



Rapporti ISTISAN

10/40



**Piscicoltura intensiva in ambienti reici:
interazioni ambientali in trotticoltura
in Italia centrale**



ISSN 1123-3117

A cura di
L. Mancini, C. Marinilli, L. Tancioni,
F.A. Aulicino e S. Marcheggiani

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Piscicoltura intensiva in ambienti reici:
interazioni ambientali in trotticoltura
in Italia centrale**

A cura di
Laura Mancini (a), Claudia Marinilli (a), Lorenzo Tancioni (c),
Francesca Anna Aulicino (b) e Stefania Marcheggiani (a)

*(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Organismo di valutazione e accreditamento, ORL
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) Dipartimento di Biologia, Università di Roma "Tor Vergata", Roma

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

10/40

Istituto Superiore di Sanità

Piscicoltura intensiva in ambienti reici: interazioni ambientali in trotticoltura in Italia centrale.

A cura di Laura Mancini, Claudia Marinilli, Lorenzo Tancioni, Francesca Anna Aulicino e Stefania Marcheggiani
2010, 44 p. Rapporti ISTISAN 10/40

La trotticoltura intensiva, da cui deriva la maggiore aliquota di produzione ittica d'allevamento in ambito nazionale, essendo sviluppata soprattutto nelle zone più sensibili degli alti corsi fluviali, può produrre esternalità negative. Ciò può avvenire attraverso la diversione verso gli impianti di porzioni rilevanti dei corsi d'acqua interessati e, soprattutto, con la restituzione al fiume delle stesse acque "arricchite" di residui di mangimi e talvolta di chemioterapici. Per valutare gli effetti delle trotticoltura sui sistemi fluviali interessati sono state analizzate le variazioni stagionali degli indicatori microbiologici, fisico-chimici, chimici e macrobentonici a monte e a valle dello scarico di 10 trotticoltura industriali del centro Italia. Per colonie isolate di *E. coli*, è stata poi valutata l'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza relativi a tre antibiotici consentiti dalla normativa vigente e ad uno vietato dalla stessa. I risultati ottenuti dall'analisi dell'antibiotico-resistenza hanno evidenziato la possibilità che venga, impropriamente, fatto uso del Cloramfenicolo, attualmente vietato nelle pratiche acquacolturali. Questo studio rappresenta un contributo all'ampliamento delle conoscenze sull'impatto ambientale dell'acquacoltura intensiva sui sistemi fluviali, in particolare nell'area dell'Appennino centrale.

Parole chiave: Trotticoltura; Indicatori chimici e chimico-fisici; Macrobenthos; Metriche; Antibiotico resistenza; *E. coli*

Istituto Superiore di Sanità

Intensive fish farming in lotic ecosystems: trout farming and environmental interactions in central Italy.

Edited by Laura Mancini, Claudia Marinilli, Lorenzo Tancioni, Francesca Anna Aulicino and Stefania Marcheggiani
2010, 44 p. Rapporti ISTISAN 10/40 (in Italian)

The trout farming, which represents the most important fish production in Italy, can produce negative impacts on river ecosystems, as poured water discharge contains added nutrients and chemotherapeutic drugs. For the evaluation of trout farming on river ecosystems effects, the seasonal variations of chemical-physical, chemical, microbiological and macrobenthonic indicators were analyzed upstream 100 m and 500 m downstream of 10 industrial trout farms in the centre of Italy. Moreover, for isolated strains of *E. coli*, the spread of the phenomenon of resistance to antibiotics was evaluated (three antibiotics allowed by current law, and one banned). The results of the comparative analysis of environmental indicators observed upstream and downstream of the trout farms indicate, as a general rule, a modest variation of the chemical, chemical-physical and biological indicators. These results showed a possible illegal use of the Chloramphenicol, currently prohibited in aquaculture. This study contributes to enhance knowledge on aquaculture and its impact on environment and on river ecosystems in particular in the area of Italian Central Apennines.

Key words: Trout farming; Chemical and chemical-physical indicators; Macrobenthos; Metrics; Antibiotic resistance; *E. coli*

Autori del presente rapporto

per l'Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria:

Mancini Laura, Marinilli Claudia, Pierdominici Elio, Ciadamidaro Simone, Marcheggiani Stefania,
Puccinelli Camilla, D'Angelo Anna Maria, Mario Figliomeni, Vendetti Claudia

per l'Istituto Superiore di Sanità, Organismo di Valutazione e Accreditamento ORL:

Aulicino Francesca Anna

per l'Università di Roma "Tor Vergata":

Tancioni Lorenzo

Si ringrazia il Prof. Roberto Argano per il contributo critico alla stesura del lavoro e Valentina Della Bella per il supporto tecnico. Si ringraziano inoltre i gestori degli impianti per la disponibilità mostrata nel corso del lavoro.

Per informazioni su questo documento scrivere a: laura.mancini@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Mancini L, Marinilli C, Tancioni L, Aulicino FA, Marcheggiani S (Ed.). *Piscicoltura intensiva in ambienti reici: interazioni ambientali in trotticoltura in Italia centrale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/40).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2010

INDICE

Introduzione	1
Normativa di riferimento	2
Decreto legislativo 152/1999.....	2
Indicatori di qualità e analisi da effettuare.....	3
Direttiva 2000/60/CE.....	4
Decreto legislativo 152/2006.....	4
Decreto legislativo 193/2006.....	4
Area di studio	5
Materiali e metodi	6
Analisi chimico-fisiche.....	6
Analisi chimico-fisiche <i>in situ</i>	6
Analisi chimiche.....	6
Applicazione dell'indice LIM.....	7
Analisi microbiologiche.....	7
Rilevazione di <i>Escherichia coli</i> ed Enterococchi.....	7
Conservazione dei ceppi batterici di <i>Escherichia coli</i>	8
Valutazione dell'antibiotico-resistenza di ceppi di <i>Escherichia coli</i>	8
Saggio per la verifica della resistenza/sensibilità agli antibiotici: metodo di diffusione in agar o metodo Kirby-Bauer.....	8
Analisi della comunità macrobentonica.....	10
Tecnica di campionamento.....	10
Trattamento dei campioni in laboratorio.....	10
Calcolo dell'IBE.....	11
Descrizione delle comunità macroinvertebrati tramite metriche.....	12
Analisi statistica.....	13
Classificazione o <i>cluster analysis</i>	13
Analisi delle componenti principali.....	13
Analisi statistica della varianza.....	13
Risultati	14
Analisi chimico-fisiche.....	14
Valutazione delle variabili chimico-fisiche.....	14
Applicazione dell'Indice LIM.....	28
Analisi microbiologiche.....	30
Calcolo delle Unità Formanti Colonia per <i>E. coli</i> ed Enterococchi.....	30
Antibiotico-resistenza per ceppi batterici di <i>E. coli</i>	31
Analisi della comunità macrobentonica.....	33
Valutazione della struttura della comunità macrobentonica.....	33
Calcolo dell'IBE.....	39
Discussione e conclusioni	41
Bibliografia	43

INTRODUZIONE

L'acquacoltura rappresenta l'attività produttiva a più rapida crescita a livello mondiale nell'ambito delle produzioni alimentari, con un accrescimento medio di oltre il 10% annuo a partire dalla metà degli anni '80 del secolo scorso (FAO, 2003). In Italia, come in molti altri Paesi industrializzati, a tale incremento produttivo, ha contribuito il ruolo fondamentale dell'acquacoltura intensiva che è basata sulla produzione di elevate biomasse ittiche per unità di superficie di allevamento, con la somministrazione di mangimi. Come nel caso dell'allevamento della trota, le produzioni intensive sono spesso finalizzate a produrre "specie carnivore", per la cui alimentazione sono necessari mangimi a elevato contenuto proteico di origine animale, come le farine di pesce, e questo può avere grandi impatti a livello di sostenibilità globale di tali forme produttive (Tancioni & Scardi, 2001).

In Italia la troticoltura, che con oltre 44.000 tonnellate annue rappresenta la principale produzione da piscicoltura (API, 1999), ha da molti anni assunto caratteristiche industriali (Arrignon, 1999; Cautadella, 2001) e ciò ha indotto l'insorgere di problematiche di natura ambientale. Come altre forme di allevamento intensivo, le troticolture, possono, infatti, produrre effetti negativi, rilasciando nei corpi idrici recettori notevoli quantità di sostanze potenzialmente inquinanti sotto forma di mangimi non consumati, feci, residui di sostanze chimiche e antibiotici. La tutela delle acque è regolamentata a livello comunitario dalla Direttiva quadro 2000/60/CE (e dal suo recepimento nazionale con il DL.vo 152/2006) e dal DL.vo 193/2006 per quanto riguarda l'impiego, il divieto e la definizione di medicinali veterinari.

Il presente lavoro è stato finalizzato a valutare l'influenza dei principali impatti ambientali di troticolture industriali sulle porzioni dei corsi d'acqua recettori dei reflui idrici degli impianti. A tal fine sono stati identificati 10 impianti di troticoltura nel Centro Italia nei quali sono stati valutati gli impatti dei reflui sui sistemi acquatici recettori attraverso l'analisi delle eventuali variazioni, su base stagionale, di alcuni indicatori. Sono stati rilevati parametri chimico-fisici, chimici, microbiologici (*Escherichia coli* ed Enterococchi) e analizzata la struttura della comunità dei macroinvertebrati bentonici (Hynes, 1960).

Colonie di *Escherichia coli*, isolate nell'ambito del campionamento invernale, sono state sottoposte a saggi per la verifica della sensibilità ad alcuni antibiotici, per valutare la diffusione della resistenza agli antibiotici nell'ambiente e testare eventuali differenze tra i siti a monte e a valle degli impianti. I siti a valle sono stati posizionati sia a 100 che a 500 metri di distanza dall'immissione dei reflui per valutare l'eventuale capacità di recupero dei sistemi recettori.

Tale studio contribuisce, quindi, ad un livello di base, all'acquisizione di nuovi dati sulle problematiche della antibiotico-resistenza in natura e, per le possibili ricadute di interesse gestionale, all'ampliamento delle conoscenze sull'impatto ambientale dell'acquacoltura intensiva sui sistemi acquatici naturali costituendo uno dei primi contributi su tale tematica in ambito nazionale.

NORMATIVA DI RIFERIMENTO

Decreto legislativo 152/1999

Il DL.vo 152/1999 definisce la disciplina per la tutela delle acque perseguendo gli obiettivi di prevenire e ridurre l'inquinamento, risanare e migliorare lo stato delle acque, proteggere le acque destinate ad usi particolari, garantire gli usi sostenibili delle risorse e mantenere la capacità naturale di auto-depurazione dei corpi idrici, necessaria a sostenere comunità animali e vegetali ampie e ben diversificate.

I punti salienti che caratterizzano il DL.vo 152/1999 e successive modifiche sono:

- una politica della tutela delle acque che integra gli aspetti qualitativi con quelli quantitativi;
- una politica di risanamento e prevenzione basata sugli obiettivi di qualità dei corpi idrici recettori e sulla necessità di diversificare le azioni di prevenzione in base alle criticità presenti sul territorio.

Il raggiungimento degli obiettivi del decreto è affidato a una molteplicità di strumenti, tra questi: gli obiettivi di qualità ambientale, i piani di tutela e il monitoraggio delle acque. La normativa fornisce, infatti, i criteri di selezione dei corpi idrici significativi, su cui vanno attuate le azioni di monitoraggio. Nelle Tabelle 1 e 2 si riportano rispettivamente un elenco esemplificativo dei corpi idrici significativi nelle diverse tipologie di acque dolci superficiali e l'elenco delle acque a specifica destinazione d'uso.

Tabella 1. Tipologie di corpi idrici superficiali significativi ai sensi del DL.vo 152/1999

Tipologia	Criteri	Dimensione
Corsi d'acqua superficiali	Corsi d'acqua superficiali di 1° Ordine il cui bacino imbrifero abbia superficie maggiore di 200 km ² ; Corsi d'acqua di 2° Ordine o superiore il cui bacino imbrifero abbia superficie superiore a 400 km ² ; Corsi d'acqua di qualunque Ordine e dimensioni che per valori naturalistici e/o paesaggistici o per particolari utilizzazioni in atto, hanno rilevante interesse ambientale	234 corsi d'acqua di I e II Ordine per 288.026 km ² (95% del territorio)
Laghi	Laghi aventi superficie dello specchio liquido, riferita al periodo di massimo invaso, pari a 0,5 km ²	69 laghi naturali
Corpi idrici artificiali	Canali artificiali aventi portate di esercizio di almeno 3 m ³ /s; Laghi artificiali e serbatoi aventi superficie dello specchio liquido pari a 1 km ² o un volume di invaso, nel periodo di massimo invaso, di 5 milioni di m ³	183 laghi artificiali Canali: da definire

Tabella 2. Tipologie di corpi d'acqua a specifica destinazione d'uso ai sensi del DL.vo 152/1999

Tipologia di acque	Criteri	Dimensione
Destinate alla potabilizzazione	Acque dolci superficiali e sotterranee utilizzate o destinate alla produzione di acqua potabile dopo opportuno trattamento	498 corpi idrici superficiali
Idonee alla vita dei pesci	Acque idonee alla vita dei pesci	Classificati: 4.682 km di fiumi; 551 km ² di laghi
Idonee alla vita del molluschi	Acque idonee alla vita del molluschi	Designazioni: 3110 km ² di aree marine, 771 km ² di aree salmastre

Gli obiettivi di qualità prefissati sono di mantenere o raggiungere lo stato di qualità ambientale “buono” o “elevato” entro il 2016 e la classe di qualità “sufficiente” per tutti i corpi idrici, entro il 31 dicembre 2008.

Lo stato di qualità ambientale dei corpi idrici superficiali è definito sulla base dello stato ecologico e dello stato chimico del corpo idrico.

Lo stato ecologico dei corpi idrici superficiali è l'espressione della complessità degli ecosistemi acquatici, e della natura fisica e chimica delle acque e dei sedimenti, delle caratteristiche del flusso idrico e della struttura fisica del corpo idrico, considerando comunque prioritario lo stato degli elementi biotici dell'ecosistema.

Lo stato chimico è definito in base alla presenza di sostanze chimiche pericolose; nell'Allegato I del DL.vo 152/1999 vengono riportati i principali inquinanti chimici da controllare nelle acque dolci superficiali.

Indicatori di qualità e analisi da effettuare

Ai fini della prima classificazione della qualità dei corsi d'acqua sulla matrice acquosa e sul biota vanno eseguite determinazioni che, qualora ne ricorra la necessità, possono essere integrate da indagini sui sedimenti e da test di tossicità.

Le *determinazioni sulla matrice acquosa* riguardano due gruppi di parametri, quelli di base e quelli addizionali.

I parametri di base, riportati nella Tabella 3 riflettono le pressioni antropiche tramite la misura del carico organico, del bilancio dell'ossigeno, dell'acidità, del grado di salinità e del carico microbiologico nonché le caratteristiche idrologiche del trasporto solido. I parametri definiti macrodescrittori vengono utilizzati per la classificazione e la loro combinazione porta alla formulazione del Livello di Inquinamento da Macrodescrittori (LIM); gli altri parametri servono a fornire informazioni di supporto per l'interpretazione delle caratteristiche di qualità e di vulnerabilità del sistema nonché per la valutazione dei carichi trasportati.

La determinazione dei parametri di base è obbligatoria.

Tabella 3. Parametri di base con indicazione se macrodescrittori utilizzati per la classificazione ai sensi del DL.vo 152/1999

Parametri di base	Unità di misura	Parametri macrodescrittori
Portata	m ³ /s	
pH		
Solidi sospesi	mg/L	
Temperatura	(°C)	
Conducibilità	µS/cm (20°C) **	
Durezza	mg/L di CaCO ₃	
Azoto totale	N mg/L **	
Azoto ammoniacale	N mg/L *	X
Azoto nitrico	N mg/L *	X
Ossigeno disciolto	mg/L **	X
BOD ₅ (<i>Biochemical Oxygen Demand</i>)	O ₂ mg/L **	X
COD (<i>Chemical Oxygen Demand</i>)	O ₂ mg/L **	X
Ortofosfato	P mg/L *	
Fosforo totale	P mg/L **	X
Cloruri *	Cl ⁻ mg/L	
Solfati	SO ₄ ⁻ mg/L*	
<i>Escherichia coli</i>	Unità Formanti Colonia (UFC) /100 mL	X

(*) determinazione sulla fase disciolta (**) determinazione sul campione tal quale

Le *determinazioni sul biota* riguardano due gruppi di analisi, di base e supplementari.

Per le analisi di base, gli impatti antropici sulle comunità animali dei corsi d'acqua vengono valutati attraverso l'Indice Biotico Esteso (IBE). Tale analisi va eseguita obbligatoriamente.

Le analisi supplementari sono da eseguire solamente a giudizio dell'Autorità che effettua il monitoraggio al fine di un'analisi più approfondita delle cause di degrado del corpo idrico. Possono in tal caso essere effettuati saggi biologici finalizzati alla evidenziazione di effetti a breve e a lungo termine.

Direttiva 2000/60/CE

Tale direttiva si propone di istituire un quadro per la protezione delle acque superficiali, delle acque di transizione, delle acque costiere e sotterranee.

L'obiettivo di fondo consiste nel mantenere e migliorare l'ambiente acquatico all'interno della Comunità, attraverso misure che riguardano la qualità, integrate con misure riguardanti gli aspetti quantitativi.

Gli elementi biologici, infatti, non si limitano alla popolazione di macroinvertebrati, ma comprendono anche fitoplancton, macrofite, fitobenthos e fauna ittica; acquisisce importanza a sostegno dei parametri biologici anche la valutazione di elementi idromorfologici: il regime idrologico, la continuità fluviale e le condizioni morfologiche.

Decreto legislativo 152/2006

Il DL.vo 152/2006 entrato in vigore il 3 aprile 2006 riprende le indicazioni fornite dal DL.vo 152/1999 e dalla Direttiva 2000/60/CE unendone gli aspetti principali.

I parametri descrittivi per i corsi d'acqua superficiali sono gli stessi del DL.vo 152/1999, per quanto riguarda gli elementi biologici invece sono presenti tutte le novità introdotte dalla Direttiva 2000/60/CE: l'analisi dei vari livelli della catena trofica e lo studio delle comunità attraverso composizione e abbondanza delle specie. Il DL.vo 152/2006 rappresenta il recepimento della Direttiva Europea 2000/60 in Italia seppure nella forma di "testo unico" per la tutela dell'ambiente, infatti solo nella Parte Terza di tale Decreto viene affrontata la tutela delle acque dall'inquinamento e la gestione delle risorse idriche.

Decreto legislativo 193/2006

In Italia, la detenzione, l'impiego, il divieto e la definizione dei medicinali veterinari sono stabilite dal DL.vo 193/2006 entrato in vigore il 6 aprile 2006 in "Attuazione della direttiva europea 2004/28/CE recante il codice comunitario dei medicinali veterinari". Questo, per definire i Limiti Massimi di Residui (LMR) di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale, si basa sul precedente Reg. CEE 2377/90/ del Consiglio del 26 giugno 1990. Nell'Allegato I di tale regolamento sono incluse le sostanze con LMR definitivi, e sono menzionate le Tetracicline, l'Amoxicillina triidrato e la Flumequina, per le quali è autorizzato l'impiego sui pesci rispettando però le limitazioni descritte nel regolamento stesso. Nell'Allegato IV sono invece incluse tutte le sostanze vietate e tra queste troviamo il Cloramfenicolo.

AREA DI STUDIO

Sono stati oggetto di questo studio 10 impianti di tritocoltura localizzati lungo 5 sistemi fluviali del Centro Italia. I punti di campionamento sono stati selezionati a monte di ciascun impianto e a 100 e 500 metri a valle degli impianti, per un totale di 26 stazioni di prelievo (Tabella 4) con cadenza stagionale nell'anno 2007. Nel bacino idrogeografico del fiume Tevere sono state individuate le seguenti stazioni di campionamento: 8 stazioni lungo l'asta fluviale del fiume Nera e rispettivamente 3 stazioni a Castel Sant'Angelo, 2 a Ussita e 3 a Borgo Cerreto; 6 stazioni nel bacino del fiume Velino (3 a Colli sul Velino, e 3 a Cànetra); e 2 stazioni sul fiume Corno a Biselli. All'interno del bacino idrogeografico del fiume Aterno-Pescara sono state individuate le seguenti stazioni: 2 stazioni a Capestrano, 3 a Bussi sul Tirino e 3 a Popoli sul rio S. Callisto. Nel bacino idrogeografico del fiume Potenza sono state posizionate 2 stazioni sul Torrente Scarsito affluente del fiume Potenza a Sefro.

Per alcuni impianti non è stato possibile effettuare i campionamenti nei siti a 100 m a valle, perché ubicati in zone recintate di proprietà privata.

Tabella 4. Stazioni di campionamento, e loro codice, utilizzate nello studio (2007)

Stazione	Codice stazione
Bacino idrogeografico del fiume Tevere	
Stazione 1	CSA M
Stazione 2	CSA 100
Stazione 3	CSA 500
Stazione 4	USS M
Stazione 5	USS 500
Stazione 6	BC M
Stazione 7	BC 100
Stazione 8	BC 500
Stazione 9	COL M
Stazione 10	COL 100
Stazione 11	COL 500
Stazione 12	CAN M
Stazione 13	CAN 100
Stazione 14	CAN 500
Stazione 15	BIS M
Stazione 16	BIS 500
Bacino idrogeografico del fiume Aterno-Pescara	
Stazione 17	POP M
Stazione 18	POP 100
Stazione 19	POP 500
Stazione 20	BUS M
Stazione 21	BUS100
Stazione 22	BUS 500
Stazione 23	CAP M
Stazione 24	CAP 500
Bacino idrogeografico del fiume Potenza (Torrente Scarsito)	
Stazione 25	SEF M
Stazione 26	SEF 500

MATERIALI E METODI

Analisi chimico-fisiche

Analisi chimico-fisiche *in situ*

In concomitanza ai campionamenti sono state effettuate sul campo misurazioni di pH, conducibilità (cond.), temperatura e ossigeno disciolto utilizzando sonde portatili disponibili in commercio.

