

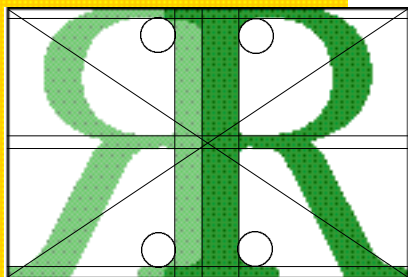


Fondazione Lombardia per l'Ambiente

**RICERCHE & RISULTATI**

*Valorizzazione dei progetti di ricerca 1994/97*

# Bioindicatori ambientali



a cura di Francesco Sartori

**Francesco Sartori** è professore associato di Botanica Sistemática presso il Dipartimento di Ecologia del Territorio dell'Università degli Studi di Pavia.

È autore di pubblicazioni scientifiche riguardanti la flora e la vegetazione dell'Italia settentrionale. I suoi studi riguardano principalmente la tipizzazione, l'ecologia, il dinamismo e la rappresentazione cartografica delle comunità vegetali. Si dedica anche a studi di geobotanica applicata alla pianificazione territoriale, alla valutazione di impatto ambientale, al recupero di aree marginali e degradate, alla gestione delle aree protette e al monitoraggio di aree a rischio.

È impegnato come docente in corsi di formazione e svolge anche attività di divulgazione scientifica.

Ha partecipato, e partecipa, in qualità di esperto a commissioni scientifiche per la gestione di aree protette.

È membro delle principali associazioni scientifiche del settore botanico. Fa parte del comitato editoriale e dei revisori di riviste scientifiche.

È attualmente responsabile del Progetto di ricerca *Per una cartografia tematica lombarda*, promosso dalla Fondazione Lombardia per l'Ambiente.

# **Bioindicatori ambientali**

a cura di  
Francesco Sartori

## Fondazione Lombardia per l'Ambiente

Foro Bonaparte 12 - 20121 Milano

tel. +39(2)809169

fax +39(2)72002398

flanet@flanet.org

http: //www.flanet.org

### **Consiglio di Amministrazione**

*Presidente:* Giovanni Bottari

*Vicepresidente:* Achille Cutrera

*Consiglieri:* Giordano Cassetta, Massimo Donati, Salvatore Giannella,  
Paolo Mantegazza, Emilio Massa, Roberto Schmid

### **Comitato scientifico**

Silvio Garattini, Angelo Cavallin, Renzo Compiani, Emilio Gerelli,  
Giorgio Guariso, Alfredo Liberatori, Gianfranco Mascazzini, Paola Vita Finzi

*Coordinatore scientifico:* Antonio Ballarin Denti

*Programma editoriale ideato e curato da:* Salvatore Giannella

*Coordinamento editoriale:* Rosa Maria Panattoni

*Revisione:* Diana Borio

*Progettazione e fotocomposizione:* Studio Tabloid, Milano

*Stampa:* Arti Grafiche by Juri Iodice, Sannazzaro (PV)

© 1998 Copyright Fondazione Lombardia per l'Ambiente

Proprietà letteraria riservata

Nessuna parte di questo volume può essere riprodotta o utilizzata sotto nessuna forma, senza permesso scritto, tranne che per brevi passaggi in sede di recensione e comunque citando la fonte.

# Indice

<b>Prefazione</b>	pag. 13
<b>Introduzione</b>	15
<b>Premessa</b>	17
<b>Ringraziamenti</b>	21
<b>INDICATORI BIOLOGICI, BIOVALUTAZIONE E BIOMONITORAGGIO: UN'INTRODUZIONE</b> di Francesco Sartori	23
<b>Bibliografia citata</b>	31
<b>Capitolo 1</b>	
<b>BIOINDICATORI A LIVELLO SUBCELLULARE</b> di Maurizio Cocucci, Francesco G. Albergoni, Maria Teresa Marrè e Alberto Rivetta	33
<b>1.1 Processi fisiologici e biochimici utilizzati come biosensori per l'ambiente - Maurizio Cocucci e Alberto Rivetta</b>	34
1.1.1 Introduzione	34
1.1.2 Sistemi biologici per il biomonitoraggio	34
1.1.3 Risposte biochimiche e fisiologiche come bioindicatori di inquinanti	35

1.1.4	Come individuare i bioindicatori: criteri di scelta	pag.	37
1.1.5	Bioindicatori di inquinanti atmosferici		37
1.1.6	Bioindicatori di metalli pesanti: aria, acqua, suolo		38
1.1.7	Esperienze: tioli acido-solubili come bioindicatori di metalli pesanti nel suolo		40
1.1.8	Bioindicatori di erbicidi		45
1.1.9	Prospettive future		46
	Bibliografia		47
1.2	<b>Individuazione e misura di alterazioni di funzioni nei processi fisiologici di alcune piante vascolari</b> - Francesco Albergoni e Maria Teresa Marrè		49
1.2.1	Introduzione		49
1.2.2	Materiale e terminologia		50
1.2.3	Informazioni deducibili		51
1.2.4	Metodi d'uso		51
1.2.5	Esempi di applicazione del metodo		56
1.2.6	Discussione		61
1.2.7	Limiti del metodo		62
1.2.8	Limiti di accettabilità dei risultati		63
	Bibliografia		63

## Capitolo 2

### I MICRORGANISMI DEL SUOLO COME BIOINDICATORI

	di Annamaria Ferrari, Luigi Allievi, Carmen Gigliotti e Anna Fontana		65
2.1	<b>Introduzione</b>		66
2.1.1	Le micorrize come bioindicatori		67
2.2	<b>Rassegna e discussione delle metodiche</b>		69
2.2.1	Ecotossicologia		70
2.2.2	Tossicologia		78
2.2.3	Studio delle simbiosi microrganismi-piante		79
	2.2.3.1 <i>Ectomicorrize</i>		79
	2.2.3.2 <i>Endomicorrize arbuscolari</i>		80
2.3	<b>Esempi</b>		81
2.3.1	Nostre ricerche		81
2.3.2	Strutture di ricerca		86
	Bibliografia		86

## Capitolo 3

### BIOINDICATORI A LIVELLO DI ORGANISMI VEGETALI

	di Mariagrazia Valcuvia Passadore, Michele Aleffi, Silvia Assini, Paola Nola, Filippo Bussotti, Alberto Cozzi, Marco Ferretti, Giovanna Puppi Branzi, Giuseppe Belli e Guido Violini		87
--	--	--	----

<b>3.1</b>	<b>Licheni</b> - <i>Mariagrazia Valcuvia Passadore</i>	pag. 88
	3.1.1 Generalità	88
	3.1.2 Utilizzo nel biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico	89
	3.1.3 Licheni come bioaccumulatori	90
	3.1.4 Licheni come bioindicatori	92
	3.1.5 Studi di biomonitoraggio in Lombardia	96
	3.1.6 Conclusioni	98
	Bibliografia	99
<b>3.2</b>	<b>Briofite</b> - <i>Michele Aleffi</i>	102
	3.2.1 Introduzione	102
	3.2.2 Ecologia delle briofite	103
	3.2.3 Caratteristiche degli indicatori biologici	103
	3.2.4 Principali definizioni e metodi	104
	3.2.4.1 Bioaccumulatori	104
	3.2.4.2 Bioindicatori	107
	3.2.4.3 L'Indice di Purezza Atmosferica (IAP)	107
	3.2.5 Conclusioni	110
	Bibliografia	111
<b>3.3</b>	<b>Tessuti e organi di vegetali vascolari</b>	112
	3.3.1 Radice - <i>Silvia Assini</i>	112
	3.3.1.1 Premessa	112
	3.3.1.2 Sezione I. <b>Allium</b> test	114
	3.3.1.3 Sezione II. Test di fitotossicità	115
	3.3.1.4 Sezione III. Radice e fattori ambientali in situazioni di stress	116
	3.3.1.5 Altre applicazioni	120
	3.3.1.6 Considerazioni finali	121
	Bibliografia	121
	3.3.2 Anelli di accrescimento annuale del fusto - <i>Paola Nola</i>	122
	Bibliografia	134
	3.3.3 Foglie - <i>Filippo Bussotti, Alberto Cozzi e Marco Ferretti</i>	135
	3.3.3.1 Introduzione	135
	3.3.3.2 Metodi	135
	3.3.3.3 Sintomi visibili	138
	3.3.3.4 Sintomi non visibili	141
	3.3.3.5 Informazioni ritraibili per mezzo del Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM)	143
	3.3.3.6 Informazioni ritraibili per mezzo del Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)	144
	3.3.3.7 Proposte per una quantificazione del danno microscopico	144
	3.3.3.8 Accumulo nei tessuti	144
	Bibliografia	149
	3.3.4 Organi riproduttivi - <i>Giovanna Puppi Branzi</i>	151
	3.3.4.1 Introduzione	151
	3.3.4.2 I fattori che determinano la comparsa dei fiori	152
	3.3.4.3 I fattori che determinano il momento di schiusura dei fiori	152
	3.3.4.4 Fioriture e fattori di stress	153

3.3.4.5	Informazioni deducibili	pag.	153
3.3.4.6	Monitoraggio diretto: fenologia e produzione antesica		154
3.3.4.7	Monitoraggio indiretto: aeropalinologia		154
3.3.4.8	Metodo d'uso		155
3.3.4.9	Metodologia di rilievo aerobiologico		156
3.3.4.10	Discussione		156
3.3.4.11	Specie guida come indicatori fenologici		156
3.3.4.12	Anomalie delle fioriture e stress ambientali		157
3.3.4.13	Aerobiologia		157
3.3.4.14	Esempi		158
	<b>Bibliografia</b>		159
<b>3.4</b>	<b>Vegetali vascolari</b> - Giuseppe Belli e Guido Violini		160
	3.4.1 Introduzione		160
	3.4.2 Informazioni deducibili		161
	3.4.3 Metodologia		161
	3.4.4 Esempi		166
	3.4.5 Considerazioni conclusive		167
	<b>Bibliografia</b>		168

## Capitolo 4

	<b>BIOINDICATORI A LIVELLO DI ORGANISMI ANIMALI</b>		
	di Maurizio G. Paoletti, Luciano Süß, Paola Girgenti, Riccardo Groppali, Sergio Frugis, Luciano Bani, Luciana Bottoni, Lorenzo Fornasari, Renato Massa, Carlo Alberto Redi, Silvia Garagna e Maurizio Zuccotti		171
<b>4.1</b>	<b>Anellidi (Programma Lombri CD-ROM)</b> - Maurizio G. Paoletti		172
<b>4.2</b>	<b>Insetti</b> - Luciano Süß e Paola Girgenti		174
	4.2.1 Gli Scolitidi come indicatori dello stato di salute della vegetazione		175
	4.2.1.1 Introduzione		175
	4.2.1.2 Cenni di biologia		176
	4.2.1.3 Ecologia degli Scolitidi		177
	4.2.1.4 Tecniche di raccolta, conservazione e studio		179
	<b>Bibliografia</b>		179
	4.2.2 Chironomidi come indicatori della qualità delle acque		180
	4.2.2.1 Introduzione		180
	4.2.2.2 Cenni di biologia		182
	4.2.2.3 Ecologia dei Chironomidi		182
	4.2.2.4 Tecniche di raccolta		183
	<b>Bibliografia</b>		184
	4.2.3 Il monitoraggio dell'inquinamento agricolo e urbano mediante l'ape		184
	4.2.3.1 Introduzione		184
	4.2.3.2 Cenni di biologia e morfologia		185
	4.2.3.3 Metodo d'uso		186



	4.2.3.4 Attività di volo	pag.	187
	4.2.3.5 Attività di bottinamento		187
	4.2.3.6 Forza della famiglia		187
	<b>Bibliografia</b>		189
<b>4.3</b>	<b>Ragni (Araneae) - Riccardo Groppali</b>		190
	4.3.1 Introduzione		190
	4.3.2 Informazioni deducibili		191
	4.3.3 Metodo d'uso		191
	4.3.4 Discussione		194
	4.3.4.1 Limiti d'uso		194
	4.3.4.2 Limiti di accettabilità dei risultati		195
	4.3.4.3 Problemi attinenti all'applicazione del metodo d'uso		195
	4.3.4.4 Stato delle ricerche		195
	4.3.4.5 Potenzialità		196
	4.3.5 Esempi		197
	4.3.5.1 I ragni come bioindicatori di contaminazione da sostanze biocide		197
	4.3.5.2 I ragni come bioindicatori di alterazioni e di disturbo ambientali		198
	4.3.5.3 I ragni come bioindicatori della qualità ambientale		199
	<b>Bibliografia</b>		200
<b>4.4</b>	<b>Pesci, anfibi e rettili - Sergio Frugis</b>		201
	4.4.1 Introduzione		201
	4.4.2 Informazioni deducibili		203
	4.4.3 Metodo d'uso		207
	4.4.4 Discussione		208
	4.4.4.1 Limiti d'uso		208
	4.4.4.2 Limiti di accettabilità dei risultati		209
	4.4.5 Problemi attinenti all'applicazione del metodo d'uso		209
	4.4.6 Stato delle ricerche		210
	4.4.6.1 Potenzialità		211
	4.4.7 Esempi		211
	4.4.7.1 Pesci, anfibi e rettili come bioindicatori di sostanze biocide		212
	4.4.7.2 Pesci, anfibi e rettili come indicatori della qualità delle alterazioni e del disturbo ambientali		214
	<b>Bibliografia</b>		215
<b>4.5</b>	<b>Uccelli e Mammiferi - Luciano Bani, Luciana Bottoni, Lorenzo Fornasari e Renato Massa</b>		216
	4.5.1 Introduzione		216
	4.5.1.1 Inquinamento		216
	4.5.1.2 Gli ecosistemi naturali		216
	4.5.1.3 Fauna e ambiente		217
	4.5.2 La fauna vertebrata superiore come strumento di monitoraggio ambientale		220
	4.5.2.1 Uccelli		220
	4.5.2.2 Mammiferi		220

4.5.3	<b>Informazioni deducibili</b>	pag.	221
4.5.3.1	<i>Comunità di uccelli</i>		221
4.5.3.2	<i>Passeriformi</i>		221
4.5.3.3	<i>Rapaci</i>		222
4.5.3.4	<i>Chiroteri</i>		223
4.5.3.5	<i>Micromammiferi</i>		223
4.5.3.6	<i>Carnivori</i>		224
4.5.3.7	<i>Altri mammiferi</i>		224
4.5.4	<b>Metodi d'uso e loro validità</b>		225
4.5.4.1	<i>Censimenti</i>		225
4.5.4.2	<i>Caratteristiche dei metodi di campionamento</i>		226
4.5.4.3	<i>Caratteristiche di un metodo di rilevamento</i>		227
4.5.4.4	<i>Tipi di errore</i>		227
4.5.4.5	<i>Metodi assoluti e metodi relativi</i>		227
4.5.4.6	<i>Metodo della cattura e ricattura</i>		228
4.5.4.7	<i>Uccelli</i>		228
4.5.4.8	<i>Chiroteri</i>		230
4.5.4.9	<i>Micromammiferi</i>		231
4.5.4.10	<i>Carnivori</i>		231
4.5.5	<b>Tempi</b>		232
4.5.5.1	<i>Uccelli</i>		232
4.5.5.2	<i>Chiroteri</i>		232
4.5.5.3	<i>Altri mammiferi</i>		232
4.5.6	<b>Conclusioni</b>		233
4.5.7	<b>Stato delle ricerche ed esempi</b>		233
	<b>Bibliografia</b>		234
4.6	<b>Mammiferi, danno a livello cellulare</b> - Carlo Alberto Redi, <i>Silvia Garagna e Maurizio Zuccotti</i>		235
4.6.1	<b>Introduzione</b>		235
4.6.2	<b>Informazioni deducibili</b>		236
4.6.3	<b>Metodo d'uso</b>		237
4.6.4	<b>Discussione</b>		237
4.6.5	<b>Esempi</b>		240
	<b>Bibliografia</b>		244

## Capitolo 5

<b>APPROCCIO MULTISPECIE NELL'UTILIZZO DI BIOINDICATORI</b> di Marina Camatini, Anita Colombo, Patrizia Bonfanti, Nicola Dell'Orto e Davide Cantelli			245
5.1	<b>Introduzione</b>		246
5.2	<b>Informazioni acquisibili</b>		247
5.3	<b>Metodi e limiti di utilizzo</b>		248
5.3.1	<i>Illustrazione dei materiali e delle procedure</i>		248

5.3.1.1	Test di fitotossicità	pag.	248
5.3.1.2	Test di tossicità con <i>Daphnia magna</i>		249
5.3.1.3	Test di tossicità acuta		250
5.3.1.4	Test di tossicità cronica		250
5.3.1.5	Test di teratogenesi con <i>Xenopus laevis</i>		250
<b>5.4</b>	<b>Esempio di applicazione</b>		251
5.4.1	Risultati del test con il modello <i>Selenastrum capricornutum</i>		252
5.4.2	Risultati ottenuti con <i>Daphnia magna</i>		257
5.4.2.1	Test acuto		257
5.4.2.2	Test cronico		257
5.4.3	Risultati del test di teratogenesi con <i>Xenopus laevis</i>		258
<b>5.5</b>	<b>Considerazioni conclusive sulle indagini tossicologiche</b>		261
	<b>Bibliografia</b>		261

## Capitolo 6

	<b>BIOINDICATORI A LIVELLO DI POPOLAZIONI E COMUNITÀ</b>		
	di Mauro G. Mariotti, Alberto Meriggi, Anna Occhipinti Ambrogi, Andrea Buffagni, Paolo Galli, Marco Marchetti e Mario A. Gomasasca		263
<b>6.1</b>	<b>Flora e vegetazione</b> - Mauro G. Mariotti		264
6.1.1	L'importanza delle piante vascolari come bioindicatori		264
6.1.2	I metodi		266
6.1.3	Alcuni esempi		269
6.1.3.1	L'ambiente acquatico		269
6.1.3.2	Gli inquinanti organici nel terreno		270
6.1.3.3	Piante e metalli pesanti		272
6.1.3.4	Le condizioni atmosferiche urbane		274
6.1.4	I limiti		275
	<b>Bibliografia</b>		276
<b>6.2</b>	<b>Fauna</b> - Alberto Meriggi		277
6.2.1	Introduzione		277
6.2.2	Parametri descrittivi delle comunità		277
6.2.2.1	Le misure della diversità		278
6.2.2.2	Ricchezza specifica		278
6.2.2.3	Eterogeneità		280
6.2.2.4	Uniformità		283
6.2.3	Comportamento dei parametri descrittivi delle comunità animali		284
6.2.3.1	Ricchezza specifica		284
6.2.3.2	Eterogeneità e uniformità		286
6.2.4	La scelta delle comunità da utilizzare come bioindicatori		286
6.2.4.1	Macroinvertebrati acquatici		287
6.2.4.2	Insetti		287
6.2.4.3	Pesci		288
6.2.4.4	Anfibi		288

6.2.4.5 Uccelli	pag. 288
6.2.4.6 Mammiferi	289
6.2.5 Stato delle ricerche	289
Bibliografia	290
<b>6.3 Indicatori biologici e valutazione della qualità delle acque - Anna Occhipinti Ambrogi, Andrea Buffagni e Paolo Galli</b>	<b>291</b>
6.3.1 Generalità	291
6.3.2 Indici basati sul macrobenthos	291
6.3.2.1 Indice biotico esteso (IBE)	293
6.3.2.2 Biological Monitoring Working Party-score (BMWPs)	301
6.3.2.3 Average Score Per Taxon (ASPT)	302
6.3.2.4 River Invertebrate Prediction and Classification System (RIVPACS)	303
6.3.2.5 Indici di integrità biotica	303
6.3.3 Indici basati su altre componenti	306
6.3.3.1 Il sistema saprobico	306
6.3.3.2 L'indice nematodologico	306
6.3.3.3 L'ittiofauna	307
6.3.4 L'uso di bioindicatori in ambiente lacustre	307
6.3.5 Stato delle ricerche e potenzialità future	308
Bibliografia	310
<b>6.4 Approcci cartografici e telerilevamento - Marco Marchetti e Mario A. Gomasca</b>	<b>313</b>
6.4.1 Premessa	313
6.4.2 La diversità forestale. Definizioni e scale di misurazione	314
6.4.3 Metodi di misurazione della diversità forestale	315
6.4.4 Indicatori di diversità strutturale nelle immagini digitali	316
6.4.5 Telerilevamento e tendenze evolutive	319
6.4.5.1 Un esempio applicativo (Bottai et al., 1997)	320
Bibliografia	323
<b>Sintesi delle attività del progetto</b>	<b>325</b>
<b>Gli Autori</b>	<b>351</b>
<b>Sigle e abbreviazioni</b>	<b>357</b>
<b>Indice analitico</b>	<b>359</b>

## Prefazione

Questo volume appartiene a una nuova serie di pubblicazioni, nuova nel contenuto nella veste grafica, che la Fondazione Lombardia per l'Ambiente inaugura a conclusione del programma di valorizzazione dei risultati dei tre importanti progetti da essa promossi e finanziati fra il 1994 e il 1997. Si tratta di ricerche che, facendo perno sulla prevalente collaborazione di istituti universitari e di altri enti di ricerca della nostra regione, sono state proposte e sostenute dalla Fondazione per affrontare importanti questioni di inquinamento e degrado ambientale nel contesto del territorio regionale.

Le tematiche affrontate riguardavano rispettivamente:

1. la gestione del territorio in relazione allo smaltimento dei rifiuti tossico-nocivi (coordinatore prof. Giuseppe Marchetti, Università di Pavia);
2. gli effetti dell'inquinamento sui sistemi agricoli e forestali (coordinatore prof. Sergio Cocucci, Università di Milano);
3. la qualità dell'aria nell'area metropolitana milanese e i suoi riflessi sulla salute dell'uomo (coordinatore prof. Paolo Beltrame, Università di Milano).

I progetti, una volta conclusi, sono stati oggetto di un'attenta opera di valutazione al fine del trasferimento dei loro risultati e della valorizzazione del **know how** maturato nel loro svolgimento. Questo processo è stato affidato a un gruppo di studio formato dai professori Demetrio Pitea (progetto 1), Francesco Sartori (progetto 2) e Bruno Rindone (progetto 3) e dall'avvocato Ada Lucia De Cesaris, esperta in diritto ambientale, per tutti gli aspetti relativi ai rapporti con la Pubblica Amministrazione.

In questo ambito, infatti, si erano voluti individuare gli "utilizzatori finali" dell'azione di trasferimento, secondo una metodologia adottata in sede comunitaria europea, volta a trasmet-

tere i risultati della ricerca scientifica a coloro che sul piano istituzionale (e in seconda istanza anche professionale e produttivo) hanno responsabilità nelle decisioni in campo ambientale. Si è pertanto impostato un programma di **auditing**, grazie anche al proficuo rapporto di collaborazione con l'assessorato all'Ambiente della Regione Lombardia, con le strutture tecnico-amministrative e regionali, per mettere a punto contenuti e finalità del programma di ricerca.

La pubblicazione di questo volume (accanto agli altri otto libri delle tre serie in pubblicazione) conclude questa fase di valorizzazione dei primi tre grandi progetti coordinati di ricerca che consideriamo di sicura rilevanza scientifica, sviluppati dalla nostra Fondazione.

Rivolgiamo un caloroso ringraziamento ai professori Demetrio Pitea, Bruno Rindone e Francesco Sartori e all'avvocato Ada Lucia De Cesaris che hanno diretto con impegno e competenza l'intero programma di valorizzazione insieme con il coordinatore scientifico della Fondazione prof. Antonio Ballarin Denti. Siamo altresì riconoscenti per l'efficace collaborazione fornita dai funzionari della Regione Lombardia, responsabili dei settori oggetto delle singole opere, e che ringraziamo più specificatamente nelle pagine introduttive dei vari volumi. Gli uni e gli altri hanno fornito un prezioso contributo al nostro programma dimostrando – in coerenza con un paradigma culturale della nostra Fondazione – che scienza e azione politico-amministrativa nel campo ambientale possono trovare un terreno serio e costruttivo di collaborazione e sviluppo comune.

Il Presidente  
**Giovanni Bottari**

## Introduzione

**T**erra, acqua, aria e luce solare sono considerati, fin dagli albori del pensiero scientifico, gli elementi fondamentali della vita sul nostro pianeta. Di questi elementi, la sola luce solare è costantemente rinnovata; gli altri sono invece riutilizzati, attraverso processi oltremodo complessi, sinteticamente descritti nel loro svolgersi dai grandi cicli biogeochimici che attraversano la biosfera. L'esplosione demografica dell'uomo, favorita e affiancata dai prodotti dello sviluppo tecnologico e scientifico, ha perturbato i meccanismi ciclici e gli equilibri naturali sui quali si basa tutta la vita, compresa quella umana.

Non è casuale, quindi, che la Fondazione Lombardia per l'Ambiente abbia iniziato la sua attività di promozione e sostegno della ricerca scientifica in campo ambientale volgendo la sua attenzione ad alcuni aspetti dell'inquinamento del suolo, dell'aria, dell'acqua, con particolare riferimento alla situazione lombarda.

Il progetto di ricerca sull'inquinamento dell'aria e del suolo, valutato attraverso gli effetti provocati a livello di alcuni importanti sistemi agro-forestali, venne messo a punto e poi realizzato dal prof. Sergio Cocucci, fisiologo e biochimico vegetale della Facoltà di Agraria dell'Università di Milano, in qualità di coordinatore di un numeroso gruppo di ricercatori, afferenti a svariate discipline scientifiche e organizzati in dieci Unità Operative appartenenti ad altrettanti istituti universitari ed enti di ricerca.

Il progetto, discusso prima in sede di Comitato Scientifico della Fondazione, una volta completati gli studi di fattibilità, venne definitivamente esaminato e approvato dal Consiglio di Amministrazione nell'autunno del 1993 e si svolse nel biennio 1994/95. Un riassunto delle attività svolte e dei risultati conseguiti dalle varie Unità Operative è riportato in appendice al volume. La relazione finale venne poi sottoposta a revisione da parte di tre referees. I risultati della ricerca si concretizzarono in pubblicazioni su riviste scientifiche specializzate e in comunicazioni a congressi scientifici nazionali e internazionali, redatte a opera dei ricercatori responsabili delle indagini svolte.

Al fine di non limitare la diffusione dei risultati al solo ambito della comunità scientifica, il Consiglio di Amministrazione della Fondazione promosse nel corso del 1996 un'azione di valorizzazione e trasferimento del progetto, per dare una diffusione più ampia ai dati, ai risultati e alle metodologie acquisite con la ricerca.

Tale azione ha quindi preso lo spunto dallo scopo originario della ricerca, finalizzato alla messa a punto di metodi per il monitoraggio e il controllo dei sistemi agro-forestali sottoposti a stress ambientale. In particolare la ricerca aveva indagato sulle sostanze inquinanti presenti nelle componenti degli ecosistemi che veicolano e accumulano tali sostanze quando entrano all'interno dei grandi cicli biogeochimici: organismi viventi, acqua, aria, terra, valutando gli effetti di queste sostanze sugli organismi che popolano i sistemi studiati.

Oggetto specifico della ricerca erano stati i seguenti tre temi.

- *Tecniche biologiche di monitoraggio dell'inquinamento ambientale. Si sono studiate flora e fauna dei sistemi agricoli e forestali, con valutazione dei segnali che gli organismi viventi, presi singolarmente o in comunità o come strutture componenti il loro corpo, possono trasmettere per indicare lo stato dei sistemi che popolano in relazioni a specifiche situazioni di inquinamento: a questa area di studi fa riferimento il libro "Bioindicatori ambientali" (a cura di Francesco Sartori).*
- *Fattori di fertilità e di tossicità dei suoli in relazione all'impiego su di essi di biomasse derivanti da attività di smaltimento di reflui e rifiuti. Sono state analizzate le alterazioni che avvengono nella componente biologica e chimico-fisica del sistema suolo-pianta e i possibili veicoli di perturbazione dei cicli biogeochimici che nel suolo trovano il loro ambito di svolgimento. Poiché l'utilizzo del compost (oggi di rinnovata attualità alla luce di recenti politiche nazionali e locali sullo smaltimento dei rifiuti) entra comunque nella complessa rete di questi equilibri si sono ulteriormente sviluppate le ricerche del progetto affidate al prof. Pier Luigi Genevini dell'Università di Milano producendo il libro su "Compost e agricoltura" (a cura di Pier Luigi Genevini).*
- *Effetti dell'inquinamento dell'aria e dei suoli sugli alberi e sulle foreste. Si sono verificati e messi a punto nuovi protocolli di valutazione del deperimento forestale attraverso lo studio di una varietà di indicatori biologici e si sono parallelamente caratterizzate le principali variabili fisico-chimiche ambientali legate a particolari forme di inquinamento dell'aria e dei suoli, cercandone possibili relazioni con i sintomi visibili e microscopici di stress forestale. Da questa linea di ricerca è scaturito il volume "Monitoraggio delle foreste sotto stress ambientale" (a cura di Antonio Ballarin Denti, Sergio Mariano Cocucci e Francesco Sartori).*

**Francesco Sartori**  
**Università degli Studi di Pavia**  
**Dipartimento di Ecologia**  
**del Territorio e degli**  
**Ambienti Terrestri**



## Premessa

**I**l libro della natura si presta a più letture e interpretazioni. Già l'uomo dell'antichità riuscì a decifrarvi le specie utili per la sua alimentazione, per la sua salute, per suo ornamento, per la sua sicurezza o compagnia, per il suo lavoro, per i suoi viaggi, per i suoi scambi commerciali, per il suo piacere o stordimento. I primi filosofi hanno trovato nella natura gli spunti più originali per i loro ragionamenti, che saranno alla base della riflessione speculativa e della stessa scienza. Artisti di tutti i tempi, non solo si sono ispirati a forme e colori di piante, fiori, animali, paesaggi, ma hanno usato questi stessi come elementi del loro particolare linguaggio espressivo. L'uomo religioso vede la natura come il manto sublime di un Dio re del cosmo, o deifica la natura stessa. Miti, leggende, proverbi, poesia riferiti alla natura hanno permeato tutti gli strati della nostra cultura, alta e popolare, da Dante al più ingenuo proverbio campagnolo. Agli alchimisti non mancarono riferimenti a segni della natura per sviluppare teorie fantasiose, talora sorprendentemente feconde di risultati.

Anche l'uomo moderno fa ampiamente uso delle espressioni proprie del mondo naturale, magari recuperando o rivisitando la riflessione degli uomini e delle culture che ci hanno preceduto. Vegetali e animali diventano simboli araldici, stemmi di stati e di bandiere, di partiti, di gruppi e associazioni; sono impressi sulle mostrine dei militari; sono usati dal messaggio pubblicitario per evocare paesi esotici o familiari, per creare atmosfere e situazioni emotivamente coinvolgenti. Cibi e cure naturali, bagaglio culturale di popoli anche molto diversi tra loro, sono accettati, usati e talora preferiti. Sono praticati credenze, miti, dottrine, forme di meditazione che spesso hanno la natura al loro centro. La recente moda della **new age** è espressione di questo complesso fenomeno, al tempo stesso mistico e artistico. La cultura, che viene riassuntivamente ed emblematicamente definita ecologista, permea un po' tutta la nostra società.

Al mondo agricolo, forzatamente attento ai fatti della natura, si deve non solo un retaggio di proverbi e aneddoti direttamente derivati dall'osservazione di fenomeni biologici, ma, con tut -

ta probabilità, anche la prima forma d'uso delle piante come indicatori. Infatti la manualistica agricola, fin dalle sue prime opere, dedica particolare attenzione agli elenchi delle cosiddette piante spia, indicatrici del grado di fertilità dei terreni e dell'attitudine degli stessi a determinate coltivazioni.

Anche le scienze della natura, fin dal loro nascere, hanno collegato le specie vegetali e animali con la geografia e con le situazioni climatiche, edafiche, antropiche, territoriali ed ecologiche in genere; per cui il naturalista è in grado, non solo di dire quale sia l'ambiente di vita più adatto a una specie tra i molteplici ambienti che formano la biosfera ma è anche in grado di elencare quali specie animali o vegetali caratterizzino e improntino, con la loro presenza esclusiva o quasi, questi stessi ambienti.

È invece ben più recente l'uso strumentale e sistematico delle manifestazioni biologiche come indicatrici di perturbazioni indotte dalle attività dell'uomo sull'ambiente e il conseguente monitoraggio delle condizioni dell'ambiente tramite bioindicatori.

Il libro intende fare il punto su questo vivace settore della ricerca scientifica, soprattutto volto all'individuazione e alla messa a punto delle modalità e possibilità d'uso dei bioindicatori.

I testi, preparati per la maggior parte dai ricercatori che hanno collaborato a un comune Progetto di ricerca di cui il libro è lo sviluppo, intendono offrire una panoramica delle ricerche e dei metodi di indagine scientifica percorribili per studiare e, soprattutto, controllare nel tempo l'ambiente attraverso il biomonitoraggio, non trascurando le possibilità di integrazione con il rilevamento di tipo strumentale.

Specialisti diversi fanno una rapida panoramica delle possibilità di biovalutazione offerte dai principali gruppi sistematici animali e vegetali, estendendo la trattazione anche ai livelli di organizzazione subcellulare e a quelli di popolazioni e comunità. Ogni gruppo biologico è trattato estensivamente, con alcuni esempi di approfondimento. Conseguentemente, solo una piccola parte del mondo vivente potenzialmente utilizzabile in questo tipo di ricerche viene considerato in modo diretto; tuttavia lo sforzo di aggregazione delle varie competenze è stato notevole e, sotto questo profilo, il libro costituisce un raro esempio di pubblicazione con un così ampio spettro disciplinare.

Purtroppo i tempi stretti concessi per la preparazione dei contributi hanno consentito di attivare un gruppo relativamente limitato di specialisti, per cui non mancano lacune anche vistose; importanti gruppi sistematici zoologici e vegetali, come alcuni invertebrati, i funghi e le alghe sono per esempio trattati solo marginalmente.

L'opera, come è stato detto nella Prefazione, è nata come sviluppo del Progetto di ricerca della Fondazione Lombardia per l'Ambiente "Effetti dell'inquinamento sui sistemi agro-forestali - tecniche biologiche di monitoraggio e recupero" coordinato dal prof. S. M. Cocucci dell'Università di Milano (vedi sintesi delle attività del progetto).

Gli autori delle voci provengono per la gran parte da detta esperienza di ricerca e, in quest'ambito, avevano già avuto modo di focalizzare, per i settori di competenza, la problematica dei bioindicatori, della biovalutazione e del biomonitoraggio.

Nell'ambito delle ricerche di questo Progetto si sono anche attivate varie borse di studio, sia all'interno delle Unità Operative sia nell'ambito dei concorsi delle borse di formazione banditi annualmente dalla Fondazione. Il Progetto ha pertanto costituito un'importante occasione di formazione e di addestramento alla ricerca scientifica e al lavoro di monitoraggio ambientale "in campo" per giovani laureati che potranno ora trasferire le competenze acquisite

---

site nell'ambito della gestione dell'ambiente e del controllo dei fattori di inquinamento. Anche alcuni borsisti o tutori di borsisti hanno partecipato alla realizzazione del volume redigendo parti di specifica competenza.

Il libro è strutturato in sei capitoli, ordinati secondo i gradi di crescente complessità organizzativa del mondo vivente, dagli organuli subcellulari alle comunità.

Dopo la parte introduttiva al tema che definisce alcuni concetti di base, il primo capitolo illustra le possibilità di utilizzo dei bioindicatori subcellulari: un settore di ricerca che tende a correlare le modificazioni dei processi biochimici e fisiologici provocate con l'azione diretta o indiretta di una sostanza tossica presente nell'ambiente.

Il capitolo secondo espone le possibilità di impiego dei microrganismi del suolo per rilevare la presenza di sostanze inquinanti; particolare rilevanza è data alle metodiche di laboratorio necessarie per lo svolgimento di tali studi; una sezione del contributo riguarda anche i Funghi micorrizici.

Il capitolo terzo è molto vasto e tratta gran parte della componente vegetale del mondo vivente. Alcuni gruppi sistematici, come i Licheni, ovvero alcuni organi, come la foglia delle piante superiori, hanno una lunga storia di utilizzo come bioindicatori e come bioaccumulatori e quindi sono ampiamente trattati. Altri gruppi sistematici, come le Briofite, o altre strutture vegetali, come la radice, gli anelli di crescita del fusto delle piante legnose, gli aspetti fenologici non sono altrettanto noti come bioindicatori, per cui la lettura di queste parti sarà una scoperta per molti addetti alla gestione e al controllo dell'ambiente.

Il capitolo quarto è pure notevolmente vasto, trattando la componente animale del mondo vivente. Anche in questo caso, accanto a gruppi sistematici noti per il loro valore come bioindicatori, ve ne sono altri altrettanto interessanti che attireranno l'attenzione del lettore.

Il capitolo quinto riassume un'esperienza di utilizzo contemporaneo di specie vegetali e animali per acquisire informazioni utili sul grado di inquinamento delle acque.

Con il capitolo sesto è abbandonato l'approccio tassonomico e si affronta il problema della biovalutazione e del biomonitoraggio attuati con i segnali trasmessi dai sistemi biologici di più alta complessità, vale a dire, dalle popolazioni e dalle comunità, sia vegetali sia animali. Nell'ambito del capitolo, due temi (vegetazione e fauna) trattano soprattutto gli ambienti terrestri; un terzo illustra gli indicatori biologici delle acque, uno dei settori della biovalutazione ove le ricerche sono tra le più avanzate anche come livello di standardizzazione; infine, un ultimo contributo prospetta le possibili applicazioni del telerivamento.

Il testo è redatto in forma di alta divulgazione ed è affrontabile senza difficoltà da un lettore dotato di una normale cultura universitaria nell'ambito delle scienze agronomiche, naturali o ambientali. Non mancano parti specialistiche e di approfondimento che richiedono una preparazione specifica; queste sezioni sono tuttavia sempre introdotte o riassunte usando concetti scientifici di base. Al termine di ogni contributo è riportata una bibliografia sia di carattere generale, sia attinente ad aspetti specifici affrontati nel capitolo.

Nella redazione delle voci gli autori sono stati invitati a seguire il seguente schema espositivo:

- un'introduzione di presentazione del sistema usato nella biovalutazione;
- l'esposizione delle informazioni deducibili dall'uso del bioindicatore;
- le modalità di impiego del bioindicatore;
- una discussione critica sui limiti d'uso, sui limiti di accettabilità dei risultati, sui problemi applicativi, sulle potenzialità di impiego;

- l'esposizione di alcuni esempi;
- i riferimenti bibliografici essenziali, privilegiando le opere di sintesi.

*In genere gli autori si sono attenuti allo schema. Il diverso spazio dedicato ai vari punti può essere rivelatore delle problematiche esistenti: più un punto è discusso e approfondito, maggiore è la probabilità che lo stesso sia cruciale per l'uso di quel tipo di bioindicatore.*

**Francesco Sartori**

## Ringraziamenti

*Il curatore rivolge un cordiale ringraziamento e apprezzamento per il lavoro svolto da tutti gli autori delle singole parti dell'opera (i cui nomi sono riportati in una sezione del libro, oltre che nell'indice e all'inizio dei testi scritti dagli stessi) e per la disponibilità e la pazienza da essi sempre dimostrata nel corso del faticoso lavoro di **editing**. Si ringraziano altresì i dr. Paola Nola, Gisèle Gizzi, Lorenzo Gamba, Diana Borio, Giacomo Gerosa, Silvia Assini, Luciana Carotenuto e Barbara Beccaria per la preziosa assistenza nei contatti con gli autori, nell'organizzazione delle riunioni di lavoro, nella raccolta del materiale bibliografico e nella fase di **editing** finale. Una particolare gratitudine è dovuta al Direttore Generale dell'Assessorato Agricoltura e Foreste della Regione Lombardia dr. Salvatore Ena e al suo validissimo collaboratore, dr. Vittorio Vigorita, per l'intelligente azione di sostegno e consulenza in sede di impostazione generale del volume e di lettura dei testi.*



# Indicatori biologici, biovalutazione e biomonitoraggio: un'introduzione

Francesco Sartori

Non si sa con precisione quando e dove la vita sia iniziata sulla Terra. È probabile che già 3 miliardi di anni fa le prime rudimentali espressioni di vita fossero presenti sul nostro pianeta, in ambienti particolari e circoscritti. Da allora, con una progressione inesorabile, la vita si è diffusa in tutti gli ambienti terrestri. Per diffondersi essa ha inventato una impressionante varietà di forme, con caratteristiche e specializzazioni adattative diverse, abbandonando ed eliminando quelle aventi caratteri non più congruenti e competitivi. La storia della vita, a noi nota solo in parte, evidenzia una spiccata capacità degli esseri viventi di comportarsi in modo utilitaristico, reagendo, adeguandosi o trasformandosi, secondo la teoria evolutiva attraverso casuali errori di riproduzione, per selezionare forme in grado di vivere nelle diverse condizioni ambientali.

La correlazione stretta che esiste tra espressioni di vita e tipi di ambiente fa del materiale biologico un descrittore dell'ambiente stesso. Tali correlazioni sono da tempo note ai biogeografi ed agli ecologi. Come d'altra parte la paleontologia ci informa della sterminata quantità di forme viventi scomparse nel passato, eliminate da una selezione spietata. Intesa in questo senso, cioè come testimone di determinate condizioni ambientali presenti o passate, ogni forma di vita è un "indicatore" di quelle condizioni e di quel periodo.

Negli ultimi decenni, la definizione di indicatore biologico, o bioindicatore, è riferita soprattutto alle strutture biologiche in grado di indicare, attraverso correlazioni di causa-effetto tra risposte del bioindicatore e variazioni ambientali, un'alterazione della situazione ambientale, riconducibile a una probabile attività antropica, soprattutto di tipo negativo.

## Bioindicatori

Pur nella diversità di sfumature, quasi tutti gli Autori concordano nel paragonare il bioindicatore a una sorta di raffinato e complesso strumento in grado di evidenziare le variazioni ambientali.

Divergenze tra gli Autori si riscontrano invece riguardo alla natura del bioindicatore. Per alcuni questo è soprattutto un organismo, normalmente identificato a livello di specie, o a livelli sistematici sovraspecifici (genere, famiglia) ovvero a livelli sistematici subspecifici (sottospecie o, più frequentemente, *cultivar* e cloni); per altri, anche le popolazioni, le comunità o il paesaggio, nel loro strutturarsi nel tempo e nello spazio, possono essere assunti come bioindicatori; infine, per altri Autori ancora, il ruolo di indicatore biologico può essere svolto anche da parti del corpo di un organismo. Ovviamente, dalla diversa interpretazione della natura del bioindicatore discende anche il diverso modo di definire le risposte da considerare come segnali utili per la valutazione biologica.

In questo libro viene presa come riferimento la definizione di bioindicatore proposta da Iserentant e De Sloover (1976): "organismo o sistema biologico usato per valutare una modificazione – generalmente degenerativa – della qualità dell'ambiente, qualunque sia il suo livello di organizzazione e l'uso che se ne fa. Secondo i casi il bioindicatore sarà una comunità, un gruppo di specie con comportamento analogo (gruppo ecologico), una specie particolarmente sensibile (specie indicatrici



ce), oppure una porzione di organismo, come organi tessuti cellule o anche una soluzione di estratti enzimatici". Altri Autori hanno ripreso, sviluppato e riformulato tale definizione, tuttora ampiamente accettata dalla letteratura scientifica. Date le finalità del libro, non è questa la sede per svolgere un discorso su tali temi, tuttavia con la citazione sopra riportata si intende recuperare una definizione "storica", sostanzialmente corretta.

I requisiti di un buon bioindicatore variano con la natura dello stesso, con il tipo di risposta che è in grado di esprimere, con il tipo e la durata dell'alterazione ambientale che si intende rilevare.

Nei capitoli che seguono i diversi specialisti elencano e valutano tali aspetti in ragione del tipo di bioindicatore considerato. Comunque sia, un parametro irrinunciabile è l'accertata sensibilità nei confronti di una azione perturbatrice, chiaramente identificata rispetto a tutta una serie di stress ai quali l'indicatore è costantemente sottoposto (tabella 1); sensibilità che può esprimersi con un'ampia gamma di risposte: alterazione biochimica e fisiologica, disturbo dei bioritmi, modificazione anatomico-morfo-

<b>Cause biotiche</b>	
	<i>infezioni</i> <i>parassiti</i> <i>competizione</i>
<b>Cause abiotiche</b>	
	<i>temperatura</i> alta bassa (freddo, gelo)
	<i>acqua</i> poca troppa
	<i>radiazione</i> IR visibile UV ionizzanti
	<i>sostanze chimiche</i> molecole inquinanti sali gas tossici fitofarmaci erbicidi
	<i>agenti fisici</i> pressione atmosferica e vento rumore magnetismo e flusso elettrico sottrazione di spazio e distruzione di ambienti

Tabella 1 - Principali cause di stress degli organismi viventi.

logica, variazione della composizione della biocenosi per la morte degli individui e delle specie sensibili, fino alle trasformazioni territoriali che hanno diretti effetti sul paesaggio, sulle sue forme e sul suo funzionamento.

<b>Tempo / Grado di organizzaz. biologica</b>	<b>ore/giorni</b>	<b>giorni/settimane</b>	<b>mesi/anno</b>
ecosistema	non rilevabile	prime deboli reazioni	cambiamenti nella abbondanza e qualità delle specie cambiamenti nei cicli cambiamenti nella produzione accumulo di inquinanti
organismo	clorosi necrosi  effetti sugli scambi gassosi alterazione di tessuti	clorosi necrosi  alterazione di tessuti  variazioni morfologiche accumulo di inquinanti deperimento di organi	deperimento riduzione della fertilità fino alla sterilità
cellula	attività enzimatiche alterate	attività enzimatiche alterate  concentrazione di metaboliti	cambiamenti nel metabolismo  cambiamenti negli scambi di energia  cambiamenti nei meccanismi di ossidoriduzione

**Tabella 2** - Matrice delle reazioni a un agente inquinante dei livelli di organizzazione biologica nel tempo.

Il tipo di risposta del bioindicatore varia in relazione al livello di organizzazione biologica del sistema assunto come bioindicatore e al tempo di esposizione alla causa che provoca lo stress e la conseguente risposta (tabella 2).

I tipi di bioindicatori, le modalità diversificate di risposta e le condizioni ambientali da rilevare permettono una vasta scelta di uso. I bioindicatori di basso livello di organizzazione biologica, sono soprattutto usati come sensori e con le me-

to di un vero e proprio strumento di rilevamento. I bioindicatori identificati con organismi di scarsa o nulla mobilità, selezionati in modo da avere un patrimonio genetico il più possibile uniforme per dare risposte omogenee agli stimoli ambientali, sono generalmente usati come test. I bioindicatori nati in natura, danno invece informazioni di massima che devono essere rilevate da un operatore adeguatamente addestrato, in quanto il segno di risposta potrebbe essere mascherato, esaltato o depresso dalla concomitante eventuale presenza di altre azioni più o meno occulte di stress ambientale non direttamente collegate con quella che si intende rilevare.

Infine, quando l'indicatore biologico si comporta anche da bioaccumulatore, perché accumula in parti vecchie o morte del suo corpo la sostanza inquinante, le informazioni deducibili possono essere anche di tipo storico.

## **Biovalutazione e misure strumentali**

L'interpretazione e valutazione della risposta del bioindicatore all'azione di disturbo ambientale che si intende rilevare rientra nelle procedure di biovalutazione.

Soprattutto quando si tratta di inquinamento e di alterazione degli ambienti, è legittimo fare un confronto tra biovalutazione e misure strumentali al fine di definire al meglio pregi, vantaggi ed eventuali possibilità di integrazione dei due metodi.

La biovalutazione differisce dalla misura strumentale, perché:

- fornisce stime indirette, che hanno una minore precisione e una minore oggettività delle misure dirette di tipo strumentale;
- la sua risposta non è selettiva, ma è mediata e sintetizza l'azione di tutte le componenti ambientali; per contro lo strumento di misura è selettivo e preciso, ma non è in grado di evidenziare gli effetti sinergici; in particolare la biovalutazione può evidenziare effetti combinati delle sostanze su più bioindicatori, consentendo valutazioni incrociate; operazione meno facile e sicuramente più dispendiosa se fatta con strumenti;
- il bioindicatore può sviluppare un buon grado di adattamento all'inquinamento, attraverso l'attivazione di barriere selettive, forme di inertizzazione, meccanismi di espulsione rapida delle sostanze tossiche, falsando il risultato della biovalutazione; gli strumenti di misura, se mantenuti efficienti, non subiscono variazioni nelle prestazioni;
- spesso le misure sono il risultato di una attività stagionale, mentre lo strumento può funzionare tutto l'anno;
- il bioindicatore risponde alle azioni di disturbo con reazioni diversificate per la diversa irritabilità biologica non solo dei gruppi sistematici, ma anche degli individui; lo stesso individuo può variare la sua risposta alle azioni di disturbo da periodo a periodo o da un anno all'altro; lo strumento di misura, correttamente tarato ed efficiente, è coerente nelle misure;
- permette di evidenziare gli effetti di più tipi di inquinanti, segnalano anche la presenza di sostanze inquinanti nuove; gli strumenti rilevano solo le sostanze per le quali sono stati progettati;
- chi raccoglie il dato deve avere una adeguata preparazione; mentre la semplice let-

tura del dato strumentale in genere richiede una sommaria conoscenza tecnica dello strumento;

- il bioindicatore può essere vantaggiosamente usato per valutare parametri non misurabili strumentalmente, come la complessità biologica, il valore ecologico, il valore estetico, la qualità e il senso (progressivo o regressivo) delle trasformazioni dinamiche delle comunità, gli effetti delle azioni di cura degli ecosistemi, i processi di accumulo del danno che portano a manifestazioni di deperimento del bioindicatore e alla scoperta di forme striscianti di inquinamento;
- è meno costosa del rilevamento strumentale e la sua economicità e speditezza di applicazione aumenta: con l'aumentare del territorio da rilevare, con il protrarsi del tempo di indagine, negli studi di gradiente, quando la sorgente dell'alterazione o dell'inquinamento è puntiforme, negli studi su vasta scala, quando l'inquinamento è diffuso;
- pur con tutte le precauzioni del caso, la biovalutazione si presta anche a efficaci applicazioni didattiche e di informazione della popolazione.

I due tipi di rilevamento sono alternativi nei metodi, ma non nei fini, perché si integrano: la biovalutazione permette indagini estensive più o meno empiriche e diffuse sul territorio, mentre la misura strumentale è pur sempre da integrare in una rete di punti di rilevamento; conseguentemente, la biovalutazione rappresenta una sorta di semeiotica ambientale che permette di indirizzare e guidare l'approfondimento strumentale, facendo risparmiare tempo e denaro, consentendo indagini mirate e più oggettive.

## Biomonitoraggio

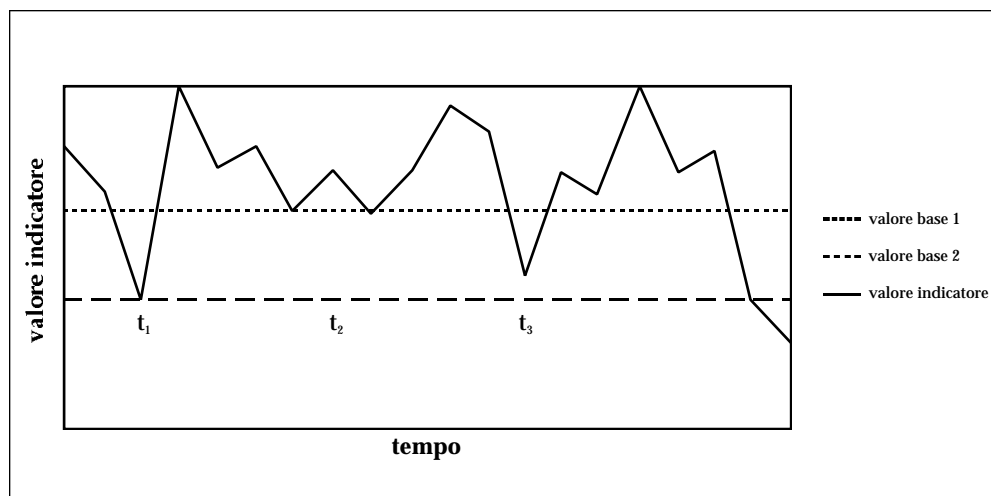
Il monitoraggio affascina. Dallo sport al mondo degli affari, dalla valutazione dello stato di salute di persone e di popoli a quella della qualità della vita, dalla bontà di un prodotto ai sondaggi sull'opinione dei cittadini, non vi è settore che sfugga alla tentazione di fare classifiche e di controllare come queste si modificano nel tempo. In talune attività sono ormai consolidati certi indicatori universali, come per esempio il Prodotto Interno Lordo delle nazioni usato in macroeconomia; in altre attività, gli indicatori scelti per controllare l'evoluzione di fenomeni sociali, fisici, o biologici sono ancora opinabili e oggetto di dibattito.

Il monitoraggio è un processo di sistematica raccolta di dati qualitativi e quantitativi fatta con una procedura standardizzata in un periodo di tempo, necessario a raccogliere i dati previsti. La biovalutazione protratta nel tempo, secondo metodiche definite e con scopi precisi di controllo dello stato dell'ambiente, soprattutto per quanto attiene le azioni di sostanze inquinanti, viene detta biomonitoraggio. Esso tende a verificare le deviazioni da una situazione che si ritiene normale o di base, stabilendo i limiti di accettabilità dei risultati; esso si distingue in questo dalla semplice sorveglianza, che prevede pure un programma esteso nel tempo di osservazioni qualitative e quantitative, ma che mira solo a valutare se avvengono variazioni, senza formulare giudizi sulle stesse.

Le fasi del monitoraggio sono:

1. precisa definizione dell'obiettivo;
2. selezione degli indicatori chiave e del segnale che si vuol cogliere in dipendenza

- degli obiettivi prefissati e la conseguente definizione di una scala di valori di riferimento;
3. selezione di un approccio praticabile, per non intasare di dati il sistema, permettendogli tuttavia di apprendere dai dati stessi, ponendo domande significative;
  4. disegno dei punti di controllo e organizzazione della rete di distribuzione territoriale del monitoraggio; la distribuzione spaziale dei bioindicatori deve essere tale da cogliere tutte le possibili sfumature del fenomeno e, nel contempo, ridurre a un numero minimo significativo le località sotto controllo;
  5. stesura di un piano esecutivo, con definizione dei tempi di raccolta dei dati e della durata dell'azione;



**Figura 1** - Ipotesi di andamento del valore di un indicatore biologico nel tempo (sull'asse delle y, l'incremento del valore è assunto come migliorativo dell'ambiente) e capacità del monitoraggio di cogliere dette variazioni in funzione del valore base assunto come soglia per il monitoraggio e della durata dell'azione di monitoraggio. Il valore base 2 è tranquillizzante, perché considera il valore dell'indicatore sempre al di sopra della soglia base. Il valore base 1 registra periodi di peggioramento al tempo  $t_2$  e di allarme ai tempi  $t_1$  e  $t_3$ , che potrebbero ingannare se la durata dell'osservazione si limitasse al tempo della crisi e non fosse sufficientemente estesa per registrare le fluttuazioni nel tempo del valore dell'indicatore (da Hellowell, 1991, modificato).

6. raccolta e interpretazione dei dati o dei campioni, determinazione del valore predittivo dei dati raccolti e definizione di una soglia limite oltre la quale prevedere eventuali decisioni operative di intervento in corso di monitoraggio (figura 1);
7. valutazione finale dell'azione e formulazione di proposte operative per migliorare la situazione.

Per la fase 2, valgono le seguenti osservazioni:

- indicatori plurimi sono preferibili, ma non è da sottovalutare il valore indicatore di specie isolate;

- il bioindicatore deve essere affidabile e avere un buon potere discriminante rispetto agli stimoli che deve monitorare;
- il biomonitoraggio è tanto più efficace e speditivo, quanto più il bioindicatore presenta facilità di identificazione, di delimitazione spaziale, di reperibilità e di campionamento;
- se si usano bioindicatori test posti in località diverse del territorio è necessario prevedere difese contro i vandalismi, i parassiti o altri nemici naturali e prevedere anche interventi di cura, per esempio innaffiature, se trattasi di piante in vaso o trapiantate.

Per la fase 5, il piano d'azione deve tener conto dell'eventuale dinamismo interno del bioindicatore, dei suoi bioritmi e della sua velocità di risposta allo stimolo sotto monitoraggio e delle eventuali fluttuazioni nel tempo del fattore di stress (figura 1).

Per la fase 6, valgono le seguenti osservazioni:

- i metodi di campionamento devono essere standardizzati con la preparazione di precisi protocolli di rilevamento e con addestramento del personale addetto;
- va verificata la modalità di uso di eventuali vecchi dati disponibili;
- si deve valutare se è il caso di operare monitoraggi cruenti (con mutilazione o morte del bioindicatore) ovvero solo monitoraggi stressanti (quali la cattura di animali), o preferire i monitoraggi incruenti, di sola osservazione;
- il campionamento deve essere rappresentativo della realtà che vuole descrivere e deve avvicinarsi al dato reale;
- deve essere messa a punto la tattica di campionamento, con predeterminazione del numero di campioni e delle caratteristiche del materiale da campionare;
- se la fonte di inquinamento è localizzata, il bioindicatore deve essere posto in condizioni di ecologia uguali, ma di concentrazione di inquinanti diversa.

## Prospettive del biomonitoraggio

Accettata la necessità di quadri conoscitivi di base, la scelta degli strumenti ottimali per la stima e il monitoraggio dell'ambiente è funzione dell'avanzamento dello stato delle ricerche delle varie discipline e dell'applicabilità reale delle soluzioni proposte e dell'informazione che l'indicatore dà.

La ricerca è aperta in svariati settori e su più fronti: dallo studio della biologia dell'indicatore e della sua risposta all'inquinamento alla "costruzione" di organismi o di strutture *ex novo*, dalla messa a punto di indici sintetici di valore il più vasto possibile al miglioramento del metodo di campionamento, dalla integrazione e correlazione del dato strumentale con quello biorilevato al miglioramento delle conoscenze tassonomiche e biogeografiche, dal miglioramento delle conoscenze ecologiche alla individuazione degli organi bersaglio più sensibili e al chiarimento del ruolo della variabilità genetica.

Come dimostrano i capitoli del libro, sono praticabili metodi e ricerche molto promettenti, ma lo studio e l'uso dei bioindicatori è lontano dall'essere esaustivo. Questo non significa che si tratti di un'utopia. Ci basta applicare, magari empiricamente, quanto si conosce, utilizzando tutte le risorse che la natura ci offre, anche se imperfette. D'altro canto, anche la specie uomo è un bioindicatore e un bioaccumulatore, da millenni studiata e da un numero enorme di ricercatori valutata, eppure l'eziologia di certe patologie e l'interpretazione di certi comportamenti resta misteriosa.

## Bibliografia citata

**Goldsmith, F. B.** (ed.) 1991. *Monitoring for Conservation and Ecology*. London.

**Hellawell, J. M.**, 1991. Development of a rationale for monitoring. In: **Goldsmith, F. B.** (ed.) 1991, op. cit.

**Iserentant, R. e De Sloover, J.**, 1976. Le concept de bioindicateur. *Mem. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 7, 15-24.

**Mckenzie, D. H., Hyatt, D. E. e Mcdonald V. J.** (ed.) 1990. *Ecological indicators*. Voll. 1 e 2.





# Capitolo 1

## Bioindicatori a livello subcellulare

Maurizio Cocucci, Francesco G. Albergoni,  
Maria Teresa Marrè e Alberto Rivetta

## **1.1 Processi fisiologici e biochimici utilizzati come biosensori per l'ambiente** - Maurizio Cocucci e Alberto Rivetta

### **1.1.1 Introduzione**

Negli ultimi anni, la possibilità che sostanze tossiche di diversa natura possano entrare nella catena alimentare ha raggiunto livelli elevati soprattutto a causa della loro aumentata immissione nella biosfera. Tale problema è stato affrontato in diversi modi tra cui, a monte, il contenimento della diffusione di sostanze tossiche nell'ambiente e, a valle, il tentativo di sviluppo di tecnologie per la decontaminazione.

D'altro canto, risulta sempre più impellente la necessità di poter monitorare l'introduzione di sostanze inquinanti organiche e inorganiche nell'ambiente, in particolare quando il processo è nelle sue fasi iniziali. In un primo momento si è cercato di sviluppare metodi per la misura diretta della concentrazione dei più diversi tipi di inquinanti in differenti matrici quali suolo, acqua e aria, utilizzando metodologie analitiche molto laboriose e costose che spesso non risultano particolarmente adatte a restituire informazioni interessanti sulla qualità dell'ambiente anche futura.

### **1.1.2 Sistemi biologici per il biomonitoraggio**

Solo ultimamente l'attenzione è stata rivolta alla valutazione del possibile utilizzo di sistemi biologici per il monitoraggio (biomonitoraggio) ambientale. Rispetto ai metodi tradizionali, l'utilizzo di un sistema biologico ha l'enorme vantaggio di essere in grado di valutare l'effettiva tossicità dell'inquinante su un organismo vivente anche in matrici molto complesse e quindi di essere un buon indice della reale possibilità che una sostanza inquinante diventi pericolosa per la salute dell'uomo (Decaprio, 1997). Infatti, un tale tipo di procedere tiene conto dell'effettiva disponibilità della sostanza tossica nel suo ambiente naturale cioè in presenza di sostanze che possono aumentarne o diminuirne l'attività e inoltre un tale sistema di monitoraggio è in grado di valutare eventuali sinergie tra più sostanze tossiche. Quest'ultima osservazione, considerato che l'inquinamento ambientale raramente è dovuto alla presenza di una singola specie chimica, appare di particolare interesse.

#### *Metodi di biomonitoraggio*

Certamente, uno dei più semplici metodi di biomonitoraggio è la valutazione del maggior o minor grado di sopravvivenza o di crescita di un organismo o di altri indici di tossicità in presenza di un inquinante, principio su cui si basano i test di tossicità. Tuttavia, i risultati che si possono ottenere utilizzando tale metodo danno scarse informazioni sul tipo di inquinante e sulla concentrazione a cui l'organismo è sottoposto. Inoltre, non è facile disporre di organismi bioindicatori particolarmente sensibili, capaci di fornire informazioni interessanti sull'ambiente o substrato in esame. Un altro metodo di biomonitoraggio spesso utilizzato in questi ultimi anni, è la misura diretta di sostanze inquinanti assorbite e accumulate da particolari organismi viventi o in parti di essi. Nonostante abbia fornito risultati interessanti, tale metodo presenta alcuni limiti quali la disponibilità di organismi accumulatori e i costi elevati dovuti alle complesse modalità di estrazione e parziale purificazione spesso necessarie prima dell'analisi tramite metodi chimico-fisici quali gas cromatografia, spettrometria di massa ecc.

### 1.1.3 Risposte biochimiche e fisiologiche come bioindicatori di inquinanti

Un altro possibile metodo di biomonitoraggio, a tutt'oggi ancora in fase sperimentale, è quello che utilizza come bioindicatori le risposte di organismi viventi alla presenza di sostanze tossiche (Welch, 1993). Queste risposte consistono in particolari adattamenti morfologici e funzionali dipendenti dall'assorbimento e dalla traslocazione della sostanza tossica da parte dell'organismo. Tra l'ampia gamma di risposte, particolarmente interessanti risultano quelle a livello sub-cellulare, vale a dire le modificazioni di processi biochimici e fisiologici provocate dall'azione diretta o indiretta della sostanza tossica su attività biochimiche e funzioni fisiologiche dell'organismo. Queste modificazioni sono individuabili misurando le variazioni di parametri legati ai meccanismi di tossicità e di detossificazione (livelli di alcuni metaboliti, attività enzimatiche ecc.) e possono essere sfruttate per mettere a punto sistemi di biomonitoraggio. È interessante far notare che l'ampio spettro di parametri bioindicatori, potenzialmente disponibili da numerosi eventi biochimici e fisiologici, potrebbe permettere di rilevare la presenza di sostanze inquinanti con diverso grado di specificità (intere classi di inquinanti o sostanze molto specifiche).

#### *Vantaggi e potenzialità dei bioindicatori*

L'utilizzo di indicatori biochimici e fisiologici per monitorare l'inquinamento di acqua, aria e suolo presenta numerose potenzialità che saranno di seguito indicate e rappresenta un metodo alternativo alla misura diretta di un inquinante. Esso consiste nel trovare una elevata correlazione tra i livelli noti di sostanza tossica e le variazioni (aumento, diminuzione) di un parametro biochimico o fisiologico. Risulta chiaro che per ottenere valutazioni non esclusivamente qualitative e per evitare sovra- e sotto-stime è necessario che la calibrazione del "bio-dosaggio" preveda la determinazione delle risposte massime e minime del bio-dosaggio e del dosaggio tramite misura diretta, che permettono l'eventuale applicazione di fattori di correzione. Inoltre, è necessario determinare la cinetica delle variazioni del parametro in funzione del tempo, per poter scegliere il tempo di esposizione più adatto. Infatti, a tempi relativamente lunghi, le variazioni del parametro bioindicatore potrebbero non essere correlabili con i livelli di inquinante, sia per problemi di tossicità, sia perché il parametro può subire variazioni nel tempo e con lo stadio di sviluppo dell'organismo. L'utilizzo di parametri biochimici e fisiologici come bioindicatori può rappresentare in molti casi un metodo a elevata sensibilità e quindi uno strumento molto utile per la precocità nell'individuazione di situazioni incipienti di inquinamento; può ridurre o eliminare completamente il complesso problema della messa a punto del metodo di estrazione dell'inquinante dalla matrice in cui è contenuto che in certi casi è molto complessa (si pensi per esempio al suolo); può consentire di monitorare in modo continuo l'evoluzione di condizioni di degrado ambientale e di valutare la possibilità reale di recupero di siti già fortemente contaminati; può risultare molto utile per determinare il grado di inquinamento di aree molto estese; in particolare, l'uso delle piante come bioindicatori può permettere di valutare la reale fitotossicità dei suoli che sono i substrati per la crescita delle piante e di ottenere una stima della velocità di introduzione di sostanze tossiche nella catena alimentare; può consentire di valutare, anche ad ampio spettro, il grado di contaminazione di sottoprodotti agricoli (per esempio deiezioni) o industriali potenzialmente reimmisibili nel ciclo produttivo.

*Limiti dei bioindicatori*

Da tutte queste considerazioni si evince che, nonostante l'utilizzo dei bioindicatori nell'accezione sopra riportata sia tuttora poco diffuso nella pratica di monitoraggio ambientale, la sua applicazione potrebbe ridurre notevolmente i costi del monitoraggio effettuato con metodi tradizionali. Tuttavia, l'utilizzo di parametri biochimici e fisiologici come bioindicatori di inquinamento presenta anche delle limitazioni tra cui il loro grado di specificità, il tipo di informazioni che possono fornire e la reale applicabilità a condizioni naturali (per esempio di campo). Le variazioni di tali parametri che possono misurare la risposta a un inquinante generalmente risultano tanto meno specifiche quanto più coinvolgono processi legati a importanti funzioni fisiologiche (omeostasi, respirazione, fotosintesi ecc.), poiché alcune di queste funzioni possono essere modificabili da più di un fattore di stress esogeno, ma anche endogeno (per esempio ormoni). Quindi, tali variazioni potrebbero essere aspecifiche anche perché risultato di una sovrapposizione di risposte e non di una risposta primaria alla presenza di un inquinante. È necessario inoltre verificare la specificità del parametro bioindicatore in esame analizzando le risposte dell'organismo a stress di diversa natura, verificando anche in questi casi la variazione del parametro. Comunque, può essere utile valutare contemporaneamente due parametri bioindicatori. Quando risultano adatte, le variazioni dei suddetti parametri devono essere valutate in relazione alla capacità dell'organismo di escludere o detossificare la sostanza tossica, poiché in molti casi tali variazioni sono il risultato dell'attivazione di meccanismi fisiologici che possono entrare in gioco in misura diversa a seconda della dose di inquinante e del tempo di esposizione. Tale situazione può causare una elevata tossicità per l'organismo e di conseguenza invalidare l'informazione fornita dal sistema bioindicatore. È necessario quindi che, soprattutto nella fase sperimentale di messa a punto del sistema, i parametri bioindicatori siano valutati parallelamente a indici dello stato di salute dell'organismo (crescita, respirazione, fotosintesi, contenuto in clorofilla, stato nutrizionale, traspirazione ecc.). La valutazione dei limiti dell'utilizzo di variazioni di parametri bioindicatori ambientali in condizioni di campo necessita di alcune considerazioni. Innanzitutto la stagionalità può ridurre il tempo di utilizzo degli organismi durante l'arco dell'anno. Generalmente, in un ambiente naturale, numerosi inquinanti anche di natura chimica molto diversa sono presenti contemporaneamente e possono dar luogo a effetti sinergici, facendo sì che le variazioni del parametro in esame non siano più rappresentative dei livelli della sostanza inquinante. Inoltre, se le variazioni di un parametro sono valutate in popolazioni di organismi già presenti nell'ambiente, il loro utilizzo come bioindicatori può essere possibile solo se si conosce il grado di adattamento all'inquinante già presente in tali popolazioni (Ernst *et al.*, 1994). Questo adattamento può essere il risultato di una relativamente recente esposizione degli organismi a elevate concentrazioni di una sostanza già presente a basse concentrazioni nell'ambiente (per esempio metalli pesanti) oppure può essersi evoluto in risposta a sostanze introdotte dall'uomo solo recentemente (per esempio erbicidi). Tuttavia l'adattamento allo stress ambientale può anche essere il risultato dell'esposizione per tempi lunghissimi. Quindi, le differenze nell'adattamento a inquinanti di popolazioni di organismi determineranno la validità di un parametro bioindicatore; l'efficacia di un parametro bioindicatore viene ridotta con l'aumentare dell'adattamento (Ernst *et al.*, 1994; Meharg, 1994). Comunque, anche utilizzando organismi che non sono pre-

senti spontaneamente nell'ambiente indagato, l'uso di parametri bioindicatori necessita della non semplice individuazione di una situazione di "controllo", vale a dire un ambiente presumibilmente sano e con caratteristiche molto simili a quelle dell'ambiente in degrado. In alternativa potrebbero essere utilizzati organismi con sensibilità differenziale all'inquinante, in grado di dare risposte diverse nel medesimo ambiente contaminato.

#### 1.1.4 Come individuare i bioindicatori: criteri di scelta

Risulta evidente che l'individuazione di nuovi parametri biochimici e fisiologici da utilizzare come bioindicatori, anche molto specifici, richiederà inevitabilmente l'approfondimento dello studio dei meccanismi biochimici e fisiologici che determinano una particolare sensibilità e tolleranza a inquinanti. Alcuni tasselli di questi complessi e integrati meccanismi sono in parte conosciuti e in alcuni casi lo sforzo di applicazione a problemi di monitoraggio ambientale è stato effettuato. Qui di seguito ne saranno descritti alcuni con lo scopo di individuare quali possano essere i processi biochimici e fisiologici a cui fare riferimento, ponendo particolare attenzione agli aspetti applicativi e alle potenzialità di sviluppo.

Innanzitutto il criterio di scelta degli organismi più adatti al biomonitoraggio. Nel caso degli organismi vegetali può risultare interessante utilizzare quelli che mostrano meno barriere di selettività all'entrata nelle cellule di sostanze tossiche che in questo modo possono esplicare la loro azione con maggiore efficienza. Per esempio nei licheni, organismi che presentano bassa differenziazione dei tessuti e non hanno alcune delle barriere normalmente presenti nelle piante superiori (cuticola, stomi, barriere del tessuto corticale ecc.), sono stati riscontrati elevati livelli di diversi inquinanti quali i metalli pesanti (Richardson, 1992). Nonostante ciò, anche le piante superiori possono risultare adatte, poiché la selettività dei sistemi di trasporto a livello della membrana plasmatica per alcune sostanze inquinanti può essere bassa. A questo proposito è stato suggerito che il trasporto attraverso il plasmalemma di alcuni elementi tossici come Cd, Cs, Cr e As sia mediato dai sistemi di trasporto di Ca, K, solfato e fosfato, rispettivamente (Zaccheo *et al.*, 1985; Meharg, 1994; Rivetta *et al.*, 1997; Sacchi *et al.*, 1997).

