



RAPPORTI ISTISAN 16|3

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Selezione di indicatori nella valutazione della salute degli ecosistemi acquatici

S. Cacioli, B. Gustavino, S. Marcheggiani, E. D'Ugo, C. Puccinelli,
S. Berasi, I. Fioravanti, F. Chiudioni, A.M. D'Angelo, R. Giuseppetti,
E. Pierdominici, L. Mancini



AMBIENTE
E SALUTE

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Selezione di indicatori nella valutazione della salute
degli ecosistemi acquatici**

Silvana Caciolli (a), Bianca Gustavino (b), Stefania Marcheggiani (a),
Emilio D'Ugo (a), Camilla Puccinelli (a), Simona Berasi (a),
Ilaria Fioravanti (a), Filippo Chiudioni (a), Anna Maria D'Angelo (a),
Roberto Giuseppetti (a), Elio Pierdominici (a), Laura Mancini (a)

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

(b) Dipartimento di Biologia, Il Università degli Studi "Tor Vergata", Roma

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

16/3

Istituto Superiore di Sanità

Selezione di indicatori nella valutazione della salute degli ecosistemi acquatici.

Silvana Cacioli, Bianca Gustavino, Stefania Marcheggiani, Emilio D'Ugo, Camilla Puccinelli, Simona Berasi, Ilaria Fioravanti, Filippo Chiudioni, Anna Maria D'Angelo, Roberto Giuseppetti, Elio Pierdominici, Laura Mancini
2016, 31 p. Rapporti ISTISAN 16/3

La qualità delle acque, in particolare quelle superficiali, dipende dalle molteplici attività che si svolgono sul territorio. Gli insediamenti urbani, gli agglomerati industriali, l'agricoltura, la zootecnia e l'uso del territorio in genere producono effetti che, singolarmente o in sinergia tra loro, inducono perturbazioni sugli ecosistemi acquatici. Il degrado degli ecosistemi acquatici può avere degli impatti significativi sulla salute umana; i meccanismi con cui l'acqua può danneggiare la salute sono numerosi: consumo d'acqua o di prodotti ittici contaminati, contatto con invertebrati acquatici, mancanza d'acqua o infezioni diffuse da vettori collegati alla sua presenza. L'aumento di eventi alluvionali, in conseguenza di cambiamenti nelle precipitazioni, può causare contaminazione delle fonti di approvvigionamento idrico, in particolare di tipo fecale. Questo approccio tende a considerare la salute umana e la salute ecosistemica strettamente interconnesse. In questo rapporto si riporta una selezione di indicatori utili a definire la salute di un ecosistema acquatico e il contesto normativo.

Parole chiave: Indicatori biologici; Qualità delle acque; Salute degli ecosistemi acquatici; Salute umana

Istituto Superiore di Sanità

Selection of indicators in the evaluation the aquatic ecosystems health.

Silvana Cacioli, Bianca Gustavino, Stefania Marcheggiani, Emilio D'Ugo, Camilla Puccinelli, Simona Berasi, Ilaria Fioravanti, Filippo Chiudioni, Anna Maria D'Angelo, Roberto Giuseppetti, Elio Pierdominici, Laura Mancini
2016, 31 p. Rapporti ISTISAN 16/3 (in Italian)

Water quality, particularly surface water, depends on a variety of activities that take place on the territory. Urban settlements, industrial conglomerates, agriculture, animal husbandry and land use typically produce effects which, individually or in synergy with each other, induce perturbations on aquatic ecosystems. The degradation of aquatic ecosystems can have significant impacts on human health. The mechanisms by which water can damage health are numerous: water consumption or contaminated fish, aquatic invertebrates' contact, lack of water or infections spread by vectors linked to its presence. The increase of floods as a result of changes in precipitation can cause contamination of water supplies, particularly faecal contamination. This approach tends to consider closely interconnected the human and ecosystem health. In this report it is provide a selection of indicators to determine the health of an aquatic ecosystem, and the regulatory environment.

Key words: Biological indicators; Water quality; Aquatic ecosystems health; Human health

Per informazioni su questo documento scrivere a: silvana.cacioli@iss.it

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

Citare questo documento come segue:

Cacioli S, Gustavino B, Marcheggiani S, D'Ugo E, Puccinelli C, Berasi S, Fioravanti I, Chiudioni F, D'Angelo AM, Giuseppetti R, Pierdominici E, Mancini L. *Selezione di indicatori nella valutazione della salute degli ecosistemi acquatici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2016. (Rapporti ISTISAN 16/3).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Gualtiero Ricciardi*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Paola De Castro e Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.

INDICE

Introduzione	1
Valutazione della qualità ambientale dei corsi d'acqua	3
Classificazione dello stato ecologico	3
Definizione delle tipologie fluviali	4
Indicatori biologici.....	5
Macroinvertebrati bentonici	5
Valutazione dello stato ecologico: STAR_ICMi	7
Diatomee bentoniche.....	7
Valutazione dello stato ecologico: ICMi	8
Macrofite acquatiche	8
Valutazione dello stato ecologico: IBMR.....	9
Indicatori ecotossicologici	9
Valutazione della tossicità.....	11
Indicatori di effetti mutageni	13
Test dei micronuclei in <i>Vicia faba</i>	14
Indicatori microbiologici	16
Malattie idrotrasmesse	17
Fattori associati alla comparsa di patogeni emergenti e re-emergenti.....	18
Procedura per la valutazione dello stato ecologico: dal campionamento al test	20
Metodi di campionamento	20
Macroinvertebrati bentonici	21
Diatomee bentoniche.....	22
Macrofite acquatiche	22
Test ecogenotossicologici	23
Test dei micronuclei in <i>Vicia faba</i>	23
Test su <i>Vibrio fischeri</i>	24
Test su <i>Daphnia magna</i>	24
Approccio integrato per la valutazione dello stato ambientale: caso studio	24
Bibliografia	26

INTRODUZIONE

La qualità delle acque, in particolare quelle superficiali, riflette fedelmente il grado di compatibilità ambientale delle molteplici attività svolte sul territorio. Gli insediamenti urbani, gli agglomerati industriali, l'agricoltura, la zootecnia e l'uso del territorio in genere producono effetti che, singolarmente o in sinergia tra loro, inducono perturbazioni sugli ecosistemi acquatici. Se queste perturbazioni superano la capacità di resilienza e di resistenza degli ecosistemi, le condizioni che garantiscono la stabilità degli equilibri naturali vengono meno (Cecchi & Mancini, 2005). L'alterazione di questi equilibri causa un deterioramento più o meno accentuato della qualità ambientale. A seconda del grado di inquinamento l'ecosistema si modifica, diminuisce la qualità delle acque e il paesaggio e la fruibilità territoriale risultano compromessi. Se in passato la qualità dei corsi d'acqua è stata considerata esclusivamente in un'ottica antropocentrica, considerandola cioè solo in relazione ai possibili usi che avrebbe potuto farne l'uomo, oggi l'attenzione si è spostata dalla sola matrice acqua all'intero alveo bagnato e ad un approccio integrato per salvaguardare la salute dell'intero ecosistema compreso l'uomo (Cecchi & Mancini, 2006).

Lo studio degli ecosistemi in termini di salute è un approccio integrato che consente di indagare la dicotomia salute umana e salute ecosistemica (Lackey, 2001).

La salute degli ecosistemi riguarda lo stato delle comunità e degli organismi animali e vegetali che lo compongono e la loro capacità di modificare l'ambiente in cui vivono, attraverso le loro attività che in alcuni casi possono compromettere le funzioni ecologiche di un intero ecosistema. Tra gli organismi che compongono queste comunità non può prescindere l'uomo. Un ecosistema è un sistema complesso e dinamico che combina comunità biotiche e abiotiche interagenti (Tansley, 1935). Per definizione, un ecosistema in salute possiede tre attributi fondamentali: organizzazione, funzionalità e resilienza (Odum & Barret, 2004). La capacità degli ecosistemi di fornire servizi è ormai nota, quello che è meno chiaro è l'identificazione di caratteristiche che possano inequivocabilmente definire il suo stato di salute. Negli ultimi anni si è riconosciuto che la salute umana è condizionata da una complessa rete di fattori e processi ambientali che includono determinismi reciproci tra ambiente e azioni umane.

Quando si parla di rischio per la salute umana si fa riferimento ad una incapacità di affrontare in modo adeguato i rischi ambientali o all'impossibilità di accedere a servizi e a risorse essenziali, oltre che ad uno sviluppo sostenibile.

Il collegamento tra salute e ambiente acquista un ruolo prioritario nella tutela degli ecosistemi acquatici (Carere *et al.*, 2008). La conservazione di questi ecosistemi è fondamentale perché le risorse idriche e la loro buona qualità e quantità, la biodiversità vegetale e animale, le attività antropiche (industriali e agricole) e la salute umana, si basano su di essa.

Per una caratterizzazione più puntuale del termine "salute", in relazione agli ecosistemi, sono stati inclusi elementi come l'alterazione del biota e dei flussi di energia, la perdita dei nutrienti e, più in generale, la perdita d'equilibrio tra le componenti dell'ecosistema. Queste alterazioni nel complesso possono avere un impatto negativo sulla salute umana (De Groot, 1992). La quasi totalità dei disturbi rilevati negli ecosistemi sono da attribuire alle attività umane, questo perché non si ha l'effettiva consapevolezza di essere parte integrate degli ecosistemi e della loro funzionalità. In questo contesto l'attenzione non è da porre su alterazioni locali dovute a fenomeni di inquinamento puntuali, ma la scala da considerare è quella globale. Ad oggi un terzo della popolazione mondiale vive in condizioni di carenza e di scarsa qualità della risorsa idrica (WHO, 2013).

Le acque costiere sono contaminate da fonti terrestri, in particolare reflui urbani, molte risorse ittiche sono classificate come sovra sfruttate, la distribuzione spaziale e temporale delle precipitazioni sta cambiando. Inevitabilmente questi fenomeni stanno iniziando ad avere delle ripercussioni sulla salute umana, riguardanti l'alimentazione e la qualità della vita (WHO 2003)

Quando si parla di ripercussioni sulla salute umana si fa riferimento ad un'incapacità di affrontare in modo adeguato rischi ambientali o all'impossibilità di accesso a servizi e a risorse essenziali ma anche ad uno sviluppo non sostenibile.

Per una corretta analisi dei rischi per la salute umana bisogna prendere in considerazione le modificazioni sociali come l'aumento delle prospettive di vita, la diminuzione dell'incidenza di alcune malattie o l'aumento di alcune altre, i pericoli chimico-biologici a cui è sottoposto l'ambiente e le modificazioni ambientali.

In questo contesto è possibile dire che il deperimento dell'ecosistema incide sull'uomo dal punto di vista fisico, biologico e socio-economico.

Il degrado di ecosistemi acquatici può avere degli impatti significativi sulla salute umana. L'inquinamento delle acque dolci e degli ecosistemi marini è causa ogni anno di milioni di decessi potenzialmente evitabili. I meccanismi con cui l'acqua può danneggiare la salute sono numerosi: consumo d'acqua o di prodotti ittici contaminati, contatto con invertebrati acquatici, mancanza d'acqua o infezioni diffuse da vettori collegati alla sua presenza. Ecosistemi acquatici come stagni e pozze, influenzati dai cambiamenti climatici, costituiscono l'ambiente riproduttivo per determinati parassiti e vettori di malattie; la modifica nei regimi idrici di questi sistemi può modificare l'incidenza di tali malattie. L'aumento di eventi alluvionali in conseguenza di cambiamenti nelle precipitazioni può causare contaminazione delle fonti di approvvigionamento idrico, in particolare di tipo fecale (Marcheggiani *et al.*, 2010).

Questo approccio tende a considerare la salute umana e la salute ecosistemica strettamente interconnesse. In questo rapporto si riporta una selezione di indicatori utili a definire la salute di un ecosistema acquatico e il contesto normativo.

VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ AMBIENTALE DEI CORSI D'ACQUA

Il sistema normativo, che regola il settore delle acque in Europa e in Italia, è stato radicalmente modificato negli ultimi anni sotto la spinta della sempre più consolidata asserzione della esauribilità della risorsa, ed è stato sempre più orientato ad uno sviluppo sostenibile e verso una gestione integrata delle risorse idriche (Mancini & Fidente, 2007).

Per quanto riguarda l'Europa, l'ultimo traguardo in materia di tutela delle acque è rappresentato dalla Direttiva Quadro Acque 2000/60/CE (Europa, 2000) e dalle direttive specifiche relative alle acque sotterranee (Europa, 2006), e alle acque marine (Europa, 2008). La Direttiva Quadro sulle Acque istituisce un quadro per la protezione delle acque superficiali e sotterranee con lo scopo di mantenere e migliorare l'ambiente acquatico all'interno della Comunità Europea. Gli obiettivi della Direttiva sono: prevenire l'ulteriore deterioramento, proteggere e migliorare lo stato degli ecosistemi acquatici e delle zone umide associate, promuovere un utilizzo sostenibile dell'acqua basato sulla protezione a lungo termine delle risorse idriche disponibili, assicurare la progressiva riduzione dell'inquinamento delle acque sotterranee e prevenire il loro ulteriore inquinamento e contribuire a mitigare gli effetti delle inondazioni e della siccità (Wernersson *et al.*, 2015). Il suo principale aspetto innovativo è l'importanza riconosciuta agli elementi biologici: alla visione prettamente antropocentrica del passato, con una gestione basata essenzialmente sul rispetto di determinati valori tabellari per i principali parametri fisici, chimici e microbiologici, si stanno sostituendo approcci di tipo ecosistemico, che pongono al centro proprio l'analisi delle comunità biotiche (Bargagli, 2012). Per quanto concerne gli ecosistemi lotici la normativa prevede, tra gli elementi biologici, lo studio delle comunità del fitobenthos (di cui sono state scelte le diatomee come rappresentanti principali), delle macrofite acquatiche, dei macroinvertebrati bentonici e dei pesci. Il raggiungimento di questi fini è affidato principalmente al sistema di monitoraggio volto a definire lo stato delle acque e a fornire le indicazioni per il risanamento e il conseguente raggiungimento degli obiettivi di qualità.