Analisi chimiche

Il prelievo dell'acqua è stato effettuato con flaconi in vetro da 1000 mL dotati di chiusura ermetica con tappo a vite preventivamente lavate.

Il trasporto in laboratorio è stato effettuato in frigoriferi dotati di panetti refrigeranti sufficienti a mantenere la temperatura a 4-8°C. In laboratorio i campioni sono stati conservati in frigorifero ad una temperatura di 4-8°C.

Le analisi sono state effettuate generalmente al momento dell'arrivo in laboratorio, in ogni caso entro le 24 ore dalla data del campionamento.

La determinazione delle concentrazioni dei soluti, eccettuata la domanda biologica di ossigeno (*Biochemical Oxygen Demand*, BOD₅) per la quale è stato utilizzato il sistema Oxitop, è stata effettuata con saggi di tipo colorimetrico, utilizzando uno spettrofotometro (UV-visibile) Aquamate e i kit per le misurazioni delle concentrazioni dei parametri qui di seguito riportati:

– *Fosfati*

Gli ioni ortofosfato formano, con gli ioni molibdato in soluzione solforica, acido fosfomolibdico. Quest'ultimo viene ridotto con acido ascorbico a blu di fosfomolibdeno, la cui concentrazione, espressa in mg/L, viene determinata fotometricamente alla lunghezza d'onda di 710 nm.

– *Nitrati*

Gli ioni nitrato, in presenza di cloruro in soluzione di acido solforico molto concentrata, formano con resorcina un colorante indofenolico violetto rosso, il quale viene determinato fotometricamente alla lunghezza d'onda di 505 nm. La concentrazione di nitrati viene espressa in mg/L.

– *Ammonio*

L'azoto ammoniacale si trova in parte in forma di ioni ammonio e in parte come ammoniaca. Tra le due forme esiste un equilibrio dipendente dal pH. In soluzione fortemente alcalina, in cui praticamente esiste solo ammoniaca, ha luogo con un agente clorante una trasformazione in monocloroammina. Quest'ultima forma con timolo un derivato blu di indofenolo, il quale viene determinato fotometricamente a 692 nm. La concentrazione di ammonio viene espressa in mg/L.

– *COD (Chemical Oxygen Demand)*

La domanda chimica di ossigeno (COD) corrisponde alla quantità d'ossigeno proveniente da bicromato potassico, che reagisce sulle condizioni del procedimento specificato con le sostanze ossidabili contenute in un litro d'acqua. Il campione d'acqua viene ossidato con una soluzione solforica calda di bicromato di potassio e solfato d'argento come

catalizzatore. I cloruri vengono mascherati da solfato di mercurio. In seguito viene determinata fotometricamente a 348 nm la concentrazione degli ioni cromato gialli non consumati.

– **BOD₅**

La domanda biologica di ossigeno misura la frazione di ossigeno disciolto (in mg/L) utilizzata da una popolazione microbica eterogenea per metabolizzare, in condizioni specifiche di temperatura, il materiale organico biodegradabile presente in una quantità d'acqua. Poiché la completa biodegradazione della sostanza organica richiederebbe un periodo troppo lungo (circa 20 giorni), nella pratica tale periodo viene ridotto a 5 giorni. In questo studio l'analisi è stata svolta sempre a partire dal giorno di campionamento dell'acqua, utilizzando il sistema Oxitop, basato sulla misura di variazione di pressione effettuata attraverso l'uso di un sensore elettronico di pressione.

Applicazione dell'indice LIM

Il calcolo dell'indice LIM viene effettuato in base alla Tabella 5.

Tabella 5. Parametri utilizzati per l'Indice LIM

Parametro		Livello 1	Livello 2	Livello 3	Livello 4	Livello 5
%saturOx		≤ 10	≤ 20	≤ 30	≤ 50	< 50
BOD ₅	mg/mL	< 2,5	≤ 4	≤ 8	≤ 15	> 15
COD	mg/mL	< 5	≤ 10	≤ 15	≤ 25	> 25
NH ₄	mg/mL	< 0,03	≤ 0,10	≤ 0,50	≤ 1,5	> 1,5
NO ₃	mg/mL	< 0,3	≤ 1,5	≤ 5	≤ 10	> 10
P tot	mg/mL	< 0,07	≤ 0,15	≤ 0,3	≤ 0,6	> 0,6
<i>E.coli</i>	UFC/100mL	<100	≤ 1000	≤ 5000	≤ 20000	> 20000
Punteggio		80	40	20	10	5
LIM		480-560	240-475	120-235	60-115	< 60

Analisi microbiologiche

Rilevazione di *Escherichia coli* ed Enterococchi

Le analisi microbiologiche per l'accertamento della contaminazione fecale delle acque hanno riguardato il rilevamento di *Escherichia coli* ed Enterococchi. I campioni di acqua prelevati e posti in contenitori sterili da 100 mL sono stati trasportati in un frigorifero da campo (4-8°C) e analizzati al rientro in laboratorio oppure, mantenuti in frigorifero a 4-8°C, e sottoposti ai saggi microbiologici al massimo entro 24 ore dal campionamento.

Le analisi per il rilevamento di *Escherichia coli* ed Enterococchi sono state eseguite seguendo il metodo della filtrazione attraverso membrana ed enumerazione successiva delle colonie sviluppatesi su di essa. Sono state utilizzate membrane filtranti 60 x 15 mm di 0,45 µm di porosità (APHA, 1998).

Tutti i campioni prima della filtrazione hanno subito processo di diluizione utilizzando come diluente soluzione fisiologica tamponata sterile. Sono stati sottoposti a filtrazione quantità di 10 mL dei campioni non diluiti e quantità di 10 mL delle diluizioni dei campioni, rispettivamente 1:10 e 1:100.

Una volta operata la fase della filtrazione, le membrane sono state poste su capsule Petri da 20 mm di diametro contenenti i terreni di coltura selettivi TBX Medium (Oxoid) e Slanetz Bartley Medium (SB)(Oxoid) rispettivamente per l'isolamento di *Escherichia coli* e di Enterococchi.

Le piastre di TBX Medium sono state poste ad incubare per 24 h ad una temperatura 44°C mentre le piastre di SB per 48 ore a 37°C.

Dopo incubazione su TBX sono state enumerate come *Escherichia coli* le colonie colorate di blu scuro mentre quelle rosso scuro-marrone sviluppatasi su agar SB sono state considerate ed enumerate come Enterococchi.

Le colonie di *Escherichia coli* sono state isolate su capsule Petri contenenti TSA (*Tryptose Sulphate Agar*) per le successive prove di conferma: ossidasi e colorazione Gram. Le colonie ossidasi negative e Gram negative, quindi, confermate come *Escherichia coli*, sono state successivamente sottoposte alle prove biochimiche miniaturizzate API 20 NE.

Conservazione dei ceppi batterici di *Escherichia coli*

Tutte le colonie confermate come *Escherichia coli* sono state ripassate su capsule Petri di TSA, incubate a 37°C per 24 ore e successivamente le colonie isolate sono state seminate in provette di TSA a becco di clarino in polistirene da 14 mL con fondo tondo e con tappo a scatto, incubate a 37°C per 24 ore. Una volta verificata la crescita dei diversi ceppi le provette di TSA sono state conservate a 4-8°C per non più di 30 giorni. In ogni caso è stata effettuata una verifica intermedia della vitalità dei ceppi.

Valutazione dell'antibiotico-resistenza di ceppi di *Escherichia coli*

Tutte le colonie di *Escherichia coli* isolate nel periodo invernale, cioè 428, sono state sottoposte a saggi di resistenza ai seguenti antibiotici: Cloramfenicolo, Tetraciclina, Flumequina e Amoxicillina.

Gli antibiotici utilizzati per effettuare i saggi di resistenza/sensibilità sulle colonie di *Escherichia coli* isolate nel corso del presente lavoro sono stati scelti in base alla loro diffusione nelle pratiche acquacolturali, nelle quali, quasi sempre, vengono somministrati ai pesci di allevamento direttamente nei mangimi. La scelta del Cloramfenicolo è stata fatta perché questo antibiotico è tra le sostanze vietate dal Reg. CE 2377/90 (Allegato IV del Regolamento).

Saggio per la verifica della resistenza/sensibilità agli antibiotici: metodo di diffusione in agar o metodo Kirby-Bauer

Gli antibiotici selezionati per questo studio sono stati utilizzati in forma di dischetti (Oxoid). Le concentrazioni per dischetto corrispondono alle concentrazioni minime inibenti (*Minimum Inhibiting Concentration*, MIC) e sono le seguenti:

- Cloramfenicolo (C) 30 µm,
- Tetraciclina (TE) 30 µm,
- Flumequina (UB) 30 µm,
- Amoxicillina (AML) 10 µm.

Il metodo per saggiare la sensibilità/resistenza agli antibiotici selezionati è stato quello della diffusione in agar o metodo Kirby-Bauer (Bauer & Kirby, 1966), che consiste nella semina delle colonie, da sottoporre alla prova di resistenza agli antibiotici, sulla superficie di terreni

agarizzati su cui si pongono successivamente dischetti imbibiti di antibiotici. Dopo opportuna incubazione si rilevano gli eventuali aloni di inibizione e se ne misura l'estensione.

Di seguito si descrivono le diverse fasi del saggio:

– I FASE: *Preparazione delle piastre*

Per la prova è previsto l'uso del terreno Mueller-Hinton Agar(MH)(Oxoid). Il terreno, preparato seguendo le istruzioni della ditta fornitrice, una volta sterilizzato per 15 minuti a 121°C e raffreddato fino alla temperatura di 45-50°C è stato distribuito in piastre Petri da 90 mm di diametro in quantità sufficiente ad ottenere uno spessore di 4 mm. Particolare attenzione deve essere prestata in questa fase poiché il terreno di coltura deve presentarsi sufficientemente umido ma non devono essere presenti goccioline di condensa sotto i coperchi delle capsule Petri.

– II FASE: *Preparazione dell'inoculo*

I ceppi di *Escherichia coli* da sottoporre a prova si seminano su capsule Petri di TSA con successiva incubazione a 37°C per una notte. Si prelevano le colonie isolate che vengono risospese in provette contenenti 5 mL di *Tryptone Soya Broth* (TSB) e poi incubate a 37°C fino ad ottenere una torbidità uguale allo standard 0,5 di McFarland (0,5 mL di BaCl₂ 0,048 M + 99,50 mL di H₂SO₄ 0,36 M). La comparazione tra l'inoculo e lo standard viene fatta su uno sfondo con righe nere di contrasto. La torbidità dell'inoculo può essere aggiustata aggiungendo brodo sterile o soluzione fisiologica. Lo standard deve essere agitato con il vortex prima della verifica della torbidità. Entro 15 minuti dalla verifica/aggiustamento della torbidità dell'inoculo si immerge un tampone di Dacron nella sospensione, allontanando l'eccesso di liquido lungo la parete della provetta; si effettua l'inoculo strisciando il tampone sulla superficie delle piastre di Mueller-Hinton Agar e ruotando la piastra di 60°C per almeno 3 volte e 3 direzioni così da distribuire uniformemente la brodocoltura su tutta la superficie della piastra.

– III FASE: *Deposizione dei dischetti e incubazione*

Attendere 3-5 minuti, in ogni caso più di 15, affinché la superficie delle piastre su cui è stato effettuato l'inoculo con la brodocoltura in TSB si asciughi bene, quindi deporre i dischetti contenenti gli antibiotici. Questa fase della prova deve essere condotta seguendo accuratamente le istruzioni poiché se il dischetto viene posto sulla superficie di terreno non ben asciutta i microrganismi possono svilupparsi attorno ad esso e ridurre l'eventuale area di inibizione. Per posizionare i dischi sono utilizzate pinzette sterili con le quali si opera una leggera pressione per assicurare il contatto col terreno di coltura. Gli antibiotici diffondono immediatamente dopo il contatto pertanto i dischi non possono essere riposizionati. Per evitare la sovrapposizione delle zone di inibizione non devono essere distribuiti più di 6 dischi per piastre da 90 mm di diametro e più di 12 dischi per quelle da 150 mm. Le piastre contenenti i dischetti sono rovesciate e incubate in condizioni aerobiche a 35-37°C per 16-18 ore. L'incubazione deve iniziare non oltre 15 minuti dall'applicazione dei dischetti per permettere che i microrganismi siano posti il più presto possibile nelle condizioni ottimali di sviluppo.

– IV FASE: *Interpretazione degli aloni*

Si effettua l'osservazione delle piastre per la rilevazione della presenza degli aloni di inibizione, che sono circolari, e si procede alla misurazione delle aree di inibizione. La misura è effettuata mediante un righello millimetrato o un calibro e deve includere anche il diametro del dischetto di carta oltre che l'alone di inibizione vero e proprio. La misura del diametro è espressa in millimetri. L'interpretazione degli aloni di inibizione si ottiene confrontando i valori dei diametri con i valori di apposite tabelle (CLSI, 2004) per cui il microrganismo può essere classificato come: S (sensibile), I (intermedio), R (resistente).

Analisi della comunità macrobentonica

Tecnica di campionamento

Il campionamento è stato effettuato, nei siti in cui la profondità dell'acqua lo rendeva possibile, su un transetto obliquo lungo uno dei due margini del fiume. Sono stati indagati i diversi microhabitat presenti: raschi con maggior velocità di flusso e turbolenza, pozze caratterizzate da sedimenti fini e basse velocità di flusso; tratti con maggior presenza di vegetazione. La raccolta dei macroinvertebrati bentonici è stata condotta seguendo la metodologia standard della tecnica del "calcio" (*kick-sampling*) per 3 minuti (Wright *et al.*, 1997). Il campionamento è stato effettuato usando un retino immanicato di dimensioni standard (25 × 40 cm e 20 maglie per centimetro). Il retino è stato posizionato sul fondo dell'alveo con l'apertura rivolta contro corrente, affinché vi si raccogliesse il materiale smosso dal fondo con i piedi. Ove possibile, si è avuta cura di pulire con le mani i ciottoli presenti al fine di raccogliere più accuratamente possibile organismi ad essi aderenti.

Il materiale raccolto veniva riversato in secchielli di plastica con etanolo al 95% e portato in laboratorio per lo smistamento e l'identificazione tassonomica.

Trattamento dei campioni in laboratorio

I campioni sono stati passati al setaccio per eliminare i sedimenti e detriti più fini, avendo cura di pulire foglie e materiale inorganico più grossolano da eventuali organismi. Il materiale raccolto in una vaschetta bianca è stato analizzato dispensandone piccole quantità in un'altra vaschetta, affinché i macroinvertebrati fossero più facilmente visibili.

Gli organismi raccolti con l'uso di pinzette morbide sono stati riconosciuti a livello tassonomico di genere o famiglia utilizzando uno stereoscopio e con l'ausilio di guide per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci (Tachet *et al.*, 1984; Campaioli *et al.*, 1999; Sansoni, 1988) (così come richiesto per applicare l'IBE) (Tabella 6) (Ghetti, 1997).

Tabella 6. Livello di determinazione richiesto per la definizione delle Unità Sistematiche (US)

Gruppi faunistici	Livelli di determinazione tassonomica per definire le US
Plecoteri	Genere
Tricotteri	Famiglia
Efemerotteri	Genere
Coleotteri	Famiglia
Odonati	Genere
Ditteri	Famiglia
Eterotteri	Famiglia
Crostacei	Famiglia
Gasteropodi	Famiglia
Bivalvi	Famiglia
Tricladi	Genere
Irudinei	Genere
Oligocheti	Famiglia
Megalotteri, Planipenni, Nematomorfi, Nemertini*	<i>presenza</i>

* taxa rinvenuti poco frequentemente nelle acque correnti italiane

Non si è potuto raggiungere un livello tassonomico inferiore per motivi di tempo e difficoltà nell'identificazione più accurata di un così gran numero di *taxa* senza l'aiuto di specialisti per ciascun gruppo. Gli organismi sono stati conservati in provette con etanolo al 95%, opportunamente etichettate e datate, e suddivisi in base al *taxon* di appartenenza. Per ogni stazione campionata è stata compilata una scheda nella quale vengono riportate le caratteristiche del sito, la lista faunistica e il relativo valore dell'indice IBE calcolato, con la classe di qualità ad esso attribuita.

Calcolo dell'IBE

Per calcolare i valori dell'indice il metodo prevede una tabella a doppia entrata (Tabella 7), costruita considerando il numero delle Unità Sistematiche (US) campionate (generi o famiglie a seconda dei *taxa*, vedi Tabella 6) e un ordine di *taxa* con sensibilità decrescente all'inquinamento (Ghetti, 1997).

Tabella 7. Tabella per il calcolo del valore IBE

Gruppi faunistici che determinano l'ingresso orizzontale in tabella (primo ingresso)	Numero totale delle US costituenti la comunità (secondo ingresso)								
	0-1	2-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	≥36
Plecopterari (<i>Leuctra</i>)°									
>1 US	–	–	8	9	10	11	12	13*	14*
1 US	–	–	7	8	9	10	11	12	13*
Efemerotteri (esclusi <i>Baetidae</i> e <i>Caenidae</i>)°°									
>1 US	–	–	7	8	9	10	11	12	–
1 US	–	–	6	7	8	9	10	11	–
Tricotteri									
>1 US	–	5	6	7	8	9	10	11	–
1 US	–	4	5	6	7	8	9	10	–
Gammaridi, Atiidi e Palemonidi									
tutte US sopra assenti	–	4	5	6	7	8	9	10	–
Asellidi									
tutte US sopra assenti	–	3	4	5	6	7	8	9	–
Oligocheti o Chironomidi									
tutte US sopra assenti	1	2	3	4	5	–	–	–	–
Tutti i <i>taxa</i> precedenti assenti									
possono essere presenti	–	–	–	–	–	–	–	–	–
organismi a respirazione aerea	–	–	–	–	–	–	–	–	–

° Nelle comunità in cui il genere *Leuctra* è presente come unico *taxon* di Plecopterari e sono contemporaneamente assenti gli Efemerotteri tranne *Baetidae* e *Caenidae*, esso deve essere considerato al livello dei Tricotteri al fine dell'entrata orizzontale in tabella;

°° Nelle comunità in cui sono assenti i Plecopterari (tranne eventualmente *Leuctra*) e fra gli Efemerotteri sono presenti solo *Baetidae* e *Caenidae*, l'ingresso orizzontale in tabella avviene al livello dei Tricotteri;

– indica un giudizio dubbio per errore di campionamento, per presenza di organismi da drift erroneamente considerati nel computo, per ambiente non colonizzato adeguatamente, per tipologie non valutabili con l'indice (es. sorgenti, acque di scioglimento di nevai, acque ferme, zone delizie, zone salmastre, ecc.);

* indica valori dell'indice raggiunti raramente nelle acque correnti italiane. Si tratta in genere di ambienti ad elevata diversità, ma occorre evitare la somma di biotipologie diverse che porterebbe ad un incremento artificioso della ricchezza in *taxa*.

Per quanto riguarda il numero delle US non vanno considerate quelle riscontrate con un numero minimo di individui, tali da far ritenere che la loro presenza sia dovuta al fenomeno del *drift*. Per *drift* si intende il processo di trasporto verso valle di un piccolo numero di organismi e può essere costante, comportamentale (legato alla fase di sfarfallamento di alcuni insetti) e catastrofico (generalmente a causa di ondate di piena). Per questo motivo in un sito si potrebbero trovare degli organismi che non sono rappresentanti stabili della comunità. Esistono perciò tabelle che, considerando la predisposizione al *drift* dei vari *taxa*, indicano il numero minimo di presenze da trovare per poter prendere in considerazione quel determinato *taxon*.

Gli ingressi orizzontale e verticale vengono quindi scelti rispettivamente in corrispondenza del *taxon* più sensibile raccolto in un determinato sito e del numero totale delle US presenti; questi determinano nel loro punto di intersezione il valore dell'indice; tale valore può essere tradotto in classi di qualità che vanno da I (acque non inquinate) a V (acque fortemente inquinate). Poiché l'indice assume valori discreti, sono previste classi di qualità intermedie, per meglio tradurre il dato biologico in valore numerico.

Le diverse classi possono essere rappresentate cartograficamente mediante colori o tratteggi stabiliti convenzionalmente e riportate in mappe di qualità biologica.