#### 1.1.5 Bioindicatori di inquinanti atmosferici

##### Ozono

Numerose evidenze indicano che in piante esposte a ozono ( $O_3$ ) i livelli delle forme di ossigeno attivate (per esempio radicali superossido) aumentano e che i sistemi enzimatici detossificanti di tali forme quali le superossido dismutasi (SOD), l'ascorbico perossidasi, la deidroascorbico reductasi e la glutatione reductasi giocano un ruolo importante nella detossificazione così come la regolazione dei livelli delle principali molecole antiossidanti quali acido ascorbico e deidroascorbico, glutatione ridotto e ossidato, poliammine (Luwe *et al.*, 1993; Kangasjärvi *et al.*, 1994). Sia la variazione dei livelli degli antiossidanti sia l'individuazione di particolari forme isoenzimatiche di enzimi detossificanti potrebbero rilevarsi *markers* molto specifici della presenza di  $O_3$ . A tale scopo potrebbe essere utile utilizzare le varietà di piante di tabacco sensibili (Bel W3) e insensibili (Bel B) all' $O_3$ , già largamente impiegate per chiarire molti aspetti fisiologici delle risposte dei vegetali all'ozono.

### Ossidi di azoto

Altre sostanze tossiche possono essere presenti nell'aria e tra queste gli ossidi di azoto che, quando assorbiti dalle piante, possono modificare il metabolismo dell'azoto. Studi condotti su piante di pino (*Pinus sylvestris*) con differente livello di deposizioni umide suggeriscono che le variazioni dei livelli di glutamina e arginina negli aghi possono essere utili bioindicatori dell'inquinamento da deposizioni azotate (Huhn *et al.*, 1996). Tuttavia tali differenze non sembrano essere significative per alberi di abete rosso (*Picea excelsa*) danneggiati e sani (Schmeink *et al.*, 1990). Un altro studio condotto in Germania su alberi di *Picea excelsa* con diverso grado di danno visibile ha suggerito che indicatori biochimici quali i livelli di clorofilla, amido, prolina, attività di fosfatasi acida e perossidasi potrebbero essere utilizzati per evidenziare uno stress generalizzato, ma difficilmente correlabili a uno specifico fattore di stress (Godbold *et al.*, 1993).

### Fluoro

È noto che alcune piante esposte a elevati livelli di fluoro sintetizzano fluoroacetil-CoA e lo convertono a fluorocitrato tramite il ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). Tale composto inibisce l'attività dell'enzima aconitasi bloccando il TCA e come risultato si ha l'accumulo di fluorocitrato (Ernst *et al.*, 1994). Va da sé che l'analisi dei livelli di fluorocitrato in piante posizionate in prossimità di potenziali sorgenti di emissione di fluoro potrebbe offrire una rapida e molto specifica applicazione pratica di questo bioindicatore in un contesto economico.

### Ammoniaca

Anche l'ammonio atmosferico (NH<sub>3</sub>) derivante da numerose fonti di origine antropica sta diventando un serio problema ambientale. L'NH<sub>3</sub> provoca non solo variazioni nel metabolismo dell'azoto nelle piante, ma influenza anche il loro bilancio acido-base. Utilizzando coloranti fluorescenti e sensibili al pH (piranina ed esculina) è stato possibile misurare le variazioni di pH citoplasmatico e vacuolare in foglie di piante C<sub>3</sub> (*Pelargonium zonale*) e C<sub>4</sub> (*Zea mays*, *Amaranthus caudatus*) esposte per 30 minuti a concentrazioni di NH<sub>3</sub> nell'aria da 1,3 a 8,3 μmoli NH<sub>3</sub> mole<sup>-1</sup> gas, alla luce o al buio e in presenza di diverse concentrazioni di CO<sub>2</sub> (Yin *et al.*, 1996). Tali variazioni potrebbero essere utilizzate per monitorare la presenza di NH<sub>3</sub> nell'atmosfera.

## 1.1.6 Bioindicatori di metalli pesanti: aria, acqua, suolo

### Fitochelatine

Per quanto riguarda le risposte delle piante ai metalli pesanti, alcune evidenze suggeriscono che le fitochelatine (Rauser, 1995), peptidi a basso peso molecolare, prodotti di una via biosintetica che consuma glutatione, ricchi in gruppi -SH e con la tipica struttura ( -Glu-Cys)<sub>n</sub>Gly (n=2-11), i cui livelli aumentano in presenza di alcuni metalli pesanti, potrebbero svolgere un ruolo importante nella detossificazione sequestrando e compartimentando l'eccesso di metallo pesante. L'induzione della sintesi di fitochelatine non è sotto il controllo trascrizionale, ma è basata sull'attivazione postrascrizionale dell'enzima fitochelatina sintasi. Studi condotti sulla diatomea *Thalassiosira weissflogii* hanno indicato che la concentrazione intracellulare di

fitochelatine in colture di laboratorio mostra una distinta relazione dose-risposta con la concentrazione di  $\text{Cd}^{2+}$  libero nel mezzo di incubazione ed è rilevabile anche quando l'attività dello ione è molto bassa, minore di 1 pM ( $0,112 \times 10^{-9}$  g/litro). In campioni naturali di *T. weissflogii* ottenuti in diverse stazioni marine di Massachusetts Bay e di Boston Harbor i livelli di fitochelatine (riferiti ai livelli di clorofilla a) nella frazione particolata sono simili a quelli misurati in colture di laboratorio a concentrazioni di  $\text{Cd}^{2+}$  libero picomolari e mostrano un andamento decrescente all'aumentare della distanza dalla costa (Ahner *et al.*, 1994). Inoltre, l'incubazione dei campioni naturali della diatomea in presenza di  $\text{Cd}^{2+}$  conferma l'induzione di fitochelatine da parte del metallo. Questi risultati supportano l'idea che le variazioni dei livelli di fitochelatine possano essere un valido indicatore quantitativo dello stress da metalli pesanti (in particolare il  $\text{Cd}^{2+}$ ), risultante dalla complessa interazione di metalli in tracce e chelanti naturali nelle acque marine. È interessante notare che in questo caso il parametro bioindicatore è estremamente sensibile.

I metalli pesanti sembrano essere anche implicati nel fenomeno di degrado delle foreste (*forest decline*) negli Stati Uniti e in Europa a causa della loro presenza nelle deposizioni, ma fino a ora non esiste evidenza diretta di un legame fisiologico tra danno degli alberi ed esposizione ai metalli. In un altro studio recente, i livelli di fitochelatine sono stati utilizzati come bioindicatori specifici dell'esposizione a metalli pesanti in condizioni naturali. Infatti, i livelli di fitochelatine in aghi di *Picea rubens*, una specie in declino, sono più elevati che in quelli di *Abies balsamea*, una specie che non lo è. Inoltre, la concentrazione di tali peptidi aumenta con l'altitudine che a sua volta segue l'andamento del *forest decline* e aumenta nelle zone di foresta in cui il grado del danno degli alberi risulta crescente (Gawel *et al.*, 1996). Anche se è necessario uno studio più diretto della relazione tra esposizione ai metalli pesanti, produzione di fitochelatine e crescita degli alberi per stabilire il grado di stress da metalli pesanti indicato dalla misura dei livelli di fitochelatine, questi risultati suggeriscono che i metalli sono probabilmente uno dei fattori che contribuiscono al degrado delle foreste del Nord-est degli Stati Uniti.

#### Attività enzimatiche

Sebbene il meccanismo preciso dell'interazione dei metalli pesanti con enzimi non sia sempre chiaro e il significato fisiologico dell'incremento delle attività enzimatiche e isoenzimatiche sia piuttosto speculativo, le variazioni di alcune di tali attività nelle piante possono essere utilizzate come criteri diagnostici per la valutazione della tossicità per le piante (fitotossicità) di suoli contaminati da metalli pesanti. La relazione quantitativa rilevata in piante di fagiolo (*Phaseolus vulgaris*) tra l'incremento dell'attività perossidasi e l'assimilazione di metalli pesanti, in combinazione con le variazioni metallo specifiche del *pattern* isoperossidasi, ha permesso di rilevare bassi livelli di fitotossicità da rame in suoli agricoli fertilizzati frequentemente con liquami suini (Van Assche *et al.*, 1990). Lo stesso bioindicatore è stato applicato anche per esaminare la fitotossicità dei suoli nelle zone limitrofe a fonderie ormai dismesse e in questo modo è stato mappato il grado di fitotossicità. Il bioindicatore ha rilevato che lo zinco è il principale agente fitotossico di quell'area (Van Assche *et al.*, 1990).

È noto che nelle piante numerosi geni appartenenti alla famiglia multigenica delle glutatione S-transferasi (GSTs) sono indotti da  $\text{Cd}^{2+}$  (Mauch *et al.*, 1993). Inoltre è stato

anche evidenziato che i livelli di GST25 e GST26 di frumento aumentano quando le piante sono in presenza di Cd<sup>2+</sup>. Utilizzando il gene *Bronze2* (*Bz2*) di mais che codifica una GST, responsabile del legame al glutatione dei precursori delle antocianine permettendone in tal modo il riconoscimento e la loro entrata nel vacuolo, un recente studio ha dimostrato che il Cd<sup>2+</sup> (da 10 a 100 µM esterno) attiva un sito d'inizio della trascrizione di *Bz2* e aumenta l'espressione del gene (livelli di mRNA), ma blocca in maniera specifica il processamento (*splicing*) del *Bz2*RNA e non ha effetto sull'attività enzimatica di *Bz2*. L'effetto del Cd<sup>2+</sup> sullo *splicing* del *Bz2*RNA non sembra essere il risultato di un effetto di inibizione generalizzato sullo *splicing* degli RNA messaggeri, ma è specifico. Inoltre lo *splicing* dell'introne *Bz2* non è influenzato da altre condizioni di stress che inducono l'espressione del gene *Bz2* quali acido abscissico, auxina e shock da freddo. Gli Autori ipotizzano che il Cd<sup>2+</sup> blocchi specificatamente lo *splicing* di *Bz2* per stimolare la produzione di una proteina alternativa *BZ2* durante lo stress da Cd<sup>2+</sup>: tale proteina troncata mancherebbe dell'attività GST codificata dal trascritto processato, ma manterrebbe la capacità di legare il glutatione e i composti che lo contengono come i complessi fitochelatina-Cd forse coadiuvando il sequestro di tali complessi nel vacuolo (Marrs *et al.*, 1997). I risultati descritti suggeriscono ancora una volta che, dal vasto panorama dei processi biochimici e fisiologici coinvolti nella risposta di un sistema biologico alla presenza di una sostanza tossica, è certamente possibile individuare parametri bioindicatori anche molto complessi, ma con elevato grado di specificità.

### 1.1.7 Esperienze: tioli acido-solubili come bioindicatori di metalli pesanti nel suolo

Nell'ambito del Progetto "Effetti dell'inquinamento sui sistemi agro-forestali: tecniche biologiche di monitoraggio e recupero" finanziato dalla Fondazione Lombardia per l'Ambiente, e in particolare all'interno dell'Unità Operativa "Uso di sistemi biologici per il controllo dell'inquinamento dei suoli e fitosalubrità" (prof. M. Cocucci) è stato affrontato lo studio delle risposte delle piante alla presenza di inquinanti, in particolare di metalli pesanti, con lo scopo di individuare parametri biochimici e fisiologici bioindicatori. Di seguito saranno riportati alcuni dei risultati ottenuti.

L'attenzione è stata soprattutto rivolta a valutare se le variazioni dei livelli dei tioli acido-solubili nelle piante possano essere utilizzate come parametri bioindicatori della presenza di Cd<sup>2+</sup>, preso come modello di inquinante, nel suolo. È noto infatti che il livello di tali molecole a basso peso molecolare contenenti gruppi -SH (glutatione, cisteina ecc.) incrementa fortemente in piante incubate in presenza di metalli pesanti. Inoltre, un forte accumulo di tioli è stato spesso correlato all'attivazione di vie metaboliche coinvolte nella detossificazione da numerosi inquinanti. La scelta della valutazione delle variazioni dei livelli di tioli acido-solubili è stata suggerita anche dal fatto che tale parametro bioindicatore potrebbe risultare molto utile per una applicazione pratica, in quanto relativamente facile da determinare. L'estrazione e il dosaggio dei tioli acido-solubili erano condotti secondo il metodo di Ellman modificato, che ha il vantaggio di essere molto semplice e prevede l'omogenazione a freddo del tessuto in acido tricloroacetico e l'immediato dosaggio colorimetrico con acido ditionitrobenzoico. Inizialmente si è ritenuto opportuno operare in ambiente controllato per verificare la validità di questo sistema e il parametro bioindicatore è stato valutato anche in



relazione a parametri di crescita della pianta. Sono state utilizzate tre specie erbacee coltivate, ravanello (*Raphanus sativus*), lattuga (*Lactuca sativa*) e loietto (*Lolium perenne*), normalmente impiegate nei test di rilevamento della presenza di metalli pesanti (Terrestrial plants, Growth Test, OECD). L'incremento di peso fresco di assi embrionali di semi di ravanello incubati per 24 h in presenza di concentrazioni crescenti di  $\text{CdSO}_4$  (1, 3, 10, 30, 100, 300  $\mu\text{M}$ ) era significativamente ridotta a partire da  $\text{Cd}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$ . Nonostante il livello di  $\text{Cd}^{2+}$  negli assi embrionali aumentasse considerevolmente, il livello dei tioli acido-solubili non era influenzato in tale periodo, anche a concentrazioni di  $\text{Cd}^{2+}$  inibenti la crescita (tabella 1.1).

Tempi e condizioni di germinazione	Peso fresco (g/100 emb.)	Tioli ( $\mu\text{mol}/100$ emb.)	$[\text{Cd}^{2+}]_i$ (nmol/100 emb.)
0h	0,230 $\pm$ 0,005	0,23 $\pm$ 0,01	5 $\pm$ 0,5
24h (controllo)	0,430 $\pm$ 0,017	1,26 $\pm$ 0,17	7 $\pm$ 1,1
10 M $\text{Cd}^{2+}$	0,438 $\pm$ 0,017	1,29 $\pm$ 0,03	44 $\pm$ 6,1
30 M $\text{Cd}^{2+}$	0,436 $\pm$ 0,010	1,23 $\pm$ 0,15	135 $\pm$ 5,1
100 M $\text{Cd}^{2+}$	0,380 $\pm$ 0,008	1,27 $\pm$ 0,04	439 $\pm$ 15,3
300 M $\text{Cd}^{2+}$	0,263 $\pm$ 0,012	0,87 $\pm$ 0,06	1167 $\pm$ 64,3

**Tabella 1.1** - Effetto del  $\text{Cd}^{2+}$  sull'incremento di peso fresco, sul livello dei tioli acido-solubili e sul contenuto di  $\text{Cd}^{2+}$  in assi embrionali di semi di ravanello. I semi detegumentati erano incubati per 24h in un bagno termostato a 26°C in un mezzo contenente Mes-BTP (pH 6) (controllo) e  $\text{CdSO}_4$  alle concentrazioni indicate. Ai tempi indicati gli assi embrionali erano separati dai cotiledoni, pesati e il livello dei tioli acido-solubili era determinato utilizzando il reagente di Ellman. I livelli di  $\text{Cd}^{2+}$  negli assi embrionali erano misurati tramite spettrofotometria ad assorbimento atomico. I valori sono le medie  $\pm$ SE di sette esperimenti condotti in triplicato.

Un forte incremento del livello dei tioli si osserva invece in plantule di ravanello e lattuga cresciute per tempi più lunghi (72 h) in presenza di  $\text{Cd}^{2+}$  (tabelle 1.2 a, 1.2 b).

(a) Ravanello	Tioli ( $\mu\text{mol}/100$ plantule)		Peso fresco (g/100 plantule)	
	radice	germoglio	radice	germoglio
Controllo	0,61 $\pm$ 0,01	1,44 $\pm$ 0,11	1,60 $\pm$ 0,11	3,20 $\pm$ 0,15
10 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$	0,74 $\pm$ 0,04	1,89 $\pm$ 0,12	1,45 $\pm$ 0,21	3,00 $\pm$ 0,20
30 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$	0,74 $\pm$ 0,05	2,83 $\pm$ 0,16	1,44 $\pm$ 0,25	2,85 $\pm$ 0,42
100 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$	1,22 $\pm$ 0,10	2,99 $\pm$ 0,12	1,60 $\pm$ 0,09	2,88 $\pm$ 0,35
300 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$	2,45 $\pm$ 0,16	3,94 $\pm$ 0,23	1,45 $\pm$ 0,28	2,90 $\pm$ 0,31

(segue)

(b) Lattuga	Tioli ( $\mu\text{moli}/100$ plantule)		Peso fresco (g/100 plantule)	
	radice	germoglio	radice	germoglio
Controllo	0,015 $\pm$ 0,002	0,12 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,02	0,82 $\pm$ 0,03
10 $\mu\text{M}$ Cd <sup>2+</sup>	0,023 $\pm$ 0,005	0,11 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,03	0,80 $\pm$ 0,03
30 $\mu\text{M}$ Cd <sup>2+</sup>	0,042 $\pm$ 0,007	0,15 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	0,77 $\pm$ 0,02
100 $\mu\text{M}$ Cd <sup>2+</sup>	0,077 $\pm$ 0,001	0,22 $\pm$ 0,03	0,25 $\pm$ 0,01	0,82 $\pm$ 0,02
300 $\mu\text{M}$ Cd <sup>2+</sup>	0,076 $\pm$ 0,001	0,47 $\pm$ 0,05	0,17 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,05

Tabelle 1.2 (a, b) - Effetto del Cd<sup>2+</sup> sull'aumento del peso fresco e sul livello dei tioli acido-solubili in plantule di (a) ravanello e (b) lattuga. I semi erano incubati in piastre Petri su carta da filtro in presenza di acqua distillata e CdSO<sub>4</sub> alle concentrazioni indicate. Dopo 72h di incubazione le plantule erano separate in radice e germoglio, pesate e il livello di tioli acido solubili era dosato spettrofotometricamente (A<sub>412</sub>) misurando il rilascio di nitrobenzoato dopo reazione dei gruppi -SH dei tioli con il ditionitrobenzoato (reagente di Ellman). I dati rappresentano i valori medi  $\pm$ SE di 5 esperimenti condotti in triplicato.

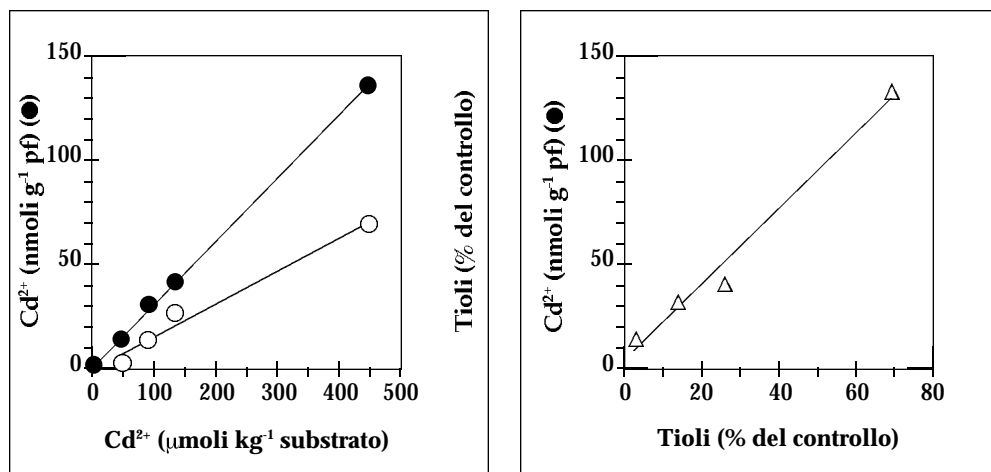
Tale incremento era più elevato nelle radici che nelle foglie di entrambe le specie. Un incremento del livello di tioli era presente anche in plantule intere di loiutto (dati non mostrati). Questi dati indicano che il Cd<sup>2+</sup> induce un incremento del livello dei tioli acido-solubili dipendente dal tempo di esposizione, dal tessuto della pianta, dalla sensibilità della specie al Cd<sup>2+</sup> e dal livello del catione nel mezzo esterno, suggerendo che tale incremento sia un utile parametro bioindicatore della presenza di Cd<sup>2+</sup>. La possibilità di utilizzare le variazioni dei livelli di tioli acido-solubili come bioindicatori fisiologici della presenza di Cd<sup>2+</sup> nel suolo è stata valutata utilizzando un substrato standard suolo-simile (sabbia 87%, argilla 9%, suolo secco all'aria 2%, torba 2%). A tale scopo, semi di ravanello erano seminati in vasi contenenti il substrato standard, aggiungendo soluzioni di CdSO<sub>4</sub> tali da raggiungere un contenuto di cadmio pari a 45, 89, 134 e 446  $\mu\text{moli}/\text{kg}$  di substrato secco. L'esperimento era condotto in condizioni costanti di temperatura, umidità, ciclo luce-buio, riportando giornalmente l'umidità del substrato al 60% della capacità idrica massima. I risultati ottenuti mostrano che il livello di tioli nella parte epigea di piante di ravanello cresciute su tale substrato per 12 giorni aumentava all'aumentare della concentrazione di Cd<sup>2+</sup> esterno. Parallelamente non si osservavano effetti tossici del Cd<sup>2+</sup> e parametri della crescita della pianta quali incremento di peso fresco, contenuto di clorofilla e proteine non variavano significativamente rispetto al controllo, anche alle più alte concentrazioni di Cd<sup>2+</sup> utilizzate (tabella 1.3).

Lo studio del contenuto di Cd<sup>2+</sup> e del livello di tioli nel germoglio delle piante cresciute in presenza di Cd<sup>2+</sup> (figura 1.1) mostra che il contenuto di Cd<sup>2+</sup> nei germogli delle piante aumentava con il livello del catione presente nel substrato e che tale incremento, che iniziava da 89  $\mu\text{moli}/\text{kg}$  di substrato secco di Cd<sup>2+</sup> esterno, era accompagnato da un incremento del livello dei tioli acido-solubili.

La figura 1.2 mostra un'elevata correlazione tra il livello dei tioli acido-solubili e i contenuti di Cd<sup>2+</sup> ( $r=0,996$ ). Le variazioni del livello dei tioli acido-solubili sono state

Condizioni di crescita	Tioli	Peso fresco	Clorofilla	Proteine
$Cd^{2+}$ $\mu\text{moli/kg}$ substrato standard	( $\mu\text{moli/g pf}$ )	(g/100 piante)	(mg/g pf)	(mg/g pf)
0 (Controllo)	$0,29 \pm 0,01$	$11,4 \pm 0,8$	$0,56 \pm 0,04$	$17,9 \pm 2,2$
45	$0,29 \pm 0,02$	$11,6 \pm 0,9$	$0,58 \pm 0,03$	$17,1 \pm 2,8$
89	$0,33 \pm 0,02$	$12,0 \pm 0,5$	$0,61 \pm 0,07$	$18,8 \pm 1,3$
134	$0,37 \pm 0,01$	$12,6 \pm 0,5$	$0,59 \pm 0,04$	$21,6 \pm 1,8$
446	$0,49 \pm 0,04$	$11,9 \pm 0,3$	$0,63 \pm 0,04$	$22,0 \pm 2,5$

**Tabella 1.3** - Effetto del  $Cd^{2+}$  sul livello dei tioli acido-solubili, l'incremento di peso fresco e il contenuto di clorofilla e proteine in piante di ravenello cresciute su un substrato standard suolo-simile. I semi erano seminati (20 semi/0,5 kg substrato) su un substrato standard contenente sabbia 87%, argilla 9%, suolo secco all'aria 2%, torba 2% e  $CdSO_4$  alle concentrazioni indicate. Dopo 12 giorni la parte epigea delle piante era raccolta, sciacquata brevemente con acqua distillata, pesata e il livello dei tioli acido solubili era determinato usando il reagente di Ellman. I contenuti di clorofilla totale erano determinati nella frazione solubile in acetone e il contenuto proteico nella frazione insolubile in acido degli estratti acidi usati per la determinazione dei tioli. I dati sono i valori medi  $\pm$ SE di tre esperimenti condotti in triplicato.



**Figure 1.1, 1.2** - Effetto del  $Cd^{2+}$  sull'incremento del livello dei tioli acido-solubili e sul contenuto di  $Cd^{2+}$  in germogli di piante di ravenello cresciute su un substrato standard suolo-simile e relazione tra incremento del livello dei tioli e contenuto di  $Cd^{2+}$  nei germogli. I semi erano seminati (20 semi/0,5 kg substrato) su un substrato standard contenente sabbia 87%, argilla 9%, suolo secco all'aria 2%, torba 2% e  $CdSO_4$  alle concentrazioni indicate. Dopo 12 giorni la parte epigea delle piante era raccolta, sciacquata brevemente con acqua distillata, pesata e il livello dei tioli acido solubili era determinato usando il reagente di Ellman. I contenuti di clorofilla totale erano determinati nella frazione solubile in acetone e il contenuto proteico nella frazione insolubile in acido degli estratti acidi usati per la determinazione dei tioli. I livelli di  $Cd^{2+}$  nei germogli erano determinati tramite spettrofotometria ad assorbimento atomico. I dati sono i valori medi di tre esperimenti condotti in triplicato e SE è  $<9\%$  per i tioli e  $<5\%$  per il  $Cd^{2+}$ .

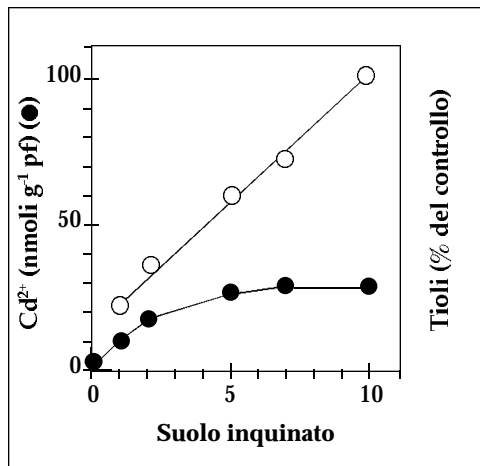
valutate anche su un suolo presumibilmente inquinato da metalli pesanti, provenienti dai cumuli di abbattimento fumi della ferriera Orsenigo di Figino Serenza (Varese). Le piante erano cresciute in presenza di quantità crescenti di tale suolo, seccato all'aria, setacciato a 2 mm e aggiunto al substrato standard in modo da ottenere una miscela omogenea. Nonostante l'incremento di peso fresco, i contenuti di clorofilla e di proteine non subissero sostanziali variazioni in presenza di percentuali crescenti di suolo inquinato aggiunto al substrato, il livello dei tioli aumentava progressivamente già a dosi di terreno inquinato dell'1% (tabella 1.4).

Condizioni di crescita	Tioli	Peso fresco	Clorofilla	Proteine
Cd <sup>2+</sup> $\mu$ mol/kg substrato standard	( $\mu$ mol/g pf)	(g/100 piante)	(mg/g pf)	(mg/g pf)
0 (Controllo)	0,29 $\pm$ 0,01	11,4 $\pm$ 0,8	0,56 $\pm$ 0,03	17,9 $\pm$ 1,1
1	0,35 $\pm$ 0,03	12,4 $\pm$ 0,3	0,60 $\pm$ 0,02	15,4 $\pm$ 1,1
2	0,39 $\pm$ 0,02	11,4 $\pm$ 0,7	0,57 $\pm$ 0,03	16,2 $\pm$ 1,2
5	0,46 $\pm$ 0,04	11,4 $\pm$ 0,8	0,58 $\pm$ 0,05	18,0 $\pm$ 1,6
7	0,50 $\pm$ 0,03	12,1 $\pm$ 0,9	0,57 $\pm$ 0,04	15,9 $\pm$ 2,2
10	0,58 $\pm$ 0,05	11,0 $\pm$ 1,0	0,52 $\pm$ 0,02	17,9 $\pm$ 1,8

**Tabella 1.4** - Effetto di un suolo inquinato sul livello dei tioli acido-solubili, incremento di peso fresco, contenuto di clorofilla e proteine in piante di ravanella. I semi erano seminati (20 semi/0,5 kg substrato) su un substrato standard contenente sabbia 87%, argilla 9%, suolo secco all'aria 2%, torba 2% e un suolo inquinato proveniente da un deposito di abbattimento fumi di una ferriera alle percentuali indicate (peso secco: peso secco). Dopo 12 giorni la parte epigea delle piante era raccolta, sciacquata brevemente con acqua distillata, pesata e il livello dei tioli acido-solubili era determinato usando il reagente di Ellman. I contenuti di clorofilla totale erano determinati nella frazione solubile in acetone e il contenuto proteico nella frazione insolubile in acido degli estratti acidi usati per la determinazione dei tioli. I dati sono i valori medi  $\pm$ SE di tre esperimenti condotti in triplicato.

Al crescere della percentuale di suolo inquinato, l'aumento lineare del livello dei tioli acido-solubili era accompagnato dall'incremento del contenuto di Cd<sup>2+</sup> fino a quantità di suolo del 5%. Oltre questo valore fino al 10%, la velocità di incremento del livello dei tioli non era influenzata, ma l'accumulo di Cd<sup>2+</sup> nei germogli non aumentava ulteriormente (figura 1.3).

Il confronto tra figura 1.1 e figura 1.3 indica che quando il contenuto di Cd<sup>2+</sup> nelle piante raggiungeva lo stesso livello (circa 30 nmoli/g peso fresco), l'incremento del livello dei tioli era più elevato nelle piante cresciute in presenza di suolo inquinato che in quelle cresciute in presenza di Cd<sup>2+</sup> esogeno. Questi dati suggeriscono che la variazione del livello dei tioli possa essere attribuita anche alla presenza di altri inquinanti (per esempio altri metalli pesanti oltre al Cd<sup>2+</sup>) e possa quindi rappresentare un parametro generale di sofferenza della pianta. Il fatto che il livello dei tioli acido-solubili aumenti in presenza di Cd<sup>2+</sup> o di suolo inquinato nel substrato standard anche se la



**Figura 1.3** - Effetto di un suolo inquinato sul - l'incremento del livello dei tioli acido-solubili e sul contenuto di  $Cd^{2+}$  nei germogli di piante di ravanello. I semi erano seminati (20 semi/ 0,5 kg substrato) su un substrato standard contenente sabbia 87%, argilla 9%, suolo secco all'aria 2%, torba 2% e suolo inquinato alle percentuali indicate. Dopo 12 giorni la parte epigea delle piante era raccolta, sciacquata brevemente con acqua distillata, pesata e il livello dei tioli acido solubili era determinato usando il reagente di Ellman. I contenuti di clorofilla totale erano determinati nella frazione solubile in acetone e il contenuto proteico nella frazione insolubile in acido degli estratti acidi usati per la determinazione dei tioli. I livelli di  $Cd^{2+}$  nei germogli erano determinati tramite spettrofotometria ad assorbimento atomico. I dati sono i valori medi di tre esperimenti condotti in triplicato e SE è <9% per i tioli e <5% per il  $Cd^{2+}$ .

crescita delle piante non sia significativamente influenzata, suggerisce che le variazioni del livello dei tioli acido-solubili sia un bioindicatore più sensibile di parametri di crescita, spesso utilizzati per i test di fitotossicità.

### 1.1.8 Bioindicatori di erbicidi

Bioindicatori per la presenza di erbicidi possono essere individuati analizzando le evidenze fisiologiche e genetiche raccolte negli ultimi 25 anni (Uotila *et al.*, 1995; Marrs, 1996; Rossini *et al.*, 1996) che indicano chiaramente che nella maggior parte dei casi il principale determinante della selettività di una pianta a un erbicida risiede nella capacità di metabolizzarlo e quindi detossificarlo. È noto infatti che le GSTs giocano un ruolo fondamentale nella selettività delle piante a numerosi erbicidi in quanto tali en-

zimi sono in grado di inattivarli mediante coniugazione al glutatione. Successivamente i coniugati vengono compartimentati nel vacuolo tramite un trasportatore che utilizza ATP e localizzato sul tonoplasto. Piante con livelli più elevati di attività GST riescono a crescere in presenza di erbicidi che invece eliminano specie suscettibili. Per esempio, le GSTs sono responsabili della tolleranza del mais ad Atrazina, Alachlor, Metolachlor ed EPTC sulfossido; la selettività della soia all'Acifluorena è dovuta a una più elevata velocità di coniugazione al glutatione rispetto alle specie infestanti.

Parametri bioindicatori di sostanze organiche inquinanti potrebbero essere ricercati anche tra i numerosi stadi metabolici che caratterizzano i meccanismi di detossificazione in piante e animali. Molti xenobiotici sono inattivati da reazioni (soprattutto ossidazione) catalizzate da enzimi appartenenti alle citocromo P450 monoossigenasi. Questi enzimi rendono gli xenobiotici più idrofili e quindi meno mobili e più suscettibili di ulteriore metabolizzazione, che include coniugazione secondaria, degradazione e compartimentazione (Kreuz *et al.*, 1996; Coleman *et al.*, 1997a). È stato mostrato che in piante di orzo la presenza di un antidoto di un erbicida (sostanza chimicamente molto simile all'erbicida, ma non tossica) induce l'attività sia dell'enzima detossificante sia del trasportatore vacuolare (Gaillard *et al.*, 1994). In piantule di *Vigna radiata*, l'applicazione esogena di 1-cloro-2,4-dinitrobenzene, un precursore del coniugato con il glutatione (DNP-GS) aumenta la capacità delle vescicole di membrana vacuolare isolate dagli ipocotili, di trasportare DNP-GS (Li *et al.*, 1995). Le variazioni delle caratteristiche cinetiche ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) di tale trasportatore coinvolto nella detossificazione di sostanze organiche tossiche sia nelle piante sia negli animali, rilevate per esempio con metodi fluorimetrici (per esempio monoclorobimano) potrebbero diventare interessanti parametri bioindicatori della presenza di xenobiotici nell'ambiente (Coleman *et al.*, 1997b). In uno studio recente è stata valutata la possibilità di utilizzare colture di epatociti di embrioni di gallo per misurare le concentrazioni equivalenti di 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD-EQ) in estratti preparati da uova di uccelli selvatici (*Larus argentatus* e *Ardea herodias*) contaminati con miscele complesse di bifenilipoliclorurati, dibenzo-p-diossine, dibenzofurani e altri idrocarburi aromatici alogenati. Il parametro biochimico indicatore utilizzato è la variazione dell'attività della citocromo P4501A, stimata usando la ethoxyresorufin-O-deethylase. I risultati così ottenuti indicano che esiste una buona correlazione ( $r^2=0,977$ ) tra le concentrazioni TCDD-EQ calcolate e quelle TCDD-EQ ottenute utilizzando il biosaggio (Kennedy *et al.*, 1996).

### 1.1.9 Prospettive future

#### *Metodi biotecnologici*

Per l'individuazione di bioindicatori molto specifici è sicuramente utile analizzare gli studi condotti sull'espressione di geni attivati da sostanze tossiche e in particolare sulla loro regolazione. Per esempio è stato evidenziato che, in protoplasti ottenuti dal mesofillo di foglie di tabacco, l'espressione del gene *parA* regolato dall'auxina è indotto da  $Cd^{2+}$  (25  $\mu M$ ) ma non da  $Cu^{2+}$  e tale differenza risiede nella struttura del suo promotore (Kusaba *et al.*, 1996). I risultati descritti in questo lavoro suggeriscono che, utilizzando i moderni strumenti delle biotecnologie, può essere possibile la selezione e la costituzione *ex novo* di particolari organismi (per esempio piante transgeniche) aventi le caratteristiche adatte per il biomonitoraggio dell'ambiente. In numerosi casi infatti,

per facilitare lo studio del controllo dell'induzione genica in seguito a uno stimolo, sono utilizzati costrutti genici chimerici contenenti la regione codificante per il promotore del gene che si intende studiare e quella del gene per la  $\beta$ -glucuronidasi (GUS), la cui attività risulta relativamente facile da misurare. In prospettiva, potendo associare l'espressione del gene *reporter* GUS a promotori di geni indotti in maniera specifica da sostanze inquinanti, sarà possibile ottenere organismi potenti bioindicatori di sostanze inquinanti. Utilizzando gli strumenti messi a disposizione da un approccio di tipo biotecnologico (tecniche di biologia molecolare, *differential display* ecc.) sarà possibile individuare le differenze geniche che determinano differenti risposte di un organismo a un inquinante (per esempio l'espressione di proteine differenti) (Urwin *et al.*, 1996) e con la stessa base di ragionamento sopra indicata per il gene *reporter* GUS, sarà possibile costruire organismi bioindicatori secondo necessità.

### Biosensori

L'approfondimento delle conoscenze su alcune caratteristiche biologiche (per esempio strutture di membrana, trasportatori, anticorpi ecc.) potrà permettere lo sviluppo di biosensori *sensu stricto*, vale a dire sensori molecolari che accoppiano un meccanismo di riconoscimento biologico (mediato da enzimi, anticorpi, DNA, microrganismi ecc.) con una tecnica fisica di trasduzione del segnale (elettrochimico, ottico, acustico) generato dall'elemento biologico (Rogers *et al.*, 1996; Turner 1997). Recentemente è stato costruito un biosensore in cui la conduttanza di una popolazione di canali ionici posti in una membrana fosfolipidica viene aperta o chiusa da un evento di riconoscimento. Questo tipo di biosensore può utilizzare molti tipi di recettori (tra cui anticorpi e nucleotidi) e permettere con elevata sensibilità il rilevamento, anche in matrici relativamente complesse (per esempio sangue), di numerose sostanze a basso peso molecolare tra cui pesticidi (Cornell *et al.*, 1997).

## Bibliografia

Ahner, B. A., Price, N. M. e Morel, F. M. M. 1994. Phytochelatin production by marine phytoplankton at low free metal ion concentrations: laboratory and field data from Massachusetts Bay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8433-8436.

Coleman, J. O. D., Blake-Kalff, M. M. A. e Davies, T. G. E. 1997a. Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.*, 2, (4), 144-151.

Coleman, J. O. D., Randall, R. e Blake-Kalff, M. M. A. 1997b. Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane. *Plant Cell Environ.*, 20, 449-460.

Cornell, B. A., Braach-Maksvytis, V. L. B., King, L. G., Osman, P. D. J., Raguse, B., Wiczorek, L. e Pace, R. J. 1997. A biosensor that uses ion-channel switches. *Nature*, 387, 580-583.

Decaprio, A. P. 1997. Biomarkers: coming of age for environmental health and risk assessment. *Environ. Sci. Tech.* 31, (7), 1873-1848.

Ernst, W. H. O. e Peterson, P. J. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (4). Terrestrial plants. *Ecotoxicology*, 3, 180-192.

Gaillard, C., Dufaud, A., Tommasini, R., Kreuz, K., Amrhein, N. e Martinoia, E. 1994. A herbicide antidote (safener) induces the activity of both the herbicide detoxifying enzyme and of

a vacuolar transporter for the detoxified herbicide. *FEBS Lett.*, 352, 219-221.

**Gawel, J. E., Ahner, B. A., Friedland, A. J. e Morel, F. M. M.** 1996. Role for heavy metals in forest decline indicated by phytochelatin measurements. *Nature*, 381, 64-65.

**Godbold, D. L., Freig, R., Cremer-Herms, A. e Hüttermann, A.** 1993. Determination of stress bioindicators in three Norway spruce stands in northern Germany. *Water Air Soil Poll.*, 66, 231-237.

**Huhn, G. e Schulz, H.** 1996. Contents of free amino acids in Scots pine needles from field sites with different levels of nitrogen deposition. *New Phytol.*, 134, 95-101.

**Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. e Karjalainen** 1994. Plant defence systems induced by ozone. *Plant Cell Environ.*, 17, 783-794.

**Kennedy, S. W., Lorenzen, A. e Norstrom, R.** 1996. Chicken embryo hepatocyte bioassay for measuring cytochrome P4501A-based 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin equivalent concentrations in environmental samples. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 706-715.

**Kreuz, K., Tommasini, R. e Martinoia, E.** 1996. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. *Plant Physiol.*, 111, 349-353.

**Kusaba, M., Takahashi, Y. e Nagata, T.** 1996. A multiple-stimuli-responsive *as-1*-related element of *parA* gene confers responsiveness to cadmium but not to copper. *Plant Physiol.*, 111, 1161-1167.

**Li, Z. S., Zhen, R. G. e Rea, P. A.** 1995. 1-chloro-2,4-dinitrobenzene-elicited increase in vacuolar glutathione-*S*-conjugate transport activity. *Plant Physiol.*, 109, 177-185.

**Luwe, M. W. F., Takahama, U. e Heber, U.** 1993. Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol.*, 101, 969-976.

**Marrs, A. K.** 1996. The functions and regulation of glutathione *S*-transferase in plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.*, 47, 127-158.

**Marrs, K. A. e Walbot, V.** 1997. Expression and RNA splicing of the maize glutathione *S*-transferase *Bronze2* gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiol.*, 113, 93-102.

**Mauch, F. e Dudler, R.** 1993. Differential induction of distinct glutathione-*S*-transferases of wheat by xenobiotics and pathogen attack. *Plant Physiol.*, 102, 1193-1201.

**Meharg, A. A.** 1994. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. *Plant Cell Environ.*, 17, 989-993.

**Rauser, W. E.** 1995. Phytochelatin and related peptides. Structure, biosynthesis and function. *Plant Physiol.*, 109, 1141-1149.

**Richardson, D. H. S.** 1992. Pollution monitoring with lichens. Richmond Publishing Co. Ltd. Corbet, S. A. e Disney, R. H. L. (eds.), Slough, UK.

**Rivetta, A., Noemi, N. e Cocucci, M.** 1997. Involvement of Ca<sup>2+</sup>-calmodulin in Cd<sup>2+</sup> toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ.*, 20, 600-608.

**Rogers, K. R. e Gerlach, C. L.** 1996. Environmental biosensors. A status report. *Environ. Sci. Technol.*, 30, (11), 486A-491A.

**Rossini, L., Jepson, I., Greeland, A. J. e Sari-Gorla, M.** 1996. Characterization of glutathione *S*-transferase isoforms in three maize inbred lines exhibiting differential sensitivity to alachlor. *Plant Physiol.*, 112, 1595-1600.

**Sacchi, G. A., Espen, L., Nocito, F. e Cocucci, M.** 1997. Cs<sup>+</sup> uptake in subapical maize root segments: mechanism and effect on H<sup>+</sup> release, transmembrane electric potential and cell pH. *Plant Cell Physiol.*, 38, (3), 282-289.

**Schmeink, B. e Wild, A.** 1990. Studies on the content of free amino acids in needles of undamaged and damaged trees at a natural habitat. *J. Plant Physiol.*, 136, 66-71.

**Turner, A. P. F.** 1997. Switching channels makes sense. *Nature*, 387, 555-557.



Uotila, M., Gullner, G. e K mives 1995. Induction of glutathione S-transferase activity and glutathione level in plants exposed to glyphosate. *Physiol. Plant.*, 93, 689-694.

Urwin, P. E., Groom, Q. J. e Robinson, N. J. 1996. Characterization of two cDNAs and identification of two proteins that accumulate in response to cadmium in cadmium-tolerant *Datura innoxia* (Mill.) cells. *J. Exp. Bot.*, 47, (301), 1019-1024.

Van Assche, F. e Clijsters, H. 1990. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant Cell Environ.*, 13, 195-206.

Welch, W. J. 1993. Come le cellule reagiscono allo stress. *Le Scienze*, 299, 50-57.

Yin, Z. H., Kaiser, W. M., Heber, U. e Raven, J. A. 1996. Acquisition and assimilation of gaseous ammonia as revealed by intracellular pH changes in leaves of higher plants. *Planta*, 200, 380-387.

Zaccheo, P., Cocucci, M. e Cocucci, S. 1985. Effects of Cr on proton extrusion, potassium uptake and transmembrane electric potential in maize root segments. *Plant Cell Environ.*, 8, 721-726.

## 1.2 Individuazione e misura di alterazioni di funzioni nei processi fisiologici di alcune piante vascolari - Francesco Albergoni e Maria Teresa Marr 

### 1.2.1 Introduzione

La distribuzione delle specie vegetali sul pianeta e, in diretta relazione, la complessit  ambientale, sono fondamentalmente riconducibili alla pressione di quattro fattori: luce (intensit  e durata), temperatura, disponibilit  idrica, disponibilit  degli elementi minerali. Le fluttuazioni di tali fattori costituiscono stress naturali, presenti in varia intensit  praticamente sempre in ogni ambiente. Negli ultimi decenni si   aggiunto un quinto fattore: l'inquinamento di origine antropica. Si tratta nella quasi totalit  dei casi di uno stress chimico:

- sostanze, presenti normalmente in natura, subiscono un forte aumento di concentrazione;
- sostanze di nuova sintesi vengono rilasciate e, a seconda delle loro caratteristiche chimico-fisiche, hanno un diverso destino ambientale.

I comparti ambientali, specie nelle aree altamente produttive quali quelle di buona parte del territorio lombardo, sono tutti particolarmente vulnerabili. Tra questi l'acqua (e la sua qualit ) assume una importanza primaria per le sue capillari interconnessioni sia con i viventi – basti pensare allo sviluppo dell'apparato radicale delle piante – sia con tutti i settori produttivi (utilizzo civile, agricolo, industriale ecc.). Ne deriva un danno economico, quasi sempre taciuto anche per le oggettive difficolt  di quantificarlo in modo corretto.

Molti ricercatori, che a diversi livelli si occupano di problemi ambientali e altri che studiano i meccanismi regolativi di funzioni fisiologiche, hanno focalizzato la loro attenzione sui problemi di stress chimico indotto da fattori antropogenici (Heath, 1980; Darral, 1989). Le conseguenze, non di rado drammatiche, sono particolarmente evidenti nelle aree altamente produttive, tra cui gran parte del territorio lombardo. Qui,

infatti, emerge con particolare evidenza la necessità di un approccio interdisciplinare per la ricerca dei limiti dello sviluppo economico e tecnologico compatibile con la salvaguardia ambientale, intesa non solo nei suoi valori culturali, naturalistici ed estetici, ma anche in quelli ecologici.

L'idea, peraltro assai diffusa, che tale problematica vada affrontata e risolta solo con mezzi tecnologici, e che quindi il problema si riduca ai soli aspetti economici (costi di gestione ambientale), è a dir poco illusoria.

È stata da più parti sottolineata l'imprescindibile necessità della ricerca di base tesa alla comprensione dei complessi e intimi meccanismi che regolano i rapporti tra gli organismi e tra questi e l'ambiente, anche con una lettura in chiave fisiologica dei processi coinvolti nelle alterazioni ambientali a vario livello (Marrè, 1990; Albergoni, 1990; Albergoni *et al.*, 1997).

Gli effetti degli inquinanti sulle popolazioni vegetali spontanee o coltivate molto spesso si rivelano subdoli, ma non per questo meno gravi. La parziale inibizione del processo fotosintetico, l'aumento dell'attività respiratoria, l'alterazione dei meccanismi di trasporto sono spesso privi di evidenti sintomi e non portano necessariamente alla morte delle piante colpite. Tuttavia, in molte popolazioni spontanee, la diminuzione o l'alterazione delle principali funzioni fisiologiche può comportare la sopraffazione da parte di popolazioni più resistenti su quelli più sensibili, con una conseguente erosione della complessità ambientale. Nelle popolazioni coltivate, a tali alterazioni, può seguire una diminuzione della produttività e quindi della produzione (Cocucci, 1990; Alpi, 1990). Quest'ultimo fenomeno è spesso erroneamente interpretato come la conseguenza di una scorretta gestione della coltura (fertilizzazione, irrigazione, trattamenti antiparassitari, interventi agronomici) inducendo una spirale di aumento delle dosi di trattamenti rivolti illusoriamente a un incremento della produzione.

L'utilizzo di indicatori biologici per il monitoraggio ambientale è un approccio tra i più seguiti ed è stato ampiamente sperimentato con successo, anche se quasi tutti i metodi si basano sulla misura del parametro sopravvivenza-morte (o presenza-assenza) del gruppo di organismi utilizzati (Bonotto *et al.*, 1992).

L'approccio qui suggerito si propone di indagare a monte di tali eventi proponendosi di individuare e misurare alterazioni di funzioni fisiologiche al loro primo comparire, con particolare attenzione alla fotosintesi e alla respirazione.

La ricerca che ha portato alla formulazione di questo approccio si è articolata in due fasi. Una prima fase si è proposta la progettazione e la realizzazione di strumenti relativamente semplici per rapide misure di fotosintesi e/o respirazione su uno stesso campione variando l'ambiente ionico o altri parametri ambientali. Una seconda fase si è proposta di indagare quali fossero le piante superiori acquatiche più facilmente coltivabili e più adatte a essere usate come indicatori biologici nell'approccio di analisi ecotossicologiche proposto.

### **1.2.2 Materiale e terminologia**

Per evidenziare l'alterazione delle funzioni misurate (fotosintesi e/o respirazione) si sono considerate soprattutto piante superiori acquatiche che vivono normalmente sommerse, anche se molte di esse presentano alcune foglie apicali galleggianti, scapo fiorale e fiori emersi.

L'organo utilizzato nelle analisi è la foglia, possibilmente intera, avendo cura di scegliere per tutte le misure quelle giovani, purché completamente distese e integre. Durante la messa a punto del metodo, *Elodea densa* Caspary è stata individuata come la specie più adatta tra quelle saggiate.

Tuttavia la metodologia può utilizzare come materiale sia alghe (specie unicellulari per esempio *Selenastrum* spp., oppure pluricellulari, per esempio *Chara* spp.), sia piante superiori terrestri. In quest'ultimo caso è necessario perforare sottovuoto le foglie nel mezzo di incubazione di base, prima di iniziare le misure, allo scopo di sostituire l'aria presente tra le cellule con il mezzo di incubazione.

Se non se ne farà particolare cenno, le specie a cui si fa riferimento sono piante superiori acquatiche a foglie immerse.

### 1.2.3 Informazioni deducibili

Le misure mettono in evidenza alterazioni dell'attività fotosintetica o respiratoria, misurate come variazioni di concentrazione di ossigeno nel liquido di incubazione. Mentre le alterazioni della fotosintesi consistono di regola in inibizione della funzione, quelle a carico del consumo di ossigeno misurato al buio possono risultare sia in una diminuzione che in un aumento: per esempio, ondate ossidative (*oxidative burst*) indotte dalla presenza, nel mezzo di incubazione, di metalli pesanti o da reagenti dei gruppi sulfidrilici.

Le informazioni ottenute dalle misure fisiologiche con il metodo illustrato possono schematicamente essere così riassunte:

- presenza nel mezzo di incubazione di una o più sostanze di cui si ignorano la natura e/o la concentrazione, ma che comunque interferiscono sui processi fisiologici valutati;
- in presenza di una sostanza nota, aumentandone gradatamente la concentrazione è possibile individuare:
  - a) la concentrazione-soglia a cui la funzione misurata inizia a essere significativamente alterata;
  - b) la concentrazione che inibisce del 50% ( $EC_{50}$ ) la funzione misurata;
  - c) la concentrazione che inibisce la velocità di fotosintesi sino al punto di compensazione (fotosintesi = respirazione);
  - d) la concentrazione che inibisce totalmente la funzione;
  - e) la reversibilità o irreversibilità dell'alterazione registrata.
- in presenza di sostanze note, e in relazione ai punti sopra elencati, è possibile individuare effetti sinergici o antagonismi in funzione di parametri ambientali quali intensità della luce, temperatura, variazioni di pH del mezzo di incubazione, presenza, a diverse concentrazioni, di altra sostanza;
- saggi comparativi della tossicità di una sostanza su differenti specie o *cultivar*;
- saggi della tossicità totale di reflui e ricerca della soglia di diluizione per il loro eventuale utilizzo in agricoltura.

### 1.2.4 Metodi d'uso

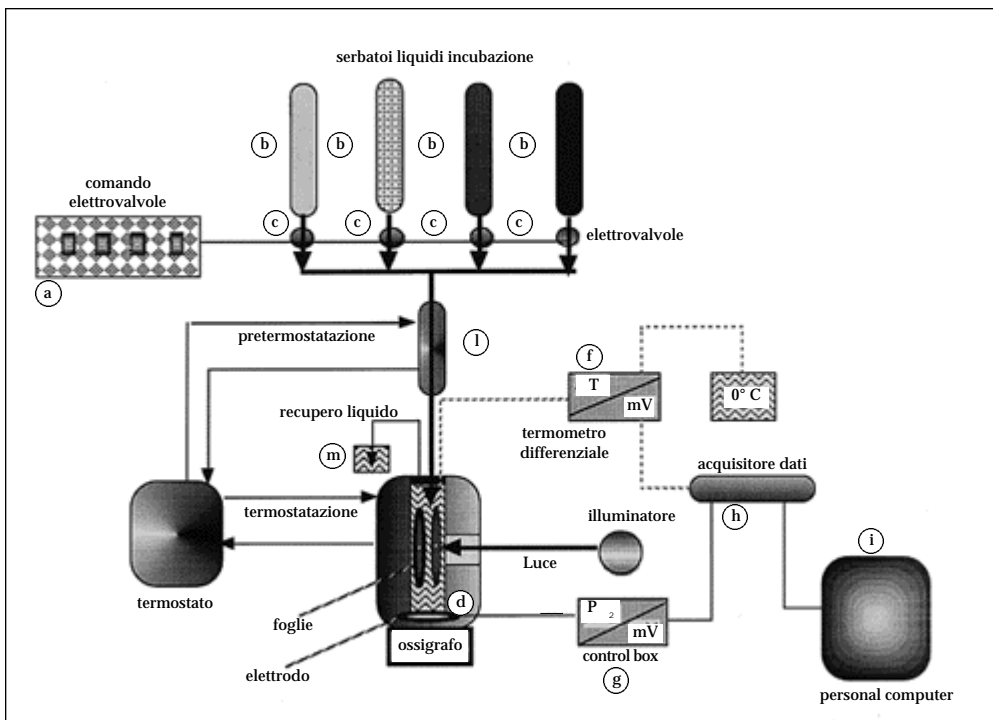
#### Strumentazione

La strumentazione da noi realizzata, utilizzando un ossigrafo Hansatech KW2/CB1 D

opportunamente modificato, presenta le seguenti caratteristiche (figura 1.4):

- rapido cambio del mezzo di incubazione senza perturbare il campione;
- misure di respirazione e/o fotosintesi in un range di  $[O_2]$  scelto dall'operatore;
- possibilità di modulare sullo stesso campione, durante la misura, parametri fisici (temperatura e/o luce), fisico-chimici (pH) o chimici (concentrazioni di sostanze da saggiare);
- possibilità di individuare sinergismi o antagonismi sia tra parametri ambientali ed effetto delle sostanze saggiate sia tra diverse sostanze.

La misura della pressione parziale di ossigeno e delle sue variazioni è fatta in condizioni di temperatura rigorosamente costante controllata dalla circolazione di acqua



**Figura 1.4** - Schema della strumentazione realizzata per misure di variazione di  $[O_2]$ .

- Comando manuale elettrovalvole.
- Serbatoi per mezzi di incubazione.
- Elettrovalvole per regolazione del flusso serbatoi-camera di misura ossigrafo.
- Ossigrafo Hansatech KW2/CB1 D.
- Centralina per la termostatazione.
- Termometro differenziale: ghiaccio fondente come temperatura di riferimento.
- Acquisitore dati ossigrafo e termometro-personal computer.
- Traduttore di segnale elettrodo-acquisitore dati (o registratore).
- Personal computer.
- Serpentina termostata per pretermostatazione del mezzo di incubazione.
- Serbatoio per recupero del mezzo di incubazione durante i cambi.

termostata in una centralina (figura 1.4 e) e rilevate all'interno della camera di misura da un termometro differenziale che confronta la misura della temperatura del liquido di incubazione con quella del ghiaccio fondente in acqua distillata (figura 1.4 f).

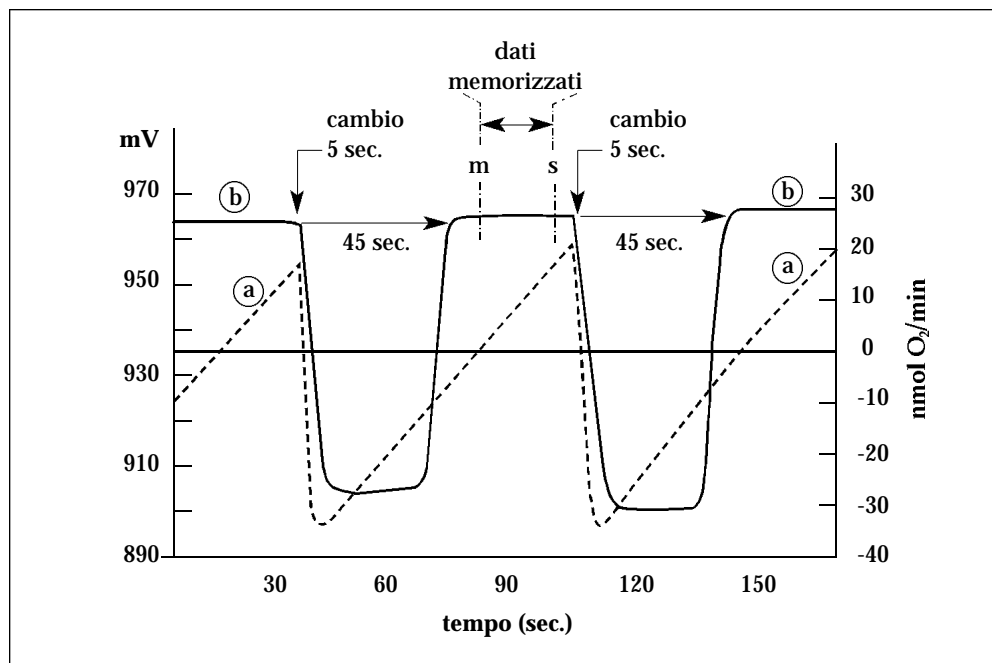
Una serie di serbatoi con differenti liquidi di incubazione (figura 1.4 b) sono in comunicazione con la cella di misura dell'ossigrafo (figura 1.4 d). Il flusso del liquido durante il cambio avviene per caduta ed è regolato da una batteria di elettrovalvole (figura 1.4 c) comandate a mano, ma eventualmente programmabili.

La fonte di luce è fornita da un illuminatore Volpi Intralux 150H a diaframma centrale per la regolazione dell'intensità luminosa e collegato con fibra ottica alla camera di misura il cui volume è variabile da 1,5 a 3 ml.

L'intensità luminosa è misurata con un radiometro LI/OR 185A.

Un semplice programma di acquisizione e archiviazione dati, da noi realizzato, è collegato a un Personal Computer (figura 1.4 i).

In figura 1.5 è riportato un esempio di acquisizione dati mediante PC. Tre foglie di *Elo-dea densa* erano illuminate perpendicolarmente con una intensità luminosa di  $75 \text{ watt m}^{-2}$  (la composizione del mezzo di incubazione è indicato in didascalia). La curva (a) è la



**Figura 1.5** - Serie di dati acquisiti su personal computer. La curva (a) indica le variazioni della funzione espresse in mV. La curva (b) la derivata per punti della media dei 60 dati precedenti e direttamente espressa in  $\text{nmol O}_2/\text{min}^{-1}$ .

Nel grafico sono indicati i tempi dei cambi del mezzo di incubazione, quelli dell'inerzia per il calcolo della derivata e (m-s), la serie di dati scelti per essere memorizzati. Condizioni sperimentali:  $\text{CaSO}_4$  0,5 mM; MES/BTP 10 mM pH 6; anidra carbonica 9 U/ml;  $\text{NaHCO}_3$  0,5 mM; intensità luminosa  $75 \text{ watt m}^{-2}$ .

gistrazione delle variazioni dei valori in mV in uscita dal traduttore di segnale (figura 1.4 h) e corrispondenti alla funzione. Nell'esempio riportato, la funzione indica un aumento dei mV in uscita corrispondenti a un proporzionale aumento della pressione parziale di O<sub>2</sub> nella camera di misura dovuta all'attività fotosintetica delle foglie illuminate.

La scansione dei dati acquisiti, cioè il numero di acquisiti nell'unità di tempo, può essere scelto dall'operatore (un dato al secondo, nell'esempio di figura 1.5).

La curva (b) è la registrazione del calcolo della derivata della funzione; ogni punto corrisponde alla derivata della media degli "n" dati precedentemente acquisiti (nell'esempio riportato "n" = 60), ed esprime direttamente la velocità della variazione della concentrazione di O<sub>2</sub> della camera di misura (nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>). La curva della derivata parallela alla linea di zero indica quindi una velocità di variazione di [O<sub>2</sub>] costante.

In figura 1.5 sono registrati due cambi di liquido di incubazione. Il tempo di cambio è di circa 5 minuti secondi; il livello della concentrazione di O<sub>2</sub> espressa in mV (curva a) ritorna a quello iniziale = 900 mV. Il tempo di inerzia per il calcolo della derivata è di circa 45 minuti secondi. Tale tempo può essere variato scegliendo un numero di dati più o meno grande su cui calcolare la derivata.

Un doppio comando (m—s) individua e memorizza una sequenza di dati lunga a piacere che si vuole archiviare.

#### Scelta del materiale

È stata condotta un'ampia indagine per individuare il materiale più adatto per l'approccio proposto con il nostro metodo, considerando specie acquatiche diffuse nelle acque lombarde e facilmente reperibili (tabella 1.5), non escludendo due specie di Briofite.

Su questo gruppo di specie si è operato uno *screening* per individuare la o le specie che rispondessero ai seguenti requisiti:

- essere facilmente reperibili nelle acque lombarde;

Briofite	
<i>Fontinalis antypiretica</i> L.	<i>Riccia fluitans</i> L.
Monocotiledoni	
<i>Elodea canadensis</i> Michaux	<i>Elodea densa</i> Caspary
<i>Groenlandia densa</i> Fourr.	<i>Lemna trisulca</i> L.
<i>Najas marina</i> L.	<i>Potamogeton crispus</i> L.
<i>Potamogeton nodosus</i> L.	<i>Potamogeton perfoliatus</i> L.
<i>Potamogeton pusillus</i> L.	<i>Vallisneria spiralis</i> L.
Dicotiledoni	
<i>Apium nodiflorum</i> L.	<i>Callitriche stagnalis</i> Scop.
<i>Callitriche palustris</i> L.	<i>Ceratophyllum demersum</i> L.
<i>Hottonia palustris</i> L.	<i>Myriophyllum spicatum</i> L.
<i>Ranunculus fluitans</i> L.	<i>Veronica anagallis-aquatica</i> L.

**Tabella 1.5** - Elenco floristico delle specie saggiate. Tutte le specie fanno parte della flora autoctona lombarda con le sole eccezioni di *Elodea canadensis* ed *Elodea densa* originarie rispettivamente dell'America settentrionale e dell'America meridionale; ambedue le specie sono da tempo naturalizzate nelle nostre acque: la prima solo con individui femminili, la seconda solo con individui maschili.

- essere presenti durante tutto l'anno;
- non presentare particolari difficoltà di coltivazione in laboratorio o in serra;
- essere sensibili a sostanze che alterano la respirazione come metalli pesanti, tossine o veleni organici, reagenti dei sulfidrilici ecc.;
- essere sensibili a inibitori della fotosintesi;
- presentare una buona letteratura specifica.

Pertanto, si è eseguita una serie di saggi sulla respirazione e sulla fotosintesi delle specie considerate secondo le condizioni sperimentali di seguito specificate.

#### *Condizioni sperimentali per i saggi sulla respirazione e sulla fotosintesi*

Le piante venivano accuratamente lavate in acqua corrente avendo cura di asportare eventuali organismi epifiti. Foglie giovani integre e completamente distese venivano staccate, randomizzate e preincubate in  $\text{CaSO}_4$  0,5 mM per due ore, cambiando la soluzione due volte.

- *Misure di respirazione.*
- Mezzo di incubazione:  $\text{CaSO}_4$  0,5 mM; MES/BTP 10 mM pH 6;  $\pm\text{Cu}^{++}$  0,5 mM;  $\pm\text{Hg}^{++}$  0,1 mM;  $\pm\text{Ag}^+$  2  $\mu\text{M}$ ;  $\pm\text{Pb}^{++}$  0,1 mM;  $\pm\text{NEM}$  0,5 mM. Temperatura 20°C. Le misure venivano eseguite al buio.
- *Misure di fotosintesi.*
- Mezzo di incubazione:  $\text{CaSO}_4$  0,5 mM; MES/BTP 10 mM pH 6; anidra carbonica 9 U/ml;  $\text{NaHCO}_3$  0,5 mM; intensità luminosa 75 watt  $\text{m}^{-2}$ .

Sono state considerate in un primo tempo le alterazioni della respirazione valutando la sensibilità delle varie specie ad alcuni metalli pesanti ( $\text{Cu}^{++}$ ,  $\text{Pb}^{++}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{++}$ ) e ad altre sostanze note come reagenti dei gruppi sulfidrilici (-SH) delle proteine tra cui NEM (N-etilmaleimide). Per ogni sostanza e per ogni specie il test è stato ripetuto almeno tre volte. In nove specie saggiate, tutte le sostanze hanno indotto in modo netto e ripetibile un forte e transiente aumento del consumo di  $\text{O}_2$  (per esempio figura 1.8 B); in sei specie, solo alcune sostanze hanno indotto tale risposta; nelle rimanenti non si è manifestata alcuna alterazione del consumo di  $\text{O}_2$ .

Tra le nove specie risultate più sensibili al test effettuato, quattro sono state scartate perché non reperibili tutto l'anno nelle acque lombarde. Sulle restanti cinque, *Elodea densa* Caspary, *Groenlandia densa* Fourr., *Callitriche palustris* L., *Myriophyllum spicatum* L. e *Ranunculus fluitans* L., è stata condotta una seconda serie di misure per valutare  $\text{EC}_{50}$  – cioè la concentrazione a cui l'attività misurata viene ridotta del 50% – di cinque sostanze ( $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{HgCl}_2$ , DCMU, NEM). Nel nostro caso  $\text{EC}_{50}$  si riferisce alla concentrazione delle singole sostanze saggiate che inibisce la funzione fisiologica misurata (fotosintesi). Anche in questo caso, per ogni specie e per ogni sostanza, le prove sono state ripetute almeno tre volte.

La tabella 1.6 mostra che, tra le specie saggiate, *Elodea densa* è la più sensibile, almeno in queste condizioni sperimentali, mentre *Callitriche palustris* risulta essere quella relativamente più resistente.

La quantità di materiale necessario per ciascuna prova, sia di respirazione che di fotosintesi, è di 40-60 mg di peso fresco, corrispondenti indicativamente a 5-10 foglie di *Elodea densa* o di *Groenlandia densa*.

Il metodo messo a punto è stato confrontato con quello denominato *inibizione di crescita algale a 96 ore*, utilizzato e codificato per misure di ecotossicità acquatiche. Il materiale

Specie	Ag <sup>++</sup>	Cu <sup>++</sup>	Hg <sup>++</sup>	DCMU	NEM
<i>Groenlandia densa</i>	10 nM	10 nM	10 nM	15 nM	20 nM
<i>Elodea densa</i>	5 nM	10 nM	5 nM	10 nM	25 nM
<i>Callitriche palustris</i>	30 nM	25 nM	50 nM	100 nM	75 nM
<i>Myriophyllum spicatum</i>	20 nM	50 nM	10 nM	50 nM	25 nM
<i>Ranunculus fluitans</i>	15 nM	10 nM	20 nM	15 nM	25 nM

**Tabella 1.6** - Concentrazioni che inibiscono del 50%, nelle singole specie utilizzate, la velocità di fotosintesi iniziale (EC<sub>50</sub>) in presenza delle sostanze saggiate. Condizioni sperimentali: CaSO<sub>4</sub> 0,5 mM;MES/BTP 10 mM pH 6;anidrasi carbonica 9 U/ml; NaHCO<sub>3</sub> 0,5 mM;intensità luminosa 75 watt x m<sup>2</sup>; ±Ag<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ±CuSO<sub>4</sub>, ±HgCl<sub>2</sub>, ±DCMU e +NEM. I dati riportati sono la media di tre ripetizioni; l'errore è inferiore a ±5%.

utilizzato è costituito da *Selenastrum capricornutum*, una *Chlorococcales*, in coltura sterile e monospesifica; per il saggio di tossicità è stato utilizzato DCMU. In presenza di concentrazioni crescenti della sostanza da saggiare si determina a quale concentrazione la crescita della popolazione algale utilizzata è inibita del 50% (EC<sub>50</sub>) dopo 96 ore. In tabella 1.7 vengono confrontati i due metodi, considerando la sensibilità valutata con EC<sub>50</sub> e la velocità di esecuzione. Mentre la sensibilità è dello stesso ordine di grandezza, rispettivamente 4 x 10<sup>-7</sup> M e 5 x 10<sup>-7</sup> M, risulta notevolmente diverso e a favore del metodo da noi proposto, il tempo di esecuzione, 5700 minuti (96 ore) contro 60 minuti (1 ora).

I tempi di esecuzione con foglie di piante superiori non si discostano da quelli indicati in tabella riferita ad alghe monocellulari.

Metodo	Sensibilità EC <sub>50</sub>	Tempo di risposta
Inibizione della crescita algale (DCMU)	(5 mg/l) 4 x 10 <sup>-7</sup> M	5700 minuti (96 ore)
Inibizione della fotosintesi (DCMU)	(16 mg/l) 5 x 10 <sup>-7</sup> M	60 minuti (1 ora)

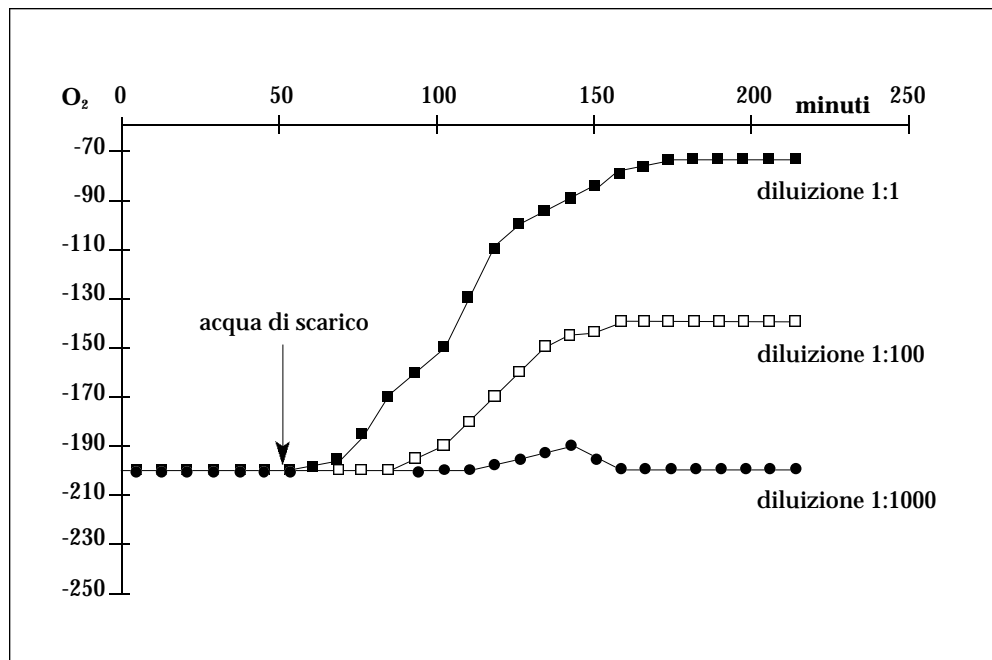
**Tabella 1.7** - Determinazione di EC<sub>50</sub> su popolazioni pure di *Selenastrum capricornutum* con DCMU [3-(3,4-diclorofenil) - 1,1 dimetilurea]:confronto della sensibilità e del tempo di risposta fra il metodo inibizione di crescita algale a 96 ore e quello da noi proposto della misura dell'inibizione della fotosintesi. Le condizioni sperimentali di allevamento e delle misure di fotosintesi sulle alghe sono state uguali.

La necessità di repliche dipende fondamentalmente dalla variabilità del materiale utilizzato. Per quanto riguarda le specie saggiate e scelte come ottimali (tabella 1.6) la variabilità può essere valutata inferiore al 10%.

### 1.2.5 Esempi di applicazione del metodo

La figura 1.6 mostra alterazione della respirazione in foglie di *Elodea densa* in presenza di acqua di scarico a composizione ignota, prelevata in un cavo di irrigazione a valle di un'industria chimica. La diluizione mostra che le sostanze presenti alterano notevolmente la respirazione che tuttavia non viene totalmente soppressa.