In Italia, la Direttiva è stata recepita attraverso l'emanazione del DL.vo 152/2006 e successive integrazioni, attraverso una serie di decreti da parte del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (DM 131/2008, DM 56/2009, DM 260/2010).

Classificazione dello stato ecologico

La Direttiva 2000/60/CE indica, per tutte le tipologie di corpi idrici, gli elementi specifici per la classificazione dello stato ecologico. Questi sono costituiti da elementi biologici, idro-morfologici, chimici e fisico-chimici. Attraverso il monitoraggio si deve arrivare alla classificazione dei corpi idrici in base al loro stato di qualità ambientale e seguire l'evoluzione di questo stato, intervenendo ove necessario con interventi di risanamento.

L'obiettivo principale della Direttiva è il raggiungimento di un "buono stato ecologico" per tutti i corpi idrici considerati significativi entro il 31 dicembre 2015.

Lo stato ecologico deve essere espresso come RQE (Rapporto di Qualità Ecologica), calcolato rapportando i valori dei parametri biologici, riscontrati in un dato corpo idrico superficiale, a quelli costatabili nelle condizioni di riferimento applicabili al medesimo corpo. Il rapporto è espresso come valore numerico compreso tra 0 ed 1: i valori prossimi a 1 tendono

allo stato ecologico elevato, quelli prossimi allo 0 allo stato ecologico pessimo. Le indicazioni della Direttiva 2000/60/CE per la classificazione dello stato ecologico sono riportate nel “Regolamento recante i criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali” (DM 260/2010).

Lo stato ecologico è l'espressione della complessità degli ecosistemi acquatici, 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. Fondamentale, per la valutazione dello stato ecologico, è la definizione delle “Condizioni di riferimento”, che devono essere individuate per ogni tipologia di corpo idrico significativo individuato seguendo le indicazioni della linea guida europea, pubblicata nell'ambito della *Common Implementation Strategy* (CIS, 2005), sviluppata a livello europeo. Il suo scopo principale è quello di fornire supporto all'implementazione di questa normativa mediante lo sviluppo di attività e linee guida, messe a punto da esperti del settore sui suoi elementi chiave. Sono stati inoltre formati gruppi di lavoro, coordinati dall'Istituto Superiore per la Protezione dell'Ambiente (ISPRA), a cui hanno partecipato rappresentanti delle Agenzie e delle Istituzioni di ricerca nazionali, che hanno prodotto i protocolli per i metodi di campionamento per tutti gli elementi di qualità biologica delle acque dolci superficiali e per gli elementi chimico-fisici (ISPRA, 2007; 2013)

Per poter riqualificare e gestire gli ecosistemi acquatici, è necessario adottare strategie di monitoraggio integrate e innovative. A differenza delle determinazioni fisico-chimiche infatti, le variazioni nella distribuzione, nella composizione e nella struttura delle comunità animali e vegetali acquatiche riflettono gli effetti integrati degli inquinanti e degli stimoli provenienti dalle componenti biotiche e abiotiche dell'ecosistema.

Definizione delle tipologie fluviali

Nel processo di definizione delle tipologie fluviali, proposto dalla Direttiva Quadro sulle Acque, l'Italia ha scelto il sistema di classificazione di tipo B, per la definizione dei tipi fluviali nazionali (DM 131/08). La procedura utilizzata per la definizione dei tipi, per i corsi d'acqua, si articola in tre livelli successivi, di seguito descritti:

– *Livello 1. Regionalizzazione*

Il processo di regionalizzazione prevede la suddivisione del territorio nazionale in idro-eco-regioni (*Hydro-Eco-Regions*, HER), che presentano, al loro interno, una limitata variabilità per le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche, sulle quali applicare successivamente la tipizzazione dei corsi d'acqua.

– *Livello 2. Definizione di una tipologia*

Il livello 2 consente di giungere ad una tipizzazione di tutti i corsi d'acqua con dimensione minima di bacino di 10 km², o di dimensione minore sulla base di alcuni descrittori abiotici comuni, con l'obiettivo di ottenere una lista di tipi riconosciuti, come ulteriore approfondimento della regionalizzazione in HER.

È importante ricordare come i criteri selezionati devono essere il più possibile indipendenti dalla presenza di eventuali alterazioni indotte dalle attività antropiche. Ad esempio, ove si consideri la morfologia dell'alveo, essa andrà definita in tratti fluviali non canalizzati, fortemente risonanti o soggetti a prelievi idrici di rilievo, dove tale criterio risulterà evidentemente inapplicabile.

– *Livello 3. Definizione di una tipologia dettaglio*

Questo livello è opzionale, a discrezione delle Regioni, e si basa su diversi descrittori, la cui utilità e appropriatezza devono essere dimostrate su scala locale/regionale.

Su scala nazionale, le analisi hanno portato a riconoscere delle similarità delle comunità biologiche e dei parametri idromorfologici in determinate zone, che permettono di ricondurre tutti i tipi fluviali indentificati a delle categorie fluviali più grandi, definite macrotipi fluviali (DM 260/2010).

Indicatori biologici

Dall'anno 2006 risulta in vigore il nuovo testo unico in materia ambientale, il DL.vo 152/2006, che modifica profondamente il contenuto del monitoraggio delle acque interne superficiali rispetto a quanto richiesto dal DL.vo 152/1999, in relazione al recepimento della Direttiva 2000/60/CE sulle acque. Al monitoraggio basato principalmente sugli elementi fisico-chimici delle acque e sui macroinvertebrati – indice LIM (Livello di Inquinamento da Macrodescrittori) e l'IBE (Indice Biotico Estesio) – tutti gli elementi biologici assumono il ruolo principale nel determinare lo stato di qualità dell'ambiente idrico. L'analisi delle comunità biologiche assume quindi un ruolo predominante nel determinare il giudizio di qualità, mediante le indagini sul macrobenthos, sulle diatomee e sulle macrofite. I pesci, pur essendo indicatori biologici richiesti dalla Direttiva Quadro, non vengono trattati in questa guida. L'analisi della struttura delle comunità biologiche, ovvero composizione e abbondanza delle specie, proporzione tra specie sensibili e tolleranti prevede una fase di campionamento e una fase di analisi della composizione della comunità, tramite l'identificazione tassonomica dei gruppi (famiglie, generi, specie) che la compongono e di un metodo di classificazione.

Il maggior rilievo dato agli indicatori biologici, ha reso necessari approfondimenti, messe a punto, o modifiche di metodi per la valutazione delle singole componenti biologiche: diatomee, macrofite, macroinvertebrati e pesci. Gruppi di lavoro si sono riuniti a livello nazionale per la stesura di Protocolli di Campionamento e Analisi (ISPRA, 2007; ISPRA, 2014); sono stati messi a punto metodi per la valutazione dello stato ecologico dei diversi elementi biologici (Buffagni *et al.*, 2008; Mancini & Sollazzo 2009; Minciardi *et al.*, 2009); è stato realizzato l'Atlante iconografico delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua italiani (De Meo *et al.*, 2014). Passaggio successivo è stato la creazione di un software: Diatom_Eqr_It, per la valutazione dello stato ecologico basato sulle comunità diatomiche (Bugarini *et al.*, in stampa); MacOper.Icm per le comunità dei macroinvertebrati (Buffagni & Belfiore, 2013).

Per ogni comunità le tre diverse fasi avvengono con modalità differenti attraverso metodiche standardizzate (ISPRA, 2014; Buffagni *et al.*, 2008; Mancini & Sollazzo, 2009; Minciardi *et al.*, 2009).

Macroinvertebrati bentonici

Lo studio del macrobenthos rappresenta un importante strumento per il monitoraggio dell'ambiente acquatico: le comunità bentoniche sono, infatti, largamente usate come indicatori delle caratteristiche ambientali e quindi per il rilevamento di possibili alterazioni dell'ecosistema (Turco, 2011). La loro importanza ha fatto sì che esse siano state alla base di numerose ricerche sviluppatesi negli ultimi decenni in Europa.

I popolamenti bentonici nel complesso sono costituiti da organismi che vivono nelle acque e vengono divisi, per ragioni puramente pratiche, in micro- e macro-invertebrati.

I microinvertebrati hanno dimensioni che raramente superano il millimetro di lunghezza (es. Protozoa, Rotifera, Nematoda, Gastrotrichia, Tardigrada, Ostracoda, Cladocera, Copepoda, Acarina), mentre i macroinvertebrati presentano dimensioni superiori al millimetro, essendo quindi facilmente visibili ad occhio nudo. A questo gruppo, privo di valenza tassonomica, fanno parte: Insetti, Crostacei, Molluschi, Oligocheti, Irudinei, Platelmini e, più raramente, Poriferi, Celenterati e Briozoi (Ciadamidaro *et al.*, 2012).

Per standardizzare le pratiche di campionamento, i macroinvertebrati furono definiti dalla *Environmental Protection Agency* (Weber, 1973) come organismi che vengono tratti da un setaccio avente maglie di 0,595 mm pari a 21 maglie/cm. Il “Protocollo di campionamento dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d’acqua guadabili” (ISPRA, 2007; 2014) definisce invece i macroinvertebrati come invertebrati visibili ad occhio nudo con lunghezza > 0,5 mm.

Gli invertebrati bentonici si possono suddividere in due gruppi, anche se la distinzione tra questi non è mai molto netta:

- *epibentonici*,
che vivono sulla superficie o nei primissimi centimetri del substrato;
- *endobentonici*
o freatici, che vivono all’interno dei sedimenti a varia profondità.

La comunità di macroinvertebrati, indipendentemente dalle situazioni di stress antropico, non ha una composizione costante durante tutto l’anno ma variabile a seconda dei cicli vitali delle varie specie. La maggior parte delle popolazioni di invertebrati vive nell’acqua solo durante lo stadio larvale e può avere una sola generazione per anno, come nelle specie univoltine, oppure avere più di una generazione per anno come nelle specie polivoltine. I primi si rinvergono solo in determinati periodi, i secondi sono poliannuali (Mancini & Andreani, 2008). La maggior parte delle specie sono soggette comunque a cicli vitali stagionali; pertanto, per poter correttamente definire la composizione tassonomica di un sito, le abbondanze degli individui e la diversità, le stagioni di campionamento devono essere chiaramente stabilite. In ogni caso, è indispensabile procedere al campionamento in regime di magra (bassa portata) e di morbida (portata intermedia), derivate da portate decrescenti.

I macroinvertebrati bentonici sono, insieme alle alghe, il gruppo di organismi più spesso raccomandati per la valutazione della qualità delle acque (Hellawell, 1986; Rosenberg & Resh, 1992). In particolare, negli ambienti acquatici, il comparto sedimenti è quello dove si concentrano molte delle sostanze più pericolose, quali quelle bioaccumulabili, persistenti e tossiche, che possono avere effetti sulle comunità bentoniche (Mancini & Pace, 2008).

È possibile individuare le caratteristiche biologiche che li rendono dei buoni indicatori: sono ubiquitari, quindi subiscono l’effetto di perturbazioni ambientali in differenti tipologie di ambiente e in diversi microhabitat; inoltre sono presenti in numero elevato facilitando la procedura di campionamento e l’analisi del campione stesso. In aggiunta, la comunità è costituita da numerose specie, ognuna con particolari esigenze ecologiche, che offrono un ampio spettro di risposte a stress ambientali; essendo principalmente sedentarie, permettono un’analisi spaziale delle perturbazioni e la valutazione di impatti sito-specifici. I cicli di vita relativamente lunghi delle diverse specie, consentono analisi a lungo termine degli effetti di perturbazioni, sia continue che intermittenti, causati da uno o più agenti, riflettendo anche effetti sinergici. Infine, si conosce la risposta di molte specie a diversi tipi di inquinamento. Questo permette di poter valutare come l’intera comunità venga alterata, fornendo un quadro di insieme sul grado di alterazione dell’ambiente. Tali organismi offrono inoltre molti vantaggi legati alle modalità di analisi: il campionamento è relativamente semplice e poco costoso, la tassonomia del gruppo è ben conosciuta e sono disponibili chiavi dicotomiche per l’identificazione.

Valutazione dello stato ecologico: STAR_ICMi

Lo STAR_ICMi (*Standardization of River Classifications_Itercalibration Multimetric Index*) è un indice multimetrico che fornisce informazioni in merito ai principali aspetti che la Direttiva chiede di considerare per l'analisi della comunità macrobentonica (Buffagni *et al.*, 2005; Buffagni *et al.*, 2008).

Il nuovo sistema di classificazione, sostitutivo dell'IBE, non intende essere "stressor-specifico" ma, al contrario, ha come scopo la valutazione della qualità generale dei siti fluviali. L'indice è composto da 6 metriche, opportunamente normalizzate e ponderate, che descrivono i principali aspetti su cui la Direttiva 2000/60/CE pone l'attenzione (Buffagni & Erba, 2007). Per una descrizione dettagliata delle metriche si rimanda alla bibliografia (Armitage *et al.*, 1983; Pinto *et al.*, 2004; Ofenböck *et al.*, 2004; Böhmer *et al.*, 2004; Hering *et al.*, 2004). Dalla somma delle sei metriche normalizzate, ciascuna delle quali moltiplicata per il proprio peso, si ottiene l'indice multimetrico finale.

