie raccolte nel PNC potranno essere confrontate con quelle rilevate nelle stesse specie provenienti da analoghi studi effettuati in altre aree protette che presentano comprovate somiglianze con il Parco stesso. Ciò consentirà di verificare, mediante il metodo comparativo, l'esistenza o meno di presupposti per effettuare il monitoraggio genotossico periodico all'interno del comprensorio. Inoltre i risultati ottenuti contribuiranno alla comprensione delle problematiche generali relative alle popolazioni di piccoli mammiferi al fine di un'adeguata gestione del territorio e forniranno indicazioni di carattere ecologico su eventuali effetti mutagenetici dell'impatto antropico in questa area protetta. I micromammiferi (in particolare i Roditori) sono stati utilizzati in passato con successo come indicatori di impatto ambientale per la loro ampia diffusione e facile reperibilità (FRENCH, 1965; TEMME e JACKSON, 1978; CRISTALDI *et al.*, 1985, 1991, IERADI *et al.*, 1996, 1998). In particolare sono ritenuti bioindicatori adatti poiché hanno in generale un *home range* limitato,

elevata densità di popolazione, piccole dimensioni corporee, sono facilmente catturabili senza alterare il preesistente equilibrio ecologico ed, infine, esiste su di essi una buona letteratura di riferimento (CRISTALDI *et al.*, 1985; TICE *et al.*, 1987; TALMAGE e WALTON, 1991). I Roditori concentrano nei loro tessuti sostanze inquinanti, quali metalli pesanti, pesticidi ecc., e pertanto sono utili per evidenziare gli effetti biologici della contaminazione ambientale *in situ* (IERADI, 1993; DEGRASSI *et al.*, 2001; IERADI *et al.*, 2003).

Il test dei micronuclei, messo a punto da SCHMID (1975) sul midollo osseo di topi di laboratorio, permette di rilevare eventuali danni genetici indotti da sostanze contaminanti presenti nell'ambiente. Il test, applicato successivamente anche al sangue periferico (SCHLEGEL e MACGREGOR, 1982), è stato validato con la Direttiva 2000/32/CE della Commissione del 19 maggio 2000. Questo test è stato utilizzato in diverse popolazioni naturali di roditori per controllare gli effetti dell'inquinamento ambientale (MATERIJ e MASLOVA, 1978; CRISTALDI *et al.*, 1985; ECKL e RIEGLER, 1997). La frequenza di micronuclei e di aberrazioni cromosomiche si è rilevata significativamente correlata con la concentrazione di pesticidi (KHALIKOV, 1990), di radionuclidi (CRISTALDI *et al.*, 1991) e di metalli pesanti nel terreno (IERADI *et al.*, 1996; TULL-SINGLETON *et al.*, 1994).

MATERIALI E METODI

Aree di studio

L'indagine è stata condotta in 4 siti scelti sulla base di criteri di eterogeneità del Parco e localizzati come segue: Pantani dell'Inferno, utilizzato essenzialmente come pascolo per un numero limitato di bovini (in questo caso le trappole sono state disposte sui due argini di un canale di scolo, che taglia trasversalmente i pantani); Villa di Domiziano (Rovine di Circe), sulla sponda orientale del Lago di Paola (Lago di Sabaudia); Peretto (sul Promontorio del Circeo) e Fosso del Bufalo nella parte sud della Foresta Demaniale. Quest'ultimo è stato scelto per la sua vicinanza ad un'area pesantemente coltivata a monoculture orticole, sia sotto serra che all'aperto. La scelta è stata motivata dalla necessità di trovare un sito a notevole impatto antropico da contrapporre agli altri 4, nei quali la presenza umana è più limitata. Per una descrizione dettagliata di questi siti si rimanda ad AMORI *et al.* (2008), in questo stesso volume.

Raccolta campioni

Nei 4 siti descritti sono state effettuate 12 sessioni di trappolamento, da gennaio a dicembre 2005. Durante ogni sessione sono rimaste attive 200 trappole (*live*

traps) del modello L.O.T. (Locasciulli Osvaldo Trap) per 5 notti consecutive al mese. I ratti neri (*Rattus rattus*) venivano sacrificati entro 24 ore, mentre i topi selvatici (*Apodemus*) sono stati raccolti utilizzando la tecnica Cattura-Marcatura-Ricattura (FLOWERDEW, 1976); a ciascun individuo sono stati prelevati il sangue e un frammento del padiglione auricolare; inoltre sono stati misurati, pesati, marcati mediante piccole targhette applicate all'orecchio e rilasciati senza provocare loro alcun danno. Le due specie di *Apodemus* sono state discriminate facendo ricorso all'analisi genetica (PCR con primer specie-specifici). L'analisi, effettuata su 31 individui del genere *Apodemus*, la cui identificazione in campo era risultata dubbia, ha mostrato con certezza la loro appartenenza alla specie *Apodemus sylvaticus*.