Descrizione delle comunità macroinvertebrati tramite metriche

Secondo le richieste della Direttiva 2000/60/CE lo studio delle comunità biotiche dei corsi d'acqua deve riguardare sia la composizione tassonomica sia le abbondanze dei *taxa* che le compongono, standardizzando i valori rispetto ad una superficie di campionamento definita. Il possesso di dati quantitativi relativi a superfici note permette infatti il calcolo di "metriche" (grandezze calcolate sui dati ottenuti dalla conta dei macroinvertebrati raccolti) in grado di descrivere con accuratezza e precisione le condizioni in cui versano le comunità biologiche e quindi i corsi d'acqua che le ospitano (Hawkes, 1979; Hellawell, 1986). Di conseguenza, il metodo IBE, non rispondendo efficacemente alla Direttiva 2000/60/CE, è stato sostituito da alcuni indici metrici basati proprio su queste metriche:

- EPT (Ephemeroptera-Plecoptera-Tricoptera)
Si calcola sommando le abbondanze relative degli ordini degli Efemerotteri, Plecotteri e Tricotteri rispetto al totale di organismi che compongono la comunità studiata. Questi tre ordini racchiudono tutti gli organismi più sensibili alle fonti di disturbo dei corsi d'acqua. La metrica ha un valore che può variare da 0 a 1.
- 1-GOLD (1- Gasteropoda, Oligochaeta, Diptera)
Si calcola sottraendo all'unità le abbondanze relative dei *taxa* appartenenti ai Gasteropodi, agli Oligocheti e ai Ditteri. Si tratta di *taxa* all'interno dei quali sia annoverano specie tra le più tolleranti alle fonti di disturbo dei corsi d'acqua. Anche questa metrica può avere un valore che varia da 0 a 1
- Shannon per Famiglie
Si calcola secondo la formula $H_s = -\sum_{(da 1 a n)} h \cdot x \ln h$, dove h rappresenta la proporzione di organismi che appartengono a ciascuno degli n *taxa* che costituiscono la comunità. Il risultato è tanto più elevato tanto più diversificata e bilanciata è la comunità di organismi. Questa metrica ha un valore che va da 0 a infinito.
- Numero di famiglie
Consiste nel numero di famiglie che costituiscono la comunità. È anch'esso una misura della biodiversità della comunità, talvolta preferito a Shannon perché meno soggetto a distorsioni legate all'ecologia dei diversi *taxa*. Può assumere un valore che va da 0 a infinito.

Analisi statistica

Classificazione o *cluster analysis*

La struttura delle comunità dei macroinvertebrati è stata analizzata attraverso la *cluster analysis*. Tale analisi multivariata permette di individuare, all'interno di un set di variabili, gruppi caratterizzati da una maggior omogeneità. È stata utilizzata la tipologia "gerarchica" e l'algoritmo dell'*average linkage*, consigliato per le analisi effettuate su dati ecologici (McGarigal *et al.*, 2000).

In questo studio la *cluster analysis* è stata applicata a una matrice di dati composta dalla lista faunistica di ciascun sito di campionamento al fine di evidenziare un'eventuale caratterizzazione dei siti in base alle comunità stesse. Prima dell'analisi i valori della abbondanze sono stati standardizzati secondo la formula $\arcsen[\text{radq}(p)]$ per ridurre la varianza.

Lo stesso tipo di analisi è stato applicato anche ai dati chimici, al fine di avere una classificazione delle stazioni basata anche sui parametri chimico-fisici, utilizzata come termine di paragone.

Per questo tipo di analisi ci siamo serviti del programma PAST (ver 1.21, 2004).

Analisi delle componenti principali

L'Analisi delle Componenti Principali (*Principal Component Analysis*, PCA) è una procedura per trovare variabili ipotetiche (dette 'componenti') che spieghino quanta più variabilità possibile in un set di dati multidimensionali (Davis, 1986; Harper, 1999). Queste nuove variabili sono combinazioni lineari delle precedenti. La PCA ha varie applicazioni, tra le quali:

- regressione semplice dei set di dati a sole due variabili (le due componenti principali), per scopi di ordinamento e classificazione (è il caso dell'ordinamento delle stazioni di campionamento in base ai set di variabili chimiche).
- ipotesi di correlazione delle componenti principali con altre variabili soggiacenti (è questo il caso della correlazione delle componenti principali ricavare dai dati di presenza assenza dei *taxa* con le principali variabili chimico-fisiche delle stazioni).

L'algoritmo della PCA trova gli autovalori e gli autovettori della matrice di varianza-covarianza o della matrice delle correlazioni (in base alla scelta dell'operatore, che sa di aver inserito dati normalizzati o meno).

L'analisi può essere considerata come andata a buon fine se la maggior parte della varianza all'interno dei dati inseriti è spiegata dalle prime 2-3 componenti.

Per applicare la PCA ci si è ancora serviti del programma PAST (ver 1.21, 2004).

Analisi statistica della varianza

Gli eventuali effetti degli impianti sugli ecosistemi fluviali sono stati evidenziati mediante il confronto delle variabili chimico-fisiche, dell'indice LIM, dell'indice IBE e delle metriche basate sulla comunità a macroinvertebrati misurati e calcolati separatamente nelle tre stazioni considerate (a monte, a valle di 100 m e a valle di 500 m) per ogni sito. La significatività statistica delle differenze è stata valutata con un'analisi della varianza (*ANALYSIS OF VARIANCE*, ANOVA) a una via, con le stazioni a monte e a valle dell'impianto come misure ripetute. Le variabili dipendenti fisico-chimiche sono state trasformate secondo $Y' = \text{Log}_{10}(Y+1)$ e le metriche, espresse in frequenze relative in $\arcsin \sqrt{p}$ (Sokal & Rohlf, 1973). L'analisi è stata condotta con il software Statistica for Windows (versione 5.1).

RISULTATI

Analisi chimico-fisiche

Valutazione delle variabili chimico-fisiche

I valori delle variabili chimico-fisiche esaminate in questo studio sono riportati nella Tabella 8, per il campionamento estivo, e nella Tabella 9 per quello invernale (dove non espresso il valore è da intendersi in mg/L). Durante il campionamento estivo, si sono osservati aumenti della temperatura dell'acqua di circa 1°C nelle vicinanze dell'impianto a Colli sul Velino, ad Ussita, a Bussi sul Tirino e a Cànetra. Invece nelle vicinanze degli impianti di Castel Sant'Angelo e di Sefro, la temperatura dell'acqua mostra aumenti di circa 2°C.

Per facilitare il confronto tra i risultati dei siti a monte e a valle di ogni impianto si riportano nelle Figure 1-16 gli istogrammi delle variabili utilizzate per l'applicazione dell'indice LIM.

Per quanto riguarda l'ossigeno disciolto, si osserva, durante la stagione estiva, una diminuzione di 1,36 mg/L nelle vicinanze dell'impianto di Borgo Cerreto, di 1,73 mg/L nei pressi di Sefro e di 2,14 mg/L nelle vicinanze dell'impianto di Capestrano (Figura 1). Nella stagione invernale, invece, è stata osservata una diminuzione dell'Ossigeno disciolto pari a 1,34 mg/L nei pressi dell'impianto di Sefro, di 1,80 mg/L nelle vicinanze dell'impianto di Bussi sul Tirino e di 1,45 mg/L nei pressi dell'impianto di Capestrano (Figura 2).

Tabella 8. Variabili chimico-fisiche osservate nella stagione estiva (2007)

Stazioni	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	COD	BOD ₅	pH	Cond. (µS/cm)	O ₂	T (°C)
CSA M	0	0,55	1,92	20,71	9	8,20	290	6,43	10,8
CSA 100	0,66	0,63	0,99	13	10	8,17	289	7,35	13,2
CSA 500	0,6	0,60	0	14	1	8,18	294	5,80	12,8
USS M	0,11	1,96	0	20,11	0	7,85	293	6,90	12,2
USS 500	0,40	1,47	0	39,73	2	7,83	306	6,12	13,1
BC M	0,02	3,86	0,204	26,05	4	7,77	519	6,45	15,6
BC 100	0,02	3,90	0,27	22,00	3	7,88	501	5,09	13,1
BC 500	0,009	3,65	0,26	20,39	3	7,90	515	6,64	14
COL M	0,002	1,95	0,35	19,31	7	7,62	820	5,48	10,6
COL 100	0,02	1,90	0,1	23,01	5	7,68	833	5,48	10,6
COL 500	0,178	1,88	0,097	22,44	4	7,65	818	6,40	12,2
CAN M	0,177	1,63	0,106	26,51	3	7,88	841	4,49	12
CAN 100	0,046	1,89	0,068	5,11	1	8,02	833	5,55	13
CAN 500	0,064	1,86	0,045	13,52	0	7,75	865	5,15	12,7
BIS M	0,04	6,76	0,09	15,39	3	7,73	471	6,34	12,5
BIS 500	0,56	6,36	0,48	33,41	5	7,69	462	6,27	12,5
POP M	0,004	3,26	0,09	22,96	1	8,18	541	6,85	11,8
POP 100	0,179	3,78	0,112	18,40	3	8,13	540	6,05	12
POP 500	0,085	3,34	0,52	21,89	2	8,18	532	6,11	12,6
BUS M	0,127	2,99	0,64	12,71	3	8,16	505	6,50	14,3
BUS100	0,072	3,48	2,49	18,60	3	8,08	514	5,77	13,2
BUS 500	0,124	3,23	0,437	14,88	2	8,16	511	6,16	13,1
CAP M	0,01	0,40	0,30	21,52	2	8,07	473	7,74	13,5
CAP 500	0,27	3,59	0,80	16,06	3	8,08	502	5,60	13,5
SEF M	1,50	2,62	0	37,78	0	8,04	364	7,33	11,5
SEF 500	0,59	2,66	0,24	22,16	9	7,72	381	5,60	13,5

Tabella 9. Variabili chimico-fisiche osservate nella stagione invernale (2007)

Stazioni	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	COD	BOD ₅	pH	Cond. (μS/cm)	O ₂	T (°C)
CSA M	0,066	1,08	0,015	12,25	17	8,01	290	10,2	8,2
CSA 100	0,002	1,33	0,07	10,68	18	8,00	295	9,37	8
CSA 500	0,025	1,37	0,087	15,43	9	8,05	297	9,89	8,3
USS M	0,07	1,29	0,14	19,65	16	7,86	290	7,90	9,2
USS 500	0,042	1,30	0,12	16,74	1	7,57	308	8,96	8,9
BC M	0,014	1,72	0,025	1,55	1	7,40	508	4,75	10,2
BC 100	0,031	1,75	0,038	3,75	0	7,84	506	4,42	10,3
BC 500	0,022	1,92	0,055	5,07	0	7,84	507	4,25	10,7
COL M	0,005	1,32	0,396	5,66	0	7,90	806	6,86	10,2
COL 100	0,049	1,319	0,037	10,91	1	7,81	813	7,01	10,4
COL 500	0,145	1,36	0,132	5,708	1	7,80	811	6,93	10,6
CAN M	0,297	1,617	0,31	6,01	4	7,60	845	7,56	11,4
CAN 100	0,13	1,877	0,2	12,78	1	7,39	830	8,02	11,5
CAN 500	0,126	1,49	0,25	6,70	5	7,40	862	6,90	11,6
BIS M	0,012	3,99	0,16	5,09	0	7,80	471	4,45	9,9
BIS 500	0,031	3,59	0,29	5,11	1	7,62	458	4,31	9,8
POP M	0,003	1,97	0,56	6,609	4	8,05	525	5,15	10
POP 100	0,11	1,83	0,46	12,46	0	7,94	536	4,78	10,7
POP 500	0,04	2,32	0,41	7,51	2	7,50	534	4,98	10,7
BUS M	0,06	2,05	0,189	12,83	11	8,05	507	6,20	10,8
BUS100	0,005	1,80	0,47	5,23	13	7,98	526	4,40	10,5
BUS 500	0,08	2,00	0,44	7,74	9	7,95	514	4,36	10
CAP M	0,007	1,88	0,53	5,808	0	8,07	500	7,75	10,8
CAP 500	0,18	2,58	0,249	8,08	9	7,80	503	6,30	10,5
SEF M	0,067	1,54	0,045	25,73	0	8,02	361	7,76	10,6
SEF 500	0,97	1,80	0,33	18,79	11	7,53	375	6,42	11,1

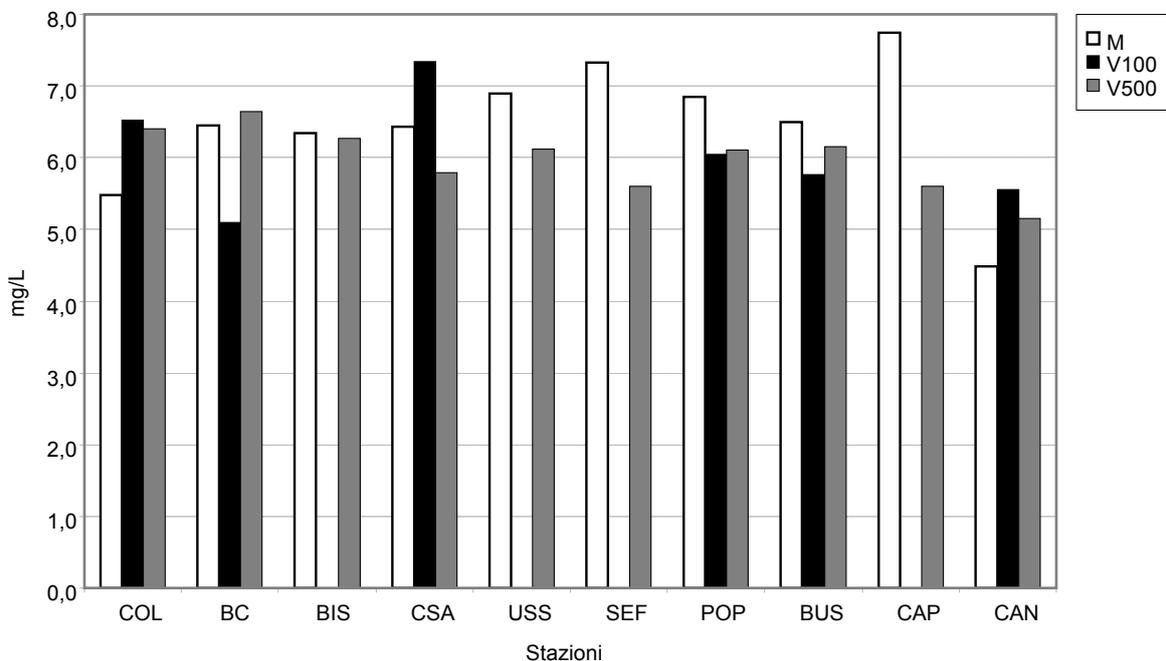


Figura 1. OSSIGENO DISCIOLTO: variazioni nei campioni di acqua, stagione estiva

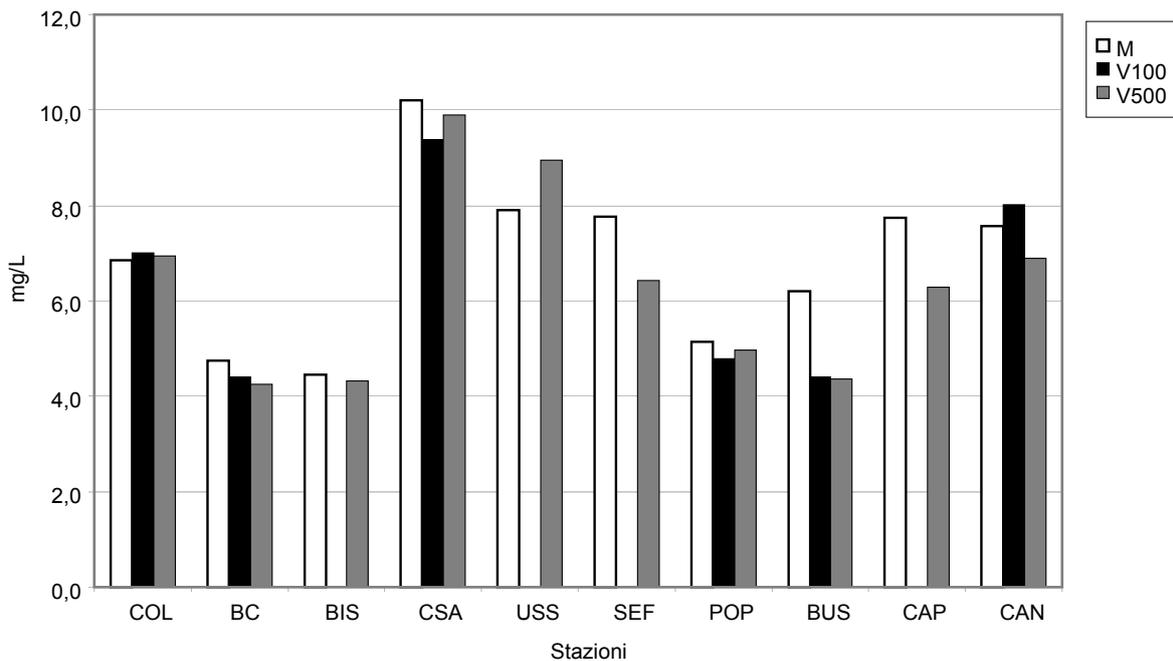


Figura 2. OSSIGENO DISCIOLTO: variazioni nei campioni di acqua, stagione invernale

Le Figure 3-6 evidenziano minime variazioni nei valori di conducibilità e pH in entrambe le stagioni per tutte le stazioni.