Il valore esatto dell'indice si ottiene con il sistema MacrOper, proposto in Italia come nuovo metodo per il monitoraggio e la classificazione dei fiumi, secondo le indicazioni della Direttiva Quadro sulle Acque e, pertanto, assunto all'interno della sperimentazione come metodologia di riferimento. Come indicato dalla Direttiva, per fornire un risultato in accordo con quanto richiesto dalla legislazione europea per i sistemi di classificazione, lo STAR_ICMi viene espresso in RQE e assume valori teorici tra 0 e 1. I valori di indice rappresentativi della qualità ecologica vengono confrontati con una scala di qualità ambientale costituita da 5 livelli, sulla base dello stato corrispondente.

Il metodo sopra descritto è il metodo ufficiale italiano utilizzato nel monitoraggio e riportato nel DM 260/2010.

Diatomee bentoniche

Gruppo di alghe brune unicellulari microscopiche (divisione Bacillariophyta), ubiquitarie negli ambienti fluviali presenti in numero elevato con una notevole diversità ecologica, caratteristiche che le rendono tra tutte le più indicate nel monitoraggio delle acque correnti. Caratteristica principale è la parete cellulare, detta frustulo, costituita principalmente di silice amorfa idratata, è costituita da due valve: epivalva e ipoalva. Queste si inseriscono l'una sull'altra chiudendosi a formare una struttura simile a una scatola.

La classificazione delle diatomee si basa principalmente su caratteri fenotipici del frustulo. La prima distinzione porta alla suddivisione delle alghe in due ordini: quello delle *Centrales* (frustulo con simmetria raggiata) e quello delle *Pennales* (frustulo con simmetria bilaterale).

Se confrontate con altri gruppi di bioindicatori, le diatomee hanno assunto negli ultimi decenni un ruolo fondamentale nella valutazione della qualità delle acque per alcune delle loro caratteristiche: sono ubiquitarie e hanno cicli vitali molto più brevi di quelli dei macroinvertebrati.

I principali fattori ecologici nell'ambiente acquatico (velocità della corrente, pH, temperatura, ossigeno disciolto, sali nutritivi, torbidità, temperatura) influenzano lo sviluppo della comunità diatomica che risulta anche fortemente condizionata dall'effetto di molteplici fattori antropici, legati in particolare al tenore di sostanza organica disciolta, e al particolato nelle acque. A questo proposito, infatti, i primi Indici Diatomici messi a punto e utilizzati a livello europeo, hanno sfruttato in particolare la sensibilità delle Diatomee alla trofia delle acque, caratteristica che del resto accomuna le diatomee alla restante componente vegetale macroscopicamente visibile dell'ambiente fluviale, costituita dalle macrofite acquatiche.

Valutazione dello stato ecologico: ICMi

Per quanto riguarda la valutazione della comunità di diatomee bentoniche dei corsi d'acqua, la normativa vigente richiede l'applicazione dell'*Intercalibration Common Metric Index* (ICMi) (Mancini & Sollazzo, 2009) che si basa sull'analisi della comunità di diatomee in termini di composizione della comunità e valutazione della presenza di specie sensibili/tolleranti a fattori di alterazione. Tale indice è stato messo a punto per poter confrontare i risultati provenienti dai diversi metodi utilizzati dagli Stati Membri e, come per gli altri indicatori biologici, viene espresso come RQE e tradotto in una scala su cinque classi di qualità, rappresentative di uno stato da cattivo a elevato.

L'ICMi deriva dall'indice di sensibilità agli inquinanti (*Specific Pollution-sensitivity Index*, IPS), che tiene conto principalmente della sensibilità delle specie all'inquinamento organico, e dall'indice trofico (*Trophic Index*, TI) che tiene conto invece della sensibilità delle specie all'inquinamento trofico. Il valore di ICMi è dato dalla media aritmetica degli RQE dei 2 indici:

$$\text{ICMi} = (\text{RQE_IPS} + \text{RQE_TI})/2$$

È necessario quindi calcolare il rapporto tra i valori osservati dei 2 indici e i rispettivi riferimenti forniti dal DM 260/2010.

Entrambi gli indici prevedono l'identificazione a livello di specie e in alcuni casi a livello di varietà, ad ognuna delle quali viene attribuito un valore di sensibilità (affinità/tolleranza) all'inquinamento.

Si basano entrambi sulla seguente formula di calcolo:

$$\text{indice diatomico} = \sum_j n [a_j r_j i_j] / \sum_i n [a_j r_j]$$

a = abbondanza relativa della specie j

r = affidabilità della specie j

i = sensibilità della specie j a fattori di inquinamento

Macrofite acquatiche

Le macrofite acquatiche comprendono numerosi *taxa* vegetali macroscopicamente visibili presenti negli ambienti acquatici. Questo raggruppamento, definito su base funzionale, è composto da Briofite, Pteridofitee, Alghe filamentose e Angiosperme erbacee. La composizione e la struttura della comunità sono determinate dall'interazione complessa di numerosi fattori ambientali che agiscono in un corso d'acqua.

Oltre al loro importante ruolo ecologico, in qualità di produttori primari e quindi fonte energetica per tutti i livelli superiori dell'ecosistema, l'utilizzo di questo gruppo come indicatore della qualità delle acque correnti si basa sul fatto che alcune specie sono sensibili alle alterazioni dei corpi idrici e risentono in modo differente dell'impatto antropico. In particolare l'inquinamento delle acque, la semplificazione della morfologia degli alvei con conseguente riduzione degli habitat naturali e l'alterazione del regime idrologico consentono lo sviluppo di popolamenti a bassa diversità costituiti da *taxa* tolleranti e a rapido sviluppo.

Pertanto, l'analisi della comunità fornisce, sulla base delle variazioni dei popolamenti macrofittici presenti, indicazioni complessive sul livello di alterazione dei corpi idrici determinato principalmente dalle pressioni antropiche.

La diversità di specie che si presenta in acque eutrofiche si basa invece sulla presenza di specie tolleranti e con un basso valore energetico. Le macrofite acquatiche sono utilizzate come bioindicatori da diversi anni in molti Paesi europei, tuttavia gran parte degli indici macrofittici

formalizzati e utilizzati in Europa è finalizzata appunto alla valutazione dello stato trofico dei corsi d'acqua, vale a dire il grado di alterazione della qualità dell'acqua in relazione alla presenza di nutrienti, carico organico, inquinanti specifici. Anche se la comunità può essere in grado di fornire informazioni più globali sullo stato degli ecosistemi acquatici, la maggior parte degli indici trofici in uso non sarebbero in grado di rilevare efficacemente impatti dovuti ad altri fattori di pressione antropica come i prelievi idrici e le alterazioni idromorfologiche (Fiorenza, 2010).

Valutazione dello stato ecologico: IBMR

Negli ultimi anni a livello europeo, si è posto il problema di adeguare i metodi di valutazione della comunità macrofittica a quanto richiesto dalla Direttiva.

In Italia, a seguito dell'emanazione del DM 260/2010, è stata adottata come metrica di valutazione dello stato ecologico delle macrofite l'IBMR, *Indice Biologique Macrophytique en Rivière* (Minciardi *et al.*, 2009). Tale indice, formalizzato in Francia, ha mostrato vasta applicabilità sul territorio italiano in ragione della similarità biogeografica tra Francia e Italia (Azzollini *et al.*, 2009; Mezzotero, *et al.*, 2009; Minciardi *et al.*, 2005).

L'IBMR è un indice finalizzato alla valutazione dello stato trofico e, anche in questo caso, può essere considerato indice di Stato Ecologico attraverso il calcolo dell'RQE-IBMR (rapporto tra l'IBMR calcolato per un dato sito e il valore teorico atteso per la tipologia alla quale il sito è stato assegnato). Il riferimento è una lista di 210 taxa indicatori per i quali è stata valutata, da dati di campo, la sensibilità in particolare alle concentrazioni di azoto ammoniacale e ortofosfati. Tuttavia lo stato trofico è determinato non solo dalla concentrazione di nutrienti ma anche da altri fattori quali la luminosità (condizionata a sua volta da torbidità e ombreggiamento) e velocità della corrente (Minciardi *et al.*, 2009). Il calcolo dell'IBMR per la stazione di campionamento si effettua secondo il seguente algoritmo:

$$IBMR = \sum_i n [E_i K_i C_i] / \sum_i n [E_i K_i]$$

dove: E_i = coefficiente di stenoecia;
 K_i = coefficiente di copertura;
 C_i = coefficiente di sensibilità;
 n = numero dei *taxa* indicatori.

Indicatori ecotossicologici

Ai fini dell'analisi e/o del monitoraggio nel tempo dello stato di qualità e del grado di inquinamento degli ecosistemi terrestri, è ormai ampiamente riconosciuto che la semplice valutazione del contenuto del contaminante in un suolo, non consente di esprimere da sola valutazioni attendibili sugli effetti che il contaminante può esercitare sugli organismi che vivono nel suolo. L'effetto biologico del contaminante è legato alla frazione di esso che risulta biodisponibile nel recettore ecologico, la cui dimensione può dipendere oltre che da fattori specie-specifici e dalla natura stessa del contaminante, anche dall'influenza che su quest'ultimo hanno le specifiche condizioni della matrice e dell'ambiente.

Pertanto, questa consapevolezza ha portato alla necessità di integrare il dato chimico con quello derivabile da indagini biologiche ed ecotossicologiche. L'ecotossicologia studia gli effetti tossici degli agenti chimici e fisici su popolazioni o comunità all'interno di un ecosistema definito, individuando i diversi tipi di trasporto di questi agenti e la loro interazione con

l'ambiente. Pertanto questa disciplina si occupa di chiarire il meccanismo d'azione degli inquinanti, di valutare il danno biologico su una o più specie e la tossicità a livello ecosistemico, integrando gli effetti dei fattori di stress attraverso tutti i livelli di organizzazione biologica, dal livello molecolare a quello di intere comunità ed ecosistemi (Maltby e Naylor, 1990).

Il tipo di effetto dipende non solo dall'esposizione, ma anche dal tipo di esposizione: questa può essere singola (quando l'organismo è esposto una sola volta alla sostanza potenzialmente tossica); ripetuta (più esposizioni in tempi successivi), o cronica (l'organismo è costantemente sottoposto alla sostanza).

L'interpretazione dei risultati è poi particolarmente complicata quando si ha una esposizione multipla, dando luogo ad interazioni di tipo additivo, sinergico, potenziante o antagonista.

L'esposizione contemporanea a due o più sostanze, infatti, produce un effetto complessivo pari, superiore, o inferiore alla somma degli effetti che produrrebbero indipendentemente le due o più sostanze. L'ecotossicologia, inoltre, tiene conto anche di tutte le sostanze che per definizione non sono caratterizzate come tossiche, ma possono produrre squilibri trofici (come i nutrienti e la materia organica) e quindi alterare la composizione degli ecosistemi in modo più o meno permanente (APAT, 2006). I test ecotossicologici sono strumenti efficaci per la valutazione della contaminazione in quanto forniscono informazioni sul suo significato biologico. Il loro scopo è quello di verificare se un composto potenzialmente tossico, o un campione ambientale, causa una risposta biologica rilevante negli organismi utilizzati per il test. I test di ecotossicità utilizzati nelle indagini ecotossicologiche si distinguono in acuti, subletali e cronici.

Il test di ecotossicità acuta stima gli effetti avversi che si manifestano in un breve tempo (non superiore ad un terzo del tempo medio tra nascita e raggiungimento della maturità sessuale e durante il quale l'organismo può essere mantenuto in buone condizioni in assenza di alimentazione) dopo la somministrazione di una singola dose di una sostanza.

Il test di ecotossicità subacuta (subletale) stima gli effetti avversi che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo $\leq 10\%$ vita dell'organismo (e durante il quale gli organismi vengono alimentati).

Il test di ecotossicità cronica stima gli effetti avversi che si manifestano dopo l'esposizione ad una sostanza per un periodo $> 50\%$ vita dell'organismo.

Condizioni di esposizione cronica a concentrazioni relativamente basse di un agente possono indurre, sugli individui delle popolazioni esposte, effetti tali da alterare la loro idoneità biologica, innescando processi selettivi che portano alla riduzione della variabilità genetica delle popolazioni stesse. Questi effetti possono quindi determinare l'alterazione della struttura della comunità biotica, mettendo a rischio la sopravvivenza di individui e riducendo la loro numerosità nelle popolazioni.

Per lo svolgimento dei test ecotossicologici gli organismi vengono esposti a differenti concentrazioni o dosi di una sostanza di prova, di campioni tal quali o diluiti in un mezzo opportuno. Le osservazioni possono essere effettuate dopo uno o più periodi di esposizione prefissata: questa può essere singola (quando l'organismo è esposto una sola volta alla sostanza potenzialmente tossica); ripetuta (più esposizioni in tempi successivi), o cronica (l'organismo è costantemente sottoposto alla sostanza).

Il parametro osservato e misurato (endpoint) nei differenti gruppi di organismi può essere la mobilità, la sopravvivenza, la dimensione o crescita, il numero di uova o figli, oppure qualsiasi variabile biochimica o fisiologica che può essere attendibilmente quantificata.

Lo scopo è quello di stabilire quale tipo di relazione esista tra endpoint e concentrazione della sostanza di prova o del campione.

Per la valutazione degli effetti provocati in relazione alla concentrazione di esposizione ambientale, è utile stimare la DL50 (Dose Letale al 50%), che rappresenta la concentrazione di tossico necessaria a provocare la morte del 50% degli individui impiegati nel test.