Identificazione molecolare di due specie simpatriche di *Apodemus*

Un frammento (3-5 mg) del padiglione auricolare è stato asportato ad ogni animale sul campo ed è stato conservato in etanolo all'80% fino al momento di procedere all'estrazione del DNA genomico.

Per l'estrazione, effettuata previo lavaggio del tessuto in acqua distillata, si è utilizzato il protocollo Qiagen (DNeasy Tissue Kit) che consiste in lisi del tessuto, legame del DNA contenuto nel lisato ad una resina di affinità, successivo lavaggio per la rimozione delle impurità ed eluizione finale in acqua distillata. Un'aliquota del DNA così purificato è stata poi sottoposta a reazione di PCR (Polymerase Chain Reaction) allo scopo di isolare e amplificare una regione del gene mitocondriale per il citocromo *b* che è peculiare (specie-specifica) in ogni specie di *Apodemus*. Per discriminare le due specie campionate sono state utilizzate le seguenti coppie di primer: SylUP 5'-AGGAGGATTCTCAGTAGAC-3' e SylDN 5'-TTAATATGGGGTGGGGTGTTA-3' per *A. sylvaticus* e FlaUP 5'-AGCTACACTAACACGTTTC-3' FlaDN e 5'-GCGTATGCAAATAGGAAGTAC-3' per *A. flavicollis*.

Ogni campione è stato quindi testato con le 2 coppie di primer specie-specifici al fine di stabilire l'appartenenza a una delle 2 specie. La miscela di reazione è stata preparata con 0,1 mg di DNA stampo, 5 µL di tampone 10x, 3,5 µL di Mg (25 mM), 0,2 mg di ciascun primer, 0,2 mM di ciascun dNTP e 2U di Taq polimerasi (Bioline) portando con acqua sterile a un volume finale di 50 µL. L'amplificazione è stata eseguita utilizzando un programma con denaturazione a 94 °C per 20 secondi, appaiamento a 58 °C per 30 secondi e estensione a 68 °C per 90 secondi, per la durata di 33 cicli, seguiti da un ciclo di 10 minuti di estensione finale a 68 °C.

Test dei micronuclei

Tra le specie raccolte nel PNC, il test dei micronuclei sul sangue periferico (metodo non invasivo) è stato applicato solo a due specie di Roditori: *Apodemus sylvaticus* (50% dei micromammiferi raccolti) e *Rattus rattus* (28%). In *R. rattus*, specie non sottoposta a tutela e considerata infestante, il test è stato effettuato anche nel midollo rosso delle ossa (metodo invasivo). L'estrazione del midollo è stata eseguita utilizzando la procedura proposta da SCHMID (1975). Il sangue viene prelevato dalla vena caudale, gli strisci vengono asciugati all'aria, fissati in metanolo assoluto per 10 minuti e colorati con May-Grünwald-Giemsa modificato. Il conteggio dei micronuclei è stato effettuato a 1000 ingrandimenti e per ogni individuo è stata valutata la frequenza di eritrociti micronucleati (MNE), policromatici (MPCE) e normocromatici (MNCE) su 2000 eritrociti, sia nel sangue che nel midollo.

Analisi statistiche

Le frequenze di eritrociti micronucleati, analizzate con il test di Shapiro-Wilk's, hanno mostrato una distribuzione non normale; pertanto per calcolare i livelli di significatività nelle comparazioni tra siti diversi è stato utilizzato il test di Mann-Whitney. Per valutare le differenze tra le percentuali è stato applicato il test del chi quadro. Il livello di significatività accettabile è stato stabilito per un valore di *p* inferiore a 0,05. Tutte le analisi sono state effettuate utilizzando il programma STATISTICA 6.0 package (StatSoft, Tulsa, OK, USA).

RISULTATI

Apodemus sylvaticus

La figura 1 mostra i risultati ottenuti applicando il test dei micronuclei al sangue periferico di 128 individui. L'analisi della distribuzione indica il valore massimo (12) e minimo (0) di queste frequenze e mette in evidenza che il 14 % degli individui ha un valore pari a 0, il 43% ha valori maggiori o uguali a 2 e il 43% valori inferiori a 2.

In particolare, le figure 2a, 2b, 2c e 2d mostrano la distribuzione delle frequenze di eritrociti micronucleati nei gruppi di *A. sylvaticus* provenienti dai 4 siti studiati del Parco, mentre non sono riportati i risultati relativi al sito Piscina delle Bagnature, in quanto il numero estremamente scarso di catture non ha permesso una raccolta significativa di campioni. Nel sito Peretto (Fig. 2c) si osserva il range di valori più ristretto (0-3,5), mentre nel sito Fosso del Bufalo (Fig. 2b) si è riscontrato il range più ampio (0-12).