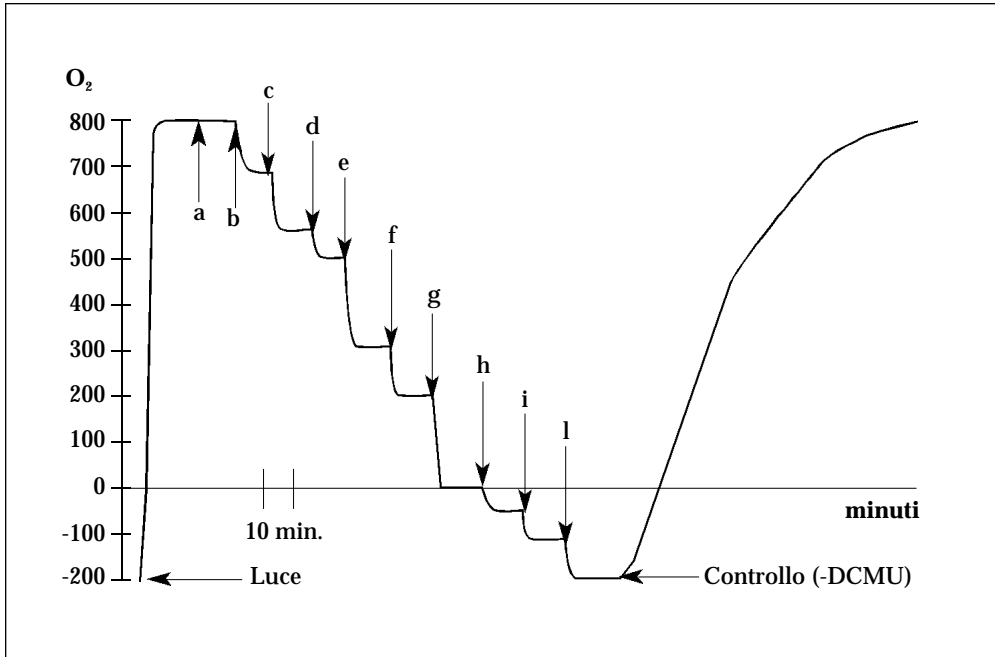
**Figura 1.6** - Alterazione della respirazione in presenza di acque di scarico industriali a diverse concentrazioni. Le sostanze presenti sono sconosciute.  $CO_2$  espresso in  $nmol O_2/min \times gr P.F.$  Condizioni sperimentali: liquido di controllo  $CaSO_4$  0,5 mM; MES/BTP 10 mM pH 6; buio. Acqua di scarico diluita con liquido di controllo nei rapporti 1:1; 1:100; 1:1000.

N.B.: nel liquido di incubazione e in quelli da analizzare alle varie diluizioni è stata fatta gorgogliare aria per un'ora prima dell'inizio della misura allo scopo di eguagliare la concentrazione iniziale di  $O_2$  nelle diverse soluzioni.

Foglie della stessa specie lasciate a incubare nelle stesse condizioni presentavano dopo tre giorni un'inibizione della respirazione maggiore del 40% (dati non presentati). Solo una diluizione 1:1000 segnalava alterazioni della respirazione insignificanti.

La figura 1.7 mostra un secondo possibile uso della strumentazione. Si vuol conoscere, per una data sostanza, la soglia di tossicità per la fotosintesi e la reversibilità degli effetti della sostanza. A titolo esemplificativo è stato scelto il DCMU [3-(3,4-diclorofenil)-1,1 dimetilurea] di cui è noto il meccanismo d'azione nel bloccare l'evoluzione fotosintetica di  $O_2$ .

Quattro foglie di *Elodea densa* sono state poste nella camera di misura. Dopo un breve periodo di buio in cui è stata misurata la respirazione, le foglie sono state illuminate con intensità di  $75 \text{ watt} \times \text{m}^2$ . In pochi minuti la fotosintesi raggiunge la sua massima velocità ( $810 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ gr P.F.}^{-1}$ ). I successivi cambi del liquido di incubazione erano fatti con concentrazioni via via decrescenti di DCMU; ciascun cambio veniva fatto solo dopo che la misura di velocità della fotosintesi si era stabilizzata per almeno 5 minuti su un nuovo valore. Alla concentrazione di  $10^{-8} \text{ M}$  si



**Figura 1.7 -** Andamento della velocità di fotosintesi in presenza di concentrazioni crescenti di DCMU.

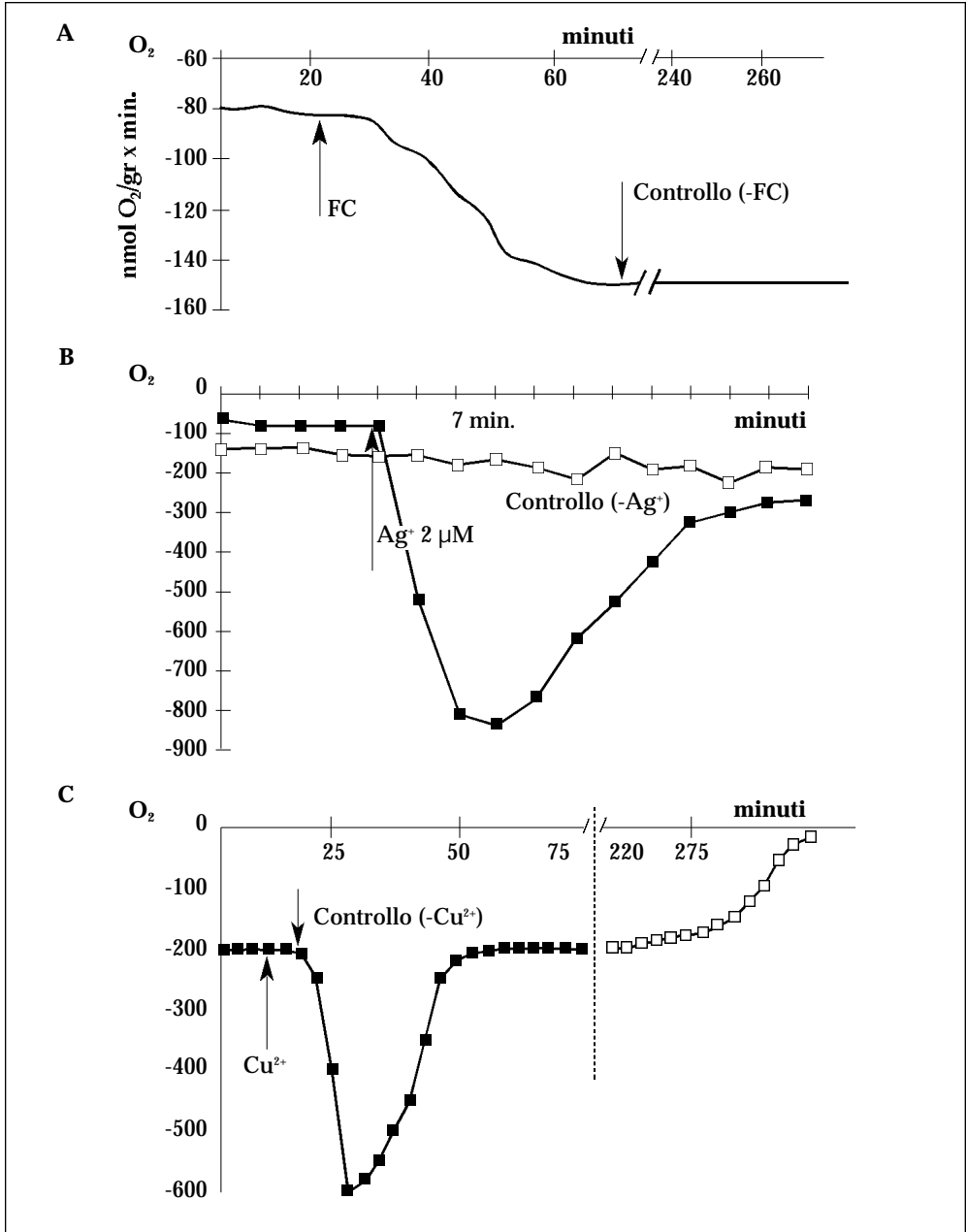
$O_2$  espresso in  $nmol O_2/min \times gr P.F.$

Condizioni sperimentali:  $CaSO_4$  0,5 mM; MES/BTP 10 mM pH 6; anidrasi carbonica 9 U/ml;  $NaHCO_3$  0,5 mM; intensità luminosa  $75 \text{ watt} \times m^{-2}$ ;  $\pm$  DCMU alle concentrazioni: a)  $10^{-9}$  M; b)  $10^{-8}$  M; c)  $5 \times 10^{-8}$  M; d)  $10^{-7}$  M; e)  $5 \times 10^{-7}$  M; f)  $7,5 \times 10^{-7}$  M; g)  $10^{-6}$  M; h)  $1,5 \times 10^{-6}$  M; i)  $2,5 \times 10^{-6}$  M; l)  $5 \times 10^{-6}$  M.

registra la soglia di inibizione dell'attività fotosintetica; alla concentrazione  $10^{-7}$  M si registra una inibizione del 50%; il punto di compensazione è raggiunto a una concentrazione di  $5 \times 10^{-7}$  M, mentre la totale inibizione dell'attività fotosintetica è ottenuta con una concentrazione di  $5 \times 10^{-6}$  M. Il lavaggio con mezzo di incubazione privo di DCMU (controllo) riporta in circa un'ora i valori dell'attività fotosintetica ai livelli iniziali, dimostrando la reversibilità dell'effetto della sostanza saggiata sull'attività fotosintetica.

In figura 1.8 sono riportati tre casi di rilevamento di sostanze tossiche presenti nel liquido di incubazione.

- La fusicoccina (FC) è una tossina naturale prodotta da un fungo parassita principalmente del mandorlo (*Fusicoccum amygdali*); la tossina agisce sull' $H^+$  ATPasi del plasmalemma aumentandone l'attività e alterando il controllo del trasporto transmembrana. Oltre a questo effetto, già ampiamente studiato e caratterizzato, si è constatato un aumento del consumo di  $O_2$  che risulta indipendente dall'effetto stimolante della tossina sul consumo di ATP.
- L'aumento del consumo di ossigeno indotto da FC (figura 1.8 A) risulta irrever-



**Figura 1.8** - Effetti sulla respirazione di foglie di *Elodea densa* di tre differenti sostanze: A) Fusicoccina, B)  $\text{Ag}^+$ , C)  $\text{Cu}^{2+}$ .  $\text{O}_2$  è espresso in  $\text{nmol O}_2/\text{min} \times \text{gr P.F.}$  Condizioni sperimentali:  $\text{CaSO}_4$  0,5 mM; MES/BTP 10mM pH 6; buio.  $\pm\text{FC}$  (fusicoccina)  $10^{-4}$  M;  $\pm\text{Ag}_2\text{SO}_4$  2 $\mu\text{M}$ ;  $\pm\text{CuSO}_4$  0,5 mM.

sibile e tale rimane per diverse ore dopo la somministrazione della tossina.

- L'effetto dello ione  $Ag^+$  (figura 1.8 B), assai simile a quello di altri metalli pesanti, si manifesta invece in un aumento parossistico, ma transiente, del consumo di  $O_2$ . Una rapida e tempestiva misura dell'alterazione di questo parametro può quindi mettere in evidenza la presenza di tali sostanze anche in concentrazioni particolarmente basse e non letali.

La figura 1.8 C mostra le alterazioni della respirazione in foglie di *Elodea densa* incubate per soli 10 minuti in presenza di  $Cu^{2+}$  alla concentrazione di 500 mM. L'effetto tossico dello ione  $Cu^{2+}$  non è reversibile ed è costituito da due fasi: in un primo tempo si ha un aumento transiente del consumo di  $O_2$  (ondata ossidativa); dopo più di due ore si manifesta invece una progressiva diminuzione della respirazione sino (nel caso citato) alla morte delle foglie trattate.

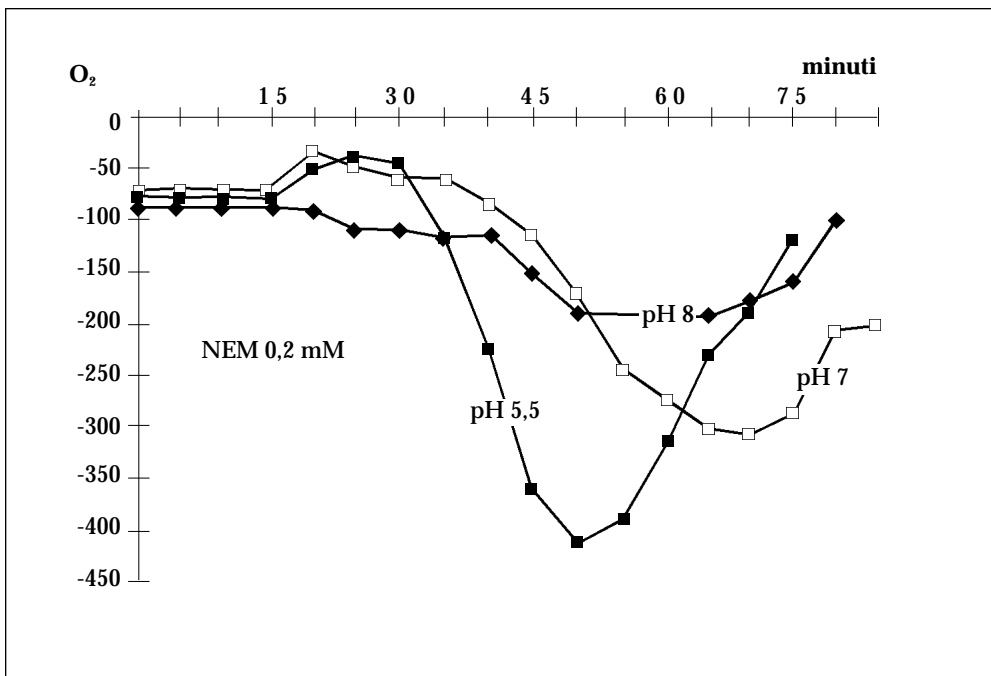


Figura 1.9 - Differente intensità dell'alterazione della respirazione in foglie di *Elodea densa* in presenza della stessa concentrazione di NEM (N-etilmaleimide) a tre differenti pH del mezzo di incubazione.  $O_2$  è espresso in  $nmol O_2/min \times gr P.F.$  Condizioni sperimentali:  $CaSO_4$  0,5 mM; MES/BTP 10 mM; NEM 0,2 mM; buio.

In figura 1.9 si evidenzia come l'alterazione della respirazione, nel caso citato una ondata ossidativa provocata dal NEM (N-etilmaleimide) un reagente dei gruppi sulfidrilici, possa essere notevolmente diversa, sia come intensità sia come tempo di comparsa, a seconda del pH del mezzo di incubazione.

### 1.2.6 Discussione

Il metodo proposto, basato sul rilevamento di alterazioni di parametri fisiologici, presenta, rispetto ad altri metodi, i seguenti vantaggi:

- la rapidità: in *tabella 1.7* è riportato un significativo confronto con un metodo che presenta una sensibilità dello stesso ordine di grandezza; la velocità di risposta è di due ordini di grandezza a favore di quello da noi proposto;
- la sensibilità: la *figura 1.7* evidenzia che a una concentrazione di 1 nM di DCMU è rilevabile una prima significativa alterazione della fotosintesi, sia pure di lieve entità. D'altra parte, in *tabella 1.6* sono riportate le concentrazioni a cui, nelle cinque specie saggiate, l'attività fotosintetica viene dimezzata non solo da un veleno specifico per la fotosintesi, ma anche da altre sostanze la cui azione non è prettamente specifica sulla fotosintesi.
- La possibilità di uso di differenti materiali: in *tabella 1.6* sono illustrati i risultati di una ricerca tesa a individuare quali specie, presenti nelle acque lombarde, presentano le caratteristiche migliori per essere utilizzate come materiale per rilevamento di alterazioni di processi fisiologici. *Elodea densa* è risultata la specie più sensibile ai saggi effettuati; essa presenta anche alcune caratteristiche che la fanno preferire ad altre specie:
  - a) non presenta particolari esigenze e può essere facilmente coltivata in vasche con un lento ricambio d'acqua anche all'aperto o in serra (o in laboratorio) durante i mesi più freddi. Teme il sole diretto durante i mesi estivi e, per ovviare a ciò, è sufficiente porre una comune rete da ombreggiamento sulle vasche;
  - b) le foglie hanno funzione sia fotosintetica sia di assunzione minerale. Le radici, quando presenti, hanno infatti solo funzione ancorante;
  - c) il mesofillo fogliare è costituito da due soli strati di cellule (di maggiori dimensioni quelle sulla pagina superiore) e quindi tutte le cellule sono in diretto contatto con il mezzo esterno;
  - d) la letteratura specifica è molto ampia, poiché la specie si presta molto bene per ricerche di fisiologia vegetale ed ecofisiologia; basti ricordare che essa è stata usata come materiale sperimentale in oltre 60 lavori pubblicati su riviste internazionali nel solo nostro laboratorio.

Per quanto riguarda le altre specie acquatiche che si sono dimostrate ben utilizzabili, da un lato esse sono assai più diffuse di *Elodea densa* nelle acque lombarde e quindi sono sempre e facilmente reperibili in acque vivaci – come per esempio quelle dei fontanili – ma dall'altro non sono di facile coltivazione ed esigono, seppur modestamente, acque correnti.

Si vuole ancora sottolineare che il metodo, come già ricordato, permette di utilizzare una vasta gamma di organismi fotosintetici, da alghe unicellulari a piante terrestri superiori.

Nel primo caso, la sospensione di alghe, in eventuali differenti condizioni sperimentali, è direttamente immessa nei contenitori (*figura 1.4 b*) e a ogni cambio verrà sostituito nella cella di misura il liquido di incubazione contenente la sospensione di alghe. In queste misure si deve presupporre che il numero di alghe per unità di volume rimanga costante durante il periodo dell'esperimento. È pertanto necessario mantenere agitata – per esempio gorgogliando aria – la sospensione algale nei serbatoi ed è preferibile utilizzare una coltura in fase di crescita stazionaria. Nell'esempio riportato

in *tabella 1.7* la misura dura un'ora; quindi è ragionevole pensare, ed eventualmente facile da controllare, che in tale tempo il numero di individui nell'unità di volume non sia significativamente cambiato. Va però sottolineato che l'utilizzo di alghe unicellulari presuppone la disponibilità di colture di popolazioni pure, il che implica attrezzature adeguate e personale specializzato.

L'uso di foglie di piante terrestri è assai più semplice. Infatti, l'unica precauzione è quella di perfondere sottovuoto nelle foglie il liquido di incubazione. Tale operazione permette al liquido stesso, che sostituisce l'aria tra le cellule, di venire a contatto con tutte le cellule del mesofillo, favorendo lo scambio di soluti in modo non molto diverso da quanto avviene nelle piante acquatiche. In caso contrario, la presenza di aria tra le cellule sia del tessuto lacunoso che di quello a palizzata, impedirebbe o ritarderebbe enormemente l'entrata nelle cellule delle sostanze in soluzione nel liquido di incubazione e il conseguente rilevamento dell'effetto tossico. L'uso di foglie di piante terrestri presenta l'indubbio vantaggio della grande disponibilità di specie, sia spontanee sia coltivate, su cui poter saggiare, per esempio, sostanze di nuova sintesi determinandone le soglie di tossicità. In particolare per le specie coltivate sono disponibili numerosissime varietà che possono presentare diversi livelli di sensibilità a sostanze da saggiare. Va comunque tenuto presente che la perfusione sottovuoto del liquido di incubazione pone i tessuti fogliari in una situazione anomala, in modo particolare per quanto riguarda la concentrazione di  $O_2$  e i dati rilevati in questi casi, pur non potendo essere oggettivamente considerati in senso assoluto, possono ugualmente dare utili informazioni in senso comparativo. Non si tratta di una tecnica innovativa e molti Autori la ritengono accettabile specie se le misure non si prolungano molto nel tempo.

### 1.2.7 Limiti del metodo

I parametri fisiologici considerati sono, anche se di fondamentale importanza, solo due: fotosintesi e respirazione. Va comunque ricordato che queste analisi possono essere approfondite anche con semplici misure delle variazioni della conducibilità del mezzo che, rivelando un rilascio di elettroliti da parte dei tessuti, possono indicare alterazioni della permeabilità selettiva della membrana (plasmalemma). Altre analisi, ma assai più sofisticate, possono essere condotte a tale riguardo come la misura delle variazioni del potenziale elettrico transmembrana e dei flussi ionici, con particolare riguardo a  $K^+$  o a  $H^+$ .

Le misure di variazioni di fotosintesi e respirazione si riferiscono ad alterazioni immediate di tali parametri; in alcuni casi può rendersi necessario lasciare le foglie a incubare nel mezzo da analizzare per un periodo di tempo ritenuto di volta in volta sufficiente dal ricercatore e confrontare con analogo campione lasciato in presenza di mezzo di incubazione standard.

Se si analizza un mezzo di cui si ignora la composizione sia qualitativa che quantitativa di eventuali sostanze tossiche, l'unica informazione che si può ottenere è se in tale mezzo sono presenti sostanze che alterano in qualche modo le funzioni fisiologiche analizzate (*figura 1.6*).

Va sottolineato che alcune sostanze, potenzialmente presenti nelle acque da analizzare, possono inibire o mascherare le alterazioni, soprattutto della respirazione, provocate da altre sostanze.

Va infine ricordato che anche i parametri ambientali possono assumere notevole im-

portanza, primo tra tutti il pH del mezzo di incubazione. È stato rilevato, a titolo di esempio, che l'effetto di alcuni metalli pesanti sull'alterazione transiente della respirazione (*oxidative burst*) è fortemente dipendente dal pH del mezzo di incubazione, sia come intensità che come tempi di comparsa dell'alterazione (figura 1.9). Proprio per questo, soprattutto nelle ricerche di soglie di tossicità di singole sostanze, è consigliabile eseguire le stesse misure a diversi pH.

### 1.2.8 Limiti di accettabilità dei risultati

I limiti di accettabilità dei risultati ottenuti dipendono fondamentalmente dalla variabilità del parametro fisiologico nell'ambito della popolazione utilizzata. Come già accennato vanno soprattutto considerate variazioni stagionali tipiche di ogni specie, in modo particolare in relazione allo stato fenologico della specie stessa. Nel caso di *Elo-dea densa*, numerose misure di controllo condotte nel nostro laboratorio negli ultimi anni indicano che nello stesso periodo dell'anno la variabilità sia per la respirazione che per la fotosintesi può ritenersi < 8%, mentre durante il periodo di fioritura (luglio-settembre in dipendenza dell'andamento stagionale) l'attività fotosintetica può subire anche una notevole riduzione passando da 1200-1800 nmol O<sub>2</sub>/min x gr P. F. a 150-75 nmol O<sub>2</sub>/min x gr P. F. A questo proposito si ricorda comunque che qualsiasi analisi va preceduta, possibilmente sullo stesso campione, dalla misura dello stesso parametro nel solo liquido di incubazione (controllo), in modo da ottenere un confronto sicuro in assenza e in presenza della soluzione che si vuol analizzare (figure 1.6, 1.7 e 1.8).

## Bibliografia

**Albergoni, F. G. e Marrè, M. T.** 1997. Materiali e metodo per la valutazione della qualità biologica delle acque di superficie. Rend. Accademia Lombarda di Scienze e Lettere (in stampa).

**Bonotto, S., Nobili, R. e Revoltelle, R. P.** 1992. Biological Indicators for environmental monitoring. *Sereno Symposia*, 27.

**Darral, N. M.** 1989. The effect of air pollutants on physiological processes in plants. *Plant, Cell*

*and Environment*, 12, 1-30.

**Heath, R. L.** 1980. Initial events in injury to plants by air pollution. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31, 365-431.

**Marrè, E., Albergoni, F. G., Cocucci, M. e Alpi, A.** 1990. La ricerca di base nella salvaguardia dell'ambiente. In: Il contributo della biologia vegetale nella salvaguardia dell'ambiente e della produzione vegetale, Milano, 123-190.





# Capitolo 2

## I microrganismi del suolo come bioindicatori

Annamaria Ferrari, Luigi Allievi, Carmen Gigliotti e Anna Fontana

## 2.1 Introduzione

I microrganismi sono una costante componente biologica di tutti i suoli, alla cui struttura sono intimamente associati. Il suolo è stato paragonato a un organismo vivente: come questo possiede un equilibrio e dei meccanismi che tendono a mantenerlo.

L'attività chimica complessiva del suolo, essenzialmente opera dell'insieme degli organismi viventi che lo popolano, non è la pura somma delle singole azioni, ma è arricchita dalla sinergia, dall'interazione tra le forme viventi, a partire da quelle più intimamente legate alla sua struttura, i microrganismi; fonte di apporti particolarmente positivi sono le simbiosi microrganismi-piante. Tale organizzazione rende l'ecosistema suolo più complesso, sofisticato e tutto sommato più resistente del semplice insieme delle forme viventi e della sua struttura chimica e fisica.

Il suolo inoltre è non solo a contatto ma in continua relazione con gli altri comparti ambientali ed ecosistemi, con i quali ha regolari scambi chimici nonché di organismi viventi, con importanti ripercussioni non solo negative in termini di inquinamento, ma anche positive come la completezza dei cicli degli elementi.

La funzione preminente, ma non esclusiva, dei microrganismi è di tipo demolitivo, consistente nella mineralizzazione della sostanza organica, che produce i nutrienti minerali per la pianta. Col termine microrganismi, o a volte con quello praticamente equivalente di protisti, si indicano forme, molto spesso unicellulari, che comprendono batteri (o schizomiceti) ed eumiceti (le comuni muffe e lieviti) quali gruppi numericamente dominanti. Anche le altre forme microbiche sono comunque presenti nel suolo: protozoi (essenzialmente predatori di altri microrganismi) e alghe (spesso in grado di vivere eterotroficamente).

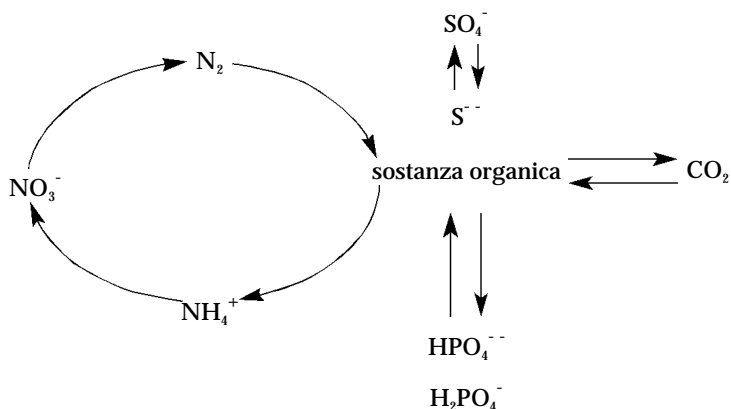
Lo studio della microflora e delle modificazioni a suo carico rappresenta un potente mezzo per indagare sia la fisiologia del suolo che eventuali fenomeni patologici (per esempio le conseguenze di uno stress esogeno quale il contatto con uno xenobiotico). I fattori ambientali naturali, che noi descriviamo tramite gli opportuni parametri chimici e fisici, nonché i fattori esogeni, possono influenzare ogni aspetto della presenza e dell'attività della microflora:

- entità della microflora, totale o dei gruppi componenti, stimabile sia sotto forma di biomassa che di carica microbica (numero di microrganismi);
- livello di attività metabolica, totale o delle singole funzioni, importante per l'indagine diretta dei flussi della materia nei cicli degli elementi;
- presenza o assenza delle varie forme microbiche, anche a livello di specie o varietà, quindi struttura della comunità microbica complessiva e biodiversità.

Lo studio di questi aspetti e delle modificazioni che possono subire, può quindi permettere da un lato di descrivere la struttura raggiunta dalla comunità microbica in una data situazione ambientale e l'adattamento alle variazioni naturali dell'ambiente stesso, dall'altro di individuare le ripercussioni di uno stress esogeno e di giudicarne la gravità, in termini per esempio di alterazione della biodiversità, modificazioni dei cicli degli elementi, possibilità di recupero dell'equilibrio dell'ecosistema.

Il modo consueto per schematizzare e descrivere il chimismo del suolo, come detto di origine prevalentemente biologica, è quello dei cosiddetti cicli degli elementi (o cicli biogeochimici): C, N (particolarmente complesso), P, S ecc. Ognuno di essi è necessariamente chiuso su se stesso, poiché nell'ecosistema la materia viene riciclata, utiliz-

zando energia, anche se a vari livelli possono verificarsi perdite nonché acquisizioni di determinati composti.



Ogni ciclo comprende da due a più passaggi chimici, che portano alla formazione di un composto (organico o inorganico, solido, liquido o gassoso) a partire da un altro. Ognuna di queste trasformazioni, se condotta da organismi viventi, è opera di uno o di una serie di enzimi. La potenzialità di produrre ognuno di questi enzimi accomuna organismi, per altri versi anche molto diversi, a formare un "gruppo fisiologico".

Tutti i passaggi sono opera prevalentemente o solo di microrganismi, il gruppo di organismi viventi con la massima diversificazione fisiologica. All'interno dei microrganismi, o anche solo dei batteri, esiste infatti un'enorme versatilità e potenzialità metabolica, correlata alla loro grande capacità d'adattamento enzimatico. Tutti i tipi di metabolismo esistenti compaiono nei batteri, che d'altra parte presentano peculiarità fisiologiche non presenti altrove: si possono citare l'azotofissazione (capacità di utilizzare  $N_2$  come fonte di N per le biosintesi) e la chemioautotrofia (utilizzo della  $CO_2$  per la sintesi di C organico sfruttando energia chimica).

La suddivisione in gruppi fisiologici (insieme di tutti i microrganismi in grado di condurre una determinata trasformazione), in contrapposizione ai gruppi solo tassonomici, è caratteristica della microbiologia ambientale: la funzione di un microrganismo in un ecosistema è soprattutto legata al biochimismo che può esprimere, all'apporto che può dare all'attività totale.

### 2.1.1 Le micorrize come bioindicatori

Le micorrize, uno degli esempi più suggestivi di simbiosi mutualistica, in cui entrambi i partner traggono reciproco profitto, sono l'associazione di funghi con le radici delle piante. I funghi simbionti rappresentano una tra le più diffuse comunità di microrganismi del suolo: essi hanno un ruolo fondamentale nel miglioramento della nutrizione minerale e dell'assorbimento dell'acqua, nonché nella protezione delle piante e dell'integrità del suolo (Smith e Read, 1997). In condizioni naturali la maggioranza di essi sembra essere simbionte obbligato con piccola o nessuna capacità di crescere in modo indipendente.

Si possono distinguere due grandi gruppi di funghi micorrizici: funghi ectomicorrizi-

ci (EM) e funghi endomicorrizici arbuscolari (AM). Un terzo gruppo di funghi endomicorrizici vive nell'apparato radicale di *Ericales* e molto spesso in terreni che sono generalmente considerati altamente perturbati per la maggioranza delle piante e dei funghi.

Negli ultimi anni si è cercato di verificare se i funghi simbiotici possano essere utilizzati come bioindicatori di situazioni di stress. I fattori di stress possono essere rappresentati da eccessi o deficienze di nutrienti, da un arricchimento di anidride carbonica, dalla presenza di metalli pesanti oltre che da numerosi altri fattori strettamente legati ad attività umane (Colpaert e Van Tichelen, 1994).

Le osservazioni finora riportate danno un quadro non ancora ben definito, in quanto in alcuni casi si sono registrate dirette relazioni tra funghi ectomicorrizici e declino della foresta, mentre in altre analisi non si sono riscontrate variazioni significative. Alcuni funghi ectosimbionti, per esempio, sono più sensibili che altri, ceppi diversi di una stessa specie possono addirittura avere differente comportamento nei confronti degli inquinanti (Smith e Read, 1997).

Per quanto riguarda le ectomicorrize, in base alle osservazioni sulla diminuzione del numero delle specie di funghi ectomicorrizici in foreste con danni visibili, o addirittura in declino, di diverse parti dell'Europa temperata, si è pensato che i cambiamenti nelle popolazioni di questi funghi siano conseguenza diretta o indiretta dell'inquinamento atmosferico.

Un esempio di studio sul declino di funghi ectomicorrizici e/o di micorrize in seguito all'inquinamento atmosferico è dato, infatti, dalle ricerche intraprese a lungo termine in parcelle permanenti in foreste di abete rosso, di querce e faggio nella Repubblica Ceca. Le analisi delle micorrize hanno confermato i dati ottenuti da quelle dei corpi fruttiferi. La percentuale delle specie ectomicorriziche e la proporzione delle micorrize attive sembrerebbero molto sensibili alle cause incidenti sugli ecosistemi forestali (inquinamento dell'aria, acidificazione, fertilizzazione); la loro diminuzione sembrerebbe in relazione inversa all'intensità di defogliazione degli alberi e potrebbe essere utilizzata per prevedere lo sviluppo degli eventi per lo meno in località comparabili. Molti di questi funghi potrebbero quindi essere considerati bioindicatori utili per rivelare cause incidenti sulla stabilità delle foreste.

Per quanto riguarda le endomicorrize arbuscolari, un esempio di studio su quelle presenti in habitat perturbati contrapposti ad habitat non perturbati è dato da un lavoro svolto in suoli tropicali australiani. I metodi usati per esaminare le popolazioni dei funghi AM comprendono la valutazione del numero delle spore e del loro "biovolume", tentativi di identificazione delle specie e l'isolamento di queste in *pot cultures*. Risposte diverse sono state ottenute in corrispondenza ai differenti metodi usati per rilevare i funghi. Sembra comunque che molte specie siano diffuse, mentre talune specie si possano trovare particolarmente in zone perturbate con un'abbondanza di spore e propaguli superiore a quella riscontrata in zone non perturbate. I risultati delle analisi per differenti generi di funghi AM davano una buona correlazione con il numero delle spore, ma non con i dati del biovolume, probabilmente in relazione alle differenze che questi funghi manifestano, a livello di genere ma anche di specie, nel loro sviluppo miceliare e nella produzione di spore.

In conclusione, nonostante il numero molto alto di segnalazioni, non sembra possibile affermare che i funghi simbiotici siano dei bioindicatori di stress ambientale con un significato universale come i licheni. Essi mostrano un ampio *range* di comporta-

mento per cui molto spesso vengono segnalati come organismi stress-tolleranti. Questo aspetto ha suscitato d'altro canto molto interesse, in quanto si è visto che è possibile isolare ecotipi fungini tolleranti a stress di tipo diverso (metalli pesanti, sali, eccesso di fertilizzazione). I funghi endomicorrizici sembrano essere più tolleranti a tali stress rispetto agli ectomicorrizici, probabilmente perchè la radice della pianta offre una nicchia più protetta. Inoltre, tra gli endomicorrizici, i funghi simbiotici delle *Ericales* rivestono particolare interesse: è da tempo noto che Ericacee sopravvivono come uniche specie vegetali anche in suoli fortemente inquinati da metalli pesanti. Anche se le basi biologiche di tale tolleranza sono sconosciute, tuttavia i miceli ericoidi sollevano un notevole interesse poiché, oltre a incrementare la crescita delle piante ospiti in presenza di concentrazioni tossiche di zinco o rame, riducono anche la concentrazione di tali elementi nelle parti aeree delle piante ospiti.

## 2.2 Rassegna e discussione delle metodiche

Innanzitutto, l'impiego dei microrganismi come bioindicatori può avvenire in due diverse ottiche:

- sperimentazione allestita appositamente per indagare l'effetto di un determinato inquinante;
- studio di un caso: essendo avvenuto o venendo sospettato un inquinamento, si studia la microflora per indagarne le ripercussioni.

Nel primo caso un piano sperimentale adeguato deve prevedere un controllo (tesi non trattata) e un trattato, allestiti nell'identico modo eccetto il trattamento con la sostanza inquinante. È buona norma prevedere più repliche sia del controllo che del trattato, per evidenziare il grado di variabilità insito. Il controllo e il trattato (o i trattati, per esempio con diverse dosi della sostanza) verranno indagati in parallelo dal punto di vista microbiologico, per rilevare eventuali differenze che verranno attribuite al trattamento.

L'aspetto più delicato dello studio di un caso reale è la scelta di un opportuno controllo. Dato che i vari aspetti della presenza e dell'attività della microflora ambientale possono variare nello spazio e nel tempo in relazione alle condizioni chimiche e fisiche (ambientali in senso lato) nelle quali i microrganismi si trovano a vivere, l'effetto di uno stress può essere dedotto solo dal confronto del comportamento dei microrganismi in presenza e non del fattore di perturbazione, nella situazione caratteristica di un dato momento per eliminare ogni altra causa di differenze. In altre parole, è difficile e delicato poter attribuire solo al fattore di stress la variazione nella situazione della microflora prima e durante, o dopo, l'azione dello stress stesso. La soluzione migliore sarebbe di poter individuare una zona di terreno che possa effettivamente rappresentare il controllo "non trattato" (cioè non inquinato) da poter analizzare in parallelo alla zona inquinata. Questo evidentemente presuppone che le diverse zone siano intrinsecamente simili come caratteristiche.

Un'ulteriore considerazione è che possiamo adottare come bioindicatore un microrganismo o gruppo microbico (o la loro attività) in base a diversi criteri:

- la loro importanza in generale, per esempio quantitativa, per l'ecosistema suolo;
- la loro importanza in casi particolari;

- la loro sensibilità ai fattori di stress in generale, che può permettere di rilevare effetti negativi non altrimenti dimostrabili: per esempio risultano molto sensibili, tra i batteri, i nitrificanti e i metanogeni.

Nel primo caso si potranno stimare, per esempio, le popolazioni microbiche nel loro insieme: batteri totali aerobi, batteri totali anaerobi (tuttavia normalmente minoritari rispetto agli aerobi), eumiceti totali (muffe e lieviti, ma nel terreno sono maggioritarie le muffe o ifomiceti).

Il secondo caso può per esempio presentarsi quando il suolo considerato si trovi in una particolare condizione (per esempio di asfissia che favorisca la microflora anaerobia) oppure quando si possa presumere o sospettare che la sostanza inquinante colpisca una determinata funzione o struttura e quindi i microrganismi che ne sono portatori (per esempio effetti sulla fotosintesi o sul metabolismo di un determinato composto).

Riguardo infine al tipo di metodica adottabile, si può realizzare uno studio di tipo "ecotossicologico" (il microrganismo è studiato nella sua situazione reale di componente di una comunità microbica organizzata presente in un ecosistema) che fornisce risultati più rappresentativi della realtà, oppure uno studio semplicemente tossicologico (con test *in vitro*).

La trattazione che segue è riferita al caso di sperimentazione allestita appositamente, ma, con ovvie varianti nei vari casi, può valere anche per lo studio di un evento inquinante. Ci si riferisce inoltre a situazioni di validità generale, non a casi particolari. Le micorrize, date le loro peculiarità, verranno trattate separatamente in specifici capitoli.

### 2.2.1 Ecotossicologia

Si saggia l'azione dell'inquinante sull'ecosistema *in toto* oppure su sue porzioni sufficientemente rappresentative (meso- o microcosmi). Nel caso del suolo, l'alternativa può essere fra sperimentazione in campo (parcelle trattate e non) e incubazione di quantitativi limitati di un terreno, trattati e non, in laboratorio in adatti contenitori.

Il primo caso richiede la disponibilità di un appezzamento sufficientemente esteso e in linea di massima anche di manovalanza e macchine per operazioni agricole. Ha il vantaggio della massima aderenza alla realtà, o almeno a una data realtà, ma lo svantaggio di essere realizzato in condizioni ambientali, pur rilevabili, non stabili e prefissate.

La sperimentazione su suolo incubato in laboratorio ha evidentemente il vantaggio della realizzazione in condizioni perfettamente programmabili e costanti; l'aderenza alla situazione reale dipende dai particolari del piano sperimentale. Un'alternativa intermedia fra campo e laboratorio può essere la sperimentazione in serra.

La reazione della microflora all'inquinamento viene indagata rilevando eventuali modificazioni di tipo qualitativo e/o quantitativo a carico dei microrganismi venuti a contatto per un certo tempo con lo stesso (per esempio, nelle parcelle trattate rispetto a quelle non trattate).

#### *Valutazioni quantitative*

Si determina il valore di alcuni parametri microbiologici che esprimono i diversi aspetti della presenza e dell'attività della microflora:

- entità di popolazione microbica: si può esprimere sotto forma di carica (numero di

cellule microbiche in 1 g di suolo peso secco; rappresenta una densità di popolazione), rilevabile mediante conte dirette al microscopio, oppure mediante la crescita in terreni colturali liquidi o gelificati (con l'aggiunta di agar) inoculati con quantità scalari di suolo; si può esprimere anche come biomassa (quantità in peso di cellule microbiche, anch'essa in 1 g di suolo);

- attività microbica: velocità di formazione di un determinato prodotto del metabolismo microbico o del consumo di un substrato, che esprime il livello dell'attività metabolica o di una particolare attività, condotta enzimaticamente dalla microflora.

Le determinazioni di carica utilizzano tecniche ormai consolidate e sperimentate, relativamente semplici da realizzare, anche se quelle colturali comportano l'impiego di una quantità rilevante di materiale (terreni colturali, vetreria); sono tuttavia affette, specie quelle colturali in liquido, da una spiccata e ineliminabile imprecisione statistica.

Le determinazioni di carica per via colturale trascurano i microrganismi cosiddetti non-coltivabili, gli altri tipi di determinazione sostanzialmente no: è in effetti dal confronto fra le tecniche colturali e non che è emersa infatti l'esistenza del grave problema della non coltivabilità. È tuttavia opinione di alcuni che questa popolazione quiescente non abbia un soverchio peso nel biochimismo totale della microflora nel suolo. Il gruppo dei coltivabili può comunque essere considerato una sorta di gruppo fisiologico e come tale la sua ricerca ha una indubbia validità pratica.

A rigore, non rientrano nella problematica della vera non-coltivabilità le semplici inadeguatezze delle varie metodiche colturali che, pur esistenti e difficilmente eliminabili, si può pensare siano superabili; il vero problema è la non-coltivabilità come caratteristica intrinseca di una forma microbica o di un particolare stadio vitale della stessa. È pur vero che nella pratica ambedue gli inconvenienti si sommano nel provocare sottovalutazioni delle cariche reali o della reale quantità di specie presenti.

Esistono numerose segnalazioni di stadi di non coltivabilità di specie comunemente coltivabili: è uno stadio particolare che non corrisponde a un danneggiamento della vitalità preliminare alla morte ed è reversibile tramite un processo, naturale o indotto, chiamato *resuscitation*. Oltre a questa non coltivabilità temporanea, è verosimile che esista una non-coltivabilità intrinseca di determinate specie, che potrebbero essere maggioritarie nell'ambiente. È evidentemente un fenomeno estremamente difficile da indagare con le tecniche consuete.

Le opportunità offerte dalle tecniche avanzate di tipo biochimico-genetico (per esempio sonde di acidi nucleici), che non sottostanno alla necessità di coltivazione delle cellule microbiche, sono molto promettenti per indagini qualitative ma più dubbie nel caso di determinazioni quantitative di carica o biomassa, a causa del numero di repliche del corredo in DNA estremamente variabile nelle varie fasi del ciclo vitale dei batteri.

Una determinazione di attività esprime più o meno da vicino l'apporto della microflora alla vita e alle caratteristiche dell'ecosistema suolo, una valutazione di entità di popolazione microbica esprime, oltre che la struttura microbiologica dell'ecosistema, una potenzialità di attività la cui reale estrinsecazione dipenderà anche dalle condizioni ambientali reali presenti in un dato momento o situazione.

#### *Metodi per valutazioni di tipo quantitativo*

Le conte microscopiche di microrganismi, specie in una matrice complessa quale il suolo, vengono comunemente effettuate con l'ausilio di particolari colorazioni (con

fluorocromi quali per esempio il DAPI o l'Arancio di Acridina) (Bloem *et al.*, 1995) che a volte, con maggiore o minore approssimazione, permettono di evidenziare cellule che possiedono effettivamente un'attività metabolica, oltre, in primo luogo, a permettere di distinguere le cellule dalle particelle non biologiche. È necessario l'impiego di un microscopio a epifluorescenza appositamente equipaggiato. Nonostante quanto disponibile ora in commercio, tali determinazioni restano comunque piuttosto delicate e specialistiche, oltre a richiedere una specifica attrezzatura. Si ritiene pertanto, nonostante i vantaggi dal punto di vista teorico rispetto alle cariche per via colturale, di non suggerirle in questo contesto e di rimandare comunque a bibliografia specifica quale il manuale sopra citato.

Per quanto riguarda le determinazioni di carica per via colturale, si suggerisce di considerare prioritariamente da un lato i principali gruppi microbici generici (batteri aerobi totali, batteri anaerobi totali, eumiceti totali), che sono rappresentativi della comunità microbica nella sua interezza, dall'altro due gruppi fisiologici, comunque non compresi nelle cariche totali, molto specializzati e sensibili a sostanze estranee: i batteri nitrificanti autotrofi nella generalità dei casi e i metanobatteri nel caso di terreni in anaerobiosi. Per i casi in cui si volesse ampliare l'indagine, o per l'esame di casi particolari, si riportano anche metodiche relative ad altri raggruppamenti, di tipo fisiologico. Qualora si ravvisasse l'opportunità di ricercare ulteriori gruppi, si può fare riferimento a validi manuali quale il *Methods of Soil Analysis* americano (Page, 1982). È comunque prevista la pubblicazione anche in Italia di un manuale al riguardo, a cura della Società Italiana della Scienza del Suolo.

In ogni caso l'indagine, che come già evidenziato deve possibilmente essere condotta in parallelo per il controllo e il trattato, inizia con il prelievo dei campioni di suolo da analizzare e nelle prime fasi è comune non solo alle determinazioni di carica dei vari gruppi microbici (tranne, per alcuni aspetti, i metanobatteri), ma sostanzialmente anche alle determinazioni di biomassa e attività.

Si deve anzitutto garantire la rappresentatività del campione rispetto all'intero oggetto d'indagine. Nel caso di suolo incubato in contenitori si può rimescolare il materiale prima del prelievo; nel caso di indagine in campo, conviene ottenere un campione medio per ogni zona, unendo quantità equivalenti di suolo prelevate in punti scelti con procedura casuale oppure distanziati regolarmente (i due criteri non coincidono). È opportuno considerare lo strato di terreno che si ritiene interessato dall'inquinamento. La quantità finale di terra di ogni campione deve essere indicativamente attorno al chilogrammo; si può scendere attorno ai 100 g nel caso si debba campionare una quantità molto limitata di terreno (per esempio in vaso). Si deve evitare di campionare in situazioni ambientali estreme o comunque poco caratteristiche, per esempio di temperatura e umidità del suolo. È bene non campionare nei pochi millimetri attorno a radici, dove esiste un ambiente particolare, la rizosfera, molto ricco di microflora specifica. Per le analisi che verranno menzionate, non è indispensabile l'assoluta sterilità dei materiali e delle procedure di prelievo: è sufficiente impiegare strumenti puliti, in ogni caso non trattati con agenti chimici persistenti.

Trattandosi di analisi relative a organismi viventi, si pongono problemi di conservazione del campione. In ogni caso non bisogna esporlo a congelamento o temperature indicativamente superiori a 50°C, nemmeno per brevi periodi, e occorre evitare l'asciugatura del campione (raccolgerlo in sacchetti, o contenitori rigidi, impermeabili



anche al vapor acqueo e sigillati senza spazio di testa). Se l'allestimento delle analisi non può essere completato entro poche ore dal prelievo, si deve conservare il campione a pochi gradi sopra lo zero.

Il campione arrivato in laboratorio va setacciato, nella sua interezza, a 2 mm prima dell'analisi. In tal modo si toglie il cosiddetto scheletro del suolo, poco rilevante per la presenza di microflora, e si sfrutta l'operazione per omogenizzare la massa.

A questo punto inizia la vera e propria determinazione di carica, che si basa normalmente sull'allestimento di una serie di diluizioni successive a base 10 (1:10) del campione. Da questo momento in poi si deve prevedere assoluta sterilità dei materiali e conseguenti precauzioni nelle manipolazioni. Un quantitativo di 10 g di suolo setacciato e rimescolato è aggiunto a 90 ml di acqua distillata o, meglio, di soluzione salina tampone di Winogradsky, più protettiva (in g/l d'acqua distillata:  $K_2HPO_4$  5,  $MgSO_4$  2,5, NaCl 2,5,  $Fe_2(SO_4)_3$  0,05,  $MnSO_4$  0,05; pH = 7). La piccola imprecisione dovuta al fatto che il volume finale raggiunto è minore di 100 ml è trascurabile nel contesto dell'intera analisi. Per un'efficace separazione delle cellule microbiche fra loro e dalle particelle del suolo, si può tritare il campione per qualche minuto in mortaio in ceramica oppure, con migliori risultati, trattarlo con omogenizzatori a lame rotanti tipo l'Omni-Mixer della Sorvall/DuPont o i Waring Blenders. Da questa prima diluizione si allestiscono le successive, in numero e con quantitativi in volume secondo le necessità delle semine da realizzare nei terreni colturali.

Aliquote normalmente di 1 ml delle opportune diluizioni vengono inoculate nelle provette dei terreni colturali liquidi oppure in piastre in cui verrà poi versato il terreno colturale agarizzato sciolto e raffreddato a circa 50°C (semina per inclusione). Si consiglia di inoculare per ogni analisi 3 provette/diluizione nel primo caso, 2 piastre nel secondo. Volendo migliorare la precisione delle rilevazioni, si possono prevedere più analisi di ogni campione.

Dopo il capovolgimento, una volta solidificato (in realtà gelificato) l'agar, si pongono le piastre in incubazione a temperatura (generalmente 28°C) e per un tempo appropriato. Nel caso di incubazioni superiori a pochi giorni, dal secondo in poi si porrà il materiale in contenitori chiusi, con una fonte d'umidità all'interno. Per la ricerca di gruppi anaerobi, normalmente si ricorre all'incubazione in contenitori con generatore di anaerobiosi tipo GasPak BBL o equivalenti.

La lettura dei risultati in piastra avviene mediante conteggio delle colonie cresciute: nel caso del suolo, si considerano già valide piastre con una decina di colonie ed è opportuno scartare piastre con troppe decine di colonie, ma ciò in relazione anche alle dimensioni delle stesse, che devono presentarsi ben distanziate fra loro. Si divide poi il numero medio di colonie per il fattore di diluizione relativo alle piastre considerate ( $10^{-x}$ ) e si ottiene il numero di cellule, o unità formanti colonia (UFC), per grammo di campione.

Nel caso di terreno colturale liquido, una volta rilevato in ogni provetta se è avvenuta crescita, la procedura è più complessa essendo una stima probabilistica; può essere così sintetizzata: 1) prendere come riferimento la diluizione più spinta in cui tutte le provette mostrano crescita, o comunque la prima diluizione a disposizione se vi sono già negatività, 2) rilevare il numero di positività per tale diluizione e per le due successive, 3) rilevare dall'apposita tabella del MPN (tabella 2.1) il corrispondente numero di microrganismi per ml, 4) dividere tale numero per il fattore di diluizione della diluizione di riferimento per ottenere il MPN/g.

N. positività nella serie di tre diluizioni	MPN / ml della diluizione di riferimento	N. positività nella serie di tre diluizioni	MPN / ml della diluizione di riferimento
000	0,0	222	3,5
001	0,3	223	4,0
010	0,3	230	3,0
011	0,6	231	3,5
020	0,6	232	4,0
100	0,4	300	2,5
101	0,7	301	4,0
102	1,1	302	6,5
110	0,7	310	4,5
111	1,1	311	7,5
120	1,1	312	11,5
121	1,5	313	16,0
130	1,6	320	9,5
200	0,9	321	15,0
201	1,4	322	20,0
202	2,0	323	30,0
210	1,5	330	25,0
211	2,0	331	45,0
212	3,0	332	110,0
220	2,0	333	140,0
221	3,0		

Tabella 2.1 - Tavola di Mc Crady per la stima del Most Probable Number (MPN) con 3 provette per diluizione.

Ogni carica va poi riferita a grammi di peso secco, determinando in parallelo all'analisi la frazione di secco nel campione di suolo esaminato.

Una volta rilevate le cariche microbiche, è necessario procedere al loro confronto per verificare se alcune sono effettivamente superiori ad altre. Data la spiccata variabilità statistica insita in tali determinazioni di carica, si deve essere in grado di escludere che la differenza fra cariche possa essere dovuta alla sola variabilità casuale: quando si siano effettuate più di una analisi su ogni campione, si possono adottare le consuete elaborazioni statistiche quale l'analisi della varianza. Qualora si debbano confrontare fra loro singoli dati, valutazioni statistiche, applicate a serie di analisi da noi effettuate, hanno mostrato che non si può ritenere una carica in piastra effettivamente superiore

a un'altra se la prima non sia almeno 2-3 volte superiore come numero; nel caso di terreni colturali liquidi (MPN in tripla serie di provette) la prima dev'essere almeno 15 volte superiore.

Per quanto riguarda la procedura per i singoli gruppi microbici, la ricerca dei batteri aerobi totali e dei batteri anaerobi totali può essere effettuata in piastra con un terreno colturale agarizzato a base di estratto di terra. Questo viene ottenuto mescolando in pesi uguali acqua e terra di giardino o incolta con pH attorno alla neutralità, estraendo a caldo in autoclave a 130°C per 1 ora, filtrando su strato di cotone idrofilo e infine chiarificando mediante centrifugazione a 5000 x g per 20 min. A tale estratto si devono aggiungere 1 g/l ciascuno di estratto di lievito e di D-glucosio, nonché agar 14 g/l; si deve regolare il pH a 7,5 circa e sterilizzare a 121°C / 15 min. Occorre allestire piastre per inclusione dalle diluizioni da 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-9</sup> e incubare a 28°C, per 15 giorni per gli aerobi e per 20 giorni in anaerobiosi per gli anaerobi.

Per gli eumiceti, si devono allestire piastre per inclusione dalle diluizioni da 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-7</sup> con Agar Malto (disponibile anche in commercio): in g/l, estratto di malto in polvere 30, agar 15; pH 5,5. Si aggiungono 100 mg/l di cloramfenicolo per inibire i batteri e si sterilizza a 121°C / 15 min. Si incuba a 28°C per 7 giorni. Può essere opportuno effettuare una prima rilevazione delle colonie a circa 3 giorni, prima che le stesse possano invadere completamente le piastre.

Per i nitrificanti autotrofi, comprendenti in realtà due gruppi, i nitrosanti che ossidano l'ammonio a nitrito e i nitrificanti che ossidano tale nitrito a nitrato, si suggerisce di conteggiare normalmente i soli nitrosanti come rappresentativi di ambedue. Si impiega un terreno di coltura minerale: soluzione di Winogradsky (vedi paragrafo: Metodi per valutazioni di tipo quantitativo-allestimento delle diluizioni) 50 ml, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 g, CaCO<sub>3</sub> 1 g, H<sub>2</sub>O distillata 950 ml; pH 7,5; si distribuisce in provette dal diametro di 16 mm (2 ml/cad.), si sterilizza a 110°C/20 min. La soluzione di Winogradsky deve contenere anche 1 ml/l di soluzione di oligoelementi: in mg/l d'acqua distillata, potassio molibdato, sodio borato, cobalto nitrato, cadmio solfato, rame solfato, zinco solfato e manganese solfato 50/cad., FeCl<sub>3</sub> 100. Si seminano le diluizioni da 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-7</sup>, si incuba a 28°C/40 gg. La positività viene poi rilevata mediante aggiunta in ogni provetta di reattivo alla difenilamina (sciogliere 1 g di difenilamina in 100 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 95%, versare in 20 ml di acqua distillata): a poche gocce di coltura bisogna aggiungere dapprima 0,5 ml di acido solforico 95%, poi 1,5 ml di reattivo. Un colore blu cupo indica positività (crescita di nitrificanti).

Per gli azotofissatori aerobi, si consiglia la ricerca degli *Azotobacter*, i più tipici e specifici tra gli aerobi nei nostri climi. Si può impiegare un terreno colturale agarizzato: in g/l, D-glucosio 5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,8, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,2, FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,04, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O 0,005, CaCl<sub>2</sub> anidro 0,15, agar 15; pH 6,8, sterilizzazione a 121°C/15 min. Glucosio e fosfato vanno sciolti in una piccola parte dell'acqua, sterilizzati per filtrazione e aggiunti in piastra prima di colarvi il terreno colturale a 50°C circa. In questo caso, è opportuno realizzare una semina superficiale: immettere in piastra e lasciar gelificare il terreno colturale, far asciugare lievemente la superficie lasciando a 37°C per un giorno o a 60°C per circa un'ora, spargere sulla superficie solo 0,2 ml delle diluizioni da 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup> curando che il liquido asciughi entro qualche decina di minuti. Incubare a 28°C per 7 gg. Si ricercano le colonie bianche, mucose e lucide larghe più di qualche millimetro; si confermano mediante osservazione al microscopio a contrasto di fase:

le cellule di *Azotobacter* sono tondeggianti o ovoidali, larghe qualche micron, contenenti granuli di poli-idrossibutirrato dall'aspetto rifrangente. Dividere il numero medio di colonie per 0,2 oltre che per il fattore di diluizione.

Per gli azotofissatori anaerobi (alcune specie di Clostridi), si impiega un terreno culturale liquido (per litro di acqua distillata,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,75 g, D-glucosio 10 g, estratto di terra, come in "batteri totali", 10 ml,  $\text{CaCO}_3$  0,05 g, fenosafranina 0,2% in acqua 8 ml, soluzione di oligoelementi e di Winogradsky, come in "nitrificanti", rispettivamente 1 e 50 ml, NaOH 0,1 N 33 ml e comunque fino a portare il pH a 7 circa). Si distribuisce in provette da 16 mm, 10 ml/cad., si aggiunge una campanella di Durham e si passa in autoclave a vapore fluente (100°C) per 20 min. Si seminano le diluizioni da  $10^{-1}$  a  $10^{-9}$ , si incubano le colture in anaerobiosi 28°C/30 giorni. La positività di crescita è indicata da una consistente bolla di gas e dal viraggio dell'indicatore redox fenosafranina.

Per gli ammonificanti, si può impiegare un terreno culturale liquido (in 950 ml di acqua distillata, soluzione di Winogradsky e di oligoelementi, come in "nitrificanti", rispettivamente 50 e 1 ml, L-asparagina 0,2 g); pH 6,8, si distribuisce in provette da 20 mm 10 ml/cad., si sterilizza a 110°C/20 min. Si inoculano le diluizioni da  $10^{-3}$  a  $10^{-9}$ , si incubano a 28°C/15 gg. In 1 ml di coltura si introducono 2 gocce di reattivo di Nessler (preparato unendo in volumi uguali due soluzioni, l'una di  $\text{HgI}_2$  50 g/l e KI 36,5 g/l, l'altra di KOH 150 g/l): la positività di crescita è indicata da una colorazione arancio più o meno spiccata.

Per quanto riguarda i metanobatteri, la metodica differisce innanzitutto per alcuni aspetti dell'usuale campionamento del suolo, data la frequenza di forme microbiche ossigeno-sensibili. Bisogna limitare quindi al minimo il contatto del campione con l'aria, riponendolo in sacchetti di plastica poi lavati con miscela anaerobica (per esempio  $\text{N}_2$ ), oppure, nel caso di suoli sommersi, prelevandolo con un contenitore che possa venir chiuso in sommersione. È necessario portarlo al più presto in condizione di refrigerazione al laboratorio per porre il materiale in anaerobiosi rigorosa (per esempio in apposite cabine in cui la tensione di  $\text{O}_2$  viene abbassata a circa 30 ppm v/v). Operando nella cabina anaerobica, le diluizioni decimali verranno allestite in soluzione salina di Aranki (Trypticase Soy Broth in polvere 30 g,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0,42 g, L-cisteina-HCl 0,5 g,  $\text{H}_2\text{O}$  distillata 1 l; pH = 7) preridotta per 48 h. Con le diluizioni da  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  si inoculano mediante siringa *vial* sigillati contenenti Todd Hewitt Broth addizionato di Na-acetato e Na-formiato (ambedue, 2,5 g/l) e portato a pH 7. Il terreno culturale sarà stato preparato in cabina con acqua preridotta per 48 h (altri componenti: 2 h); tale terreno va distribuito in ragione di 20 ml in *vial* da 50, i *vial* vanno sigillati con tappi in gomma butilica e ghiera di serraggio ed estratti dalla cabina per la sterilizzazione a 115°C/20 min. Dopo inoculo delle diluizioni nei *vial*, si lava lo spazio di testa e si manda in sovrappressione (2 atm. assolute) con miscela  $\text{H}_2\text{-CO}_2$  8:2 v/v mediante un ago collegato ad apposita bombola. L'incubazione avviene a 37°C per i mesofili e a 55°C per i termofili, per 20 gg. Sarà considerato positivo ogni *vial* nel quale sia rilevabile gascromatograficamente metano.

Per la valutazione della biomassa microbica, si suggerisce di ricorrere al metodo cosiddetto fumigazione-estrazione. Aliquote di 30 g di suolo, setacciato a 4 mm, vengono sottoposte a fumigazione sotto vuoto con cloroformio per 24 h al buio. Dopo allontanamento del cloroformio, sul campione fumigato e su una aliquota non fumigata si effettua l'estrazione del carbonio organico con una soluzione di  $\text{K}_2\text{SO}_4$  1 M in acqua,

sotto agitazione per 30 min. Si procede poi alla filtrazione su carta e alla valutazione del carbonio organico mediante ossidazione a caldo con  $K_2Cr_2O_7$  e successiva titolazione del bicromato in eccesso con  $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$ .

Per quanto riguarda le attività microbiche, si consiglia lo studio di un'attività totale, la respirazione come produzione di  $CO_2$ , e di una specifica e particolarmente sensibile agli agenti inquinanti, la nitrificazione autotrofa. Ai fini di una corretta valutazione delle diverse attività biologiche, è necessario innanzitutto effettuare un condizionamento a temperatura ambiente per 2-3 giorni del campione di suolo conservato a bassa temperatura. La valutazione dell'attività respiratoria va condotta su aliquote di 50 g di suolo, portato al 50 % della capacità idrica massima, poste in vasi di vetro della capacità di 1 litro contenenti inoltre un beaker con un'opportuna quantità di KOH 1 N. Si pone a incubare al buio a 25°C per 10 gg. Si titola quindi l'eccesso di KOH, non neutralizzato dalla  $CO_2$  svolta, con HCl 0,5 N al punto di viraggio della fenoltaleina e del metilarancio.

L'attività nitrificante viene valutata su aliquote di 20 g di suolo addizionato di 250 mg N/kg s.s. di suolo sotto forma di  $(NH_4)_2HPO_4$  e incubato a 25°C al buio. A 20 gg d'incubazione il nitrato formatosi viene estratto mediante agitazione per 30 minuti con una soluzione di KCl 1 M. Dopo filtrazione su carta si determina il contenuto in nitrato coi correnti metodi (per esempio elettrodo specifico, metodo alla brucina, metodo alla sulfanilamide e naftilendiamina previa riduzione a ione nitroso). È indispensabile valutare il contenuto iniziale di nitrato nel suolo considerato. Per studiare l'andamento della nitrificazione nel tempo (curva di nitrificazione), è necessario prevedere tante aliquote di suolo da incubare quante sono le scadenze previste (per esempio 0, 1, 2, 4, 8, 16, 20 giorni).

#### *Valutazione di aspetti qualitativi e metodi*

Si può per esempio studiare la variazione delle caratteristiche della comunità microbica mediante:

- identificazione delle specie microbiche presenti (perlomeno quelle prevalenti); si possono impiegare le classiche metodiche di tipo colturale (per esempio isolare e studiare le colonie cresciute su piastre seminate con diluizioni del suolo) oppure le metodiche avanzate di tipo biochimico-genetico (per esempio sonde di acidi nucleici, sequenziamento del rRNA 16S); queste ultime possono permettere, con l'aiuto della PCR (Polymerase Chain Reaction), di evidenziare ed entro certi limiti di studiare anche forme microbiche non-coltivabili;
- valutazione generica della biodiversità microbica: forme microbiche isolate vengono sottoposte a una serie di test, per esempio di tipo fisiologico (per esempio mediante kit commerciali tipo API o simili), per avere indicazioni di massima sul numero di forme microbiche diverse presenti, anche senza arrivare a una completa identificazione;
- caratterizzazione fisiologica della comunità microbica nel suo insieme (*fingerprinting* metabolico): si sottopone a una serie di test fisiologici (per esempio una serie di 95 test nel caso del sistema Biolog) l'intera comunità microbica, seminando una certa quantità del suolo stesso invece che singole forme microbiche da questo isolate, per evidenziare la diversificazione all'interno della microflora nella capacità di utilizzare substrati.

L'**identificazione delle specie microbiche** con metodiche colturali è generalmente un'indagine molto lunga e laboriosa. Si tratta di studiare dal punto di vista morfologico, e per i batteri soprattutto fisiologico, in svariati e appropriati terreni colturali, i singoli ceppi isolati, riferendosi a opportune chiavi tassonomiche e a specifici manuali quali il *Bergey's Manual* (Holt *et al.*, 1994) per i batteri e quello di Funder (1968) per gli eumiceti. Esistono kit commerciali per una indicativa identificazione di batteri e lieviti di vario tipo (per esempio gli API), ma appaiono limitati pressochè esclusivamente a microrganismi d'interesse igienico e medico.

Le metodiche avanzate come le sonde e il sequenziamento di RNA o DNA, pur già piuttosto sviluppate e impiegate presso centri di ricerca, sono ancora troppo specialistiche. Sono di recente introduzione in commercio alcuni sistemi piuttosto costosi basati su sonde (per esempio i GENE-TRAK), tuttavia anch'essi sostanzialmente limitati al campo igienico-medico. In ogni caso, ditte quali la tedesca DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen - Braunschweig) offrono un servizio di identificazione anche con tecniche avanzate, a prezzi non proibitivi.

Alcuni autori hanno cercato una soluzione alla notevole complessità dell'identificazione completa delle forme microbiche attraverso una semplificata **valutazione dei biotipi presenti**, sufficientemente diversi fra loro come caratteristiche morfo-fisiologiche, con un numero limitato di test quali quelli dell'API System. Questo permette di confrontare con buona approssimazione l'entità di biodiversità presente in diversi campioni di suolo, nonché di saggiare l'eventuale similitudine delle forme microbiche presenti in essi.

Da diversi anni infine è entrato in uso un originale approccio allo studio delle caratteristiche fisiologiche della comunità microbica (in particolare batterica) nel suo insieme, che non passa attraverso l'isolamento e il successivo studio delle singole forme microbiche, identificate o non: un **fingerprinting metabolico dell'intera comunità**. Questo si basa sulla semina di sospensioni del suolo in esame (quindi dell'intera comunità microbica presente) in kit tipo i *Biolog*, comprendenti un centinaio di terreni colturali caratterizzati da diverse fonti di carbonio per la crescita. Diventano dominanti nei diversi terreni colturali forme batteriche diverse, che evidenziano la specifica capacità metabolica. Non passando attraverso un preliminare isolamento, vengono considerati pochi cicli vitali con limitate possibilità quindi di adattamenti particolari: ciò si ritiene dia informazioni più aderenti al reale comportamento delle varie forme microbiche nella situazione naturale.

### 2.2.2 Tossicologia

Si può confrontare il comportamento in presenza dell'inquinante a una certa dose e in sua assenza, di colture microbiche pure, di collezione o isolate da un particolare suolo, in terreno colturale liquido o gelificato. Le tecniche impiegabili sono quelle consolidate nel saggio di disinfettanti, antibiotici e tossici microbici in genere, per esempio:

- rilevazione della sopravvivenza del microrganismo al contatto per un dato tempo con una certa concentrazione dell'inquinante (effetto biocida);
- studio delle caratteristiche della crescita in presenza e non del composto: determinazione della minima concentrazione inibente (MCI) oppure confronto dell'entità della crescita o della curva di crescita in presenza dell'inquinante rispetto alla sua assenza.

Il secondo approccio appare particolarmente adatto allo studio dell'effetto di inquinanti ambientali, che raramente hanno rapidi effetti mortali, paragonabili a quelli di sostanze come la formaldeide o il cloro, su forme viventi in generale fra le più resistenti, quali sono i microrganismi. Semplici tecniche per realizzare test in quest'ottica sono per esempio:

- striscio di una sospensione microbica su terreno colturale agarizzato contenente e in parallelo non contenente la sostanza da saggiare: la mancata o ritardata crescita, o comunque la diversità nella crescita, sulla piastra trattata rispetto al controllo non trattato indicano l'effetto della sostanza sul microrganismo;
- inoculo di diluizioni successive della sospensione microbica in due serie di piastre, una trattata e l'altra non: questa variante più complessa della tecnica precedente permette di valutare la frazione di cellule non in grado di crescere in presenza dell'inquinante testato o di quantificare ritardi della crescita nel tempo, quindi di studiare dettagliatamente effetti inibenti parziali;
- inoculo del microrganismo in terreno colturale liquido, anche in tal caso trattato e non, per confrontare le caratteristiche della crescita: se il mezzo colturale è di per sé sufficientemente limpido, si può seguire la crescita col semplice e rapido metodo turbidimetrico.

### 2.2.3 Studio delle simbiosi microrganismi-piante

In questo caso si esce dal contesto puramente microbiologico: viene studiato un microrganismo, ma in una situazione di stretta relazione con un organismo di tipo completamente diverso, il che può cambiare sostanzialmente il comportamento. Un esempio vistoso di tali differenze è la spiccata suscettibilità a erbicidi solfonilureici della nodulazione da rizobio, attribuibile alla fitotossicità dei composti. Si può considerare una simbiosi importante e diffusa, quella micorrizica nei suoi vari tipi (ectomicorrize e varie endomicorrize).

#### 2.2.3.1 Ectomicorrize

Si cerca di determinare l'azione dell'inquinamento su un ecosistema forestale, scegliendo parcelle rappresentative che comprendano alberi con danni evidenti (rami secchi, defogliazione ecc.) e, possibilmente, parcelle con alberi senza danni visibili come controllo. La reazione dei funghi ectosimbionti all'inquinamento può essere indagata rilevando eventuali modificazioni di tipo qualitativo e/o quantitativo in ambedue i tipi di parcelle.

*Valutazioni qualitative.* Nelle parcelle, contemporaneamente alla determinazione dei corpi fruttiferi dei funghi ectomicorrizici rinvenuti nel corso di alcune stagioni, vengono fatte analisi sulle micorrize per identificarle. L'identificazione delle micorrize avviene con l'esame macro- e microscopico delle loro strutture (tipo di ramificazione, ife miceliari libere, mantello fungino, reticolo di Hartig) (Agerer 1995, Brundrett *et al.*, 1996). Nel caso in cui le micorrize rinvenute siano state già descritte in letteratura, l'identificazione può risultare abbastanza facile; in caso contrario, è necessario cercare di risalire al fungo simbiote loro produttore mediante lo studio di somiglianze ed eventualmente di connessioni tra le micorrize non ancora note e le specie di funghi i cui corpi fruttiferi siano presenti nelle immediate vicinanze. Comunque, anche se non si può giungere all'esatta identificazione di tutte le mi-

corrizze trovate, si può giungere a una valutazione approssimativa della biodiversità micorrizica.

I funghi EM includono specie di Ascomiceti e di Basidiomiceti e il genere *Endogone* degli Zigomiceti. Per una caratterizzazione più precisa rivolta a singole specie di funghi si può ricorrere alla sperimentazione in laboratorio condotta mediante sintesi micorriziche in presenza dell'inquinante. Le sintesi possono essere ottenute in condizioni di sterilità *in vitro* oppure in condizioni di semisterilità in vaso, ma in questi casi si è molto lontani dalla situazione in cui i due partner si trovano in natura. Condizioni un po' più aderenti alla realtà si possono avere con sintesi micorriziche controllate, ma sperimentate in vivaio o in campo. Le sintesi *in vitro* o in vaso si ottengono inoculando il fungo da saggiare in contenitori o in vasi dove si sviluppano piantine ottenute da semi o da talee o da micropropagazione. L'inoculo fungino può essere costituito da frammenti di corpo fruttifero, da spore oppure da micelio (coltivato in coltura pura). Per specie fungine che producono rilevanti quantità di spore o che si sviluppano facilmente in coltura pura consentendo una loro produzione massiva, la sperimentazione in vivaio o in campo può avvalersi di tecnologie già applicate con successo (Brundrett *et al.*, 1996).

*Valutazioni quantitative.* Analogamente a come si opera per le valutazioni qualitative, nelle parcelle si valuta sia il numero dei corpi fruttiferi di ciascuna specie rinvenuta, sia il numero delle micorrizze di ciascuna forma identificata. Per quantificare le radici ectomicorrizzate nei campioni sono riportati in letteratura vari metodi (Brundrett *et al.*, 1996). Anche in questo caso si può ricorrere alla sperimentazione in condizioni di sterilità *in vitro*, in condizioni di semisterilità in vaso oppure, in condizioni più aderenti alla realtà, in vivaio o in campo.