Una misura analoga per la valutazione degli effetti in relazione alla concentrazione di esposizione ambientale è l'EC50 (*Effective Concentration 50%*, concentrazione effettiva mediana), intesa come la concentrazione di sostanza tossica in grado di produrre un'incidenza pari al 50% dell'effetto scelto come misura della mortalità.

Valutazione della tossicità

Nei saggi ecotossicologici, organismi viventi in condizioni ottimali vengono posti a contatto per un determinato tempo, a differenti concentrazioni o dosi di una sostanza di prova o di un campione (acqua di scarico, fango di depurazione, suolo, sedimento fluviale o marino) diluiti in un mezzo opportuno e si valuta la risposta mostrata dall'organismo (Maffiotti *et al.*, 1997).

I test tossicologici permettono di determinare una relazione causa-effetto ma, i risultati che si ottengono sono spesso validi solo per le condizioni sperimentali e non possono essere estesi ad altre specie o ai sistemi naturali complessi in quanto non considerano le interazioni che possono intercorrere tra biota e ambiente. Pertanto, si ritiene utile, ed è ampiamente condiviso dagli ecotossicologi, la necessità di utilizzare numerosi organismi diversi (alghe, batteri, vegetali, invertebrati, vertebrati) in quanto ciascuno di essi manifesta una diversa sensibilità nei confronti delle diverse sostanze. Non esiste, quindi, una singola specie adatta ad esprimere gli effetti di tutte le possibili sostanze tossiche; è necessario, perciò, utilizzare in ogni caso una batteria selezionata in base alla rappresentatività ecologica e in relazione alla catena trofica. Deve cioè comprendere individui appartenenti a 3 livelli diversi della catena alimentare:

1. Alga (*organismo unicellulare produttore*) – *Pseudokirchneriella subcapitata*

L'esecuzione del test di tossicità algale prevede l'impiego dell'alga verde unicellulare *Pseudokirchneriella subcapitata*, una cloroficea appartenente alla famiglia delle Chlorococcales. Questo test ecotossicologico è un test cronico poiché la sua durata è di quattro giorni. La risposta finale ad un'eventuale sostanza tossica presente nel campione testato si manifesta mediante l'inibizione della proliferazione delle cellule algali. Anche in questo caso i risultati possono essere espressi come percentuale di inibizione della crescita algale oppure come EC50. Nel caso il campione testato non risulti tossico, ma anzi presenti un elevato contenuto organico, si può addirittura assistere ad una proliferazione maggiore rispetto al controllo utilizzato come riferimento. In questo caso si presenta una biostimolazione, nota anche come fenomeno dell'ormesi, che non sempre è da interpretare in senso positivo. L'organismo cerca in pratica di diluire l'eccesso di nutrienti attraverso processi metabolici che portano ad un aumento della biomassa.

2. Batterio (*organismo unicellulare decompositore*) – *Vibrio fischeri*

Il microrganismo indicatore *Vibrio fischeri* (Eubacteria, Vibrionacea) è un batterio marino bioluminescente Gram-negativo, aerobio-anaerobio facoltativo, in grado di emettere luce di colore blu-verde con una lunghezza d'onda massima pari a 430 nm, tramite la seguente reazione chimica (Perin, 2004):



La sequenza di reazioni che provoca l'emissione di luce è associata alla catena respiratoria di trasporto degli elettroni ed è catalizzata dall'enzima luciferasi (ossigenasi a funzione mista connessa alla membrana cellulare) che ossida la luciferina batterica

(aldeide alifatica a catena lunga) e la riboflavina 5-P, trasferendo elettroni all'ossigeno e producendo l'emissione di luce.

Per un meccanismo d'azione ancora non del tutto chiaro, quando i batteri vengono a contatto con sostanze tossiche, si ha un abbassamento misurabile quantitativamente della luminescenza. Probabilmente le sostanze tossiche provocano l'inibizione di qualche enzima o intervengono nei processi di trasporto della membrana, portando ad un rallentamento delle reazioni di produzione

di energia della cellula e quindi una riduzione dell'emissione di bioluminescenza. Tuttavia la natura diversa delle sostanze che determinano una diminuzione della luce fa pensare ad una molteplicità di siti d'azione dei tossici sui batteri, nell'ambito comunque della membrana cellulare e della catena di trasporto degli elettroni.

La tossicità del campione viene misurata in termini di EC50, che rappresenta la concentrazione per la quale si ha la diminuzione del 50% della luce emessa dai batteri.

Il sistema per la rilevazione della tossicità Microtox, messo a punto negli USA alla fine degli anni '70 del secolo scorso, è da tempo diventato un valido strumento di screening per il controllo della qualità dei campioni ambientali.

La percentuale di inibizione della luminescenza (I%) viene calcolata secondo la formula:

$$I\% = \frac{I_b - I_c}{I_b} \times 100$$

dove: I_c è la luminosità del campione;

I_b è la luminosità della soluzione di controllo.

La differenza nella quantità di luce emessa opportunamente corretta per la diminuzione di luce che si verifica fisiologicamente in assenza di tossicità è proporzionale all'effetto del campione sui microrganismi. I risultati sono espressi quindi come inibizione percentuale della luminescenza e/o come concentrazione efficace tale da indurre un'inibizione della bioluminescenza del batterio.

Il valore soglia di inibizione che si considera per affermare la presenza di tossicità è del 20% (Tabella 1) (APAT, 2002).

Tabella 1. Giudizio di tossicità del campione espresso in base al valore di I%

Inibizione percentuale (I%) riferita al campione tal quale	EC50	Giudizio
< 20%		Assenza di tossicità acuta
≥ 20% < 50%		Debolmente tossico
≥ 50%	100-10	Tossico
> 50%	< 10-1	Molto tossico
> 50%	< 1	Estremamente tossico

3. *Invertebrato (organismo pluricellulare consumatore) – Daphnia magna*

L'uso dei vertebrati, in genere, implica problematiche sia di natura sperimentale oltre che di natura etica, per le difficoltà di reperimento e mantenimento dei soggetti e hanno tempi più lunghi di sopravvivenza rispetto ad alghe o invertebrati.

L'organismo utilizzato per il saggio è la *Daphnia magna*, un crostaceo d'acqua dolce di facile allevamento, di buona reperibilità e di piccole dimensioni (5-6 mm individui adulti; < 1 mm neonati), appartenente all'ordine dei Cladoceri, nella sottoclasse dei Branchiopodi. Questa sottoclasse è una delle più tardive dal punto di vista evolutivo e ciò

si rispecchia nelle sue caratteristiche morfologiche (carapace trasparente che ricopre sia la camera incubatrice posta dorsalmente che l'intero tronco comprese le appendici, basso numero di segmenti, un paio di occhi composti fusi medialmente, un apparato boccale filtratore di tipo rudimentale, quattro paia di zampe, uguali tra loro e non segmentate relativamente mobili). Le funzioni natatorie sono svolte da un paio di antenne variamente diramante, poste sul capo. Si riconoscono molte specie di acqua dolce e poche specie marine, tutte però caratterizzate da particolari processi adattativi per la riproduzione, in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli e/o stagionali. In condizioni normali, la *Daphnia magna* si riproduce per partenogenesi per cui, una popolazione di daphnidi è composta in toto da femmine adulte e giovani di varia età con corredo genetico uguale, in quanto madri-sorelle le une delle altre.

La riproduzione sessuata, invece, ha luogo in risposta a stimoli ambientali negativi, per cui alcuni organismi neonati, sotto influsso ormonale, diventano maschi e si accoppiano con le femmine adulte, le quali producono gli efippi, composti da due sole uova che non si sviluppano, ma restano avvolte da uno spesso strato di carapace, tipicamente di colore nero, e rimangono latenti fino al mutamento di condizioni favorevoli per il loro sviluppo. Nel test si utilizza questa forma "dormiente" (efippio), che può essere attivata direttamente prima dello svolgimento di ogni singolo test. Ciò comporta un duplice vantaggio: da una parte si conducono le prove su una popolazione omogenea, che non manifesta quindi differenze clonali nella sensibilità alle sostanze tossiche, dall'altra vengono eliminate tutte le fasi preliminari di allevamento e acclimatazione, riducendo le difficoltà gestionali ad esse collegate.

Il saggio con *Daphnia magna* è molto sensibile soprattutto all'inquinamento da metalli pesanti (piombo, cadmio, zinco, rame ecc.). I neonati di meno di 24 ore vengono immessi nel campione da analizzare e dopo un periodo di tempo prestabilito (24-48 ore) si osserva la percentuale di individui sopravvissuti. I risultati possono essere espressi o come percentuale di individui morti/immobilizzati o come valore di EC50, cioè come concentrazione della sostanza tossica che determina la morte/immobilizzazione del 50% degli individui impiegati nel test.

Indicatori di effetti mutageni

Molti composti rilasciati nell'ambiente sono potenzialmente genotossici, in grado cioè di interagire con il materiale genetico direttamente o a seguito di attivazione metabolica, dando luogo alla formazione di lesioni al DNA: queste costituiscono il primo evento nel processo mutazionale. L'esposizione ambientale ad agenti mutageni è responsabile di effetti nocivi sulla salute di individui e popolazioni che non si manifestano come cambiamenti immediatamente visibili, ma sotto forma di effetti tardivi (es.: trasformazione neoplastica e aumento del rischio di sviluppo del cancro nell'individuo; riduzione del tempo di vita degli organismi).

L'effetto genotossico risulta dall'interazione di un determinato agente con il DNA e consiste nella produzione di un'alterazione strutturale della stessa molecola, ossia un danno primario potenzialmente mutageno, che può manifestarsi attraverso l'alterazione chimica delle basi azotate, come la formazione di addotti, legami crociati e rotture a livello di singolo e doppio filamento. Tali alterazioni, di solito, sono prontamente corrette da meccanismi cellulari di riparazione delle lesioni presenti sul DNA, senza conseguenze dannose per l'organismo. Le lesioni che non sono riparate o sono processate in modo improprio, vengono fissate come mutazioni (aberrazioni cromosomiche, mutazioni geniche), oltre a causare altri effetti a lungo termine come il cancro nei vertebrati, uomo compreso.

La maggior parte degli agenti classificati come mutageni risultano positivi ai test di genotossicità, ma esistono categorie di composti altamente mutageni che non manifestano effetti genotossici, come nel caso degli agenti mitoclastici (es. veleni del fuso mitotico) che agiscono su altre molecole bersaglio (es. i microtubuli), e non direttamente sul DNA.

È importante sottolineare che l'identificazione del potenziale genotossico di uno xenobiotico rivela la capacità di produrre alterazioni alla macromolecola di DNA, ma non fornisce informazioni sul risultato finale dei diversi processi che seguono (es. i processi di replicazione e di riparazione del danno al DNA), responsabili della trasformazione del danno al DNA in mutazione. È noto, infatti, che il metabolismo cellulare delle sostanze potenzialmente genotossiche è un fenomeno relativamente complesso e la mancanza di una detossificazione completa, o la formazione di composti elettrofili altamente reattivi come prodotti intermedi di tali processi, possono attaccare i centri nucleofili del DNA (per una review: Morales-Ramírez *et al.*, 2014). A partire dagli anni '70 del secolo scorso sono stati sviluppati test per la valutazione degli effetti mutageni in quantità sempre crescente, basati sull'utilizzo di un'ampia varietà di organismi di saggio (Hoffmann, 1996; Ohe *et al.*, 2004; White & Claxton, 2004). Molti di questi test possono essere applicati sia *in vivo* che *in vitro*, sia nelle cellule somatiche che in quelle germinali. Successivamente l'introduzione di test che permettessero di rilevare il potenziale genotossico ha ampliato enormemente la gamma dei possibili sistemi di saggio (Kienzler *et al.*, 2013).

È possibile oggi individuare il tipo di saggio (di mutagenesi e/o di genotossicità) e il sistema biologico più idonei in relazione alle specifiche esigenze sperimentali, soprattutto negli studi di monitoraggio ambientale. Infine, in base alle caratteristiche dell'organismo indicatore e del quesito biologico da affrontare, è possibile utilizzare test specifici per lo studio di effetti mutageni, in seguito ad esposizioni ambientali (*in situ*), oppure con approcci di esposizione sperimentale, *in vivo* o *in vitro*. I test basati su esposizioni sperimentali di laboratorio, come negli studi di *screening* di composti, miscele, o su matrici ambientali, utilizzano organismi di saggio standardizzati, esposti *in vitro* o *in vivo*. Al contrario, le esposizioni *in situ* si basano sull'uso di organismi bioindicatori, selezionati tra quelli più rappresentativi dell'ambiente naturale specifico, la cui sensibilità agli effetti mutageni sia documentata sperimentalmente: esempi di questo tipo sono rappresentati dall'applicazione del test dei micronuclei.

Test dei micronuclei in *Vicia faba*

Il test dei micronuclei è considerato uno dei metodi più idonei per identificare la risposta integrata all'esposizione ad una miscela complessa di contaminanti perché rappresenta un indice del danno genetico accumulato complessivamente durante la vita di un organismo esposto.

Esso è in grado di misurare gli effetti mutageni che risultano dall'interazione degli inquinanti presenti in un ambiente a cui gli organismi sono esposti (Bolognesi & Hayashi, 2011), rilevandone sia gli effetti clastogeni, cioè che producono rottura alla doppia elica del DNA, sia quelli aneugeni, che inducono mal-distribuzione cromosomica e aneuploidia (White & Claxton, 2004; Ohe *et al.*, 2004). La sua applicazione in sistemi vegetali permette l'analisi di matrici ambientali grezze evitando i processi di purificazione e concentrazione per la rilevazione di mutageni in esse presenti (Beraud *et al.*, 2007; El Hajjouji *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007; Yi *et al.*, 2010). La frequenza di formazione dei micronuclei, in seguito a danno cromosomico indotto, è ritenuto un parametro molto sensibile e, rispetto ad altri test citogenetici di mutagenesi, il test dei micronuclei vanta una maggiore semplicità di esecuzione, sia per la facilità nell'identificazione dell'oggetto di studio che per la possibilità di analizzare in breve tempo un elevato numero di cellule.