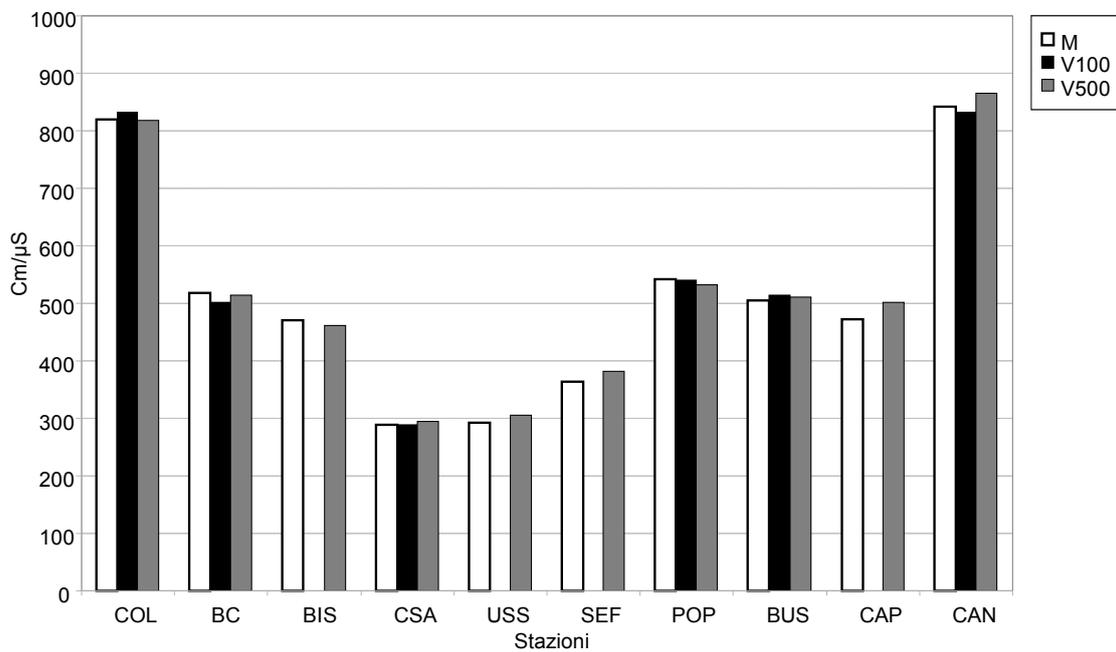


Figura 3. CONDUCIBILITÀ: variazioni nei campioni di acqua, stagione estiva

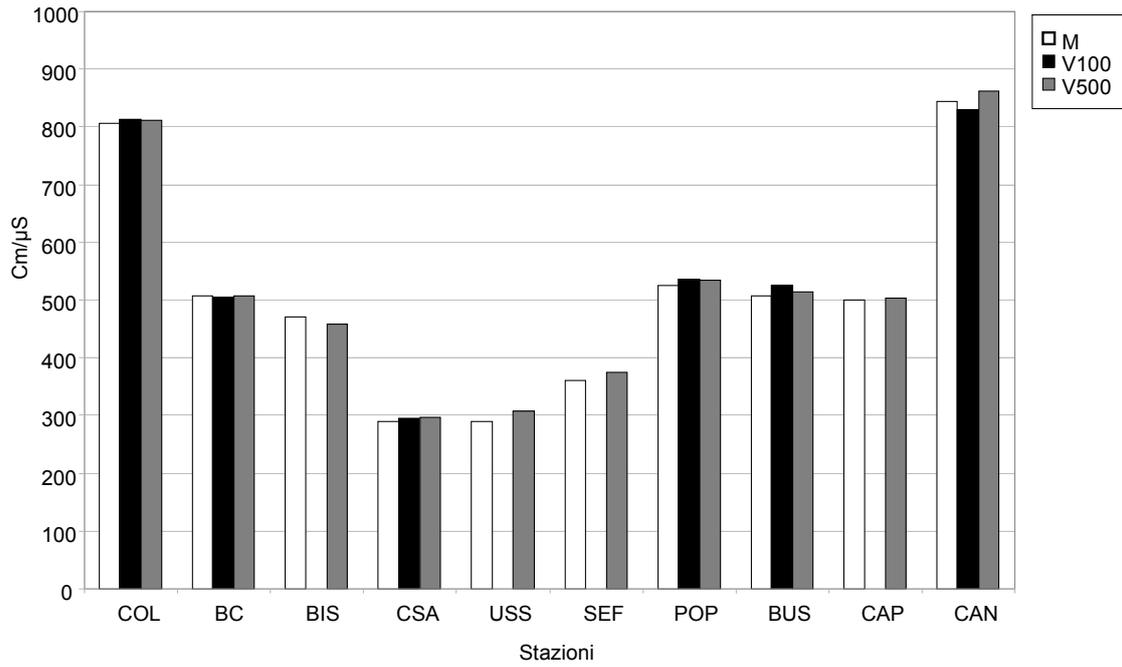


Figura 4. CONDUCEBILITÀ: variazioni nei campioni di acqua, stagione invernale

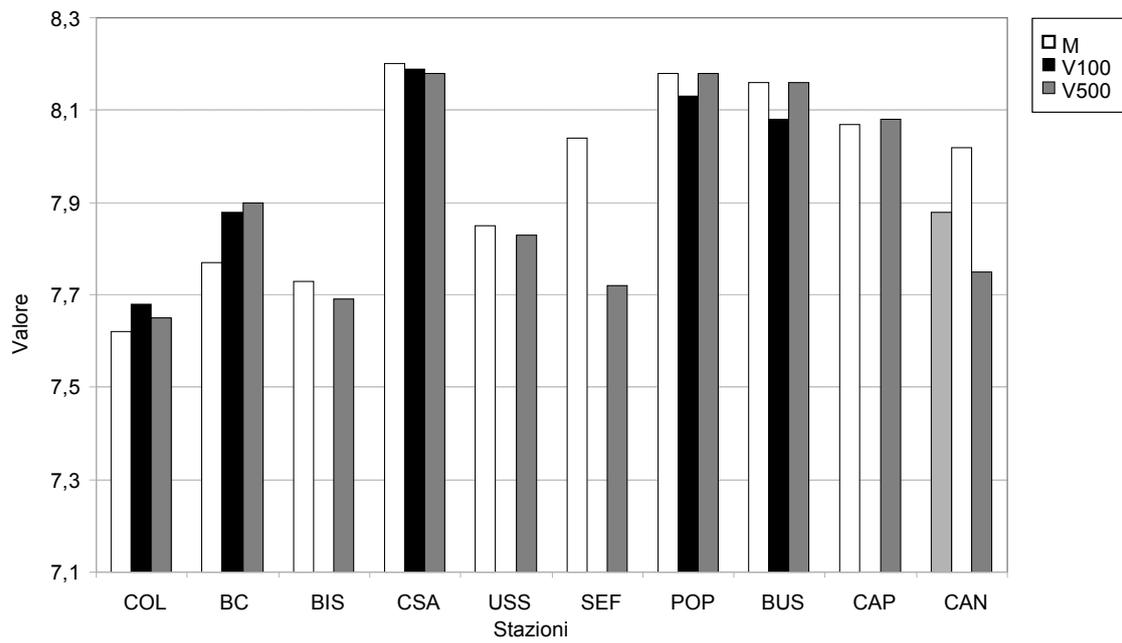


Figura 5. pH: variazioni nei campioni di acqua, stagione estiva

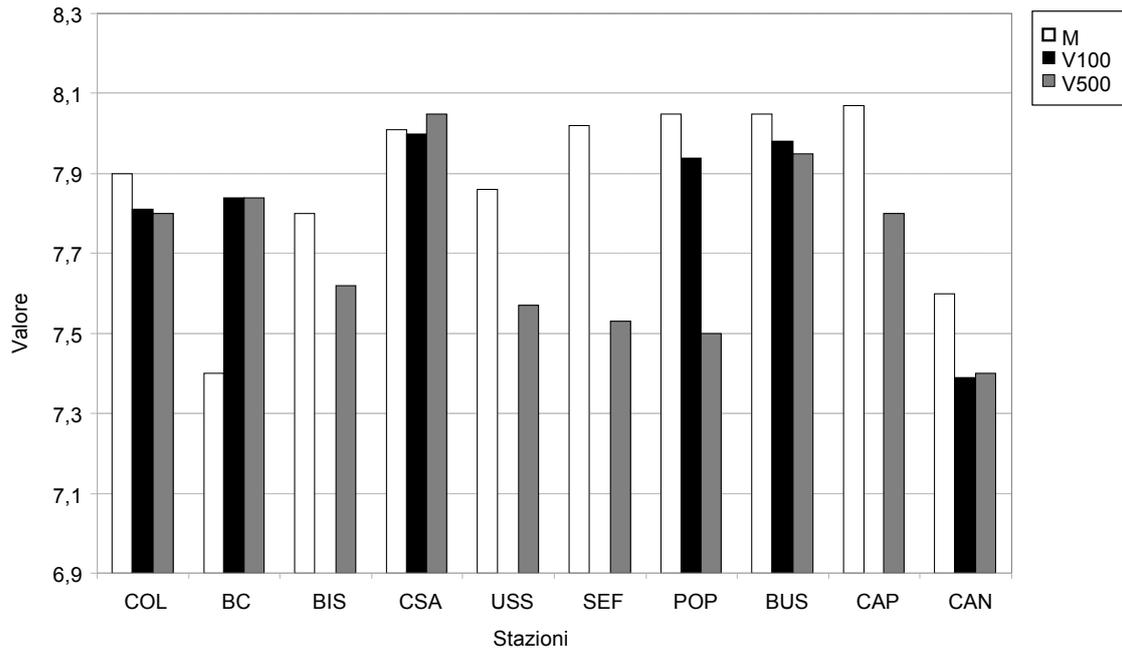


Figura 6. pH: variazioni nei campioni di acqua, stagione invernale

Per quanto riguarda la BOD₅, per la stagione estiva (Figura 7) è stato osservato un aumento di 9 mg/L nei pressi di Sefro dove anche nella stagione invernale (Figura 8) si è osservato un aumento di 11 mg/L; anche nei pressi dell'impianto di Capestrano c'è stato aumento nel valore della domanda biologica d'ossigeno pari a 9 mg/L durante la sola stagione invernale.

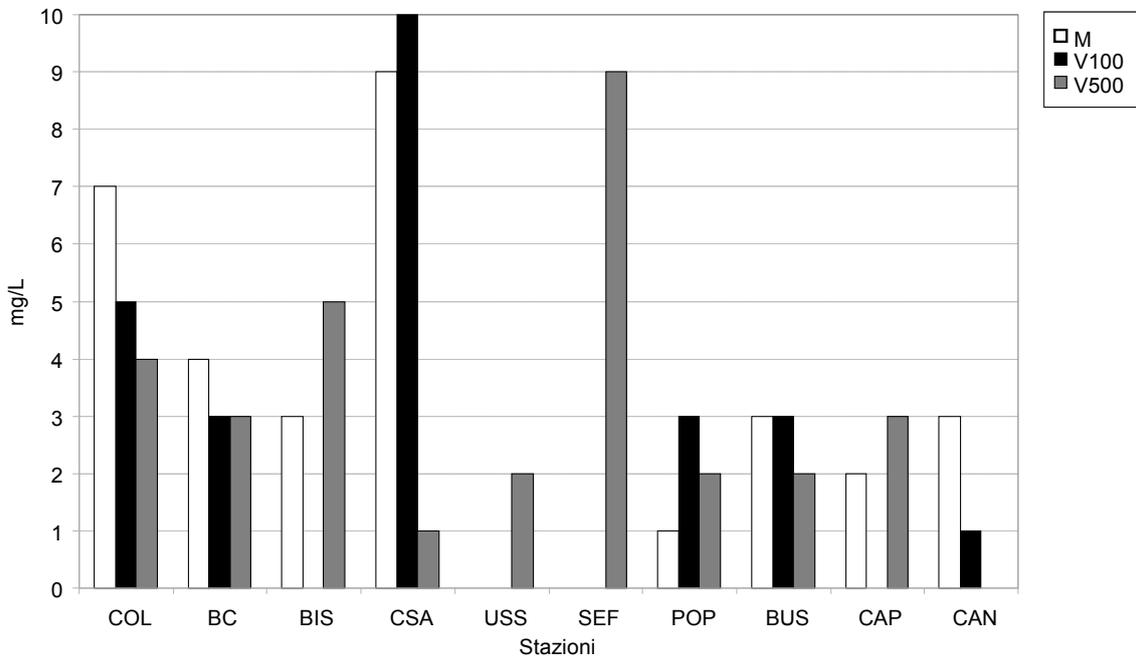


Figura 7. BOD₅: variazioni nei campioni di acqua, stagione estiva

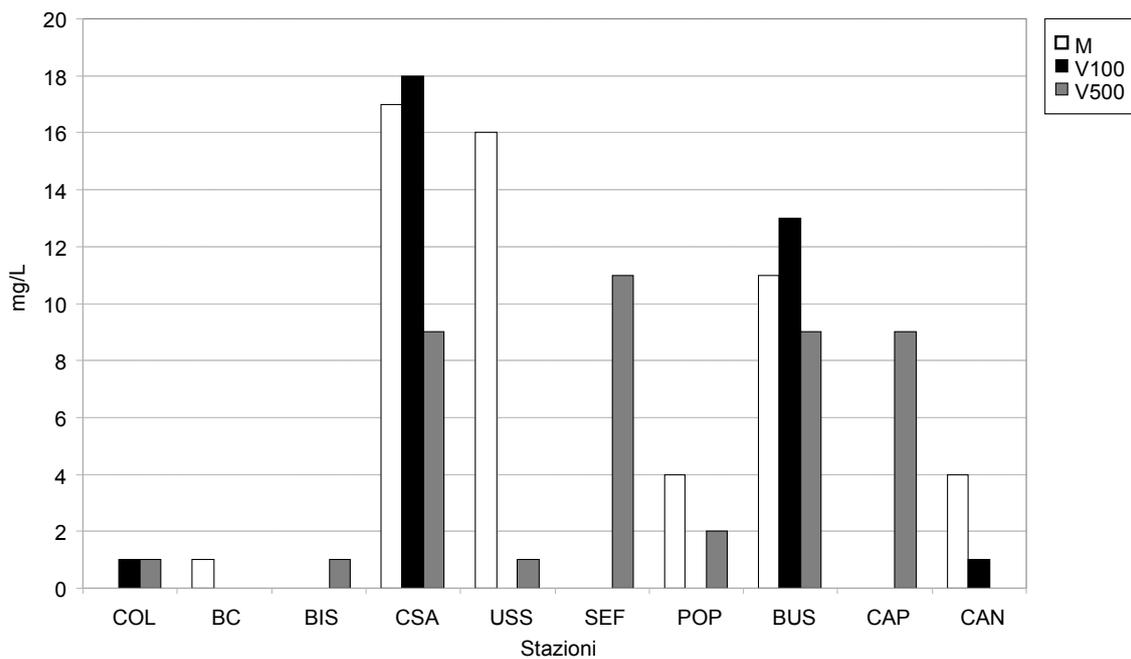


Figura 8. BOD₅: variazioni nei campioni di acqua, stagione invernale

Per la COD è stato osservato un aumento pari a 18,02 mg/L nei pressi dell'impianto di Biselli e di 19,62 mg/L nelle vicinanze dell'impianto di Ussita, entrambi durante la stagione estiva (Figura 9). La Figura 10 riporta le variazioni di COD nel periodo invernale.

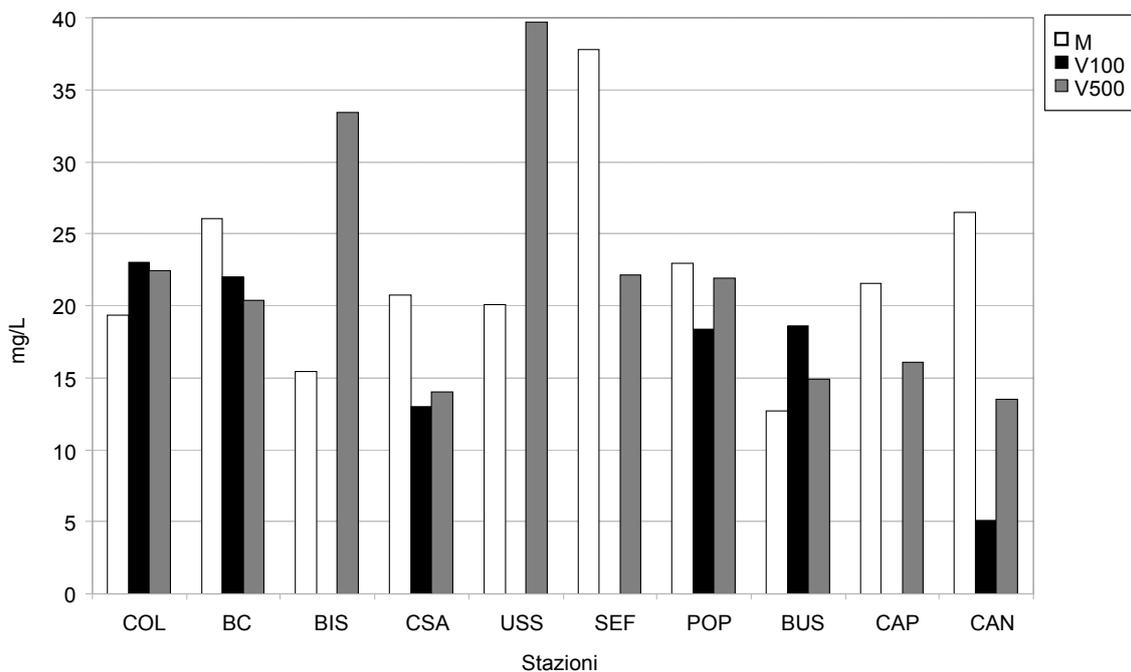


Figura 9. COD: variazioni nei campioni di acqua della, stagione estiva

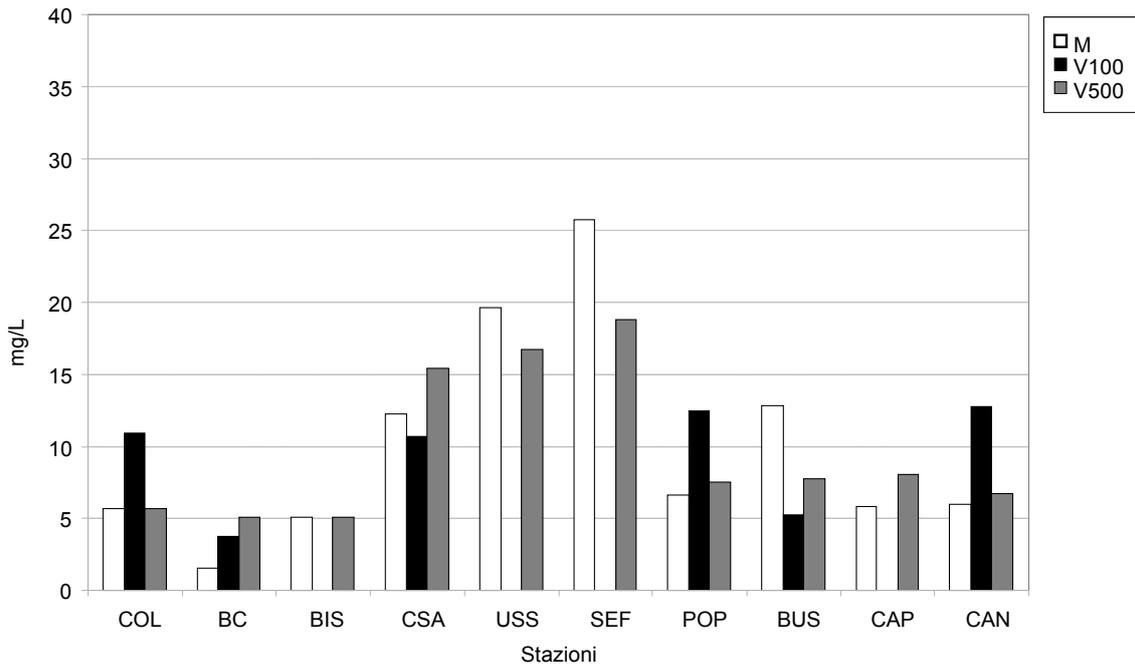


Figura 10. COD: variazioni nei campioni di acqua, stagione invernale

Nella Figura 11 si nota in particolare l'aumento dei fosfati a 100 m a valle nei pressi di Bussi sul Tirino durante il periodo estivo. Anche nella stagione invernale Bussi sul Tirino mostra lo stesso andamento, seguito da Sefro, Biselli e Castel Sant'Angelo (Figura 12).

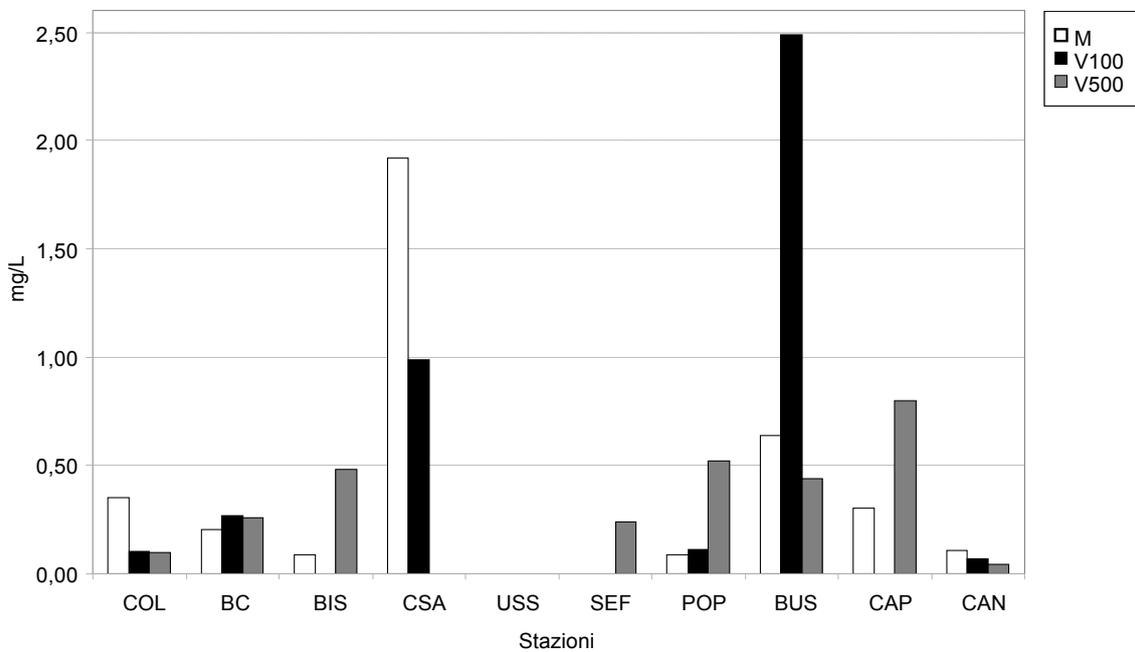


Figura 11. FOSFATI: variazioni nei campioni di acqua, stagione estiva

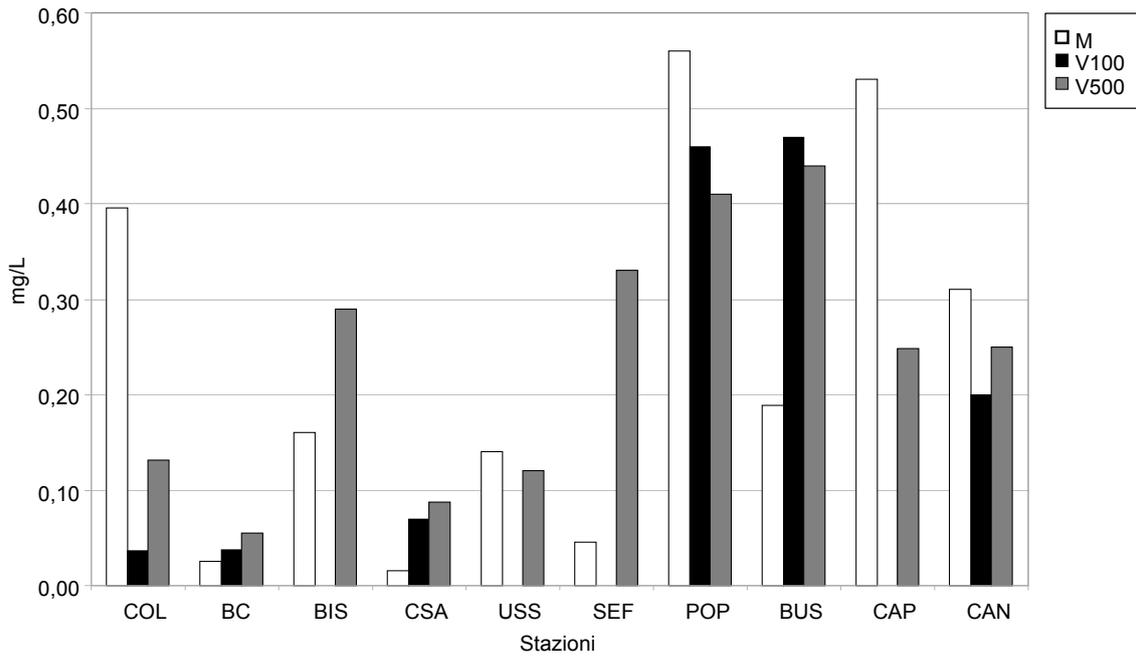


Figura 12. FOSFATI: variazioni nei campioni di acqua, stagione invernale

Si osserva un generale aumento nella stagione invernale per i nitrati (Figure 13 e 14) e in entrambe le stagioni per lo ione ammonio (Figure 15 e 16).