#### 2.2.3.2 *Endomicorrize arbuscolari*

Analogamente a quanto detto per le ectomicorrize, la reazione dei funghi endosimbionti AM all'inquinamento può essere indagata rilevando eventuali modificazioni di tipo qualitativo e/o quantitativo. Il metodo di campionamento per queste analisi è importante e basato, anche in questo caso, sulla scelta di parcelle rappresentative che comprendano piante visibilmente sofferenti e parcelle con piante senza danni visibili come controllo. Particolarmente utile nel caso delle endomicorrize arbuscolari è la sperimentazione in laboratorio.

*Valutazioni qualitative.* Nelle parcelle si procede al prelievo di campioni di radici e di suolo. I funghi AM non producono generalmente strutture sulla superficie del terreno. Anzi una parte delle strutture prodotte dai funghi AM spesso non sono visibili all'osservazione macroscopica perchè contenute all'interno della radice. Possono quindi essere necessarie operazioni di schiarimento e/o di colorazioni delle radici micorrizzate per l'osservazione microscopica, più di quanto non sia necessario per l'osservazione dei funghi EM. Per schiarire e per colorare le radici micorrizzate vengono utilizzati vari metodi a seconda del tipo di radice (Brundrett *et al.*, 1996). Oltre alle strutture interne (ife, gomitoli, arbuscoli, talvolta vescicole) i funghi AM producono un reticolo di ife libere e spore nel suolo circostante le radici micorrizzate. Criteri tassonomici che possono aiutare a identificare i funghi AM includono il tipo di formazione, struttura e ornamentazione della parete e aggregazione delle spore, nonché il tipo di colonizzazione del fungo all'interno delle radici (Morton *et al.*, 1995; Brundrett *et al.*, 1996). I funghi AM sono Zigomiceti dell'ordi-



ne Glomales; essi sono simbiotici mutualistici obbligati per cui è impossibile coltivarli in coltura pura e la loro riproduzione è possibile solo in presenza di una pianta ospite. È quindi particolarmente utile, e spesso essenziale, per l'isolamento e l'identificazione delle singole specie e per le prove con queste in presenza dell'inquinante la sperimentazione in laboratorio condotta mediante sintesi micorriziche in vaso (*pot cultures*) e/o sintesi *in vitro* con piante "trappola" quali trifoglio, sorgo, orzo ecc. (Brundrett *et al.*, 1996).

*Valutazioni quantitative.* Analogamente alle valutazioni qualitative, si procede al prelievo di campioni nelle parcelle. La valutazione quantitativa viene fatta su radici recise, colorate (per mettere in evidenza la colonizzazione fungina al loro interno) e osservate al microscopio per il conteggio con metodi basati sull'intersezione di tratti infungati con un reticolo (Brundrett *et al.*, 1996). Negli stessi campioni può essere valutato il numero delle spore delle specie presenti. Gli stessi metodi vengono utilizzati nel caso delle prove controllate di sintesi *in vitro* o in vaso.

## 2.3 Esempi

### 2.3.1 Nostre ricerche

Una prima sperimentazione, appositamente allestita e condotta congiuntamente presso la Sezione Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica del DISTAM e la Sezione Chimica e Biochimica del Suolo del DIFCA, ha riguardato la tossicità per i microrganismi del suolo di un erbicida solfonilureico, il bensulfuron-metile. Due suoli dalle caratteristiche diverse soprattutto per pH e contenuto in C organico (suolo A, rispettivamente 7,6 e 2,1%, suolo B, 5,5 e 0,7%) sono stati incubati in laboratorio in contenitori aperti, a 25°C per un totale di 4 settimane, mantenuti al 50% della capacità idrica massima, dopo trattamento (di diverse aliquote) con 0, 0,016 (equiparabile alla dose agronomica), 0,16 e solo per il suolo B 1,6 ppm di principio attivo.

Alle scadenze di 1 e 4 settimane, il suolo è stato campionato per la determinazione da un lato delle cariche dei principali gruppi microbici generici e fisiologici e dall'altro di due attività microbiche. Le tabelle 2.2, 2.3 e 2.4 sintetizzano i risultati ottenuti e l'elaborazione degli stessi mediante analisi della varianza e test di Duncan. Solo per i cellulolitici, e nel solo caso del suolo A, è risultata evidenziata significatività in relazione al trattamento, confermando la riduzione delle cariche sotto l'effetto del bensulfuron. Per quanto riguarda le attività microbiche, la sola nitrificazione nel suolo B è risultata inibita in misura sensibile, oltre che significativamente all'analisi statistica, ma solo da concentrazioni dell'erbicida superiori a quelle che possono derivare da un normale trattamento agronomico.

Si è potuto concludere che il bensulfuron-metile, arrivato sul suolo, ha solo limitati effetti negativi sulla microflora presente e sulla sua attività, anche a concentrazioni sensibilmente superiori a quelle che possono essere presenti con il normale impiego agronomico. Questo concorda sostanzialmente con quanto rilevato in altre ricerche, che hanno riguardato dieci delle ventun solfoniluree esistenti.

Una seconda ricerca, che costituisce un esempio di studio di un caso reale, ha riguardato la caratterizzazione microbiologica dei suoli degli ecosistemi forestali monitorati dall'ARF-Lombardia in Val Gerola e Val Masino. Nella primavera del 1994 ana-

	1 settimana			4 settimane		
	0	0,016	0,16	0	0,016	0,16
Batteri aerobi	7,88 a	7,91 a	8,01 a	8,17 a	8,24 a	8,07 a
Batteri anaerobi	6,06 a	5,93 a	5,81 a	6,12 a	5,77 a	6,01 a
Eumiceti	4,39 a	4,29 a	4,45 a	4,09 a	4,13 a	4,13 a
Azotofiss. aerobi	2,09 a	1,85 a	2,09 a	1,61 a	1,82 a	1,87 a
Azotofiss. anaerobi	4,00 a	4,15 a	4,12 a	4,07 a	4,33 a	4,17 a
Nitrosanti	5,11 a	5,19 a	4,87 a	4,85 a	5,15 a	4,84 a
Cellulos. aerobi	3,83 b	3,65 b	3,06 a	3,91 b	3,25 a	3,07 a
Cellulos. anaerobi	3,40 a	3,65 a	3,91 a	3,65 b	3,56 b	3,10 a

**Tabella 2.2** - Cariche microbiche nel suolo A incubato per 1 e 4 settimane in presenza di diverse concentrazioni (0, 0,016 e 0,16 ppm) di bensulfuron-metile, espresse come Log n. cell. (UFC o MPN) / g peso secco. Ogni dato rappresenta la media logaritmica di sei indipendenti determinazioni. Per ogni gruppo microbico, separatamente per ogni tempo d'incubazione, lettere uguali contrassegnano medie non significativamente differenti secondo il test di Duncan ( $p \leq 5\%$ ).

	1 settimana				4 settimane			
	0	0,016	0,16	1,6	0	0,016	0,16	1,6
Batteri aerobi	7,31	7,36	7,35	7,28	7,34	7,29	7,21	7,35
Batteri anaerobi	6,06	6,20	5,95	6,16	6,11	6,17	5,96	6,00
Azotofiss. aerobi	assenti	assenti	assenti	assenti	assenti	assenti	assenti	assenti
Nitrosanti	4,21	4,48	4,23	3,98	3,69	3,82	3,87	3,66
Cellulos. aerobi	2,57	2,14	2,53	2,71	2,98	3,03	2,90	3,07
Cellulos. anaerobi	2,41	2,02	2,08	2,59	1,74	1,40	1,74	1,76

**Tabella 2.3** - Cariche microbiche nel suolo B incubato per 1 e 4 settimane in presenza di diverse concentrazioni (0, 0,016, 0,16 e 1,6 ppm) di bensulfuron-metile, espresse come Log n. cell. (UFC o MPN) / g peso secco. Ogni dato rappresenta la media logaritmica di sei indipendenti determinazioni. Sia a 1 che a 4 settimane, per ogni gruppo microbico l'analisi della varianza non ha evidenziato differenze significative attribuibili al trattamento con l'erbicida.

lisi preliminari di terreno sottostante a singoli abeti che mostravano un maggiore (+T) grado di trasparenza della chioma o minore (-T) hanno rilevato, ma solo in alcuni casi, cariche microbiche minori e accumulo di sostanza organica non mineralizzata in corrispondenza di alcuni alberi +T (tabella 2.5).

Una successiva campagna di prelievi, più articolata, è stata condotta nella primavera del 1995, prelevando suolo in corrispondenza di zone con prevalenza rispettivamente di piante +T e -T, in tre diversi punti per ciascuna zona. I risultati sono riportati in tabella 2.6.

Suolo - attività - tempo	Dosi fra le quali esiste differenza statisticamente significativa	Entità della differenza vs. controllo
<b>Suolo I</b>		
Respirazione - 1 settimana	(nessuna)	-
Respirazione - 4 settimane	(nessuna)	-
Nitrificazione - 1 settimana	0,16 vs. 0	- 4%
Nitrificazione - 4 settimane	0,16 vs.0	-5%
<b>Suolo II</b>		
Respirazione - 1 settimana	1,6 e 0,16 vs.0	- 3 - 4%
Respirazione - 4 settimane	(nessuna)	-
Nitrificazione - -3, -40, -60%	1 settimana col crescere della dose	ogni dose vs.0
Nitrificazione - 4 settimane	ogni dose vs.0	-3, -20, -30% col crescere della dose

**Tabella 2.4** - Sintesi dei risultati dello studio di due attività microbiche nei due suoli incubati per 1 e 4 settimane dopo trattamento con diverse dosi di bensulfuron-metile: 0, 0,016, 0,16 e per il suolo B anche 1,6 ppm. È indicato quali trattamenti hanno provocato differenze di attività statisticamente significative nei confronti del controllo e, nel caso di significatività, l'entità della differenza di attività nel suolo trattato rispetto al controllo.

Gruppo microbico	Località - sottozona o area e stato della chioma					
	Val Gerola				Val Masino	
	B,-T	B,+T	G,-T	G,+T	VM,-T	VM,+T
Batteri aerobi	<u>4,6x10<sup>7</sup></u>	9,7x10 <sup>6</sup>	<u>1,4x10<sup>7</sup></u>	5,9x10 <sup>6</sup>	3,0x10 <sup>7</sup>	3,2x10 <sup>7</sup>
Eumiceti	4,0x10 <sup>5</sup>	3,1x10 <sup>5</sup>	3,6x10 <sup>5</sup>	3,3x10 <sup>5</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>	6,5x10 <sup>3</sup>
Azotofiss. aerobi	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	6
Azotofiss. anaerobi	6,8x10 <sup>2</sup>	1,5x10 <sup>3</sup>	39	39	n.r.	4
Nitrosanti autotrofi	38	23	n.r.	n.r.	<u>5,5x10<sup>3</sup></u>	12
pH in H <sub>2</sub> O	4,10	4,10	4,30	4,15	5,45	7,50
pH in KCl	3,30	3,20	3,35	3,15	4,15	6,85
C organico (%)	8,7	11,5	6,1	8,6	3,2	5,9

**Tabella 2.5** - Cariche microbiche (n° cell. / g s.) e valori di due parametri chimici, rilevati nei campioni di suolo del prelievo del 1994 effettuato sotto ad abeti con chioma meno trasparente (sigla: -T) e più trasparente (+T) nei pressi di due sottozone o aree di saggio in Val Gerola (B e G) e nei paraggi del campo da tennis a Bagni di Masino (VM). Sono sottolineate le cariche da considerarsi effettivamente maggiori in base all'Errore del Metodo (Cavatorta et al., 1968), nel confronto col rispetto +T. È indicato n.r. quando la carica non risultava rilevabile (inferiore a 1-5 cell. / g).

Gruppo microbico	Località - sottozona o area			
	Val Gerola		Val Masino	
	B (+T)	G (-T)	C (+T)	M (-T)
Batteri aerobi	5,2x10 <sup>7</sup>	8,8x10 <sup>6</sup>	1,8x10 <sup>7</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>
	5,3x10 <sup>6</sup>	4,2x10 <sup>6</sup>	3,6x10 <sup>6</sup>	2,5x10 <sup>7</sup>
	6,0x10 <sup>7</sup>	9,8x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>	2,9x10 <sup>7</sup>
Eumiceti	2,7x10 <sup>4</sup>	9,8x10 <sup>4</sup>	7,3x10 <sup>4</sup>	1,8x10 <sup>4</sup>
	1,4x10 <sup>5</sup>	2,9x10 <sup>4</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>
	6,2x10 <sup>5</sup>	6,3x10 <sup>4</sup>	3,2x10 <sup>4</sup>	1,5x10 <sup>5</sup>
Azotofiss. aerobi	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Azotofiss. anaerobi	13	64	2,5x10 <sup>2</sup>	16
	11	11	16	59
	9	19	1,7x10 <sup>2</sup>	17
Nitrosanti autotrofi	n.r.	n.r.	-	n.r.
	n.r.	n.r.	1,3x10 <sup>2</sup>	-
	67	n.r.	7,0x10 <sup>3</sup>	61

**Tabella 2.6** - Cariche microbiche (n. cell. / g s.) rilevate nei campioni di suolo del prelievo del 1995, effettuato in tre diversi punti attorno alle sottozone o aree di saggio B, G, C e M, presentanti maggior (+T) o minor (-T) trasparenza della chioma degli alberi. Per ogni gruppo e zona sono indicati i risultati relativi ai tre singoli punti di prelievo. È indicato n.r. quando la carica non risulta rilevabile (inferiore a 1 / g per gli azotofissatori, a 10 per i nitrosanti). Per un campione C e un M non sono disponibili le cariche dei nitrificanti.

I valori delle cariche microbiche sono sostanzialmente concordanti con quanto riscontrato un anno prima (tabella 2.5), ma il dato saliente che emerge dai risultati di questo campionamento più articolato è tuttavia la frequente disomogeneità delle cariche fra i tre punti di prelievo all'interno di ogni zona considerata omogenea ai fini del confronto: tali differenze in alcuni casi non sono giustificabili con la sola variabilità statistica associabile a ogni singola determinazione. In queste condizioni risulta difficile individuare eventuali differenze fra zone, che possano in qualche modo essere messe in relazione con lo stato di alterazione presentato dalla vegetazione. In effetti l'elaborazione statistica dei dati effettuata mediante analisi della varianza non evidenzia significatività per tali differenze.

La disomogeneità microbiologica evidenziata per questi ecosistemi potrebbe gettare una nuova luce sui dati relativi alla primavera dell'anno prima: le differenze allora riscontrate potrebbero anche essere dovute alla posizione dei punti di prelievo e non necessariamente allo stato della chioma dell'abete sovrastante.

Forma	Località - sottozona o area												
	Val Gerola						Val Masino						
	B1 Ar	B2 Ab	B2 Ar	B3 Ar	G1 Ab	G2 Ab	G3 Ab	C1 Ar	C2 Ar	C3 Ar	M1 Ar	M2 Ar	M3 Ar
a	+		+										+
b							+		+	+		+	+
c									+		+		
d					+	+	+	+					
e					+								+
f		+					+						
g				+								+	
h			+				+						
i	+						+						
l										+			
m								+					
n		+								+		+	+
o								+					
p											+		

Tabella 2.7 - Presenza (segno +) delle diverse forme micorriziche nei campioni di radice prelevati nel 1995 in tre diversi punti (1, 2 e 3) attorno alle sottozone B e C (maggiore trasparenza della chioma) e alle aree di saggio G e M (minor trasparenza), sotto ad abete bianco (Ab) e ad abete rosso (Ar).

La spiccata disomogeneità fra zone anche vicine sottolinea il problema del confronto dei dati nello studio di un caso reale. L'altra possibilità cui si può ricorrere per valutare eventuali effettive alterazioni della microflora è di seguire nel tempo le cariche microbiche, considerando gli stessi punti di prelievo del suolo; questo tuttavia richiede anche un'accurata valutazione delle variazioni ambientali complessive (per esempio delle caratteristiche chimiche e fisiche del suolo) per poterne tenere presente l'effetto.

Nel 1995 sugli stessi terreni sono state studiate anche le ectomicorrizze presenti sulle radici degli abeti. Dalle analisi sono risultate presenti, nella totalità dei campioni, micorrizze che, per i caratteri osservati, sia macro- sia microscopici, si possono raggruppare in 14 tipi diversi, qui indicati come forme (tabella 2.7).

Per due sole forme è stata identificata in modo certo la simbiosi poichè è stato possibile individuare il fungo simbiote (micobionte). Le due forme sono la a e la b, i cui micobionti corrispondono rispettivamente a *Piloderma croceum* Erikss. et Hjortst. (= *Corticium croceum* Bres.) e a *Cenococcum geophilum* Fr. Le altre forme, eccetto f e h, posseggono caratteri soltanto simili a quelli di micorrizze la cui identità è già stata determinata oppure solo descritta. Le forme f e h invece non hanno alcun riscontro con micorrizze già descritte.

Peraltro, anche se qualche forma è risultata presente solo in zone con maggior traspa-

renza della chioma e qualche altra solo in zone con minor trasparenza, la maggioranza delle forme appare sostanzialmente indipendente dalla trasparenza della chioma.

### 2.3.2 Strutture di ricerca

- Conte colturali e valutazioni qualitative: DISTAM, Sezione di Microbiologia Agraria, Alimentare, Ecologica.
- Biomassa e attività microbiche: DIFCA, Sezione di Chimica e Biochimica del Suolo.
- Micorrize: Centro di Studio sulla Micologia del Terreno, CNR, Torino.

## Bibliografia

**Agerer, R.** 1995. Anatomical characteristics of identified ectomycorrhizas: an attempt towards a natural classification. In: **Varma, A. e Hock, B.** (eds.). *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, 685-734.

**Bloem, J., Bolhuis, P. R., Veninga, M. R. e Wieringa, J.** 1995. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In: **Alef, K. e Nannipieri, P.** (eds.) *Methods of Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, London, 158-186.

**Brundrett, M., Bougher, N., Dell, B., Grove, T. e Malajczuk, N.** 1996. Working with mycorrhizas in forestry and agriculture. *ACIAR Monograph*, 32, 1-374.

**Colpaert, J. V. e Van Tichelen, K. K.** 1994. Mycorrhizas and environmental stress. In: **Frankland, J. C., Magan, N. e Gadd, G. M.** (eds.) *Fungi and Environmental Change*. Cambridge University Press, Chapter 9, 109-128.

**Funder, S.** 1968. *Practical Mycology: Manual*

for Identification of Fungi. Hafner Publishing Company, New York.

**Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. e Williams, S. T.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

**Morton, J. B., Franke, M. e Bentivenga, S. P.** 1995. Developmental foundations for morphological diversity among endomycorrhizal fungi in Glomales (Zygomycetes). In: **Varma, A. e Hock, B.** (eds.). *Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnology*. Springer-Verlag, Berlin, 669-683.

**Odum, E. P.** 1988. *Basi di Ecologia*. Piccin, Padova.

**Page, A. L.** (ed.) 1982. *Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. American Society of Agronomy, Madison, USA.

**Smith, S. e Read, D. J.** 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press.

# Capitolo 3

## Bioindicatori a livello di organismi vegetali

Mariagrazia Valcuvia Passadore, Michele Aleffi, Silvia Assini,  
Paola Nola, Filippo Bussotti, Alberto Cozzi, Marco Ferretti,  
Giovanna Puppi Branzi, Giuseppe Belli e Guido Violini

### 3.1 Licheni - Mariagrazia Valcuvia Passadore

#### 3.1.1 Generalità

I licheni, ancor prima che scientificamente, sono stati presi in considerazione per le loro proprietà terapeutiche, alimentari e per le loro caratteristiche estetiche.

Camillo Sbarbaro (1888-1967), poeta figure moderno, ma anche “scienziato e poeta dei licheni” (Cormagi, 1993), nelle sue opere letterarie (1960, 1967) ha più volte affermato che “Il lichene è il più multiforme” e “il più policromo dei vegetali”, è “un enigma”.

Si tratta, infatti, di vegetali insoliti, in quanto espressione della simbiosi tra organismi eterotrofi (funghi, per lo più Ascomiceti, raramente Basidiomiceti) e autotrofi (alghe verdi e/o cianobatteri). Il fungo (micobionte) riceve carboidrati dal suo partner algale (ficobionte) e, in cambio, lo rifornisce di acqua e sali minerali, proteggendolo anche da eccessivo disseccamento e dalle forti radiazioni luminose.

L'associazione porta alla formazione di talli ben caratterizzati dal punto di vista morfologico e fisiologico e completamente diversi da quelli di partenza. In una sezione trasversale di tallo lichenico si individuano i due simbionti: le ife fungine generalmente costituiscono un'impalcatura in cui le alghe sono distribuite più o meno uniformemente (tallo omeomero) oppure sono localizzate in uno strato algale ben definito (tallo eteromero). In questo secondo tipo di struttura si osserva una successione di strati, così disposti dall'alto al basso: strato corticale (o *cortex*) superiore, costituito da ife strettamente intrecciate e provviste di pareti ispessite; strato gonidiale in cui si trovano le alghe frammiste ai funghi; strato midollare (o *medulla*) con ife fungine lasse; strato corticale (o *cortex*) inferiore, a volte mancante, con struttura simile a quella del *cortex* superiore e spesso provvisto di rizine che ancorano il tallo al substrato. Per facilitare gli scambi gassosi alcune specie presentano perforazioni del *cortex* (cifelle e pseudocifelle).

La morfologia dei talli è variabile, ma si possono riconoscere tre tipi principali di licheni: crostosi, fogliosi e fruticosi. I primi, fortemente aderenti al substrato, privi di *cortex* inferiore e di rizine, assumono l'aspetto di croste, diverse per forma, colore e dimensioni; irregolarmente circolari, hanno superficie continua, fessurata o composta da areole piane, concave o convesse. I fogliosi presentano lobi piuttosto appiattiti, a struttura dorso-ventrale e di dimensioni variabili; sono generalmente ancorati al substrato per mezzo di rizine e sono, per lo più, facilmente asportabili. Quelli fruticosi, aderenti al substrato solo con la parte basale, hanno lobi tridimensionali a sezione circolare o appiattita e possono essere eretti, penduli o prostrati.

La riproduzione nei licheni avviene secondo due modalità distinte: per via vegetativa o sessuale.

La prima coinvolge i due simbionti; avviene per dispersione (a opera del vento, dell'acqua, degli animali, dell'uomo) di frammenti indifferenziati di tallo o di propaguli organizzati in soredi o in isidi.

I soredi sono costituiti da ammassi di alghe e di ife (aggregati in sorali) distribuiti su tutta la superficie tallina o in zone ben circoscritte; gli isidi consistono in protuberanze del *cortex* superiore contenenti alghe e ife.

Frammenti e propaguli, staccatisi dal tallo e trasportati su un substrato adatto, producono un nuovo lichene.

La riproduzione sessuale è attuata solo dal fungo che produce spore. Si può origi-



nare un nuovo tallo soltanto quando una spora fungina, germinando, incontra cellule algali adatte con cui entra in simbiosi.

Nella maggior parte dei licheni le spore, diverse nelle varie specie per forma, colore e dimensioni, vengono prodotte entro corpi fruttiferi a forma di coppa (apotecii) o di fiasco (peritecii).

I primi, di colore e dimensioni variabili, sono dispersi su tutto il tallo oppure sono localizzati su lobi o, nel caso delle Cladonie, all'estremità di strutture particolari chiamate podetii; gli altri, aperti alla sommità tramite un poro (ostiole), appaiono come piccoli punti neri distribuiti uniformemente sulla faccia superiore del tallo in cui sono spesso affondati.

I licheni sono longevi, possono essere addirittura plurisecolari, ma hanno crescita molto lenta: in un anno i loro lobi si allungano o il loro tallo aumenta in diametro per valori compresi mediamente tra 1 e 10 mm. I licheni fruticosi crescono più velocemente di quelli fogliosi che, a loro volta, hanno velocità di crescita maggiore dei crostosi.

Possono colonizzare qualsiasi tipo di substrato naturale e artificiale: terra, roccia, scorza degli alberi, legno, foglie di piante sempreverdi, ma anche cemento, mattoni, tegole, vetro, amianto ecc.

Distribuiti a tutte le latitudini, sono in grado di conquistare biotopi estremi, adattandosi a vivere in luoghi dove altri vegetali incontrerebbero notevoli difficoltà di sopravvivenza: superano i periodi critici passando rapidamente a stadi di vita latente durante i quali respirazione e fotosintesi vengono ridotte. Quando le condizioni ambientali tornano favorevoli, in tempi molto brevi assorbono una quantità di acqua sufficiente per riprendere la fotosintesi e per svolgere tutte le altre attività metaboliche.

Già presso gli antichi egizi i licheni trovavano numerose applicazioni: alcune, attualmente, sono quasi del tutto scomparse, altre si stanno sviluppando sempre di più.

Vengono utilizzati come alimento, per decorazione, nella preparazione di coloranti e profumi, per l'estrazione di antibiotici e antimicotici e per condurre indagini scientifiche di vario tipo. Servono, infatti, per datare substrati di età ignota, quali morene glaciali e reperti archeologici; danno informazioni sul substrato in relazione a pH, grado di umidità, presenza di sostanze azotate ecc.; permettono di individuare zone con atmosfera inquinata.

### 3.1.2 Utilizzo nel biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico

Come ampiamente documentato in letteratura (Nimis *et al.*, 1989, 1991; Nimis e Castello, 1990; Nimis, 1994), negli studi di biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico gli organismi più utilizzati sono i licheni (soprattutto quelli epifiti), vegetali dotati di particolari caratteristiche che permettono loro di essere buoni indicatori biologici e/o bioaccumulatori.

I loro talli, molto semplici dal punto di vista morfologico e strutturale, sono privi di apparato radicale, sono sprovvisti di cuticola, di stomi e di qualsiasi struttura in grado di proteggerli dall'ambiente esterno. Il loro metabolismo, di conseguenza, dipende prevalentemente da quanto presente in atmosfera: gli elementi nutritivi e i contaminanti atmosferici (sotto forma di gas, in soluzione o associati al particolato) vengono assorbiti (ed eventualmente accumulati) attraverso tutta la superficie del tallo durante tutte le stagioni e nell'arco di molti anni.

A differenza di quanto si verifica nelle piante superiori, i licheni non hanno la possibilità di liberarsi delle sostanze nocive né tramite meccanismi di escrezione attiva né mediante eliminazione e rinnovo delle parti danneggiate o vecchie del tallo.

Essendo, inoltre, organismi resistenti agli stress ambientali (periodi di siccità prolungata, temperature estreme, sopportazione per brevi periodi di alte concentrazioni di sostanze inquinanti), dotati di lenta crescita e di grande longevità, permettono di valutare l'inquinamento su tempi lunghi.

I licheni presentano diversi gradi di tolleranza nei confronti dei contaminanti; la reazione varia a seconda delle specie, delle sostanze tossiche, della durata e dell'andamento dell'inquinamento (saltuario, cronico, acuto ecc.), delle condizioni climatiche (precipitazioni, temperatura, venti dominanti) e orografiche.

Tali organismi presentano, quindi, tutte le caratteristiche dei buoni bioindicatori e le numerose indagini condotte hanno permesso di identificare vari tipi di risposta nei confronti dell'inquinamento (Nimis e Castello, 1990; Nimis 1994).

L'alterato equilibrio tra l'alga e il fungo simbiotici può portare a:

- riduzione delle attività fisiologiche: l'anidride solforosa, per esempio, interferisce su fotosintesi, respirazione, trasmissione di carboidrati tra alga e fungo; i metalli pesanti influenzano la fotosintesi solo a concentrazioni elevate;
- alterazione della forma e del colore del tallo con la comparsa di parti scolorite, di macchie marroni, di zone necrotiche e col distacco di parti del tallo dal substrato;
- riduzione della fertilità: diminuisce il numero di propaguli vegetativi (soredi e isidi) e di corpi fruttiferi che raggiungono anche dimensioni inferiori;
- cambiamenti nella copertura esercitata dalle specie presenti con alterazione delle comunità licheniche. Generalmente le specie crostose sono più resistenti all'inquinamento rispetto a quelle fogliose e fruticose, perché presentano una minore superficie di scambio; molto resistenti sono anche i licheni idrorepellenti (acqua e sostanze disciolte vengono assorbite in quantità minore);
- riduzione del numero di specie nel tempo e nello spazio. Numerosi Autori, conducendo studi comparativi in periodi diversi, hanno constatato un decremento nel numero delle specie nelle zone in cui è avvenuto un peggioramento della qualità dell'aria. La diminuzione è stata riscontrata anche in diverse città procedendo dalla periferia verso il centro.

Negli studi di biomonitoraggio i licheni sono utilizzati come bioaccumulatori per individuare gli inquinanti in essi contenuti e misurarne la concentrazione oppure come bioindicatori per ricavare informazioni sulla qualità dell'aria mediante diverse tecniche, quali il calcolo degli Indici di Purezza Atmosferica (IAP) e degli indici ecologici, l'osservazione della distribuzione delle specie e delle comunità sul territorio o tramite il trapianto di talli lichenici.

### 3.1.3 Licheni come bioaccumulatori

Il metodo, basato sull'analisi qualitativa e quantitativa delle sostanze nei talli lichenici, permette di stimare il grado di diffusione degli inquinanti nell'ambiente, individuandone le fonti principali.

Molte specie licheniche sono in grado di assorbire e accumulare nel loro tallo contaminanti persistenti (che non si trasformano continuamente al variare di fattori ambientali, quali luce, temperatura ecc.), anche quando la loro concentrazione è così bassa da venire difficilmente misurata dagli strumenti convenzionali (Gasparo, 1994).

I licheni sono utilizzati per indagini su radionuclidi, zolfo, fluoro, idrocarburi clorurati, ma sono impiegati soprattutto nel biomonitoraggio di metalli in aree urbane e

industriali (Nimis *et al.*, 1989; Nimis e Castello, 1990; Nimis, 1994). Questi ultimi provengono dalle attività che comportano la loro estrazione e lavorazione o derivano come sottoprodotto della combustione di petrolio, carbone e scarichi urbani. Associati a particelle, polveri e fumi, vengono trasportati dal vento in diverse zone, creando problematiche sanitarie e ambientali per la loro eventuale tossicità (Guidetti e Stefanetti, 1996). Alcuni (rame e zinco) sono pericolosi per l'uomo in quantità elevata, altri (cadmio, cromo, mercurio, nichel, piombo) lo sono anche a bassi livelli. La loro concentrazione in atmosfera varia a seconda dei ritmi di produzione, delle condizioni meteorologiche e della presenza di ostacoli antropici o naturali.

Il metodo d'indagine è stato applicato prevalentemente nelle vicinanze di sorgenti puntiformi, anche in assenza di licheni epifiti, utilizzando talli raccolti in aree non contaminate e trapiantati nella zona interessata.

Il materiale viene prelevato in stazioni il cui numero e la cui ubicazione devono essere adeguati alle probabili fonti di emissione e alle modalità di diffusione degli inquinanti, in quanto alcuni tendono a ricadere abbastanza rapidamente, a poca distanza dal punto di emissione, altri si diffondono maggiormente (Nimis *et al.*, 1989).

La scelta della specie lichenica viene fatta in base alla sua frequenza e distribuzione sul territorio, alla quantità disponibile e alle sue caratteristiche morfologiche. Si preferiscono talli fogliosi con parti periferiche ben riconoscibili, regolari, preferibilmente senza soredi e rizine. Il prelievo viene effettuato sul tronco a più di un metro d'altezza (per ridurre l'influenza delle particelle del suolo) con bisturi di acciaio e il materiale viene inserito in buste di carta. Viene prelevata solo la parte esterna (5-10 mm) di diversi talli (almeno 6-7) presenti su alberi di una stessa località. Le parti centrali dei talli presentano concentrazioni più elevate di metalli rispetto alle parti periferiche più giovani (Bargagli, 1989; Gasparo *et al.*, 1989). Analizzando solo queste ultime si considera all'incirca l'ultimo anno di crescita del lichene e, quindi, le sostanze emesse in atmosfera e accumulate nei talli negli ultimi 12 mesi. Il materiale viene ripulito allo stereomicroscopio da terriccio, pezzi di scorza e viene seccato all'aria. Circa 150 mg di campione vengono sottoposti a trattamenti chimici e le soluzioni ottenute vengono analizzate con metodi diversi per la determinazione degli elementi da ricercare (per i vari procedimenti da adottare vedi Bargagli *et al.*, 1985; Nimis *et al.*, 1989; Gasparo *et al.*, 1989).

I modelli di distribuzione e deposizione dei vari contaminanti (considerati uno alla volta o tutti contemporaneamente) possono essere rappresentati cartograficamente, utilizzando uno specifico programma di elaborazione (Surfer, Golden Software Inc., Colorado, USA).

Tra gli studi condotti in Italia, utilizzando i licheni come bioaccumulatori, si possono ricordare quelli effettuati in zone industriali del Veneto (Nimis *et al.*, 1989), della Lombardia (Arosio e Rinaldi, 1994), del Piemonte (Guidetti e Stefanetti, 1996), della Liguria (Nimis *et al.*, 1993; Castello *et al.*, 1994), della Toscana (Bargagli *et al.*, 1985, 1987), delle Marche (Gasparo *et al.*, 1989) e quelli eseguiti in aree vulcaniche (Barghigiani *et al.*, 1988; Bargagli *et al.*, 1989) o con anomalie geochimiche e geotermali (Bargagli *et al.*, 1988; Loppi *et al.*, 1992; Loppi, 1994).

*Vantaggi e limiti del metodo*

Non presenta particolari difficoltà: non occorrono conoscenze lichenologiche ap-

profondite, in quanto gli studi vengono solitamente condotti su una sola specie corticicola; le determinazioni analitiche, inoltre, sono effettuate mediante comuni procedure di spettrofotometria, gascromatografia o con rilevatori di radioattività.

L'utilizzo dei licheni in questo senso si avvicina notevolmente al rilevamento classico compiuto con centraline; rispetto a queste, tuttavia, vengono forniti dati più estesi in senso spaziale e temporale e con costi molto contenuti per una prima valutazione dell'inquinamento ambientale (Guidetti e Stefanetti, 1996).

Tale metodica consente di ottenere valori non traducibili in misure di concentrazione assoluta dell'aria (Arosio e Rinaldi, 1994) e i dati ricavati da indagini diverse sono confrontabili solamente quando vengono utilizzate le stesse specie licheniche e le stesse procedure di campionamento e analitiche (Guidetti e Stefanetti, 1996).

Come tutte le altre tecniche descritte è un approccio complementare del monitoraggio strumentale.

### 3.1.4 Licheni come bioindicatori

#### *Indici di Purezza Atmosferica (IAP)*

Tra i vari Indici di Purezza Atmosferica elaborati, particolarmente utilizzato in Italia è quello basato sulla frequenza delle specie licheniche corticicole proposto per la Svizzera da Liebendoerfer *et al.* (1988) e modificato successivamente da Nimis *et al.* (1989 e 1991).

Accurata deve essere la scelta degli alberi su cui effettuare i rilievi, in quanto le caratteristiche chimico-fisiche della scorza influenzano notevolmente le comunità licheniche. È necessario individuare una o due specie arboree abbastanza diffuse nell'area di studio e con caratteristiche simili (pH della scorza il più uniforme possibile, circonferenza > 80 cm, tronchi dritti e senza ferite, non posizionati presso fonti di disturbo ecc.).

Numero e localizzazione delle stazioni variano a seconda del tipo di indagine e della zona considerata. Per ogni stazione viene rilevato un gruppo di alberi contigui, utilizzando un reticolo (30 x 50 cm) suddiviso in 10 rettangoli e posizionato sul tronco nella zona di maggiore copertura lichenica a una altezza mai inferiore a 120 cm. Per ciascun rilievo vengono annotati i licheni reperiti e la loro frequenza, intesa come presenza nei 10 rettangoli del reticolo e, quindi, espressa per ogni specie con valori compresi tra 1 e 10.

Durante la elaborazione dei dati per ogni stazione vengono calcolati gli IAP risultanti dalla media aritmetica delle frequenze totali dei rilievi effettuati nella stazione. Diversità specifica elevata e alta frequenza degli individui appartenenti alle singole specie determinano indici elevati che evidenziano condizioni ambientali favorevoli per le comunità e una buona qualità dell'aria; la diminuzione progressiva dell'indice denota, al contrario, un peggioramento delle condizioni ambientali: uno IAP pari a 0 indica condizione di deserto lichenico e qualità dell'aria pessima.

In base agli IAP ottenuti si individuano diverse fasce della qualità dell'aria che possono essere rappresentate cartograficamente mediante un programma computerizzato (Surfer, Golden Software Inc., Colorado, USA).

In Italia ultimamente sono stati condotti numerosi studi col metodo illustrato: un ruolo fondamentale hanno avuto le ricerche svolte in Veneto (Nimis *et al.* 1989, 1991) e in Liguria (Nimis *et al.*, 1990). In particolare in quest'ultima indagine gli Autori, sulla base di dati forniti da centraline dell'Enel, hanno saggiato per la zona di La Spezia il valore predittivo dell'indice rispetto alla anidride solforosa, evidenziando un'elevata

correlazione tra IAP e le medie annue del 98° percentile di SO<sub>2</sub>. In base a tale correlazione Nimis *et al.* (1991) nella regione Veneto hanno individuato 7 zone con livelli di inquinamento da SO<sub>2</sub> compresi tra il molto elevato e il trascurabile.

*Vantaggi, problemi di attuazione e limiti di utilizzo del metodo*

- L'indice proposto è poco soggettivo, altamente predittivo dei tassi di inquinamento e ricavabile con un metodo abbastanza semplice anche da parte di persone prive di approfondite conoscenze lichenologiche (Nimis e Castello, 1990).
- Indagini di questo tipo comportano costi contenuti, permettono di valutare l'azione contemporanea di più sostanze e danno informazioni estese nello spazio e nel tempo; sono utili per integrare le misure dirette delle centraline.
- La scelta di alberi adatti su cui effettuare i rilievi può essere molto laboriosa, soprattutto nelle zone più antropizzate; è meglio evitare alberi con scorza troppo acida o troppo basica. Si deve tenere presente che più il substrato è uniforme e più le aree sono simili dal punto di vista ecologico, più è possibile attribuire con sicurezza le alterazioni riscontrate nei talli e nelle comunità ad alterazioni della qualità dell'aria e non ad altri fattori ambientali.
- L'identificazione dei licheni non è sempre agevole: una determinazione errata, tuttavia, non comporta errori nella valutazione dell'indice. È sempre meglio conservare il materiale e farlo esaminare da esperti.
- Il metodo non è applicabile se l'inquinamento è eccessivo, in quanto si determina la scomparsa totale di licheni. In questo caso si può utilizzare la tecnica del trapianto.
- La metodologia proposta consente valutazioni qualitative, non quantitative e fornisce solo valori relativi, non assoluti.
- Non si possono rilevare fenomeni acuti temporanei e sporadici, a differenza delle centraline di rilevamento.

*Indici ecologici*

Questa tecnica, utilizzata per integrare studi floristici e vegetazionali, permette di valutare indirettamente l'inquinamento atmosferico, rilevando la presenza di contaminanti (SO<sub>2</sub>, fertilizzanti, polveri calcaree ecc.) che modificano secondariamente il pH del substrato. Permette, inoltre, di individuare le condizioni ecologiche prevalenti delle aree in cui sono eseguiti i campionamenti, in quanto dà informazioni anche sulla deposizione di sostanze azotate, sul grado di umidità e di luminosità.

Si effettuano rilievi delle specie licheniche: a ognuna si attribuiscono i quattro indici ecologici proposti da Wirth (1980) e relativi a pH, grado di nitrofitismo (N), di igrofitismo (H) e fotofitismo (L). I valori, desumibili da Nimis *et al.* (1987), esprimono numericamente le designazioni di Wirth.

Indice relativo al pH:

1. estremamente acidofitico,  $\text{pH} < 3,3$
2. molto acidofitico,  $3,4 < \text{pH} < 4,0$
3. piuttosto acidofitico,  $4,1 < \text{pH} < 4,8$
4. moderatamente acidofitico,  $4,9 < \text{pH} < 5,6$
5. subneutrofitico,  $5,7 < \text{pH} < 7,0$

- 6. neutrofitico, pH ca. 7,0
- 7. moderatamente basifitico,  $7,1 < \text{pH} < 8,5$
- 8. basifitico,  $\text{pH} > 8,5$

Indice relativo al nitrofitismo (N):

- 1. anitrofitico
- 2. moderatamente nitrofitico
- 3. piuttosto nitrofitico
- 4. molto nitrofitico
- 5. estremamente nitrofitico

Indice relativo all'igrofitismo (H):

- 1. estremamente igrofitico
- 2. molto igrofitico
- 3. piuttosto igrofitico
- 4. mesofitico
- 5. piuttosto xerofitico
- 6. molto xerofitico

Indice relativo al fotofitismo (L):

- 1. molto sciafitico
- 2. piuttosto sciafitico
- 3. moderatamente fotofitico
- 4. piuttosto fotofitico
- 5. molto fotofitico

La caratterizzazione ecologica della zona studiata viene espressa dai valori medi degli indici di Wirth, calcolati come percentuale sul totale delle presenze delle specie nei vari rilievi.

Il metodo è molto spesso impiegato per integrare studi di IAP (paragrafo precedente): ogni campionamento e, di conseguenza, ogni stazione vengono, così, definiti da quattro valori, ottenuti dagli indici delle specie presenti.

Durante l'elaborazione dei dati, infatti, sono considerati i taxa campionati in ogni rilievo con le loro frequenze; queste, moltiplicate per i quattro indici ecologici, danno risultati che, divisi per la frequenza totale, forniscono gli indici del rilievo considerato.

Esempio di calcolo per un ipotetico rilievo comprendente le specie A e B presentanti, rispettivamente, frequenza 4 e indici pH: 4-5; N: 2-4; H: 4-5; L: 4-5 e frequenza 10 con pH: 5; N: 3-4; H: 4-5; L: 4.

	<b>pH</b>	<b>N</b>	<b>H</b>	<b>L</b>
A	$4,5 \times 4 = 18$	$3 \times 4 = 12$	$4,5 \times 4 = 18$	$4,5 \times 4 = 18$
B	$5 \times 10 = 50$	$3,5 \times 10 = 35$	$4,5 \times 10 = 45$	$4 \times 10 = 40$
<b>Totale</b>	<b>68</b>	<b>47</b>	<b>63</b>	<b>58</b>

La sommatoria dei prodotti ottenuti, rapportata alla frequenza totale (14 in questo esempio), dà le seguenti classi degli indici ecologici relativi al campionamento:  $pH=4,8$ ;  $N=3,3$ ;  $H=4,5$ ;  $L=4,1$ .

I calcoli sono ripetuti per i rilievi che fanno parte della medesima stazione; dalla media aritmetica degli indici dei vari rilievi si ottengono quelli relativi alla stazione. Lo stesso procedimento viene applicato a tutte le stazioni indagate.

I risultati possono essere espressi cartograficamente unendo con linee le stazioni che rientrano nella stessa classe di valori.

Ai lavori eseguiti in Italia da Nimis e Dallai (1985) e da Recchia e Polidoro (1987), negli ultimi anni se ne sono aggiunti parecchi altri in cui gli indici ecologici sono stati usati a completamento e integrazione di studi di IAP condotti secondo il metodo svizzero.

#### *Vantaggi e limiti del metodo*

Il metodo permette di valutare l'impatto ambientale delle sorgenti inquinanti in modo economico e in tempi relativamente brevi con la mappatura di vaste aree (Nimis *et al.*, 1989; Nimis e Castello, 1990); richiede, però, competenze lichenologiche avanzate per una corretta identificazione delle specie.

#### *Carte relative alla flora e alle comunità licheniche*

La mappatura preliminare di flora e vegetazione lichenica costituisce spesso la base per studi di monitoraggio di aree urbane o di zone di grande estensione (Nimis *et al.*, 1989; Nimis e Castello, 1990).

Le carte si riferiscono per lo più a:

- *distribuzione di singole specie* - rappresentano il punto di partenza per indagini più approfondite in cui vengono considerati altri parametri, quali la frequenza relativa e il grado di copertura. Si ottengono le classiche mappe a punti che vengono interpretate sulla base degli indici ecologici (paragrafo precedente) o di scale di tolleranza all'inquinamento come quelle sviluppate da Hawksworth e Rose (1970) per l'Inghilterra;
- *parametri relativi a una specie* - si considerano specie facilmente riconoscibili e diffuse di cui si valutano grado di copertura, frequenza, danneggiamento del tallo, tasso di fotosintesi ecc. Nimis *et al.*, (1989 e 1991) riportano esempi di carte con la distribuzione di frequenza di specie reperite nella regione Veneto;
- *specie indicatrici* - si mappa la distribuzione di specie che denotano tassi di inquinamento diversi. Questo tipo di indagini non richiede conoscenze lichenologiche approfondite, ma può essere applicato solo ad aree omogenee dal punto di vista climatico. Un esempio si trova nello studio condotto da Nimis (1985) nella città di Trieste;
- *numero di specie* - il numero di specie presenti in zone ecologicamente affini è correlato al grado di inquinamento atmosferico (Nimis *et al.*, 1989; Nimis e Castello, 1990). I dati sono desumibili sia da studi sulla distribuzione delle specie sia da indagini effettuate sugli indici di purezza atmosferica (paragrafo relativo). Nimis *et al.* (1989 e 1991) redigono per il Veneto carte dell'inquinamento basate sugli IAP.

#### *Vantaggi e limiti del metodo*

Il mappaggio con licheni può fornire una chiave di lettura generale sull'inquinamento atmosferico senza dare indicazioni quantitative.

### *Trapianto*

In questo metodo, impiegato prevalentemente in assenza di comunità epifite, i licheni possono essere utilizzati come bioaccumulatori o come bioindicatori.

I talli sono prelevati con la scorza sottostante da alberi presenti in zone non inquinate e trapiantati con diverse tecniche in aree inquinate (in città, presso complessi industriali ecc.).

Il materiale, raccolto per lo più in quantità rilevante, viene posto entro reti di nylon o viene fissato su tavolette di plastica o terracotta, quindi viene appeso a sostegni (rami di alberi, pali ecc.), generalmente mediante fili di PVC. Gli espiani sono esposti direttamente all'atmosfera oppure sono posizionati in *Open Top Chambers*, cilindri di plastica trasparente (Caniglia *et al.*, 1992 e 1993a), nei quali viene immessa aria controllata da sensori ed eventualmente filtrata.

Negli studi di bioaccumulo i licheni vengono analizzati, a intervalli regolari, con le solite procedure d'indagine (paragrafo relativo). Nell'utilizzo come bioindicatori i talli sono sottoposti a controlli periodici (generalmente ogni due mesi nell'arco di un intero anno) mediante fotografie eseguite con pellicole all'infrarosso e mediante l'analisi computerizzata delle immagini. Possono essere effettuate anche microanalisi semi-quantitative al SEM sulla parte superficiale dei talli mediante microsonde. Giudizi qualitativi sullo stato di salute dei talli possono essere espressi, inoltre, in base alle immagini ottenute all'infrarosso e al SEM.

Danneggiamento o tasso di mortalità dei licheni sono proporzionali al grado di inquinamento atmosferico.

Pochi e recenti sono gli studi condotti in Italia col metodo del trapianto. Si possono ricordare quelli effettuati in aree urbane del Piemonte (Piervittori *et al.*, 1993), in una località lombarda e in una emiliana (Caniglia *et al.*, 1992, 1993 a, 1993 b), a Padova (Caniglia e Febraretti, 1994), sul delta del Po (Caniglia e Zorer, 1991 a, 1991 b), a Roma (Cardarelli *et al.*, 1993; Bartoli *et al.*, 1994) e a Palermo (Giovenco *et al.*, 1996).

### *Vantaggi e limiti del metodo*

Il lavoro, che può essere svolto anche in condizioni di deserto lichenico, non richiede notevoli conoscenze lichenologiche, dal momento che le indagini sono generalmente eseguite su una o poche specie.

Non si presta ad applicazioni su vasta scala, ma può essere utilizzato per condurre studi preliminari sulla sensibilità di diverse specie all'inquinamento (Nimis *et al.*, 1989; Nimis e Castello, 1990).

È un metodo piuttosto laborioso che richiede molta cautela anche nell'interpretazione di eventuali danni riscontrati nei talli, in quanto le alterazioni possono essere provocate non solo dall'inquinamento ma anche dalle condizioni climatiche diverse del luogo di trapianto.

Questa tecnica deve essere integrata dal monitoraggio strumentale.

### **3.1.5 Studi di biomonitoraggio in Lombardia**

Alla rassegna delle principali tecniche di biomonitoraggio in cui vengono impiegati i licheni, segue un breve accenno ai lavori, relativi all'argomento, pubblicati per località lombarde. Ci si limita a studi condotti a livello regionale, in quanto in Italia la letteratura in merito è ormai ampia, pur essendo le ricerche iniziate piuttosto recentemente, a partire dagli anni Ottanta.



Indagini lichenologiche sulla qualità dell'aria della Lombardia sono state effettuate in varie località di estensione diversa e prevalentemente mediante l'indice di purezza atmosferica (IAP) proposto dagli Autori svizzeri.

Soltanto Caniglia *et al.* (1992, 1993a, 1993b) si discostano da questa tendenza generale, in quanto conducono osservazioni su espianti di *Pseudevernia furfuracea* e di specie appartenenti al genere *Parmelia*, prelevati da alberi del trevigiano e trapiantati a Isola Serafini (PC), territorio agricolo scarsamente abitato, e a Redecesio, presso un raccordo autostradale, alla periferia orientale di Milano. Nei campioni collocati vicino a Milano rilevano cattivo stato di salute e un contenuto maggiore in piombo e zolfo rispetto a quelli di Isola Serafini.

Sartori *et al.* (1993), nell'ambito di un'indagine condotta (con il metodo svizzero e gli indici ecologici) nei pressi della raffineria di Sannazzaro de' Burgundi (Pavia), riscontrano che la qualità dell'aria risulta piuttosto compromessa per la presenza di gas fitotossici e di fertilizzanti usati in agricoltura.

Casarini e collaboratori valutano la qualità dell'aria di Pavia, capoluogo di provincia, e di Voghera, il più importante centro dell'Oltrepò Pavese: i dati relativi alla prima città sono pubblicati nel 1994, quelli della seconda sono contenuti in un dattiloscritto depositato presso il PMIP (UO Fisica e Tutela dell'Ambiente) dell'USSL di Pavia. Per Voghera adottano l'indice proposto dagli Autori svizzeri, per Pavia, invece, per ottenere informazioni più dettagliate, utilizzano un indice di presenza lichenica. Nella prima città sono riconosciute quattro zone, nell'altra sono individuate cinque aree con diverso grado di inquinamento atmosferico che, per entrambe, dipende essenzialmente dalle emissioni degli impianti di riscaldamento e dei veicoli.

Mediante il metodo svizzero, integrato con indici ecologici, Valcuvia Passadore in collaborazione con Gianatti (1995) e con Brusoni (1996) svolge indagini preliminari sulla qualità dell'aria di Sondrio e di Brescia: nei centri urbani c'è deserto lichenico attribuibile agli inquinanti emessi dagli impianti di riscaldamento e dai veicoli in transito, mentre nelle zone adiacenti distribuzione e tipo di vegetazione lichenica sono influenzati da contaminanti fitotossici presenti in atmosfera e dai fertilizzanti usati in agricoltura, la cui dispersione è facilitata dai venti.

Alla medesima conclusione giungono Zocchi *et al.* (1996) che valutano la qualità dell'aria nel comune di Varese utilizzando i licheni come bioaccumulatori e come bioindicatori (IAP e indici ecologici).

Arosio e Rinaldi (1995) realizzano una mappa della qualità dell'aria del territorio di Bergamo e di alcuni comuni circostanti su una superficie di 115 km<sup>2</sup>. I valori di IAP riscontrati permettono agli Autori di individuare sei fasce con diversa qualità dell'aria la cui distribuzione dipende dalla dislocazione di insediamenti abitativi e produttivi, dalla presenza di coltivazioni, di rilievi collinari e dall'andamento dei venti. Le analisi chimiche effettuate su talli lichenici del bergamasco evidenziano, inoltre, che la concentrazione di metalli pesanti è correlata agli IAP.

Roella *et al.* (1995a), effettuando studi con lo stesso indice e con quelli ecologici, suddividono la provincia di Varese (con un'estensione di 1198,71 km<sup>2</sup>) in cinque fasce, rappresentate anche cartograficamente: la più estesa presenta qualità dell'aria pessima sia per sostanze inquinanti emesse dai veicoli locali o transitanti per turismo e trasporto di merci, sia per contaminanti provenienti da zone fortemente antropizzate e

industrializzate site anche al di fuori dell'area di studio. Al lavoro sono annesse anche cartine relative alla distribuzione dei taxa più diffusi.

Roella *et al.* (1995b, c) riscontrano analoghe fonti inquinanti, valutando la qualità dell'aria del territorio (di circa 1285 km<sup>2</sup>) circostante il Lago Maggiore, compreso in parte in Piemonte (provincia di Novara) e in parte in Lombardia (provincia di Varese). Le indagini, condotte con gli indici ecologici e quelli di purezza atmosferica, portano alla individuazione di otto zone che vengono espresse anche cartograficamente.

Casarini *et al.* (1995), infine, conducono indagini nel Parco Lombardo della Valle del Ticino, avente un'estensione di 90.640 ettari e comprendente 3 province e 46 comuni. Individuano cinque fasce con diversi livelli di inquinamento, pur essendo la qualità dell'aria compromessa su tutto il territorio per l'elevata industrializzazione e urbanizzazione e per l'intenso traffico veicolare. Riscontrano buona correlazione tra i valori di IAP e la concentrazione di SO<sub>2</sub>, misurata dalle centraline ed elaborano la carta della qualità dell'aria e alcune mappe con la distribuzione di frequenza delle specie più diffuse nella zona.

### 3.1.6 Conclusioni

In base agli studi di biomonitoraggio effettuati in Lombardia si possono fare alcune considerazioni:

- i veicoli e gli impianti di riscaldamento risultano essere nella regione fonti di inquinamento pressochè costanti, cui si aggiungono di volta in volta insediamenti abitativi e produttivi o coltivazioni agricole che contribuiscono a immettere ulteriori contaminanti in atmosfera;
- la qualità dell'aria in Lombardia attende di essere studiata ulteriormente; estese sono ancora le aree non considerate, anche se attualmente sono in corso diversi lavori in località poste in provincia di Sondrio, Milano, Lodi, Pavia ecc.;
- più tecniche di biomonitoraggio potrebbero essere applicate nella regione. Scarso finora è stato l'uso dei licheni come bioaccumulatori; più frequente il loro impiego come bioindicatori, in particolare molto utilizzato è stato l'indice proposto dagli Autori svizzeri, generalmente integrato da quelli ecologici. Sono state realizzate anche alcune cartine in base agli IAP riscontrati o in base alla frequenza delle specie più diffuse; in pochi lavori è stato usato il metodo del trapianto;
- tra le persone che si sono interessate di biomonitoraggio in Lombardia, poche svolgono attività di ricerca presso le Università, alcune collaborano presso Musei di Scienze Naturali, la maggior parte lavora in unità operative delle USSL. Questo fatto, che non è esclusivo della nostra regione, ma riscontrabile anche in altre parti d'Italia, indica che per svolgere indagini del genere non occorre essere necessariamente specialisti, è sufficiente, infatti, avere una buona preparazione lichenologica di base, acquisibile presso sedi universitarie competenti in materia. Per la identificazione di specie critiche o per chiarimenti e suggerimenti ci si rivolge a ricercatori di centri universitari o si chiede assistenza alla Società Lichenologica Italiana che ha sede a Trieste.

Da quanto esposto nei precedenti paragrafi si possono trarre anche conclusioni di carattere più generale.

L'uso dei licheni come bioindicatori e/o come bioaccumulatori è utile per integrare le misure dirette delle centraline automatiche, in quanto, oltre a comportare costi molto contenuti, permette di valutare l'azione contemporanea di più inquinanti e fornisce

un quadro più completo della situazione ambientale, dando informazioni anche sulle aree circostanti i punti di indagine e per un arco di tempo abbastanza ampio (Nimis *et al.*, 1989, 1991; Nimis e Castello, 1990; Nimis, 1994).

Si deve tenere presente che i licheni, come tutti gli altri organismi viventi, sono sottoposti all'influenza di troppi fattori ambientali e l'inquinamento è solo uno dei tanti: da questo deriva spesso la difficoltà di trovare procedure standard di campionamento (Nimis, 1994). Non sempre, inoltre, i bioindicatori danno risposte di tipo lineare per concentrazioni crescenti di un singolo inquinante. Il fatto, tuttavia, che siano in grado di rivelare gli effetti sinergici di più contaminanti permette di sviluppare degli standard di qualità dell'aria (Nimis, 1994).

Per un migliore utilizzo dei licheni in questo tipo di indagini occorre ancora approfondire alcuni aspetti non del tutto chiariti (Gasparo, 1994):

- come il substrato influenzi accumulo e localizzazione degli elementi nel tallo;
- se sia possibile confrontare i risultati ottenuti in fasce bioclimatiche diverse;
- quale sia la velocità di crescita e di accumulo del lichene in ambiente inquinato rispetto a quella in ambiente pulito;
- quale sia il grado di variabilità inter e intraspecifica negli studi di bioaccumulo.

Concludendo, gli studi di monitoraggio effettuati strumentalmente e tramite parametri biologici sono senza dubbio complementari, in quanto le indagini preliminari con organismi permettono di individuare rapidamente e con costi moderati le aree a rischio in cui collocare le centraline di rilevamento.

## Bibliografia

**Arosio, G. e Rinaldi, G.** 1994. Progetto Lichenes. Indagine conoscitiva sul popolamento lichenico a Bergamo e nell'hinterland: flora, vegetazione, qualità dell'aria. *Museo Civ. Sci. Nat. Bergamo*, 17, 1-67.

**Bargagli, R., Iosco, F. P. e Leonzio, C.** 1985. Monitoraggio di alcuni elementi in tracce mediante licheni epifiti nell'area industriale di Rosignano Solvay. *Inquinamento*, 27, (2), 33-37.

**Bargagli, R., Iosco, F. P. e D'Amato, M. L.** 1987. Zonation of trace metal accumulation in three species of epiphytic lichens belonging to the genus *Parmelia*. *Crypt. Bryol. Lichenol.*, 8, (4), 331-337.

**Bargagli, R., Ferrara, R. e Maserti, B. E.** 1988. Mercury in the atmosphere and in lichens in a region affected by a geochemical anomaly. *Environ. Technol. Lett.*, 9, 689-694.

**Bargagli, R.** 1989. Determination of metal depo-

sition patterns by epiphytic lichens. *J. Toxicol. Environm. Chem.*, 18, 249-256.

**Bargagli, R., Barghigiani, C., Siegel, B. Z. e Siegel, S. M.** 1989. Accumulation of mercury and other metals by the lichen *Parmelia* at a minesite and a volcanic area. *Water, Air and Soil Pollut.*, 45, 315-327.

**Barghigiani, C., Bargagli, R. e Giofrè, D.** 1988. Mercury in the environment of Mt. Etna volcanic area. *Envir. Technol. Lett.*, 9, 239-244.

**Bartoli, A., Cardarelli, E., Achilli, M., Campagnella, L. e Massari, G.** 1994. Biomonitoraggio dell'aria a Roma: accumulo di metalli pesanti in trapianti di licheni. *Ann. Bot.*, 52, suppl. 11, 239-266.

**Caniglia, G. e Zorer, R.** 1991a. Analysis of infrared images on transplants of *Xanthoria parietina* concerning the quality of air in Po delta

(North-East Italy). In: Effects of atmospheric pollutants on climate and vegetation. Abstracts (Taormina, 26-29 settembre 1991).

**Caniglia, G. e Zorer, R.** 1991b. Variazioni morfologico-dimensionali in espunti di *Xanthoria parietina* dislocati nel territorio del delta del Po. *Giorn. Bot. Ital.*, 125, (3), 351.

**Caniglia, G., Laveder, C., Zocca, C. e Zorer, R.** 1992. Osservazioni qualitative e quantitative su espunti lichenici di *Parmelia caperata*, *P. sulcata* e *P. elegantula* a Isola Serafini (Piacenza) e a Milano. *Giorn. Bot. Ital.*, 126, (2), 353.

**Caniglia, G., Laveder, C., Zocca, C., Calliari, I. e Zorer, R.** 1993a. Bioaccumulation of elements on thalli of *Pseudevernia furfuracea* exposed in urban and rural sites. *Giorn. Bot. Ital.*, 127, (3), 621.

**Caniglia, G., Laveder, C., Zocca, C., Zorer, R. e Calliari, I.** 1993b. A preliminary study of elemental bioaccumulation on *Pseudevernia furfuracea* thalli exposed in urban and rural sites. In: Nuclear Analytical Methods in the Life Science (Prague, 13-17 september 1993). Int. Conf. Book of Abstracts: 117.

**Caniglia, G. e Febbraretti, R.** 1994. Osservazioni sulla crescita di espunti lichenici nel centro cittadino di Padova. In: Aerobiologia e Inquinamento atmosferico, Abstracts VI Congr. AIA (Perugia, 5-8 ottobre 1994), 7.

**Cardarelli, E., Achilli, M., Campanella, L. e Bartoli, A.** 1993. Monitoraggio dell'inquinamento da metalli pesanti mediante l'uso di licheni nella città di Roma. *Inquinamento*, 6, 56-63.

**Casarini, P., Garavani, M. e Rolandi, E.** 1994. Licheni epifiti per la valutazione dell'inquinamento atmosferico a Pavia. *Ambiente Risorse Salute*, 32, 28-31.

**Casarini, P., Garavani, M. e Rinaldi, E.** 1994. Biomonitoraggio della qualità dell'aria nel centro abitato di Voghera mediante licheni. USSL 42 Pavia, PMIP, UO Fisica e Tutela dell'Ambiente (dattiloscritto).

**Casarini, P., Genoni, P. e Roella, V.** 1995. La qualità dell'aria nel Parco Regionale Lombardo della Valle del Ticino. Parco Ticino, 47.

**Castello, M., Nimis, P. L., Alleleo, D. e Bellio, M. G.** 1994. Biomonitoring of SO<sub>2</sub> and metal pollution with lichens and barks in Savona (N Italy). *Boll. Soc. Adr. Sc.*, 74 (I), 63-83.

**Cormagi, C.** 1993. I licheni tra scienza e poesia. Omaggio a Camillo Sbarbaro. *Not. Soc. Lich. Ital.*, 4, 83-87.

**Gasparo, D.** 1994. Biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico. I licheni epifiti come bioindicatori di inquinamento e bioaccumulato-ri di metalli pesanti. *Biologi Italiani*, 10, 16-20.

**Gasparo, D., Castello, M. e Bargagli, R.** 1989. Biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico tramite licheni. Studio presso un inceneritore (Macerata). *Studia Geobot.*, 9, 153-250.

**Giovenco, A., Ottonello, D., Dia, G. e Orecchio, S.** 1996. Licheni e inquinamento atmosferico. Qualità dell'aria nella zona metropolitana di Palermo. *Inquinamento*, 3, 48-52.

**Guidetti, L. e Stefanetti, M.** 1996. Biomonitoraggio della deposizione atmosferica di elementi in tracce tramite il lichene *Parmelia caperata* nell'area circostante il Lago d'Orta. *Acqua Aria*, 5, 489-497.

**Hawksworth, D.L. e Rose, L.** 1970. Qualitative scale for estimating sulphur dioxide air pollution in England and Wales using epiphytic lichens. *Nature*, 227, 145-148.

**Liebendoerfer, L., Herzig, R., Urech, M. e Amman, K.** 1988. Evolution und Kalibrierung der Schweizer-Indicationsmethode mit wichtigen Luftschadstoffen. *Staub-Reinhaltung der Luft*, 48, 233-238.

**Loppi, S.** 1994. Biomonitoraggio della qualità dell'aria tramite licheni nell'area geotermica di Travale-Radicondoli. In: **Loppi, S. e Sorbi, S.** (eds.): Geotermia in Toscana: Ambiente e Sviluppo Proc. Congr. (Siena, 26 marzo 1993), 12-19.

**Loppi, S., Chiarucci, A. e Bonini, I.** 1992. Preliminary data on the use of lichens as bioindicators of atmospheric pollution by geothermal emission. In: Environmental Impact Assessment. Situation and Perspectives in Europe. Proc. Int. Symp. (Genova, 16-18 maggio 1991), 455-456.

- Nimis, P. L.** 1985. Urban lichen studies in Italy. I: the town of Trieste. *Studia Geobot.*, 5, 49-74.
- Nimis, P. L.** 1994. Tecniche di biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico basate sull'utilizzo di licheni come bioindicatori e bioaccumulatori. *Biologi Italiani*, 8, 27-31.
- Nimis, P. L. e Dallai, D.** 1985. Lichens of hypogaeic cavities in the Apennines of Reggio Emilia (N-Italy). Le grotte d'Italia. *Atti Int. Symp. on Karst Phenomena in evaporites*, 4 (7), 373-382.
- Nimis, P. L., Monte, M. e Tretiach, M.** 1987. Flora e vegetazione lichenica di aree archeologiche del Lazio. *Studia Geobot.*, 7, 3-161.
- Nimis, P. L., Ciccarelli, A., Lazzarin, G., Bargagli, R., Benedet, A., Castello, M., Gasparo, D., Lausi, D., Olivieri, S. e Tretiach, M.** 1989 (1992). I licheni come bioindicatori di inquinamento atmosferico nell'area di Schio - Thiene - Breganze (VI). *Boll. Mus. Civ. St. Nat. Verona*, 16, 1-154.
- Nimis, P. L. e Castello, M.** 1990. L'uso dei licheni nel biomonitoraggio dell'inquinamento atmosferico. *Biologia ambientale*, 14, 5-25.
- Nimis, P. L., Castello, M. e Perotti, M.** 1990. Lichens as biomonitors of sulphur dioxide pollution in La Spezia (Northern Italy). *Lichenologist*, 22 (3), 333-344.
- Nimis, P. L., Lazzarin, G. e Gasparo, D.** 1991. Lichens as bioindicators of air pollution by SO<sub>2</sub> in the Veneto region (NE Italy). *Studia Geobot.*, 11, 3-76.
- Nimis, P. L., Castello, M. e Perotti, M.** 1993. Lichens as bioindicators of heavy metal pollution: a case study at La Spezia (N Italy). In: *Plants as Biomonitors* (ed. Markert B.). VCH, Weinheim, 265-284.
- Piervittori, R., Maffiotti, A., Laccisaglia, A. e Natale, P.** 1993. Bioaccumulation in *Xanthoria parietina* thalli in urban areas: transplant and analysis methods. In: *Agricultural and Environmental Biothecology: biodiagnosis, biocontrols, bioprocesses*. Proc. Congr. (Torino, 15-17 Settembre 1993), 228-229.
- Recchia, F. e Polidoro, F.** 1988. Osservazioni sui licheni nelle vicinanze di un cementificio. *Arch. Bot.*, 64 (1-2), 8-18.
- Roella, V., Guidetti, L. e Battioli, M. T.** 1995a. Bioindicazione della qualità dell'aria nelle province di Novara e Varese. Nicolini ed., Gavirate (VA), 63.
- Roella, V., Guidetti, L., Battioli, M. T., Gervasini, E. e Lazzarin, G.** 1995b. Bioindicazione della qualità dell'aria tramite licheni epifiti nel territorio circostante il Lago Maggiore (provincia di Novara e di Varese). Parte I. *Ingegneria Ambientale*, 24 (4), 185-195.
- Roella, V., Guidetti, L., Battioli, M. T., Gervasini, E. e Lazzarin, G.** 1995c. Bioindicazione della qualità dell'aria tramite licheni epifiti nel territorio circostante il Lago Maggiore (provincia di Novara e di Varese). Parte II. *Ingegneria Ambientale*, 24 (5), 267-276.
- Sartori, F., Nola, P., Terzo, V. e Valcuvia Passadore, M.** 1993. Indagine botanica sul territorio circostante la raffineria AGIP di Sannazzaro de' Burgundi. In *Progetto ambiente*, Università di Pavia, 1-37.
- Sbarbaro, C.** 1960. Scampoli. Firenze.
- Sbarbaro, C.** 1967. Licheni. Un campionario del mondo. Vallecchi, Firenze, 73.
- Valcuvia Passadore, M. e Gianatti, C.** 1995. L'inquinamento atmosferico a Sondrio: dati preliminari relativi a licheni come bioindicatori. *Arch. Geobot.*, 1, 45-51.
- Valcuvia Passadore, M. e Brusoni, M.** 1996. I licheni come bioindicatori di inquinamento atmosferico: dati preliminari relativi alla città di Brescia. *Arch. Geobot.*, 2 (1), 31-40.
- Wirth, V.** 1980. Flechtenflora. Ulmer, Stuttgart, pp. 552.
- Zocchi, A., Roella, V. e Calamari, D.** 1996. Valutazione della qualità dell'aria nel comune di Varese attraverso l'utilizzo di licheni epifiti. *Ingegneria Ambientale*, 25 (3), 78-87.

### 3.2 Briofite - *Michele Aleffi*

#### 3.2.1 Introduzione

La crescente produzione di sostanze tossiche da parte delle attività umane ha reso necessaria la ricerca di strumenti sempre più sensibili per il controllo della qualità dell'aria e dell'acqua, al fine di impostare una corretta gestione dell'ambiente, salvaguardando la salute umana e più in generale gli ecosistemi.

Gli approcci tradizionali alla valutazione dei fenomeni di inquinamento si affidano esclusivamente a strumentazioni analitiche operanti su base chimica o chimico-fisica. Tuttavia l'utilizzo delle centraline di rilevamento, indispensabile nel caso di aree soggette costantemente ad alti tassi di inquinamento atmosferico, come i grandi centri urbani, non può risolvere completamente il problema del monitoraggio dell'inquinamento per diversi motivi:

- limitazione delle misure effettuate con centraline nello spazio e nel tempo, per ovvie ragioni economiche;
- difficoltà nell'utilizzo e nella sintesi dei dati raccolti;
- impossibilità di stimare gli effetti sinergici delle sostanze considerate, in particolare dei metalli pesanti.

Nella stima dell'inquinamento è importante invece valutare l'influenza delle numerose variabili ecologiche sull'ambiente.

Esiste pertanto l'esigenza di un monitoraggio biologico (biomonitoraggio), basato appunto sulle variazioni ecologiche indotte dagli inquinanti sull'ambiente in tempi più o meno lunghi, e in concentrazioni medio-basse; queste si riflettono sugli organismi secondo tre modalità principali:

1. accumulo di sostanze inquinanti negli organismi;
2. modificazioni morfo-strutturali degli organismi;
3. variazione della composizione di un dato ambiente o comunità vegetale.

Ciò permette la realizzazione di elaborati cartografici su aree relativamente vaste e in tempi brevi.

Numerosi sono i requisiti richiesti a un organismo perché possa essere considerato un buon bioindicatore; tra essi i principali sono:

- accertata sensibilità agli agenti inquinanti;
- scarsa mobilità nell'ambito dell'area di indagine;
- ampia distribuzione in tutto il territorio in esame;
- ciclo vitale sufficientemente lungo;
- eventuali capacità di accumulo di sostanze inquinanti.

Le briofite sono particolarmente adatte per essere utilizzate nel biomonitoraggio ambientale, in quanto rispondono in maniera ottimale a tutti e cinque i requisiti sopra elencati.

Il biomonitoraggio mediante l'uso delle briofite è stato fino a oggi realizzato, sia in Italia che all'estero, avvalendosi di metodiche la cui efficacia è comprovata da una ricchissima letteratura a livello internazionale. Lisbona, Ginevra, Montreal, la regione del Quebec e l'estuario del fiume Tejo in Portogallo sono solo alcune fra le aree ad alta densità urbana e industriale in cui tali studi sono stati condotti in maniera sistematica; in Italia le ricerche che utilizzano le briofite come bioindicatori sono invece ancora allo stadio iniziale e sperimentale a causa della mancanza di specialisti briologi che si dedichino a tali in-

dagini. Tuttavia, numerose ricerche sono state avviate negli ultimi anni in diversi centri urbani e su alcuni corsi d'acqua, in particolare dell'Italia centrale, allo scopo di creare delle reti regionali di rilevamento naturale dell'inquinamento mediante briofite.