In sintesi, la figura 3 mostra che il 23% degli individui raccolti a Peretto ha una frequenza di micronuclei (MN) pari a 0, il 46% una frequenza minore di 2

e il 31% una frequenza maggiore o uguale a 2. Nel sito Pantani si osserva il minore numero di individui (5%) con frequenze pari a 0, il 40% di individui mostra valori maggiori o uguali a 2. Nel sito Fosso del Bufalo il 14 % degli individui mostra frequenze di MN pari a 0, il 40% minori di 2 e il 46% maggiori o uguali a 2. Nel sito Villa Domiziano si osserva che solo il 9% di individui ha una frequenza di MN pari a 0, il 56%

maggiore o uguale a 2 e il 35% minore di 2. In particolare si osserva che nel sito Peretto la percentuale di individui con frequenze di MN pari a 0 è la più elevata (46%), mentre la percentuale di individui con MN maggiore o uguale a 2 è significativamente meno elevata di quella rilevata nel sito Villa Domiziano (chi-quadro= 4,68, p=0,03).

Inoltre, nel sito Peretto la frequenza media di eri-

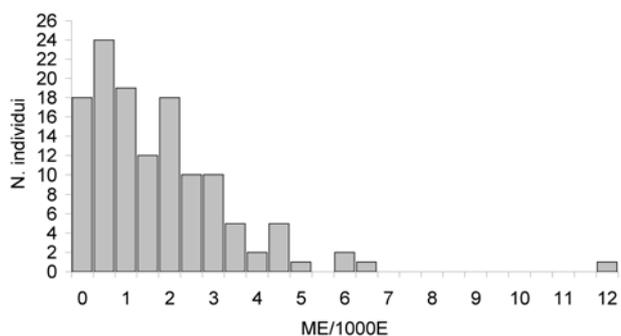


Fig. 1. Test dei micronuclei nel sangue periferico di 128 individui di *A. sylvaticus*: distribuzione delle frequenze di eritrociti micronucleati (ME/1000E) in 128 individui di *A. sylvaticus*; ME= Eritrociti micronucleati, E= Eritrociti.

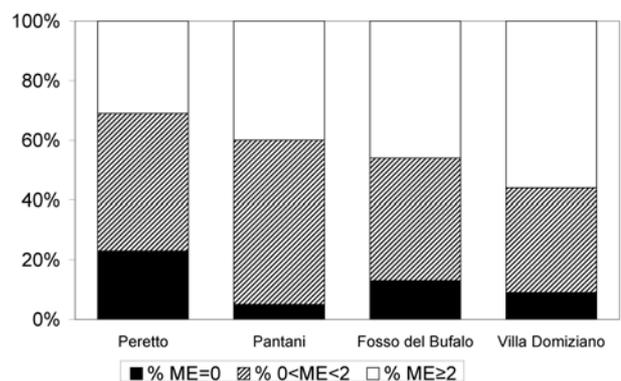


Fig. 3. Test dei micronuclei: percentuali di MN rilevate in 128 individui di *A. sylvaticus* nei 4 siti.

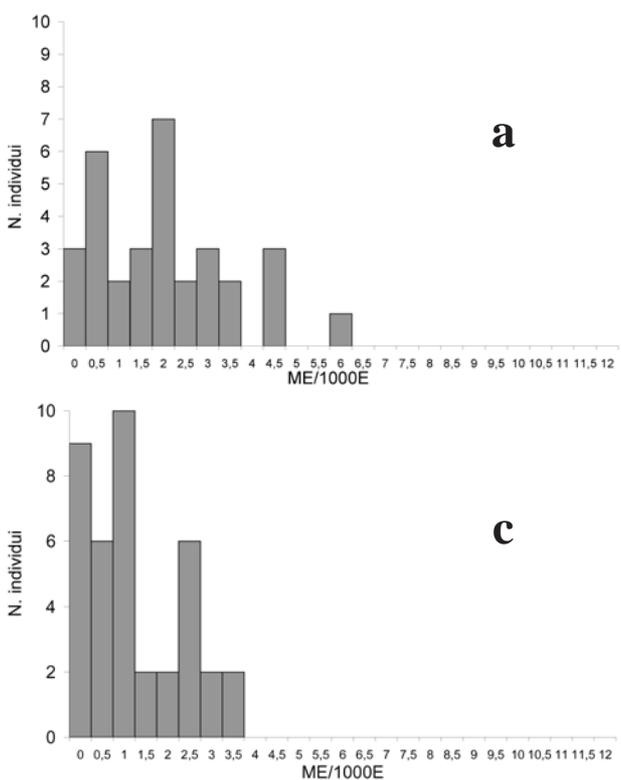


Fig. 2. Test dei micronuclei nel sangue periferico di individui di *A. sylvaticus*: distribuzione delle frequenze di ME/1000E rilevate nei 4 siti del Parco: Villa Domiziano (a), Fosso del Bufalo (b), Peretto (c), Pantani (d).