L'applicazione del test dei micronuclei su organismi di saggio standardizzati o su bioindicatori, è particolarmente idoneo per la valutazione del potenziale mutageno di ambienti contaminati, come ambienti fluviali (Klobučar *et al.*, 2012; Carrola *et al.*, 2014) o acque superficiali trattate per la potabilizzazione (Gustavino *et al.*, 2005; Canistro *et al.*, 2012), scarichi di rifiuti industriali e urbani (Chiochetta *et al.*, 2014), suoli (Foltête *et al.*, 2011) e aria (Pereira *et al.*, 2013). Il test dei micronuclei è stato validato in vari sistemi di saggio, sia animali che vegetali, per il loro utilizzo nell'analisi dei diversi compartimenti ambientali.

Tra i sistemi vegetali, *Vicia faba* (2n=12), *Allium cepa* (2n=16) e *Tradescantia* (2n=6) sono considerati i più idonei: i primi due oltre che per lo studio delle acque sono particolarmente indicati per suoli e matrici solide (De Marco *et al.*, 2005; White & Claxton, 2004; Foltête *et al.*, 2012; Cotelle *et al.*, 2014) o fangose (Mielli *et al.*, 2009; Magdaleno *et al.*, 2014); per l'analisi del compartimento aereo, *Tradescantia* sp. è uno dei pochi sistemi vegetali di saggio in cui il test dei micronuclei risulta sensibile e validato come test di mutagenesi ambientale (Pereira *et al.*, 2013). Infine, i risultati di un recente studio condotto nel contesto di standardizzazione ISO, che ha coinvolto diversi Paesi dell'Unione Europea, hanno confermato l'idoneità del test dei micronuclei in *Vicia faba* per la sua elevata sensibilità, raccomandandone l'utilizzo nelle indagini di genotossicità (Cotelle *et al.*, 2014).

A differenza dei saggi di ecotossicità, i cui protocolli di esecuzione non prevedono variazioni in base al tipo di agente o a possibili risultati intermedi, il test dei micronuclei pone delle possibilità di variazione, in particolare riguardo i tempi di fissaggio delle cellule dopo l'inizio dell'esposizione.

Le diverse modalità di esposizione sono infatti finalizzate ad evitare la possibilità di sottostimare l'eventuale effetto mutageno, nel caso in cui il campione induca effetti tossici, e che quindi l'esposizione fino al tempo di fissaggio inibisca l'attività proliferativa.

La scelta dei tempi per il fissaggio delle radici esposte è programmata per poter registrare gli effetti in condizione di esposizione cronica, senza tuttavia rischiare di perdere informazioni nel caso di eventuali effetti letali dovuti ad un'esposizione troppo prolungata.

Infatti, oltre all'analisi della frequenza dei micronuclei, che fornisce la stima dell'effettivo potenziale mutageno, è necessario analizzare anche l'Indice Mitotico (IM), che fornisce informazioni sullo stato proliferativo delle cellule esaminate. La manifestazione dei micronuclei è strettamente legata allo stato proliferativo della popolazione cellulare: una consistente riduzione del valore dell'indice mitotico, dovuta ad effetti citotossici che inibiscono la progressione del ciclo cellulare, potrebbe infatti determinare la mancata formazione di micronuclei, causando in tal modo un'errata valutazione (es. una sottostima) degli effetti mutageni.

Il tempo di fissaggio più tardivo permette inoltre di rilevare l'induzione di MN anche da parte di agenti mutageni S-dipendenti (cioè con effetto ritardato) come l'Idrazide Maleica (De Marco *et al.*, 2005; Marcano *et al.*, 2004). Questo composto, utilizzato anche in campo alimentare per la conservazione di ortaggi a causa delle sue proprietà antigerminative, esercita un potente effetto mutageno nei sistemi vegetali, mentre nelle cellule di mammifero esso è molto debole (Ribas *et al.*, 1996). Per tali proprietà questo agente viene impiegato come mutageno di riferimento (controllo positivo) nei test di mutagenesi in sistemi vegetali (Monarca *et al.*, 2005). A causa del suo potente effetto mutageno, trattamenti prolungati con tale agente inducono effetti citostatici.

I micronuclei si presentano come piccoli nuclei accanto al nucleo principale, con un diametro che non sia superiore a circa 1/3 di quello del nucleo principale.

La loro comparsa è legata sia alla perdita di frammenti cromosomici, a causa della mancanza del centromero, sia alla perdita di interi cromosomi, dovuta o a danni funzionali indotti al fuso mitotico, oppure all'inibizione delle funzioni di altre strutture (es. interazione tra il centromero-

cinetocoro con le fibre del fuso mitotico nel processo di segregazione) (Figura 1) (Gustavino *et al.*, 2013).

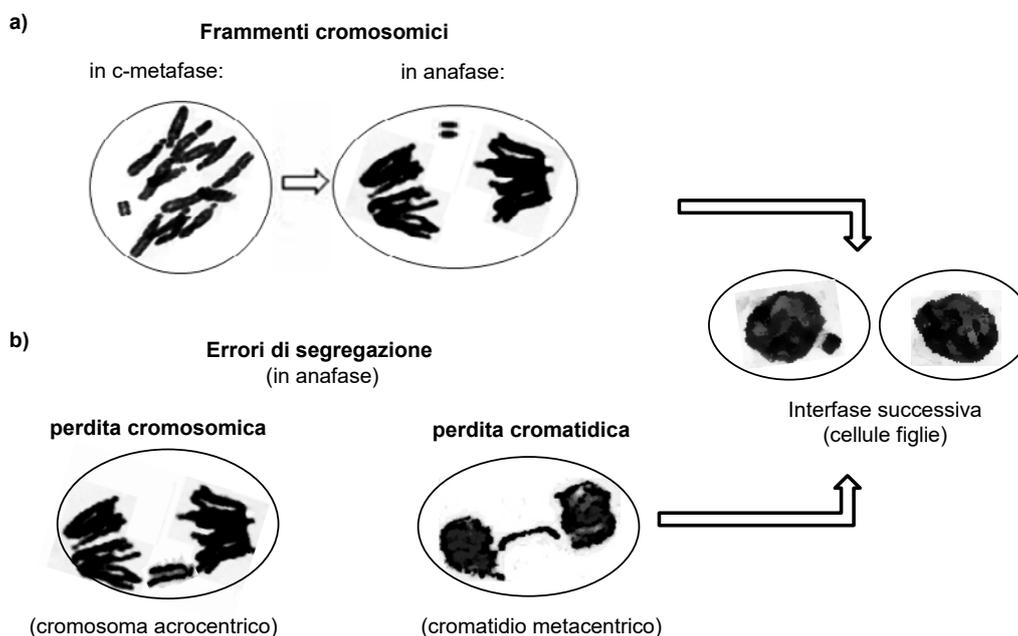


Figura 1. Schema del meccanismo di formazione dei micronuclei: (a) effetto clastogeno; (b) effetto mitoclastico

Indicatori microbiologici

Il cambiamento delle condizioni degli ecosistemi acquatici dovuto a diversi fattori come l'aumento della captazione della risorsa a scopo irriguo o potabile, l'eccessivo uso del suolo e il disboscamento, l'alterazione dell'idromorfologia, la diminuzione della zona riparia e non ultimo i cambiamenti climatici. Quindi il monitoraggio e la conoscenza dei potenziali rischi per la salute possono avere un ruolo fondamentale nelle azioni di prevenzione.

Gli indicatori microbiologici sono comunemente utilizzati nella valutazione della qualità delle acque che è basata su degli standard. Questi sono presenti nel tratto intestinale dell'uomo e degli animali omeoterme e appartengono alla famiglia delle Enterobacteriaceae. *Escherichia coli* e gli Enterococchi sono indicatori richiesti dalle normative in materia di acque ed hanno i requisiti per rappresentare la contaminazione fecale delle acque.

La Tabella 2 mostra i principali indicatori microbiologici presi in considerazione dalla normativa nazionale, per la valutazione di diverse tipologie di acque e dei diversi destini d'uso.

Tabella 2. Indicatori microbiologici e normativa di riferimento

Tipologia di acqua	Indicatori microbiologici	Normative
Acque di superficie	<i>E. coli</i>	DL.vo 152/1999
Acque superficiali destinate alla produzione di acqua potabile	Coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali e salmonelle	DL.vo 152/2006 Dir. 2000/60/CE
Acque reflue (liquami urbani e industriali nel suolo nelle acque di superficie e nelle fognature)	<i>E. coli</i>	DL.vo 152/2006 Dir. 2000/60/CE
Rifiuti usati nelle colture di molluschi	Coliformi fecali	DL.vo 152/2006 Dir. 2000/60/CE
Acque destinate al consumo umano	<i>E. coli</i> ed enterococchi, <i>C. perfringens</i> (spore incluse) solo per acque derivate da acque superficiali, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> ed enterococchi, Computo delle colonie a 22°C e a 37°C solo in acqua venduta in bottiglie o contenitori	DL.vo 31/2001 Dir. 98/83/CE
Acque di balneazione	Enterococchi intestinali e <i>E. coli</i>	DL.vo 116/2008 Dir. 2006/76/CE

Malattie idrotrasmesse

I rischi microbiologici legati all'acqua contaminata non derivano solo da un uso diretto, ma anche da vie indirette come il consumo di prodotti ittici contaminati, dall'ingestione di acqua durante la balneazione, dall'utilizzo di acque irrigue di non buona qualità. Il rischio di focolai di malattie diarroiche dovute a patogeni enterici è alto sia nei Paesi industrializzati che non. L'aumento del numero di epidemie correlate al consumo di acque, nei Paesi industrializzati ha portato una maggiore attenzione verso le problematiche connesse alla presenza di microrganismi patogeni nelle risorse idriche anche potabilizzate. Negli ultimi 50 anni più della metà dei focolai di malattie emergenti legate all'acqua sono stati osservate negli Stati Uniti, in Europa e in Asia.

Il 35% delle epidemie negli Stati Uniti sono causate da una contaminazione microbiologica e attribuibile a parassiti (*Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum*), il 45% a batteri (*E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*) e il 20% a virus (Calicivirus) (Carraro *et al.*, 2004).

Complessivamente è da ritenere che l'incidenza delle malattie idrodifuse nei Paesi industrializzati sia sottostimata. A livello europeo non è presente un sistema di sorveglianza organizzato per le patologie di questa origine ed è possibile ipotizzare che molte gastroenteriti sia di origine idrica, dovute al consumo di acque contaminate o al consumo di alimenti contaminati da acque.

I cambiamenti nelle condizioni degli ecosistemi e delle dinamiche socio-demografiche hanno contribuito a determinare una nuova situazione che ha favorito la comparsa di patologie idrodifuse causate da patogeni emergenti, riemergenti e opportunisti.

La situazione relativa al rischio microbiologico associato all'acqua può essere diversa nei vari Paesi in relazione al fatto che l'epidemiologia delle patologie idrodifuse è influenzata dalla interazione di una serie di fattori che determinano condizioni che possono favorire o meno la diffusione attraverso l'acqua di differenti microrganismi patogeni in aree diverse.

Tali fattori comprendono:

- presenza/assenza originaria di un microrganismo in un'area;
- caratteristiche intrinseche (resistenza, infettività, dose infettante, ecc.);

- condizioni climatiche che possono favorirne la sopravvivenza e la moltiplicazione;
- eventi estremi.

La pressione che determina la selezione di specifici microrganismi patogeni idrodiffusibili e la loro circolazione in un'area è dovuta alla presenza di sorgenti di contaminazione microbiologica e di attività antropiche che ne favoriscono la diffusione sul territorio, come la presenza di pascoli e la circolazione di animali selvatici, l'impiego di fertilizzanti organici naturali in agricoltura, le modalità di trattamento e smaltimento dei reflui civili e degli allevamenti, il trattamento effettuato sulle acque destinate ad uso potabile, la qualità dell'acqua impiegata a scopo irriguo, ecc.

Anche la morfologia del territorio e le condizioni meteorologiche dell'area sono fondamentali per la idrodifusione di microrganismi patogeni, in quanto possono favorire o meno, attraverso fenomeni di percolazione e dilavamento, la contaminazione delle risorse idriche superficiali e profonde.

Fattori associati alla comparsa di patogeni emergenti e re-emergenti

È possibile riconoscere una serie di fattori di carattere generale implicati nella comparsa di nuovi microrganismi patogeni e nei cambiamenti della diffusione delle infezioni nelle popolazioni in diversi Paesi.

- I cambiamenti demografici verificatisi nei Paesi industrializzati influiscono in modo determinante sulla diffusione delle patologie.
- La tendenza all'invecchiamento delle popolazioni, che si sta verificando nei Paesi industrializzati e che ha portato all'aumento del numero di soggetti suscettibili a potenziali patogeni.
- L'incremento nella popolazione, legato all'aumento della speranza di vita, dell'incidenza e della prevalenza di patologie e condizioni associate a immunosoppressione (malattie ereditarie, infezione da HIV, trapianti d'organo, trattamenti immunosoppressivi per patologia cancerosa e reumatoide, ecc.)