### 3.2.2 Ecologia delle briofite

Le briofite sono organismi diffusi in tutti i continenti. La distribuzione di questi vegetali dipende sia da fattori generali del clima, come la latitudine e l'altitudine, sia da fattori ecologici come l'umidità, l'illuminazione e l'interazione con gli altri esseri viventi. Questi fattori interagiscono fra di loro in modo molteplice. L'umidità rappresenta uno dei fattori principali di sopravvivenza delle briofite, anche se la maggior parte di esse può resistere a periodi più o meno prolungati di siccità. Il gametofito, non essendo provvisto di uno strato protettivo cutinizzato, può facilmente assorbire su tutta la sua superficie, l'acqua e il vapore acqueo dell'atmosfera. Allo stesso tempo, nei periodi di aridità i muschi, pur assumendo un aspetto disidratato, mantengono la loro vitalità. Il loro ciclo vitale è notevolmente rallentato e questo stato può avere una durata di alcuni mesi e talvolta, per alcune specie, anche di anni. Il ritorno dell'acqua ristabilisce il ritmo normale di vita della piantina.

La vegetazione briofitica è condizionata anche dai caratteri fisici e chimici del substrato su cui vive. La struttura fisica del substrato permette più o meno facilmente la circolazione dell'aria e la ritenzione di acqua; questa dipende dalla sua natura chimica: un suolo calcareo granuloso è in genere più secco e più caldo del suolo argilloso. Per alcune specie tuttavia il substrato può essere rappresentato anche dalla roccia nuda o dalla corteccia degli alberi viventi o in via di decomposizione. In ogni caso lo sviluppo della piantina è condizionato dal pH del substrato, per cui si possono distinguere specie calcicole e calcifughe più o meno esigenti. Gli sfagni, per esempio, prediligono ambienti acidi (pH 3-4), mentre le specie del genere *Cratoneuron* si sviluppano in acque basiche e calcaree (pH 6,8-8). Le specie corticicole sono invece condizionate dal pH della corteccia su cui crescono.

### 3.2.3 Caratteristiche degli indicatori biologici

Le briofite vengono considerate degli ottimi indicatori biologici in quanto, al variare dell'inquinamento dell'aria e dell'acqua, non solo cambia il loro aspetto esteriore, ma variano anche il numero e le specie presenti. Le variazioni ecologiche dell'ambiente si riflettono su tali organismi in tre modi: modificazioni morfostrutturali, accumulo di sostanze inquinanti e variazione della composizione floristica della comunità vegetale.

Nella maggior parte dei casi queste modificazioni non dipendono da fenomeni acuti di inquinamento, ma dall'inquinamento medio entro periodi più o meno lunghi. Gli organismi vengono quindi utilizzati come "centraline naturali permanenti".

Numerose sono le caratteristiche biologiche che fanno di questi organismi degli ottimi bioindicatori. Innanzitutto le briofite hanno elevata capacità di assorbimento e di accumulo delle sostanze prelevate dall'acqua e dall'atmosfera, in quanto sono sprovviste di cuticola e di aperture stomatiche, per cui attuano gli scambi gassosi attraverso tutta la superficie della piantina. Questo permette un assorbimento di elementi nutritivi e contaminanti che si protrae per lungo tempo.

In condizioni di stress ambientali le briofite rallentano inoltre le proprie attività metaboliche, per cui aumenta la loro resistenza agli inquinanti. Le basse temperature, per

esempio, permettono loro una attività continua anche nel periodo invernale, quando i livelli di inquinamento atmosferico sono più elevati.

Un'altra caratteristica rilevante è la persistenza delle parti vecchie o intossicate per accumulo delle sostanze tossiche, caratteristica che invece non si ritrova nelle piante superiori. Il lento accrescimento e la grande longevità sono infatti la causa della resistenza, nei centri abitati, di numerose specie di muschi ed epatiche e ciò permette di attuare una stima dell'inquinamento su tempi lunghi. Infine questi organismi sono molto sensibili agli agenti inquinanti quali anidride solforosa, idrocarburi, ozono, piombo, zinco, cadmio ecc.; questa sensibilità si manifesta con alterazioni nell'attività fotosintetica e nella riproduzione sessuale.

Le varie specie di muschi ed epatiche hanno in definitiva diversi gradi di tolleranza rispetto agli inquinanti; questo consente la realizzazione di "scale di tolleranza" con le quali è possibile stimare il grado di inquinamento di un determinato territorio a partire dalla sua flora briofitica.

### 3.2.4 Principali definizioni e metodi

Le briofite, in base alle loro caratteristiche fisiologiche ed ecologiche, possono essere utilizzate per il biomonitoraggio secondo due principali strategie:

- come bioaccumulatori, utilizzando la loro capacità di assorbire sostanze dall'atmosfera e analizzando le concentrazioni di queste nelle piantine (approccio diretto);
- come bioindicatori, correlando la ricchezza floristica, l'aspetto esteriore e la copertura alla presenza o assenza di inquinanti (approccio indiretto floristico).

Il metodo diretto permette il monitoraggio dell'inquinamento da metalli pesanti (piombo, cadmio, rame, zinco ecc.); il metodo indiretto permette invece il monitoraggio dell'inquinamento e la redazione di carte basate su indici di purezza atmosferica.

Gli studi basati sui bioindicatori non forniscono dati quantitativi esatti circa le concentrazioni di sostanze inquinanti presenti nell'atmosfera, ma forniscono informazioni sulla qualità dell'aria in una data regione.

#### 3.2.4.1 Bioaccumulatori

Un organismo viene definito bioaccumulatore quando può essere usato per misurare qualitativamente e quantitativamente le concentrazioni di una sostanza.

Sfruttando le capacità delle briofite di assorbire e accumulare i contaminanti persistenti in basse concentrazioni, negli ultimi anni questi organismi sono stati impiegati nel monitoraggio di metalli pesanti, di solfuri e fluoruri e di idrocarburi clorurati. In particolare, i metalli pesanti sono componenti intrinseci della crosta terrestre e quindi possono essere naturalmente presenti nell'aria, nell'acqua e nel suolo in quantità molto basse. Queste minime quantità vengono sopportate molto bene dalla parte biotica dell'ecosistema, senza determinare considerevoli modificazioni o danni. Tuttavia, il progressivo aumento delle attività umane che utilizzano i metalli, ha incrementato la concentrazione di questi elementi negli ecosistemi naturali, minacciando la vita degli organismi viventi.

Questo metodo diretto per misurare la qualità dell'aria e dell'acqua può essere di due tipi: passivo e attivo. Il primo utilizza organismi naturalmente presenti nell'ecosistema indagato; il secondo, mediante il trapianto, immette l'indicatore biologico negli ambienti in cui è assente. Inoltre questo tipo di studio è possibile solo se la specie in esame possiede un'alta tolleranza alle sostanze tossiche permettendo così di rilevare le



punte massime di inquinamento; inoltre deve possedere la capacità di accumulare le sostanze esaminate in misura indefinita. La piantina accumula le sostanze in maniera dipendente dalla concentrazione di queste nell'atmosfera o nell'acqua, e dal tempo di esposizione; quindi, a parità di concentrazione nell'ambiente, la contaminazione è più alta nel tallo più vecchio.

Per le determinazioni analitiche si utilizzano metodologie spettrofotometriche, gascromatografiche o rilevatori di radioattività.

Il tallo viene prelevato dal substrato, ripulito dai materiali estranei e analizzato: di esso si utilizza però solo la parte corrispondente all'ultimo anno di crescita e quindi all'ultimo anno di emissione di sostanze inquinanti. Il campione viene essiccato in stufa per 24 ore a una temperatura di circa 80-100°C, successivamente viene polverizzato mediante un mortaio di ceramica e infine mineralizzato a caldo utilizzando acido nitrico al 65% e acido perclorico al 70%. A questo punto è possibile determinare nei campioni le diverse concentrazioni di metalli pesanti per mezzo della spettrofotometria ad assorbimento atomico con sistema di atomizzazione a fornetto di grafite.

Una specie frequentemente utilizzata come bioindicatore di accumulo di metalli pesanti in ambiente terrestre, mediante biomonitoraggio passivo, è il muschio *Hypnum cupressiforme* (figura 3.1, vedi tavole a colori).

Questa specie, oltre a essere ubiquitaria e quindi facilmente reperibile sia in ambiente naturale che urbano, mostra una notevole capacità di resistenza agli agenti inquinanti, in particolare ai metalli pesanti.

In una ricerca condotta nella provincia di Macerata, nella fascia di territorio compresa fra le valli dei fiumi Chienti e Potenza, è stato effettuato un monitoraggio mediante *Hypnum cupressiforme* in dieci stazioni dislocate dalla zona interna collinare fino alla costa, allo scopo di valutare la concentrazione di cadmio, piombo, cromo e rame. I risultati di questo lavoro hanno complessivamente messo in evidenza, come si può osservare nella tabella 3.1, una scarsa presenza di metalli pesanti nell'a-

Stazioni		Cd	Pb	Cr	Cu
Camerino		0,11	15,64	3,99	15,10
S. Gregorio	0,08	7,55	1,07	7,32	
Fiungo		0,09	3,91	0,82	9,44
Belforte		0,08	1,24	1,10	9,26
Tolentino		0,07	1,08	1,18	9,65
Abbazia di Fiastra	0,07	2,09	0,81	8,52	
Pieve di Macerata	0,09	18,47	1,35	12,22	
Civitanova Marche	0,08	18,77	0,89	9,22	
Gole S. Eustachio	0,08	1,41	0,71	6,13	
Castello Lanciano	0,04	0,97	0,51	4,97	

Tabella 3.1 - Valori medi stagionali delle concentrazioni dei metalli pesanti in *Hypnum cupressiforme* (ppm).

rea studiata, essendo questa caratterizzata da un basso livello di industrializzazione e da una modesta presenza di quelle attività che danno luogo a una consistente emissione di metalli pesanti in atmosfera. Va tuttavia evidenziata la concentrazione del piombo nelle stazioni di Camerino, Macerata e Civitanova Marche, ove tale metallo presenta valori medi di gran lunga superiori a quelli delle altre stazioni e degli altri metalli analizzati. Tali maggiori concentrazioni indicano una chiara situazione di inquinamento, legata alla vicinanza delle tre stazioni di monitoraggio ai centri abitati e quindi più esposte delle altre alle emissioni del traffico veicolare, principale sorgente di piombo.

La metodologia del biomonitoraggio attivo si sta invece progressivamente affermando negli studi sulla contaminazione degli ecosistemi acquatici, in quanto, oltre ai compartimenti abiotici (acqua e sedimenti), vengono sempre più frequentemente presi in considerazione anche quelli biotici (organismi vegetali, fra cui le briofite, e animali). Questo tipo di monitoraggio si diversifica da quello passivo nelle prime fasi: infatti, il muschio da trapiantare viene raccolto in zone possibilmente incontaminate, viene lavato con acqua distillata e posto in appositi contenitori di forma cubica costruiti con una rete di plastica rigida. Questi campioni vengono posizionati in acqua e fissati con delle corde sulla riva del fiume, ricordandosi di lasciare sempre da parte, in laboratorio, un campione di muschio non contaminato come "testimone". Dopo quattro settimane trascorse nel fiume, i campioni di muschio vengono prelevati e risciacquati con la stessa acqua del fiume in cui sono stati trapiantati, per liberarli da eventuali detriti depositati. A questo punto le fasi metodologiche successive sono le stesse del biomonitoraggio passivo.

Le briofite acquatiche sono poco numerose, anche se la capacità di accumulo nelle diverse specie può essere considerata identica. In uno studio recentemente condotto su un tratto del fiume Potenza, nelle Marche, è stata utilizzata *Fontinalis antipyretica* (figura 3.2, vedi tavole a colori), una specie facilmente reperibile negli ambienti di acque correnti, sia in pianura che in alta montagna.

In alcune stazioni dislocate lungo il tratto più alto del corso d'acqua, sono state effettuate indagini di biomonitoraggio passivo nel quale i metalli presi in esame sono stati piombo, cromo, cadmio e rame.

Dall'analisi della tabella 3.2 si può osservare come i valori più elevati di accumulo dei metalli considerati, e in particolare del rame, si abbiano a valle del centro abitato di Pioraco: questo dato va messo in relazione con la presenza di una cartiera nelle vicinanze della stazione di rilevamento. Analoghe ricerche di biomonitoraggio attivo

Località	1990	1991	1990	1991	1990	1991	1990	1991
	Pb	Pb	Cr	Cr	Cd	Cd	Cu	Cu
S. Cassiano	2,75	—	9,51	—	0,12	—	15,28	—
A valle di Pioraco	3,98	5,72	3,40	7,07	0,09	0,12	95,04	35,69
Castello Lanciano	0,44	0,81	8,57	4,02	0,15	0,12	20,79	9,98

Tabella 3.2 - Valori medi della concentrazione dei metalli pesanti in *Fontinalis antipyretica* in situ (ppm).

hanno mostrato, nelle stesse stazioni, valori simili di accumulo di metalli pesanti. Questi risultati confermano che l'uso su vasta scala dei muschi come bioindicatori di accumulo si dimostra efficace proprio in virtù della loro spiccata capacità di adattamento a qualsiasi tipo di ambiente e la grande facilità di accumulare e tollerare contaminanti anche in quantità elevate.

#### 3.2.4.2 Bioindicatori

Viene definito bioindicatore un organismo che risponde con variazioni identificabili del suo stato a determinati livelli di sostanze inquinanti.

Le briofite presentano tutte le caratteristiche di un buon indicatore e numerosi studi hanno permesso di identificare i più evidenti tipi di risposta a situazioni di inquinamento.

*Riduzione della fotosintesi e della respirazione per danneggiamento della clorofilla.* Ricerche condotte sul terreno e in laboratorio hanno dimostrato che l'anidride solforosa è il principale inquinante che interessa su larga scala le briofite. I processi più colpiti sono la fotosintesi e la respirazione. La diversa sensibilità delle specie muscicole all'anidride solforosa è imputabile a diversi fattori: superficie disponibile per gli scambi gassosi e dunque per l'assorbimento dell'anidride solforosa; velocità di idratazione e idrorepellenza del tallo, attività metaboliche, pH e capacità tamponante del substrato sul quale la specie normalmente si sviluppa. I danni indiretti si verificano a causa dell'azione acidificante delle piogge e delle nebbie; la SO<sub>2</sub> infatti determina la riduzione della capacità tamponante e di conseguenza del pH del substrato; infine altera gli equilibri delle forme ioniche generate dall'anidride solforosa in soluzione acquosa, con danni alla clorofilla.

I danni diretti riguardano l'azione diretta della SO<sub>2</sub> sui muschi, che causa una riduzione dell'attività fotosintetica, danneggiando la clorofilla. Anche i metalli pesanti, come il piombo, riducono fortemente la fotosintesi.

*Riduzione della vitalità e fertilità della specie.* È causata prevalentemente dai metalli pesanti; man mano che ci si avvicina alle sorgenti inquinanti, si assiste a un progressivo peggioramento delle condizioni di salute della specie, e in particolare a una diminuzione della sua fertilità, in funzione del tempo di esposizione e dell'avvicinamento alla fonte inquinante.

*Riduzione della copertura e del numero totale delle specie nel tempo e nello spazio.* L'inquinamento da metalli pesanti ha anche effetti nocivi sulla copertura della specie e sul numero totale delle specie. Studi floristici, effettuati a distanza di anni sullo stesso territorio, mostrano una riduzione netta del numero delle specie riscontrate.

Anche nello spazio tale variazione si avverte in maniera sensibile: per esempio, passando dal centro cittadino alla periferia, si può notare un aumento del numero di specie, indipendentemente dal tipo di substrato considerato.

#### 3.2.4.3 L'Indice di Purezza Atmosferica (IAP)

Il passo successivo nell'identificazione delle risposte delle briofite all'inquinamento è quello di quantificare l'informazione fornita dai bioindicatori sulla qualità dell'aria e dell'acqua. In particolare, nella valutazione del grado di inquinamento atmosferico, negli ultimi decenni si è sviluppata una metodica basata sul numero, sulla frequenza

e sulla tolleranza delle specie muscicole presenti nell'area di studio considerata, e che quindi è in grado di fornire una valutazione quantitativa del livello di inquinamento dell'aria.

L'*Index of Atmospheric Purity* (IAP), questo è il nome dato a tale tipo di parametro, fu proposto da De Sloover nel 1964 in uno studio da lui effettuato sulla città di Montreal (Canada). Tale metodo viene applicato utilizzando come bioindicatori sia i licheni che le briofite epifite.

La formula originale messa a punto nel 1970 da Le Blanc e dallo stesso De Sloover è la seguente:

$$IAP = \frac{1}{n} \frac{Q \times f}{10}$$

dove  $n$  è il numero di specie epifite presenti in una stazione,  $Q$  rappresenta il fattore di resistenza di ciascuna specie all'inquinamento ed è dato dal numero medio di epifite che accompagnano la specie considerata, ed  $f$  il valore risultante dalla combinazione di frequenza, ricoprimento e abbondanza. La somma dei prodotti è divisa per dieci allo scopo di ottenere valori più facilmente comparabili.

Di fondamentale importanza risulta la scelta della specie arborea su cui effettuare il rilevamento, dal momento che le caratteristiche fisiche e chimiche della scorza influenzano in misura notevole la vegetazione epifitica. Inoltre tale scelta è subordinata a un'ampia distribuzione della specie arborea nell'area di studio considerata. Molte sono le specie arboree che sono colonizzate dalle briofite; tuttavia esse mancano su alberi la cui corteccia si sfoglia in placche sottili come nel platano, o con ritidoma che si stacca in scaglie come nelle conifere, o con corteccia levigata e difficilmente alterabile a opera dell'acqua meteorica, per cui le spore non riescono a germinare, come nel caso della betulla.

Normalmente, negli studi fino a oggi effettuati in varie località italiane ed estere, sono stati utilizzati il tiglio (*Tilia* sp.) o il frassino (*Fraxinus* sp.), che sovente si trovano nelle città per la realizzazione di viali alberati e giardini, e la quercia (*Quercus* sp.), presente prevalentemente nelle aree periferiche intorno ai centri abitati. Oltre alla loro ampia distribuzione, la scorza di questi alberi presenta una reazione subacida (pH 4,5-5) che favorisce l'attecchimento delle specie muscicole.

Anche l'età della pianta ospite è molto importante nel condizionare l'insediamento delle briofite; infatti essa influisce sullo spessore degli strati periferici del sughero, sulle condizioni di asperità e di fessurazione delle cortecce e di conseguenza sulla maggiore possibilità di trattenere l'acqua meteorica, il pulviscolo, il terriccio e i vari detriti che vanno a formare un deposito, sia pur modesto, di humus.

L'insediamento e la distribuzione delle briofite epifite dipendono anche dall'interazione di diversi fattori ambientali come la luce, l'esposizione, l'umidità, la temperatura.

Viene a questo punto individuato nell'area di studio un certo numero di stazioni di rilevamento per ognuna delle quali viene effettuata una quantità variabile di rilievi, su alberi diversi, in rapporto al loro numero e alla loro dislocazione sul territorio. Mediamente ciascuna stazione deve essere costituita da almeno 5 alberi. Si tratta di esemplari isolati, inevitabilmente più esposti all'impatto dell'inquinamento, posti in città,

lungo strade e viali e, in periferia, al margine delle colture e dei pascoli. Inoltre gli alberi devono rispondere a determinate caratteristiche affinché i rilievi possano avere i requisiti di validità:

- inclinazione del tronco non superiore ai 10° per eliminare variazioni microclimatiche dovute a zone di scolo preferenziale dell'acqua;
- circonferenza superiore ai 70 cm, scartando quindi gli alberi giovani che possono presentare condizioni ecologiche diverse rispetto agli individui adulti;
- assenza di fenomeni evidenti di disturbo come verniciatura, capitozzatura, o applicazione di anticrittogamici.

Il rilievo su ciascun albero viene effettuato applicando sul tronco, a una altezza compresa fra i 50 e i 200 cm, nella zona di massima densità briofitica, una griglia delle dimensioni di 30x100 cm, suddivisa in 10 rettangoli di 30 x 10 cm (figura 3.3, vedi tavole a colori).

Vengono quindi annotate le specie e la loro frequenza intesa come numero di rettangoli in cui ogni specie è presente (min 1, max 10).

Vengono poi calcolate la frequenza, il ricoprimento e l'abbondanza di tutte le specie presenti entro la griglia, rapportandole a delle tabelle standard; a questo punto è possibile quindi calcolare la frequenza totale  $f$  del rilievo.

L'indice IAP relativo a una stazione è dato dalla media delle frequenze totali degli  $n$  rilievi nella medesima stazione. Valori elevati indicano una migliore qualità dell'aria, mentre valori bassi segnalano situazioni di degrado.

Tale metodo permette di predire i tassi di inquinamento con una certezza pari al 98% rispetto ai dati ottenuti mediante l'uso di centraline automatiche di rilevamento. Questo metodo risulta quindi molto interessante per l'alta predittività, per la relativa facilità di esecuzione, per la bassa soggettività e alta riproducibilità dei dati e, infine, fatto non trascurabile, per l'alto contenimento dei costi di realizzazione.

Negli ultimi anni sono state condotte da alcuni ricercatori del Dipartimento di Botanica ed Ecologia dell'Università di Camerino indagini in alcuni centri urbani delle Marche, fra cui Macerata, Jesi e Camerino, finalizzate alla valutazione dell'IAP tramite briofite epifite.

Nella maggior parte dei rilievi effettuati si è potuto notare che tutte le specie presentavano un ricoprimento medio compreso fra l'1% e il 3%, a eccezione di *Tortula ruralis* e *Tortula papillosa*, con un ricoprimento medio compreso fra il 5% e l'8%.

Inoltre si è potuto osservare che le specie più frequentemente rinvenute nei tre centri erano *Orthotrichum diaphanum*, *Tortula papillosa*, *Tortula ruralis* e *Orthotrichum affine* (figura 3.4, vedi tavole a colori).

Recenti studi effettuati in alcune città della Spagna, hanno potuto dimostrare come alcune specie abbiano una diversa sensibilità alla concentrazione di SO<sub>2</sub>. In particolare, *Orthotrichum diaphanum* e *Tortula papillosa* si sono dimostrate mediamente tolleranti, mentre *Tortula ruralis* viene indicata come una specie tollerante, in quanto, sebbene non risulti particolarmente favorita dall'inquinamento, è capace di sopportare alte concentrazioni di SO<sub>2</sub>. Partendo da tali considerazioni è possibile, già su base floristica, osservare come le specie che si ritrovano più frequentemente nei centri studiati siano le più resistenti all'inquinamento.

Analizzando invece i valori di IAP, si può innanzitutto rilevare una diminuzione progressiva di tali indici man mano che ci si sposta dalle stazioni periferiche a quelle

situate in prossimità del centro storico o che comunque sono localizzate lungo viali sottoposti a un più intenso traffico veicolare. Nel fare queste considerazioni va naturalmente tenuto presente che, se alcuni parametri climatici, quali la temperatura e le precipitazioni, hanno un notevole peso sulla composizione floristica della vegetazione briofitica di una determinata zona, il parametro dei venti è determinante per quanto concerne la diffusione degli inquinanti e lo studio degli effetti delle fonti inquinanti sulla vegetazione briofitica.

Nella *tabella 3.3* sono sintetizzati, a titolo esemplificativo, i valori di IAP rilevati nelle città di Macerata, Jesi e Camerino. Si può notare subito come i valori di IAP relativi alla città di Camerino siano piuttosto elevati, soprattutto se posti a confronto con i dati ottenuti a Macerata e Jesi. Questa notevole differenza di valori va messa in relazione con la differente struttura urbana, il diverso grado di urbanizzazione e di industrializzazione dei tre centri e con una conseguente, diversa qualità dell'aria.

Località	Staz. 1	Staz. 2	Staz. 3	Staz. 4	Staz. 5	Staz. 6
Macerata	2,58	1,33	0,99	0,94	1,31	1,03
Jesi	0,71	0,84	1,45	0,73	0,76	0,85
Camerino	3,45	3,70	3,81	4,08	2,40	—

Tabella 3.3 - Tabella comparativa dei valori di IAP di Macerata, Jesi e Camerino.

### 3.2.5 Conclusioni

I risultati ottenuti utilizzando le briofite, secondo le diverse metodologie precedentemente esposte, nella valutazione del grado di inquinamento, sia nell'acqua che nell'aria, confermano la validità dell'uso di questi organismi come bioindicatori. Queste ricerche hanno tuttavia messo in evidenza la necessità di prendere in considerazione il maggior numero di stazioni possibili, uniformemente distribuite nell'area di studio, con l'evidente vantaggio di una maggiore capillarità e quindi precisione nel monitoraggio.

L'inquinamento tuttavia non rappresenta l'unico fattore responsabile della distribuzione di questi organismi. In analoghe ricerche si è potuto constatare che nelle stazioni in cui non si riscontra un forte inquinamento, altri sono i fattori che influenzano la vegetazione epifitica fra cui il tipo di suolo, la sua umidità, i valori di pH ecc. Un altro elemento capace di svolgere un ruolo importante nella distribuzione delle briofite è rappresentato dal microclima in cui esse si sviluppano e crescono, come pure la presenza di altre specie antagoniste.

Ulteriori ricerche devono quindi andare nella direzione di una migliore conoscenza del microclima dell'area di studio e di una maggiore capillarizzazione dei rilievi. Occorre cioè prendere in considerazione il maggior numero di stazioni possibili, ripartite uniformemente nel territorio, allo scopo di creare una rete di rilevamento naturale dell'inquinamento atmosferico e di perfezionare i criteri e le metodologie di tipo quantitativo legate direttamente alla ricchezza delle vegetazione epifitica.

I dati analitici potranno in tal modo essere oggetto di elaborazioni statistiche e cartografiche, effettuate con metodiche computerizzate allo scopo di eliminare interpretazioni soggettive, sia nell'analisi dei risultati che nel riporto cartografico degli stessi.

Gli studi effettuati tramite bioindicatori e bioaccumulatori non vanno comunque considerati come una alternativa nei confronti dell'uso di centraline di rilevamento strumentali; la possibilità di uno *screening* su ampia scala territoriale rapido, poco esteso e basato sull'uso di questi organismi vegetali, può essere visto anche come strumento conoscitivo di base e utile mezzo per la localizzazione ottimale delle centraline di rilevamento. Le tecniche di rilevamento biologico e quelle chimico-fisiche sono quindi alternative nei metodi, ma complementari nei fini: è quindi irrazionale contrapporle. I due metodi possono benissimo integrarsi fra loro, poiché forniscono, l'uno un'ampia capacità di sintesi, l'altro un'alta precisione analitica.

## Bibliografia

**Agneta, M. e Burton, S.** 1990. Terrestrial and aquatic bryophytes as monitors of environmental contaminants in urban and industrial habitats. *Bot. J. Linn. Soc.*, 104, 267-280.

**Barkman, J. J.** 1958. Phytosociology and ecology of cryptogamic epiphytes. Van Goreum and Co., Assen.

**Barkman, J. J.** 1968. The influence of air pollution on bryophytes and lichens. In: Air pollution, Proc. First European Congress on the influence of air pollution on plants on animals (Wageningen), 197-209.

**Cortini Pedrotti, C.** 1992. Le Briofite quale componente strutturale e funzionale degli ecosistemi forestali. *Ann. Accad. Ital. Sci. Forest.*, XLI, 163-190.

**De Sloover, J.** 1964. Végétaux épiphytes et pollution de l'air. *Rev. Quest. Sci.*, 25, 531-561.

**Glime, J. M. e Vitt, D. H.** 1984. The physiological adaptations of aquatic Musci. *Lindbergia*, 10, 41-52.

**Grodzinska, K.** 1982. Monitoring of air pollutants by mosses and tree bark. In: **Steubing, L. e Jager, A. J.** (eds.), Monitoring of air pollutants by plants, 33-42.

**Le Blanc, F. e De Sloover, J.** 1970. Relation between industrialization and the distribution

and growth of epiphytic lichens and mosses in Montreal. *Can. J. Bot.*, 48, 1485-1496.

**Le Blanc, F. e De Sloover, J.** 1972. Effet de l'industrialisation et de l'urbanisation sur la végétation épiphyte de Montréal. *Sarracenia*, 15, 1-41.

**Le Blanc, F. e Rao, D. N.** 1973. Evaluation of the pollution and drought hypotheses in relation to lichens and bryophytes in urban environments. *The Bryologist*, 16, 1-19.

**Le Blanc, F. e Rao, D. N.** 1975. Effects of air pollutants on lichens and bryophytes. In: **Mudd, J. B. e Kozlowski, T. T.** (eds.), Responses of plants to air pollutants, 231-272. Academic Press, New York.

**Lötschert, W., Wandtner, R. e Hiller, H.** 1975. Schwermetallenreicherungen bei Badenmoosen in Immissionsgebieten. *Ber. Deutsch. Bot. Gesellsch.*, 88, 419-431.

**Manning, W. J. e Feder, W. A.** 1980. Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Publishers LDT, London.

**Papert, A.** 1990. Bryophytes corticoles dans le canton de Genève: aperçu floristique et bioindication. *Saussurea*, 21, 123-146.

**Puckett, K. T.** 1988. Bryophytes and lichens as

monitors of metal deposition. *Bibl. Lichenol.*, 30, 231-267.

**Rao, D. N.** 1982. Responses of Bryophytes to air pollution. In: **Smith, A. J. E.** (ed.), *Bryophyte ecology*: 445-471.

**Rasmussen, L. e Johnsen, I.** 1976. Uptake of mineral, particularly metals, by epiphytic *Hypnum cupressiforme*. *Oikos*, 27, 483-487.

**Rühling, A. e Tyler, G.** 1969. Ecology of heavy metals, a regional and historical study. *Bot. Not.*, 122, 248-259.

**Say, P. J. e Whitton, B. A.** 1983. Accumulation of heavy metal by aquatic mosses. I. *Fontinalis antipyretica* Hedw. *Hydrobiology*, 100, 245-260.

**Shaw, A. J., Beer, S. C. e Lutz, J.** 1989. Potential

for the evolution of heavy metal tolerance in *Bryum argenteum*, a moss. I. Variation within and among populations. *The Bryologist*, 92, 73-80.

**Smith, A. J. E.** 1978. The moss flora of Britain and Ireland. Cambridge University Press, Cambridge.

**Tyler, G.** 1990. Bryophytes and heavy metals, a literature review. *Bot. J. Linn. Soc.*, 104, 231-253.

**Wehr, J. D.** 1983. Accumulation of heavy metal by aquatic bryophytes in streams and rivers in Northern England. Dept. of Botany, Univ. Durham.

**Winner, W. E.** 1988. Responses of bryophytes to air pollution. In: **Nash, T. H. e Wirth, V.** (eds.), *Lichens, Bryophytes and air quality. Bibl. Lichenol.*, 30, 141-173.

### 3.3 Tessuti e organi di vegetali vascolari

#### 3.3.1 Radice - Silvia Assini

##### 3.3.1.1 Premessa

Insieme a fusto e foglie, la radice forma il corpo vegetativo delle piante vascolari. Si origina dalla radichetta dell'embrione, contenuto nel seme. È l'organo destinato ad approfondirsi nel terreno dove svolge funzioni di vario tipo.

Osservando una radice, si constata che da essa si dipartono numerose ramificazioni a loro volta ramificate. Si tratta di radici laterali di primo ordine (che si distaccano dalla radice principale), di radici laterali di secondo ordine e così via.

La radice si distingue dal fusto, principalmente, per la mancanza di cuticola, stomi e foglie; da ciò deriva una delle fondamentali differenze fisiologiche tra parti epigee e parti radicali ipogee di un vegetale: le porzioni aeree delle piante sono facilitate nello scambio dei gas; le radici sono facilitate nella captazione dell'acqua e delle sostanze minerali.

Le radici svolgono anche altre funzioni importanti, tra cui, la fissazione e l'ancoraggio della pianta, nonché l'accumulo di sostanze di riserva.

Il problema più importante nello studio degli apparati radicali dei vegetali consiste nell'indagare le loro differenti tipologie tra specie differenti e/o tra individui della stessa specie, considerando le variazioni causate dai cambiamenti delle condizioni am-



bientali. Ai fini di una valutazione ecologica e di un'analisi della vegetazione sono significative le caratteristiche morfo-anatomiche degli apparati radicali, nonché la loro produttività intesa come massa (Kutschera-Mitter, 1984).

L'influenza di alcuni fattori sulla crescita degli apparati radicali è evidenziata dall'estensione laterale e verticale della radice e dal rapporto delle estensioni radice/fusto. Questo rapporto è maggiore in condizioni di elevata luminosità e di ridotte disponibilità di acqua e nutrienti nel suolo. Inoltre, la penetrazione della radice è maggiore nei suoli riscaldati fino a grandi profondità e spesso raffreddati in superficie, se ciò determina un intenso movimento di vapore dagli strati più profondi a quelli superiori. Il rapporto radice/fusto è minore in condizioni di scarsa luminosità e di buona disponibilità di acqua e nutrienti nel suolo. Anche la penetrazione delle radici è più limitata in suoli riscaldati solo superficialmente o con scarse variazioni di temperatura e umidità (Kutschera-Mitter, 1984).

In merito all'impiego delle radici come indicatori di condizioni critiche e di stress dell'ambiente, si possono considerare sia l'organo intero come tale e, in particolare, le sue caratteristiche morfologiche, sia tessuti, cellule e processi fisiologici che lo interessano. Relativamente a quest'ultimo aspetto, risultano importanti i meccanismi di accumulo e di rilascio di sostanze chimiche, di metalli, di composti organici ecc.

Un'altra caratteristica delle radici che può essere sfruttata ai fini di una valutazione ecologica, è la loro capacità di realizzare unioni simbiotiche con i funghi, dette micorrize. Confronti tra lo stato di salute di differenti aree boscate possono essere basati, tra i vari parametri, anche sulla consistenza delle micorrize radicali. Power e Ashmore (1996) hanno osservato che, nella parte meridionale della Gran Bretagna, faggi (*Fagus sylvatica* L.) sani possedevano micorrize vitali in proporzioni maggiori rispetto ai faggi debilitati.

Un'analisi dettagliata di tutte le possibilità di impiego delle radici ai fini del monitoraggio ambientale si tradurrebbe in una monografia che andrebbe al di fuori dei limiti e degli scopi previsti dall'opera in cui questo contributo si inserisce.

Pertanto il lavoro si limita a prendere in considerazione soltanto gli aspetti che riguardano gli apparati radicali nel loro complesso, tralasciando le informazioni relative a tessuti, cellule e processi fisiologici, dei quali, tuttavia, si potranno fare cenni quando siano importanti per dare completezza all'argomento trattato.

Questo contributo, che si basa esclusivamente su una indagine di tipo bibliografico relativa al tema in esame, descrive le metodologie utilizzate per lo studio degli apparati radicali, il tipo di informazioni estraibili, la validità delle procedure applicate, con tutti i limiti, ovviamente, derivanti dalla mancanza di un'esperienza diretta dello scrivente.

In Italia, infatti, lavori di questo genere sono scarsi, in quanto gli studi sull'uso delle piante come bioindicatori si sono concentrati prevalentemente sulle variazioni genetiche delle parti che costituiscono un vegetale, indotte da modificazioni ambientali. L'indagine bibliografica, conseguentemente, sarà rivolta soprattutto alle esperienze maturate nei paesi esteri, non mancando, ovviamente, i riferimenti alla letteratura italiana, quando esistenti.

Il lavoro è stato articolato in tre sezioni, ognuna delle quali si riferisce a un tipo diverso di informazione estraibile dallo studio degli apparati radicali e, di conseguenza, a una differente metodologia di indagine applicata.

La prima sezione, intitolata “*Allium Test*”, riguarda l’applicazione di una metodica che utilizza i bulbi di alcune specie del genere *Allium* per monitorare gli effetti tossici della contaminazione di acque naturali.

La seconda sezione, intitolata “Test di fitotossicità”, si riferisce all’impiego di semi di varie specie vegetali che vengono fatti germinare in situazioni controllate sperimentalmente, sottoponendoli all’azione di soluzioni contenenti concentrazioni diverse di vari metalli, per testare la sensibilità delle specie nei confronti dei metalli impiegati, misurando le variazioni dell’allungamento radicale.

La terza sezione, intitolata “Radici e fattori ambientali in situazioni di stress”, prende in esame i sintomi manifestati dagli apparati radicali di alcune specie forestali, riconducibili al fenomeno tanto discusso della moria del bosco. Viene quindi riportato, a titolo di esempio, un lavoro in cui, sperimentalmente, si è tentato di comprendere i rapporti di causa/effetto collegati a questa situazione patologica della foresta. Non esiste ancora, infatti, una teoria valida che spieghi e interpreti con chiarezza il declino del bosco.

Segue, infine, un paragrafo intitolato “Altre applicazioni”, in cui si riporta un ulteriore utilizzo degli apparati radicali per valutare l’efficacia di piante arboree impiegate nel recupero di una discarica RSU e le considerazioni finali.

### 3.3.1.2 Sezione I. *Allium test*

*Introduzione.* Per realizzare questo test occorrono i bulbi di specie o varietà appartenenti al genere *Allium* (in Fiskesjö, 1985b, sono utilizzate varietà commerciali di *Allium cepa*).

*Informazioni deducibili.* Il test può essere utilizzato per monitorare gli effetti tossici e genetici della contaminazione in acque naturali. Quando la pianta di *Allium* viene a contatto con campioni d’acqua contaminati da sostanze che alterano la normale attività cellulare, diminuisce la crescita radicale e compaiono aberrazioni microscopiche.

*Metodo d’uso.* È stato descritto dettagliatamente da Fiskesjö (1975, 1979, 1985a). In breve: bulbi di uguale misura sono puliti a fondo e collocati in provette riempite con l’acqua dei campioni che devono essere testati. Ogni campione d’acqua è testato con 5-6 bulbi. I campioni d’acqua, incluso il campione di controllo (costituito da acqua di rubinetto), sono cambiati quotidianamente. I campioni testati e i campioni di controllo sono fotografati il terzo o il quarto giorno e vengono determinate le lunghezze delle radici. Confrontando la lunghezza delle radici dei bulbi posti nelle provette contenenti i campioni d’acqua da testare con la lunghezza delle radici dei bulbi posti nelle provette con acqua del rubinetto si possono dedurre le condizioni qualitative dell’acqua testata.

*Discussione.* Il test rappresenta un metodo semplice, ma molto efficiente, per controlli rapidi ed estensivi sulla qualità delle acque. Può rivelare e localizzare con precisione, in modo veloce e poco costoso, eventuali contaminazioni dovute a fonti sconosciute, essendo così preliminare a studi più dettagliati e sofisticati, di tipo chimico o di altro tipo.

Questo test si è rivelato utile ed efficiente nell’evidenziare e valutare i rischi biologici attribuibili all’acqua di un fiume (in particolare nella Svezia meridionale) dopo la sua contaminazione con prodotti industriali di scarto. Anche il recupero dell’acqua del fiume, dopo la rimozione della fonte contaminante, potrebbe essere osservata con questo test.

Il test può essere integrato con studi a carattere microscopico. Infatti, è stata dimostrata una buona correlazione tra la ridotta crescita delle radici e la presenza di segni microscopici indicatori di cellule avvelenate; accurate indagini citogenetiche possono chiarire il tipo specifico di aberrazioni indotte. I citogenetisti esperti possono ottenere valide informazioni circa la natura del contaminante da una dettagliata analisi delle risposte cellulari.

Anche lo studio dell'attività mitotica (o indice mitotico) delle cellule radicali fornisce informazioni utili; Vidakovic e Pape (1993), utilizzando l'*Allium Test*, analizzano la tossicità di fluidi di scarto considerando solo i parametri citogenetici sopra indicati (indice mitotico percentuale di aberrazioni cromosomiche e genomiche) relativi alle cellule radicali di *Allium ascalonicum* L.

Mukerjee e Sharma (1988) hanno studiato gli effetti del cadmio e del selenio sulla divisione cellulare e sulla comparsa di aberrazioni cromosomiche in cellule degli apici radicali di *Allium sativum*.

### 3.3.1.3 Sezione II. Test di fitotossicità

*Introduzione.* Per la realizzazione di questo test vengono utilizzati i semi delle seguenti specie vegetali: ravanello comune (*Raphanus sativus* var. *radicula* Perzoon); frumento (*Triticum aestivum* L. var. Florida 301); lattuga coltivata (*Lactuca sativa* L.); cavolo comune (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.); cavolo rapa (*Brassica rapa* L.); miglio coltivato (*Panicum miliaceum* L.).

*Informazioni deducibili.* Questo metodo permette di valutare la sensibilità delle suddette specie nei confronti di alcuni metalli, quali berillio, nichel, tallio e vanadio; le specie sensibili possono, quindi, essere utilizzate per testare la tossicità di sostanze, disperse nell'ambiente, che contengano tali metalli.

*Metodo d'uso.* Vengono preparate soluzioni sperimentali utilizzando  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Ti}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{VOSO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e sali di  $\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (puri al 99,9%) in 0,001 M di  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  per ottenere concentrazioni di 0 - 0,25 - 0,5 - 1 - 2 - 4 - 8 - 12 - 16 e 20 mg Ni/L e 0 - 0,5 - 1 - 2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 20 - 30 e 40 mg/L di Be, Tl e V. Il nitrato di calcio è utilizzato come soluzione stabilizzante per mantenere costante il potere ionico attraverso tutte le concentrazioni dei metalli.

Semi di cavolo comune, lattuga coltivata, miglio coltivato, ravanello comune, cavolo rapa e frumento sono collocati in capsule Petri (10 semi alla volta di una data specie per capsula) contenenti un pezzo di carta da filtro (Whatman No. 1). Ogni capsula Petri viene poi trattata con 4 ml di soluzione appropriata, coperta con Parafilm<sup>TM</sup> e collocata in una camera ambientale. Ogni trattamento viene ripetuto 10 volte per un totale di 100 capsule per specie per ogni metallo. La camera ambientale è mantenuta con fotoperiodo luce/oscurità di 16/8 ore, temperature diurna e notturna, rispettivamente di 28°C e 24°C. L'illuminazione viene fornita da lampade fluorescenti bianche di 64  $\mu\text{E s/m}$ .

Dopo tre giorni viene misurato l'allungamento radicale di ogni plantula germinata nelle capsule e viene calcolata la media delle lunghezze radicali per ogni capsula. Queste medie sono utilizzate per le analisi statistiche. Mediante il programma statistico SAS Institute, Cary, NC, si realizzano curve di regressione lineare e confronti multipli. Al fine di effettuare i confronti tra le specie vegetali, le lunghezze radicali sono espresse come percentuali. Queste percentuali sono allora utilizzate per determinare la relativa sensibilità delle piante nei confronti dei quattro metalli considerati.

*Discussione.* I risultati del lavoro di riferimento (Carlson *et al.*, 1991) evidenziano l'elevata variabilità di risposte che le piante manifestano nei confronti dei metalli. Trattamenti con basse concentrazioni di Be, Ni o V stimolano l'allungamento radicale nella maggior parte delle specie. Concentrazioni più elevate di questi elementi e tutti i trattamenti con Tl provocano una riduzione nell'allungamento delle radici. In generale, *Brassica rapae* e *Lactuca sativa* sono le specie più sensibili tra quelle utilizzate, mentre *Triticum aestivum* e *Panicum miliaceum* sono le meno sensibili.

Nel selezionare le specie vegetali da usare per test di tossicità si dovrebbe prestare molta cura; è importante, infatti, utilizzare più specie.

Wang (1991) afferma la non accettabilità del test quando germina meno dell'85% dei semi.

Il metodo è approvato dalla US EPA, 1982 (Environmental Protection Agency).

Il test dell'allungamento radicale può essere utilizzato per monitorare acque, acque di scolo, sedimenti e fanghi; ha il vantaggio di non essere eccessivamente costoso. Una sua importante applicazione riguarda lo studio delle piogge acide.

Altri ricercatori hanno utilizzato piante diverse, da quelle descritte precedentemente, per testare la sensibilità nei confronti di altri metalli e/o sostanze chimiche, come emerge dalla revisione bibliografica realizzata da Wang (1991) e da Balsberg Pahlsson (1989).

Quest'ultima, in particolare, tratta la tossicità di zinco, rame, cadmio e piombo sulle piante vascolari, riportando delle tabelle di sintesi indicanti, per ognuno dei suddetti metalli, la concentrazione minima tossica (espressa in ppm e in  $\mu\text{M}$ ), le condizioni di crescita in cui si è realizzato l'esperimento, la specie vegetale studiata, gli effetti osservati e il riferimento bibliografico.

Nyamangombe e Lefèbre (1986) hanno testato la tolleranza di varietà africane ed europee di *Zea mays* nei confronti dell'alluminio, considerando la crescita radicale di giovani plantule, allo scopo di individuare varietà da utilizzare in condizioni edafiche poco favorevoli.

In Italia, Pirola *et al.* (1996), al fine di ricercare piante spia che evidenziassero i disturbi legati alla presenza di discariche di sostanze tossiche e nocive attraverso modificazioni morfologiche di apparati vegetativi e riproduttivi, hanno studiato lo sviluppo dell'apparato radicale di *Chenopodium album*, *Setaria viridis*, *Digitaria sanguinalis* e *Portulaca oleracea*; gli Autori osservarono una riduzione dell'apparato radicale negli individui crescenti all'interno della discarica rispetto a quelli viventi all'esterno della stessa. Indagini più dettagliate furono effettuate su *Solidago gigantea*, che cresceva rigogliosa in una parte della discarica ricca di idrocarburi; i semi di tale specie furono fatti germinare in laboratorio somministrando loro soluzioni a concentrazione crescente di piombo, rame e nichel. I risultati evidenziarono il perfetto adattamento della specie al substrato di melme acide e la capacità di agire come accumulatore nei confronti dei metalli esaminati, non presentando segni evidenti di danno, almeno alle concentrazioni considerate.

### 3.3.1.4 Sezione III. Radice e fattori ambientali in situazioni di stress

La deposizione cronica di inquinanti atmosferici è considerata comunemente come il fattore che contribuisce in maggior modo ad accelerare il tasso di mortalità forestale e a ridurre il tasso di crescita nelle piante.

L'ozono e le precipitazioni acide sono i due agenti citati più frequentemente come cause primarie nel problema del declino forestale (Simmons e Kelly, 1989).

Poco dopo la pubblicazione dei primi rapporti sulla moria dei boschi in Europa e nel Nord America, studi comparativi evidenziarono alterazioni degli apparati radicali negli alberi danneggiati. Nonostante i sintomi del declino delle foreste variassero da specie a specie e a seconda delle località, si osservavano fenomeni comuni come la perdita di vitalità delle radici fini, cambiamenti nella composizione chimica e disfunzioni nelle micorrize (Matzner e Murach, 1995).

Münzenberger *et al.* (1995) indagarono l'influenza di inquinanti atmosferici industriali ( $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_x$ , ceneri alcaline volatili) sulla vitalità delle micorrize, sulla loro frequenza e su alcuni parametri della crescita radicale quali la biomassa radicale e la necromassa, nonché la distribuzione delle differenti classi di radici negli orizzonti edafici. Gli studi furono condotti in tre ecosistemi forestali confrontabili di *Pinus sylvestris* L. localizzati nella Germania orientale che furono esposti a differenti carichi di inquinanti atmosferici. Gli Autori osservarono un maggior numero di micorrize vitali, una maggior frequenza di micorrize e una maggior biomassa radicale delle radici più fini nel sito sottoposto a scarsa deposizione. Essi interpretarono la crescita ridotta di micorrize e di radici fini non micorriziche nei due siti sottoposti a maggior inquinazione atmosferica come un meccanismo di adattamento del sistema radicale a un più elevato input di nutrienti.

Anche Heisendorf (1993) osservò una riduzione della quantità di radici fini, di micorrize e di crescita delle piante nelle foreste di *Pinus sylvestris* L. delle pianure della Germania orientale, attribuendo questi effetti all'input di  $\text{NH}_3$ , causato dall'agricoltura, che determina una sovranutrizione dei siti occupati dal pino, un accumulo di N nel suolo e una drastica modificazione della vegetazione con crescita lussureggiante di infestanti e arbusti o della copertura erbacea.

Per verificare le cause delle alterazioni radicali furono realizzati molti studi in cui gli organismi vegetali venivano sottoposti, sperimentalmente, all'azione di livelli cronici di ozono e a piogge acide simulate.

Si riporta il lavoro di Simmons e Kelly (1989) per cogliere la linea metodologica applicata.

*Introduzione.* Per questo esperimento vengono utilizzate giovani plantule, derivate da seme, di *Pinus taeda* L.

*Informazioni deducibili.* Con questo tipo di esperimento si intende valutare gli effetti, sugli apparati radicali, dell'ozono, di piogge acide simulate e della presenza di magnesio nel suolo.

*Metodo d'uso.* Per l'esperimento è stato utilizzato terreno di tipo siliceo argilloso prelevato dall'orizzonte A del suolo di una preesistente foresta a legno duro che era stata preparata per la conversione in foresta di pino. Il terreno è stato poi setacciato attraverso un setaccio a maglie di 10 mm e mescolato con sabbia derivata dalla stessa arenaria da cui si era formato il suolo. In questo modo si è ottenuta un'argilla sabbiosa.

Il terreno è stato distribuito in vasi di plastica (18 kg di terra asciutta per vaso) e sono stati aggiunti nutrienti (sulla base dei valori riportati da South e Davey, 1983), a eccezione del magnesio, con l'intenzione di fornirne un apporto adeguato.

In metà dei recipienti il contenuto in Mg scambiabile era di circa 15 mg/kg; nei vasi rimanenti è stato aggiunto  $\text{MgSO}_4$  per incrementare il contenuto di Mg scambiabile, portandolo a circa 35 mg/kg.

Quattro applicazioni mensili di  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , a un tasso equivalente a 170 kg N/ettaro/anno, sono state effettuate durante la stagione di crescita, nel tentativo di aumentare la richiesta di Mg da parte delle piante e rafforzare, così, una possibile risposta dovuta alla deficienza di Mg.

A metà aprile del 1987, nei vasi sono state trapiantate plantule di simile altezza e diametro di *Pinus taeda* L. (una plantula per vaso).

I vasi sono stati posti casualmente in 36 camere (in numero di 36 vasi per camera) aperte in alto ed equipaggiate per l'esposizione a inquinanti gassosi e per l'aggiunta di pioggia. I trattamenti con l'ozono sono incominciati ai primi di maggio applicando concentrazioni pari a quelle subatmosferica (aria filtrata dopo combustione), atmosferica e due volte quella atmosferica. L'ozono era generato da aria atmosferica e inviato, attraverso tubi TeflonR, alla corrente d'aria che entrava nelle camere. L'aria era iniettata con un flusso di circa  $1,7 \text{ m}^3/\text{secondo}$  che forniva quattro ricambi d'aria al minuto. Ulteriori dettagli sul sistema di generazione di ozono sono riportati in McEvers *et al.* (1988). Le camere sono state operative per 24 ore al giorno dal 7 maggio al 19 ottobre 1987. I livelli medi di ozono, per la stagione di crescita 1987, sono stati i seguenti: subatmosferici ( $0,02 \mu\text{L}/\text{L}$ ), atmosferici ( $0,05\text{-}0,04 \mu\text{L}/\text{L}$ ) e due volte quelli atmosferici ( $0,09\text{-}0,07 \mu\text{L}/\text{L}$ ).

Due trattamenti di piogge acide simulate, rispettivamente a pH 3,8 e 5,2, sono stati applicati durante l'esperimento. Tali piogge erano distribuite grazie a un sistema aereo a becco che diffondeva volumi equivalenti a quelli ricorrenti in condizioni atmosferiche (44 cm da maggio a ottobre). Per realizzare il trattamento acido è stata utilizzata una soluzione a composizione ionica standard (Irving, 1985) portata al pH desiderato aggiungendo  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HNO}_3$  in proporzione 70:30.

Alla fine di ottobre, due plantule per camera, nei vasi contenenti terreno trattato a magnesio (144 plantule in totale) sono state scelte casualmente per le misure delle radici. Gli apparati radicali di queste plantule sono stati estratti dal terreno e tre radici laterali di primo ordine, scelte a caso, sono state rimosse. Questi subcampioni radicali sono stati osservati al microscopio per rilevare la presenza di micorrize in ogni radice corta e ognuna di quest'ultime è stata caratterizzata in base alla morfologia superficiale della micorrizza associata.

Per ogni subcampione è stata misurata la lunghezza di ogni radice laterale ed è stato contato il numero di radici corte micorriziche e non-micorriziche. Sono stati anche determinati, per ogni metro di radice laterale, il numero totale di radici corte, il numero di radici corte micorriziche e la percentuale di infezione micorrizica (per ogni tipo di micorrizza).

È stata determinata la lunghezza delle radici fini e grossolane utilizzando il metodo modificato della linea intersecata (Tennant, 1975) con fotografie delle radici in ogni subcampione. Per le radici laterali di primo e di secondo ordine è stata calcolata la frequenza delle ramificazioni.

Le radici dei subcampioni sono state poi seccate in stufa e separate in componenti radicali fini (diametro  $< 1 \text{ mm}$ ) e grossolani (diametro  $> 0 = 1 \text{ mm}$ ) per la determinazione della biomassa; successivamente sono state unite agli apparati radicali laterali rimanenti di ogni plantula (da cui erano stati estratti i subcampioni). Infine è stata determinata la biomassa radicale laterale e utilizzata per stimare la lunghezza totale radicale, il numero di radici corte e il numero totale di radici corte micorriziche (per ogni tipo di micorrizza).

*Discussione.* Da questo esperimento è emerso che la biomassa radicale, la lunghezza delle radici e la loro frequenza di ramificazione, dopo una stagione di crescita, non

erano influenzate sensibilmente dall'ozono, dall'acidità delle precipitazioni simulate e dai trattamenti del terreno con magnesio.

Le plantule esposte a precipitazione con elevato pH mostravano una maggior biomassa e lunghezza radicale grossolana quando sottoposte a livelli atmosferici di ozono, rispetto alle plantule cresciute in condizioni di ozono subatmosferico o con concentrazione doppia di quella atmosferica. Nessuna spiegazione apparente permette di interpretare questo *trend*; tuttavia, le variazioni, probabilmente, erano dovute alle differenti caratteristiche delle plantule piuttosto che alle risposte conseguenti ai trattamenti imposti. La mancanza, in generale, di una risposta radicale ai trattamenti effettuati concorda con un precedente studio (Adams *et al.*, 1988) e suggerisce che il controllo genetico della crescita radicale, a questo stadio di sviluppo delle plantule, è più importante rispetto al trattamento imposto nell'esperimento. Effetti dei trattamenti sulla crescita radicale possono essere scoperti in anni successivi, dopo che le plantule sono state esposte a stress ambientali continuativi e le radici sono in grado di esplorare completamente il volume di terreno disponibile.

I dati rilevati indicano che, dopo una stagione di crescita, le simbiosi micorriziche si rivelano più sensibili, rispetto alla crescita delle plantule, alle precipitazioni acide e alle condizioni di magnesio del terreno e che rapporti micorrizici alterati possono attualmente ricorrere nelle foreste danneggiate, nonostante la crescita dei vegetali non sia stata influenzata.

Il significato delle modificazioni micorriziche non è chiaro, ma i cambiamenti possono essere visti come sintomi di stress che potrebbero avere altre conseguenze se lo stress continuasse.

Kreutzer *et al.* (1989) hanno realizzato un esperimento in campo, effettuando irrigazioni acide in una foresta matura a peccio, *Picea abies* (L.) Karst, al fine di testare l'ipotesi che le deposizioni acide causassero danni forestali attraverso la perdita di nutrienti e la tossicità dell'alluminio nel suolo. La ricerca implicava analisi degli effetti dei trattamenti sulla chimica del suolo, sulla microbiologia del suolo e sulla vegetazione erbacea, nonché sulla crescita e sulla salute degli alberi e sullo sviluppo delle radici fini e delle micorrize. Relativamente a quest'ultimo aspetto, hanno osservato leggeri disturbi sulle radici fini degli alberi con incremento della massa necrotica e diminuzione del numero di punte radicali micorriziche e non micorriziche. Gli Autori conclusero che il tempo utilizzato per l'esperimento era ancora troppo breve per avere risultati definitivi che convalidassero l'ipotesi di partenza, poiché gli ecosistemi forestali reagiscono lentamente a impatti acidi forzati.

Matzner e Murach (1995) effettuando una revisione dei recenti sviluppi relativi alla deposizione acida di inquinanti atmosferici in Germania, hanno analizzato le recenti scoperte sui cambiamenti della chimica del suolo nelle foreste acide indotti dall'inquinamento atmosferico (con particolare riferimento all'alluminio, ai solfati, al calcio e all'azoto depositato) e hanno indagato sullo stato delle conoscenze relative agli effetti dei suddetti cambiamenti del suolo sugli alberi, con particolare attenzione riguardo alla crescita radicale e alla captazione di acqua. In base alle analisi di cui sopra, gli Autori ipotizzano che, in futuro, l'acidificazione del suolo e l'aumentata disponibilità di azoto ridurranno la biomassa radicale fine degli alberi e determineranno uno spostamento della zona radicale verso gli strati edafici superiori. L'aumentata crescita epigea, osservata in molte aree dell'Europa, dovrebbe determinare un ulteriore de-

cremento del rapporto radice/fusto. Questo sviluppo, alla fine, causerà un aumento della sensibilità degli alberi nei confronti del disseccamento e rappresenterà un fattore destabilizzante. Questa catena di eventi proposta potrebbe sovrapporsi ad altri effetti provocati dall'inquinamento atmosferico sugli ecosistemi forestali, quali effetti diretti dei gas sulle foglie, squilibri nutrizionali e interazioni con parassiti.

### 3.3.1.5 Altre applicazioni

In questo paragrafo si riporta un'esperienza realizzata in Italia in cui La Marca *et al.* (1995) hanno valutato i primi risultati relativi al recupero con impianti arborei di una discarica RSU localizzata a Cavenago di Brianza (MI), analizzando lo sviluppo degli apparati radicali di piante appartenenti a tre specie arboree (*Acer pseudoplatanus*, *Fraxinus excelsior* e *Fraxinus ornus*) messe a dimora sulla discarica e su un'area contigua utilizzata come testimone.

Sono stati esaminati tre individui per specie in ogni area. Sono state prelevate piante con età diverse e il più possibile corrispondente nelle due aree. Nella fase di ricerca si è fondamentalmente seguita la metodologia utilizzata proprio nello studio del recupero delle discariche da Gilman *et al.* (1981):

- studio della profondità delle radici, mantenendo le stesse classi di profondità utilizzate dai suddetti Autori (intervalli di 8 e 7 cm fino a un massimo di 53 cm);
- studio della loro direzione verticale, basato sulle % di lunghezza delle radici che vanno verso l'alto, verso il basso e parallele;
- studio della dispersione orizzontale, introducendo un indice sintetico di dispersione, ottenuto dal rapporto tra la lunghezza totale dell'apparato radicale e la lunghezza delle radici comprese in tre classi (le classi sono state definite da due cerchi del diametro, rispettivamente, di 40 e 80 cm: la prima classe occupa il cerchio interno, la seconda classe la restante parte del cerchio più grande e la terza è esterna a quest'ultimo); è stato, quindi, calcolato un indice di dispersione per ogni classe.

Per questa indagine non sono state considerate radici di diametro inferiori a 2 mm dal punto in cui si dipartivano e non è stata mai considerata la misura del fittone.

Dai dati ottenuti con lo studio sugli apparati radicali si è visto che le radici delle piante in discarica, nonostante presentino un'età media superiore rispetto ai soggetti dell'area di controllo, si sviluppano molto poco in profondità e parecchio invece in senso orizzontale, costituendo così lunghe radici parallele al suolo. Ci si trova di fronte a radici profonde necrotizzate e a radici che deviano bruscamente dal loro normale andamento verso il basso, per risalire e poi stabilizzarsi a bassa profondità. Con apparati radicali così poco profondi, si ha un fortissimo rischio di crisi idriche e in futuro si avranno grossi problemi di stabilità.

Si diversifica da questa situazione il frassino maggiore (*Fraxinus excelsior*) che, sebbene raggiunga con gli apparati radicali profondità minori rispetto all'area di controllo, riesce a mantenere la sua struttura radicale naturale spingendosi a una profondità non raggiunta da orniello (*Fraxinus ornus*) e acero di monte (*Acer pseudoplatanus*); da questo punto di vista sembrerebbe, quindi, essere la specie più adatta all'ambiente di discarica. Tuttavia, per valutare obiettivamente l'adattabilità del frassino maggiore, bisognerebbe però conoscerne l'indice di mortalità e poterlo poi confrontare con quello dell'orniello e dell'acero montano.

Riccolgandosi a quanto affermato da Gilman *et al.* (1981), la diversa struttura del-



l'apparato ipogeo è fondamentalmente dovuta a un'alta percentuale di anidride carbonica e di metano presente nel suolo, associata a una bassa concentrazione di ossigeno. Le radici tendono quindi a sfuggire dagli strati del terreno ricchi di anidride carbonica e metano e deficitari di ossigeno, per concentrarsi invece nelle zone più superficiali del suolo sicuramente più areate.

Emerge in maniera pressante la necessità di studiare forme di governo e trattamento delle specie arboree presenti, nonché l'introduzione di altre piante allo scopo di proporre soluzioni più rispondenti alle condizioni ambientali della discarica e per raggiungere con maggiore efficacia gli obiettivi che il recupero si propone.

### 3.3.1.6 Considerazioni finali

Questa rassegna su alcune possibilità di impiego degli apparati radicali quali bioindicatori mette in luce come le ricerche in questo settore siano ancora a livello fortemente sperimentale e, spesso, costituiscano episodi isolati e sporadici, essendo necessario acquisire molti più dati e informazioni per arrivare a una standardizzazione delle metodologie e a una loro acquisizione definitiva e diffusa sul territorio nazionale, ma anche oltre confine.

I campi di utilizzo sono molteplici e notevole è la variabilità degli studi collegati allo sfruttamento degli organi radicali quali indicatori di situazioni ambientali critiche; tuttavia, specialmente in Italia, non esiste omogeneità nelle procedure applicative e pertanto è auspicabile uno sforzo a livello degli organi di ricerca per promuovere iniziative finalizzate a migliorare le possibilità di uso di queste porzioni dei vegetali, che possono rivelarsi altamente significative nelle valutazioni di carattere ecologico.

## Bibliografia

- Adams, M. B., Kelly, J. M. e Edwards, N. T.** 1988. *Water, Air and Soil Pollution*, 38, 137.
- Balsberg Pahlsson, A. M.** 1989. Toxicity of Heavy Metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to Vascular Plants. A Literature Review. *Water, Air and Soil Pollution*, 47, 287-319.
- Carlson, C. L., Adriano, D. C., Sajwan, K. S., Abels, S. L., Thoma, D. P. e Driver, J. T.** 1991. Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species. *Water, Air and Soil Pollution*, 59, 231-240. Biogeochemistry Division, Savannah Ecology Laboratory, Drawer E, Aiken, SC 29802, USA.
- Fiskesjö, G.** 1975. *Vatten*, 4 p.304.
- Fiskesjö, G.** 1979. *Hereditas*, 91 p.169.
- Fiskesjö, G.** 1985a. *Hereditas*, 102 p. 99.
- Fiskesjö, G.** 1985b. *Allium Test on River Water* From Braan and Saxan Before and After Closure of a Chemical Factory. *Ambio*, 14, (2), 99-103.
- Gilman, E. F., Leone, I. e Flower, F. B.** 1981. Vertical root distribution of american basswood in sanitary landfill. *Forest Sci.*, 1, 13-18.
- Heinsdorf, D.** 1993. The Role of Nitrogen in Declining Scots Pine Forests (*Pinus sylvestris*) in the Lowland of East Germany. *Water, Air and Soil Pollution*, 69, 21-35.
- Irving, P. M.** 1985. *Environ. and Exp. Bot.*, 25, 327.
- Kreutzer, K., Reiter, H., Schierl, R. e Göttelein, A.** 1989. Effects of Acid Irrigation and Liming in a Norway Spruce Stand [*Picea abies* (L.) Karst.]. *Water, Air and Soil Pollution*, 48, 111-125.
- Kutschera-Mitter, L.** 1984. Untersuchung der Wurzeln und der unterirdischen Teile von

Spross-Systemen. In: **Knapp, R.**, Sampling methods and taxon analysis in vegetation science. Handbook of vegetation science. 4. Dr W. Junk Publishers.

**La Marca, O., Sanesi, G., Selleri, B., Ballardini, P. e Lassini, P.** 1995. Il recupero di una discarica RSU con impianti arborei: primi risultati. *Monti e Boschi*, 2, 12-19.

**McEvers, J. A., Bowers, T. L. e Edwards N. T.** 1988. Air Pollution Effects Field Research Facility: I. Ozone Flow Control and Monitoring System, ORNL/TM-10758. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN.

**Matzner, E. e Murach, D.** 1995. Soil Changes Induced by Air Pollutant Deposition and Their Implication for Forests in Central Europe. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 63-76.

**Mukherjee, A. e Sharma, A.** 1988. Effects of Cadmium and Selenium on Cell Division and Chromosomal Aberrations in *Allium sativum* L. *Water, Air and Soil Pollution*, 37, 433-438.

**Münzenberger, B., Schmincke, B., Strubelt, F. e Hüttl, R. F.** 1995. Reaction of Mycorrhizal and Non-Mycorrhizal Scots Pine Fine Roots along a Deposition Gradient of Air Pollutants in Eastern Germany. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 1191-1196.

**Nyamangombe, L. e Lefèbre, C.** 1986. Différenciation variétale pour la tolérance à l'Aluminium chez des plantules de *Zea mays* L. *Bull. Soc. Roy. Bot. Belg.*, 119, 97-100.

**Pirola, A., Brusoni, M., Caretta, G. e Picco, A. M.** 1996. Ricerca di piante spia che evidenziano

i disturbi legati alla presenza di discariche attraverso modificazioni morfologiche di apparati vegetativi e riproduttivi. In: Progetto di Ricerca FLA: Gestione del territorio e smaltimento di rifiuti tossici e nocivi.

**Power, S. A. e Ashmore, M. R.** 1996. Nutrient Relations and Root Mycorrhizal Status of Healthy and Declining Beech (*Fagus sylvatica* L.) in Southern Britain. *Water, Air and Soil Pollution*, 86, 317-333.

**Simmons, G. L. e Kelly, J. M.** 1989. Influence of O<sub>3</sub>, Rainfall Acidity, and Soil Mg Status on Growth and Ectomycorrhizal Colonization of Loblolly Pine Roots. *Water, Air and Soil Pollution*, 44, 159-171. Tennessee Valley Authority, Cooperative Forest Studies Program, P.O. Box 2008, Bldg. 1506, Oak Ridge. National Laboratory, Oak Ridge, TN 37831-6034, USA.

**South, D. B. e Davey, C. B.** 1983. Circular 265, Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn, AL.

**Tennant, D.** 1975. Modified line intersect method. *J. Ecol.*, 63, 995.

**US Environmental Protection Agency** 1982. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Tests. EG-12, Office of Toxic Substances, Washington, DC.

**Vidakovic, Z. e Pape, D.** 1993. Toxicity of Waste Drilling Fluids in Modified *Allium* Test. *Water, Air and Soil Pollution*, 69, 413-423.

**Wang, W.** 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air and Soil Pollution*, 59, 381-400.

### 3.3.2 Anelli di accrescimento annuale del fusto - Paola Nola

#### Introduzione

La modalità più semplice per descrivere le condizioni di crescita di un albero, in modo retrospettivo, è rappresentata dai suoi incrementi annuali. Infatti, il fusto delle

piante legnose che crescono in climi con stagioni differenziate è caratterizzato dalla presenza di sequenze di anelli più o meno concentrici, ognuno dei quali si è formato nell'ambito di una stagione vegetativa dell'individuo. Le caratteristiche di questi anelli e in particolare le loro ampiezze, rimangono stabili nel tempo dopo che essi sono stati formati e possono quindi servire come espressione di eventi che hanno favorito o meno la crescita nel passato.

Naturalmente molti sono i fenomeni ambientali che possono lasciare traccia negli anelli annuali, non soltanto in riferimento a caratteri quantitativi, come l'ampiezza o la densità del legno, ma anche per quanto riguarda caratteristiche qualitative, quali per esempio la presenza di ferite, di tessuti particolari derivanti dalla formazioni di calli, o la presenza di canali resiniferi traumatici.

Questo fa sì che gli anelli possano essere considerati come dei bioindicatori rispetto a qualsiasi evento capace di lasciare in essi una traccia chiaramente identificabile. Inoltre, poiché ogni anello è attribuibile con estrema precisione all'anno in cui si è formato, ne deriva che anche tutte le informazioni da esso deducibili sono a loro volta databili con la stessa precisione.

Il fatto che le sequenze di anelli annuali possano fornire indicazioni su lunghi periodi di tempo in un'ottica retrospettiva, senza dunque la necessità di una replicazione temporale delle misure effettuate, rappresenta il carattere esclusivo del loro utilizzo come bioindicatori.

L'analisi dettagliata di sequenze di anelli d'accrescimento (o *dendrocronologia*) può allora fornire numerose indicazioni sulla storia passata non soltanto della pianta a cui appartengono, ma anche dell'ambiente in cui essa vive, con particolare riferimento a eventi che hanno provocato stress o danni all'individuo.

Una rassegna dettagliata dei fenomeni che possono influenzare in modo evidente la formazione degli anelli annuali d'accrescimento e nei confronti dei quali questi ultimi possono essere considerati dei buoni indicatori è riportata da Schweingruber (1996). L'autore prende in considerazione in particolare i fattori idrologici, la neve, il vento, il fuoco, i movimenti glaciali, l'attività vulcanica e i movimenti tettonici, i movimenti delle masse rocciose, i danni causati dagli animali, le infezioni dovute a funghi o parassiti quale il vischio, gli effetti derivanti da competizione e cooperazione, il fattore antropico, i fattori climatici, la concentrazione di particolari sostanze chimiche o isotopi che possano essere utilizzati come indicatori ecologici.

In questo contesto ci si limita a prendere in considerazione alcune possibilità di applicazione della dendrocronologia allo studio dell'inquinamento ambientale, dedicando particolare attenzione agli aspetti metodologici. Lo scopo di questa rassegna non è tanto quello di fornire un quadro completo e dettagliato di tutte le metodologie oggi disponibili per lo studio dell'inquinamento tramite l'analisi degli anelli annuali, quanto piuttosto, tramite l'illustrazione di alcuni esempi significativi, di delineare le corrette modalità d'uso degli anelli come bioindicatori in questo ambito, sia al fine di evitare errori interpretativi, sia per massimizzare l'efficacia degli studi intrapresi rispetto agli obiettivi da raggiungere.

*Gli anelli d'accrescimento annuale e la terminologia utilizzata*

L'*anello annuale* può essere definito come uno strato di cellule legnose prodotte durante un periodo vegetativo corrispondente a un anno. In esso si possono distinguere

una zona più interna comprendente *legno iniziale* (primaverile, primaticcio), caratterizzata da elementi di trasporto (fibrotracheidi o vasi) con pareti sottili e ampio lume, seguita esternamente da una zona a *legno tardivo* (estivo), caratterizzata da elementi conduttori a lume ridotto o poco numerosi (Kaennel, Schweingruber 1995). Il passaggio tra il legno tardivo di un anno e quello iniziale dell'anno successivo costituisce il limite tra due anelli adiacenti.

La distinzione tra legno iniziale e legno tardivo non è ugualmente netta nelle diverse specie. Essa risulta di norma evidente nelle conifere, mentre le dicotiledoni arboree vengono usualmente distinte in specie con legno a *porosità anulare*, in cui le due zone sono chiaramente separate, e specie a *porosità diffusa*, in cui le caratteristiche del legno internamente all'anello sono più omogenee. Ne deriva che anche il riconoscimento dei singoli anelli presenta diversi gradi di difficoltà a seconda del differenziamento all'interno dell'anello di zone con caratteristiche diverse.

Se si osserva un tronco in sezione trasversale, frequentemente è possibile distinguere due zone legnose con caratteristiche differenti, denominate rispettivamente *alburno* e *durame*. L'*alburno*, che occupa la zona più esterna del tronco, generalmente di colore chiaro, contiene cellule parenchimatiche vive, aventi la funzione di accumulo di sostanze di riserva. Quando l'*alburno* esaurisce le sue funzioni fisiologiche si trasforma in *durame*, che risulta perciò disposto nella zona più interna. Il *durame* è caratterizzato dall'assenza di cellule parenchimatiche vive e presenta in genere un colore più scuro, conferitogli dalla presenza di tossine e metaboliti secondari che vengono qui immagazzinati e conferiscono al legno una maggiore resistenza al decadimento (Kaennel e Schweingruber, 1995). Mentre gli anelli annuali appartenenti all'*alburno* non presentano, in condizioni normali, alcuna variazione rispetto a quando sono stati formati, gli anelli che costituiscono il *durame* subiscono delle trasformazioni dovute all'impregnazione con sostanze particolari che possono alterarne le caratteristiche chimiche.