trociti micronucleati è meno elevata ($x = 1,23 \pm 1,1$) rispetto a quella rilevata nei siti Villa Domiziano e Fosso del Bufalo ($x = 2,00 \pm 0,24$ e $x = 1,97 \pm 1,51$, rispettivamente); tuttavia questa differenza è significativa solo per il sito Peretto rispetto al sito Villa Domiziano (Mann-Whitney: $U=2,074$, $p=0,038$). In particolare, a Villa Domiziano, dove è stata rilevata la frequenza media più elevata e la percentuale più alta di frequenze di MN maggiori o uguali a 2 (56%), analizzando le frequenze di MN in rapporto ai punti di raccolta (x e y coordinate del *grid*), si può osservare una tendenza all'incremento nel numero di MN in

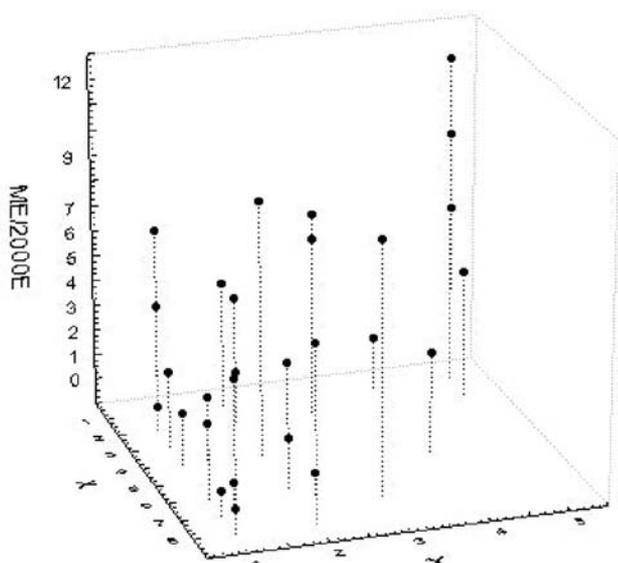


Fig. 4. Test dei micronuclei nel sangue periferico di esemplari di *A. sylvaticus* raccolti nel sito Villa Domiziano. x e y : coordinate del grid. ME = eritrociti micronucleati, E= eritrociti.

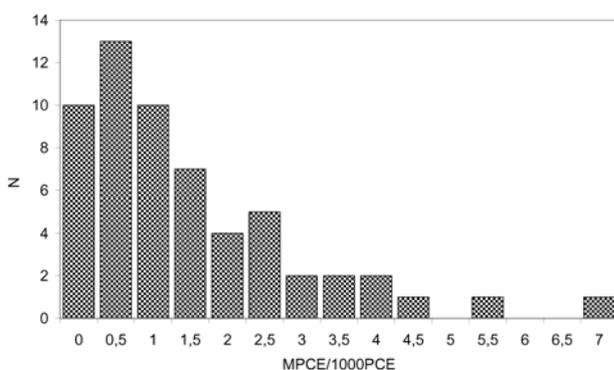


Fig. 5. Test dei micronuclei nel midollo osseo di individui di *R. rattus* ($N=58$) raccolti nel Parco: distribuzione delle frequenze di eritrociti policromatici micronucleati (MPCE/1000PCE); MPCE = eritrociti policromatici micronucleati, PCE= eritrociti policromatici; N = numero individui.

esemplari di *A. sylvaticus* raccolti sempre più in prossimità del lago (Fig. 4).

La frequenza media di eritrociti micronucleati ($1,71 \pm 1,64$) e il range delle frequenze di MN (0-12) rilevati in *A. sylvaticus* viventi nel Parco (Tab. I) mostrano valori più elevati di quelli osservati in individui della stessa specie (CRISTALDI *et al.*, 2005), raccolti in altre aree naturali protette del Centro Italia, come il Parco Naturale Regionale dei Monti Lucretili (RM), l'Oasi Regionale Naturale del WWF "Lago di Penne" (PE) e il Parco Suburbano Marturanum (VT).

Le frequenze medie di eritrociti micronucleati non mostrano differenze significative tra individui di sesso maschile ($1,86 \pm 1,89$) e femminile ($1,49 \pm 1,35$), né tra giovani ($1,69 \pm 1,74$) e adulti ($1,71 \pm 1,62$) e tra individui catturati in diverse stagioni.

Tab. I. Test dei micronuclei nel sangue periferico di 128 esemplari di *A. sylvaticus* raccolti in 4 aree protette del Lazio e dell'Abruzzo: x = frequenza media di ME/1000 E, MIN = valore minimo e MAX= valore massimo, SE= errore standard, SD= deviazione standard.