Molti di questi patogeni sono in realtà nuovi microrganismi originati, in primo luogo, dall'abilità di acquisire facilmente la resistenza nei confronti di uno o più antibiotici e, in secondo luogo, dalla capacità di trasferimento del patrimonio genetico responsabile della patogenicità (le cosiddette *pathogenicity islands*) tra diversi microrganismi (Egli *et al.*, 2002).

L'esempio più evidente è rappresentato dal ceppo patogeno enteroemorragico di *E. coli* (EHEC) che si suppone abbia acquisito i geni della virulenza attraverso sistemi di trasferimento genico (lisogenia) (O'Brien & Kaper, 1998).

Infine i cambiamenti climatici su piccola e larga scala possono contribuire alla diffusione di nuovi microrganismi patogeni (Menne & Wolf, 2007). Nell'ultimo secolo si è osservato un aumento della temperatura media giornaliera e negli ultimi cinque anni la temperatura superficiale della Terra è risultata più alta rispetto agli analoghi periodi degli ultimi 600 anni. Questo ha influenzato la nuvolosità, le precipitazioni e la frequenza di eventi piovosi di elevata intensità, fenomeni frequentemente associati ad epidemie idrodiffuse causate da microrganismi a trasmissione oro-fecale (Patz *et al.*, 2004; Menne & Wolf, 2007). In particolar modo, si è osservata una maggiore diffusione nell'ambiente di alcuni batteri (*Campylobacter*, ecc.), virus (Calicivirus, ecc.) e protozoi (*Cryptosporidium*, *Giardia*), considerati per tale ragione patogeni "emergenti" (Rose *et al.*, 2000).

Un altro aspetto che gioca un ruolo chiave nella diffusione di potenziali patogeni è la globalizzazione con l'intensificazione dei viaggi e del commercio internazionali. Per quanto

riguarda il rischio di diffusione di patogeni associato alle attività commerciali, basta pensare che una rilevante proporzione della frutta e verdura consumata nei Paesi industrializzati è coltivata in Paesi diversi da dove viene consumata (Louria, 2000).

La lista delle patologie idrodiffuse è ampia e comprende virus, batteri e protozoi, come è ampia la lista delle patologie provocate da questi patogeni, che può andare da alterazioni gastro-intestinali a complicazioni polmonari, fino alla morte di individui suscettibili.

Nella Tabella 3 sono riportati alcuni dei patogeni emergenti (Metcalf & Eddy Inc., 2003).

Tabella 3. Alcuni dei principali patogeni emergenti e re-emergenti

Agente	Malattia	Periodo di incubazione
Batteri		
<i>E. coli</i>	Gastroenteriti	2-6 giorni
<i>Salmonella typhi</i>	Febbre tifoide	7-28 giorni
<i>Leptospira</i>	Leptosirosi	2-20 giorni
<i>Shigella</i>	Shigellosi	1-7 giorni
<i>Vibrio colera</i>	Colera	9-72 giorni
Virus		
Enterovirus	Polio, gastroenteriti, anomalie cardiache	3-14 giorni
Epatite A	Epatite	15-50
Rotavirus	Gastroenteriti acute	2-3
Protozoi		
<i>Entamoeba histolyca</i>	Amoebiadi	2-4 settimane
<i>Giardia Lamblia</i>	Giardiasi	5-25 giorni
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Criptosporidiosi	1-2 settimane

PROCEDURA PER LA VALUTAZIONE DELLO STATO ECOLOGICO: DAL CAMPIONAMENTO AL TEST

Metodi di campionamento

I saggi ecotossicologici e di mutagenesi possono essere applicati su vari tipi di matrice ambientale (acque superficiali, acque sotterranee, suolo, sedimenti, scarichi).

Il sedimento in particolare, viene maggiormente utilizzato in quanto è in grado di registrare maggiormente le variazioni ambientali sia di origine naturale che antropica (Castelli *et al.*, 2003), al contrario dell'acqua che, scorrendo nel suo flusso naturale, risulta essere un indicatore meno accurato e più transitorio. Il campionamento dei sedimenti superficiali, effettuato preferibilmente nella stagione estiva viene praticato tramite utilizzo della benna (Figura 2), strumento meccanico largamente impiegato per questa tipologia di prelievi. La benna, preparata con le ganasce aperte in superficie, viene calata nei punti di campionamento prescelti: quando l'attrezzo tocca il fondo, il gancio di ritenuta delle ganasce si stacca tramite l'azione della fune di sollevamento e le leve di chiusura fanno sì che le ganasce, chiudendosi l'una contro l'altra, trattengano il substrato. Per ogni stazione in cui si effettua il campionamento, devono essere registrati i dati inerenti il punto preciso di prelievo e, ogni campione, etichettato con un numero di riferimento e con i dati necessari alla sua identificazione, per una successiva archiviazione.



Figura 2. Strumento meccanico (Benna Van Veen) per il campionamento dei sedimenti superficiali

Tutti i campioni prelevati, indipendentemente dalla loro natura, devono essere esaminati nel minore tempo possibile (Ciceri *et al.*, 2001). Anche il trasporto stesso deve avvenire in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C. Al fine di consentire il mantenimento della temperatura richiesta, devono essere

utilizzati frigoriferi portatili o contenitori termoisolanti, utilizzando apposite piastre frigorifere commerciali.

Il sedimento, a seconda del tipo di test da svolgere, può essere adoperato tal quale oppure trattato per ottenere l'elutriato secondo la procedura EPA 503/8-91/001 (USEPA, 1991): un'aliquota di campione viene diluita 1:4 p/v con acqua ultrapura (Milli-Q); la sospensione sottoposta ad agitazione continua mediante agitatore magnetico per 30 minuti circa, e lasciata decantare a +4°C per 24 ore. La fase liquida successivamente viene separata dalla fase solida mediante filtrazione sottovuoto. Questa rappresenta una metodica piuttosto rapida, ma che richiede una vetreria ad alta tenuta, l'utilizzo di carta da filtro (dmt 45 µm) e un sistema che generi un vuoto che permetta l'eliminazione del materiale in sospensione. Il materiale ottenuto da questo procedimento è l'elutriato, ossia la matrice acquosa che verrà utilizzata per l'esecuzione dei test.

Macroinvertebrati bentonici

Per il campionamento e la conservazione dei campioni devono essere seguite le indicazioni riportate nel "Protocollo di campionamento dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d'acqua guadabili" (ISPRA, 2007), sviluppato nell'ambito delle attività di implementazione della Direttiva 2000/60/CE. Le procedure di campionamento e identificazione delle specie devono essere svolte da personale competente e autorizzato.

La raccolta dei macroinvertebrati bentonici viene effettuata utilizzando la rete *Surber* nei siti guadabili e retino immanicato nei siti non guadabili. E' necessaria, in ogni caso, un'individuazione preliminare dei principali microhabitat e la valutazione della percentuale di copertura degli stessi nel tratto prescelto. Una volta deciso il punto di campionamento, si procede partendo a valle dell'area in esame per poi proseguire verso monte, allo scopo di non arrecare disturbo agli habitat (Andreani *et al.*, 2007).

I campioni vanno raccolti smuovendo il substrato localizzato, a monte del posizionamento della rete e in opposizione alla corrente (Figura 3a). Il campionamento deve comprendere complessivamente un'area di 0,5 m², derivato dalla raccolta di 10 incrementi, ciascuno di area pari a 0,05 m²; i campioni vanno setacciati, per eliminare i sedimenti e detriti più fini, avendo cura di pulire foglie e materiale inorganico più grossolano da eventuali organismi (Figura 3b).



Figura 3. Campionamento del macrobenthos: a) raccolta del materiale tramite Rete Surber; b) setacciatura e smistamento del materiale raccolto

Il materiale campionato viene posto in un contenitore bianco, affinché i macroinvertebrati risultino più facilmente visibili.

Le operazioni preliminari sono effettuate direttamente sul campo e successivamente il materiale, con l'aggiunta di conservanti specifici, viene trasferito in laboratorio per la conservazione o per ulteriori analisi. Il riconoscimento avviene a livello tassonomico di genere o famiglia, con l'ausilio di chiavi dicotomiche per l'identificazione dei macroinvertebrati delle acque dolci (Tachet *et al.*, 1984; Campaioli *et al.*, 1999; Sansoni, 1988).

Diatomee bentoniche

Per il campionamento e l'analisi della comunità di diatomee, sempre nell'ambito delle attività di recepimento della Direttiva Quadro, è stato predisposto il "protocollo di campionamento e analisi delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua" (ISPRA, 2007).

Come richiede il metodo, vengono campionate le diatomee epilitiche su ciottoli di una certa dimensione, in preferenza privi di alghe filamentose.

Il campionamento viene effettuato procedendo da monte a valle, per un tratto di almeno 10 metri di corso d'acqua su raschio, preferibilmente in corrente intensa, evitando le zone fortemente ombreggiate e le zone con corrente lenta; vengono prelevati alcuni ciottoli, almeno 5-6 ciottoli per una superficie totale di circa 100 cm², e viene raschiata la parte superiore dei ciottoli con uno spazzolino.

In laboratorio il campione viene opportunamente trattato con perossido di idrogeno, a caldo, per ossidare la sostanza organica. Il campione viene successivamente montato su vetrino con resina apposta e osservato al microscopio a ingrandimento 100X per il riconoscimento sistematico dei generi e delle specie che compongono la comunità. L'identificazione si basa sull'osservazione dei frustuli, dei quali viene esaminata la morfologia sulla base di alcuni elementi tassonomici importanti ai fini della classificazione (De Meo *et al.*, 2014).

Macrofite acquatiche

Si procede ad un campionamento secondo la modalità prevista dal metodo e conforme alle norme UNI EN 14184, UNI EN 27828, EN ISO 9391 e al Protocollo di campionamento e analisi per le macrofite delle acque correnti (ISPRA, 2007).

La stazione di monitoraggio corrisponde ad una porzione rappresentativa del corso d'acqua che si intende indagare, avente uno sviluppo longitudinale da 50 a 100 m in funzione delle dimensioni del corso d'acqua e dei livelli di copertura delle macrofite presenti.

Il rilievo consiste nell'osservazione *in situ* della comunità macrofita con un primo riconoscimento in campo dei singoli *taxa* e una valutazione della copertura totale della comunità presente nella stazione e coperture in percentuale dei singoli *taxa* rinvenuti, che verranno confermate da una successiva determinazione in laboratorio.

Contestualmente al campionamento di macrofite, effettuato percorrendo a zig zag il tratto di corpo idrico, vengono rilevati parametri stazionali utilizzando un'apposita scheda di campionamento. I campioni trasferiti in laboratorio vengono conservati mediante procedure di fissazione diverse a seconda della tipologia di macrofite raccolte.

Test ecogenotossicologici

Test dei micronuclei in *Vicia faba*

Per l'esecuzione del test viene utilizzata la specie *Vicia faba*, varietà *minor*. Le piantine vengono preparate per l'esposizione al campione, partendo dalla fase di germinazione dei semi secchi; questi devono essere conservati al riparo dalla luce in un ambiente fresco e asciutto per tempi non molto lunghi. La durata totale del test può variare tra 10 e 14 giorni, principalmente in funzione del tempo di conservazione dei semi utilizzati (Gustavino *et al.*, 2013).

Dopo la reidratazione i semi vengono risciacquati abbondantemente e adagiati sopra un supporto di materiale poroso e assorbente (argilla espansa) precedentemente imbibito di acqua corrente e successivamente posti in un armadio termostato e umidificato (possibilmente ventilato) alla temperatura di +20 ($\pm 1^\circ\text{C}$) per un intervallo di tempo sufficiente allo sviluppo della radice primaria di almeno 1 cm. Dopo circa 5 giorni, si recide la parte apicale delle radici primarie, per favorire lo sviluppo delle radici secondarie, rimuovendone gli ultimi 4-5 mm; allo stesso modo si rimuovono i tegumenti dei semi e, se presente, anche la parte aerea delle piantine. I semi così trattati vengono adagiati sopra un supporto rigido e immersi in acqua di fonte, in modo che i cotiledoni siano posizionati sopra il livello dell'acqua e risulti immerso solo l'apparato radicale. Completato lo sviluppo delle radici secondarie, queste vengono esposte alla matrice ambientale. In questo passaggio i supporti rigidi contenenti i semi vengono trasferiti in un nuovo contenitore in vetro o ceramica contenente il campione da saggiare, e posti in termostato alla temperatura di +20°C circa, fino ai tempi di prelievo predefiniti nel protocollo. Trascorsi i tempi di esposizione, le radici vengono sciacquate, recise e poste in una soluzione fissativa (acido acetico: etanolo in rapporto 1:4), fino al momento della colorazione. Per la successiva fase della colorazione, le radici vengono reidratate in acqua di fonte per almeno 10 minuti e, messe in una soluzione di HCl 1N al 37% (preriscaldata a + 60°C), mantenute per 10 minuti a + 60°C (Julabo SW23), per favorire una reazione di idrolisi acida della parete cellulare e una blanda denaturazione del DNA. Tra le diverse metodologie di colorazione, il metodo *Feulgen* è di gran lunga preferito, per la sua specificità per il DNA.

Le radici vengono esposte al reattivo di Schiff (Merck) e mantenute al buio, a temperatura ambiente per almeno 45 minuti, al termine dei quali le radici risulteranno colorate di un rosso magenta intenso. In particolare la parte apicale, costituita dalle cellule proliferanti, risulta ben distinguibile per la sua colorazione molto intensa.