Di norma l'analisi degli anelli annuali nell'ambito degli studi di carattere ecologico e ambientale (*dendroecologia*) viene effettuata su campioni provenienti da alberi viventi. Tramite un'apposita trivella (la *trivella di Pressler*) è possibile prelevare, in direzione perpendicolare al tronco, dei sottili cilindri di legno (o *carote*), che adeguatamente trattati, mostrano il susseguirsi degli anelli annuali dalla corteccia verso il midollo.

Sebbene diversi e numerosi siano i parametri che possono essere misurati all'interno di un anello annuale, di norma quest'ultimo è più frequentemente caratterizzato in modo quantitativo dalle sue dimensioni e in particolare dall'*ampiezza*. A questo parametro possono essere talvolta associate altre misure, quali per esempio le ampiezze parziali di legno iniziale e legno tardivo, la dimensione media del lume degli elementi conduttori, la densità del legno (sia totale che riferita alle diverse parti costituenti l'anello), la concentrazione di certi elementi chimici.

Qualunque sia la quantità misurata, essa viene comunque riferita a ogni anello e l'anello a sua volta viene attribuito all'anno solare in cui si è formato. Da una successione di anelli si ottengono così sequenze di coppie di valori (da un lato l'anno e dall'altro la misura quantitativa del parametro scelto) che costituiscono le cosiddette *serie cronologiche* o *cronologie*.

Di norma, negli studi dendroecologici viene campionato un certo numero di piante

per ogni stazione oggetto di indagine e per ogni pianta vengono prelevate più carote. L'analisi dendrocronologica si basa allora sulla costruzione di *cronologie elementari* (costruite a partire dai dati relativi alle singole carote), *cronologie individuali* (ottenute come media delle cronologie elementari relative alla stessa pianta) e *cronologie stazionali*, (date dalla media delle cronologie individuali relative alle piante della stessa stazione). Nel caso in cui il sito studiato sia caratterizzato da più specie ugualmente adatte all'indagine, per ciascuna di esse vengono elaborate separatamente delle cronologie stazionali, che possono allora essere indicate come *cronologie specifiche*.

Il numero di carote prelevate per ciascuna pianta e il numero di piante campionate per ciascuna specie in ogni stazione possono variare a seconda del tipo di studio, tenendo conto del fatto che da un'adeguata replicazione dei dati dipende fortemente l'attendibilità dei risultati ottenuti. In generale uno studio dendroecologico dovrebbe basarsi su un minimo di 10 piante per specie e 2 carote per pianta.

*Principali approcci allo studio dell'inquinamento tramite metodi dendrocronologici*

L'analisi dendrocronologica può contribuire in diversi modi allo studio dell'inquinamento ambientale. Tale disciplina ha trovato applicazioni tanto numerose e diversificate in questo ambito che risulta difficile farne una rassegna completa e individuare dei protocolli standard di analisi. Innes (1989) suddivide i principali approcci allo studio dell'inquinamento tramite metodi dendrocronologici in diverse categorie. Tra queste verranno qui presi in considerazione i seguenti approcci:

- a) approccio tradizionale;
- b) approccio dendroclimatico;
- c) approccio dendrochimico.

#### a) L'approccio tradizionale

Il metodo è di semplice applicazione e non richiede procedure di elaborazione dei dati di tipo particolare. Esso si basa sul presupposto che le differenze rilevate nel confronto tra due cronologie, l'una relativa a una stazione prossima alla sorgente inquinante, l'altra relativa a una stazione esente da inquinamento, siano imputabili al diverso carico di sostanze inquinanti caratterizzante i due siti considerati. In realtà vi sono numerosissimi fattori intrinseci alle stazioni stesse che possono essere responsabili di tali differenze, a partire dalle caratteristiche chimiche del suolo fino ad arrivare a un diverso grado di competizione interspecifica o intraspecifica. Se da un lato è possibile evitare gli effetti derivanti da alcuni di questi fattori, dall'altro è necessario tener conto del fatto che un'interazione complessa tra l'inquinamento e i fattori ambientali può rendere comunque difficile l'interpretazione dei risultati ottenuti.

Nonostante queste problematiche, l'approccio può essere utilizzato con successo nello studio di casi con inquinamento fortemente localizzato. È comunque indispensabile che le aree confrontate presentino una netta differenza riguardo alla loro esposizione alla sorgente inquinante, ma siano assolutamente simili per quanto riguarda ecologia, clima, densità e storia dei popolamenti che in esse si sviluppano.

Questo tipo di approccio può essere modificato confrontando cronologie derivate da alberi che crescono nella stessa zona, alcuni con, altri senza sintomi visibili di deperimento.

Becker e Levy (1989) in uno studio sul deperimento delle abetine dei Vosgi relativo a 200 aree di saggio, conducono un'analisi particolareggiata su 8 coppie di aree di saggio, mettendo a confronto siti caratterizzati da evidente deperimento e siti con piante apparentemente sane. I risultati ottenuti mettono in evidenza che nelle aree di saggio deperienti, il fenomeno si accompagna a una sensibile riduzione dell'accrescimento annuale, che inizia a differenziarsi dall'accrescimento caratteristico della corrispondente area sana a partire dagli anni 1960-65 e dunque molto prima che comparissero sintomi visibili di deperimento.

Il limite principale di questa applicazione consiste nel fatto che il metodo presuppone che gli alberi senza sintomi visibili siano meno danneggiati di quelli che mostrano deperimento evidente. Ciò resta comunque discutibile, dato che spesso risulta che la riduzione degli incrementi annuali si è verificata prima che i segni di deperimento diventassero visibili. Inoltre gli alberi messi a confronto sono frequentemente soggetti allo stesso livello di stress da inquinamento e qualunque differenza di accrescimento riscontrata può essere piuttosto il riflesso di differenze nella risposta dei singoli alberi dovuta a variazioni genotipiche.

La metodologia può comunque essere utilmente impiegata quando non sono disponibili molte informazioni sul grado reale di inquinamento, ma si osservano fenomeni di deperimento, la cui causa non è chiaramente identificabile. Essa può allora contribuire allo studio delle relazioni tra il deperimento evidente e l'andamento degli accrescimenti annuali.

L'approccio classico, basato sul confronto tra cronologie relative a diversi siti, è stato applicato anche a studi di inquinamento a livello regionale, prendendo in considerazione un elevato numero di cronologie provenienti da una vasta area. Comunque la trasposizione della tecnica da situazioni di inquinamento localizzato allo studio degli effetti dell'inquinamento a lunga distanza, può presentare diversi problemi e richiedere particolari modifiche.

L'approccio è stato schematizzato da Strand (1980a, 1980b), che ha analizzato 6150 cronologie di abete rosso (*Picea excelsa*) e pino silvestre (*Pinus sylvestris*) relative a otto aree differenti in Norvegia. Le serie originali sono state mediate secondo una griglia di 1 km x 1 km, riducendosi così a 2914. Tramite una regressione lineare, l'autore ha calcolato un coefficiente di reazione per ogni sito. Dato che tali coefficienti presentavano una grande variabilità da sito a sito, essi sono stati mediati secondo quadrati di 30 x 30 km e i risultati ottenuti sono stati utilizzati per la costruzione di mappe che rappresentano la variabilità della reazione delle due specie nell'intera regione analizzata. Queste mappe sono state confrontate con la distribuzione nota delle deposizioni di solfati e delle piogge acide. Tuttavia l'autore conclude che non c'è una chiara relazione tra la variabilità dei coefficienti calcolati e i dati relativi all'inquinamento.

Uno dei principali limiti della tecnica di Strand consiste nella sua incapacità di prendere in considerazione le differenze ecologiche esistenti tra i diversi siti e che possono giocare un ruolo importante.

Applicato ad aree di grandi dimensioni infatti l'approccio basato sul confronto tra serie cronologiche inevitabilmente prende in considerazione siti ecologicamente differenti e diventa pertanto difficile attribuire le differenze riscontrate a precisi fattori, quali quelli relativi all'inquinamento.

In questo tipo di applicazione l'approccio può essere utilmente modificato prenden-

do in considerazione, non tanto le differenze tra le cronologie che rappresentano i valori assoluti dell'accrescimento, quanto piuttosto la frequenza di variazioni d'accrescimento particolarmente caratteristiche, come evidenziato da Schweingruber (1989).

Il metodo proposto da questo autore si basa sull'analisi dettagliata degli anelli annuali di accrescimento e sull'identificazione di anelli con caratteristiche peculiari, più che sulla misura delle loro ampiezze. Di particolare interesse in questo contesto sono le brusche variazioni di accrescimento, costituite da sequenze di almeno 4 anelli, che siano chiaramente più stretti (brusca riduzione) o più larghi (brusca ripresa) rispetto a un ugual numero di anelli precedenti. Il rapporto tra le dimensioni degli anelli relativi alle sequenze messe a confronto permette di stabilire l'intensità del fenomeno di variazione, portando a distinguere variazioni deboli, medie e forti. L'analisi comporta l'annotazione della data di inizio, della durata e dell'intensità dei fenomeni osservati in ciascun individuo. Essa viene di norma realizzata direttamente sulle carote, tramite valutazione a occhio, ma il metodo può essere utilmente applicato anche alle serie rappresentanti le misure delle ampiezze degli anelli (qualora le carote debbano comunque essere misurate). In questo caso può essere allora utilizzato un adeguato software (che permette l'elaborazione semiautomatica dei dati) applicato alle cronologie individuali, in modo da prendere in considerazione solo le variazioni relative all'individuo nel suo complesso (Bracco e Nola, 1990).

La sintesi dei risultati ottenuti in ogni stazione indagata può fornire numerose informazioni sulla storia passata del popolamento e in particolare la frequenza delle brusche riduzioni può risultare utile nello studio dell'inquinamento a livello regionale.

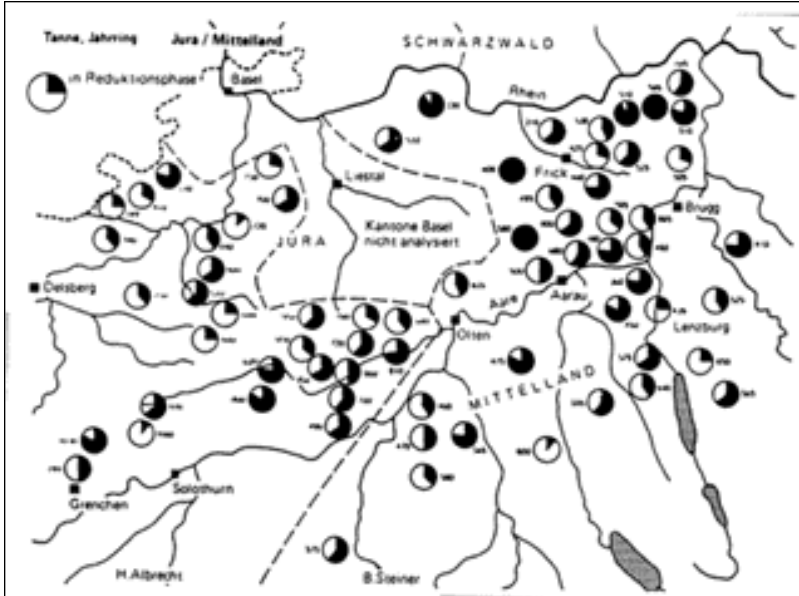
Un esempio di applicazione del metodo e del tipo di risultati ottenuti è riportato da Schweingruber (Schweingruber *et al.*, 1986; Schweingruber 1989) in relazione a uno studio realizzato nello Jura Svizzero e basato sull'analisi di 480 campioni di abete rosso e 464 campioni di abete bianco (figura 3.5). Quest'ultimo presenta riduzioni d'accrescimento nel passato molto più numerose rispetto all'abete rosso, ma nell'ambito delle 27 stazioni di abete bianco analizzate non è possibile riconoscere alcuna regolarità nella distribuzione geografica dei fenomeni di brusca riduzione osservati. Al contrario l'abete rosso presenta una forte concentrazione delle riduzioni nella zona circostante Basilea, una concentrazione inferiore nell'area densamente popolata della parte meridionale dello Jura e infine una scarsa concentrazione nell'area centrale dello Jura.

Naturalmente anche questa metodologia presenta delle limitazioni di cui è necessario tener conto nell'interpretazione dei risultati. Schweingruber sottolinea per esempio il fatto che la distribuzione geografica e temporale dei cambiamenti d'accrescimento, soprattutto delle riduzioni, è influenzata sia dalle caratteristiche della specie e dell'individuo, sia da fattori locali e regionali di origine naturale o antropica. Per questo motivo, affinché i risultati ottenuti possano essere considerati significativi, è necessario basare lo studio su un elevato numero di alberi, ma la tecnica è relativamente semplice e di rapida applicazione, pertanto il fatto di dover utilizzare un campione di grandi dimensioni non rappresenta un grosso problema.

#### **b) L'approccio dendroclimatico**

L'approccio dendroclimatico si basa su una complessa elaborazione statistica delle serie dendrocronologiche, finalizzata all'eliminazione delle variazioni d'accrescimento

A) Abete bianco



B) Abete rosso

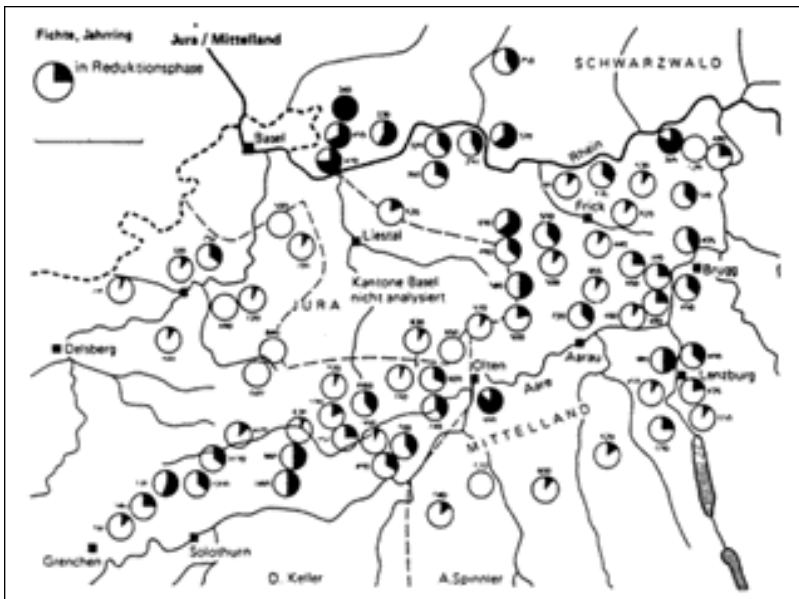


Figura 3.5 - Distribuzione geografica delle riduzioni d'accrescimento di abete bianco (A) e abete rosso (B) nello Jura svizzero (da Schweingruber et al. 1986, modificato).



attribuibili all'età delle piante, al clima o ad altre cause in modo tale che le variazioni rimanenti possano essere attribuite a fenomeni di inquinamento.

Questo tipo di approccio comporta solitamente anche un'analisi di tipo temporale, poiché si basa sul confronto tra un periodo recente caratterizzato da evidente inquinamento e un periodo precedente di riferimento in cui l'inquinamento era assente o di minore intensità.

L'analisi non comporta l'impiego di metodologie statistiche sviluppate *ad hoc*, quanto piuttosto una particolare procedura di applicazione di tecniche ormai considerate classiche nell'ambito degli studi dendroclimatici.

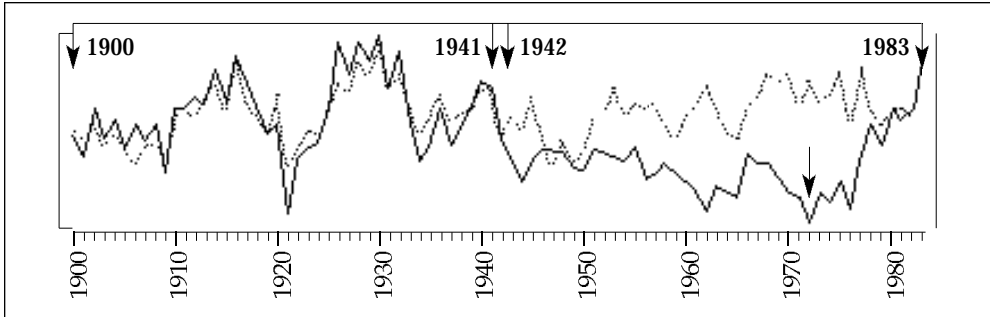
Un buon esempio di descrizione della procedura di elaborazione dei dati e di discussione dei risultati ottenuti è rappresentato dal lavoro di Tessier *et al.* (1990) relativo allo studio degli effetti dell'inquinamento da fluoro sull'accrescimento radiale di alcune popolazioni di conifere in Maurienne (Savoia, Francia).

Lo studio prende in considerazione 27 siti relativi a 4 specie: abete rosso (*Picea excelsa* (Lam.) Link), pino silvestre (*Pinus sylvestris* L.), abete bianco (*Abies alba* Mill.) e larice (*Larix decidua* Mill.). Le stazioni sono scelte in funzione della distanza dalla sorgente di inquinamento, dell'esposizione e dell'altitudine. Le cronologie rappresentanti l'ampiezza degli anelli annuali relativi a ciascuna specie e a ogni popolazione vengono analizzate nel periodo 1900-1983, suddiviso in due sequenze (1900-1941 e 1942-1983), di cui la prima è considerata come il periodo di minore inquinamento e viene perciò presa come punto di riferimento.

Le cronologie ottenute per ciascun sito vengono poi elaborate in tappe successive secondo lo schema di seguito sintetizzato.

Le cronologie vengono inizialmente trasformate tramite la *modellizzazione ARMA*. La metodologia è spiegata nel dettaglio da Box e Jenkins (1970) e la sua applicazione in campo dendrocronologico è descritta da Guiot (1986). Tale trasformazione porta a esprimere l'anello dell'anno  $t$  in funzione di un certo numero di anelli precedenti ( $t-1$ ;  $t-2$  ecc.) e di un fattore casuale legato all'anno  $t$ . I termini relativi agli anni precedenti esprimono l'inerzia della pianta nel rispondere all'ambiente esterno, prendendo in considerazione anche le variazioni dell'accrescimento imputabili all'età. Il termine casuale esprime invece la risposta immediata dell'albero ai fattori esterni e in particolare al clima. In presenza di inquinamento, si può supporre che tanto l'inerzia della pianta nei confronti dei fattori esterni, quanto la sua reazione immediata ai fattori climatici dell'anno in corso vengano modificati da fenomeni derivanti dall'inquinamento stesso. Da questa osservazione deriva la necessità di elaborare separatamente i due periodi individuati l'uno come periodo di riferimento, l'altro come periodo di maggiore inquinamento. Per tale ragione la modellizzazione ARMA viene calcolata mantenendo i due periodi separati e scegliendo per ciascuno di essi il modello che meglio interpreta l'inerzia della pianta.

Successivamente, le serie ottenute dalla modellizzazione ARMA vengono confrontate con i dati climatici per individuare le relazioni clima/accrescimento. Anche queste ultime vengono calcolate separatamente nei due diversi periodi, in modo da tener conto di eventuali variazioni nella risposta della pianta al clima, imputabili alla presenza dell'inquinamento. Il calcolo viene fatto utilizzando il metodo delle *funzioni di risposta* e 24 parametri climatici: 12 totali mensili delle precipitazioni e 12 medie mensili per le temperature, per il periodo compreso tra ottobre dell'anno precedente la formazione dell'anello e settembre dell'anno contemporaneo.



**Figura 3.6** - Curva delle ampiezze degli anelli annuali di una popolazione di pino silvestre. La linea continua rappresenta i valori reali, mentre quella punteggiata rappresenta i valori stimati. Nel periodo 1942-1983 la parte compresa tra le due curve corrisponde al deficit di accrescimento annuale attribuibile all'inquinamento.

La metodologia è descritta dettagliatamente da Serre-Bachet e Tessier (1989) e porta al calcolo di 24 coefficienti rappresentanti la relazione esistente tra l'accrescimento annuale e i 24 parametri climatici considerati. L'analisi separata dei due periodi comporta che in ciascuno di essi la relazione clima/accrescimento sia espressa da serie di coefficienti differenti.

Infine, la procedura comporta il *calcolo dell'accrescimento teorico*. A partire dalle relazioni clima/accrescimento individuate per il periodo di riferimento, i 24 coefficienti ottenuti vengono utilizzati per ricostruire una serie teorica relativa all'intero periodo d'analisi. Questa cronologia viene poi trasformata in una serie di accrescimento teorico, applicando a essa il processo inverso relativo alla modellizzazione ARMA, tenendo sempre come riferimento i coefficienti relativi al periodo con minore inquinamento. La serie d'accrescimento teorico ottenuta in questo modo viene confrontata con quella reale al fine di mettere in evidenza eventuali differenze. Nel caso in cui il confronto tra accrescimento teorico e reale metta in evidenza un deficit, quest'ultimo viene imputato all'inquinamento (figura 3.6).

I risultati ottenuti nello studio sopra citato mettono in evidenza che nel periodo di riferimento le due curve, teorica e reale, sono praticamente sovrapposte, mentre nel periodo recente, di maggiore inquinamento, frequentemente i valori stimati sono nettamente superiori a quelli osservati. Il metodo risulta dunque efficace nell'evidenziare una riduzione dell'accrescimento che potrebbe essere dovuta all'aumento dell'inquinamento. Fanno eccezione a questa regola i popolamenti di larice, la cui indifferenza potrebbe essere attribuita al fatto che la specie è caducifolia e che quindi non presenta accumulo di inquinanti negli aghi.

Comunque l'entità del deficit d'accrescimento osservato nelle diverse popolazioni non può essere interpretato sulla base della distanza dalla sorgente inquinante, né presenta una distribuzione spaziale facilmente interpretabile, poiché in alcuni casi le popolazioni teoricamente più soggette a inquinamento presentano un deficit inferiore rispetto ad altre a priori meno soggette.

Nell'esempio qui riportato gli Autori concludono sottolineando l'elevata diffi-

coltà incontrata nell'isolare il fattore inquinamento dagli altri fattori capaci di intervenire sulla crescita radiale degli alberi. Il problema fondamentale è dovuto a una complessa interazione tra tutti i fattori in gioco. Infatti tramite processi di accumulo gli elementi inquinanti possono modificare sensibilmente i fattori interni relativi ai processi biologici di accrescimento di ciascun individuo. Tramite l'eliminazione di certi alberi, maggiormente sensibili, si può poi avere una modifica degli equilibri legati alla competizione, modifica che a sua volta può essere amplificata dall'azione dell'uomo tramite interventi selvicolturali. Infine, l'inquinamento può modificare la sensibilità ad altri fattori ambientali, quali per esempio i fattori climatici. Di tutte queste interazioni è ovviamente necessario tener conto nella fase di interpretazione dei risultati.

### c) L'approccio dendrochimico

La dendrochimica, cioè l'analisi del contenuto di elementi chimici negli anelli d'accrescimento annuale datati, viene utilizzata per ricostruire i cambiamenti avvenuti dal punto di vista chimico nell'ambiente circostante l'albero. Questo tipo di approccio, spesso finalizzato alla scoperta di marcatori temporali di particolari cambiamenti ambientali, risulta estremamente utile nell'evidenziare effetti diretti di fitotossicità (Smith e Shortle, 1996) e proprio questa sua capacità di analisi diretta della composizione degli anelli legnosi ne costituisce il principale vantaggio rispetto ai metodi considerati in precedenza.

L'analisi viene svolta su carote incrementali che permettono un campionamento non distruttivo, se adeguatamente conservate mantengono inalterate le proprie caratteristiche nel tempo e mostrano stretti legami con l'ambiente chimico esterno (Smith e Shortle, 1996).

In base a quanto riportato da Kairiukstis e Kocharov (1989) attualmente possono essere estratti dal legno più di 70 elementi e sono disponibili numerosi metodi per la misura di abbondanza di vari elementi o isotopi all'interno degli anelli annuali, tra cui attivazione neutronica, analisi dell'emissione spettrale, fluorescenza a raggi X, ionizzazione e scintillazione, beta-spettrometro, spettrometria di massa tradizionale e spettrometria di massa con acceleratore.

Sebbene la metodologia non sia comunemente diffusa in tutti i laboratori che si occupano di dendrocronologia, proprio perché utilizza tecniche e apparecchiature sofisticate e più tipiche dell'ambiente chimico, piuttosto che di quello biologico, essa è già stata ampiamente utilizzata con successo in numerosi studi relativi agli effetti dell'inquinamento sull'accrescimento radiale delle piante legnose e sulla possibilità di utilizzare queste ultime come indicatori ambientali.

Nell'ambito di questo tipo di approccio è particolarmente importante evitare studi basati su un singolo albero, o addirittura su una singola carota, poiché gli effetti dei fattori microstazionali esterni o delle condizioni interne dell'albero su una singola serie di osservazioni di anelli annuali sono tali da impedire di ottenere qualsiasi tipo di informazione.

È inoltre necessario tener conto del fatto che gli alberi non sono registratori passivi dell'ambiente circostante e che i processi biologici fungono da mediatori nella registrazione dell'informazione chimica. È dunque evidente che nell'approccio dendrochimico è indispensabile un'approfondita conoscenza della biologia dell'albero. A questo proposito vengono di seguito prese in considerazione alcune problematiche di

cui è necessario tener conto nell'ambito di un'analisi dendrochimica, a partire dalle modalità di raccolta del materiale da analizzare fino all'interpretazione dei risultati ottenuti, facendo riferimento a quanto riportato da Smith e Shortle (1996).

Innanzitutto, fondamentale importanza presentano le *modalità di assunzione* da parte della pianta dell'elemento preso in considerazione, il cui ingresso può avvenire semplicemente seguendo il flusso idraulico oppure in seguito ad assorbimento attivo contro gradiente o in modo preferenziale rispetto ad altri elementi. Ciò significa che non si può considerare la composizione chimica del legno come un semplice riflesso delle caratteristiche chimiche del suolo e delle soluzioni in esso presenti. Anche in situazioni con elevate concentrazioni nel suolo di metalli quali il Pb, la presenza di quest'ultimo può non essere facilmente individuabile in alberi poco sensibili a crescita rapida. Il faggio (*Fagus sylvatica* L.) per esempio compie un assorbimento e una traslocazione selettiva a danno di Al e Na, mentre Mn, Ca, K e P vengono selezionati per un assorbimento preferenziale. Ne deriva che non è sempre possibile rilevare differenze nella concentrazione di metalli all'interno degli anelli annuali anche quando vi siano differenze sensibili nell'intensità di inquinamento da metalli a cui sono sottoposte le popolazioni analizzate.

In questo contesto risulta dunque indispensabile la scelta di specie sensibili all'accumulo di sostanze legate ai fenomeni di inquinamento analizzati e una buona conoscenza delle modalità di assunzione e trasporto di tali sostanze. In molti casi può essere utile, piuttosto che paragonare le concentrazioni assolute di certe sostanze, un confronto tra le tendenze di variazione che queste sostanze presentano in periodi successivi. Il calcolo delle frequenze di cambiamento netto è un modo per combinare le osservazioni relative a un certo numero di alberi diversi, senza peraltro diluire le variazioni osservate tramite operazioni di media.

Il fatto che attualmente siano disponibili tecniche analitiche particolarmente sofisticate, che permettono di stimare la concentrazione dei metalli nelle pareti di singole cellule o di piccoli gruppi di cellule, ha conferito all'analisi dendrochimica un elevato potere analitico anche rispetto alla dimensione temporale. Il metodo è stato pertanto spesso utilizzato al fine di stabilire con precisione l'anno a partire dal quale si può osservare una modifica nella composizione chimica del legno che indichi un cambiamento nell'ambiente circostante.

A questo proposito è però necessario tener presente che in alcuni casi vi può anche essere migrazione di elementi da un anello all'altro, attraverso un trasporto radiale; questo fa sì che una sostanza possa essere reperita anche negli anelli degli anni precedenti la sua reale comparsa nell'ambiente. Inoltre il trasporto della linfa grezza non è forzatamente limitato all'interno di un solo anello, ma può dipendere da un numero variabile di anelli fino a coinvolgere l'intero alburno. Infine il numero di anelli di cui è composto l'alburno può variare non solo da specie a specie, ma anche tra individui della stessa specie. Ne deriva che la presenza di un elemento all'interno di un anello corrispondente a un preciso anno non significa necessariamente che l'elemento sia comparso nell'ambiente circostante l'albero esattamente in quell'anno.

D'altra parte le tecniche che permettono un'analisi estremamente raffinata del legno sulla base di campioni molto piccoli hanno costi tanto elevati da scoraggiarne la ripetizione su un numero di campioni sufficientemente ampio da poter convalidare con buona affidabilità i risultati ottenuti. Può allora essere più vantaggioso utilizzare tecniche meno sofisticate, applicate su porzioni di legno più grandi, che comprendano

per esempio gli anelli relativi a una o due decadi. I risultati ottenuti in questo modo risultano più realistici, tenendo conto del fatto che certi elementi possono essere trasportati anche nel legno formatosi in precedenza.

Un altro elemento fondamentale di cui tener conto è che le caratteristiche chimiche del legno possono presentare notevoli fluttuazioni di tipo intrinseco. Si possono infatti osservare sensibili variazioni anche all'interno di uno stesso anello, passando da legno iniziale a legno tardivo, o all'interno di uno stesso individuo, passando da alborno a durame laddove queste due parti risultano distinte, o ancora in presenza di ferite, in corrispondenza della formazione di un callo, nelle zone affette da attacchi fungini o nel legno in via di decadimento.

L'utilizzo di campioni di legno che comprendono sequenze di più anelli completi permette di eliminare le variazioni dovute alle differenze anatomiche all'interno di uno stesso anello, ma non risolve il problema legato alle altre possibili fluttuazioni della composizione chimica del legno. A questo proposito è innanzitutto indispensabile mantenere separati i dati relativi ad alborno e durame. Allo stesso modo è necessario confrontare soltanto i dati relativi a campioni prelevati alla stessa altezza dell'albero, poiché soprattutto per le sostanze accumulate contro gradiente, si possono avere differenze di concentrazione nel legno legate più all'altezza del prelievo che a differenze di concentrazione della linfa.

Inoltre è necessario che i campioni utilizzati per l'analisi dendrochimica siano esenti da alterazioni del legno dovute a infezioni, ferite, formazioni di calli o decadimento, che talvolta sono difficili da riconoscere dalle alterazioni naturali che si producono nella trasformazione dell'alborno in durame. Infine è necessario conservare adeguatamente le carote dopo il loro prelevamento, poiché il legno può essere facilmente e rapidamente attaccato da funghi che possono comportare un movimento degli elementi presenti, soprattutto i metalli, da un anello all'altro. Quest'ultimo inconveniente può essere evitato conservando le carote in frigorifero lo stesso giorno del loro prelievo e sottoponendole successivamente a un disseccamento ad aria.

#### *Considerazioni conclusive*

Si è visto che l'utilizzo degli anelli annuali di accrescimento come bioindicatori offre la possibilità di ottenere preziose informazioni nello studio dell'inquinamento ambientale, permettendo di analizzare la variabilità degli effetti dell'inquinamento sia dal punto di vista spaziale che da quello temporale.

Al di là delle potenzialità e delle limitazioni evidenziate in ciascuno degli approcci precedentemente illustrati, è necessario sottolineare un carattere implicito a qualunque tipo di studio dendrocronologico che si basi sull'analisi degli anelli annuali d'accrescimento. Questi ultimi infatti integrano, tramite le loro caratteristiche dimensionali e qualitative, tutti gli effetti positivi e negativi prevalenti durante il periodo fotosintetico. Essi pertanto non rappresentano una misura specifica nei confronti del fenomeno che permettono di studiare e non possono perciò essere utilizzati per dimostrare in modo diretto dei rapporti di causa-effetto. Il loro impiego permette per lo più di ottenere informazioni di tipo indiretto, che devono essere interpretate, possibilmente alla luce di altri dati disponibili in relazione al fenomeno analizzato e tenendo conto delle eventuali interazioni tra fenomeni di diversa natura.

Si è visto inoltre che la maggior parte degli approcci qui illustrati non presuppone

l'impiego di metodologie sviluppate *ad hoc*. Di norma lo studio può essere realizzato tramite l'uso di metodologie classiche della dendroecologia e della dendroclimatologia, ponendo però particolare attenzione alla strategia di campionamento (soprattutto in riferimento alla selezione dei singoli individui e alla distribuzione spaziale dei siti campionati) e alle procedure di applicazione di alcune tecniche di analisi statistica.

## Bibliografia

- Becker, M. e Levy, G.** 1989. A proposito del deperimento delle foreste: clima, selvicoltura e vitalità dell'abetina dei Vosgi. *L'Italia Forestale e Montana*, 44 (2), 85-106.
- Box, G. F. P. e Jenkins, G. M.** 1970. Time series analysis: forecasting and control. Hoden-Dey, San Francisco, 1-575.
- Bracco, F. e Nola, P.** 1990. Analisi dei valori grezzi di accrescimento anulare. Nota metodologica. *Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia*, (7) 9, 27-41.
- Guiot, J.** 1986. Arma techniques for modelling tree ring response to climate and for reconstructing variations of paleoclimates. *Ecological Modelling*, 33, 149-171.
- Innes, J.** 1989. General aspects in the use of tree rings for environmental impact studies. In: **Cook, E. R. e Kairiukstis, L. A.** (eds.), *Methods of dendrochronology: Applications in the environmental sciences*. Kluwer Academic Publishers, 224-229.
- Kaennel, M. e Schweingruber, F. H.** 1995. Multilingual glossary of dendrochronology. Birnensdorf, Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research. Berne, Stuttgart, Vienna, Haupt, 467.
- Kairiukstis, L. e Kocharov, G. E.** 1989. Measuring the chemical ingredients in tree rings. In: **Cook, E. R. e Kairiukstis, L. A.** (eds.): *Methods of dendrochronology: Applications in the environmental sciences*. Kluwer Academic Publishers, 277-283.
- Schweingruber, F. H.** 1989. Dendroecological information in pointer years and abrupt growth changes. In: **Cook, E. R. e Kairiukstis, L. A.** (eds.), *Methods of dendrochronology: Applications in the environmental sciences*. Kluwer Academic Publishers, 277-283.
- Schweingruber, F. H.** 1996. Tree rings and environment. Dendroecology. Paul Haupt Pub., Berne, 609.
- Schweingruber, F. H., Albrecht, H., Beck, M., Hessel, J., Joos, K., Keller, D., Kontic, R., Lange, K., Niederer, M., Nippel, C., Spang, S., Spinnler, A., Steiner, B. e Winkler-Seifert, A.** 1986. Abrupte Zuwachsschwankungen in Jahrringabfolgen als ökologische Indikatoren. *Dendrochronologia*, 4, 125-183.
- Serre-Bachet, F. e Tessier, L.** 1989. Response function for ecological study. In: **Cook, E. R. e Kairiukstis, L. A.** (eds.), *Methods of dendrochronology: Applications in the environmental sciences*. Kluwer Academic Publishers, 247-258.
- Smith, K. T. e Shortle, W.** 1996. Tree biology and dendrochemistry. In: **Dean, J. S., Meko, D. M. e Swetnam, T. W.** (eds.), *Tree-Rings, Environment, and Humanity: Proceedings of the 1994 International Conference*. Tucson, Arizona, Radiocarbon 1996, 629-635.
- Strand, L.** 1980a. Acid precipitation and regional tree ring analysis. Internal Report 73/80 SNSF Project, Oslo, Norway.
- Strand, L.** 1980b. The effect of acid precipitation on tree growth. In: **Drablos, D. e Tollan, A.** (eds.), *Ecological impact of acid precipitation*. SNSF Project, Oslo, Norway.
- Tessier, L., Serre-Bachet, F. e Guiot, J.** 1990. Pollution fluorée et croissance radiale des conifères en Maurienne (Savoie, France). *Ann. Sci. For.*, 47, 309-323.

### 3.3.3 Foglie - Filippo Bussotti, Alberto Cozzi e Marco Ferretti

#### 3.3.3.1 Introduzione

Le foglie rappresentano un bersaglio preferenziale per i contaminanti atmosferici. Essi possono determinare modificazioni che si manifestano con sintomi visibili a occhio nudo, causare alterazioni ultrastrutturali, istologiche e biochimiche osservabili solo con tecniche adeguate (sintomi invisibili a occhio nudo), accumularsi nei tessuti, senza per questo causare alcun danno, e possono essere determinati qualitativamente e quantitativamente. La valutazione dei sintomi fogliari e le analisi chimiche delle foglie possono effettuarsi sia sulla vegetazione spontanea o coltivata residente nell'area di studio, sia utilizzando piante appositamente introdotte nell'ambiente da esaminare. Ai fini del presente capitolo si definiscono:

- bioindicatori/bioaccumulatori spontanei: piante facenti parte della flora, spontanea o coltivata, dell'area considerata;
- bioindicatori/bioaccumulatori introdotti: piante di definita specie e varietà appositamente coltivate in condizioni controllate e introdotte *ad hoc* nella zona da esaminare;
- sintomi visibili: alterazione del normale aspetto della foglia causato da cambiamenti di colore, necrosi dei tessuti, cambiamenti della forma e dimensioni distinguibili a occhio nudo;
- sintomi non visibili: alterazioni di caratteristiche istochimiche, morfologiche e strutturali e/o instaurazione di processi fisiologici di natura diversa riconoscibili e individuabili mediante tecniche di laboratorio e di campagna adeguate;
- accumulo di contaminanti nei tessuti: processo di natura passiva e/o attiva di arricchimento della concentrazione di determinati elementi chimici nelle foglie;
- strategia di campionamento: il *design* del sistema di campionamento dell'indagine (*survey design*), che individua il metodo di selezione dei punti di campionamento sul territorio (ad esempio sistematico, randomizzato, stratificato ecc.);
- tattica di campionamento: il *design* del sistema di campionamento a livello di singolo punto di campionamento (*plot design*), che indica quanti e quali individui considerare (repliche) per sito, quanti e quali sottocampioni per singola replica, l'età del materiale ecc.;
- qualità delle osservazioni: il livello al quale misurazioni e valutazioni soddisfano predefiniti livelli qualitativi di accettabilità in relazione alla loro precisione, accuratezza e riproducibilità.

La valutazione adeguata dei sintomi fogliari e/o dei fenomeni di accumulo di vari elementi chimici traccianti può fornire informazioni di grande utilità per la diagnostica ambientale, permettendo la definizione qualitativa e talvolta quantitativa degli effetti di un certo fenomeno di contaminazione ambientale sulla vegetazione dell'area di studio, permettendone una mappatura a costi ridotti.

#### 3.3.3.2 Metodi

*Strategia di campionamento.* Ogni informazione conseguibile da una campagna di biomonitoraggio mediante l'uso di sintomi fogliari o indicatori fogliari, in genere, dipende grandemente dal metodo di campionamento usato, che a sua volta è strettamente relazionato allo scopo del lavoro (Ernst, 1995); quest'ultimo dovrebbe permettere di

individuare già in partenza le caratteristiche del materiale da campionare (specie, età degli alberi e delle foglie). Di seguito vengono ricordati i più frequenti tipi di studio con le relative strategie di campionamento:

- *Studi di gradiente (gradient studies)*. È il tipo di studio che mira a identificare l'effetto di sorgenti di inquinamento puntiformi (per esempio centrali termoelettriche, inceneritori), lineari (per esempio autostrade) o - a scala più vasta - l'effetto di un gradiente di concentrazione di contaminanti (per esempio contaminazione da zolfo nel centro Europa). La collocazione dei punti di campionamento consigliata è quella che li dispone a distanze crescenti dalla sorgente e in relazione ai vettori di diffusione (venti). Le distanze progressive dalla sorgente vengono individuate in relazione alla variabilità attesa per l'indicatore considerato, generalmente più elevata in prossimità della sorgente, dove andrebbe quindi collocato un maggior numero di punti di campionamento (Ferretti *et al.*, 1995).
- *Studi a vasta scala (large scale surveys)*. Sono gli studi che mirano a definire le condizioni generali di un'area territoriale senza particolare attenzione alle sorgenti puntiformi e/o lineari eventualmente presenti. Tuttavia, a seconda degli scopi, si possono utilizzare strategie di campionamento diverse (sistematico, sistematico non allineato, randomizzato, stratificato, sistematico stratificato non allineato, multistadio, *nested*) da valutarsi in relazione alle domande di partenza. È da ricordare che l'elaborazione dei dati (statistica descrittiva e analitica, cartografia) è dipendente dal disegno di campionamento adottato. La densità dei punti di campionamento è da stabilirsi in base alla variabilità del fenomeno indagato, per cui sarebbe preferibile poter effettuare un'indagine pilota prima del rilevamento vero e proprio. In molti casi è tuttavia la disponibilità economica a determinare la densità di campionamento (nonché numero di sottocampioni e repliche). Si rimanda comunque a testi specializzati per i dettagli (Cochran, 1977; Cressie, 1991).

*Tattica di campionamento.* La tattica di campionamento deve specificare operativamente il numero di repliche, il numero dei sottocampioni, la loro dislocazione spaziale nei punti di campionamento, la frequenza temporale di campionamento, le caratteristiche del materiale da campionare. Per esempio, un punto di campionamento può includere 5 individui (repliche) della specie considerata, localizzati secondo una spirale a partire dalla posizione geografica del punto di campionamento sul terreno. Da ogni individuo vengono prelevati 4 campioni (sottocampioni) ognuno dei quali formato almeno da 10 grammi di sostanza fresca. In ogni caso sono gli scopi dell'indagine e la disponibilità economica che forniscono indicazioni per la definizione della tattica di campionamento più adatta.

*Generalità sulle procedure.* La parte tecnica riguardante le varie opzioni operative sarà centrata sulla procedura da seguire per una corretta diagnosi e identificazione, evidenziando i problemi legati alla descrizione della sintomatologia, alla quantificazione del danno e all'estrapolazione dei risultati. La bibliografia fornirà indicazioni per l'approfondimento sia degli argomenti trattati, sia di tutti gli altri connessi (aspetti chimici della formazione degli inquinanti, effetti degli altri inquinanti e delle misture, problemi connessi all'alterazione del metabolismo vegetale ecc.).

*Quality Assurance.* Le procedure di *Quality Assurance* (QA) sono i mezzi con cui viene affrontato il problema della qualità dei dati. In senso ampio, con il termine "qualità di



un prodotto” si intende il grado in cui le caratteristiche di tale prodotto incontrano quelle richiestegli (Cline *et al.*, 1990; Ferretti *et al.*, 1997) e con il termine “procedura QA” si indica un insieme organizzato di attività che definiscono i modi in cui le singole fasi della “produzione” devono essere eseguite per raggiungere un definito livello di qualità del “prodotto” (Millers *et al.*, 1994). Nei programmi di monitoraggio ciò significa che ogni dato raccolto (il prodotto) deve essere frutto di un processo di individuazione di obiettivi, di aggiornamento informativo, di standardizzazione di riferimenti e procedure e deve soddisfare requisiti di affidabilità (Ferretti, 1994; Ferretti *et al.*, 1996). Diverse attività sono normalmente comprese sotto la definizione di “controllo di qualità” (Cline *et al.*, 1989; Champine, 1993) (tabella 3.4): *Quality Management* (QM), che include le attività per la definizione della qualità del prodotto e per

<b>Categoria attività e area di interesse</b>	<b>Beneficio</b>
<i>Quality Management</i>	
disegno appropriato	considera se il quesito posto è giusto
pianificazione	permette considerazioni sulla comparabilità
modelli	identifica variabili di misura critiche
definizione dei limiti di qualità dei dati	considera le necessità di chi utilizza i dati raccolti
campioni relativi	valuta il numero e la rappresentatività
struttura dell'errore	ripartisce gli errori di campionamento e misura
valutazione globale e <i>review</i>	giudica la correttezza
documentazione	registra il processo progettuale
implementazione del programma QA	raggiungimento dei livelli di qualità dei dati
<i>Quality Assurance</i>	
obiettivi di qualità dei dati (MQOs)	aiuta la selezione dei metodi
uso di standard	permette il controllo di qualità e la valutazione
uso di procedura operative standard (SOPs)	permette un uso coerente ed efficiente dei metodi con documentata e conosciuta qualità dei dati
verifica e validazione	documenta l'integrità del campione e la coerenza dei dati
documentazione	fornisce l'evidenza di attività svolta e della qualità
<i>Quality Control</i>	
campioni per valutazione	base per il controllo statistico

(segue)

<i>Quality Control</i>	
training e uso di SOPs	promuove il controllo statistico
determinazioni di precisione	definisce le variazioni random e permette la valutazione di accuratezza
calibrazione	riduce o elimina il bias
<i>control charting</i>	documenta il controllo statistico
<i>Quality Evaluation</i>	
uso di standard	permette la determinazione di precisione e accuratezza
replicazione	fornisce una valutazione in corso
uso dei bianchi	controlla la contaminazione
ispezioni e audit	forniscono una valutazione obiettiva e la base per la comparabilità

Tabella 3.4 - Attività comprese nelle procedure di QA e loro principali benefici in un programma di monitoraggio (da Ferretti et al., 1997, basato su Cline e Burkman, 1989).

rendere effettivi i programmi formali di QA e il *Quality Assurance Plan* (QAP); *Quality Assurance* (QA), che comprende tutte le azioni pianificate o sistematiche necessarie affinché un prodotto o un servizio possa soddisfare i requisiti prefissati di qualità; *Quality Control* (QC), che include le operazioni tecniche e le attività utilizzate per soddisfare i requisiti di qualità (Shampine, 1993); *Quality Evaluation* (QE), che riguarda la comparazione di “prodotti” che si discostano dagli standard prefissati.

Allorquando si voglia affrontare correttamente un problema di monitoraggio biologico, è necessario porre attenzione agli aspetti del controllo di qualità. Tale attenzione permetterà di esplicitare adeguatamente ogni singola fase del lavoro e individuare eventuali punti deboli su cui concentrare gli sforzi successivi (Wagner, 1995).

### 3.3.3.3 Sintomi visibili

*Procedura per la loro diagnosi, descrizione e valutazione e problemi connessi. La procedura per una corretta diagnosi del danno in base ai sintomi provocati da un particolare inquinante deve considerare* (Davis, 1973; Skelly et al., 1974; Skelly et al., 1979):

- *sorgenti di inquinanti specifici*: alcuni tipi di industrie a causa dei processi lavorativi coinvolti emettono specifici tipi di inquinanti: per esempio industrie di produzione di alluminio, di fosfati e di laterizi emettono fluoro sotto differenti forme chimiche sia gassose sia come particolato. Se l'area da esaminare è localizzata vicino a un grosso polo industriale o a un agglomerato urbano il danno è probabilmente causato da una miscela di inquinanti, di conseguenza la diagnosi si deve basare sugli altri criteri riportati;
- *natura chimica e fisica dell'inquinante*: per esempio il fluoro nell'atmosfera si può trovare in tre forme che, nei confronti della vegetazione, hanno tossicità differente e

determinano quadri sintomatologici diversi (Treshow, 1971; Treshow *et al.*, 1970; McCune *et al.*, 1965; Chang, 1975);

- *caratteristiche geografiche e topografiche dell'area*: possono per esempio influenzare direzione e velocità dei venti; creare ristagni di aria ecc.;
- *condizioni meteorologiche*: temperatura dell'aria, velocità e direzione dei venti durante e dopo gli eventi inquinanti (per esempio particolari inversioni termiche, periodi di siccità, fluttuazioni repentine della temperatura e cambiamenti dell'umidità relativa) possono rendere la pianta più sensibile agli inquinanti;
- *dosaggio dell'inquinante* espresso come durata del periodo di esposizione all'inquinante e sua concentrazione: le recenti ricerche condotte in ambiente controllato permettono di conoscere le risposte specifiche delle piante a concentrazioni note di inquinanti, consentendo poi un raffronto con le osservazioni di campagna;
- *specie vegetali colpite e sintomi relativi*: sebbene la risposta a un determinato inquinante sia in qualche modo simile per tutte le piante, il grado di danneggiamento dipende dalla specie in oggetto o dalla cultivar. Esistono in letteratura elenchi delle piante resistenti o sensibili ai vari inquinanti (Manning *et al.*, 1980; Skelly *et al.*, 1974; Davis, 1973; Lorenzini, 1983);
- *sintomi visibili simili a quelli prodotti dagli inquinanti*: altri fattori quali deficienze nutrizionali, siccità, azione di batteri, virus e funghi possono provocare danni simili a quelli provocati dagli inquinanti;
- *dimensioni dell'area colpita dal danno e confronto tra i tipi di danno*: l'esame dell'intera area coinvolta può portare all'esclusione dei fattori biotici quali agenti di danno; danni estesi su vaste superfici e a carico delle specie sensibili possono essere la prova del coinvolgimento degli inquinanti;
- *data dell'emissione degli inquinanti*: può essere relazionata alla presenza di stadi fenologici con differente suscettibilità agli inquinanti;
- *valutazione della perdita (damage)*;
- *eventuali passate pratiche colturali*.

Una volta definito il quadro di azione dell'inquinante, si deve passare alla definizione dei suoi effetti visibili sulla foglia. I tipi di danno (*injury*) si possono raggruppare in alcune categorie (Lorenzini, 1983; Skelly *et al.*, 1987).

*Variazioni di sviluppo*. L'accertamento di riduzioni di sviluppo, in assenza di altre espressioni sintomatologiche, non sempre è di facile identificazione e richiede comunque il raffronto con piante cresciute in condizioni controllate. La risposta più frequente in termini di variazioni di sviluppo è la riduzione della superficie fogliare che può arrivare fino alla sua mancata formazione. Nel caso di inquinanti che alterano il bilancio ormonale della pianta possono verificarsi epinastia fogliare, modificazioni nella forma della lamina fogliare, defogliazione anticipata.

*Clorosi (chlorosis)*. È il passaggio dal caratteristico colore verde a varie tonalità di verde-giallastro o al giallo a seguito di disturbi a carico della clorofilla. L'estensione e la localizzazione della clorosi sulla foglia variano grandemente: possono essere interessate aree ben delimitate (per esempio clorosi marginali, apicali, internervali ecc.) su foglie in varie condizioni (per esempio nelle conifere solo le foglie più vecchie).

*Pigmentazione (stippling)*. È principalmente un sintomo connesso all'azione dell'ozono sulle latifoglie. Generalmente la pigmentazione è caratteristica per specie, ma può variare in relazione alle condizioni ambientali o fisiologiche dell'albero. In genere è

più evidente sulle foglie più vecchie (maggiore esposizione). Sulle foglie più giovani tende a manifestarsi sulla punta, mentre quelle più vecchie possono essere colpite su tutta la superficie. Il sintomo si manifesta come comparsa di pigmenti sottoforma di macchioline puntiformi, anche molto fini, di colore rosso o bruno fino a nero, probabilmente a seguito della scomparsa della clorofilla.

*Necrosi.* La morte di cellule del mesofillo è generalmente preceduta dalla comparsa di aree di aspetto “allessato” a causa di alterazioni del bilancio idrico che in breve disseccano e portano al manifestarsi di tipiche aree di varia colorazione, dal bianco-avorio fino al bruno-nerastro, in relazione al livello delle sostanze di degradazione prodotte, alla rapidità dei processi degenerativi, al tipo di cellule colpite, a fattori ambientali e intrinseci alla pianta. Anche nel caso delle necrosi, la distribuzione e le dimensioni delle zone necrotizzate variano considerevolmente in relazione alle combinazioni inquinante/piante. Sintomatologie molto caratteristiche sono (i) le necrosi bifacciali che si manifestano su entrambi le superfici della lamina fogliare a causa di danni sia al tessuto a palizzata che a quello lacunoso e (ii) le “bronzature” o “argentature” causate dalla morte delle cellule subepidermiche.

*Senescenza precoce.* È il meno specifico dei sintomi e, conseguentemente, il più difficile da riconoscere e il meno affidabile in termini diagnostici, visto che mima perfettamente il normale processo di decolorazione e abscissione delle foglie.

L'utilizzo esclusivo del sintomo fogliare macroscopico di danno quale sistema di bioindicazione pone però i seguenti problemi:

- i sintomi descritti, nel caso siano l'espressione “tipica” delle foglie di determinate specie come risposta a uno specifico inquinante, indicano che nell'aria è presente un inquinante o una miscela di inquinanti. Rimane la fondamentale questione di quantificare queste osservazioni in modo tale che la pianta da “indicatrice” diventi “biomonitore”. Per i seguenti inquinanti si sono stabilite le curve dose-risposta: ozono-tabacco cv. Bel-W3 (Hecket *et al.*, 1966; Heck *et al.*, 1970; Heggestad *et al.*, 1962; Macdowall *et al.*, 1964); SO<sub>2</sub> e O<sub>3</sub> per soia e pino strobo (Heagle *et al.*, 1974; Houston, 1974);
- determinati inquinanti possono produrre quadri sintomatologici complessi rendendo difficile la diagnosi: per esempio il danno acuto da ozono produce una vasta gamma di sintomi differenti tra monocotiledoni e dicotiledoni e, in queste, tra specie decidue e sempreverdi (Davis *et al.*, 1976; Hill *et al.*, 1970; Richards *et al.*, 1958; Skelly *et al.*, 1987);
- fenomeni di convergenza e/o divergenza sintomatologica possono rendere la diagnosi errata se condotta sulla base di osservazioni dei sintomi su una sola specie: agenti diversi (biotici e non) possono provocare sintomi simili se non identici; al contrario si può verificare che lo stesso agente inquinante provochi sulla stessa pianta sintomi alquanto diversi tra loro a causa del diverso stato fisiologico degli organi;
- la variabilità genetica a livello di specie può essere causa di uno spettro di risposte molto differenti tra loro e di difficile interpretazione, variando da individui resistenti a sensibili. Nell'uso di sistemi di biomonitoraggio sarebbe auspicabile utilizzare cloni con risposte specifiche a un solo inquinante e selezionare in contemporanea cloni resistenti per poter comparare rapidamente le risposte. Inoltre, una volta definiti questi cloni, sarebbe necessario determinare come i fattori ambientali interagiscono sulle loro risposte in modo da eliminare le incertezze nell'interpretazione delle risposte delle piante come biomonitor;

- la suscettibilità di ciascun individuo è influenzata da particolari condizioni ecologiche e da fattori intrinseci, quali stadio fenologico, età e posizione della foglia sulla pianta ecc. Per esempio nei confronti dell' SO<sub>2</sub>, nell' arco della stagione vegetativa, le seguenti piante hanno dimostrato sensibilità differente: in primavera e nella prima estate si sono dimostrate più sensibili *Poa annua*, *Brassica spp.*, *Viola spp.*, *Pteridium aquilinum*, *Rubus spp.*, *Malus spp.*, *Populus tremuloides*, *Fraxinus americana*, *Betula pendula*; in estate piena: *Medicago sativa*, *Hordeum vulgare*, *Cucurbita pepo*; nella tarda estate: *Pinus strobus*, *Pinus banksiana*, *Picea excelsa*;
- in teoria, sulle foglie, i tipi di effetto dei danni acuti (breve esposizione ad alte concentrazioni di inquinanti) e cronici (esposizione a basse concentrazioni per lungo periodo) sono distinti a livello sintomatologico: nel primo caso il danno è una necrosi, con i tessuti che assumono colorazione grigio metallico o marrone e possono decolorare con l'età a marrone rossiccio o bianco; è di norma localizzato nel tempo e nello spazio; i suoi effetti sono spettacolari per la rapidità di comparsa e l'intensità; produce in genere caratteristici sintomi e ha un notevole valore diagnostico grazie alle caratteristiche cromatiche e all'andamento delle lesioni. Nel secondo caso i danni sono clorosi, punteggiature (pigmentazione, *stippling*) e senescenza precoce. In pratica accade però che, essendo le piante in natura soggette ai due tipi di esposizione, il sintomo risultante non è facilmente riconducibile a uno dei tipi specifici. Le piante possono mostrare contemporaneamente sintomi di tipo acuto e di tipo cronico. In tal caso le necrosi possono essere accompagnate da vari livelli di clorosi. Inoltre, la comparsa di gravi danni acuti alle foglie può essere seguita dalla defogliazione completa e addirittura dalla morte della pianta, ma, come per esempio nel caso di esposizione a elevate concentrazioni di NO<sub>2</sub>, Cl<sub>2</sub> e HCl, possono verificarsi anche estese defogliazioni senza essere precedute dalla comparsa di necrosi.

#### 3.3.3.4 Sintomi non visibili

*Indici fogliari.* L'esame di vari indici fogliari può dare informazioni circa lo stato di stress della pianta, in particolare su eventuali condizioni di stress idrico. Per questo scopo è necessario che le foglie vengano raccolte e immediatamente poste in sacchetti di plastica sigillati in modo che non perdano acqua durante il trasporto. I campioni, conservati in borsa frigorifera, devono giungere al laboratorio entro le 24 ore. L'ora di raccolta può essere molto importante soprattutto per gli indici basati sul calcolo del contenuto idrico.

Occorre comunque sottolineare che gli indici proposti (cfr. vol. 3) non hanno valore assoluto in sé, ma devono essere contestualizzati (ovvero posti in relazione ad altri indici) oppure se ne deve seguire l'andamento su base stagionale e/o giornaliera. Per esempio:

- il peso secco specifico è normalmente relazionato all'area fogliare (con una relazione inversa) e al suo spessore (relazione diretta), nonché al contenuto idrico (relazione diretta);
- il peso secco specifico ha normalmente una variazione stagionale con massimi valori alla fine del periodo secco;
- il contenuto relativo d'acqua può variare su base giornaliera. Un basso RWC (contenuto relativo di acqua), soprattutto se rilevato nelle prime ore del mattino, può indicare difficoltà di rifornimento idrico. Tale condizione di stress potrà essere re-

lazionata con bassi valori di potenziale idrico. D'altra parte, un alto valore di RWC accompagnato da un valore basso di WC (contenuto percentuale di acqua) e TWC (contenuto percentuale di acqua nella foglia a pieno turgore) può indicare la presenza di adattamenti sclerofillici tesi a massimizzare l'economia dell'acqua. In questo caso ci dobbiamo aspettare alti valori di SDW (peso secco specifico) e DMC (concentrazione di materia secca).

Per la realizzazione di una prima indagine esplorativa è consigliabile effettuare un campionamento durante tutto l'anno (per le specie decidue sarà sufficiente considerare il periodo vegetativo) con frequenza mensile (quindicinale nei periodi critici per aridità). I prelievi dovrebbero essere effettuati 2 volte al giorno: alle prime luci dell'alba (meglio se un pò prima) e nelle ore più calde. Per le modalità di campionamento si fa riferimento a quelle seguite per l'analisi chimica delle foglie.

Il numero di alberi campionati e il numero di foglie per albero devono essere rappresentativi dell'area studiata.

In tal modo sarà possibile evidenziare eventuali periodi critici su cui focalizzare l'attenzione. Per esempio, nelle conifere di montagna, non necessariamente il periodo critico per lo stress idrico corrisponde all'estate; molto importanti possono essere i periodi di aridità fisiologica invernale, durante i quali si può avere una certa traspirazione cuticolare (anche in seguito a lesioni alle cere causate da esposizioni estive a ozono) non compensata da un'adeguata ricarica dal suolo.

*Indici anatomici, istochimici e ultrastrutturali.* L'uso del microscopio nelle indagini sulle condizioni dei boschi può fornire informazioni utili sulla natura e sulla dinamica di un eventuale danno a livello fogliare; tuttavia, occorre evidenziare che, da un'analisi attenta della ricca casistica riportata nella letteratura scientifica, non esistono sintomi specifici che possano far risalire con certezza a un determinato agente causale. In realtà il comportamento di piante soggette a condizioni di stress è sempre molto simile e le difese attive che esse pongono in atto consentono di affrontare più di un agente avverso. Per questo è molto importante operare il campionamento in condizioni note (età e dimensioni dell'albero, posizione della foglia sull'albero, età della foglia o dell'ago nelle specie sempreverdi, data e ora di campionamento, condizioni climatiche ed edafiche del sito ecc.) in modo da disporre di una chiave d'interpretazione. È molto utile inoltre associare all'analisi microscopica altre informazioni di carattere biologico ed ecologico (indici fogliari di stress, indici ecofisiologici, stato della chioma, stato nutrizionale ecc.).

La presente esposizione non ha lo scopo di fornire informazioni dettagliate di tecnica microscopica, per le quali rimandiamo a trattati specializzati, bensì quello di individuare una serie di parametri utili, il loro possibile significato ecologico e le difficoltà interpretative che possono esserne connesse.

*Informazioni ritraibili per mezzo del Microscopio Ottico.*

- *Anatomia.* È noto che in condizioni di stress aumentano le caratteristiche di sclerofilia, con l'incremento dello spessore totale (dovuto soprattutto all'ispessimento dei tessuti del mesofillo) e la riduzione degli spazi intercellulari. Tali adattamenti possono derivare dall'esposizione a inquinanti in forma cronica, ma anche da stress idrici, nutrizionali e per forti radiazioni luminose. Un aspetto anatomico importante, soprattutto negli aghi di conifere, è rappresentato dal collabimento delle cellule cribrose all'interno della guaina del fascio. Si tratta di un sintomo collegabile a processi d'invecchiamento.

- *Analisi della fluorescenza primaria.* La fluorescenza primaria fornisce informazioni sull'integrità della clorofilla e quindi sulla capacità fotosintetica. La degenerazione della clorofilla può essere indotta da stress della natura più varia e dai normali processi d'invecchiamento. Può essere utile osservare l'eventuale *pattern* di degenerazione: se le cellule in prossimità degli stomi sono le prime a essere interessate, è possibile che il danno sia prodotto da un agente presente nell'atmosfera; mentre se la degenerazione parte dalla prossimità dei fasci è più probabile che la responsabilità sia legata ad agenti edafici o comunque inerenti il trasporto. Nelle latifoglie, il danno da ozono interessa per prime le cellule a palizzata del mesofillo.
- *Fenoli, tannini, lignina.* I metaboliti secondari sono collegati a numerosi processi di difesa e detossificazione. L'accumulo di sostanze di natura fenolica (fra cui i tannini) nelle cellule del mesofillo e dell'epidermide e l'impregnazione della parete sono risposte aspecifiche nei confronti di diversi tipi di danno: carenze idriche e nutrizionali, esposizione a forti radiazioni solari e, in particolare, ai raggi UV-B, spray salini, varie forme di inquinamento. La lignificazione delle pareti può essere considerata il risultato ultimo del processo di impregnazione di fenoli e può essere considerato un adattamento sclerofillico. La lignificazione è per altro collegata all'attività delle perossidasi apoplastiche (anch'esse indice aspecifico di stress di tipo ossidativo), che possono essere messe in evidenza con appropriate tecniche istochimiche. Fenomeni di delignificazione degli stomi nelle conifere sono stati osservati come conseguenza di fumigazioni con elevate concentrazioni di SO<sub>2</sub>.
- *Sostanze grasse.* L'accumulo di sostanze grasse nel citoplasma può essere collegato alla degenerazione dei cloroplasti e/o del reticolo endoplasmatico. Si tratta di un sintomo descritto in relazione alla patologia da ozono, ma può derivare anche dai normali processi di invecchiamento e/o senescenza precoce in seguito a fattori di stress ambientale. Fra le sostanze grasse riveste molta importanza la cutina, che costituisce uno strato protettivo all'esterno della parete dell'epidermide. L'ispessimento dello strato cuticolare può essere considerato un adattamento di tipo protettivo. Una delle principali alterazioni imputate all'azione dell'ozono consiste nell'incremento di permeabilità della cuticola: oltre a un incremento non controllato della traspirazione cuticolare, la foglia si impoverisce in tal modo di ioni K<sup>+</sup>.
- *Pareti.* L'ispessimento delle pareti, non solo a livello di epidermide, ma anche del mesofillo, è un aspetto che può essere considerato nel quadro degli adattamenti sclerofillici.
- *Amido.* L'accumulo di granuli di amido nei cloroplasti può essere interpretato come conseguenza di problemi di trasporto a livello dei vasi cribrosi. Generalmente, in questo caso, i vasi sono ostruiti da *callosio*. Questo comportamento è stato descritto come aspetto della sintomatologia da ozono, ma, come detto, può essere imputato anche a problemi di trasporto.
- *Calcio.* La presenza di calcio, in forma di cristalli di ossalato, a livello delle pareti dell'epidermide è considerata un meccanismo di detossificazione ed è collegata a processi di invecchiamento.

3.3.3.5 *Informazioni ritraibili per mezzo del Microscopio Elettronico a Trasmissione (TEM)*  
Tutti gli aspetti sopra descritti possono essere messi in evidenza con maggiore efficacia per mezzo del TEM. Comunque il TEM è stato finora usato soprattutto per lo stu-

dio delle alterazioni che avvengono a livello dei cloroplasti. La perdita di struttura del grana e il rigonfiamento di singoli tilacoidi sono sintomi descritti come conseguenza di fumigazioni con ozono e altri inquinanti, ma possono essere indotti da qualunque altro agente che provochi la degenerazione della clorofilla. In linea generale, questi sintomi si possono considerare legati a fenomeni di senescenza. La degenerazione dei cloroplasti è di regola accompagnata dall'incremento di plastoglobuli. La granulazione dello stroma è stata descritta come sintomo specifico del danno da ozono.

#### 3.3.3.6 *Informazioni ritraibili per mezzo del Microscopio Elettronico a Scansione (SEM)*

Il SEM è stato largamente usato nei primi studi sugli effetti degli inquinanti sugli alberi. Infatti, i rivestimenti cerosi delle superfici degli aghi delle conifere e soprattutto i reticoli cerosi epistomatici hanno dimostrato un'elevata sensibilità agli inquinanti, tanto che la valutazione delle condizioni di tali reticoli è stata considerata a lungo come un possibile mezzo di biomonitoraggio. Attualmente si ritiene che la degenerazione delle strutture di protezione degli stomi nelle conifere non sia necessariamente legata all'azione di sostanze tossiche, essendo numerosi i fattori ambientali e antropici che possono causare questo effetto. Tuttavia, l'osservazione delle condizioni delle cere, se rapportata alla misura dei possibili fattori ambientali influenti, può ancora essere considerata un indice delle condizioni della pianta.

Non esiste a tutt'oggi alcuna evidenza di un analogo comportamento delle cere delle latifoglie.

#### 3.3.3.7 *Proposte per una quantificazione del danno microscopico*

Il limite principale delle analisi microscopiche è quello di fornire un dato che è di regola qualitativo. In tal modo è possibile osservare e descrivere i processi biologici che avvengono a livello cellulare, ma è assai difficile distinguere quantitativamente fra differenti campioni e disporre di numeri idonei per l'analisi statistica. Per ovviare a questo inconveniente sono stati proposti vari metodi, a cui accenneremo solo brevemente:

- per l'analisi al SEM sono state proposte classi proporzionali di danno stomatico, che consentono il calcolo di un indice complessivo di danno. Trumbacher e Eckmüllern (1997) hanno proposto 5 classi sulla base della superficie stomatica danneggiata (classe 1: fino al 20%; classe 2: 21-40%; classe 3: 41-60%; classe 4: 61-80%; classe 5: >80%);
- per l'analisi al TEM sono stati proposti sistemi di misura di alcuni parametri dimensionali dei cloroplasti e dei singoli tilacoidi, essendo questi gli organuli maggiormente sensibili agli stress ambientali;
- per l'analisi al microscopio ottico sono state effettuate misure relative a cellule intere (per esempio, percentuale di cellule collassate nel mesofillo);
- infine, per quanto riguarda l'analisi istochimica sono in corso di studio delle metodiche collegate all'analisi dell'immagine.

Per poter ottenere dati adatti a un trattamento statistico è necessario partire dalla progettazione di un idoneo sistema di campionamento.

#### 3.3.3.8 *Accumulo nei tessuti*

Taluni contaminanti, per lo meno alle concentrazioni che normalmente si trovano in atmosfera, non provocano danni diretti alle foglie, ma possono depositarsi sulle loro



superfici ed essere assorbiti, determinando così un aumento della loro concentrazione, dosabile per via chimica. È il caso tipico dei metalli in traccia, spesso impropriamente definiti metalli pesanti.

Il dosaggio chimico degli elementi nelle foglie è una pratica assai diffusa di monitoraggio ambientale. Esistono protocolli standardizzati per la raccolta dei campioni, il trasporto, la conservazione, il trattamento prima dell'analisi e la procedura analitica (Task Force Meeting of ICP Forests, 1997; Ernst, 1995; Wagner, 1995).

Fatte salve tutte le considerazioni su strategia e tattica di campionamento, su cui si basa l'estrapolazione dei dati dal sottocampione alla pianta, dalla pianta al sito e dal sito all'area considerata, ulteriori punti su cui concentrare l'attenzione sono i seguenti.

*Età delle foglie da campionare.* È chiaramente dipendente dagli scopi del lavoro. Per specie annuali o decidue, il problema ovviamente non si pone. Per specie sempreverdi si deve considerare che taluni elementi tendono ad accumularsi nei tessuti in relazione al loro periodo di esposizione (Ernst, 1995). Ai fini delle stime dello stato nutrizionale si usano generalmente foglie dell'anno corrente. Campionamenti di aghi di annate diverse possono essere utili nel caso delle conifere per evidenziare fenomeni di accumulo.

*Epoca di campionamento.* A parità di età delle foglie, l'epoca di campionamento ha grossa influenza sui risultati, in quanto taluni elementi sono soggetti a dinamiche stagionali piuttosto marcate (Ernst, 1995).

*Posizione del campione sulla pianta.* Occorre considerare che foglie di luce e d'ombra possono essere considerevolmente diverse dal punto di vista chimico. In genere, il campionamento è effettuato su foglie di luce localizzate nelle porzioni più esposte della chioma di un albero. In caso di colture introdotte *ad hoc* (per esempio minicolture di *Lolium multiflorum*, Ferretti *et al.*, 1992) è preferibile asportare l'intera parte epigea sopra i 3 cm dal suolo.

*Raccolta, trasporto e conservazione.* Queste fasi devono essere realizzate in modo da evitare il deterioramento del campione e ogni contaminazione durante le varie operazioni. Occorre ridurre al minimo il tempo tra prelievo e preparazione del campione e comunque, è necessario conservarlo in frigorifero (o in borsa frigorifera durante il trasporto).

*Trattamento prima delle procedure analitiche.* È importante decidere se lavare o no il campione di foglie. Anche in questo caso, gli scopi del lavoro offrono una guida sicura: per studi di carattere nutrizionale, si ammette che sia meglio operare un lavaggio delle foglie in modo da asportare il materiale depositato dall'atmosfera, che non fa parte del campione fogliare in termini fisiologici. Viceversa, per studi mirati a caratterizzare l'inquinamento atmosferico in una data zona, sembra preferibile misurare la concentrazione totale di un elemento, ovvero la somma delle frazioni assorbite, adsorbite o semplicemente deposte sugli apparati fogliari e, quindi, non lavare le foglie.

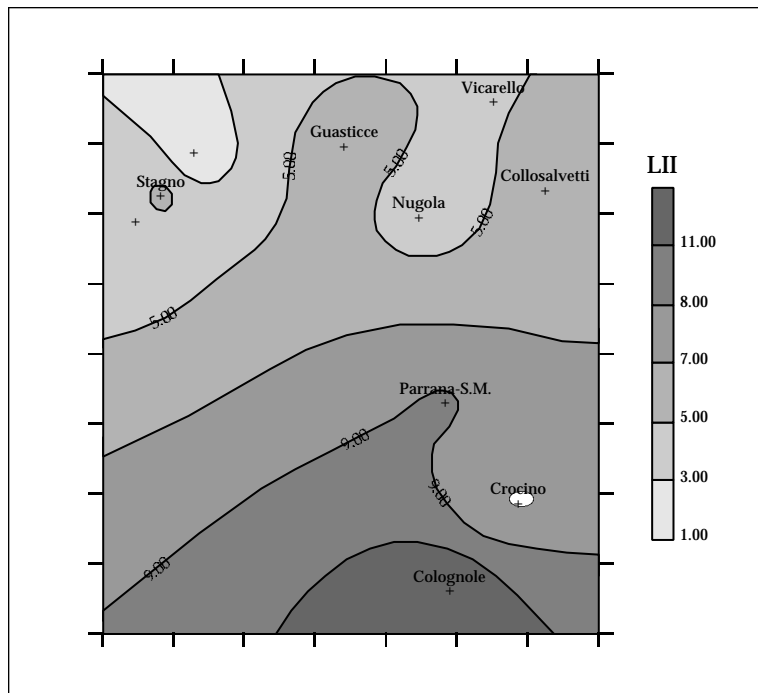
*Elementi chimici da considerare.* Gli elementi da considerare per la successiva analisi dei campioni dipendono grandemente dagli scopi dello studio, a loro volta basati sulle caratteristiche di contaminazione dell'area in esame. Esiste un'intera lista di elementi potenzialmente interessanti; tuttavia, per alcuni di essi i risultati generalmente forniscono informazioni di difficile lettura (per esempio elementi come azoto e zolfo sono a certe concentrazioni contaminanti atmosferici, ma sono anche macronutrienti per le piante, per cui, salvo casi eclatanti è difficile evidenziare fe-

nomeni di accumulo fogliare), mentre per altri i procedimenti analitici mantengono margini di errore elevati.