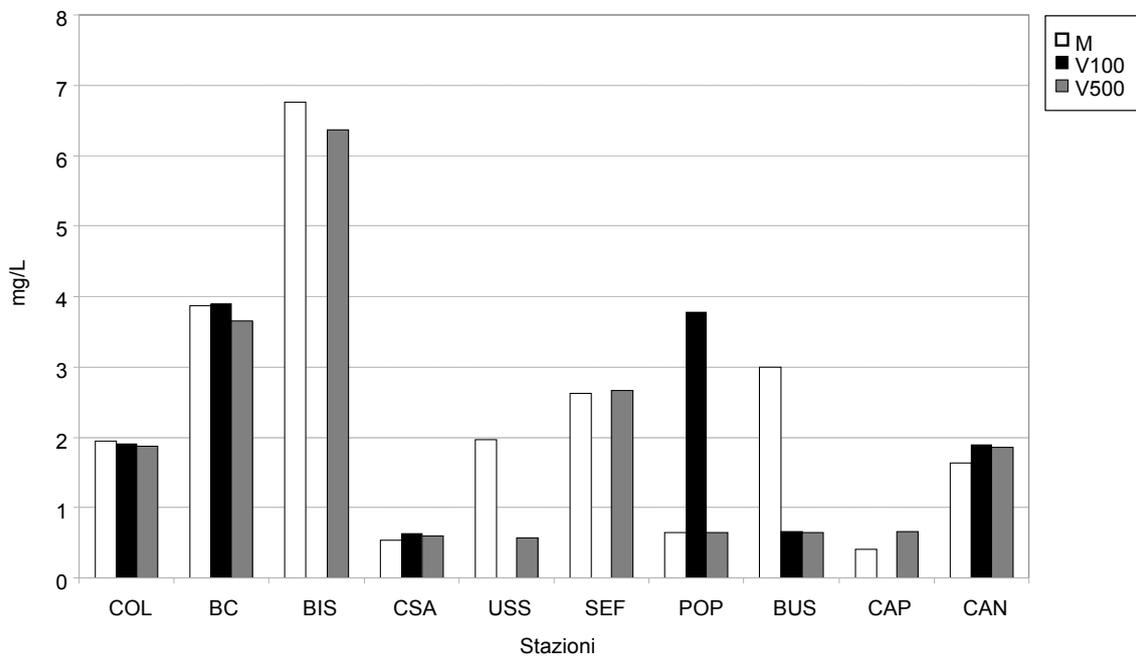


Figura 13. NITRATI: variazioni nei campioni di acqua, stagione estiva

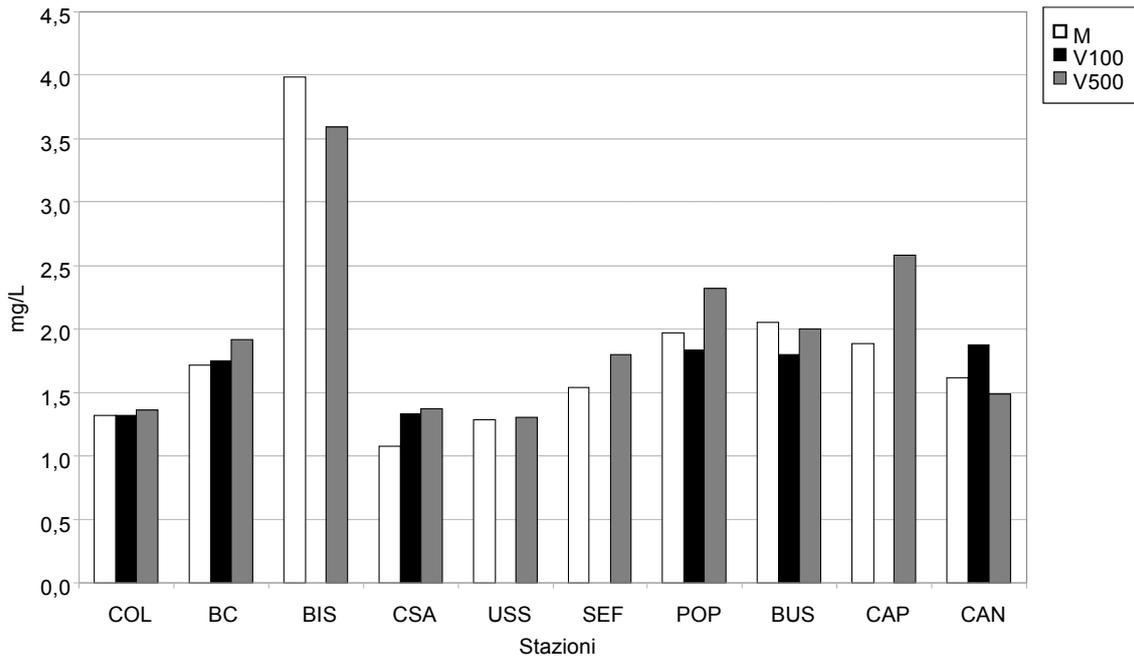


Figura 14. NITRATI: variazioni nei campioni di acqua, stagione invernale

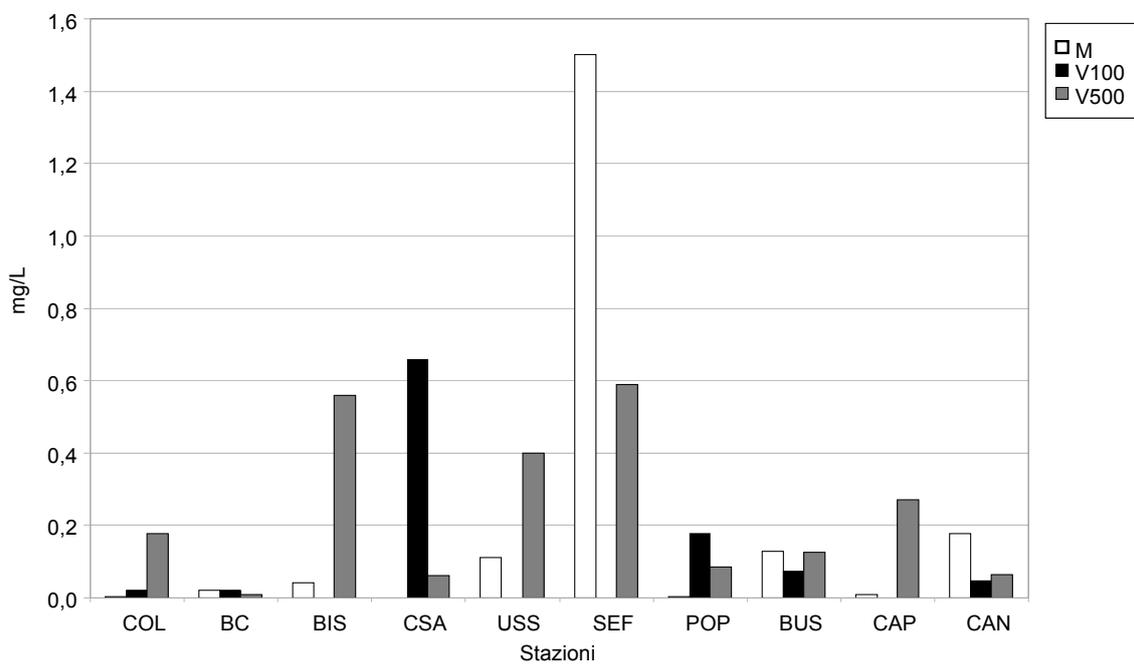


Figura 15. AMMONIACA: variazioni nei campioni di acqua, stagione estiva

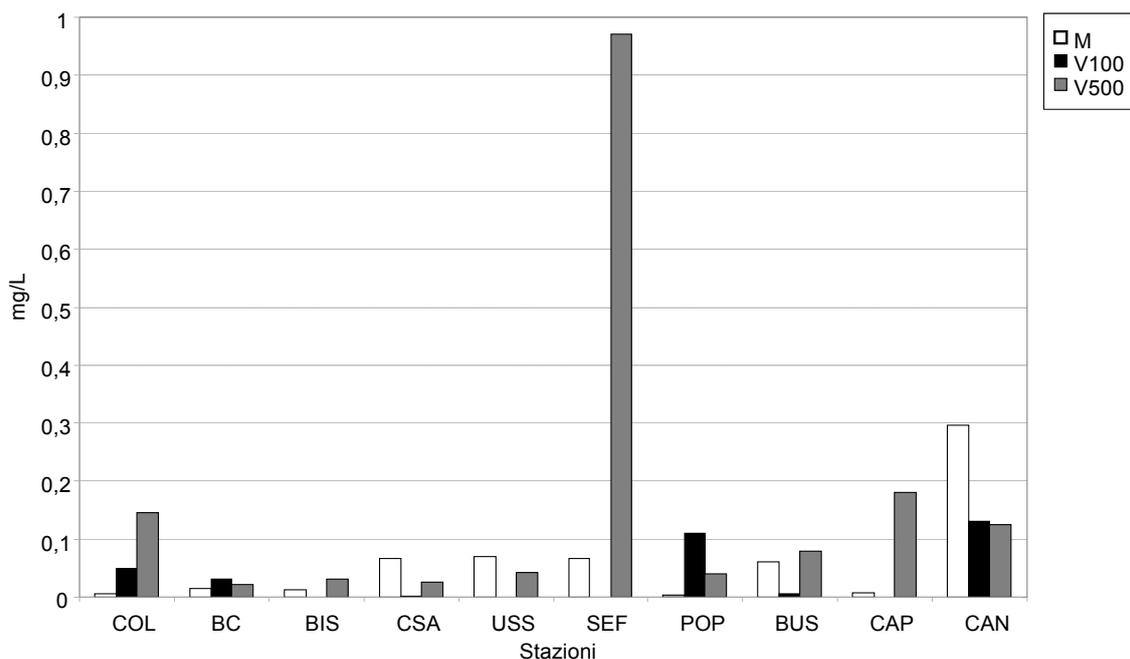


Figura 16. AMMONIACA: variazioni nei campioni di acqua, stagione invernale

Sulla base dei dati riportati precedentemente sono state effettuate le seguenti analisi statistiche:

- analisi delle componenti principali (PCA);
- *cluster analysis*;
- analisi della varianza (ANOVA).

Le Figure 17 e 18 mostrano le PCA effettuate sui valori delle variabili chimico-fisiche nelle stagioni estiva e invernale rispettivamente. L'ordinamento ottenuto, influenzato in massima parte dalla sostanza organica disciolta in acqua, non segue uno schema monte-valle degli impianti, come ci si aspetterebbe nel caso di una forte influenza della tricoltura sulle condizioni dei fiumi.

Le Figure 19 e 20 mostrano le classificazioni degli stessi siti (*cluster analysis*), le quali, in accordo con quanto emerge dalle PCA, confermano come le singole stazioni si raggruppino non in base alla loro posizione rispetto agli impianti (tutti i siti a monte tra loro uniformi, come pure i siti a 100 m e quelli a 500 m a valle), ma prevale l'appartenenza ai rispettivi sistemi fluviali. Pertanto le analisi chimiche delle stazioni a monte, a 100 m e 500 m a valle di ciascun impianto non evidenziano un peggioramento del sistema fluviale causato dalle pratiche acquacolturali.

In generale per tutte le variabili chimico-fisiche considerate nello studio, le variazioni nelle stazioni a monte e a valle di ciascun impianto, non sono risultate statisticamente significative.