Per il montaggio dei vetrini, le radici vengono adagate su un vetrino porta-oggetto, precedentemente pulito e sgrassato. Ad ogni radice viene recisa la parte apicale, utilizzando un bisturi e su ciascun apice viene posta una goccia di acido acetico al 45% per evitarne l'essiccamento. Dopo aver appoggiato un vetrino copri-oggetto si esegue lo schiacciamento degli apici, che viene eseguito esercitando una leggera pressione sul vetrino in corrispondenza di ciascun apice, al fine di ottenere un mono-strato cellulare.

I vetrini vengono portati ad una temperatura di $\leq -20^\circ\text{C}$, utilizzando preferibilmente l'azoto liquido e, facendo leva con la lama di un bisturi, il vetrino copri-oggetto viene rimosso, con un movimento rapido e deciso.

Una volta essiccato all'aria, si procede al montaggio permanente dei vetrini con un nuovo copri-oggetto utilizzando un montante per preparati istologici (Eukitt).

Come in qualsiasi saggio è necessario avere un punto di riferimento (controllo negativo) in cui il sistema non è sottoposto ad alcun tipo di trattamento e un ulteriore punto sperimentale, al fine di documentare l'effettiva sensibilità agli effetti mutageni, rappresentato dal controllo positivo (es. idrazide maleica 10^{-4} M).

Test su *Vibrio fischeri*

Il test con batteri bioluminescenti sfrutta la naturale capacità di un gruppo di batteri marini appartenenti alla specie *Vibrio fischeri*, (ceppo NRRL-B-11177), di emettere luce se si trovano nelle condizioni ottimali. La presenza di sostanze inibenti si manifesta mediante una riduzione della bioluminescenza proporzionale alla tossicità del campione in esame.

I batteri sono disponibili in forma liofilizzata e conservati alla temperatura di -20°C. All'inizio di ogni test, la sospensione contenente i batteri deve essere riattivata utilizzando una specifica soluzione ricostituente di acqua ultrapura atossica. Il test utilizza il luminometro Microtox® Model 500 ANALYZER (cella di misura termostata a $15 \pm 1^\circ\text{C}$ e blocco termostatico a $15 \pm 1^\circ\text{C}$) attraverso il quale vengono effettuate delle misure di luminescenza a diversi intervalli di tempo (5, 15 e 30 minuti) definiti dal protocollo (UNI EN ISO 11348-2, 2007). L'analizzatore è interfacciato da un computer dotato di software per l'elaborazione statistica dei dati: il programma elabora una curva concentrazione-risposta da cui si può ricavare il valore di EC50, ossia la concentrazione del campione che determina una diminuzione del 50% della luce emessa dal batterio.

Test su *Daphnia magna*

Il test si effettua su neonati di *Daphnia magna* di età inferiore alle 24 ore, poiché ritenuti più sensibili ad effetti di tossicità. Gli efippi, precedentemente conservati al buio ad una temperatura di $5^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, vengono sciacquati abbondantemente con mini-setaccio (100 μmesh) in acqua corrente per eliminare le tracce del liquido di conservazione. Traferiti in una piastra Petri (dmt 5 cm in polistirene) contenente una soluzione standard pre-areata (Daphtokit FTM), vengono mantenuti in camera termostata a $+20/25^\circ\text{C}$ sotto illuminazione continua di 6000 lux, per circa 3 giorni. Lo sviluppo embrionale in condizioni ottimali della *Daphnia magna* avviene maggiormente tra le 72 e le 80 ore; due ore prima l'inizio del test, per garantire agli organismi una riserva energetica e precluderne la morte per carenza di cibo, si aggiunge una sospensione della microalga *Spirulina* come *uptake* di cibo.

La metodica, in accordo con le normative standard internazionali, prevede l'utilizzo di un sistema multi-pozzetto che comprende 4 repliche sia della soluzione di controllo che dei campioni.

Trascorsi i tempi di esposizione di 24 e 48 ore, viene registrato il numero di individui morti, rispetto al numero di individui vitali, per ogni replica del campione. Nel conteggio vengono inclusi anche gli individui non in grado di muoversi con nuoto attivo, quindi considerati immobili, per almeno 15 secondi.

La condizione per una buona validità del test è che nei controlli, il numero degli individui morti/immobili non superi il 10%.

Inoltre, nei campioni in cui la percentuale di mortalità risulti superiore al 20%, si procederà con un test successivo dello stesso a diverse concentrazioni.

Approccio integrato per la valutazione dello stato ambientale: caso studio

Per le valutazioni di tipo ambientale, che hanno come scopo la conoscenza dello stato di salute degli ecosistemi, è stato dimostrato che l'utilizzo di un approccio multi-livello, che

preveda l'analisi in parallelo di indicatori biologici, chimico-fisici, ecotossicologici e di mutagenesi, risulta essere più efficace, rispetto ad un approccio mono-specifico.

Viene di seguito riportato un caso studio, attualmente in fase di pubblicazione, dello stato di salute del bacino idrografico del Fiume Volturno, in cui è stato utilizzato un set di indicatori multivariati che, coprendo un'ampia porzione dell'ecosistema, ha fornito informazioni più complete. I tre corsi d'acqua, appartenenti al bacino idrografico del fiume Volturno (Calore, Sabato e Isclero) scorrono all'interno della regione Campania, tra le provincie di Avellino e Benevento. Per la valutazione dello stato ecologico, sono stati analizzati e valutati parallelamente indicatori biologici, indicatori chimico-fisici, indicatori di tossicità e di mutagenesi. Come indicatori biologici sono stati scelti i macro-invertebrati bentonici, ritenuti particolarmente adatti a valutare la qualità dell'ambiente in cui vivono, in quanto permettono di rendere evidenti le modificazioni ambientali, così come richiesto dalla normativa nazionale (DL.vo 152/2006) e comunitaria (Direttiva 2000/60/CE).

Le prove sperimentali sono state messe a punto sui tre diversi livelli di organismo prima descritti, *Vibrio fischeri* (test Microtox), *Daphnia magna* e *Vicia faba* (test dei micronuclei).

Per lo svolgimento dei test sperimentali sono stati prelevati e trattati campioni di sedimento piuttosto che campioni d'acqua in quanto particolare attenzione viene riservata al sedimento come possibile matrice di immagazzinamento degli elementi di maggiore impatto ambientale.

Dai dati ottenuti si è evidenziato che l'utilizzo integrato di indicatori ha consentito una valutazione complessiva della qualità dell'ecosistema in esame maggiormente significativa e completa, rispetto ad un approccio mono-specifico.

Il set di indicatori e indici multivariati coprono un'ampia porzione dell'ecosistema che, solo se integrati, possono dare informazioni sullo stato ecologico ambientale per poter permettere la pianificazione di eventuali azioni di ripristino: coprire diversi intervalli di informazione, in condizioni di stress ambientali, o in caso di incidenti, significa poter individuare con maggior precisione il livello di compromissione dell'ecosistema e attuare sistemi di gestione e ripristino mirati. Nonostante l'approccio multidisciplinare adoperato ha consentito di ottenere valutazioni maggiormente significative, sarà comunque opportuno effettuare uno studio più approfondito dell'area, da cui dedurre, eventualmente, dei particolari che potrebbero influire sul cattivo stato di qualità dell'area studiata come le relazioni ecologiche tra le specie di un ecosistema, i parametri chimico fisici che determinano le caratteristiche di un corso d'acqua, lo studio dell'area e dei dettagli della tipologia fluviale, come vegetazione, possibile cementificazione delle sponde, presenza di attività industriali con immissione di reflui e quant'altro.

BIBLIOGRAFIA

- Andreani P, Battezzatore M, Belfiore C, Bernabei S, Buffagni A, Casino N, Ciadamidaro S, Damiani G, Erba S, Floris B, Le Foche M, Mancini L, Martone C, Morisi A, Pace G, Pagnotta R, Siligardi M. Protocollo di campionamento dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d'acqua guadabili. In: *Manuale metodi biologici per le acque - Parte I*. Roma: Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i Servizi tecnici; 2007. (Manuali e linee guida XX/2007).
- APAT. *Guida tecnica su metodi di analisi per il suolo e i siti contaminati. Utilizzo di indicatori ecotossicologici e biologici*. Roma: Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i Servizi tecnici; 2002. (RTI CTN_SSC 2/2002).
- APAT. *L'ecotossicologia negli ambienti acquatici*. Roma: Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i Servizi tecnici; 2006. (Rapporti 71/2006).
- APAT. *Metodi biologici per le acque. Parte I*. Roma: Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i Servizi tecnici; 2007. (Manuali e linee guida XX/2007).
- Armitage PD, Moss D, Wright JF, Furse MT. The performance of a new biological water quality scores system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running-water sites. *Water Res* 1983;17:333-47.
- Azzollini R, Betta G, Minciardi MR. Uso di macrofite acquatiche per il biomonitoraggio delle acque dei canali irrigui: prima applicazione in un'area del Vercellese. In: Montacchini F, Soldano A (Ed.). *Atti del Convegno Nazionale "Botanica delle Zone Umide"; Vercelli 10-11 novembre 2000 – Società Botanica Italiana*. Torino: Museo Regionale di Storia Scienze Naturale Naturali; 2003. p. 269-92.
- Bargagli R. *Ecologia applicata per un uso consapevole dell'aria, dell'acqua e del suolo*. Padova: AMON Ed.; 2012.
- Beraud E, Cotellet S, Leroy P, Ferard JF. Genotoxic effects and induction of phytochelatin in the presence of cadmium in *Vicia Faba* roots. *Mutat Res* 2007;633:112-6.
- Böhmer J, Rawer-Jost C, Zenker A. Multimetric assessment of data provided by water managers from Germany: assessment of several different types of stressors with macrozoobenthos communities. *Hydrobiologia* 2004;516:215-28.
- Bolognesi C, Hayashi M. Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis* 2011;26:205-13.
- Buffagni A, Belfiore C. *MacrOper.ICM ver. 1.0.5 - Classificazione dei fiumi italiani per la WFD sulla base dei macroinvertebrati bentonici*. Roma: CNR-IRSA, UniTuscia-Decos; 2013.
- Buffagni A, Erba S, Birk S, Cazzola M, Feld C, Ofenbock T, Murray-Bligh J, Furse MT, Clarke R, Hering D, Soszka H, Van De Bund W. Towards European Inter-Calibration for the Water Framework Directive: Procedures and examples for different river types from the E.C. project star. 11th Star deliverable. Star Contract N. EVK1-CT 2001-00089. Rome (Italy). Roma: IRSA. 2005;468 pp. (Quaderni 123).
- Buffagni A, Erba S, Pagnotta R. Definizione dello Stato ecologico dei fiumi sulla base dei macroinvertebrati bentonici per la 2000/60/CE (WFD): il sistema di classificazione MacrOper per il monitoraggio operativo. *IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici* Numero Speciale 2008.
- Buffagni A, Erba S. Macroinvertebrati acquatici e direttiva 2000/60/EC (WFD). *Notiziario dei Metodi Analitici* 2007;(1):94-100.
- Campaioli S, Ghetti PF, Minelli A, Ruffo S. *Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane*, Volume I, II. Trento: Provincia Autonoma di Trento, 1999.
- Canistro D, Melega S, Ranieri D, Sapone A, Gustavino B, Monfrinotti M, Rizzoni M, Paolini M. Modulation of cytochrome P450 and induction of DNA damage in *Cyprinus carpio* exposed *in situ*

- to surface water treated with chlorine or alternative disinfectants in different seasons. *Mutat Res* 2012;729:81-9.
- Carere M, Marcheggiani S, Miniero R, Pillozzi A, Mancini L. Risk assessment elements for the management of contaminated sediments. *Preface. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 2008;44(3):217.
- Carraro E, Bonetta S, Palumbo F, Gilli G. Rischio microbiologico associato al consumo di acqua potabile nei paesi industrializzati. *Ann. Ist. Super. Sanità* 2004;40(1):117-40.
- Carrola J, Santos N, Rocha MJ, Fontainhas-Fernandes A, Pardal MA, Monteiro RA, Rocha E. Frequency of micronuclei and of other nuclear abnormalities in erythrocytes of the grey mullet from the Mondego, Douro and Ave estuaries-Portugal. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014;21(9):6057-68.
- Castelli A, Lardicci C, Tagliapietra D. Capitolo IV: Il macrobenthos di fondo molle. *Biol Mar Medit* 2003;10(Suppl.):109-44.
- Cecchi G, Mancini L. *Salute degli ecosistemi come priorità della gestione ambientale*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2006. (Rapporti ISTISAN 06/10).
- Cecchi G, Mancini L. Salute degli ecosistemi e salute umana. *Annali Istituto Superiore di Sanità* 2005;41(3):271-9.
- Chiochetta CG, Goetten LC, Almeida SM, Quaranta G, Cotelle S, Radetski CM. Leachates from solid wastes: chemical and eco(geno)toxicological differences between leachates obtained from fresh and stabilized industrial organic sludge. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014;21:1090-8.
- Ciadamidaro S, Puccinelli C, Mancini L (Ed.). *Studio dell'ecologia dei piccoli corsi d'acqua della Provincia di Roma*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2012. (Rapporti ISTISAN 12/33).
- Ciceri G, Fontana P, Meloni ML. *Linea guida per il campionamento e la preparazione dei campioni per la caratterizzazione di siti contaminati e risultati delle prove di laboratorio di qualificazione di alcuni prodotti coadiuvanti di bonifica, 2001*. Milano: Ricerca sul Sistema Energetico; 2001. (Rapporto CESI RSE A1/-039094).
- Cotelle S, Dhyèvre A, Muller S, Chenon P, Manier N, Pandard P, Echairi A, Silvestre J, Guiresse M, Pinelli E, Giorgetti L, Barbafieri M, Silva VC, Engel F, Radetski CM. Soil genotoxicity assessment-results of an interlaboratory study on the *Vicia* micronucleus assay in the context of ISO standardization. *Environ Sci Pollut Res Int* 2014;22(2):988-95.
- De Groot, RS. *Functions of nature: evaluation of nature in environmental planning, management and decision-making*. Groningen: Wolters Noordhoff BV;1992.
- De Marco A, Owczarek M, Raglione M, Lanza B. Reduced clastogenic activity of maleic hydrazide in *Vicia faba* seedlings grown in a situation of overcrowding stress. *Mutat Res* 2005;581:133-9.
- De Meo S, Grassi F, Marcheggiani S, Puccinelli C, Vendetti C, Mancini L, Martone C, Balzamo S, Belli M. *Atlante diatomee bentoniche dei corsi d'acqua italiani*. Roma: ISPRA; 2014. (Manuali e Linee Guida 110/2014).
- Egli T, Koster W, Meile L. Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:111-2.
- El Hajjouji H, Pinelli E, Guiresse M, Merlina G, Revel JC, Hafidi M. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat Res* 2007;634:25-31.
- EN ISO 9391. *Water quality. Sampling in deep water for macro-invertebrates. Guidance on the use of colonization, qualitative and quantitative samplers*; Comité Européen de Normalisation; 1995.
- Europa. 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* n. L 327 del 22/12/2000.