In genere, micronutrienti come ferro, manganese, zinco, rame, alluminio ed elementi cosiddetti tossici, come vanadio, arsenico, mercurio, cromo, cadmio, piombo, sono frequentemente utilizzati (Ferretti *et al.*, 1992). Kabata Pendias e Pendias (1992) propongono un panorama sulla concentrazione di metalli in traccia nelle piante.

*Preparazione del campione per l'analisi.* Generalmente, i campioni di foglie devono essere sottoposti a trattamento prima di procedere alla determinazione chimica dell'elemento considerato. La preparazione è in genere tipica per i vari elementi, anche se alcuni metalli possono subire lo stesso processo di digestione. Task Force Meeting of ICP Forests. (1997) raccomanda i seguenti metodi di digestione.

- *Digestione umida in condizioni acide e/o ossidanti.* Metodo Kjeldahl per l'azoto. Digestione tramite acido solforico e acqua ossigenata per azoto e fosforo. Digestione tramite acido solforico e nitrico, acido nitrico, acqua ossigenata e acido nitrico, acido nitrico (o acqua ossigenata) seguita da acido perclorico (che è molto pericoloso), acido nitrico e acido fluoridrico in vasi di teflon per azoto (solo il primo), fosforo, zolfo, calcio, magnesio, potassio, sodio, manganese, zinco e rame. Digestione pressurizzata con acido nitrico o acido nitrico + acqua ossigenata in bombe di teflon a 180°C per fosforo, zolfo, calcio, magnesio, potassio, sodio, manganese, zinco, rame, alluminio, cadmio, piombo, cloro e boro.
- *Incenerimento a secco (dry ashing).* Incenerimento a secco in forno a 450°C-600°C in platino o porcellana o quarzo o cubicoli di nichel (a seconda dell'elemento) e dissoluzione delle ceneri con acido cloridrico e perclorico per fosforo, potassio, sodio, calcio, magnesio, ferro, manganese, zinco. Incenerimento a basse temperature in atmosfera di ossigeno per il fluoro. Combustione secondo Schöniger in atmosfera di ossigeno con dissoluzione immediata in soluzione acida o alcalina per zolfo, fosforo e cloro.
- *Ossidazione e determinazione integrata.* Esistono apparati che effettuano ossidazione, determinazione e quantificazione in circuito chiuso, come i CHN- o gli NS-*apparatus*.
- *Fluorescenza ai raggi X.* Metalli e non metalli fino al boro possono essere determinati mediante la fluorescenza ai raggi X (*X-ray fluorescence*), senza digestione o incenerimento.
- *Metodi di analisi più comuni*  
*Azoto:* colorimetria; distillazione e titolazione di NH<sub>3</sub>; apparecchi automatici CHNS.  
*Zolfo:* turbidimetria con solfato di bario; ICP cromatografia ionica; colorimetria; diretta determinazione tramite apparecchi automatici CHNS; determinazione tramite *X-ray fluorescence*.  
*Fosforo:* colorimetria e cromatografia.  
*Calcio, magnesio, potassio, sodio, ferro, manganese, zinco:* Atomic Absorption Spectrometry (AAS) ICP; *X-ray fluorescence*.  
*Cloro:* titolazione con nitrato d'argento; colorimetria; cromatografia ionica; elettroforesi capillare; elettrodi specifici; ICP; *X-ray fluorescence*.  
*Boro:* colorimetria; ICP; *X-ray fluorescence*.  
*Fluoro:* elettrodi specifici; cromatografia ionica.



**Figura 3.7** - Punteggi di danno fogliare (Leaf Injury Index, LII) specifico da ozono su tabacco nell'area del comune di Collesalveti, Livorno. La zona industriale è localizzata in corrispondenza di Stagno (vertice in alto a sinistra), mentre la zona forestale è distribuita sull'asse Nugola-Parrana S.M.-Colognole, da Nord a Sud. La città di Livorno si sviluppa sul lato sinistro della figura (ridisegnato da Ferretti et al., 1992).

Alluminio: AAS; ICP; X-ray fluorescence.

Rame: AAS; ICP.

Piombo e cadmio: AAS; ICP.

Caso di studio: monitoraggio di ozono e metalli in traccia nel comune di Collesalveti, Livorno.

La valutazione dei sintomi indotti dall'ozono su bioindicatori specifici come *Nicotiana tabacum* cv. BelW3 nel territorio del comune di Collesalveti è stata condotta nel 1990 utilizzando una serie di stazioni localizzate in diversi contesti ambientali: industriale/urbano, suburbano, forestale (Ferretti et al., 1992). I risultati sono sintetizzati nella mappa di figura 3.7, dove è evidente una zonazione dei sintomi, con valori più elevati nell'area rurale e forestale. I sintomi sono risultati significativamente correlati alla concentrazione di ozono atmosferico ( $P < 0,05$ ) per cui, entro certi limiti, la mappa di figura 3.7 corrisponde a una mappa dell'esposizione all'ozono dell'area considerata.

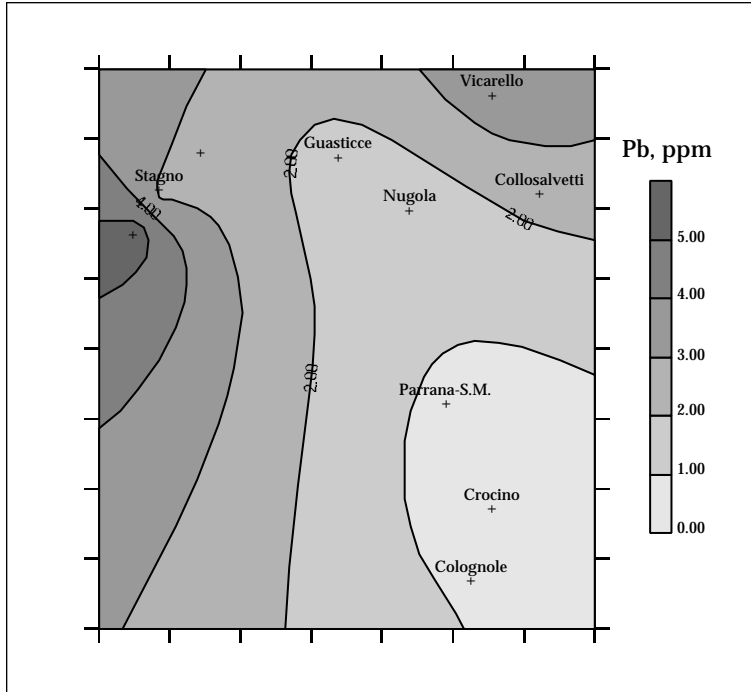


Figura 3.8 - Concentrazioni di piombo nell'area del comune di Collesalveti, Livorno. Per la caratterizzazione delle stazioni vedi figura 3.7 (ridisegnato da Ferretti et al., 1992).

È interessante notare come invece le concentrazioni di piombo determinato in *Lo - lium multiflorum* seguano un andamento quasi opposto (figura 3.8), che ben riproduce la diversità tra le caratteristiche di questo inquinante primario, tipico del traffico veicolare e la cui diffusione è nettamente sorgente-dipendente, e quelle di un ossidante fotochimico di origine secondaria come l'ozono, la cui diffusione è invece meno relazionata alla sorgente di emissione, ma le cui concentrazioni sono anzi superiori in zone "ad aria pulita" nei confronti dei contaminanti classici.

## Bibliografia

- Chang, C. W.** 1975. Fluoride. In: **Mudd, J. B. e Kozlowski, T. T.** (eds.): Responses of plants to air pollution, Academic Press, NY, 57-87.
- Cline, S. P. e Burkman, W. G.** 1989. The Role of Quality Assurance In Ecological Programs. In: **Bucher, J. B. e Bucher-Wallin, I.** (eds.). Air Pollution And Forest Decline. Proc. 14th Int. Meeting for Specialists on Air Pollution Effects on Forest Ecosystems, IUFRO P2.05, Interlaken, Switzerland, Oct. 2-8, 1988. Birmensdorf, 361-365.
- Cochran, W. G.** 1977. Sampling techniques. 3rd Ed. J. Wiley, New York.
- Cressie, N.** 1991. Statistics for spatial data. Ed. J. Wiley, New York.
- Davis, D. D.** 1973. Air pollution damages trees. USDA, Forest Service, Government Printing Office, Washington DC, 32.
- Davis, D. D. e Wilhour, R. G.** 1976. Susceptibility of woody plants to sulfur dioxide and photochemical oxidants. US EPA Publication, 600/3, 76-102.
- Ernst, W. H. O.** 1995. Sampling of plant material for chemical analysis. *The Science of Total Environment*, 176, 15-24.
- Ferretti, M.** 1994. Valutazione dello stato dei boschi con esperienza integrata di monitoraggio ambientale. In: **Gasparo, D. e Zeppa, L.** (eds.), Ecothema, Trieste, 133-157.
- Ferretti, M., Cenni, E., Pisani, B., Righini, F., Gambicorti, D., De Santis, P. e Bussotti, F.** 1992. Biomonitoraggio di inquinanti atmosferici: una esperienza integrata nella Toscana costiera. *Acqua-Aria*, 8, 747-758.
- Ferretti, M., Cenni, E., Bussotti, F. e Batistoni, P.** 1995. Vehicle-Induced Pb- and Cd-Contamination of Roadside Soil and Plants in Italy. *Chemistry and Ecology*, 11, 213-228.
- Ferretti, M., Brogi, L., Bussotti, F. e De Dominicis, V.** 1996. Il programma Monito. Monitoraggio Intensivo delle foreste Toscane. Concetti, metodi e struttura operativa. *Monti e Boschi*, 3, 11-21.
- Ferretti, M., Cozzi, A. e Cenni, E.** 1997. Importance of Quality Assurance in Ecosystem Monitoring Programs. Forests as an example. *S. It. E., Atti*, 18.
- Heagle, A. S., Body, D. E. e Neely, G. E.** 1974. Injury and yield responses of soybean to chronic doses of ozone and sulfur dioxide in the field. *Phytopathology*, 64, 132-136.
- Heck, W. W., Dunning, J. A. e Hindawi, I. J.** 1966. Ozone: nonlinear relation of dose and injury in plants. *Science*, 151, 577-578.
- Heck, W. W. e Heagle, A. S.** 1970. Measurement of photochemical air pollution with a sensitive monitoring plant. *J. Air Pollut. Control Ass.*, 20, 97-99.
- Heggstad, H. E. e Menser, H. A.** 1962. Leaf spot-sensitive tobacco strain Bel-W3, a biological indicator of the air pollutant ozone. *Phytopathology*, 52, 735.
- Hill, C., Heggstad, H. E. e Linzon, S. N.** 1970. Ozone. In: **Jacobson, J. S., Hill, A. C.** (eds.): Recognition of air pollution injury to vegetation: a pictorial atlas. Air Pollution Control Association, B1-B22, Pittsburgh.
- Houston, D. B.** 1974. Response of selected *Pinus strobus* L. clones to fumigations with sulfur dioxide and ozone. *Can. J. For. Res.*, 4, 65-68.
- Jacobson, J. S. e Hill, A. C.** (eds.) 1970. Recognition of air pollution injury to vegetation: a pictorial atlas. Air Pollution Control Association, Pittsburgh.
- Jensen, W. A.** 1962. Botanical Histochemistry. Principles and Practice. W. A. Freeman and Company, San Francisco and London.
- Johansen, D. A.** 1940. Plant microtechnique. McGraw-Hill Book Company, New York and London.
- Kabata-Pendias, A. e Pendias, H.** 1992. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London.

- Kershaw, J. A. e Larsen, D. R.** 1992. A rapid technique for recording and measuring the leaf area of conifer needle sample. *Tree Physiology*, 11, 411-417.
- Kozlowski, T. T, Kramer, P. J. e Pallardy, S. G.** 1991. The physiological ecology of woody plants. Academic Press, Inc. Harcourt Brace Jovanovich, Publishers, San Diego.
- Lacasse, N. L. e Treshow, M.** 1976. Diagnosing vegetation injury caused by air pollution. US EPA Publication.
- Larcher, W.** 1993. *Ecofisiologia vegetale. Edagricole*, Bologna.
- Lorenzini, G.** 1983. Le piante e l'inquinamento dell'aria. Edagricole, Bologna, 359.
- Macdowall, F. D. H., Mukammai, E. I. e Cole, A. F. W.** 1964. Direct correlation of air-polluting ozone and tobacco weather fleck. *Can. J. Plant Sci.*, 44, 410-417.
- Malhotra, S. S. e Blauel, R. A.** 1980. Diagnosis of air pollutant and natural stress symptoms on forest vegetation in Western Canada. Northeastern Forest Research Centre, Canadian Forestry Service, Information Report NOR-X-228, 84.
- Manning, W. J. e Feder, W. A.** 1980. Biomonitoring air pollutants with plants. Applied Science Publishers, London, 142.
- Manual on methods and criteria for harmonized sampling, assessment, monitoring and analysis of the effects of air pollution on forests- sottoposto al 13th Task Force meeting of ICP Forests (31 maggio - 4 giugno 1997, Farnham (UK).
- Markert, B.** 1993. Plants as biomonitors. VCH Weinheim, New York, Basel, Cambridge, 644.
- McCune, D. C., Hitchcock, A. E., Jacobson, J. S. e Weinstein, L. H.** 1965. Fluoride accumulation and growth of plants exposed to particulate cryolite in the atmosphere. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 23, 1-12.
- Millers, I., Lachance, D., Burkman, W. G. e Allen, D. C.** 1994. North american Sugar Maple Project - cooperative field manual, USDA, Canadian Forest Service: 51.
- Pignatti, S. (ed.)** 1995. *Ecologia vegetale*. UTET, Torino.
- Poli, E.** 1978. Indice fogliare e relativa problematica. *Informatore Botanico Italiano*, 10, 181-187
- Reynolds, E. G.** 1963. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17, 208-212.
- Richards, B. L., Middleton, J. T. e Hewitt, W. B.** 1958. Air pollution with relation to agronomic crops: V. Oxidant stipple of grapes. *Agron. J.*, 50, 559-561.
- Sampson, D. A. e Allen, H. L.** 1995. Direct and indirect estimates of Leaf Area Index (LAI) for lodgepole and loblolly pine stands. *Trees*, 9, 119-122.
- Schirone, B., Scarascia Mugnozza, G. e Valentini, R.** 1985. Osservazioni preliminari sull'indice di area fogliare di *Quercus cerris* L. *Monti e Boschi*, 5, 47-51.
- Schreiber, U. e Bilger, W.** 1987. Rapid assessment of stress effects on plant leaves by chlorophyll fluorescence measurements. In: **Tenhunen, J. D., Catarino, F. M., Lange, O. L., Oechel, W. C.** Plant Response to Stress. NATO ASI Series. Series G. *Ecological Sciences*, Vol. 15, Springer-Verlag, Berlin.
- Shampine, W. J.** 1993. Quality Assurance and Quality Control in Monitoring Programs. *Environmental Monitoring and Assessment*, 26, 143-151.
- Skelly, J. M., Davis, D. D., Merrill, W., Cameron, E. A., Daniel Brown, H., Drummond, D. B. e Dochinger, L. S.** 1987. Diagnosing injury to eastern forest trees. Pennsylvania State University, College of Agriculture, 122.
- Skelly, J. M. e Lame, R. C.** 1974. Diagnosis of air pollution injury to plants. Virginia Polytechnic Institute and State University, Publication 568, 16.

**Skelly, J. M., Krupa, S. V. e Chevone, B. E.** 1979. Field surveys. In: **Heck, W. W., Krupa, S. V. e Linzon, S. N.** (eds.). Handbook of methodology for the assessment of air pollution effects on vegetation, Air Pollution Control Association, Pittsburgh.

**Spurr, A.** 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructural Researches*, 26, 31-43.

**Stenberg, P., Linder, S., Smolander, H. e Flower-Ellis, J.** 1994. Performance of the LAI-2000 plant canopy analyzer in estimating leaf area index of some Scots pine stands. *Tree Physiology*, 14, 981-995.

**Treshow, M.** 1971. Fluorides as air pollutants affecting plants. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 9, 22-43.

**Treshow, M. e Pack, M. R.** 1970. Fluoride. In: **Jacobson, J. S., Hill, A. C.** (eds.). Recognition of air pollution injury to vegetation: a pictorial atlas. Air Pollution Control Association, D1-D17, Pittsburgh.

**Trumbacher, C. e Eckmüllern, O.** 1997. A method for quantifying changes in the epicuticular wax structure of Norway spruce needles. *European Journal of Forest Pathology*, 27, 83-93.

**Wagner, G.** 1995. Basic approaches and methods for quality assurance and quality control in sample collection and storage for environmental monitoring. *The Science of Total Environment*, 176, 63-71.

**Welles, J. M. e Norman J. M.** 1991. Instrument for indirect measurement of canopy architecture. *Agronomy Journal*, 83, 818-825.

### 3.3.4 Organi riproduttivi - Giovanna Puppi Branzi

#### 3.3.4.1 Introduzione

Tra le piante vascolari il ruolo di bioindicatori è assunto soprattutto dalle Angiosperme e Gimnosperme, in relazione alle modalità e ai tempi di comparsa dei loro organi riproduttivi.

Le strutture deputate alla riproduzione sessuata nelle piante superiori sono i fiori: nei fiori infatti si trovano gli stami (in cui si forma il polline, vettore dei gameti maschili) e gli ovuli (sedi di formazione delle oosfere).

Le fioriture appaiono come fenomeni effimeri, per lo più di breve durata e molto variabili nei tempi e nelle entità; tuttavia, a una considerazione più attenta, la comparsa e lo sviluppo dei fiori in una pianta risultano essere eventi tutt'altro che casuali, caratterizzati da un forte determinismo ambientale.

Proprio questo aspetto, delle relazioni tra le modalità di svolgimento delle fioriture e i fattori ambientali (soprattutto astronomici e climatici), è stato oggetto di interesse da parte di botanici e fisiologi vegetali fin dall'inizio di questo secolo, con gli studi ormai classici di Klebs del 1913 e di Garner e Allard del 1920 sul fotoperiodismo.

Il quadro attuale delle conoscenze risulta ormai ben definito nelle sue linee generali, anche se rimane molto ancora da indagare sui meccanismi che presiedono allo sviluppo delle singole specie.

#### 3.3.4.2 *I fattori che determinano la comparsa dei fiori*

Il passaggio dallo stato vegetativo a quello riproduttivo è condizionato principalmente da due fattori ambientali, luce e temperatura.

Nell'induzione della fioritura si verifica una specifica alterazione del modello di sviluppo degli apici vegetativi, da cui consegue la formazione delle gemme a fiore.

Tra gli stimoli ambientali che determinano questi cambiamenti svolgono un ruolo importante le basse temperature e il rapporto tra durata del giorno e della notte: questi segnali possono essere ininfluenti in certe piante, possono agire singolarmente in altre, o essere necessari entrambi per altre ancora.

Molte specie per fiorire necessitano di essere esposte a un periodo di freddo (vernalizzazione), in altre la fioritura ne viene solo accelerata (fabbisogno di freddo facoltativo): le temperature attive e la durata necessaria affinché avvenga lo stimolo variano da specie a specie.

Le caratteristiche dell'alternanza dei periodi di luce e buio giornalieri hanno un ruolo determinante nell'induzione della fioritura in molte specie. In linea generale a questo riguardo si possono distinguere le piante da giorno lungo (longidiurne o LDP), che fioriscono solo se il periodo di luce giornaliero (fotoperiodo) supera una durata minima (lunghezza critica del giorno tipica della specie, e le piante da giorno breve (brevidiurne o SDP), che fioriscono solo se il periodo di luce giornaliero è inferiore a una determinata lunghezza critica. Non tutte le specie di piante però si inseriscono in queste due categorie, esistono infatti piante poco o per nulla sensibili a questo tipo di segnali (neurodiurne o NDP).

Il numero di giorni, o meglio di cicli induttivi, necessari per la fioritura varia da 1 a circa 30, a seconda della specie.

#### 3.3.4.3 *I fattori che determinano il momento di schiusura dei fiori*

Una volta realizzatasi l'induzione fiorale con la formazione delle gemme a fiore, inizia la fase successiva dello sviluppo dei fiori che culmina nell'antesi e cioè nell'apertura dei fiori con la esposizione delle loro parti fertili maschili e/o femminili.

Anche questa parte dello sviluppo antesico si svolge sotto il controllo endogeno, ma è fortemente condizionata anche dai fattori ambientali, tra cui quello più significativo è senz'altro la temperatura.

È di esperienza comune l'osservazione che nelle annate fredde le fioriture ritardano e in quelle calde anticipano, e cioè che la velocità di sviluppo, almeno entro certi limiti, sembra aumentare con la temperatura. Questi concetti intuitivi si possono formalizzare matematicamente, stabilendo per esempio che la velocità di sviluppo sia direttamente proporzionale alla temperatura ambientale: questo semplice modello lineare equivale al modello delle sommatorie termiche che domina ormai da decenni nella letteratura fenologica di base e applicata (Maracchi, 1977; Marletto *et al.*, 1992).

Con questo modello si ipotizza che un determinato evento fenologico avvenga nel momento in cui la pianta ha accumulato una ben precisa quantità di calore, misurata in gradi-giorno.

Nella formula delle sommatorie termiche, solitamente non vengono sommate le semplici temperature medie giornaliere, ma le cosiddette temperature attive e cioè i gradi oltre una certa soglia di temperatura (o temperatura di base); un altro importante parametro del modello è la data di inizio della sommatoria.



La temperatura di base, la data di inizio della sommatoria e la quantità finale di gradi-giorno da accumulare per il raggiungimento di una particolare fenofase sono tre parametri caratteristici di ogni specie.

La fortuna del modello dei gradi-giorno nel campo delle previsioni fenologiche a scopo applicativo, risiede nella sua semplicità, nella facilità di reperimento dei dati di ingresso (la temperatura media giornaliera) e naturalmente nella buona potenzialità predittiva.

Nonostante i modelli gradi-giorno siano dichiaratamente modelli di tipo empirico, e i relativi parametri siano ricavati in modo puramente statistico, si può riconoscere una certa rispondenza con i meccanismi biologici che presiedono allo sviluppo.

È noto infatti che la temperatura controlla la velocità dei processi metabolici e che al di sotto di una certa soglia termica la crescita e lo sviluppo praticamente si arrestano (temperatura di base); inoltre, lo sviluppo dei fiori come si è detto inizia solo dopo l'avvento dell'induzione florale, che a sua volta si verifica a una data precisa, in seguito allo stimolo fotoperiodico e/o alla vernalizzazione (data che potrebbe corrispondere al giorno di inizio delle sommatorie termiche).

#### 3.3.4.4 Fioriture e fattori di stress

Nelle foreste interessate da quei fenomeni di deperimento aspecifico e generalizzato chiamati danni di nuovo tipo si osservano generalmente sintomi a carico di diverse parti delle piante: radici, rami, foglie, fiori e frutti.

I sintomi di deperimento sono stati descritti e classificati per numerose specie sia di ambito continentale che mediterraneo (AA.VV., 1985, 1990; Clauser *et al.*, 1989).

Tra tali sintomi sono elencate anche anomalie degli organi riproduttivi, come fioriture troppo precoci o troppo abbondanti. Si è osservato per esempio che esemplari danneggiati di leccio (*Quercus ilex*) possono presentare un eccesso di produzione di fiori maschili in primavera e, in seguito, un rinnovo quasi totale delle foglie. Nel carpino nero (*Ostrya carpinifolia*) si è osservato un eccesso nella produzione di frutti, unita a una forte defogliazione (Gellini *et al.*, 1992).

Nei pini (specialmente *Pinus pinaster* e *Pinus pinea*) i tipici rami produttori di fiori maschili compaiono inusualmente anche nella parte alta della chioma e negli individui molto giovani.

#### 3.3.4.5 Informazioni deducibili

Possiamo dire dunque che lo sviluppo di una pianta è geneticamente predeterminato, ma viene modificato dalle condizioni ambientali (soprattutto lunghezza del giorno e temperatura), cosicché in pratica sono l'ambiente e l'andamento stagionale a determinare il momento in cui avviene il passaggio dallo stadio vegetativo a quello riproduttivo, la data di inizio e di fine dell'antesi, le quantità di fiori, di polline e di semi prodotti.

La fioritura dunque, come ogni fenomeno biologico caratterizzato da un forte determinismo ambientale, qualora siano ben conosciute le relazioni che intercorrono tra la variabile dipendente (momento oppure entità della fioritura) e le variabili indipendenti (fattori ambientali), si presta a essere usata come sensore o indicatore ambientale, e in particolare come sensibile indicatore bioclimatico.

Inoltre, poiché esistono strette correlazioni tra i comportamenti fenologici di molte

specie, accade che il ritmo antesico di una certa specie (specie guida) possa permettere di prevedere con un certo anticipo l'andamento dello sviluppo in altre specie.

In questo caso si può parlare delle specie guida come di indicatori fenologici, che possono essere usati in svariati settori applicativi (programmazione delle operazioni agricole, allergologia ecc.).

Infine, poiché è noto che situazioni di stress e di disturbo antropico possono generare alterazioni più o meno evidenti del fenomeno antesico (per esempio superfiuriture o altre anomalie nelle specie forestali), effettuando monitoraggi mirati all'eventuale comparsa di tali segnali, è possibile individuare tempestivamente la presenza di situazioni critiche per la vegetazione.

#### 3.3.4.6 *Monitoraggio diretto: fenologia e produzione antesica*

Il ritmo antesico è da tempo memorabile oggetto dell'attenzione dell'uomo, che ha ben presto imparato a collegare la fioritura più o meno precoce di determinate specie di piante (specie guida) con l'andamento stagionale e a trarne pronostici per il successivo sviluppo delle colture.

A questa semplice conoscenza intuitiva oggi possiamo contrapporre una metodologia conoscitiva di tipo scientifico, che si avvale di procedure di rilievo standardizzate, di campionamenti quantitativi, di elaborazioni statistiche dei dati, di modelli interpretativi e previsionali.

Ovviamente l'applicazione del metodo scientifico ha determinato un salto di qualità nell'attendibilità dei dati e delle informazioni che se ne possono trarre.

Per esempio, le relazioni tra ritmi antesici e fattori climatici possono essere formalizzate matematicamente e inserite in modelli numerici: questi hanno il grande vantaggio di consentire la simulazione dei fenomeni antesici in presenza di condizioni diverse da quelle misurate, di effettuare previsioni, di dedurre informazioni climatiche da quelle fenologiche e viceversa, di confrontare il comportamento fenologico tra specie diverse.

In conclusione, il significato indicatore della comparsa dei boccioli o della schiusura dei primi fiori in una specie guida resta il medesimo di un tempo, quello che cambia, in rapporto all'approccio metodologico, è la quantità e qualità di informazioni che si possono estrarre da questi strumenti biologici.

#### 3.3.4.7 *Monitoraggio indiretto: aeropalinologia*

Nelle cenosi forestali sono numerose e abbondanti le specie vegetali con impollinazione di tipo anemofilo: tra le piante legnose come è noto sono anemofile tutte le conifere e intere famiglie di Angiosperme (Fagacee, Betulacee, Corylacee, Ulmacee, Salicacee).

Tali specie producono una grandissima quantità di polline leggero e adatto al trasporto atmosferico, che si riscontra in concentrazioni significative nell'aria anche a distanze di vari chilometri dal luogo d'origine.

La concentrazione pollinica in atmosfera dipende sia dalle condizioni meteorologiche che dal comportamento antesico e dall'abbondanza delle diverse specie nella flora locale.

Per questi motivi ci si può avvalere delle analisi sulla quantità e qualità del polline aerodiffuso per ricavarne informazioni generali sulla composizione e sullo stato fenologico della vegetazione di un territorio.

In particolare si suggerisce l'utilizzo di questo metodo indiretto di monitoraggio territoriale per alcuni obiettivi.

*Valutazione indiretta dell'abbondanza di una specie in un territorio e dell'entità delle relative fioriture.* La quantità di polline prodotto ed emesso da una specie dipende strettamente dalla quantità totale di fiori prodotti: questa, a sua volta, dipende dalla densità delle piante nel territorio e dalla quantità media di fiori per pianta. Le concentrazioni di polline in atmosfera dunque, dopo opportune tarature, possono essere un buon indice della densità delle specie anemofile di un territorio; inoltre il confronto tra dati raccolti in annate successive consente di valutare l'intensità media delle fioriture di ciascuna annata e di evidenziare eventuali tendenze del fenomeno in relazione a fattori climatici e stress ambientale.

*Valutazione indiretta dello stato fenologico di singole specie o generi.* Le concentrazioni in aria di granuli pollinici sono strettamente dipendenti dall'andamento della fioritura delle piante produttrici. Questo metodo indiretto permette di effettuare stime dell'andamento fenologico di singole specie o di gruppi di specie (generi) in vasti ambiti territoriali, in alternativa alla rilevazione diretta degli stadi fenologici. La precisione delle stime viene aumentata se si tiene conto delle vicende meteorologiche e della distribuzione delle piante sorgente nel territorio. Questa tecnica può permettere di rivelare in tempo utile su base giornaliera lo stato di fioritura di vaste aree territoriali senza l'intervento di operatori in campo.

#### 3.3.4.8 Metodo d'uso

*Metodi di rilievo fenologico.* In base alla ormai consolidata esperienza nazionale e internazionale in questo campo (Puppi Branzi in Schirone, 1989) si può giungere alla definizione di una metodologia generale di rilevamento, che segue criteri standard, e alla quale poi possono essere apportate modifiche e aggiustamenti in relazione alla particolare situazione da affrontare.

*Stazioni di rilevamento.* I rilievi devono essere eseguiti in siti scelti secondo criteri ben definiti, in modo tale che siano rappresentativi del territorio da monitorare. Quello della programmazione delle stazioni di rilevamento è un punto molto importante a cui spesso non si attribuisce sufficiente attenzione: in caso di territori disomogenei (zone montuose o collinari) bisognerebbe aver cura di scegliere le stazioni in modo che rappresentino il più possibile gli estremi delle variazioni ambientali (per esempio le quote più alte e quelle più basse, le esposizioni meridionali e settentrionali ecc.). Le stazioni di rilevamento devono essere aree omogenee per topografia e fisionomia vegetazionale, e di estensione sufficiente per ottenere rilievi rappresentativi della variabilità fenologica delle singole specie (orientativamente 50-100 m<sup>2</sup> per i prati, 100-300 m<sup>2</sup> per le praterie arbustate e i cespuglieti, 200-400 m<sup>2</sup> per i boschi). Per ogni stazione è consigliabile compilare una scheda informativa generale contenente i dati stazionali e note sull'ambiente, da utilizzare poi nell'elaborazione e interpretazione dei dati.

*Numero di individui per specie.* Le rilevazioni fenologiche vanno effettuate sui singoli individui di ogni specie. Il numero di piante da osservare per stazione dipende dal comportamento fenologico della specie e dalla precisione che si vuole ottenere. In linea di massima sono sufficienti da qualche unità a qualche decina di individui per specie (da 5 a 25 individui per le piante legnose e da 20 a 80 individui per le erbacee).

*Periodicità dei rilievi.* I rilievi devono essere ripetuti nella medesima stazione con periodicità settimanale o al massimo decadale, durante tutto il periodo di fioritura e/o fruttificazione: in caso di fioriture a decorso rapido può essere necessario un controllo bisettimanale.

*Procedura di rilievo.* Il rilevamento fenologico consiste nell'identificazione della fase fenologica (fenofase) in cui si trova l'individuo in osservazione. Le fenofasi da rilevare sono descritte in una apposita chiave di rilevamento: tra le diverse chiavi disponibili in letteratura la più diffusa nel nostro paese è senz'altro quella proposta dal prof. Marcello (1935). I rilievi fenologici vengono usualmente registrati su schede di rilevamento appositamente allestite.

#### 3.3.4.9 Metodologia di rilievo aerobiologico

Le misure delle concentrazioni polliniche vengono effettuate mediante campionamenti svolti in stazioni fisse oppure mobili, con l'impiego di apparecchiature (impattore volumetrico di tipo Hirst) già largamente utilizzate come standard internazionale nel settore dell'aerobiologia (Mandrioli, 1977; AA.VV., 1994).

Sui campioni così ottenuti vengono eseguiti identificazioni e conteggi di polline: i risultati dei conteggi vengono poi trasformati in valori di concentrazione atmosferica.

Questo tipo di metodica è già ampiamente sperimentata anche in Italia ed è documentata da una vasta bibliografia internazionale e nazionale, sia a livello generale che applicativo.

#### 3.3.4.10 Discussione

*Indicatori bioclimatici.* Come si è detto, le fenofasi dello sviluppo antesico sono strettamente determinate dall'andamento delle temperature nelle settimane (o mesi) precedenti la fioritura, e in particolare dall'accumulo di una determinata quantità di calore, indicata come sommatoria dei gradi giorno. Quindi l'osservazione dei tempi di fioritura degli individui di una o più specie, diffuse in un'area territoriale, offre la possibilità di determinare le caratteristiche termiche dell'area stessa.

L'utilizzo dei sensori biologici, in aggiunta alle stazioni meteorologiche strumentali, è giustificato dalla necessità di estendere la rete di rilevazione in modo capillare sul territorio. Gli strumenti biologici infatti presentano alcuni vantaggi rispetto a quelli convenzionali: nessuna spesa di installazione, giacché le piante sono già presenti in abbondanza in tutti i territori, né tanto meno problemi e spese di manutenzione.

I limiti dei sensori biologici sono altrettanto evidenti:

- l'errore strumentale in questo caso è piuttosto elevato (variabilità biologica) e quindi non è possibile utilizzare questi mezzi per misure di precisione;
- il tipo di informazioni deducibili riguarda particolari parametri climatici: si misura infatti l'integrale di una curva termica relativa a periodi di settimane o di mesi (a seconda della specie) e non la temperatura istantanea, come fanno invece i termometri convenzionali.

#### 3.3.4.11 Specie guida come indicatori fenologici

Le previsioni fenologiche si possono effettuare essenzialmente con due sistemi:

- con modelli fenoclimatici che utilizzano come dati di ingresso le variabili meteorologiche (per esempio sommatorie termiche);

- con modelli fenologici che utilizzano specie guida.

Il secondo sistema è preferibile, a livello territoriale, quando si disponga di una rete di stazioni meteorologiche troppo rada.

L'utilizzazione di specie guida per prevedere il verificarsi di particolari fenofasi in altre piante importanti per l'uomo (piante coltivate, specie allergogene ecc.) è una pratica già più volte sperimentata (Wielgolaski in Lieth, 1974).

Alla previsione si giunge dopo uno studio preliminare volto a individuare eventuali correlazioni tra il ritmo fenologico delle piante bersaglio e quello di un gruppo di presunte specie indicatrici.

I criteri di scelta delle specie guida riguardano sia le caratteristiche biologiche che la loro distribuzione territoriale (Puppi Branzi in Schirone, 1989).

È ovvio che la previsione sarà tanto più affidabile quanto più sono simili i meccanismi che controllano lo sviluppo nella specie indicatrice e nella specie bersaglio: per esempio non è consigliabile scegliere una specie brevidiurna per prevedere la fioritura di una neotridiurna oppure utilizzare la data di emissione delle foglie per prevedere una fioritura.

Inoltre la precisione della stima decresce con la distanza temporale tra i due eventi.

Se si intende poi effettuare stime a livello territoriale, è importante scegliere le specie guida tra quelle più capillarmente diffuse nel territorio.

#### 3.3.4.12 Anomalie delle fioriture e stress ambientali

I ritmi fenologici delle specie componenti una comunità sono il risultato di un ben preciso equilibrio tra fattori biotici e abiotici, ed è evidente che forti perturbazioni che possano rompere questo equilibrio avranno conseguenze a cascata su tutta la comunità.

Possibili anomalie nei cicli vegetativi o riproduttivi delle specie dominanti del bosco possono essere la spia della rottura di questo equilibrio e perciò vanno seguite e studiate con molta attenzione.

Nei nostri boschi si può osservare saltuariamente l'insorgenza di fenomeni definibili come anomali: in particolare sono noti da tempo casi di fioriture fortemente anticipate o ripetute nel corso dello stesso anno, superfioriture ecc.

Questi fenomeni sono molto interessanti dal punto di vista della bioindicazione, pur tenendo presente la necessità di separare gli effetti delle normali fluttuazioni meteorologiche da quelli eventualmente causati dalle sostanze inquinanti.

Per fare ciò è necessario avere una buona conoscenza di base della situazione e cioè conoscere in modo preciso le relazioni tra fattori meteorologici, ritmi fenologici e produzione di fiori delle singole specie. Solo dopo aver ricostruito un quadro preciso della normalità sarà possibile sapere se le anomalie rilevate sono effettivamente manifestazioni patologiche oppure se si possono ricondurre a casi pur estremi, ma nell'ambito della normalità.

#### 3.3.4.13 Aerobiologia

L'uso di metodi indiretti di monitoraggio fenologico comporta di per se una minor precisione nelle stime, rispetto ai metodi diretti, ciononostante ci sono situazioni e condizioni in cui può risultare più conveniente il monitoraggio indiretto.

La scelta del metodo più opportuno va valutata caso per caso; in ogni modo qui presentiamo una breve rassegna delle caratteristiche dei due diversi approcci messe a confronto.

- a) Stazioni di rilievo: i rilievi aerobiologici richiedono l'installazione di un campionario per stazione, in una collocazione adeguata (lontano da ostacoli, sopraelevato di alcuni metri rispetto al suolo, con alimentazione elettrica e con necessità di un controllo settimanale); una stazione aerobiologica, se correttamente ubicata, è rappresentativa di un territorio molto vasto (di parecchi chilometri di raggio); d'altra parte i rilievi fenologici non richiedono installazione di apparecchiature, però, le stazioni fenologiche hanno valenza spaziale molto ristretta (in territori collinari o montuosi ogni punto di rilievo rappresenta un intorno di poche decine o centinaia di metri).  
È quindi evidente che il lavoro svolto da una sola stazione aerobiologica corrisponde spazialmente a quello di numerose stazioni fenologiche; inoltre, la prima fornisce dati medi sulla rispettiva area territoriale, mentre le altre forniscono dati puntiformi.
- b) Personale tecnico: il monitoraggio aerobiologico richiede l'intervento di uno o pochi tecnici, altamente qualificati per la lettura dei campioni; il monitoraggio fenologico richiede l'intervento di più rilevatori di campo, ma non necessariamente specializzati (è sufficiente un breve addestramento).
- c) Dati: i dati aeropalinologici solitamente non arrivano a un elevato dettaglio sistematico (per lo più si giunge all'identificazione del genere o anche solo della famiglia), mentre il rilievo fenologico richiede l'esatta identificazione della/e specie indagata/e.

#### 3.3.4.14 Esempi

*Indicatori bioclimatici.* L'uso di piante in fiore come indicatori bioclimatici ha ormai una lunga tradizione che ha le sue radici in Europa.

Tra gli studi più significativi è doveroso ricordare i numerosi contributi dei ricercatori tedeschi e svizzeri, tra cui innanzitutto le carte bioclimatiche della Germania meridionale (Ellenberg, 1956) e della Svizzera (Schreiber, 1977): in questi Paesi, i servizi meteorologici nazionali e regionali (Primault, 1984; Freitag *et al.*, 1986) gestiscono reti di rilevamento fenologico e si avvalgono anche di questi dati per completare il quadro climatico del proprio territorio.

Per quanto riguarda l'Italia, sono stati svolti alcuni studi di cartografia fenologica bioclimatica a scala di dettaglio nella provincia di Bologna (Puppi Branzi, 1993).

*Specie guida come indicatori fenologici.* In questo campo operano singoli ricercatori, istituti sperimentali e settori della ricerca applicata all'agricoltura, organizzazioni nazionali e internazionali, come la rete europea dei Giardini Fenologici Internazionali IPG (alla quale anche l'Italia ha recentemente aderito), associazioni scientifiche, come la Società Botanica Italiana (SBI).

La ricerca più recente è rivolta soprattutto alla realizzazione di modelli previsionali che consentano di valorizzare al massimo la potenzialità indicatrice predittiva delle specie guida (Wielgolaski in Lieth, 1974; White, 1979; Marletto *et al.*, 1992).

*Anomalie delle fioriture e stress ambientali.* Le ricerche sulle anomalie riproduttive causate da inquinamento e stress ambientale si sono sviluppate in Italia solo di recente, soprattutto nell'ambito di studi forestali (Clauser *et al.*, 1989; Gellini, 1991; Schirone, 1992); si tratta, come si è detto, di un argomento estremamente interessante, che merita di essere approfondito, in cui però non si hanno ancora a disposizione dati sufficienti a formare un quadro organico della situazione.

*Aerobiologia*. Il settore degli studi aerobiologici si è sviluppato in tempi relativamente recenti: il primo manuale in cui viene presentata una trattazione organica di questa disciplina è stato pubblicato poco più di trenta anni fa (Gregory, 1961).

Da allora le ricerche aerobiologiche si sono diffuse anche in Italia e oggi sono ormai numerosi i gruppi di specialisti impegnati con successo in questo campo. Il nostro paese inoltre, può vantare una delle più collaudate e fitte reti di monitoraggio aerobiologico d'Europa; il coordinamento di questa rete è tenuto dall'Associazione Italiana di Aerobiologia (AIA), che cura la diffusione dei bollettini del polline, pubblica periodici e rapporti con la sintesi dei dati raccolti dalla rete, organizza congressi, seminari e corsi di aggiornamento.

Anche in questo settore la modellistica ha assunto un ruolo sempre più importante: per esempio per effettuare stime della quantità di polline prodotto e liberato da una specie in un certo territorio (Puppi Branzi *et al.*, 1992), oppure della sua dispersione in atmosfera (Okubo *et al.*, 1989; Di Giovanni *et al.*, 1989).

## Bibliografia

AA.VV. 1985. Diagnosi e classificazione dei nuovi danni subiti dalle foreste, 1985. Ed. Speciale CEE.

AA.VV. 1990. Osservazione dei danni in specie forestali mediterranee, 1985. Ed. Speciale CEE.

AA.VV. 1994. Monitoraggio aerobiologico in Emilia-Romagna. Contributi n. 30, Regione Emilia-Romagna - USSL 31, Ferrara.

Clauser, F., Gellini, R., Bussotti, F., Cenni, E. e Bottacci, A. 1989. New types of damage to forest trees typical of the the Mediterranean region. *Eur. J. For. Path.*, 19, 78-83.

Di Giovanni, F., Beckett, P. M. e Flenley, J.R. 1989. Modelling of dispersion and deposition of tree pollen within a forest canopy. *Grana*, 28, 129-139.

Ellenberg, H. 1956. Wuchsklimakarte von Sudwest-Deutschland: 1/200.000, Stuttgart.

Gellini, R. 1991. I danni di nuovo tipo nei boschi italiani. In: Ferrari e Bagnaresi (ed.): I boschi italiani- Società Pro Montibus et Sylvis, Bologna, 85-96.

Gellini, R., Bussotti, F. e Grossoni, P. 1992. Forest damage and environmental monitoring. *Aerobiologia*, 8, 102-108.

Gregory, P. H. 1961. The microbiology of the atmosphere. Ed. Wiley and sons, NY.

Klante, B. 1986. Syntetische phanologische Karten. *Arboreta Phaenologica, Offenbach a. M.*, 31, 97-102.

Lieth, H. (ed.) 1974. Phenology and seasonality modeling. *Ecological Studies n. 8*, Springer, NY.

Mandrioli, P. 1977. Tecniche di campionamento nelle misure aerobiologiche. *Inf. Bot. Ital.*, 9 (3), 320-323.

Maracchi, G. 1977. Modelli matematici in fenologia. *Informatore botanico Italiano*, 9, 306-312.

Marcello, A. 1935. Nuovi criteri per le osservazioni fitofenologiche. *Nuovo Giorn. Bot. Ital.*, 42, 543-556.

Marletto, V., Puppi Branzi, G. e Sirotti, M. 1992. Forecasting flowering dates of lawn species with air temperature: application boundaries of the linear approach. *Aerobiologia*, 8, 75-83.

Okubo, A. e Levin, S. 1989. A theoretical framework for data analysis of wind dispersal of seeds and pollen. *Ecology*, 70 (2), 329-338.

Primault, B. 1986. Phanologie. In: Kirchofer *et al.*: Klimaatlas der Schweiz. Bundesamt für Landestopographie, Wabern-Bern.

**Puppi Branzi, G.** 1993. La fioritura del nocciolo nella valle del Reno rivela la struttura del campo termico invernale. *AER*, 2, 9-12.

**Puppi Branzi, G. e Zanotti, A. L.** 1992. Estimate and mapping of the activity of airborne pollen sources. *Aerobiologia*, 8 (1), 69-74.

**Schirone, B.** (ed.) 1989. Metodi di rilievo e di rappresentazione degli stadi fenologici. Quaderni metodologici IPRA, n. 12, Roma.

**Schirone, B. e Codipietro, G.** 1992. Periodicity

and aperiodicity in the flowering rhythm of trees. Atti Congresso AIA Habitat e Salute, Montecatini Terme, 211-216.

**Schreiber, K. F. et al.** 1977. Les niveaux thermiques de la Suisse. Dep. Fed. de Just. et Pol., Berne, 69.

**White, L.** 1979. Relationship between meteorological measurements and flowering of index species to flowering of 53 plant species. *Agric. Meteorol.*, 20, 189-204.

### 3.4 Vegetali vascolari - Giuseppe Belli e Guido Violini

#### 3.4.1 Introduzione

L'utilizzo delle piante vascolari come bioindicatori dell'inquinamento ambientale risale alla metà di questo secolo, cioè all'epoca in cui, soprattutto nel Nord-America e nell'Europa centro-settentrionale, ci si incominciò a preoccupare seriamente dei fenomeni derivanti da un'industrializzazione e un'urbanizzazione sempre più spinte. Oggigiorno, nonostante i notevoli progressi registrati nel rilevamento strumentale, il biomonitoraggio basato sull'impiego di determinate specie vegetali mantiene e anzi accresce tutta la sua importanza, sia sotto il profilo scientifico che applicativo.

I principali vantaggi apportati da tale tipo di monitoraggio, nei confronti di quello strumentale, possono essere sintetizzati come segue:

- costi limitati di allestimento e di gestione;
- possibilità di coprire in modo capillare territori vasti e diversificati;
- possibilità di evidenziare l'effetto combinato su organismi viventi (le piante) di più agenti inquinanti contemporaneamente presenti (gli strumenti analitici rilevano soltanto gli inquinanti per i quali sono stati predisposti).

Quest'ultimo aspetto è di particolare rilevanza in quanto mette in evidenza i danni biologici che possono subire gli organismi viventi (uomo compreso), causati da una situazione reale di inquinamento ambientale.

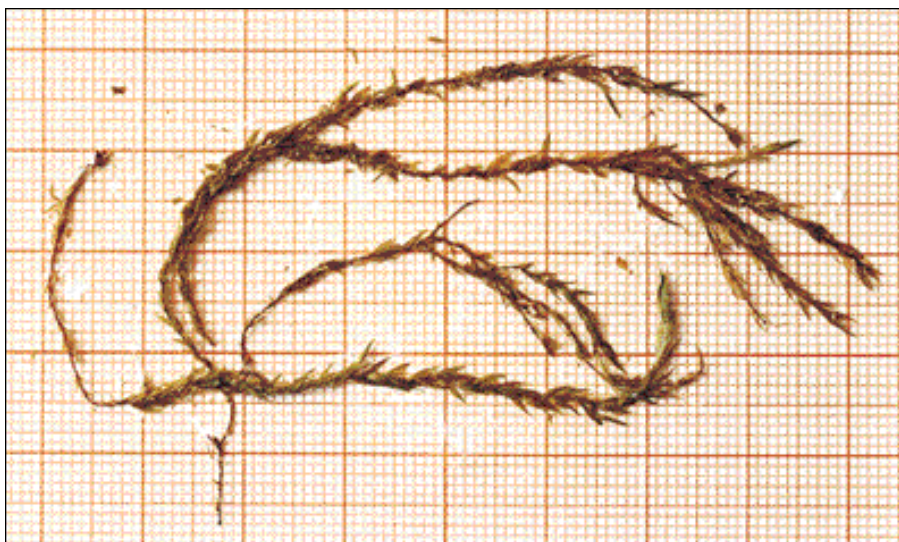
È utile ricordare che quando si parla di piante indicatrici (o piante spia) si intendono quelle piante che rispondono, con sintomi evidenti e possibilmente caratteristici, all'azione di uno o più agenti inquinanti. È noto infatti che esistono anche piante accumulatrici, capaci cioè di accumulare nei propri tessuti specifici inquinanti, i quali però devono poi essere evidenziati mediante apposite analisi di tipo chimico. In questo capitolo ci occuperemo essenzialmente delle prime, ossia delle piante indicatrici propriamente dette. In particolare, focalizzeremo la trattazione

(il testo continua a pag. 161 dopo le tavole a colori)





**Figura 3.1** - *Hypnum cupressiforme* è un muschio che viene utilizzato in numerosi studi sull'accumulo di metalli pesanti per la sua elevata resistenza agli inquinanti atmosferici (foto M. Aleffi).



**Figura 3.2** - *Fontinalis antipyretica* è una specie comunemente utilizzata negli studi di biomonitoraggio attivo e passivo delle acque, in quanto è facilmente reperibile nei corsi d'acqua sia di pianura che di montagna (foto C. Allegrini).



**Figura 3.3** - Una griglia di misurazione dell'IAP applicata su un esemplare isolato di *Fraxinus sp.* in uno studio effettuato sulla città di Camerino (MC) (foto M. Aleffi).



**Figura 3.4** - *Orthotrichum sp.* è una tipica briofita epifita che si incontra frequentemente nei rilievi per la valutazione dell'IAP (foto M. Aleffi).



**Figura 3.9** - Foglie di *Medicago sativa* con evidenti lesioni da  $O_3$ .

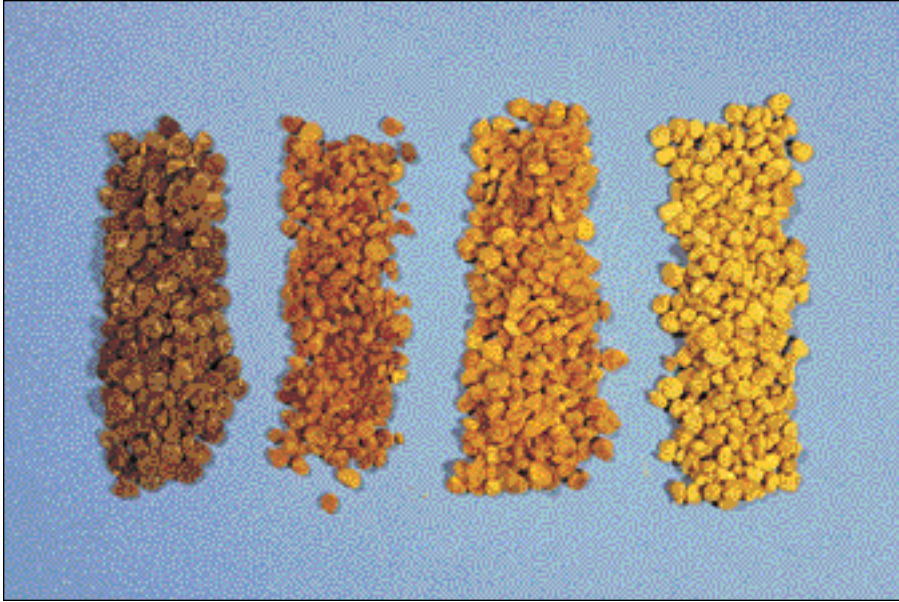


**Figura 3.10** - Giovane piantina di tabacco cv. Bel-W3 con caratteristiche lesioni da  $O_3$ .



**Figura 3.13** - Danni da inquinanti atmosferici su foglie di *Prunus serotina*.





*Figura 4.7 - Granuli di polline di differente origine botanica.*



*Figura 4.8 - Mielì liquidi multiflorali; le diverse sfumature di colore testimoniano la differente origine botanica.*

sull'uso delle piante come indicatori di inquinamento atmosferico, poiché è soprattutto in questo ambito che esse sono state sperimentate e utilizzate. Vale la pena, tuttavia, ricordare che non mancano esempi di esperienze (alcune delle quali tuttora in corso) di utilizzo delle piante anche come indicatori dell'inquinamento del suolo o delle acque. Essendo però alquanto limitata la casistica finora disponibile in questi ultimi settori, riteniamo prematuro fornire indicazioni in argomento.

### 3.4.2 Informazioni deducibili

Le informazioni che si possono dedurre attraverso l'impiego di piante indicatrici sono molteplici; tuttavia le principali, che normalmente più interessano, riguardano:

- a) la segnalazione della presenza di inquinanti;
- b) l'indicazione di uno specifico inquinante;
- c) la possibilità di valutare il livello o l'intensità dell'inquinamento.

#### a) Segnalazione della presenza di inquinanti

È indubbiamente il dato più generico e meno specifico, ma d'altra parte è quello di fondamentale importanza in quanto costituisce il primo segnale di allarme di una situazione anomala da esaminare poi in modo più approfondito. È proprio per questo tipo di informazione che le piante indicatrici si rivelano particolarmente utili in quanto, come si è detto, a differenza dei rilevatori strumentali, possono segnalare situazioni di stress dovute all'azione sinergica di più inquinanti che, singolarmente, potrebbero anche essere presenti in dosi non pericolose.

#### b) Indicazione di uno specifico inquinante

Anche per questo tipo di informazione le piante indicatrici manifestano la loro utilità: sono diverse infatti le specie che reagiscono in modo caratteristico all'azione di determinati inquinanti. Basti ricordare le tipiche risposte sintomatologiche, trattate dettagliatamente nei prossimi paragrafi, date dalla cv. Bel W-3 di tabacco all'inquinamento da ozono, da diverse cultivar di gladiolo e di vite ai composti del fluoro, da diverse cultivar di erba medica ai composti dello zolfo (SO<sub>2</sub> in particolare). La relativa facilità con cui queste piante possono essere allevate e dislocate in siti numerosi ne accresce l'utilità.

#### c) Valutazione dell'intensità dell'inquinamento

Anche questa informazione può essere, in alcuni casi, fornita dalle piante indicatrici ma, ovviamente, non potrà mai essere precisa e cronologicamente dettagliata come quella che si può ottenere da una apposita strumentazione. Tuttavia, come vedremo, sono state messe a punto scale di sensibilità e di danno che, in varie esperienze, hanno permesso di ottenere dati altamente utili e interessanti.

### 3.4.3 Metodologia

Condizione indispensabile per poter ottenere informazioni valide e attendibili dall'utilizzo delle piante indicatrici è l'adozione di una corretta e rigorosa metodologia. Nell'ambito di questa esigenza di carattere generale occorre evidenziarne una specifica e di fondamentale importanza: la necessità che coloro i quali operano con questo tipo di bioindicatori abbiano una solida formazione fitopatologica. Non si deve infatti di-

menticare che la risposta data dalle piante all'azione degli inquinanti è una risposta di tipo sintomatologico e quindi in molti casi confondibile con risposte simili dovute ad altre cause come agenti patogeni, insetti, carenze idriche o nutrizionali, sbalzi termici ecc. Soltanto chi possiede una buona dimestichezza con le sintomatologie determinate dalle diverse possibili cause può discernere con sicurezza quelle dovute agli agenti inquinanti.

Volendo andare più in dettaglio, l'aspetto metodologico va trattato diversamente a seconda degli scopi che si prefigge il biomonitoraggio. Infatti, riprendendo le distinzioni fatte in precedenza, la metodologia è diversa a seconda che si voglia accertare l'esistenza o meno di fenomeni di inquinamento oppure che si voglia verificare la presenza di un determinato inquinante o determinarne il livello.

#### *Rilevazione di fenomeni di inquinamento*

Quando lo scopo del biomonitoraggio è quello di verificare se in una data zona vi siano o meno fenomeni di inquinamento atmosferico, si possono seguire due diverse metodologie che, d'altra parte, possono essere entrambe adottate con il vantaggio di ottenere un maggior numero di informazioni. La via più immediata e di più facile adozione è quella di esaminare attentamente lo stato della vegetazione presente in zona osservando, sia a distanza che da vicino, il maggior numero possibile di specie legnose ed erbacee e rilevando quali e quante manifestino difficoltà di crescita, rami spogli, foglie rade o deformi ed eventualmente con chiazze clorotiche o necrotiche più o meno estese. Queste e altre possibili alterazioni vanno confrontate con lo stato vegetativo delle medesime specie presenti in altre zone, ritenute esenti da fenomeni di inquinamento. Se lo stato di sofferenza è generalizzato e manifesto sulla totalità o quasi delle specie presenti, è doveroso accertarsi che la causa non sia un terreno inadatto per carenza di determinati elementi nutritivi o per frequente aridità o altro.

La seconda via che si può seguire, eventualmente in aggiunta o a completamento della precedente, è quella di allevare sul posto un certo numero di specie-spia, ognuna delle quali sia sensibile a uno o più inquinanti, in modo da disporre di un'ampia gamma di indicatori certi.

Questa seconda via richiede indubbiamente un maggiore impegno organizzativo in quanto occorre predisporre per tempo le piante da utilizzare, in numero sufficiente per coprire diversi punti della zona considerata. Inoltre, al fine di evitare possibili interferenze delle diverse composizioni dei suoli, sarà bene allevare le piante in vaso, in terriccio adatto e a composizione nota e costante. Ovviamente ci si dovrà preoccupare di una periodica e sufficiente somministrazione idrica e della difesa delle piante da possibili attacchi parassitari. Vi è poi da aggiungere che, se si impiegano specie o cultivar che rispondono in maniera sintomatica anche a bassi livelli di inquinamento, sarà necessario allevare inizialmente le piante in una serra dotata di un adeguato sistema di filtrazione dell'aria, per poter mantenere le piante in un ambiente privo di inquinanti fino al momento della loro dislocazione nel sito definitivo.

Il controllo periodico delle piante indicatrici permetterà di rilevare l'eventuale comparsa di sintomi attribuibili a uno o più inquinanti.

Per maggiori dettagli metodologici (distribuzione delle piante spia, numero delle eventuali ripetizioni ecc.) si rimanda a quanto viene esposto nel punto 3.3.3 del Capi-

tolo 3 (Foglie) mentre, per la scelta delle specie vegetali da utilizzare come piante spia si rimanda al paragrafo che segue.

*Individuazione dell'inquinante (o degli inquinanti)*

Per questo scopo sono di grande utilità le diverse piante indicatrici che nel corso degli ultimi decenni sono state sperimentate dai ricercatori di vari paesi. Ovviamente, se una specie indicatrice o spia dell'inquinante indagato è già naturalmente presente nell'ambiente in esame, il lavoro diventa più semplice. In caso contrario, sarà necessario allevare sul posto le specie ritenute idonee a evidenziare un dato inquinante e bisognerà adottare quegli accorgimenti di carattere tecnico (innaffiature, difesa dai parassiti ecc.) ai quali si è accennato nel paragrafo precedente.

Inoltre è buona norma disporre di piante di controllo, ossia di piante allevate in ambiente sicuramente esente dall'inquinante o dagli inquinanti considerati. A questo scopo si prestano ottimamente le serre o le celle in cui sia possibile immettere aria filtrata e privata dell'inquinante in questione come, per esempio, le cosiddette OTC (dalla dizione inglese *Open-Top Chamber*), ossia piccole strutture cilindriche in alluminio ricoperte lateralmente di un telo in PVC e fornite di un ventilatore dotato di filtri per l'immissione dell'aria depurata. Tali strutture si possono impiegare in pieno campo e anche sovrapporre a colture in atto. Qui di seguito elenchiamo le piante spia più adatte a rilevare la presenza di alcuni importanti inquinanti atmosferici, descrivendo brevemente la sintomatologia che su di esse si manifesta. Per ulteriori notizie e approfondimenti rimandiamo alla bibliografia citata alla fine del capitolo.

---

#### **FLUORO e derivati**

- *Gladiolus gandavensis* (cv. Snow Princess): clorosi seguita da rapida necrosi delle porzioni distali delle foglie;
- *Vitis vinifera* (diverse cultivar): clorosi e necrosi fogliari a partire dai margini;
- *Prunus armeniaca* (diverse cultivar): necrosi dei margini fogliari.

---

#### **ANDRIDE SOLFOROSA (SO<sub>2</sub>)**

- *Medicago sativa* (diverse cultivar): clorosi fogliari internervali, tendenti spesso al biancastro e a evoluzione necrotica;
- *Trifolium repens* (diverse cultivar): clorosi e necrosi internervali.

---

#### **OZONO (O<sub>3</sub>)**

- *Nicotiana tabacum* (cv. Bel-W3): numerose piccole chiazze tondeggianti, clorotiche e quindi necrotiche, sparse sulla lamina fogliare;
- *Spinacea oleracea* (cv. Subito e Dinamo): necrosi fogliari estese, prevalentemente internervali;
- *Medicago sativa*: aree dapprima clorotiche e poi necrotiche, prevalentemente internervali o lungo i margini delle foglie (figura 3.9, vedi tavole a colori).

---

#### **CLORO e derivati**

- *Medicago sativa*: clorosi e necrosi su aree marginali e internervali delle foglie.

---

#### **OSSIDI DI AZOTO (NO<sub>x</sub>)**

- *Spinacea oleracea*: necrosi fogliari internervali.

---

#### **PEROSSIACETILNITRATO (PAN)**

- *Urtica urens*: "bronzatura" di estese aree fogliari.
-

*Valutazione dell'intensità dell'inquinamento*

Il dato che viene fornito dal bioindicatore è generalmente riferito alla dose dell'inquinante cumulata per il periodo di esposizione. Gli strumenti analitici, invece, sono in grado di fornire in continuo anche il valore della concentrazione dell'inquinante. Va però considerato che da un punto di vista biologico il danno risulta particolarmente correlato proprio alla dose cumulata. A livello di comunità scientifica internazionale, sono stati indicati i livelli critici per i principali inquinanti, cioè il limite al di sopra del quale le piante manifestano effetti negativi (sintomi visibili o riduzione di biomassa). Questi valori critici sono espressi proprio come dose cumulata, considerando solo i valori eccedenti determinate soglie di concentrazione, al di sotto delle quali si stima che l'inquinante non abbia effetti sulla pianta e, si presume, neppure sull'uomo.

Uno dei tipi più conosciuti e utilizzati di biomonitoraggio consiste nell'impiego della *cultivar* americana di tabacco Bel-W3. Le foglie di tale *cultivar* hanno una particolare sensibilità all'inquinamento da ozono, che si manifesta con la comparsa di tipiche necrosi tondeggianti, inizialmente puntiformi, a partire dalla pagina superiore (figura 3.10, vedi tavole a colori). La risposta si verifica già a concentrazioni molto basse dell'inquinante (intorno a 0,04 - 0,05 ppm per 4-5 ore) e la percentuale di area fogliare necrotizzata risulta correlata alla dose di ozono assorbito dalla pianta.

In sintesi, la metodologia prevede di allevare le piante in vaso (in ambiente depurato dall'ozono e a temperatura di circa 25°C) e di trasferirle, dopo circa due mesi, nei siti da monitorare. Piante di una *cultivar* di tabacco resistente all'ozono (come Bel-B), sono di norma incluse tra il gruppo di piante bioindicatrici al fine di avere una prima conferma dell'eziologia delle lesioni fogliari. A cadenza settimanale si valuta lo stato fitosanitario delle foglie e per ciascuna di esse si stima la percentuale di area fogliare necrotizzata (figura 3.11).

Gli indici di danno fogliare (IDF) registrati settimanalmente vengono utilizzati per il calcolo dell'evoluzione settimanale del danno fogliare.

L' IDF è dato dalla formula:

$$IDF = \frac{\sum_{n=N}^{n-1} (D_t - D_{t-1})}{N}$$

dove  $D_t$  è il valore di danno fogliare (secondo la scala arbitraria utilizzata) attribuito a ogni foglia alla fine della settimana,  $D_{t-1}$  la classe di danno all'inizio della settimana,  $n$  è il numero progressivo di foglia dal basso verso l'alto e  $N$  il numero complessivo di foglie vive sia al tempo  $t$  che al tempo  $t-1$  (può accadere, infatti, che una foglia si sviluppi o dissecchi e cada durante la settimana considerata). Non vengono prese in considerazione le foglie che nella settimana precedente avevano riportato lesioni superiori al 10%. Questa limitazione è dovuta al fatto che, sebbene le lesioni da ozono compaiano sulle foglie di tabacco circa 24 ore dopo l'esposizione all'inquinante, nel corso di una settimana si può verificare un incremento del danno fogliare dovuto non all'inquinante ma allo sviluppo delle lesioni che si estendono dalle zone della lesione originaria ai tessuti adiacenti. Escludendo dal calcolo dell'IDF le foglie con una superficie fogliare danneggiata superiore al 10%, l'incidenza degli errori dovuti a questo fenomeno risulta molto ridotta (Ashmore *et al.*, 1980).



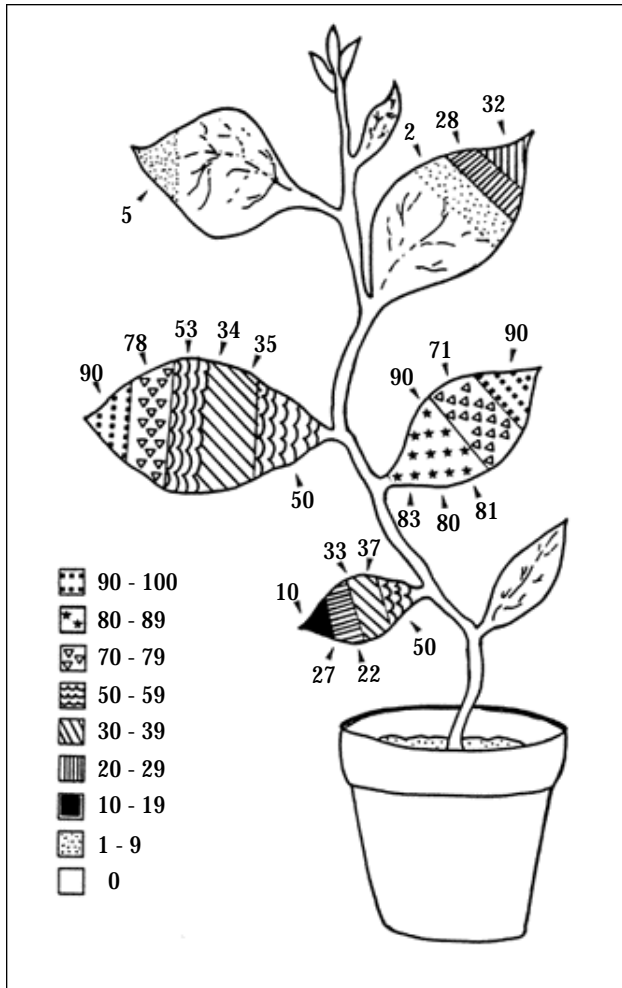


Figura 3.11 - In *Nicotiana tabacum* l'età e lo stadio di sviluppo della foglia determinano una differente distribuzione dei sintomi da ozono. In figura sono mostrate varie classi di danno fogliare espresso come percentuale di area fogliare danneggiata (ridisegnato da Lorenzini et al., 1986).

Con l'ausilio di opportune equazioni, per mezzo dell'indice di danno fogliare è possibile stimare la dose di ozono settimanale alla quale le piante sono state esposte e il numero di ore nelle quali è stato superato un determinato valore soglia (per esempio quello fissato dalla normativa). Inoltre è possibile, allestendo una stazione di biomonitoraggio in prossimità di una centralina di monitoraggio, confrontare gli indici di danno fogliare con l'andamento delle concentrazioni dei principali inquinanti e dei parametri meteorologici (Biondi et al., 1992).

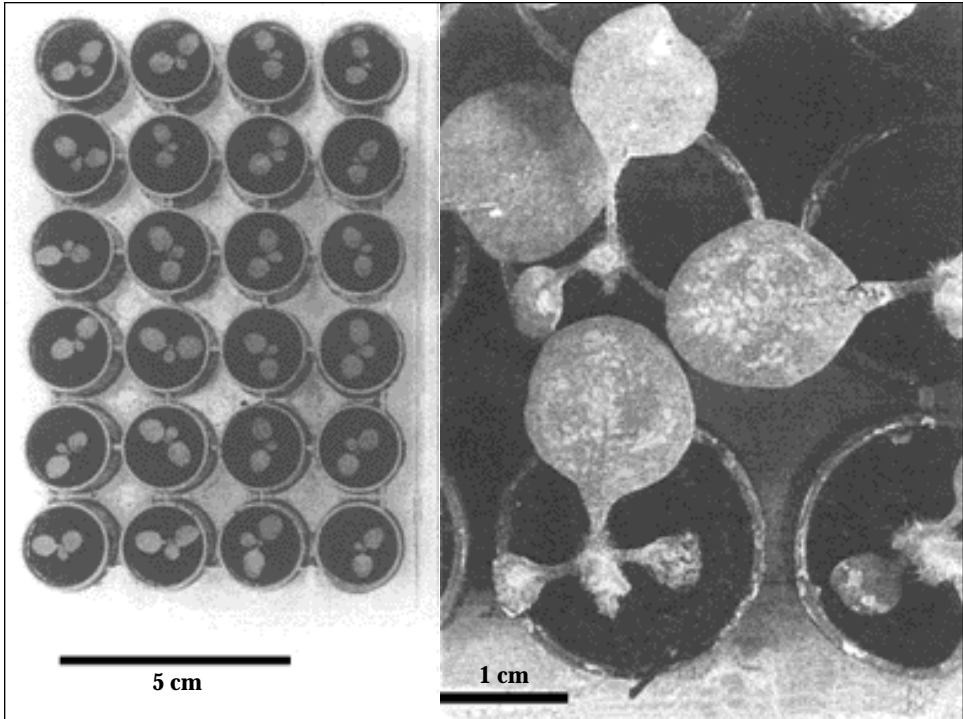


Figura 3.12 - Kit miniaturizzato di piantine di *Nicotiana tabacum* cv. Bel-w3 per il biomonitoraggio dell'ozono. A sinistra il kit pronto per essere esposto nei siti da monitorare. A destra, particolare delle tipiche lesioni fogliari provocate dall'ozono (modificato da Lorenzini, 1994).

Sempre per l'ozono, recentemente è stato proposto un kit miniaturizzato di piante di tabacco Bel-W3, che rende ancora più rapida e semplice la metodologia di biomonitoraggio (Lorenzini, 1994). Sfruttando la risposta all'ozono delle foglie cotiledonari e della prima fogliolina è possibile utilizzare piante di tabacco molto giovani (una settimana di età). Il sistema è stato standardizzato e brevettato, e il kit risulta di dimensioni molto ridotte e di facile trasporto e impiego (figura 3.12).

#### 3.4.4 Esempi

Ormai numerosi sono gli esempi di campagne di biomonitoraggio condotte sia localmente (a livello comunale o comprensoriale), che su scala regionale o anche nazionale. Tra gli esempi di biomonitoraggio in cui sono state utilizzate piante indicatrici (escludendo quindi gli esperimenti di bioaccumulo), si possono segnalare, per i necessari approfondimenti, quelli riportati in tabella 3.5, premettendo che l'elenco suddetto non può essere aggiornato su tutte le sperimentazioni effettuate.