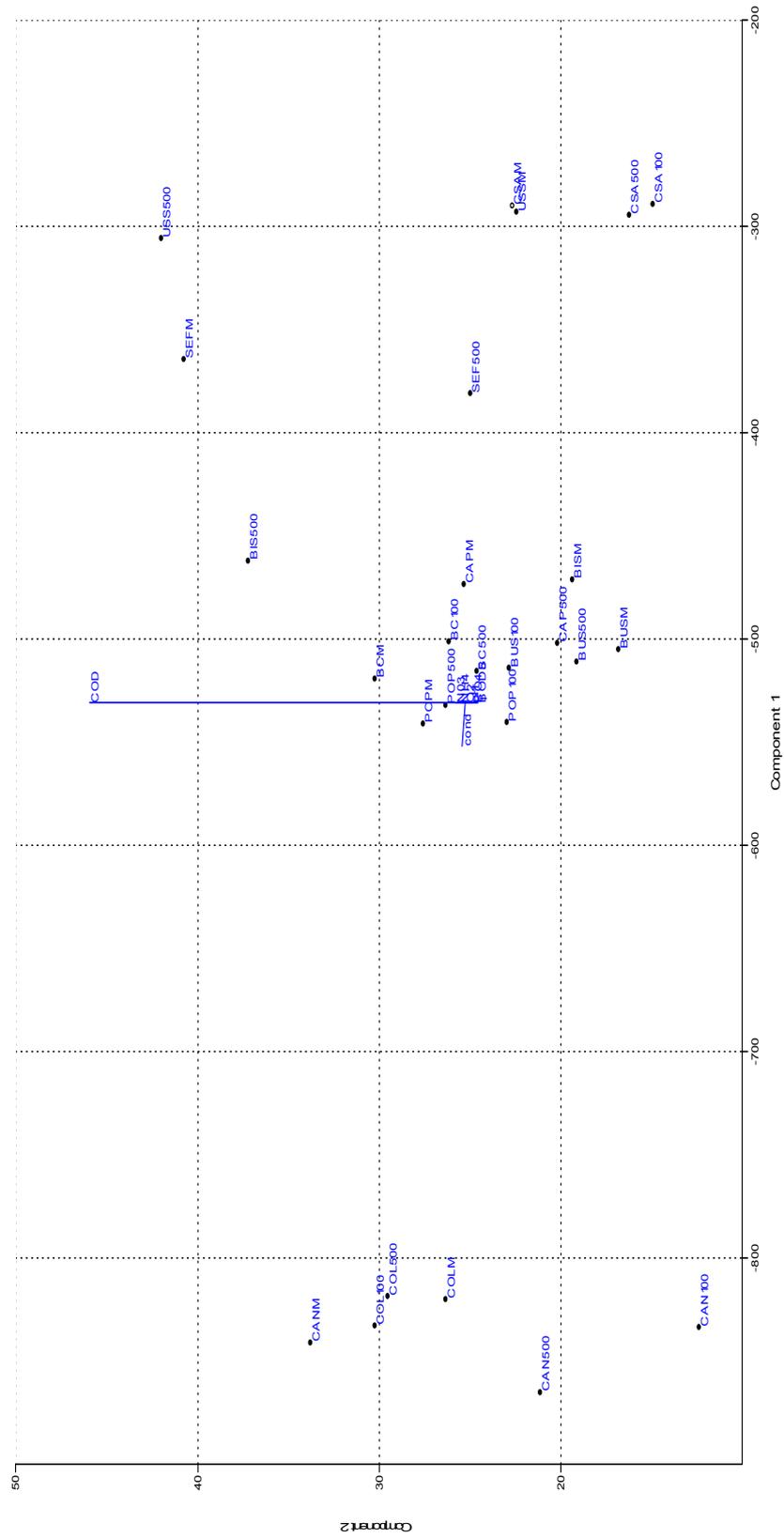


Figura 17. PCA sulle variabili chimico-fisiche, stagione estiva

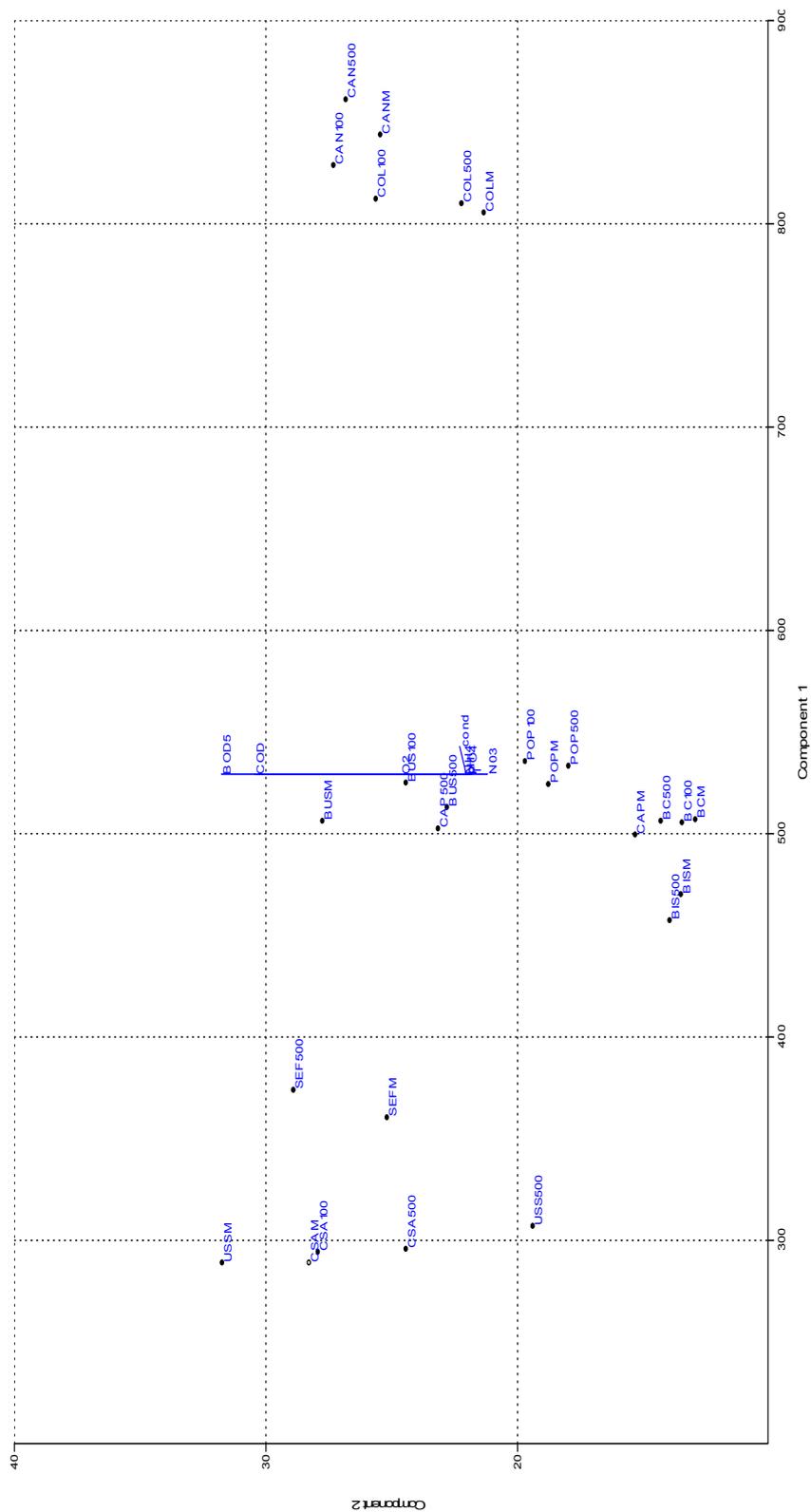


Figura 18. PCA sulle variabili chimico-fisiche, stagione invernale

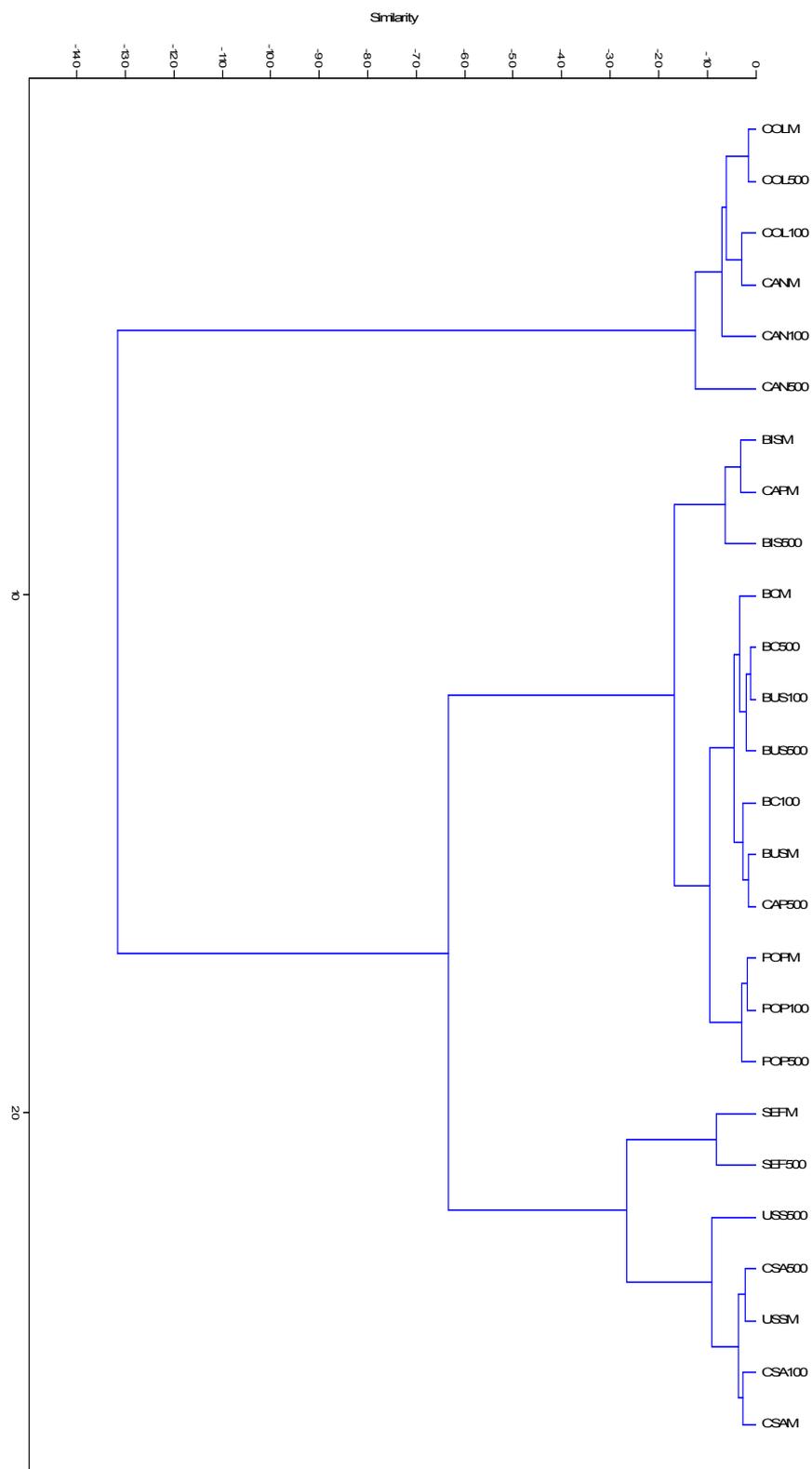


Figura 19. Cluster Analysis sulle valori chimico fisiche per la stagione estiva

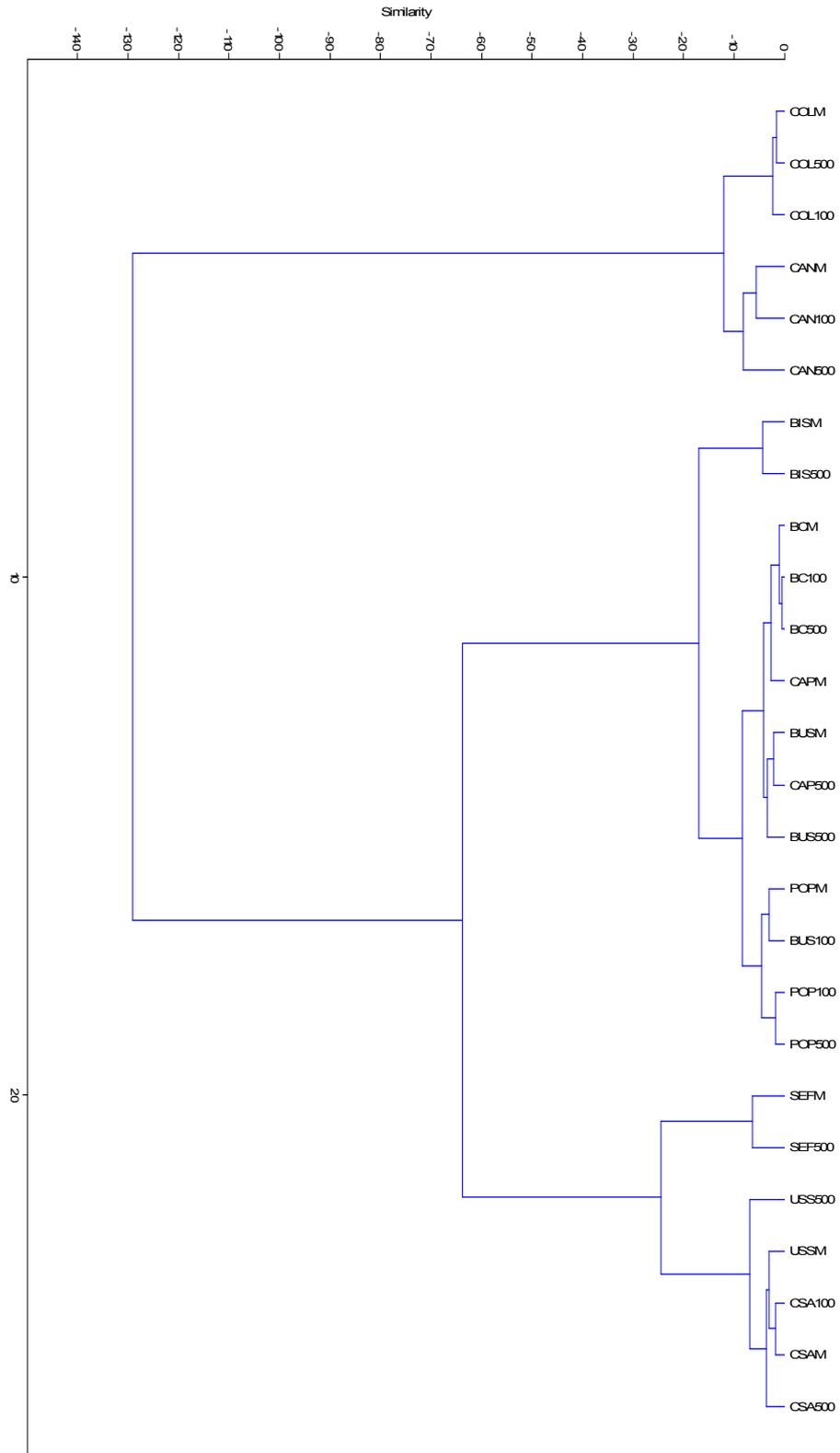


Figura 20. Cluster analysis sulle variabili chimico-fisiche per la stagione invernale

Applicazione dell'Indice LIM

La Tabella 10 riporta i valori del LIM per la stagione estiva e quella invernale.

Tabella 10. Valori dell'indice LIM per la stagione estiva e quella invernale

Stazioni	Stagione estiva		Stagione invernale	
	Valore LIM	Classe	Valore LIM	Classe
CSA M	195	III	265	II
CSA 100	115	IV-III	305	II
CSA 500	370	II	300	II
USS M	270	II	195	III
USS 500	275	II	290	II
BC M	285	II	385	II
BC 100	260	II	385	II
BC 500	255	II	385	II
COL M	230	III	340	II
COL 100	260	II	350	II
COL 500	220	III	310	II
CAN M	145	III	130	III
CAN 100	220	III	110	IV
CAN 500	200	III	145	III
BIS M	170	III	385	II
BIS 500	100	IV	265	II
POP M	320	II	255	II
POP 100	200	III	175	III
POP 500	250	II	215	III
BUS M	195	III	200	III
BUS 100	185	III	254	II
BUS 500	240	II	214	III
CAP M	330	II	260	II
CAP 500	185	III	200	III
SEF M	235	III	285	II
SEF 500	160	III	150	III

In media (Figura 21) si osserva, nel periodo invernale, una diminuzione del valore LIM subito a valle degli impianti, ad indicare la presenza di condizioni non ottimali, di stress, dei sistemi fluviali in quei tratti. Tali sistemi, però, mostrano la tendenza a ristabilire le condizioni a monte degli impianti già a 500 m di distanza da questi.

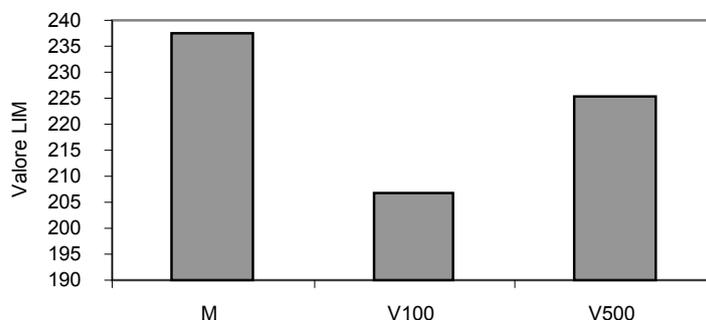


Figura 21. Valori medi dell'indice LIM, stagione invernale

Di seguito sono anche riportati istogrammi che mostrano come i valori LIM cambino tra le stazioni a monte, a 100 m e a 500 m a valle degli impianti (Figura 22 e 23).

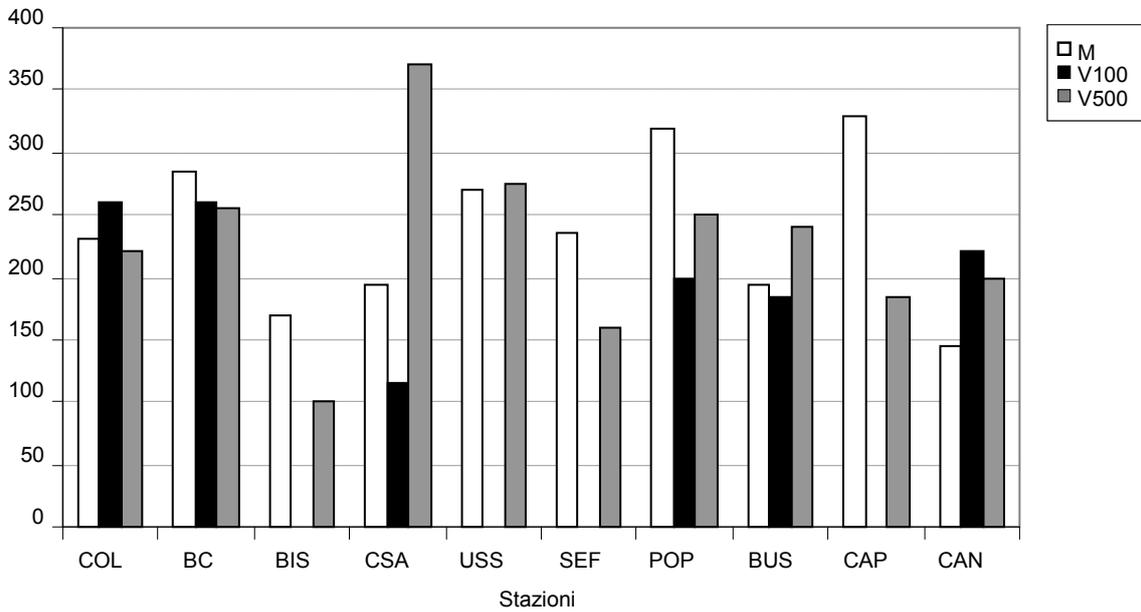


Figura 22. Valori LIM per ciascuna stazione, stagione estiva

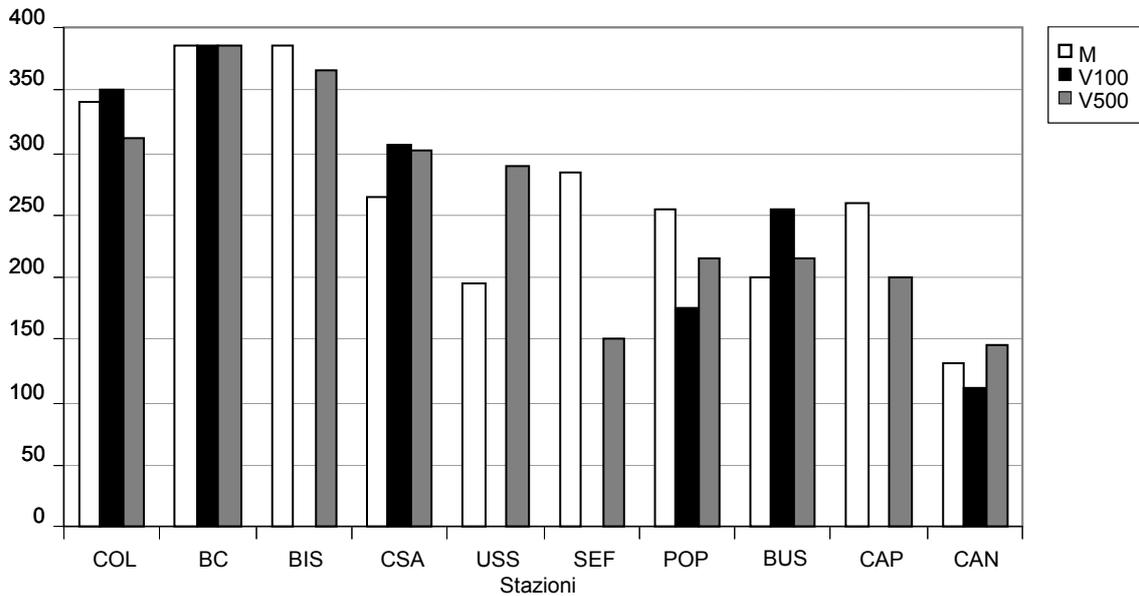


Figura 23. Valori LIM per ciascuna stazione, stagione invernale

In media (Figura 24) nel periodo estivo si osserva una diminuzione del valore LIM subito a valle degli impianti, qui però il sistema non sembra recuperare allontanandosi dall'impianto.

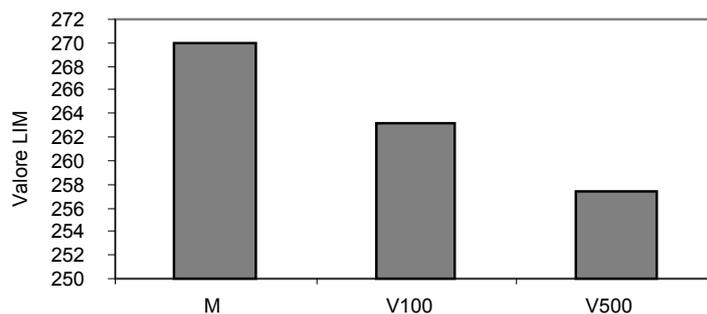


Figura 24. Valori medi dell'indice LIM, stagione estiva

Analisi microbiologiche

Calcolo delle Unità Formanti Colonia per *E. coli* ed Enterococchi

La Tabella 11 riporta i valori delle Unità Formanti Colonie (UFC/100 mL) per *E. coli* ed Enterococchi rilevati nelle acque afferenti ed efferenti dei diversi impianti prelevate nel corso di questo studio. Da queste si evince che nel tratto considerato del fiume Nera, nel fiume Scarsito a monte dell'impianto e nel tratto considerato del fiume Velino nei pressi di Cànetra, si riscontra contaminazione di natura fecale per l'accertata presenza di *E. coli* ed Enterococchi.

Tabella 11. UFC per *E. coli* ed Enterococchi, stagione estiva e invernale (UFC/100 mL x 10²)

Stazioni	Stagione estiva		Stagione invernale	
	<i>E. coli</i>	Enterococchi	<i>E. coli</i>	Enterococchi
CSA M	23	17	4	2,6
CSA 100	4	5	1,4	4
CSA 500	1	10	1,6	2,4
USS M	>30	12	4,2	2,5
USS 500	7	3	6	1,5
BC M	9	14	1,7	1,4
BC 100	9	7	2,6	4,3
BC 500	9	7	2,1	5,3
COL M	0	0	0	0
COL 100	0	1	0,1	0,6
COL 500	0	0	0	0,5
CAN M	>30	18	>30	>30
CAN 100	27	3	>30	13,5
CAN 500	11	1	>30	7,2
BIS M	2	4	0,1	0,1
BIS 500	2	1	0,7	0,7
POP M	0	0	0	0
POP 100	0	1	0	0,2
POP 500	0	0	0,1	3,9
BUS M	0	1	0	0
BUS100	2	11	0	0,1
BUS 500	0	0	0,1	0
CAP M	0	1	0	0,1
CAP 500	0	4	0,4	0,2
SEF M	16	21	7,7	>30
SEF 500	0	5	0,7	1,1

Allo scopo di identificare le possibili cause della presenza di tali microrganismi si è svolto un ulteriore sopralluogo nelle zone interessate da questo fenomeno. Nel corso dei controlli si è osservata l'esistenza di allevamenti di animali da pascolo lungo tutto il tratto considerato del fiume Velino. Per i corsi d'acqua Nera e Scarsito non sono state trovate possibili origini di contaminazione. Si è, pertanto, resa evidente la necessità di ulteriori indagini al fine di individuare possibili scarichi abusivi nei fiumi considerati (Ota & Kaise, 1997).

E. coli ed Enterococchi, entrambi indicatori di contaminazione fecale, evidenziano lo stato di salute di un sistema fluviale. Il rischio di contrarre gastroenteriti a seguito del bagno in un fiume è correlato alla presenza di tali microrganismi. Nelle più recenti normative *E. coli* ed Enterococchi hanno sostituito rispettivamente i coliformi fecali e gli streptococchi fecali. La scelta di *E. coli* come indicatore per la contaminazione fecale dei diversi comparti idrici è conseguente alla sua elevata presenza nelle feci umane e animali (Aulicino *et al.*, 2005).

Antibiotico-resistenza per ceppi batterici di *E. coli*

È stato svolto un lavoro di screening ambientale su un totale di 428 isolati batterici, tutti appartenenti alla specie *E. coli* (parametro microbiologico richiesto dal DL.vo 152/1999). La loro risposta al test di sensibilità agli antibiotici ha evidenziato una diffusa "resistenza naturale" che i ceppi batterici hanno evoluto nel tempo in risposta all'uso spesso non responsabile di tali farmaci (Tabella 12) (Nazir *et al.*, 2006; Saham & Tenover, 1987).

Tabella 12. Risultati del test di sensibilità agli antibiotici

Stazioni	Cloramfenicolo			Tetracicline			Amoxicillina			Flumequina			Totale isolati
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	
CSA M	0	0	40	2	0	38	3	1	36	1	0	39	40
CSA 100	0	0	14	5	0	9	3	0	11	2	0	12	14
CSA 500	0	0	16	6	0	10	1	0	15	1	0	15	16
USS M	1	1	40	18	0	24	3	2	37	2	0	40	42
USS 500	0	0	60	44	0	16	5	3	52	0	0	60	60
BC M	1	0	16	9	0	8	8	0	9	0	1	16	17
BC 100	4	0	22	7	0	19	11	2	13	0	0	26	26
BC 500	5	0	16	7	0	14	7	1	13	1	0	20	21
COL M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
COL 100	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
COL 500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAN M	3	0	37	7	0	33	6	3	31	1	3	36	40
CAN 100	2	0	34	11	0	25	8	1	27	0	0	36	36
CAN 500	0	0	16	1	0	15	1	0	15	0	0	16	16
BIS M	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1
BIS 500	1	0	6	2	0	5	2	0	5	0	0	7	7
POP M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
POP 100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
POP 500	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2	2
BUS M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BUS100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
BUS 500	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1
CAP M	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CAP 500	0	0	4	0	0	4	0	0	4	0	0	4	4
SEF M	0	0	77	1	0	76	2	4	71	0	0	77	77
SEF 500	0	0	7	0	0	7	2	1	4	0	0	7	7
Totale	17	1	410	121	0	307	62	18	348	8	4	416	428

Dei 428 ceppi isolati di *E. coli* il 4% si è dimostrato essere resistente al Cloramfenicolo, il 28% alle Tetracicline, il 14% è resistente e il 4% è moderatamente sensibile all'Amoxicillina, mentre solo il 2% è resistente e l'1% moderatamente sensibile alla Flumequina (Figura 25).

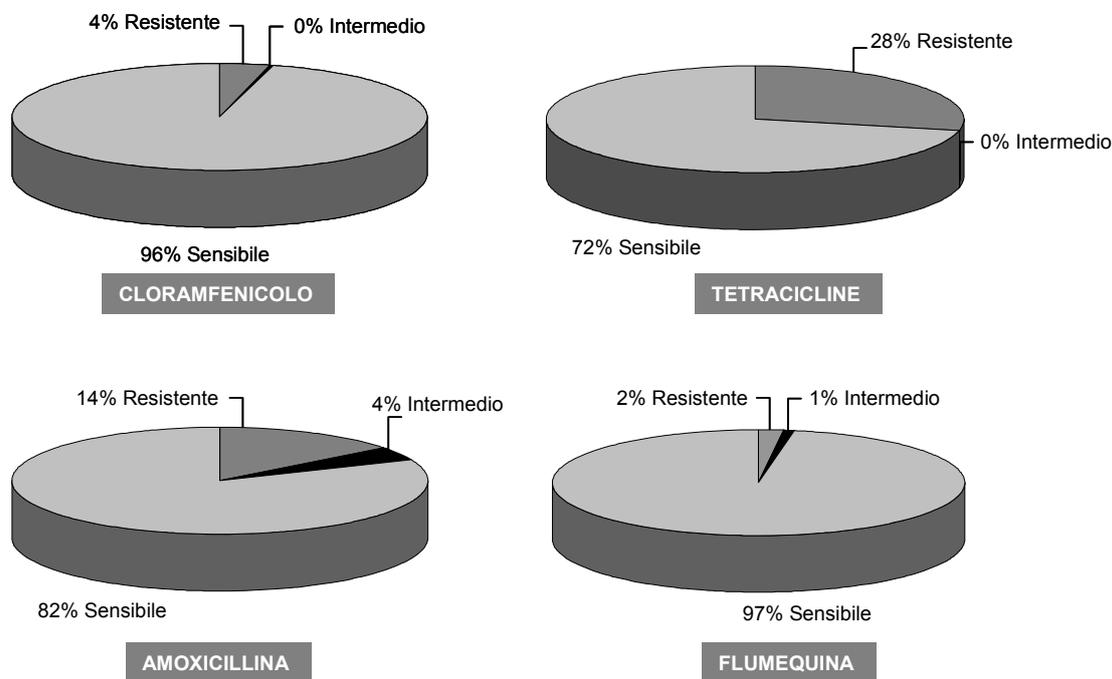


Figura 25. Percentuale di revertanti per il Cloramfenicolo, le Tetracicline, l'Amoxicillina e la Flumequina

Come mostrato nella Figura 26, della totalità delle colonie resistenti al Cloramfenicolo, il 29,4% proviene dai siti localizzati a monte degli impianti, il 35,3% è stato isolato dai siti a 100 m a valle e il 35,3% dai siti a 500 m a valle degli impianti. Tale distribuzione dei revertanti indica un aumento del fenomeno della resistenza a valle delle trotticole, indicando un possibile utilizzo di tale farmaco. Il Cloramfenicolo è uno dei chemioterapici vietati dalla Normativa Italiana sul farmaco (Reg. CE 2377/90). Indagini ulteriori si rendono quindi necessarie per verificare la consistenza di questo fenomeno nelle pratiche acquacolturali. Viene anche mostrato l'andamento delle incidenze dei fenomeni di resistenza, rispettivamente per le Tetracicline, l'Amoxicillina e la Flumequina. Di tali antibiotici è consentito l'utilizzo solo in determinate concentrazioni e somministrazioni.

Dal nostro studio è emerso che del totale dei revertanti isolati per le Tetracicline, il 30,5% proviene dai siti a monte degli impianti, il 19% dai siti a 100 m a valle e il 50,5% dai siti a 500 m a valle degli stessi. Del totale dei ceppi resistenti all'Amoxicillina, il 35,5% proviene dai siti a monte degli impianti studiati, il 35,5% dai siti localizzati a 100 m a valle e il 29% sono stati isolati dai siti a 500 m valle delle trotticole.

Del totale dei revertanti isolati per la Flumequina, il 50% proviene dai siti situati a monte, il 25% dai siti localizzati a 100 m a valle e il 25% proviene dai siti posti ad una distanza di 500 m dagli impianti.