- Europa. Direttiva 2006/118/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 dicembre 2006 sulla protezione delle acque sotterranee dall'inquinamento e dal deterioramento. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 372/19 del 27/12/2006.
- Europa. Direttiva 2008/56/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 17 giugno 2008 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria nel campo della politica per l'ambiente marino (direttiva quadro sulla strategia per l'ambiente marino). *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 164/19 del 25/6/2008.
- European Communities. *Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance on the Intercalibration Process 2004-2006*. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities; 2005. (Guidance Document No 14).
- Fiorenza A. *Caratterizzazione delle macrofite acquatiche degli ecosistemi fluviali per l'applicazione della direttiva 2000/60/CE. Caso studio in due idroecoregioni del Piemonte*. [tesi]. Torino: Università degli Studi di Torino; 2010.
- Foltête A, Dhyèvre A, Féraud JF, Cotelle S. Improvement of Vicia-micronucleus test for assessment of soil quality: a proposal for international standardization. *Chemosphere* 2011;85(10):1624-9.
- Gustavino B, Buschini A, Monfrinotti M, Rizzoni M, Tancioni L, Poli P, Rossi C. Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*. *Mutat Res* 2005;87:103-13.
- Gustavino B, Caciolli S, Mancini L. *Linea guida del test dei micronuclei in Vicia faba per la valutazione di effetti mutageni in acque dolci e sedimenti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/27).
- Hellawell JM. *Biological indicators of freshwater pollution and environmental management*. London/NewYork: Elsevier Applied Science Publishers; 1986.
- Hering D, Moog O, Sandin L, Verdonshot PFM. Overview and application of the AQEM assessment system. *Hydrobiologia* 2004;516:1-20.
- Hoffman GR. Genetic toxicology. In: Klaassen, CD (Ed.). *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. New York: McGraw-Hill; 1996. p. 269-300.
- ISPRA. *Batterie di saggi ecotossicologici per sedimenti e acque interne. I manuali di ecotossicologia*. Roma: Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale; 2013. (Manuali e Linee Guida 88/2013).
- ISPRA. *Metodi biologici per le acque superficiali interne. Delibera del Consiglio Federale delle Agenzie Ambientali. Seduta del 27 novembre 2013. Doc n. 38/13CF*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale; 2014. (Manuali e Linee Guida 111/2014).
- Italia. Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96.
- Kienzler A, Bony S, Devaux A. DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: a review. *Aquat Toxicol* 2013;134-135:47-56.
- Klobučar GI, Malev O, Šrut M, Štambuk A, Lorenzon S, Cvetković Ž, Ferrero EA, Maguire I. Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Chemosphere* 2012;87:62-7.
- Lackey RT. Value policy and ecosystem health. *BioScience* 2001;51:437-44.
- Louria DB. Emerging and re-emerging infections: the social determinants. *Futures* 2000;32:581-94.
- Maffiotti A, Bona F, Volterra L. *Introduzione all'ecotossicologia. Analisi e recupero dei sedimenti marini*. Quaderni di Tecniche di Protezione Ambientale. Bologna: Pitagora Editrice; 1997.
- Magdaleno A, Juárez AB, Dragani V, Saenz ME, Paz M, Moreton J. Ecotoxicological and genotoxic evaluation of Buenos Aires city (Argentina) hospital wastewater. *J Toxicol* 2014;2014:248461.

- Maltby L, Naylor C. Preliminary observations on the ecological relevance of the Gammarus scope for growth' assay: effect of zinc on reproduction. *Funct Ecol* 1990;4:393-7.
- Mancini L, Andreani P. *Guida agli indicatori biologici dei corsi d'acqua della provincia di Viterbo*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/34).
- Mancini L, Fidente RM (Ed.). *La Direttiva Quadro 2000/60/EU sulle acque: stato dell'arte della normativa europea*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/36).
- Mancini L, Pace G. *Strategia di protezione e indicatori delle risorse idriche: studio pilota*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2008. (Rapporti ISTISAN 08/15).
- Mancini L, Sollazzo C. *Metodo per la valutazione dello stato ecologico delle acque correnti: comunità diatomiche*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 09/19).
- Marcano L, Carruyo I, Del Campo A, Montiel X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environ Res* 2004;94:221-6.
- Marcheggiani S, Puccinelli C, Ciadamidaro S, Della Bella V, Carere M, Blasi MF, Pacini N, Funari E, Mancini L. Risks of water-disease outbreaks after extreme events. *Toxicological & Environmental Chemistry* 2010;92(3):593-9.
- Menne B, Wolf T (Ed.). *Environment and health risks from climate change and variability in Italy*. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2006.
- Metcalf & Eddy Inc. *Wastewater engineering: treatment and reuse*. 4th edition. Boston: McGraw-Hill; 2003. George
- Mezzotero A, Minciardi Mr, Spada Cd, Lucadamo L, Gallo L, De Filippis A. Prima caratterizzazione e valutazione delle comunità a macrofite acquatiche nei corsi d'acqua della Provincia di Cosenza. *Studi Trent Sci Nat* 2009;86:1-6.
- Mielli AC, Matta ME, Nersesyan A, Saldiva PH, Umbuzeiro GA. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the Tradescantia micronucleus assay. *Mutat Res* 2009;672:51-4.
- Minciardi MR, Poma S, Rossi GL. Qualità delle acque superficiali. In: Rossi GL, Minciardi MR (Ed.). *Un piano per la palude di San Genuario. Proposte per la gestione di un sito Natura 2000. città??*Torino: Regione Piemonte; 2005. p. 41-5.
- Minciardi MR, Spada CD, Rossi GL, Angius R, Orrù G, Mancini L, Pace G, Marcheggiani S, Puccinelli C. *Metodo per la valutazione e la classificazione dei corsi d'acqua utilizzando la comunità delle Macrofite acquatiche*. Roma: ENEA; 2009. (RT/2009/23/ENEA).
- Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Decreto Ministeriale 14 aprile 2009, n.56. Regolamento recante «Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento per la modifica delle norme tecniche del DL.vo 3 aprile 2006, n.152, recante Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo». *Gazzetta Ufficiale* n. 124 del 30-5-2009 – Supplemento Ordinario n. 83.
- Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Decreto Ministeriale 16 giugno 2008, n. 131. Regolamento recante «Criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici (tipizzazione, individuazione dei corpi idrici, analisi delle pressioni) per la modifica delle norme tecniche del DL.vo 3 aprile 2006, n.152, recante: «Norme in materia ambientale», predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo. *Gazzetta Ufficiale* n. 187 del 11-8-2008 - Supplemento Ordinario Serie generale n. 187.
- Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. Decreto Ministeriale 8 novembre 2010, n. 260. Regolamento recante «Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali - Modifica norme tecniche DL.vo 152/2006. *Gazzetta Ufficiale* n.30 del 7-02-2011 – Supplemento Ordinario n. 31.
- Monarca S, Feretti D, Zani C, Rizzoni M, Casarella S, Gustavino B. Genotoxicity of drinking water disinfectants in plant bioassays. *Environ Mol Mutagen* 2005;46:96-103.

- Morales-Ramírez P, Vallarino-Kelly T, Cruz-Vallejo V. Kinetics of micronucleus induction and cytotoxicity caused by distinct antineoplastics and alkylating agents in vivo. *Toxicol Lett* 2014;224:319-25.
- O'Brien AD, Kaper JB. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow. In: Kaper JB, O'Brien AD (Ed.). *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin producing E. coli strains*. Washington, DC: ASM Press; 1998. p. 1-11.
- Odum EP, Barrett GW. *Fundamentals of ecology*. 5th ed. Belmont, CA: Thomson Brooks/Cole; 2004.
- Ofenböck T, Moog O, Gerritsen J, Barbour M. A stressor specific multimetric approach for monitoring running waters in Austria using benthic macroinvertebrates. *Hydrobiologia* 2004;516:251-68.
- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res* 2004;567:109-49.
- Patz JA, Daszak P, Tabor GM, Alonso Aguirre A, Pearl M, Jon Epstein, Wolfe ND, Marm Kilpatrick A, Fofopoulos J, Molyneux D, Bradley DJ, and Members of the Working Group on Land Use Change Disease Emergence. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environ Health Persp* 2004;112(10):1092-8.
- Pereira BB, Campos Júnior EO, Morelli S. *In situ* biomonitoring of the genotoxic effects of vehicular pollution in Uberlândia, Brazil, using a Tradescantia micronucleus assay. *Ecotoxicol Environ Saf* 2013;87:17-22.
- Perin G, Capitolo V. Metodi biologici di previsione degli effetti ambientali degli stressori. In: *Ecotossicologia - Ambiente e Salute*. Venezia: Università Ca' Foscari; 2004.
- Pinto P, Rosado J, Morais M, Antunes I. Assessment methodology for southern siliceous basins in Portugal. *Hydrobiologia* 2004;516:191-214.
- Ribas G, Surrallés J, Carbonell E, Xamena N, Creus A, Marcos R. Genotoxicity of the herbicides alachlor and maleic hydrazide in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 1996;11:221-7.
- Rosenberg DM, Resh VH (Ed.). *Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates*. New York: Chapman & Hall; 1993.
- Sansoni G. *Macroinvertebrati dei corsi d'acqua italiani*. Trento: Provincia Autonoma di Trento; 1988.
- Song YF, Gong P, Wilke BM, Zhang W, Song XY, Sun TH, Ackland ML. Genotoxicity assessment of soils from wastewater irrigation areas and bioremediation sites using the *Vicia faba* root tip micronucleus assay. *J Environ Monit* 2007;9:182-6.
- Tachet H, Bournaud M, Richoux P. *Introduction à l'étude des macroinvertebrés des eaux douces*. Lyon: Association Française de Limnologie; 1984.
- Tansley AG. The use and abuse of vegetational concepts and terms. *Ecology* 1935;16: 284-307.
- Turco F. *Lo studio della qualità biologica dei corpi idrici superficiali*. Presentazione al Convegno "La qualità delle Acque Superficiali nella Provincia di Vicenza" Montecchio Maggiore (Vi) 3 marzo 2011. ARPAV Dipartimento Regionale Laboratori Servizio Laboratori Provinciale di Vicenza; 2011.
- UNI EN 14184. *Linee guida per la valutazione delle macrofite acquatiche nelle acque correnti*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 2014.
- UNI EN 27828. *Qualità dell'acqua – Metodi di campionamento biologico. Guida al campionamento di macroinvertebrati bentonici mediante retino manuale*. Milano: Ente Nazionale Italiano di Unificazione; 1994.
- UNI EN ISO 11348-2. *Qualità dell'acqua - Determinazione dell'effetto inibitorio di campioni acquosi sull'emissione di luce di Vibrio fischeri (prova su batteri luminescenti) - Parte 2: Metodo con batteri disidratati*; 2009.

- USEPA. *Evaluation of dredged material proposed for ocean disposal*, n. 503/8-91/001. Washington, DC: US Environmental Protection Agency; 1991. (EPA 503/8-91/001).
- Weber CI. *Biological field and laboratory methods for measuring the quality of surface water and effluents*. Washington, DC: US Environmental Protection Agency; 1973. (EPA-670/4-73-001).
- Wernersson AS, Carere M, Maggi C, Tusil P, Soldan P, James A, Sanchez W, Dulio V, Broeg K, Reifferscheid G, Buchinger S, Maas H, Van Der Grinten E, O'Toole S, Ausili A, Manfra L, Marziali L, Polesello S, Lacchetti I, Mancini L, Lilja K, Linderoth M, Lundeberg T, Fjällborg B, Porsbring T, Larsson DGJ, Bengtsson-Palme J, Förlin L, Kienle C, Kunz P, Vermeirssen E, Werner I, Robinson CD, Lyons B, Katsiadaki I, Whalley C, den Haan K, Messiaen M, Clayton H, Lettieri T, Negrão Carvalho R, Gawlik BM, Hollert H, Di Paolo C, Brack W, Kammann U, Kase R. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe* 2015;27:7 (1).
- White PA, Claxton LD. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat Res* 2004;567:227-345.
- World Health Organization. *Emerging issues in water and infectious disease*. Geneva: World Health Organization; 2003.
- World Health Organization. *World health report 2013: Research for universal health coverage*. Geneva: World Health Organization; 2013.
- Yi M, Yi H, Li H, Wu L. Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba*. *Environ Toxicol* 2010;25:124-9.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di marzo 2016*

*Stampato in proprio
Settore Attività Editoriali – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, marzo 2016