SITI	x	SE	SD	MIN	MAX
Lucretili	1,19	0,36	1,95	0,00	7,00
Oasi di Penne	1,31	0,22	1,58	0,00	8,00
Circeo	1,71	0,14	1,64	0,00	12,00
Marturanum	0,41	0,30	0,80	0,00	4,00

Rattus rattus

La figura 5 mostra l'analisi della distribuzione delle frequenze di eritrociti policromatici micronucleati (MPCE/1000PCE) nel midollo osseo di *R. rattus* ($N=58$). I risultati mostrano che i valori sono inclusi nell'intervallo 0-7 e che il 34,5% degli individui ha frequenze pari a zero, il 62,1% frequenze minori o uguali a 2 e solamente il 3,4% frequenze maggiori di 2. I dati inoltre indicano che la frequenza media ($x=1,41 \pm 1,52$) di eritrociti policromatici micronucleati (MPCE/1000 PCE) è inferiore al valore soglia di 2,

Tab. II. Test dei micronuclei nel midollo osseo di individui di *R. rattus* raccolti nei 4 siti del Parco: x = frequenze medie di eritrociti policromatici micronucleati (MPCE/1000 PCE), N = numero di animali; SD= deviazione standard; MIN = valori minimo e MAX= massimo

SITI	N	x	SD	MIN	MAX
F. Bufalo	28	1,50	1,23	0,00	7,00
V. Domiziano	16	1,10	1,57	0,00	5,00
Peretto	10	1,30	0,92	0,00	3,00
Pantani Inferno	4	2,00	1,82	0,00	4,00

determinato nel midollo osseo di topi di laboratorio (MACKEY e MACGREGOR, 1979).

Analizzando separatamente le frequenze medie di micronuclei nei 4 gruppi di ratti raccolti nei diversi siti (Tab. II), non si osservano differenze statisticamente significative, tuttavia nel sito Fosso del Bufalo il range di valori della frequenza di MPCE/1000 PCE è più ampio (0-7) e la frequenza massima di MPCE più elevata rispetto agli altri siti, mentre a Peretto il range è il più ristretto (0-3) ed il valore della frequenza massima di MPCE è il meno elevato. Non sono state osservate differenze significative tra individui giovani ($x=1,48\pm 1,43$) e adulti ($x=1,38\pm 1,59$), né tra individui di sesso maschile ($1,48\pm 1,5$) e femminile ($1,38\pm 1,58$).

Il valore medio ($x=1,04\pm 0,26$) del rapporto (PCE/NCE) tra il numero di eritrociti policromatici (PCE) e normocromatici (NCE), parametro che evidenzia alterazioni di tipo citotossico e/o danni del midollo osseo, è risultato nella norma.

Dal confronto (Fig. 6) tra questi dati e quelli ottenuti in *R. rattus* provenienti da altre aree (IERADI *et al.*, 1992) emerge che la frequenza media di eritrociti policromatici micronucleati ($x=1,41\pm 1,52$) rilevata nel midollo osseo dei ratti del Parco, pur essendo inferiore al valore soglia di 2, è significativamente più elevata ($p<0,05$) di quella osservata nei ratti raccolti nelle isole Pontine ($x = 0,45\pm 0,69$) e nell'area della Magliana-Roma ($x = 0,31\pm 0,53$).

I risultati ottenuti nel sangue periferico di *R. rattus* mostrano che il range di valori è compreso tra 0 e 0,75 e che la frequenza media di eritrociti micronucleati ($0,22\pm 0,41$) è significativamente meno elevata rispetto a quella osservata nel midollo osseo ($t=4,512$; $p=0,000016$).

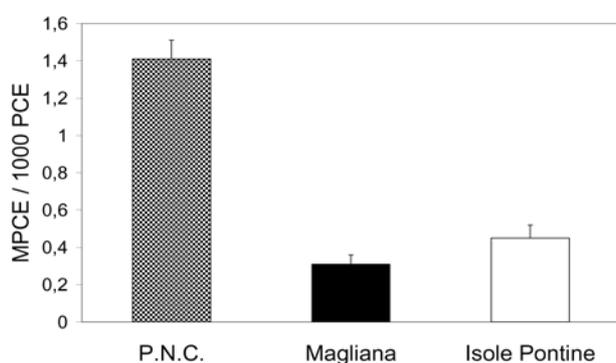


Fig. 6. Frequenze medie di eritrociti policromatici micronucleati (MPCE/1000E) nel midollo osseo di individui di *R. rattus* raccolti nel Parco, nelle Isole Pontine e alla Magliana (Roma), MPCE = eritrociti policromatici micronucleati, PCE = eritrociti policromatici.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti applicando il test dei micronuclei sia nel sangue periferico di *A. sylvaticus* che nel midollo osseo di *R. rattus*, raccolti nel Parco, mostrano che le frequenze medie di micronuclei, pur mantenendosi intorno a valori non elevati ($x = 1,71\pm 1,64$ e $x=1,41\pm 1,52$, rispettivamente), sono maggiori di quelle rilevate in individui delle medesime specie raccolti in alcune aree protette del Lazio e dell'Abruzzo (IERADI *et al.*, 1992; CRISTALDI *et al.*, 2005).