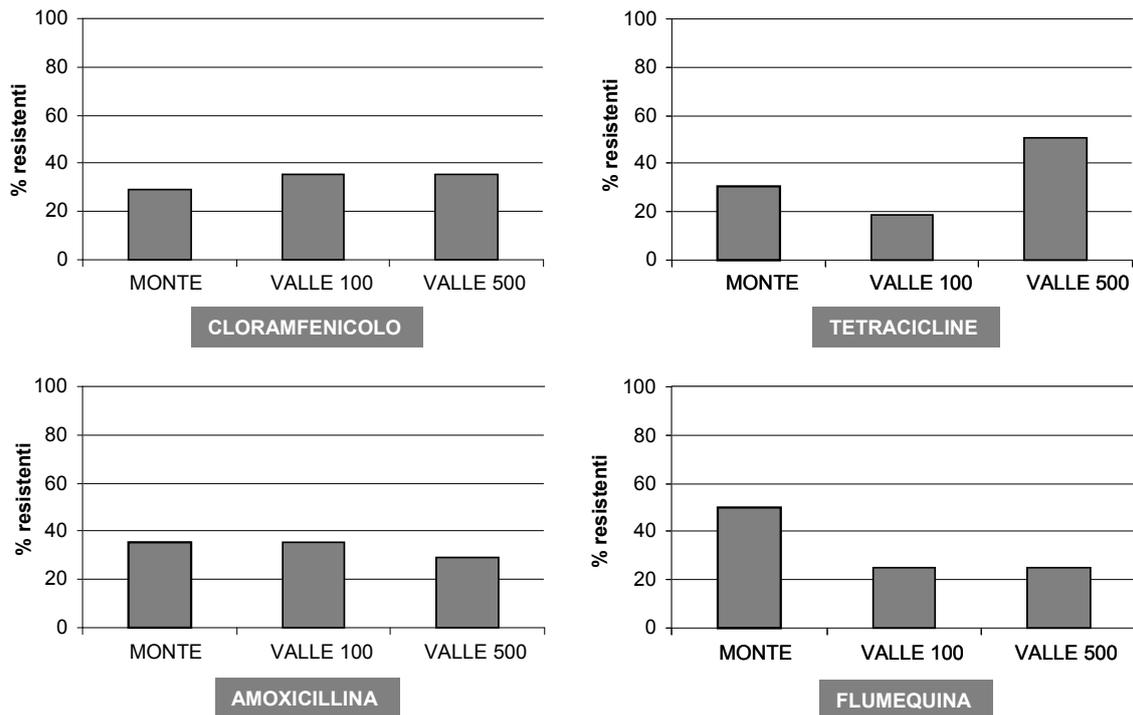


Figura 26. Distribuzione delle resistenze al Cloramfenicolo, alle Tetracicline, all'Amoxicillina e alla Flumequina

Tale andamento suggerisce che un uso eccessivo di questi antibiotici fatto nel corso degli anni nella cura delle profilassi animali potrebbe essere la causa dell'ampiezza della diffusione negli ambienti idrici dei fenomeni di resistenza dei microrganismi agli antibiotici (Brown, 1994; CLSI, 2006). Infatti, anche le popolazioni batteriche situate a monte mostrano una diffusa resistenza agli antibiotici scelti.

Analisi della comunità macrobentonica

Valutazione della struttura della comunità macrobentonica

Durante le due stagioni di campionamento in totale sono stati raccolti e identificati 15780 organismi, dei quali 6178 raccolti in estate e 9602 in inverno.

Sono state identificate 41 US appartenenti ai *taxa* di: Plecoptera (9), Ephemeroptera (8), Tricottera (6), Coleoptera (3), Diptera (6) per quanto riguarda gli insetti; Asellidae e Gammaridae per i crostacei; Ancyliidae; Lymneidae e Planorbidae per i molluschi; Hirudinea (2); e Oligochaeta (2).

È stata studiata la struttura delle comunità tramite 4 metriche descrittive: EPT e 1-GOLD, Indice di Shannon per famiglie, Numero di famiglie, mettendo a confronto i siti a monte e a valle di ciascun impianto di tritocoltura (Tabella 13).

Tabella 13. Metriche descrittive delle comunità raccolte nella stagione estiva e in quella invernale

Stazioni	Stagione estiva				Stagione invernale			
	EPT	1-GOLD	Shannon	Fam*	EPT	1-GOLD	Shannon	Fam*
CSA M	0,283186	0,743363	1,835091	9	0,67734	0,950739	1,054045	11
CSA 100	0,601626	0,829268	1,9980317	14	0,463918	0,556701	1,666421	11
CSA 500	0,578571	0,707143	2,1253612	13	0,615764	0,724138	1,51664	10
USS M	0,441718	0,570552	2,32537	12	0,375546	0,829694	2,008641	15
USS 500	0,505319	0,62234	2,0864916	11	0,660287	0,799043	1,96945	13
BC M	0,676617	0,895522	1,8312069	10	0,768977	0,894389	2,333189	17
BC 100	0,126582	0,683544	0,3584361	8	0,506494	0,798701	2,002572	11
BC 500	0,319444	0,648148	2,1731261	10	0,824419	0,897674	1,893188	17
COL M	0,133333	0,92963	0,8526495	7	0,126812	0,905797	1,2398	14
COL 100	0,033333	0,663636	1,6661219	9	0,045455	0,454545	1,844501	8
COL 500	0,11546	0,937378	0,9644783	12	0,0975	0,89	1,034068	9
CAN M	0,743056	0,861111	1,7365847	12	0,235294	0,458824	1,928647	11
CAN 100	0,958904	0,958904	0,844057	5	0,750965	0,920849	1,39243	13
CAN 500	0,441441	0,441441	1,9266786	9	0,739938	0,982972	1,452702	12
BIS M	0,497585	0,681159	2,2596828	11	0,790795	0,832636	1,895258	12
BIS 500	0,5	0,707317	1,9403629	10	0,638968	0,790831	2,052705	14
POP 100	0,173709	0,906103	1,728545	12	0,09331	0,971831	0,922035	10
POP 500	0,448669	0,764259	2,2017948	12	0,2	0,930556	1,252241	14
BUS M	0	0,241667	1,5968957	9	0,04329	0,324675	1,940123	10
BUS 100	0	0,17037	1,4231888	7	0,014019	0,313084	1,730545	9
BUS 500	0,066372	0,345133	1,8156024	9	0,106383	0,601064	1,739827	8
CAP M	0	0,980456	0,1311611	4	0,124654	0,828255	1,171751	9
CAP 500	0,007916	0,875989	0,606237	7	0,049652	0,917577	0,618306	7
SEF M	0,867052	0,942197	2,2182755	14	0,323887	0,728745	2,061929	14
SEF 500	0,581152	0,659686	1,8694616	9	0,110927	0,25	1,316015	7

* FAM: numero di famiglie

Le quattro metriche, costruite in maniera tale da avere valore tanto più grande quanto più diversificata e bilanciata è la comunità che descrivono, non mostrano andamenti netti in tutti i sistemi studiati. L'EPT e l'1-GOLD, costruiti sulle proporzioni degli organismi più sensibili e più tolleranti rispettivamente, mostrano in generale una diminuzione tra la situazione a monte e a valle degli impianti, per poi recuperare a 500 metri dallo scarico. Tuttavia alcuni sistemi (Canetra nel campionamento invernale e Castel S. Angelo in quello estivo) mostrano una tendenza opposta, con un aumento nel senso della corrente, che potrebbe essere dovuto alla locale mancanza di impatto dell'impianto di trocicoltura sul fiume. Ne è conseguita la mancanza di significatività delle analisi statistiche globali per tutti i sistemi (test ANOVA). L'indice di Shannon per famiglie e il numero di famiglie totale confermano la mancanza di un effetto netto degli impianti di trocicoltura sulle comunità di macroinvertebrati dei fiumi ad essi connessi non avendo un andamento univoco (Shannon, 1948).

Le classificazioni (*cluster analysis*) e le PCA confermano quanto emerso dall'applicazione dei precedenti indici (Figure 27-30). Non è presente una semplificazione degli habitat studiati tale da raggruppare tutti i siti a monte, tutti i siti a 100 m a valle o tutti i siti a 500 m a valle tra loro. Dal grafico della PCA eseguita sui dati di abbondanza dei *taxa* raccolti in inverno non si osserva una segregazione tra le stazioni a monte e a valle degli impianti ma si può apprezzare piuttosto una separazione tra i siti di studio dove sono situati gli impianti stessi. Quindi la variazione della struttura di comunità nelle tre stazioni dello stesso sito di studio sembra essere secondaria rispetto alla qualità generale dell'ecosistema fluviale nel sito stesso.

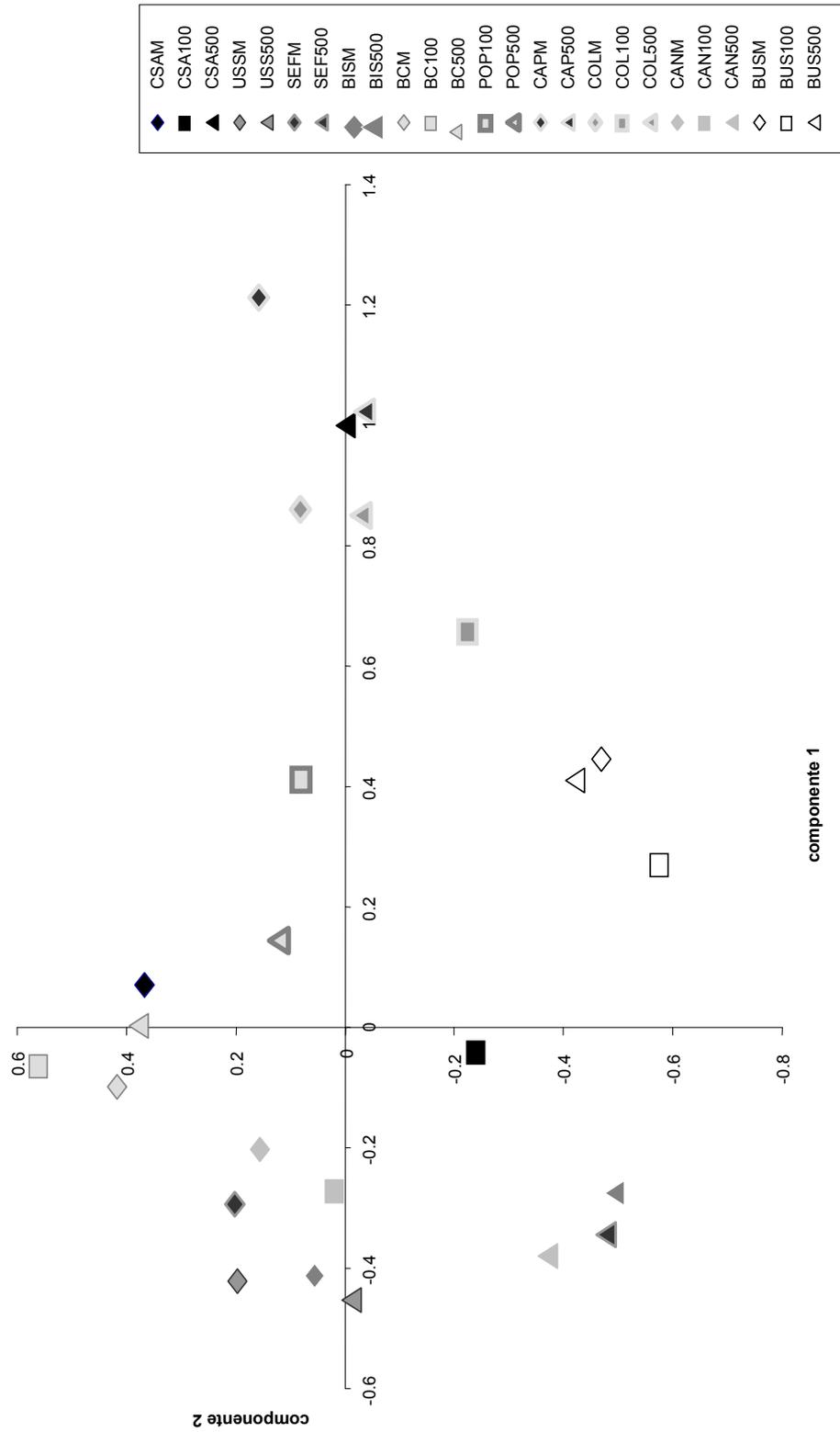


Figura 27. PCA sui dati di struttura delle comunità, stagione estiva

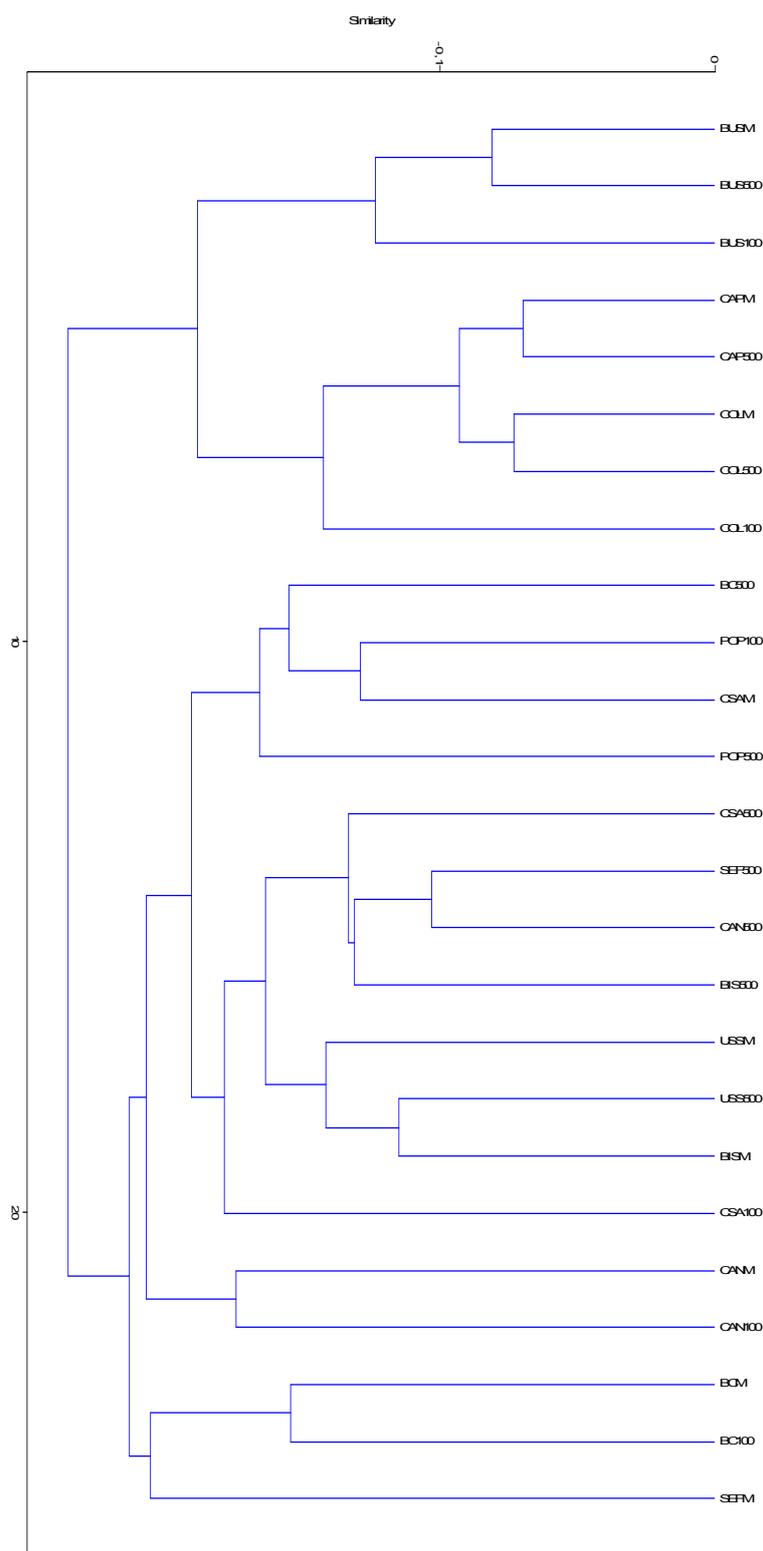


Figura 28. Cluster analysis sui dati di struttura delle comunità, stagione estiva

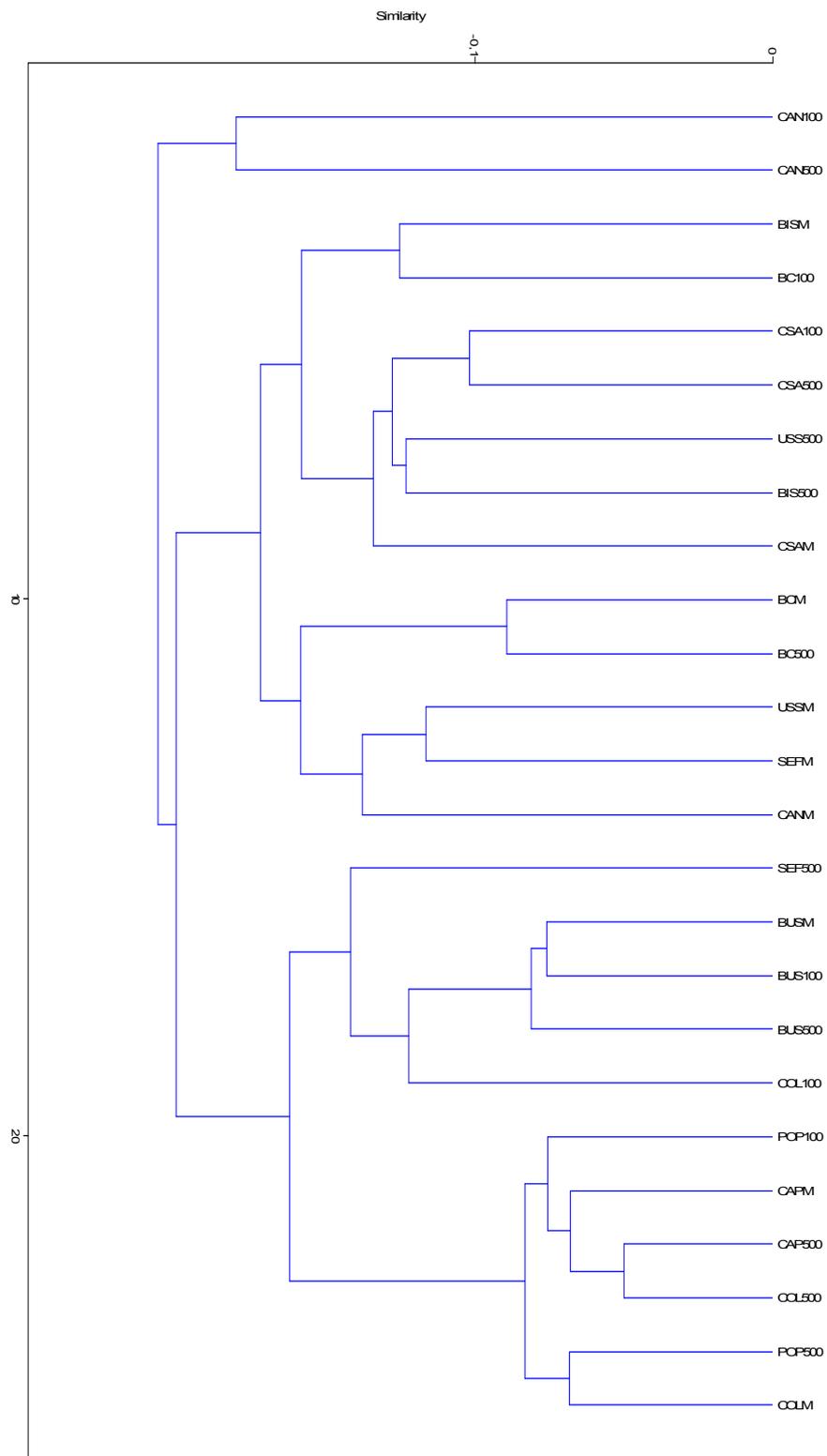


Figura 29. Cluster analysis sui dati di struttura delle comunità, stagione invernale

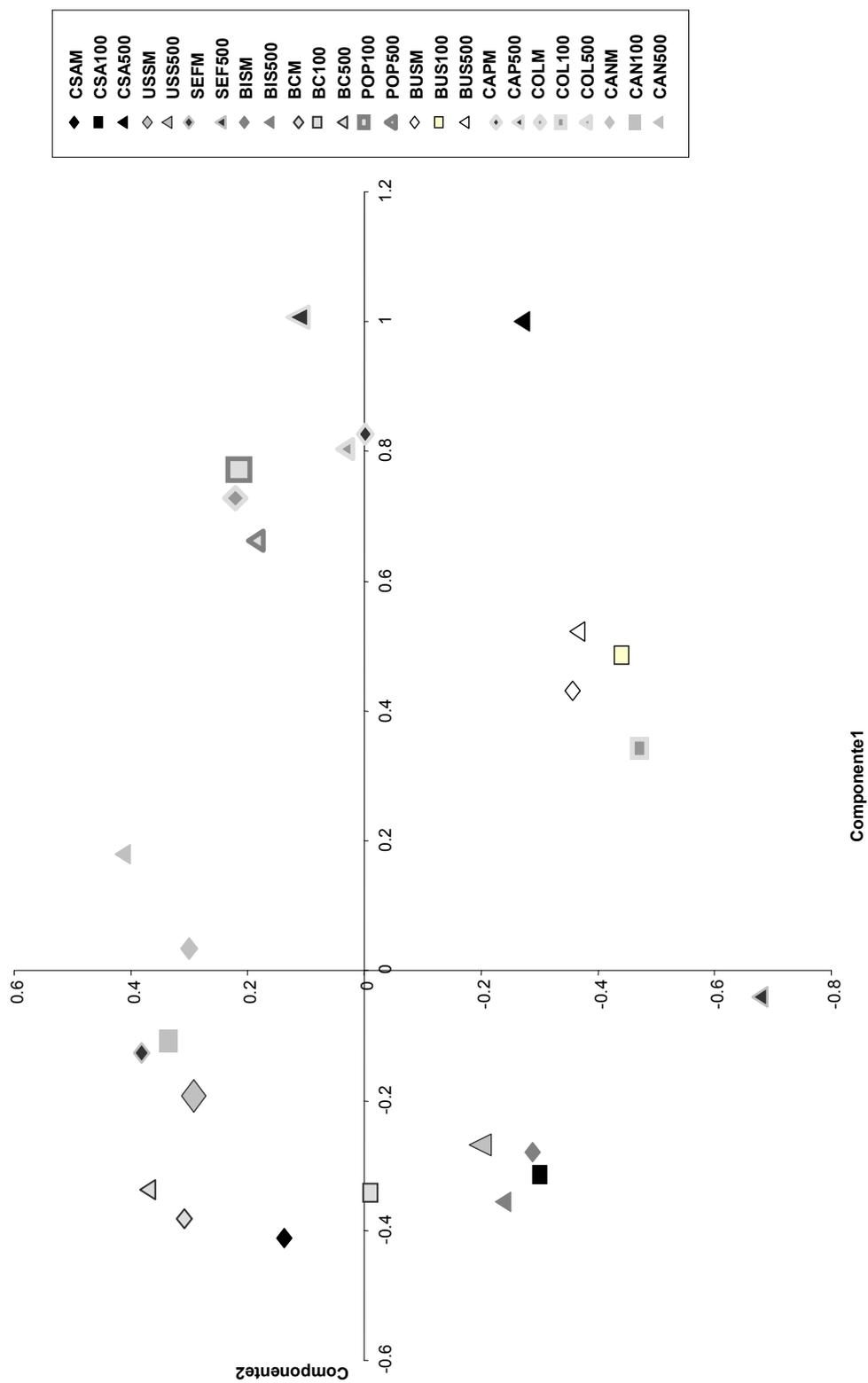


Figura 30. PCA sui dati di struttura delle comunità, stagione-invernale

Calcolo dell'IBE

Il valore dell'IBE calcolato per le comunità a macroinvertebrati reperite nella stagione invernale (Tabella 14) è diminuito in media nelle stazioni a valle ad una distanza di 500 m dagli impianti rispetto a quelle a monte in modo statisticamente significativo ($F_{1,8} = 5,22$; $p < 0,05$) (Figure 31 e 32).

Tabella 14. Valore dell'IBE e classi di qualità corrispondenti per stagioni

Stazione	Stagione estiva			Stagione invernale		
	US	valore IBE	Classe qualità	US	valore IBE	Classe qualità
CSA M	11	8	II	11	10	II
CSA 100	15	9	II	11	6	II
CSA 500	13	7	III	10	7	III
USS M	12	8	II-III	15	8	II
USS 500	12	9	II	13	7	III-II
BC M	10	8	II	17	10	I
BC 100	8	8	II	11	8	II-III
BC 500	10	8	II	18	9	II-I
COL M	7	7	III	14	7	III-II
COL 100	19	5	IV	8	5	IV
COL 500	12	7	III	9	6	III
CAN M	12	9	II	10	7	III
CAN 100	8	7	III	13	8	II-III
CAN 500	9	7	III	12	8	II-III
BIS M	11	8	II-III	12	9	II
BIS 500	10	7	III-II	14	8	II
POP M	0	0	V	0	0	V
POP 100	12	6	III	10	6	III
POP 500	12	9	II	15	9	II
BUS M	9	5	IV	10	5	IV-III
BUS 100	7	5	IV	9	5	IV
BUS 500	9	5	IV	8	5	IV
CAP M	5	4	IV	9	6	III
CAP 500	7	5	IV	7	6	III
SEF M	17	10	I-II	14	8	II
SEF 500	10	7	III	7	6	III-IV

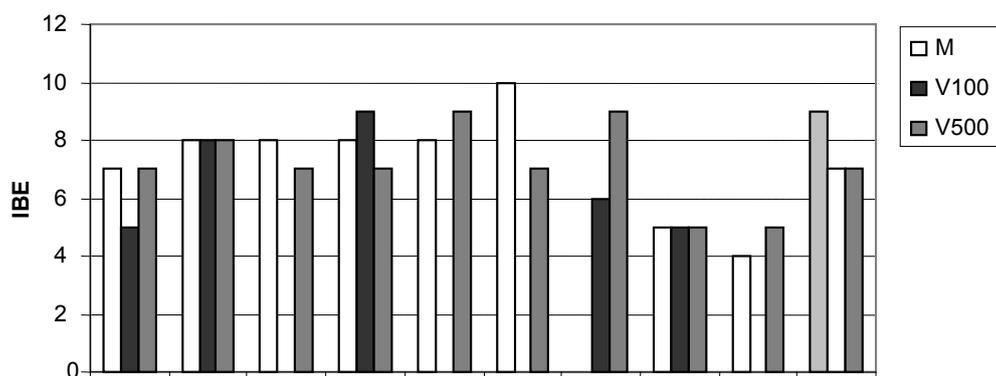


Figura 31. Valore dell'IBE calcolato per ciascun sito alle tre stazioni di studio nel campionamento estivo e invernale

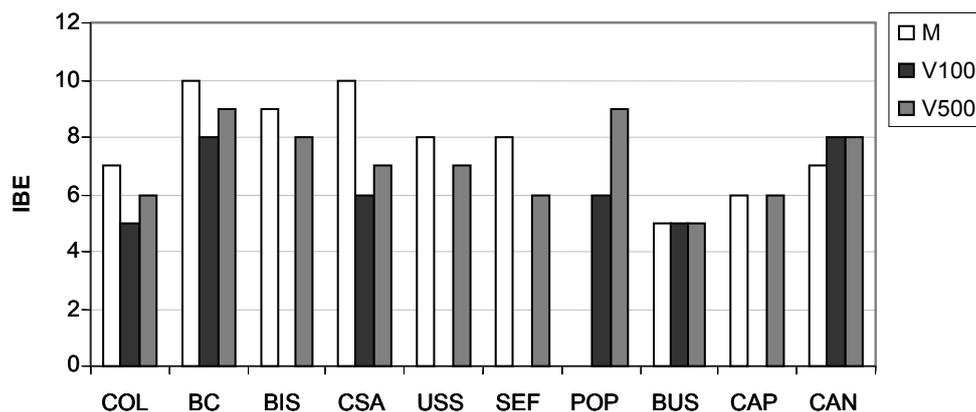


Figura 32. Valore dell'IBE calcolato per ciascun sito alle tre stazioni di studio nel campionamento invernale

Il valore dell'IBE nella stagione estiva in media è diminuito leggermente ma non in modo statisticamente significativo.

Dall'applicazione dell'IBE emerge che di tutti i siti considerati, nella stagione invernale è stata assegnata la Classe di qualità I solo ad una stazione di campionamento (Borgo Cerreto Monte), mentre nella stagione estiva si ha al massimo una Classe di qualità I-II (Sefro Monte). Sono auspicabili ulteriori indagini al fine di accertare la tendenza al peggioramento dei sistemi fluviali studiati.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Gli impianti presi in esame in questo studio sono di media grandezza e operano con tecnologie ad elevata efficienza e a basso costo (Posati, 2003; API, 1999; Gelosi & Colombari, 2004). La distribuzione del mangime è meccanizzata e si aggira su quantitativi annuali pari a circa 9.000 quintali; l'acqua viene ossigenata mediante ossigenatori meccanici, azionati da motori elettrici. Il fondo delle vasche è costituito da cemento e la pulizia delle stesse è assicurata dalla pendenza interna e dal notevole flusso idrico che comporta lo scorrimento veloce dell'acqua all'interno dell'unità di produzione, impedendo la sedimentazione dei detriti. Inoltre, in coincidenza con la rimozione dei pesci per la vendita o per trasferimenti in altre unità produttive, le vasche vengono periodicamente svuotate e pulite.

I risultati delle analisi comparate dei descrittori ambientali rilevati a monte del prelievo idrico e a valle della restituzione nel corpo idrico recettore indicano, in linea generale, un modesto aumento dei parametri chimici e fisici quali i fosfati, l'ossigeno disciolto, la BOD₅ e ammoniaca, soprattutto, negli impianti di Sefro, Capestrano e Bussi sul Tirino in accordo con studi pregressi effettuati nell'impianto di Bussi sul Tirino (Ioppolo *et al.*, 1997 a,b). Anche i valori dell'indice LIM mostrano una diminuzione, in media, a valle degli impianti studiati con la tendenza però, nella stagione invernale, al recupero già alla distanza di 500 m dall'impianto, confermando il modesto impatto dei reflui degli impianti sulla qualità delle acque e sul biota (Figura 21).

Tuttavia, tale caratteristica di resilienza dei sistemi acquatici non si osserva nella stagione estiva, durante la quale le condizioni di stress dovute alla stagione calda, con portate idriche minime, si sommano agli stress dovuti alla presenza stessa degli impianti, comportando un ritardo "spaziale" della fase di recupero (Figura 24).

Analogamente, le analisi sulla comunità macrobentonica indicano una lieve alterazione della struttura di comunità indotta dagli scarichi delle trofoculture. Sulla struttura delle comunità macrobentoniche appaiono più importanti impatti antropici di varia natura come l'alterazione delle caratteristiche idromorfologiche, l'inquinamento diffuso di origine agricola e gli scarichi di origine civile. Infatti, nei siti posti a monte degli impianti la comunità attesa dovrebbe essere composta da un maggior numero di US, tenendo presente che la maggior parte dei siti di campionamento sono ubicati nei tratti alti dei bacini idrografici in cui le pressioni dovrebbero essere ridotte o nulle.

Emblematica è risultata la situazione di Popoli dove a causa della estrema artificializzazione dell'alveo (cementato e raddrizzato), il tratto a monte dell'impianto, è risultato ai campionamenti privo di *taxa* macrozoobentoniche (numero di US pari a 0) (vedi Tabella 14).

In alcuni casi le acque in ingresso agli impianti di allevamento, risultavano quindi già compromesse (da Figura 1 a Figura 16, andamento delle variabili chimico-fisiche).

Appare chiaramente che, presi singolarmente, gli impianti di allevamento non esercitano un forte impatto sull'ambiente, come altre attività produttive più diffuse a livello di bacino (Pillay, 1992). Tuttavia, in ambienti come la Valnerina nella quale sono presenti numerosi impianti a poca distanza l'uno dall'altro, le esternalità negative generate possono avere un impatto più evidente, ad esempio, riducendo la capacità autodepurativa dei sistemi idrici recettori.

I risultati ottenuti dall'analisi di *E. coli* e degli Enterococchi confermano la necessità di indagini ulteriori per individuare la possibile presenza di scarichi isolati e puntuali di origine antropica o zootecnica. Infatti lungo tutto il tratto considerato del fiume Nera e nel fiume Scarsito in prossimità di Sefro, è stata rilevata elevata contaminazione da *E. coli* ed

Enterococchi, così come nel fiume Velino nei pressi di Cànetra. Resta probabile l'ipotesi della presenza di allevamenti zootecnici.

Dai risultati degli studi condotti in relazione alla diffusione di ceppi microbici resistenti agli antibiotici emerge la diffusa presenza nell'ambiente di ceppi resistenti alle Tetracicline e alla Amoxicillina. I ceppi resistenti alla Flumequina sembrano essere una percentuale molto bassa del totale dei ceppi isolati (il 2% su 428 isolati), e anche qui l'incidenza dei resistenti non sembra essere dovuta alla presenza degli impianti ma insita nei sistemi fluviali che conservano memoria delle pressioni ricevute (Tabella 12).

Diversa appare invece la situazione per il Cloramfenicolo, il quale presenta il 4% di resistenti sul totale di 428 ceppi batterici isolati e testati e l'andamento delle resistenze sembra essere influenzato dalla presenza degli impianti, suggerendo la possibilità che di questo farmaco vietato nelle pratiche di allevamento, ne venga, ancora, impropriamente fatto uso.

Poiché l'intensificazione produttiva del settore acquacoltura è stata accompagnata da una maggiore incidenza di patologie e tra le malattie che colpiscono maggiormente questo comparto si osserva una prevalenza di malattie di origine batterica. Nelle trotilcolture le streptococcosi e le vibriosi, le prime dovute a batteri del genere *Streptococchi* e le seconde del genere *Vibrio*, hanno raggiunto una notevole incidenza caratterizzandosi come patologie emergenti in questo settore (Guandalini, 2001). La terapia più frequentemente adottata prevede l'impiego di antibiotici addizionati all'alimento. Tuttavia l'utilizzo dei presidi farmaceutici consentiti fornisce solo risultati parziali dovuti alla diffusione dei fenomeni di antibiotico-resistenza. Nella terapia di tali patologie, la Normativa Italiana sul farmaco veterinario, consente l'utilizzo di Tetracicline, Flumequina e Amoxicillina solo in determinate concentrazioni e modalità di somministrazione, mentre è del tutto vietato l'impiego di farmaci come il Cloramfenicolo.

Questo studio ha confermato che gli impianti di trotilcoltura esercitano un'influenza sui corpi idrici recettori, seppur non come causa principale del "malessere" che sembra colpire questi sistemi fluviali, ma come concausa (Guadalini, 2003; API, 1999). Per minimizzare questo modesto impatto, si suggeriscono strategie gestionali attente alla salvaguardia della qualità ambientale (Cautadella & Carrada, 2000). Le pratiche acquacolturali dovrebbero mirare all'eco-compatibilità finalizzata alla valorizzazione delle risorse idriche per una sostenibilità a lungo termine (Tancioni & Scardi, 2001). Pertanto si suggerisce l'utilizzo di mangimi ad elevata digeribilità contenenti sostanze in grado di ridurre la quantità di cataboliti azotati e fosforati escreti (Posati, 2003). Al contempo è auspicabile la attuazione di protocolli gestionali atti al ridurre gli sprechi di mangime, il quale, oltre a farmaci addizionati, contiene proprio quei nutrienti responsabili del fenomeno dell'eutrofizzazione.

Molteplici sono le strategie possibili per una eco-compatibilità degli interventi terapeutici e profilattici. A fronte delle conseguenze dell'uso improprio di trattamenti antibiotici e della loro inefficace azione nel controllo delle patologie, sono fortemente auspicabili interventi di profilassi indiretta, quali una maggiore attenzione all'igiene dell'allevamento, una riduzione della densità di animali allevati e la somministrazione di vaccini sia per bagno sia per via intraperitoneale. Purtroppo la commercializzazione dei vaccini risulta limitata dalla mancanza di una precisa legislazione in merito. Tuttavia è proprio l'impiego di vaccini che può limitare considerevolmente l'uso di sostanze disinfettanti e antibiotiche.

BIBLIOGRAFIA

- APHA (American Public Health Association). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 20th ed. Washington, DC: APHA, AWWA, WPCF; 1998.
- Guandalini E (Ed.). *Farmaci e disinfettanti utilizzabili in acquacoltura in Italia e nei paesi UE: vademecum*. Verona; Associazione Piscicoltori Italiani; 2003.
- API (Associazione Piscicoltori Italiani). *Programma di monitoraggio degli impianti di acquacoltura nel Lazio*. Roma: Regione Lazio; 1999.
- Arrignon J. *Management of freshwater fisheries*. Enfield, New Hampshire: Science Publishers, Inc.; 1999.
- Aulicino FA, Marranzano M, Mauro L. La contaminazione delle acque superficiali e gli indicatori microbiologici. *Ann Ist Super Sanità* 2005;41(3):359-70.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966;45:493-6.
- Brown DFJ. Developments in antimicrobial susceptibility testing. *Rev Med Microbiol* 1994;5:65-75.
- Campaioli S, Ghetti PF, Minelli A, Ruffo S. *Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane*. Vol. I e II. Trento: Provincia Autonoma di Trento; 1994.
- Cataudella S. Il contesto del codice di condotta per la pesca responsabile (Fao'95) ed i problemi di nuova generazione. In: Cataudella S, Bronzi P (Ed.), *Acquacoltura responsabile verso le produzioni acquatiche del Terzo Millennio*. Roma: Unimar Uniprom; 2001. p. 1-21.
- Cataudella S, Carrada GC (Ed.). *Un mare di risorse. Introduzione alla conservazione ed alla gestione delle risorse ittiche*. Roma: Consorzio Uniprom, 2000.
- CLSI. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2006. (CLSI document M100-S16).
- Davis JC. *Statistics and data analysis in geology*. New York: John Wiley & Sons; 1986.
- De Pauw N, Vanhooren G. Method for biological quality assessment of watercourses in Belgium. *Hydrobiologia* 1983;100:153-68.
- FAO. *Review of the state of World aquaculture: FIRI/C886. (Rev.2)*. Rome: Food and Agriculture Organization; 2003.
- Gelosi E, Colombari PT. *Manuale della Pesca. Ambiente, fauna, pesca, attrezzi, leggi delle acque del Lazio*. Roma: Regione Lazio - Assessorato all'Agricoltura e Agenzia Regionale per lo Sviluppo e l'Innovazione dell'Agricoltura nel Lazio; 2004.
- Ghetti PF. *Manuale di applicazione: Indice Biotico Esteso (IBE). I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti*. Trento: Provincia Autonoma di Trento. Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente; 1997.
- Guandalini E. Igiene in acquacoltura. In: Cataudella S, Bronzi P (Ed.). *Acquacoltura responsabile verso le produzioni acquatiche del Terzo Millennio*. Roma: Unimar Uniprom; 2001. p. 176-97.
- Harper DAT (Ed). *Numerical palaeobiology*. Chichester: John Wiley & Sons; 1999.
- Hawkes HA. Invertebrates as indicators of river water quality. In: James A, Evison L (Ed.). *Biological indicators of water quality*. Chichester, England: Wiley; 1979.
- Hellawell JM. *Biological indicators of freshwater pollution and environmental management*. New York: Elsevier Applied Science Publishers; 1986.
- Hynes HBN. *The biology of polluted waters*. Liverpool, England: Liverpool Uni. Press; 1960.

- Ioppolo A, Dischetti M, Melchiorre S, Cappella MG, Volterra L, Mancini L. Pollution from fish farms: methods applied and evaluation of results. *Rivista Italiana di Acquacoltura* 1997b;32:97-104.
- Ioppolo A, Volterra L, Vischetti Mz, Melchiorre S, Cappella MG, Mancini L. A veterinary approach to the study of environmental impact caused by aquaculture. *Rivista italiana di acquacoltura* 1997a;32:89-95.
- Italia. Decreto legislativo 10 maggio 1976, n. 319. Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n.141, 29 maggio 1976.
- Italia. Decreto legislativo 11 maggio 1999 n.152. Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole. *Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario* n.124, 29 maggio 1999 (n. 101/L).
- Italia. Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario* n. 88, 14 aprile 2006.
- Italia. Decreto Legislativo 6 aprile 2006, n.193. Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari. *Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario* n.121, 26 maggio 2006.
- McGarigal K, Cushman S, Stafford S. *Multivariate statistics for wildlife and ecology research*. New York: Springer; 2000.
- Nazir KHMNH, Rahman MB, Nasiruddin KM, Akhtar F, Khan MFR, Islam MS. Antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* isolated from water and its relation with plasmid profile analysis. *Pakistan journal of Biological Sciences* 2006;8(11):1610-3.
- Ota T, Kaise T. Determination of nitrogen, phosphorus and *Escherichia coli* in rivers. *Raifu Saiensu Kiso Jikken* 1997:161-6.
- Pillay TVR. *Aquaculture and the environment*. Cambridge, MA: Fishing News Books; 1992.
- Posati S. Monitoraggio dell'impatto ambientale degli impianti di trotilcoltura in Valnerina. In: Posati S (Ed.). *Il lago di Pediluco*. Perugia: ARPA Umbria; 2003. p. 21-6.
- Comunità Europea. Regolamento (CE) n. 2377/1999. del Parlamento Europeo e del Consiglio che definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale. *GUCE* L 224, 18 agosto 1990.
- Sahm D, Tenover FC. Surveillance for the emergence and dissemination of antimicrobial resistance in bacteria. *Infect Dis Clin North America* 1997;11:767-83.
- Sansoni G. *Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati dei corsi d'acqua italiani*. Trento: Provincia Autonoma di Trento; 1988.
- Shannon CE. A mathematical theory of communication. *Bell Systems Tech J* 1948;27:379-423.
- Sokal RR, Rohlf G. *Introduction to biostatistic*. San Francisco: Freeman & Co.; 1973.
- Tachet H, Bournaud M, Richoux P. *Introduction à l'étude des macroinvertebrés des eaux douces*. Lyon, France: Association Française de Limnologie; 1987.
- Tancioni, L, Scardi M. Ecologia in acquacoltura. In: Cataudella S, Bronzi P (Ed.). *Acquacoltura responsabile verso le produzioni acquatiche del Terzo Millennio*. Roma: Unimar Uniprom; 2001;154-75.
- Unione Europea. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee* L 327 del 22 dicembre 2000.
- Wright JF, Sutcliffe DW, Furse MT (Ed.). *Assessing the biological quality of freshwaters. RIVPACS and other techniques*. Ambleside, Cumbria, UK: Freshwater Biological Association; 1997.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, ottobre-dicembre 2010 (n. 4) 13° Suppl.