Va sottolineato che il test condotto sul sangue periferico permette di indagare sul danno provocato da esposizione cronica a sostanze mutagene, in quanto gli eritrociti micronucleati tendono ad accumularsi nel sangue periferico; ciò tuttavia non accade nelle specie in cui la milza rimuove i micronuclei dagli eritrociti circolanti (SCHLEGEL e MACGREGOR, 1982, 1984). Il test applicato agli eritrociti policromatici del midollo osseo fornisce invece informazioni sui danni genotossici recenti.

In questo lavoro il test dei micronuclei è stato applicato anche al sangue periferico in *R. rattus*, non essendo noto dalla letteratura se in questa specie, come avviene in *R. norvegicus*, la milza abbia la proprietà di eliminare i micronuclei. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che i valori delle frequenze di eritrociti micronucleati rilevati nel sangue sono significativamente meno elevati ($x = 0,22\pm 0,41$) rispetto a quelli riscontrati nel midollo osseo ($x = 1,41\pm 1,52$). Pertanto, questi dati indicano che *R. rattus* deve possedere, come *R. norvegicus*, una milza di tipo sinusale che elimina i micronuclei dagli eritrociti, impedendo il loro accumulo nel sangue periferico (UDROIU, 2006). Da questo risultato si deduce che in *R. rattus* la milza svolge la funzione di eliminazione dei micronuclei dagli eritrociti e quindi i dati relativi al sangue periferico non possono essere utilizzati nella determinazione del danno genotossico. Tuttavia, in ambedue le specie è possibile applicare il test al sangue periferico eseguendo il conteggio dei micronuclei non negli eritrociti normocromatici, ma unicamente negli eritrociti policromatici (PCE), in quanto trattasi di cellule ematopoietiche che non hanno raggiunto la milza.

Dall'analisi statistica dei dati è emerso che sia in *A. sylvaticus* sia in *R. rattus*, la stagione di raccolta dei campioni, il sesso e l'età dell'animale non influenzano significativamente la frequenza di micronuclei, la quale invece può essere influenzata dal sito dove gli animali vivono. Infatti, in alcuni siti del Parco i valori di queste frequenze sono risultati più elevati che in altri. In ambedue le specie, in *A. sylvaticus* nel sangue periferico e in *R. rattus* nel midollo, l'intervallo più ampio delle frequenze di MN si osserva a Villa Domiziano (0-6 e 0-5, rispettivamente) e a Fosso del Bufalo (0-12 e 0-7,

rispettivamente), mentre nel sito Peretto il range è più ristretto (0-3,5 per *A. sylvaticus* e 0-3 per *R. rattus*). I risultati ottenuti in ambedue le specie sembrano quindi avvalorare l'ipotesi che i siti di Fosso del Bufalo, Villa Domiziano e Pantani siano in una situazione più compromessa rispetto al sito Peretto e ad altre zone protette del Centro Italia.

Il sito Fosso del Bufalo è infatti in stretto contatto con un'area coltivata con prodotti industriali e risulta quindi esposto agli effetti dell'impiego di pesticidi e concimi chimici. Questi risultati concordano con quelli ottenuti in un precedente lavoro (IERADI *et al.*, 1984), effettuato applicando il test dei micronuclei al midollo osseo di esemplari di *A. sylvaticus* raccolti in alcune aree di Roma e provincia (Palombara Sabina, Colleferro e Tevere Due Ponti). Da questo studio è emerso che le frequenze medie di eritrociti policromatici micronucleati (MPCE/1000PCE) sono incluse nel range 0,1-1,6, e che la frequenza più alta è stata rilevata negli individui provenienti da Palombara Sabina, sito soggetto a contaminazione da pesticidi per la sua vicinanza ad un'area agricola.

In particolare, si sottolinea che il sito di Villa Domiziano è inserito in un'area di riserva integrale, non distante da zone urbanizzate ed agricole, situata sulla sponda orientale del Lago di Sabaudia (o Lago di Paola), anch'esso circondato da aree antropizzate, nonché sede di attività turistico-sportive, compresa la visitabilità della riserva, e di un allevamento di mitili. Tutti i siti studiati sono comunque inseriti nel contesto generale della Pianura Pontina, in cui l'impatto antropico, sia diretto che indiretto, diviene sempre più considerevole, a causa principalmente del diffondersi delle monoculture e di siti antropizzati. Studi pregressi sulle acque superficiali del Circeo (MORGANA *et al.*, 2003), hanno dimostrato inoltre la presenza di un inquinamento chimico e microbiologico che sta compromettendo la qualità delle acque del comprensorio.

In conclusione, i risultati ottenuti in particolare con la specie *A. sylvaticus* mostrano un maggiore impatto genotossico, come si evidenzia dalle frequenze medie di micronuclei più elevate nei siti più prossimi sia alle colture che alle acque del lago: Villa Domiziano, Fosso del Bufalo e Pantani, mentre il sito Peretto, più isolato e meno soggetto ad impatto antropico, presenta una frequenza di MN più bassa ($\bar{x}=1,23\pm 1,1$), un range di valori più ristretto (0-3,5) e il maggiore numero di individui con zero micronuclei (23%). Una causa pro-

babile di induzione del danno genotossico può essere imputata alla presenza di pesticidi nelle acque o nel terreno (POLLINI, 1999; MUCCINELLI, 2006). Questi pesticidi sono in prevalenza: ethoprophos ($C_8H_{19}O_2PS_2$), methomyl ($C_5H_{10}N_2O_2S$), diazinon ($C_{12}H_{21}N_2O_3PS$) e tefluthrin ($C_{17}H_{14}ClF_7O_2$), noti per i loro effetti dannosi sull'ambiente (FRANK *et al.*, 1991; KENDALL *et al.*, 1992).

Tuttavia si potrebbe ipotizzare una situazione di rischio ambientale più generalizzata: anche aree, come il sito Peretto, poste sul Promontorio e meno soggette ad impatto antropico, mostrano frequenze di micronuclei meno elevate rispetto agli altri siti analizzati, ma comunque maggiori di quelle ottenute in altre aree, più o meno protette, dell'Italia centrale.

In conclusione, questo studio evidenzia la necessità di considerare il problema del rischio di contaminazione ambientale di origine esogena, soprattutto agricola, all'interno del Parco: il monitoraggio genotossico, quindi, dovrebbe essere eseguito con regolarità, sia nelle aree critiche che in quelle di controllo. Si auspica inoltre di poter effettuare una indagine più approfondita delle sostanze inquinanti per avere un quadro chimico certo e dettagliato delle aree a rischio. Le informazioni così ottenute potranno rivelarsi di fondamentale importanza per comprendere le problematiche relative al territorio del Parco Nazionale del Circeo e per poter attuare di conseguenza un adeguato programma di gestione e controllo territoriale.

I dati ottenuti nel presente studio costituiscono inoltre una base per un auspicabile monitoraggio genotossico delle aree protette, allo scopo di creare una banca dati per studi di impatto ambientale, mediante l'applicazione del test dei micronuclei. A tal proposito è emerso che *Apodemus sylvaticus* è specie più adatta, rispetto a *Rattus rattus*, per gli studi di rilevazione di un eventuale danno genotossico, rappresentando una "specie sentinella", sia per la positiva risposta fornita, sia per il maggior numero di catture di esemplari potenzialmente effettuabili. Infatti *A. sylvaticus* è stato utilizzato come bioindicatore in altri studi di biomonitoraggio (IERADI *et al.*, 1984; CRISTALDI *et al.*, 2005) e sono pertanto disponibili dati di letteratura per opportuni confronti.

RINGRAZIAMENTI

Per la preziosa collaborazione nel lavoro sul campo desideriamo ringraziare Massimo Cecchetti (CFS), Giuseppe Forcina (CFS), Giovanni Mastrobuoni, Giulio Lariccia e Alessandra Noal (CFS).

BIBLIOGRAFIA

AMORI G., CRISTALDI M., REICHEGGER D., SZPUNAR G., MASTROBUONI G., ZERUNIAN S., 2005. Dati preliminari su Insettivori e Roditori del Parco Nazionale del Circeo. In: *Habitat*,

Flora e Fauna del Parco Nazionale del Circeo. Corpo Forestale dello Stato – Ufficio gestione Beni ex ASFD di Sabaudia: 133-139.

- AMORI G., REICHEGGER D., IERADI L.A., ZERUNIAN S., CRISTALDI M., 2008. I micromammiferi del Parco Nazionale del Circeo: I. analisi faunistica. *Biologia Ambientale*, **22** (2): 19-26 (in questo numero).
- CRISTALDI M., CARELLA I., SZPUNAR M., IERADI L.A., 2005. Popolazioni di Roditori in natura quali bioindicatori di rischio genotossico. In: *Montagna e Salute* (a cura di Santucci D., Francia N. Alleva E.). Ist. Naz. Montagna: 55-66.
- CRISTALDI M., IERADI L.A., 2002. L'ambiente Antropico e il controllo di topi e ratti nelle città. In: Atti Convegno Acc. Naz. Lincei "Ecosistemi Urbani". Roma, 22-24 Ottobre 2001. Vol. **182**: 167-180.
- CRISTALDI M., IERADI L.A., LICASTRO E., LOMBARDI BOCCIA G., SIMEONE G., 1985. Wild rodents as biological indicators of environmental impact in nuclear sites. *Acta Zool. Fennica*, **173**: 205-207.
- CRISTALDI M., IERADI L.A., MASCANZONI D., MATTEI T., 1991. Environmental impact of the Chernobyl accident: mutagenesis in bank voles from Sweden. *Int. J. Radiat. Biol.*, **59**(1): 31-40.
- DEGRASSI F., TANZARELLA C., IERADI L.A., ZIMA J., CAPPAI A., LASCIALFARI A., ALLEGRA F., CRISTALDI M., 2001. CREST staining of micronuclei from free-living rodents to detect environmental contamination *in situ*. *Mutagen.*, **14** (4): 391-396.
- ECKL P.M., RIEGLER D., 1997. Levels of chromosomal damage in hepatocytes of wild rats living within the area of a waste disposal plant. *Sci. Total Environ.*, **196**: 141-149.
- FLOWERDEW J.R., 1976. Ecological methods. *Mammal review*, **6**: 123-159.
- FRANK R., MINEAU P., BRAUN H.E., BARKER I.K., KENNEDY S.W., TRUDEAU S., 1991. Deaths of Canada geese following spraying of turf with diazinon. *Boll. Env. Cont. Toxicol.*, **46**: 852-858.
- FRENCH N.R., 1965. Radiations and animal populations: problems, progress and projections. *Health Physics*, **11**: 1557-1568.
- IERADI L.A., 1993. Roditori infestanti: fattori di rischio e indicatori ambientali. *Biologia Oggi*, **VII** (1): 33-40.
- IERADI L. A., CRISTALDI M., AMADDEO D., LILLINI E., NUTI M., 1992. Wild rodents of Pontine Islands as bioindicators of environmental quality. *Hystrix*, **4** (1): 41-49.
- IERADI L. A., CRISTALDI M., MASCANZONI D., CARDARELLI E., GROSSI R., CAMPANELLA L., 1996. Genetic damage in urban mice exposed to traffic pollution. *Environ. Pollut.*, **92**: 323-328.
- IERADI L. A., MORENO S., BOLIVAR J.P., CAPPAI A., DI BENEDETTO A., CRISTALDI M., 1998. Free-living rodents as bioindicators of genetic risk in natural protected areas. *Environ. Pollut.*, **102**: 265-268.
- IERADI L. A., PARADISI S., TOMMASI M., CRISTALDI M., DE LILLIS M., TESTI A., CAVEDON G., MALORNI W., 1984. Saggi biologici per valutazione di impatto ambientale. *Acqua & Aria*, **9**: 935-952.
- IERADI L.A., ZIMA T., ALLEGRA F., KOTLANOVA E., CAMPANELLA L., GROSSI R., CRISTALDI M. 2003. Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic. *Folia Zoologica*, **52**: 57-66.
- KENDALL R.J., BREWER L.W., HITCHCOCK R.R., MAYER J.R., 1992. American pigeon mortality associated with turf application of diazinon AG500. *Journal of Wildlife Diseases*, **28**: 263-267.
- KHALIKOV P.K., 1990. The level of chromosome mutations in the bone marrow cells of wild mice trapped in an area of intensive pesticide use. *Tsitol. Genet.*, **24**: 10-13.
- MACKEY B., MACGREGOR T., 1979. The micronucleus test: statistical design and analysis. *Mut Res.*, **64**: 195-204.
- MATERIJ L.D., MASLOVA K.I., 1978. Micronuclei in peripheral blood cells of *Microtus oeconomus* living in areas of enhanced natural radio activity. *Radiobiologiya*, **18**: 919-922.
- MORGANA G. J., ROSA S., PRATO S., MINCIARDI M.R., BETTA G., GRIMALDI P. 2003. *Qualità delle acque superficiali nel Parco Nazionale del Circeo*. Progetto "Parchi in qualità" ENEA, 28 marzo 2003.
- MUCCINELLI M., 2006. *Prontuario degli agrofarmaci*. Edagricole. Bologna, 992 pp.
- POLLINI A., 1999. *La difesa delle piante da orto*. Edagricole. Bologna, 442 pp.
- SCHLEGEL R., MACGREGOR J.T., 1982. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. *Mut. Res.*, **104**: 367-369.
- SCHLEGEL R., MACGREGOR J.T., 1984. The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: Implication for cytogenetic screening. *Mut. Res.*, **127**: 169-174.
- SCHMID W., 1975. The micronucleus test. *Mut. Res.*, **31**: 9-15.
- TALMAGE R.H., WALTON B.T., 1991. Small Mammals as monitors of environmental contaminants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **199**: 47-145.
- TEMME M., JACKSON W.B., 1978. Palatal ridges as an epigenetic marker in *Rattus rattus* and *Rattus exulans* population. *Z. Säugetierkund*, **43**: 193-203.
- TICE R., ORMISTON B.G., BOUCHER R., LUKE C.A., PAQUETTE D.E., 1987. Environmental biomonitoring with feral rodent species. *Env. Sci. Res.*, **36**: 175-179.
- TULL-SINGLETON S., KIMBALL S., MCBEE K., 1994. Correlative analysis of heavy metal bioconcentration and genetic damage in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) from hazardous waste site. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, **52**: 667-672.
- UDROIU I., 2006. Feasibility of conducting the micronucleus test in circulating erythrocytes from different mammalian species: an anatomical perspective. *Environ. Molec. Mutagen.*, **47**: 643-646.
- WOLFF J.O., 1996. Population fluctuations of mast-eating rodents are correlated with production of acorns. *Journal of Mammalogy*, **77**: 850-856.