Un interessante approccio metodologico al biomonitoraggio è quello che prevede la ricerca e l'impiego di specie bioindicatrici per i siti forestali utilizzando arbusti poliennali. Particolarmente interessante appare la possibilità di impiego di una specie

Ambito geografico	Inquinanti monitorati	Specie indicatrice	Riferimento
Milano	O <sub>3</sub>	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3	Biondi <i>et al.</i> , (1992).
Bologna	O <sub>3</sub> , Pb	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3, <i>Lolium multiflorum</i>	Antognoni <i>et al.</i> , (1995).
Piacenza	O <sub>3</sub>	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3	Bettassa <i>et al.</i> , (1996).
Costa e isole Toscane	O <sub>3</sub>	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3	Lorenzini <i>et al.</i> , (1985).
Toscana	O <sub>3</sub>	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3	Lorenzini <i>et al.</i> , (1986).
Lombardia	O <sub>3</sub>	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3	Schenone <i>et al.</i> , (1988).
Toscana	O <sub>3</sub> F metalli	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3 <i>Gladiolus gandavensis</i> ; <i>Lolium perenne</i>	
Toscana	O <sub>3</sub> , N, S, metalli	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3; <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Quercus ilex</i> .	Ferretti <i>et al.</i> , (1992).
Umbria	O <sub>3</sub>	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3	Mercorelli S., (1992).
Copenhagen	O <sub>3</sub>	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3	Ro-Poulsen <i>et al.</i> , (1981).
Olanda	O <sub>3</sub>	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3	Posthumus (1976).
Gran Bretagna	O <sub>3</sub>	<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bel-W3	Ashmore <i>et al.</i> , (1980).

Tabella 3.5 - Esempi di applicazione del biomonitoraggio basato sull'impiego di piante indicatrici.

molto diffusa, come *Prunus serotina*, che mostra frequentemente una sintomatologia fogliare molto simile a quella che si ottiene esponendo le piante a ozono in condizioni controllate (Skelly *et al.*, 1996) (figura 3.13, vedi tavole a colori).

I vantaggi derivanti dall'impiego per il biomonitoraggio di specie poliennali e con un vasto areale naturale di diffusione sono evidenti e consentirebbero di superare alcuni problemi intrinseci al biomonitoraggio con specie erbacee annuali, quali il continuo rinnovo delle piante o la difficoltà di impiego in zone climatiche che non siano quelle caratteristiche della specie in questione (si pensi al difficile impiego del tabacco in montagna).

### 3.4.5 Considerazioni conclusive

Da quanto esposto in precedenza emergono chiaramente le possibilità e i vantaggi offerti dall'impiego delle piante quali bioindicatori dell'inquinamento atmosferico. Vale la pena comunque di aggiungere qualche ulteriore considerazione, mettendo in evidenza anche qualche punto critico del sistema di biomonitoraggio considerato. Uno di questi deriva certamente dalla constatazione che, mentre sono note diverse specie spia che reagiscono con sintomi caratteristici a certi inquinanti (come

SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, composti del fluoro e altri), non se ne conoscono di altrettanto valide per la segnalazione di altri inquinanti (come CO, NO e altri). Inoltre, mentre è generalmente ben rilevabile nelle piante indicatrici l'effetto *acuto* prodotto in tempi brevi da concentrazioni elevate di inquinante (in conseguenza, per esempio, di un'improvvisa emissione di fluoro o di SO<sub>2</sub> da un impianto industriale), risulta spesso meno marcato l'effetto *cronico* dovuto all'azione prolungata di un inquinante presente in concentrazioni modeste.

Tuttavia anche questi punti deboli possono essere superati quando l'impiego delle piante viene visto come integrazione e completamento del monitoraggio strumentale, che è poi la situazione più auspicabile.

Tra l'altro, ai molteplici vantaggi offerti dall'uso delle piante come bioindicatori, ai quali si è accennato nell'introduzione di questo capitolo, ne vanno aggiunti altri due, vale a dire:

- il fatto che le piante rispondono a distanza di alcuni giorni all'azione dell'inquinante fa sì che esse siano in grado di segnalare un fenomeno di inquinamento verificatosi vari giorni prima, magari improvvisamente, quando forse nessun rilevatore strumentale era in funzione;
- la manifestazione di sintomi di sofferenza può essere osservata anche dal comune cittadino e può quindi avere un notevole valore educativo (si pensi, per esempio, agli alunni delle scuole).

Sarebbe quindi auspicabile che gli enti locali (Comuni, Province, Regioni) prestassero maggiore attenzione alla possibilità di utilizzare le piante come bioindicatori dell'inquinamento ambientale.

## Bibliografia

Antognoni, F., Bregoli, A. M., Scaramagli, S., Rossini, P., Badini, L., Trevissoi, E., Ercoli, L. e Bagni, N. 1995. Plant biomonitoring of air pollutants in the Bologna urban area. *Agricoltura Mediterranea Spec.Vol.*, 181-188.

Ashmore, H. R., Bell, J. N. e Relly, C. I. 1980. The distribution of phytotoxic ozone in the British Isles. *Environmental Pollution*, 1, 195-216.

Bettassaa, T. e Robotti, A. 1996. Valutazione della presenza di ozono mediante l'impiego di bioindicatori. *Acqua-Aria*, febbraio, 175-178.

Biondi, F., Mignanego, L. e Schenone, G. 1992. Correlation between environmental parameters and leaf injury in *Nicotiana tabacum* L. cv. 'Bel-W3'. *Environmental Monitoring and Assessment*, 22, 73-87.

Ferretti, M., Cenni, E., Pisani, B., Righini, F.,

Gambicorti, D., De Santis, P. e Bussotti, F. 1992. Biomonitoraggio di inquinanti atmosferici: un'esperienza integrata nella Toscana costiera. *Acqua-Aria*, 8, 747-758.

Fumagalli, I. e Mignanego, L. 1995. Il biomonitoraggio dell'ozono: un esempio di sperimentazione in Lombardia. In: L'inquinamento da ozono. Fondazione Lombardia per l'Ambiente, I manuali, 29, 103-111.

Heggstad, H. E. 1991. Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environmental Pollution*, 74, 264-291.

Lorenzini, G. 1983. Le piante e l'inquinamento dell'aria. Edagricole, Bologna.

Lorenzini, G. 1992. Plants as biomonitors of air quality. In: Bonotto, S., Nobili, R. e Revoltella,

- R.P.** (eds.). Biological indicators for Environmental Monitoring. Serono, Symposium Review, 27, 47-63.
- Lorenzini, G.** 1994. A miniaturized kit for ozone biomonitoring. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 48, 1-4.
- Lorenzini, G. e Panattoni, A.** 1986. An integrated, physico-chemical and biological survey of atmospheric ozone in coastal Tuscany, Italy. *Patologia Vegetale*, S IV, 22, 130-164.
- Lorenzini, G., Guidi, L. e Panattoni, A.** 1988. Valutazione dei livelli e degli effetti di inquinanti atmosferici con l'impiego di indicatori biologici. *Acqua-Aria*, 3, 289-302.
- Lorenzini, G. e Grossoni, P.** 1993. Effetti dell'inquinamento atmosferico sulla vegetazione. *Atti dell'Accademia dei Georgofili*, settima serie, vol. XL, 379-406.
- Lorenzini, G., Nali, C. e Biagioni, M.** 1995. Long range transport of photochemical ozone over the Tyrrhenian Sea demonstrated by a new miniaturized bioassay with ozone-sensitive tobacco seedlings. *The Science of the Total Environment*, 166, 193-199.
- Mercorelli, S.** 1992. Valutazione della presenza di ozono troposferico nel versante narnese della conca ternana mediante l'uso di *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel-W3. *Biologia Ambientale*, 6, 5-14.
- Mezzetti, A., Bonaga, G., De Santis, A. e Forzezza, F.** 1987. Inquinamento atmosferico e vegetazione. Edagricole, Bologna.
- Posthumus, A. C.** 1976. The use of higher plants as indicators for air pollution. In: **Krenlampi, L.** (ed.). The Netherlands Proceed Kuopio Meeting on Plant damages caused by air pollution, 110-120.
- Ro-Poulsen, H., Andersen, B., Mortensen, L. e Moseholm, L.** 1981. Elevated ozone levels in ambient air in and around Copenhagen (Denmark) indicated by means of tobacco indicator plants. *Oikos*, 36, 171-176.
- Schenone, G. e Mignanego, L.** 1988. Monitoraggio biologico dell'ozono in Lombardia: risultati preliminari. *Acqua-Aria*, 9, 1085-1090.
- Skelly, J. M. e Innes, J. L.** 1996. Investigations of ozone-induced injury in forest of southern Switzerland: combining field surveys with open-top chamber experiments. Abstract of International Meeting: Stress factors and air pollution, Firenze 14-19 settembre, 142.



# Capitolo 4

## Bioindicatori a livello di organismi animali

Maurizio G. Paoletti, Luciano Süs, Paola Girgenti, Riccardo Groppali,  
Sergio Frugis, Luciano Bani, Luciana Bottoni,  
Lorenzo Fornasari, Renato Massa, Carlo Alberto Redi,  
Silvia Garagna e Maurizio Zuccotti

#### 4.1 Anellidi (Programma Lombri CD-ROM) - Maurizio G. Paoletti

I lombrichi italiani, circa 90 specie, interagiscono positivamente nei suoli con le piante, sia in pieno campo che in orti e giardini; sono organismi utili e spesso fondamentali nel riciclo dei materiali organici quali radici morte e lettiere e nella loro trasformazione in composti umici e nutrienti facilmente assimilabili dalle piante.

Ai lombrichi Charles Darwin ha dedicato un intero libro in cui li nobilita tra i fattori di maggiore importanza per la creazione e lo sviluppo dei suoli. Alla fine del XVII secolo Vincenzo Tanara, bolognese, principe degli agronomi, segnalava la loro importanza come indicatori di fertilità dei suoli coltivati. I lombrichi risultano quindi essere gli organismi del suolo più largamente usati come bioindicatori.

Il programma "Lombri" è stato realizzato per la classificazione dei lombrichi adulti (con clitello) sinora segnalati nel territorio italiano. L'utilizzo prevalente del mouse, l'applicazione di disegni e fotografie rendono l'impiego del programma molto semplice e intuitivo. Il software è stato sviluppato con Microsoft Access, un sistema di gestione di database relazionale per Microsoft Windows. Le immagini provengono da un archivio fotografico di materiale vivo o fissato in alcool, gestito con un programma scritto in Visual Basic per rendere più veloce la visualizzazione delle fotografie.

Per ciascuna specie sono stati memorizzati i principali caratteri tassonomiche che ne per-

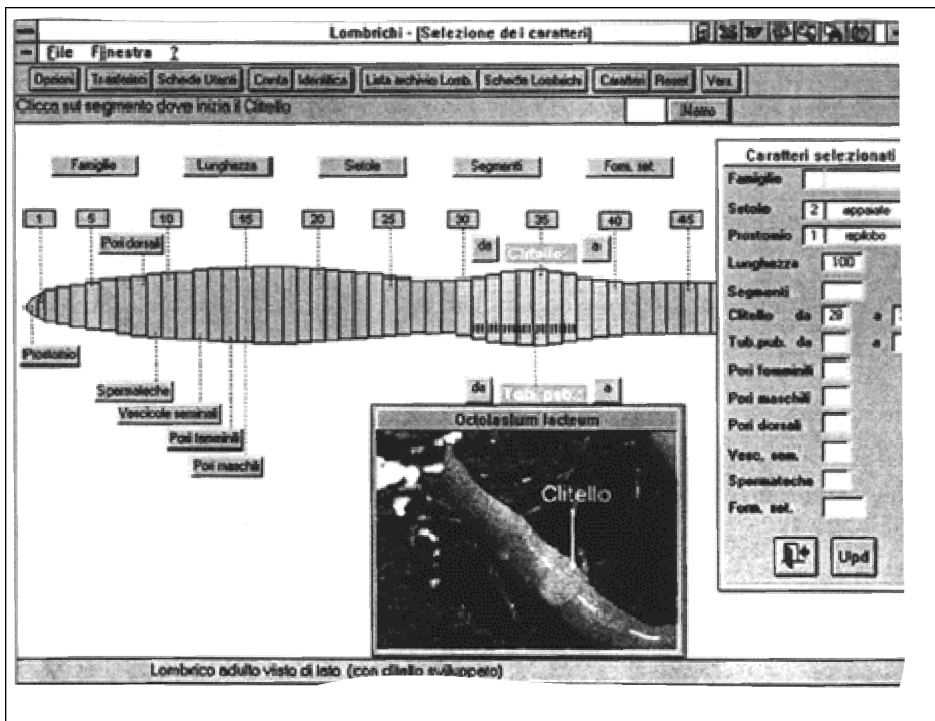


Figura 4.1 - Prima schermata del Programma Lombri.





Figura 4.2 - *Eophila tellini*

mettono l'identificazione. Per esaminare il materiale fissato occorre un microscopio binoculare stereoscopico 20-40 ingrandimenti o una buona lente contafili 20-30 ingrandimenti.

Si possono distinguere quattro fasi del programma.

#### *Identificazione*

Tutte le scelte sono guidate da etichette che specificano i diversi caratteri. Con un "clic" del mouse vengono mostrate, in modo schematico, le varie opzioni da selezionare, in alcuni casi compare una fotografia del particolare. Una volta impostati uno o più caratteri, utilizzando la funzione [Conta], si ottiene il numero di specie di lombrichi a cui corrisponde la combinazione di scelte effettuate. In tal modo è possibile, in modo iterativo, introducendo altri caratteri di selezione, pervenire a un numero di specie relativamente ristretto.

A questo punto, utilizzando la funzione [Identifica], si perviene alla lista in dettaglio delle specie selezionate.

Un percorso ottimale prevede le seguenti scelte:

- lunghezza in mm (esemplare fissato in alcool);
- posizione delle setole;
- forma del prostomio (visto dorsalmente);
- segmento di inizio e fine del clitello;
- inizio e fine dei tubercoli della pubertà;

- posizione del primo poro dorsale, formula setigera e altri caratteri anatomici sono richiesti in alcuni casi quali *Octodrilus*.

#### *Archivio fotografie*

Da diversi punti del programma è possibile accedere all'archivio delle fotografie e visualizzare le foto delle specie considerate. In questo archivio sono memorizzate fino a un massimo di nove foto per ogni specie, che ne illustrano le caratteristiche e l'ambiente. Complessivamente, le specie che presentano almeno una foto o un disegno sono trentadue.

#### *Archivio lombrichi*

In questo archivio sono memorizzati tutti i caratteri per ogni specie. Due finestre in particolare illustrano il contenuto dell'archivio. La prima, a forma di scheda, permette di modificare o inserire eventuali nuove specie. La seconda, a forma di lista, permette alcune funzionalità molto utili di selezione, di confronto e di ordinamento della specie.

#### *Archivio utenti*

Questo archivio è predisposto per accogliere dati personali degli utenti. Mentre si opera nella fase di identificazione di un lombrico, nella finestra "Selezione dei caratteri" si può decidere di salvare i caratteri digitati in una scheda personale nell'archivio utenti. A questo scopo basterà cliccare sulla funzione [Trasferisci], che apre una nuova scheda nell'archivio utenti, dove verranno trasferiti automaticamente i dati già digitati, da integrare con gli ulteriori campi evidenziati per il completamento della scheda.

#### **Requisiti hardware e software richiesti:**

- Microprocessore Pentium 100 Mhz;
- RAM 12 Mb;
- HD 10 Mb disponibili;
- CD-ROM 4 vel.;
- Windows 3.1 o superiore.
- Per ulteriori informazioni, rivolgersi a:  
Maurizio G. Paoletti e/o Carlo Gradenigo, Dip. di Biologia, Via U. Bassi 58/b,  
Università degli Studi di Padova. Tel. 049/8276304-5. Fax 049/8276300-8072213.  
E-mail: paoletti@civ.bio.unipd.it  
Web Site: <http://www.bio.unipd.it/agroecology/>

## **4.2 Insetti** - Luciano Süß e Paola Girgenti

Caratterizzati da un numero sterminato di specie, in grado di adattarsi alle più ostiche situazioni, molti insetti possono essere utilizzati come indicatori ambientali. Può sembrare banale ricordare come la proliferazione della mosca domestica sia un indice di abbondante presenza di residui organici e di sudiciume in genere, che consente a miriadi di larve di brulicare rapidamente; l'osservazione di alcune specie di zanzare in un parco cittadino segnala che gli alberi hanno vistose "carie" entro le quali si evolvono le forme giovanili, mentre la cattura di altre specie della stessa famiglia indica che

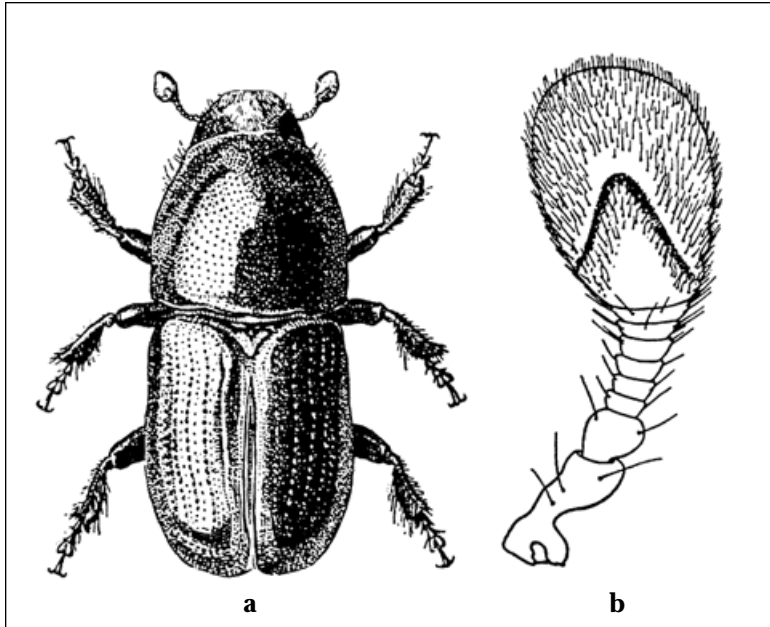


Figura 4.3 - Il Coleottero Scolitide *Scolytus scolytus* (F.): a, adulto; b, antenna del Coleottero Scolitide *S. multistriatus* (Marsh) (da Schwenke, 1974).

esistono nelle vicinanze acque stagnanti, ricche di sostanza organica. Le capacità di individuazione dei siti preferenziali da colonizzare sono determinate dal gran numero e dalla straordinaria attività dei sensilli di cui tutti gli insetti sono provvisti, sensibilità indubbiamente superiore a quella degli altri animali, nonché dalla possibilità di spostarsi, attivamente o favoriti dalle correnti d'aria, anche a distanze considerevoli.

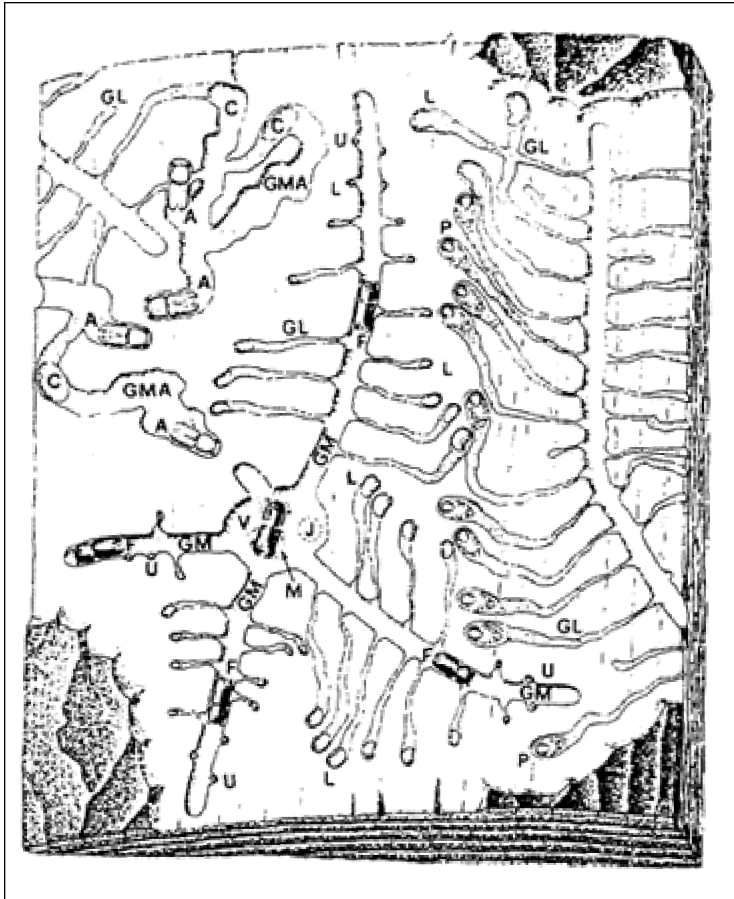
È evidente che il problema più grave, per l'utilizzo degli insetti come bioindicatori, è dato dalla primaria esigenza della loro esatta classificazione, per lo più opera di specialisti, spesso purtroppo mancanti, non solo sul territorio nazionale. Solo dopo un'attenta diagnosi sistematica si può risalire all'etologia degli insetti con cui ci si trova a che fare e diventa, quindi, possibile utilizzarli convenientemente.

Partendo da tali premesse, qui di seguito vengono esposti tre casi di particolare significato, per i quali le conoscenze sono al momento più approfondite e, di conseguenza, più facilmente applicabili.

#### 4.2.1 Gli Scolitidi come indicatori dello stato di salute della vegetazione

##### 4.2.1.1 Introduzione

Negli ecosistemi di foresta, e anche in campo agrario, gli Scolitidi sono tra i Coleotteri più importanti per gli ingenti danni procurati e spesso assumono un ruolo non trascurabile, che ne ha fatto oggetto di indagini mirate principalmente alla lotta. Negli ultimi decenni, tuttavia, grazie alla loro prodigiosa capacità di individuare e attaccare le pian-



**Figura 4.4** - Schema delle gallerie scavate da uno Scolitide del genere *Pityogenes* Bedel all'interno di un tronchetto di conifera. Al centro, avvio di un sistema di gallerie di proliferazione stellare raggiato; J, foro d'ingresso; M, maschio; F, femmina; U, uovo; L, larva in vari stadi di sviluppo; P, pupa; C, celletta pupale; A, adulto immaturo; V, vestibolo o camera nuziale; GM, galleria materna; GL, galleria larvale; GMA, galleria di maturazione (da Servadei et al., 1972).

te sofferenti, sono diventati argomento di ricerche volte a correlare lo studio quali-quantitativo dell'entomofauna "xilofaga" con lo stato di salute della vegetazione.

#### 4.2.1.2 Cenni di biologia

Si tratta di insetti di piccole dimensioni (raramente raggiungono i 5 mm di lunghezza), di forma cilindrica e compatta, con antenne genicolate e generalmente clavate e un protorace molto sviluppato (figura 4.3).

Il capo è spesso caratterizzato da un breve e tozzo rostro che li rende simili ai Coleotteri Curculionidi. Le larve sono apode.

Anche se esistono specie che si sviluppano nei semi, nei frutti e nelle essenze erbacee, la maggior parte degli Scolitidi trascorre gran parte della sua esistenza all'interno di un substrato legnoso in cui trova cibo e riparo, scavandovi gallerie a raggiera. Questi insetti sono perciò considerati xilofagi, in quanto si nutrono di "sostanze ottenute da strutture vegetali durevoli non riproduttive e dunque più o meno lignificate" (Masutti, 1985), costituite essenzialmente da lignina, cellulosa ed emicellulosa.

Il foro di ingresso, o galleria di penetrazione, è praticato di solito dalla femmina, mentre il maschio collabora provvedendo a eliminare i residui. Le elitre di questi insetti, infatti, sono spesso conformate in modo tale da poter essere utilizzate come pale. Appena sotto la corteccia, è realizzata (di norma dal maschio), una camera nuziale o vestibolo, dove avviene l'accoppiamento e da cui si dipartono una o più gallerie materne secondo il tipo di nucleo familiare (monogamo o poligamo) proprio di ciascuna specie. Ai lati di queste gallerie le femmine scavano nicchie o diverticoli per l'ovideposizione, dalle quali inizieranno le gallerie larvali, perpendicolari a quelle materne (figura 4.4). In molte specie, che vivono nei tessuti più interni, gli stadi preimmaginali possono invece essere riuniti in un vano comune.

L'impupamento avviene solitamente in apposite cellette. Gli adulti, appena sfarfallati, scavano nuove gallerie dove si completa la maturazione degli organi riproduttivi; in talune specie questa fase delicata si compie all'esterno, a spese di gemme e di cortecce tenere più ricche di nutrienti.

Il sistema di gallerie di proliferazione, costante nel modello base, per lo meno a livello dei generi, è uno degli indizi che consentono di identificare i diversi Scolitidi. Occorre però fare una distinzione fra quelli "corticicoli", che colonizzano prevalentemente i tessuti più esterni dell'albero, in particolare il floema, e i "lignicoli" veri e propri che penetrano più in profondità aggredendo il legno (o xilema). Questi ultimi, che vivono a spese di un substrato molto povero di sostanze nutritive, hanno generalmente bisogno, per completare il loro sviluppo, di funghi simbionti (tabella 4.1).

#### 4.2.1.3 Ecologia degli Scolitidi

Sono stati distinti due gruppi di Scolitidi in funzione della capacità di attaccare o meno piante apparentemente sane: le specie dette primarie possono aggredire gli alberi in piena salute, le secondarie evitano gli alberi sani preferendo i tronchi abbattuti e i soggetti malati già danneggiati dagli insetti primari. Tra le primarie ricordiamo *Ips typographus* L. (impropriamente noto come "Bostrico delle foreste"), *Polygraphus polygraphus* L., *Pityogenes chalcographus* L., *Cryphalus piceae* Ratz., e così via; tra le secondarie *Dryocoetes autographus* Ratz., *D. hectographus* Reit., *Hylurgops glabratus* Zet. ecc.

Tuttavia, studi più approfonditi sui parametri che servono a valutare le condizioni fisiologiche delle piante (come la pressione osmotica dei liquidi cellulari, la pressione di emissione delle oleoresine, la velocità di salita della linfa ecc.) hanno permesso di concludere che non esistono vere e proprie specie primariamente dannose, per lo meno nelle regioni a clima temperato, e che gli Scolitidi individuano le piante vulnerabili molto prima che il deperimento si manifesti in modo evidente.

<b>Scolitidi</b>	<b>Disposizione delle gallerie materne</b>	<b>Specie</b>	<b>Note</b>
<b>Corticicoli</b>	Longitudinale (parallela all'asse maggiore dell'albero) semplice doppia	<i>Blastophagus piniperda</i> L. <i>Ips typographus</i> L.	1 maschio + 2 femmine
	Trasversa (perpendicolare all'asse maggiore dell'albero) semplice doppia	<i>Scolytus intricatus</i> Ratz. <i>Blastophagus minor</i> Htg.	
	Stellare (tipica di specie poligame) a bracci longitudinali a bracci trasversali raggiata	<i>Ips acuminatus</i> Cyll. <i>Pityokteines vorontzovi</i> Jac. <i>Pityogenes chalcographus</i> L.	
	Familiare a piazzuola a falsa stella	<i>Cryphalus piceae</i> Ratz.	raggi rappresentati da gallerie larvali, non da materne
<b>Lignicoli</b>	a dilatazione progressiva	<i>Dendroctonus micans</i> Kug.	attività trofica delle larve su di un fronte unico
	A gradini	<i>Trypodendron lineatum</i> Ol.	nicchie di ovideposizione di forma regolare e costante
	A biforcazioni complanari al cunicolo d'ingresso	<i>Xyleborus monographus</i> F.	
	A loculo comune e a dilatazione progressiva	<i>Xyleborus dispar</i> F. <i>Xyleborus saxexenii</i> Ratz.	sviluppatate nelle 3 dimensioni

Tabella 4.1 - Principali schemi delle gallerie di proliferazione (da Servadei et al., 1972).

Gli Scolitidi presenti in Italia, infatti, attaccano di preferenza le conifere, in particolare del genere *Pinus*, aggredendo non soltanto piante palesemente malate o danneggiate (dal fuoco, dal vento, dal gelo, da attacchi di insetti defogliatori ecc.), ma anche piante in apparenza ancora vigorose, indebolite però da malattie fungine, siccità o fattori di stress come l'inquinamento aereo.

Le piante sofferenti emettono, com'è noto, uno spettro di sostanze volatili alterato (in particolare i composti terpenici presenti nelle resine), riflesso di corrispondenti disfunzioni fisiologiche, che gli adulti di questa famiglia di insetti sono in grado di percepire con sensibilità di gran lunga superiore a qualunque strumento umano disponibile. La presenza, nonché il numero e il tipo di specie raccolte, forniscono perciò utili indicazioni al ricercatore sullo stato della vegetazione.

#### 4.2.1.4 Tecniche di raccolta, conservazione e studio

La cattura degli Scolitidi può essere effettuata a vista esaminando i tronchi degli alberi, in particolare di quelli abbattuti o sofferenti, soprattutto laddove la corteccia si presenta sollevata, utilizzando una pinzetta o un aspiratore. Gli adulti possono essere catturati anche utilizzando trappole a feromone (come quelle cilindriche o a radiatore) utili per il monitoraggio delle singole specie. Ceppi e tronchi, che attirano gli insetti in procinto di riprodursi, possono essere usati per approntare trappole.

La determinazione della specie si basa, oltre che sulla conformazione delle caratteristiche gallerie, sull'esame degli adulti catturati, essendo le larve di più difficile identificazione.

Gli esemplari, uccisi con acetato di etile, sono spillati direttamente nell'elitra destra, se di dimensioni sufficientemente grandi, o incollati su di un cartoncino di dimensioni opportune in modo tale da consentire la visione dei caratteri distintivi legati all'addome e agli apparati riproduttori. Le specie più piccole possono essere eventualmente conservate in alcool etilico a 70°.

Le chiavi dicotomiche, necessarie per distinguere le larve degli Scolitidi da quelle di altri Coleotteri, sono state predisposte da Bright (1991); mentre per l'identificazione degli adulti rimandiamo a Grüne (1979).

## Bibliografia

**Bright, D. E.** 1991. In: **Stehr, F. W.** (ed.). *Immature insects*, 2. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa, USA.

**Chararas, C.** 1962. *Étude biologiques des Scolytides des Conifères*. Lechevalier, Paris.

**Chinery, M.** 1987. *Guida agli insetti d'Europa*. F. Muzzio, Padova.

**Grüne, S.** 1979. *Handbuch zur Bestimmung*

*der europäischen Borkenkäfer*. M. Verlag e H. Schaper, Hannover.

**Masutti, L.** 1984. *Insetti xilofagi nell'ambiente urbano*. Atti del 1° Convegno: Entomologia urbana per la qualità della vita. Accademia Nazionale Italiana di Entomologia, Milano, 9-25.

**Servadei, A., Zangheri, S. e Masutti, L.** 1972. *Entomologia generale e applicata*. Cedam, Padova, 611-626.

## 4.2.2 Chironomidi come indicatori della qualità delle acque

### 4.2.2.1 Introduzione

I Chironomidi sono Ditteri comuni, spesso presenti in grande quantità, con diffusione pressoché ubiquitaria e possibilità di vivere in ambienti molto diversificati (figura 4.5).

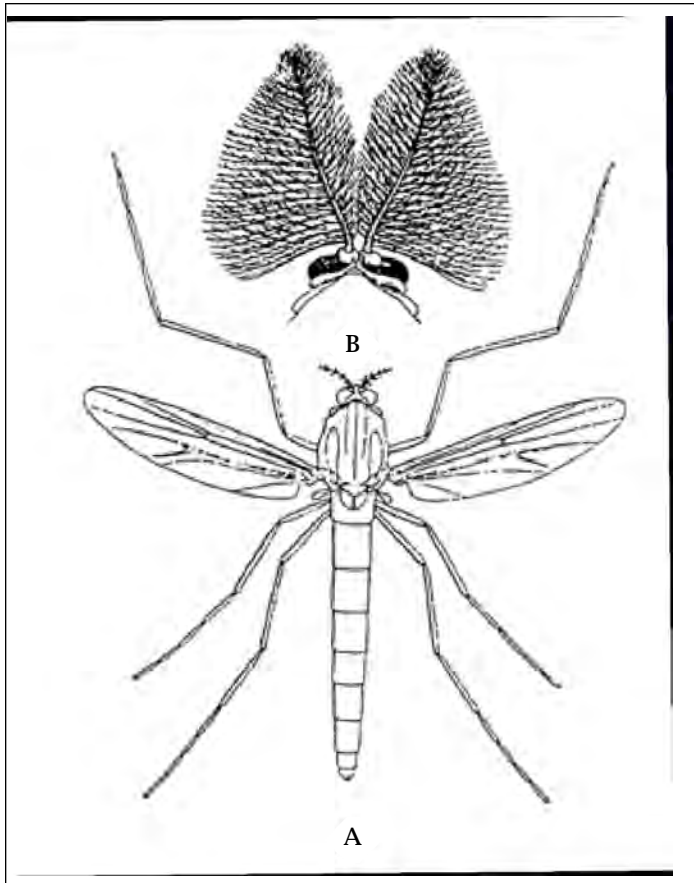


Figura 4.5 - Chironomide adulto: A, femmina; B, capo del maschio con le vistose antenne piumose (da Grandi, 1951).

La maggior parte è caratterizzata da larve viventi nell'acqua, sia dolce che più o meno salmastra, altre prediligono sostanze vegetali in decomposizione. Dai laghi di montagna ai ruscelli e ai fiumi, dalle risaie alle cave abbandonate, dalle piscine alle condutture dell'acqua potabile, alle lagune, le diverse specie di questa famiglia traggono possibilità di sostentamento. I Chironomidi sono avvantaggiati, nei riguardi della maggior parte degli insetti, dalla caratteristica di possedere emoglobina nell'emolinfa; ciò consente di vivere



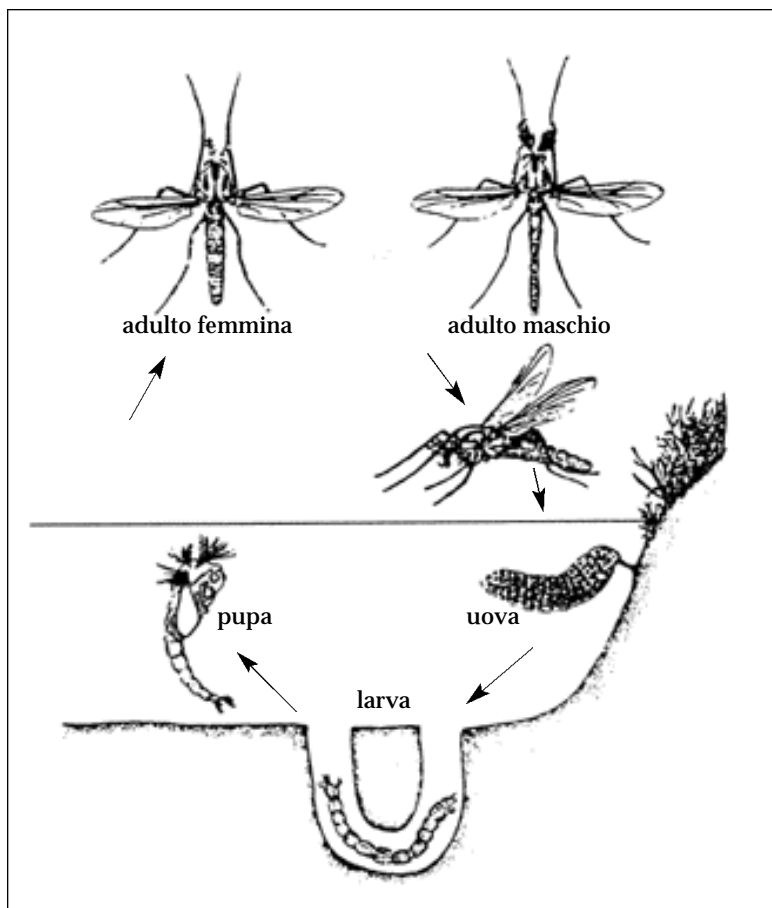


Figura 4.6 - Ciclo di sviluppo di un Chironomide (da Ferrarese e Maiori, 1984).

anche in acque povere di ossigeno. In tali condizioni, alcune specie possono prendere il sopravvento, con le mutate caratteristiche delle acque stesse, nei riguardi dei potenziali competitori, divenendo un vero e proprio problema.

Il caso di *Chironomus salinarius* Kieff., con le pullulazioni di questi anni nella laguna veneta, è sintomatico di ciò. Le modifiche dell'ambiente lagunare prodotte dall'uomo con l'arricchimento organico delle acque e il conseguente abnorme sviluppo algale hanno favorito il fenomeno: in questo caso, gli sciami sono un segnale allarmante per una situazione in cui si sono rotti gli anelli di un delicato equilibrio. Tali insetti, nel contempo, sono molto sensibili alla presenza di sostanze estranee nelle acque. La raccolta di individui deformati è quindi un ulteriore segnale di allarme, che dovrebbe avvisare l'osservatore attento che quel determinato ambiente sta subendo una progressiva degradazione.

#### 4.2.2.2 Cenni di biologia

I Chironomidi depongono per lo più le uova (parecchie centinaia, sino ad alcune migliaia) sulla superficie dell'acqua, in ammassi gelatinosi prodotti grazie alla secrezione di ghiandole colleteriche, annesse all'apparato riproduttore femminile.

Tale sostanza mucillaginosa consente alle uova stesse di attaccarsi a piante acquatiche o, comunque, a qualche oggetto presente. In molti casi affonda, trascinando le uova stesse sulla fanghiglia di fondo. Le larve che schiudono nuotano e si spostano sino a raggiungere l'ambiente più idoneo: in questo periodo si nutrono sia dei residui del tuorlo dell'uovo che della sostanza gelatinosa precedentemente ricordata.

Raggiunto il fondale, le larve costruiscono un astuccio di fili sericei, inglobante detriti presenti e vi si annidano, sporgendo con il capo, per nutrirsi. Gli astucci larvali sono di solito affondati nel fango per pochi centimetri e vengono progressivamente accresciuti con lo sviluppo del dittero. In tale condizione l'insetto resta per un periodo di tempo variabile in funzione della specie, oltre che dipendente dall'abbondanza di cibo e dalla temperatura dell'acqua. Esistono quindi specie con 1 o più (anche 7-8) generazioni annue.

Al termine della vita larvale, dopo 3 mute, si ha la differenziazione della pupa, che si porta immediatamente sotto il pelo dell'acqua e in breve tempo è in grado di differenziare gli adulti, che sfarfalleranno, liberandosi nell'aria in veri e propri sciami (figura 4.6).

I tipi di volo dei Chironomidi sono diversi e possono avvenire immediatamente dopo l'emergenza, per la formazione degli sciami riproduttivi e per l'ovodeposizione. Il primo tipo consente agli insetti di raggiungere i siti di riposo ed è condizionato dal vento. L'umidità rappresenta il fattore più importante in quanto previene la perdita d'acqua, in particolare subito dopo lo sfarfallamento, quando il tegumento dell'insetto è ancora molle.

Sciami riproduttivi si verificano soprattutto in presenza di luce crepuscolare. Anche questo comportamento è condizionato dalla temperatura; è possibile osservare sciami in primavera o autunno, in prossimità di luoghi ombrosi, o con cielo coperto. Gli sciami sono formati da maschi e vengono intersecati da femmine pronte all'accoppiamento.

#### 4.2.2.3 Ecologia dei Chironomidi

Come si è detto nell'introduzione, la spiccata variabilità nel comportamento dei rappresentanti di questa famiglia di Ditteri, la capacità delle diverse specie a tollerare in modo anche vistoso modifiche dei fattori ambientali, fa sì che i Chironomidi possano essere presi in considerazione come specie particolarmente idonee alla valutazione della qualità delle acque. Si ricorda in proposito il lavoro di Saether (1979) sui popolamenti a Chironomidi della zona profonda dei laghi, come indicatori del grado di trofia. Nei laghi estremamente oligotrofi predominano le *Orthocladiinae*, in quelli oligotrofi le *Chironominae* della tribù Tanytarsini, in quelli mesotrofi *Sergentia* ed *Endochironomus* (*Chironominae*-Chironomini), nei laghi eutrofi *Chironomus anthracinus* Zet., *C. plumosus* Zet. e specie affini, in quelli estremamente eutrofi, *C. plumosus*. Revisioni del problema, con indicazione di una serie di casi registrati in diverse località degli Stati Uniti e del Giappone, oltre che dei problemi conseguenti, sono state fatte da Ali (1980; 1990).

Meno precise appaiono le conoscenze sulla distribuzione negli ambienti di acque correnti. Pare esistere una successione longitudinale, nel senso che nel corso superiore dei fiumi prevalgono *Diamesinae* e *Orthocladiinae*, mentre nel corso inferiore le *Chironominae* divengono sempre più importanti. In casi di forte inquinamento organico il genere *Chironomus* tende a divenire dominante.

#### 4.2.2.4 Tecniche di raccolta

##### • Adulti

Sono attratti dalla luce e si soffermano su superfici chiare, contrastanti su sfondo scuro.

Pertanto si catturano:

- a volo, con retino entomologico a maglie fitte;
- con impiego di lampade (utilizzare eventualmente generatore autonomo!), dietro le quali viene installato un telo bianco (m 2x1). Gli insetti posati sul telo vanno raccolti con apposito aspiratore entomologico.

Campioni di adulti possono essere ottenuti impiegando trappole a cono o piramide, semi-sommerse. Ogni trappola copre circa 0,3 m<sup>2</sup> di superficie, viene lasciata in acqua tutta la notte e dà una buona stima dello sfarfallamento giornaliero degli adulti per unità di area di un determinato ambiente.

##### • Larve

I campioni di limo di fondo vengono prelevati con piccole benne, in grado di operare su superfici pari a circa 250 cm<sup>2</sup>.

I campionamenti vengono fatti lungo transetti a profondità diverse, sino a 6 metri circa. La distanza tra un punto di campionamento e il successivo varia in funzione dell'ambiente in cui ci si trova a operare. In genere si considerano distanze oltre i 500 e i 1500 metri.

Il limo raccolto viene versato in una bacinella con acqua, per eliminare innanzitutto i detriti più grossolani. Successivamente si rovescia il materiale residuo in un recipiente contenente formalina al 4% o, in alternativa, alcool etilico al 70%. Le larve si conservano poi in formalina o in alcool; è comunque preferibile l'uso di formalina al 4%, in quanto si mantiene così per oltre un anno il colore tipico delle larve.

Se è necessario esaminare in breve tempo molti campioni, è opportuno utilizzare una soluzione satura di MgSO<sub>4</sub>; in tal modo la maggior parte delle larve vive si separa dai detriti organici per flottazione.

La raccolta delle larve può essere fatta anche con un retino a sacco, di apertura rettangolare, provvisto di manico telescopico. Le maglie debbono essere pari a 18-21/cm<sup>2</sup>. Si effettua in particolare nei corsi d'acqua, smuovendo ciottoli, vegetali e detriti, a monte del retino appoggiato sul fondo del ruscello.

Se si vogliono raccogliere le pupe, lo stesso retino va posto con la bocca semisommersa, opposta alla direzione della corrente, per almeno 3-4 ore; si consiglia di controllare il materiale raccolto ogni ora.

#### Conservazione, preparazione, studio

Le larve possono essere conservate in alcool 70% o in formalina al 4%.

Le pupe e le exuvie di pupe si conservano in alcool 70-90%.

Nelle larve i caratteri tassonomici essenziali si trovano soprattutto nella capsula

cefalica. Dopo aver staccato la testa dal resto del corpo, la si cuoce in KOH al 10% e si effettua la preparazione in una goccia di liquido di Faure. Si ricopre con un vetrino coprioggetto.

Per l'esame delle pupe è preferibile avere esemplari di sesso maschile. Vale la pena di preparare gli organi respiratori, le antenne, il capo e gli arti nel loro involucro e di metterli nel Faure.

Il materiale preparato viene quindi determinato impiegando apposite tavole analitiche.

Ovviamente, la classificazione è opera di specialisti, operanti nei Musei di Storia Naturale o presso le Università, a cui quindi è necessario rivolgersi.

In ogni caso, chiavi dicotomiche da utilizzare nella classificazione sono presenti nell'opera di Ferrarese e Rossaro (1981; 1982); la *Check list* della Fauna Italiana (Boorman *et al.*, 1995) elenca invece tutte le specie note sul nostro territorio.

## Bibliografia

Ali, A. 1980. Nuisance Chironomids and Their Control: a Review. *ESA Bull.*, 26 (1), 3-16.

Boorman, J., Coluzzi, M., Contini, C., Ferrarese, U., Rivosecchi, L., Rossaro, B., Sabatini, A. e Wagner, R. 1995. *Diptera Culicomorpha*. In: Minelli, A., Ruffo, S. e La Posta, S. (eds.). Checklist delle specie della fauna italiana, 65. Calderini, Bologna.

D'Andrea, F. e Marchese, G. 1990. Pestiferous Midges and Their Control: A World-Wide Perspective. Atti del Convegno: Chironomidi, Culicidi, Simulidi - Aspetti sanitari ed ecologici. Regione Veneto, USSL 16, Venezia.

Ferrarese, U. e Rossaro, B. 1981. Chironomidi,

1 (*Diptera Chironomidae: Generalità, Diamesinae, Prodiamesinae*). In: Collana del Progetto finalizzato "Promozione della qualità dell'Ambiente" AQ/1/129. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, 12, CNR.

Rossaro, B. 1982. Chironomidi, 2 (*Diptera Chironomidae: Orthocladiinae*). In: Collana del Progetto finalizzato "Promozione della qualità dell'Ambiente" AQ/1/171. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, 16, CNR.

Saether, O. A. 1979. Chironomid communities as water quality indicators. *Holarct. Ecol.*, 2, 65-74.

### 4.2.3 Il monitoraggio dell'inquinamento agricolo e urbano mediante l'ape

#### 4.2.3.1 Introduzione

L'ape domestica (*Apis mellifera* L.) è uno degli insetti su cui sono stati compiuti gli studi più approfonditi e pertanto è disponibile il maggior numero di dati.

Per tal motivo l'ape è utilizzata da molti anni per saggiare in laboratorio la tossi-

cità (per ingestione o per contatto) di prodotti impiegati in agricoltura. Le percentuali di mortalità ottenute, in una certa unità di tempo e in confronto a un testimone non trattato, consentono di classificare il principio attivo come *altamente, marcatamente, moderatamente o leggermente tossico* nei confronti delle api stesse (Arzone et al., 1980).

Negli ultimi decenni, tuttavia, l'interesse dei ricercatori si è spostato dalla semplice valutazione del rischio connesso all'introduzione di nuovi fitofarmaci nei confronti dell'ape, in quanto animale domestico produttore di reddito, alla valutazione dell'impatto ambientale su questo insetto in quanto organismo utile come impollinatore (o "pronubo"), fino alla valutazione dell'inquinamento agricolo nelle sue implicazioni verso l'uomo.

#### 4.2.3.2 Cenni di biologia e di morfologia

Le api appartengono all'ordine degli Imenotteri, caratterizzato, come dice il nome stesso, dalla presenza di due paia di ali membranose (dal greco *hymen*, ovvero membrana).

Questo ordine, che comprende circa 100.000 specie, può essere suddiviso in due sottordini: *Apocrita* e *Symphyla* che si distinguono fra loro per la presenza o meno di una strozzatura, cioè una riduzione del diametro del corpo (più o meno accentuata ed evidente nelle diverse famiglie) posta fra torace e addome, che ha dato origine alla comune espressione "vitino di vespa". Mentre i Sinfiti raggruppano specie più primitive, fra gli Apocriti vi sono api, bombi, vespe e formiche ecc.

Nella superfamiglia Apoidea, che comprende anche i bombi, sono incluse tutte le specie di api, sia quelle sociali che quelle solitarie.

Questi insetti, che si nutrono prevalentemente di sostanze zuccherine (come il polline e la melata prodotta dagli Afidi), sono dotati di glosse, appendici boccali che costituiscono una specie di proboscide, o lingua molto allungata che serve a suggerire il nettare dei fiori. Sono caratterizzati, inoltre, da zampe posteriori allargate, di solito molto pelose, così come villosa è il resto del corpo. Visitando instancabilmente i fiori, le api si imbrattano di polline, che costituisce un importante alimento larvale. Per favorirne la raccolta sono dotate di peli piumosi. Il polline, spazzolato via dalla superficie corporea con le zampe anteriori, è inumidito e trasferito alle zampe posteriori, dove è raccolto in appositi sacchi posti sulle tibie. La superficie esterna della tibia, infatti, è liscia, ma bordata su entrambi i lati da robuste setole ricurve, che formano una specie di cestello.

Nella loro laboriosa vita le api (e gli altri insetti pronubi) favoriscono la riproduzione di numerose specie vegetali, svolgendo un'opera essenziale per la vita delle piante fanerogame.

Una colonia di api domestiche completamente sviluppata comprende alcune decine di migliaia di individui, suddivisi in tre caste: la regina, unica femmina fertile della colonia, i fuchi, cioè i maschi fertili, e le operaie, femmine sterili addette a tutte le operazioni necessarie al mantenimento e allo sviluppo della "famiglia": la raccolta del cibo, l'allevamento della prole, la pulizia e la difesa dell'alveare, e così via.

Il favo è costituito da cellette perfettamente esagonali, costruite dalle operaie con la cera da esse stesse secreta e disposte in grandi lamine verticali appese al tetto nel nido. Nelle cellette le operaie immagazzinano il polline e il miele e allevano la prole. Le cellette per le nuove regine sono a forma di cono irregolare, sospese ai bordi del favo.

Tutte le larve, per i primi tre giorni di vita, sono nutrite con uno speciale alimento ricco di proteine, secreto dalle ghiandole salivari delle operaie e chiamato pappa reale. Le larve destinate a diventare regine ricevono questo alimento per tutta la vita.

Raggiunto lo stadio adulto, la nuova regina si allontana per il volo nuziale e, dopo l'accoppiamento, fa ritorno al nido. Talvolta prende il posto della vecchia regina, ormai indebolita, che viene uccisa dalle operaie (una regina vive alcuni anni), altre volte sciamma con una parte della colonia per costruire un nuovo favo.

La vita delle operaie, stremate dal duro lavoro cui sono sottoposte, dura solo qualche settimana, mentre i fuchi ai primi freddi, in principio di autunno, sono espulsi dalla colonia.

Rimandiamo alla bibliografia per una descrizione più dettagliata della complessa e affascinante biologia dell'ape domestica, soprattutto per quanto concerne i meccanismi fisiologici che ne regolano la vita sociale o le celebri danze con cui comunicano fra loro la posizione delle fonti di cibo. Ci preme, invece, sottolineare il meticoloso lavoro di raccolta svolto dalle operaie, che come instancabili vigili sanitari prelevano e immagazzinano minuscoli campioni dell'ambiente in cui vivono (e in cui viviamo anche noi!) mettendoli a nostra disposizione. Secondo i dati presenti in letteratura, un buon alveare può tenere sotto controllo un'area di ben 7 km<sup>2</sup>!

#### 4.2.3.3 Metodo d'uso

La metodologia proposta è stata messa a punto dall'Istituto Nazionale di Apicoltura di Bologna, dall'Istituto di Entomologia "Guido Grandi" dell'Università di Bologna e dal Dipartimento di Biologia applicata alla Difesa delle Piante dell'Università di Udine, tenendo conto anche delle indicazioni fornite dall'International Commission for plant-bee relationships, allo scopo di valutare in campo gli effetti dei fitofarmaci sulle api; ma può fornire utili indicazioni anche per il monitoraggio dell'inquinamento agricolo o da metalli pesanti.

Questo protocollo sperimentale, che prevede l'impiego di alveari come unità di rilevamento, si basa sull'osservazione, nell'arco di 15 giorni, di numerose variabili, al fine di "seguire il tragitto della molecola indagata, studiarne la traslocazione dalle piante all'alveare, scoprire i punti preferenziali di accumulo e le eventuali barriere biologiche, conoscere i tempi e le cause di degradazione e di biomagnificazione nelle varie matrici per correlarle poi con le osservazioni riguardanti la forza della famiglia, l'attività di volo e di bottinamento e l'andamento meteorologico" (Porrini, 1995).

Ogni stazione di rilevamento è costituita da almeno 4 alveari (il numero minimo per applicare i metodi di analisi statistica), omogenei per forza e scorte alimentari.

Gli alveari devono essere introdotti nell'apezzamento all'inizio della fioritura ed equipaggiati con speciali gabbie raccogliatrici di api morte. Quelle più diffuse sono le gabbie di Gary, ma ne sono stati studiati vari modelli che sfruttano la propensione per la pulizia delle operaie, che allontanano immediatamente dall'alveare i corpi delle compagne morte.

Il trattamento antiparassitario è eseguito verso sera, quando la coltura presenta una fioritura intorno al 30-35%.

La ricerca dei residui si effettua su: api morte, polline, miele, cera, nettare e larve, ma è indispensabile anche la valutazione soggettiva dell'attività di volo, di bottinamento e della forza della famiglia.

**Api.** Il conteggio giornaliero delle api morte deve essere intrapreso una settimana prima del trattamento. I prelievi per le analisi chimiche si effettuano a -1, 1, 3, 5 e 7 giorni dall'intervento chimico.

**Polline.** I campionamenti sono eseguiti mediante una trappola detta "pigliapolline", in una determinata unità di tempo nell'arco della giornata e in coincidenza con i prelievi di api. In seguito i campioni sono pesati e sottoposti all'analisi chimica per l'accertamento dei residui e all'analisi melissopalino-logica per la determinazione dell'origine botanica (figura 4.7, vedi tavole a colori).

**Miele e cera.** Il prelievo si esegue il giorno prima del trattamento e al termine della sperimentazione, assicurandosi che il miele sia di recente importazione. Sui campioni di miele viene effettuata oltre all'analisi chimica anche quella melissopalino-logica (figura 4.8, vedi tavole a colori).

**Nettare.** È aspirato dai fiori utilizzando particolari micropipette, dal giorno antecedente l'intervento chimico fino alla settimana successiva, sia di mattina che di pomeriggio.

**Larve.** Si prelevano quelle di 4<sup>a</sup> età, il giorno precedente al trattamento e il settimo successivo.

#### 4.2.3.4 Attività di volo

Consiste nel conteggio delle api in uscita dall'alveare per 30'' consecutivi, in momenti diversi della giornata (alle ore 10.00, 12.00, 14.00 e 16.00).

#### 4.2.3.5 Attività di bottinamento

Consiste nel conteggio delle api che visitano i fiori della coltura in esame per 5 minuti in diversi momenti della giornata (alle ore 10.00, 12.00, 14.00 e 16.00). Per le colture arboree si fa riferimento a una branca fiorita; invece, se si tratta di una coltura erbacea, si considerano parcelle di 1 m<sup>2</sup>. In quest'ultimo caso, è anche possibile contare le api che bottinano sui fiori lungo una linea immaginaria di 100 m, percorsa nei due sensi a una determinata velocità (30 cm/sec).

#### 4.2.3.6 Forza della famiglia

La sua valutazione si effettua mediante accurate visite agli alveari prima e dopo l'intervento chimico, anche se è consigliabile seguirne l'evoluzione pure dopo il periodo della sperimentazione.

In questi controlli si registrano su apposite schede alcune importanti osservazioni come:

- l'attività delle bottinatrici di fronte all'alveare;
- l'età della regina;
- il numero di telaini occupati dalle api;
- il numero di telaini di covata, nonché la sua compattezza o discontinuità;
- la percentuale di covata vecchia e nuova;
- la presenza di celle di fuchi e celle reali;
- il numero di telaini con provviste;
- la percentuale di miele vecchio e nuovo;
- la quantità di polline presente;
- eventuali malattie e interventi effettuati per prevenirle o curarle.

La registrazione dei dati meteorologici è indispensabile per tutto il periodo della sperimentazione (2 settimane), perché influenza sia l'attività di bottinamento delle api che la stabilità e la diffusione del principio attivo nell'ambiente.

*Limiti d'uso.* La distribuzione spaziale delle stazioni (che deve essere comunque continua) dipende dall'uso del territorio e dall'orografia. La densità è compresa indicativamente fra due valori: una stazione ogni 50 ha, in caso di alta parcellizzazione e diversificazione colturale, e una stazione ogni 700 ha, in presenza di marcata estensivizzazione, omogeneità colturale o vegetazionale e assenza di interventi antropici.

Tra le variabili che influenzano i risultati si segnala la morfologia florale. Fiori aperti, con nettari maggiormente esposti alla contaminazione, e fiori chiusi, con nettari protetti, danno risposte diverse.

Poiché durante l'inverno gli alveari sono in riposo, queste tecniche sono utilizzabili solo stagionalmente.

*Limiti d'accettabilità dei risultati.* Le sperimentazioni condotte in campo, in generale, forniscono dati più attendibili rispetto a quelle di laboratorio, perché più vicine alla realtà che debbono indagare; d'altro canto, sono più laboriose e di difficile realizzazione proprio perché il numero di variabili in gioco aumenta e in proporzione aumenta il numero di osservazioni da eseguire. L'eventuale assenza di risultati (determinata da una mancata identificazione e/o controllo di tutti i fattori che influenzano la risposta) ha spesso causato critiche a questo approccio, spingendo molti ricercatori a tornare alle rassicuranti pareti del laboratorio.

Questi problemi sono particolarmente importanti nello studio di un animale sociale qual è l'ape. Nei test di laboratorio (dove l'ape è utilizzata in quanto individuo, ed è stressata dalle condizioni innaturali in cui è stata posta), si ottengono spesso risposte diverse da quelle fornite dalle prove di campo (dove, invece, l'insetto è nelle migliori condizioni di sopravvivenza e il principio attivo, esposto ai fattori ambientali sfavorevoli, si degrada più rapidamente).

Tra i limiti della metodologia proposta, si segnala l'assenza di una tecnica standard per l'allestimento delle colonie da insediare nelle stazioni di rilevamento e la mancanza di un modello univoco per la distribuzione delle stazioni stesse sul territorio.

Un altro importante problema è legato alla determinazione della mortalità delle api, che, purtroppo, è sempre approssimata per difetto, poiché non tutti gli individui morti finiscono nelle gabbie di raccolta. Ciò in parte perché spesso le operaie muoiono mentre stanno bottinando (fenomeno tanto più accentuato quanto più tossici sono i principi attivi con cui sono venute a contatto) e, in parte, perché i corpi espulsi sono allontanati dalle solerti spazzine anche a grande distanza dall'alveare.

Conta-api elettronici, in grado di calcolare la differenza fra individui in entrata e in uscita dall'alveare (una misura indiretta, ma più precisa della mortalità), sono allo studio.



## Bibliografia

**Accorti, M.** 1995. L'ape come insetto test dell'inquinamento agricolo. *Inf.tore fitopatol.*, 45 (6), 4-6.

**Arzone, A. e Vidano, C.** 1980. Methods for testing pesticide toxicity to honey bees. *Boll. Lab. Ent. agr. Portici*, 37, 161-165.

**Barbattini, R. e Greatti, M.** 1995. La mortalità delle api e il monitoraggio dell'inquinamento agricolo. *Inf.tore fitopatol.*, 45 (6), 13-17.

**Chinery, M.** 1987. Guida agli insetti d'Europa. F. Muzzio, Padova.

**Porrini, C.** 1993. Ecologia e... Api metropolitane. In: **Cencini, C. e Dindo, M. L.** (eds.). *Ecologia in città. Alla scoperta dell'ambiente urbano.* Lo scarabeo, Bologna, 211-216.

**Porrini, C.** 1995. L'organismo alveare e i fitofarmaci. *Inf.tore fitopatol.*, 45 (6), 7-12.

### Enti e Istituti presenti nella Regione Lombardia cui fare riferimento:

*per gli Scolitidi*

- Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi di Milano  
Via Celoria 2 - 20133 Milano
- Azienda Regionale Foreste  
Palazzo Verrocchio, Centro Direzionale Milano 2 - 20090 Segrate (MI)
- Osservatorio per le malattie delle piante  
Via G. Fara 20 - 20124 Milano

*per i Chironomidi*

- Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi di Milano

*per le Api*

- Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi di Milano
- Laboratorio Apistico dell'Unione Apicoltori della Lombardia  
presso Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi di Milano
- Fondazione di Studi Superiori "Fojanini"  
Via Valeriana 32 - 23100 Sondrio

### 4.3 Ragni (Araneae) - Riccardo Gropali

#### 4.3.1 Introduzione

I ragni (*Arachnida Araneae*) possono essere validamente impiegati come bioindicatori, anche se tali potenzialità non sono ancora pienamente conosciute e di conseguenza non sono ancora utilizzabili in modo del tutto efficace. Tra i caratteri dei ragni che più si prestano allo scopo è opportuno ricordare che:

- sono esclusivamente predatori, obbligati per alimentarsi alla cattura di prede accettabili per quanto riguarda le loro caratteristiche strutturali, eco-etologiche e dimensionali;
- quasi sempre sono da poco vagili a completamente sedentari allo stadio adulto, vivendo quindi strettamente collegati agli ambienti che li ospitano;
- sono abbondantemente diffusi a livello quali-quantitativo in ogni ecosistema terrestre, mostrando una scelta di habitat estremamente raffinata;
- sono protetti da una cuticola piuttosto sottile, che con ogni probabilità non è in grado di bloccare una rapida assunzione di sostanze pericolose.

Per quanto riguarda l'alimentazione i ragni predano altri Artropodi – in particolare Insetti – che vengono catturati direttamente oppure per mezzo di tele più o meno elaborate e regolari a livello strutturale; tali costruzioni dipendono anche strettamente dalla struttura fisica dell'ambiente ospite (Uetz, 1991), che deve tra l'altro fornire validi punti d'attacco per i fili di sostegno degli apparati di cattura (Gropali *et al.*, 1994a). La presenza di ragni in quantità e con varietà elevate in un ambiente è quindi sicuramente indice di una sufficiente ricchezza delle loro prede d'elezione, anche se la maggior parte di essi sembra essere piuttosto polifaga (Wise, 1993): la versatilità predatoria di molte specie non permette quindi di ricavare – in numerose situazioni ambientali – informazioni dirette e di lettura facile e immediata da semplici dati di presenza/assenza.

La possibilità di spostamento su distanze elevate è – nella maggior parte delle famiglie – limitata ai giovani appena usciti dall'uovo, che emettono da una posizione rilevata un filo sufficientemente lungo e si fanno trasportare dalle correnti d'aria (*ballooning*), riuscendo in tal modo a colonizzare ambienti anche molto lontani da quello della schiusa (Chinery, 1993).

L'abbondanza quali-quantitativa dei ragni è veramente notevole in ogni ecosistema terrestre. Una stima numerica generale in foreste europee permette di valutare la presenza di questi predatori tra 10 e 620 esemplari per ogni mq e a livello di varietà specifica nei medesimi ambienti sono state contate tra 31 e 134 specie differenti nelle chio-me arboree e tra 31 e 58 nella lettiera (Blandin *et al.*, 1980). Lo studio dell'araneofauna di 68 ambienti differenti nell'Europa centrale ha permesso di rilevare tra 16 e 209 specie per habitat, con numero medio di individui per specie compreso tra 3,6 e 734,7 (Nentwig, 1993).

Il collegamento tra specie araneiche e ambiente ospite è comunque quasi sempre riconoscibile come diretto: include la sua struttura fisica (importante soprattutto per le specie che costruiscono tele complesse o che necessitano di particolari tipologie di ripari) e i suoi caratteri costitutivi (popolamenti vegetali e loro caratteristiche, presenza e tipologia di lettiera, presenza di legni cavi e marcescenti, di cortecce sollevate e di sassi al suolo, esposizione all'irraggiamento solare diretto e violenza del vento).

In ambienti poco complessi ciò è già stato abbondantemente dimostrato. Uno studio effettuato per sei anni consecutivi su 11 specie di *Lycosidae* in 17 differenti habitat costieri del Mar Baltico dimostra che la scelta operata da questi ragni è estremamente raffinata, anche allo scopo di evitare la competizione intraspecifica. Un'ulteriore dimostrazione del collegamento diretto tra ambiente e araneofauna venne evidenziata in ambienti costieri lacustri e marini statunitensi, dove si riscontrò una profonda differenza tra comunità di aree poste in successione a partire dal bagnasciuga e progredendo nell'entroterra: in questo caso la massima complessità è stata rilevata nelle zone dotate di copertura vegetale maggiormente stabile e stratificata, probabilmente per le maggiori possibilità di attacco delle tele e il microclima sicuramente più favorevole.

#### 4.3.2 Informazioni deducibili

Anche se le conoscenze biologiche ed ecologiche riguardanti i ragni sono a tutt'oggi complessivamente piuttosto scarse, è sempre possibile ottenere da analisi ben condotte una quantità di dati, da sufficiente a buona, riferibili alla conservazione ambientale (soprattutto per quanto riguarda le aree ecotonali) e alla validità delle forme localmente adottate di gestione degli agroecosistemi (in particolare per quanto riguarda i margini dei coltivi, la presenza di vegetazione minore e di copertura vegetale invernale e, in alcuni casi, le ricadute biologiche di alcuni trattamenti chimici) e degli ambienti forestali (soprattutto in riferimento a tagli e diradamenti, semplificazione della composizione specifica e strutturale, presenza di alberi morti e deperienti). Infatti gli studi disponibili dimostrano una stretta relazione tra ricchezza di ragni e varietà ambientale (Uetz, 1991), con soltanto alcuni casi particolari discordanti, che sembrerebbero derivare dalla maggior concentrazione di questi predatori in punti di massima presenza di prede facilmente catturabili, come le larve di ifantria entro le loro protezioni in seta (Groppali *et al.*, 1994).

In ambienti di tipologia particolare possono inoltre essere riconoscibili i danni derivanti da alcuni fattori di disturbo di origine naturale (permanenza sul suolo delle acque di esondazione, forza del vento dominante nelle stagioni di attività dell'araneofauna, gravità e frequenza degli incendi) e antropica (contaminazioni, pratiche di diserbo).

Per quanto riguarda invece informazioni su sostanze contaminanti e loro eventuali effetti, lo studio dell'araneofauna sembra finora poter fornire informazioni non particolarmente raffinate, con alterazioni quali-quantitative evidenti soltanto in caso di forte e/o prolungata presenza di sostanze biocide in un'area. Anzi, nel caso di concentrazioni sufficientemente ridotte di sostanze potenzialmente pericolose, non di rado indagini araneologiche ben condotte hanno permesso di rilevare l'influenza da scarsa a virtualmente nulla di queste, e per contro la forte incidenza di forme non corrette di gestione ambientale.

#### 4.3.3 Metodo d'uso

Un sistema speditivo che sta dando ottimi risultati in ambienti vegetati di qualsiasi tipologia (con maggiori difficoltà d'indagine in quelli con popolamenti erbacei molto fitti e bassi) è costituito dalla raccolta a vista di tutti gli esemplari osservati nel corso di un'ora di lavoro in un'area ampia 9 m<sup>2</sup>. Tali aree, per poter fornire dati validi, vanno scelte come sufficientemente rappresentative di un territorio con i

suoi habitat più tipici, la cui descrizione con i dati naturalistici di base deve comprendere, oltre alla vegetazione e alle caratteristiche ambientali salienti, presenza e quantità approssimata degli elementi in grado di determinare le possibilità di vita di alcune specie di ragni (sassi al suolo, cortecce sollevate e legni cavi, lettiera, erbe, forza del vento ed esposizione alla luce solare diretta e di versante, in caso di raccolta in ambienti collinari e montani).

In ambienti privi di copertura vegetale, come le spiagge fluviali, sono stati ottenuti risultati interessanti operando catture a vista di tutti gli esemplari osservati nel corso di un'ora di campionamento, anche in tal caso rilevando, oltre ai normali dati, i caratteri importanti nel determinare la presenza dei ragni: descrizione ed eventuale pezzatura dei materiali costituenti, presenza e abbondanza di ripari (come sassi di grandi dimensioni e frammenti di legno di differente tipologia), di raccolte d'acqua, di tratti inerbati e di esemplari o gruppi arboreo-arbustivi. Inoltre vanno valutati altri elementi in grado di modificare le popolazioni araneiche di tali aree, come persistenza della copertura da parte delle acque di piena e loro violenza (quest'ultima riconoscibile per esempio in aree collinari e montane per la larghezza della valle).

Impiegando un retino da sfalcio (Jones-Walters, 1994) è possibile ricavare buoni risultati in popolamenti erbacei e, per poter paragonare i dati ottenuti tramite catture a vista in ambienti con vegetazione arboreo-arbustiva, è opportuno operare anche in questo caso in aree-campione ampie 9 m<sup>2</sup>. Ovviamente è necessario rilevare le caratteristiche ambientali, oltre alle specie erbacee dominanti, che consistono, insieme ai normali dati di campagna, in forza del vento ed esposizione solare diretta, altezza media della copertura vegetale, presenza e quantità di specie fiorite.

Per indagini in ambienti forestali può essere necessario operare prelievi di campioni di lettiera, raggiungenti il suolo sottostante, da selezionare successivamente utilizzando un vaglio a maglie larghe per contenere la quantità dei materiali da esaminare. Anche in questo caso è opportuno quantificare esattamente la superficie dei campioni, e buoni risultati sono stati ottenuti con quadrati ampi 0,25 m<sup>2</sup> ciascuno, rilevando, oltre alla profondità minima e massima della lettiera, le condizioni ambientali dell'area di prelievo e alcune delle caratteristiche in grado di influire direttamente sui popolamenti araneici, come presenza e quantità relativa di materiali grossolani e grado di decomposizione complessivo.

Uno dei metodi maggiormente impiegati in indagini araneologiche è infine costituito dalle trappole a caduta (*pitfall traps*), che devono essere collocate con attenzione particolare per la cattura dei ragni (Jones-Walters, 1994): infatti, mentre non sembra affatto influente la scelta del liquido conservante utilizzato, è molto importante che l'imboccatura delle trappole venga collocata esattamente al livello del suolo, e che venga operata una loro copertura con sassi e altri materiali, mantenuti sollevati dal terreno per consentire il passaggio degli esemplari.

Il metodo però è molto poco selettivo e si presta quindi ottimamente per indagini su differenti gruppi di Artropodi, destinabili a essere poi separati e conferiti agli specialisti di settore per la determinazione. Per quanto riguarda nella fattispecie i ragni, alcune specie costruttrici di tele elaborate, oltre a spostarsi di rado sul terreno (divenendo quindi raramente catturabili con tale metodo di campionamento) possono sfuggire facilmente dalle trappole utilizzando il filo, deposto durante i loro spostamenti, per raggiungere il bordo se vi cadono accidentalmente. Inoltre, in presenza di vegetazio-

ne fitta posta a breve distanza dal terreno, numerosi esemplari tendono a spostarsi sopra di essa anziché sulla superficie del suolo, riducendo in tal modo la quantità delle catture e modificandone, in modo molto difficilmente valutabile, la qualità. Ciò è stato per esempio verificato nel corso di un'indagine che ha messo in confronto un oliveto ligure coltivato con uno abbandonato da circa 20 anni.

Le trappole a caduta devono essere posizionate nelle aree da studiare in numero sufficiente – comunque mai singolarmente per evitare che danni localizzati debbano costringere alla ripetizione del campionamento – e lasciate operative per almeno cinque giorni consecutivi, per ottenere anche eventuali specie rare, altrimenti rilevabili solo del tutto casualmente.

Gli esemplari, catturati con qualsiasi metodologia, devono essere conservati in alcool a 70° fino al momento della loro determinazione; in questo modo, se i contenitori nei quali vengono conservati sono a tenuta ermetica, il loro mantenimento in condizioni accettabili per la classificazione è virtualmente illimitato.

Tali materiali, considerando comunque che una loro parte più o meno rilevante non potrà essere determinata a livello di appartenenza specifica per l'età non sufficientemente matura degli esemplari, devono poi essere conferiti a uno specialista, in grado di eseguire lo studio tassonomico preliminare alla valutazione dei dati ottenibili.

Se le aree-campione sono state scelte, e si rivelano poi essere in effetti, come sufficientemente rappresentative – del territorio oppure del fenomeno da descrivere – è possibile a determinazione avvenuta trarre le prime conclusioni da una sola campagna di prelievi, purché questa sia stata effettuata tra la tarda primavera e l'inizio dell'autunno, approfittando della massima presenza di esemplari determinabili. La ripetizione delle catture, oppure il mantenimento in attività di trappole a caduta per più mesi successivi, può invece fornire dati più completi e anche sicuramente interessanti elementi di valutazione fenologica, essenziali per alcune tipologie di indagine e soprattutto per valutazioni approfondite di qualità ambientale.

Per esempio è stato eseguito uno studio fenologico, con catture a vista mensili su aree-campione ampie 9 m<sup>2</sup>, in una siepe mista della campagna cremonese rilevando che il massimo di presenza si è verificato nei mesi di maggio (52 esemplari), aprile (32), agosto (28) e ottobre (22), e che i valori massimi degli indici di Shannon-Weaver sono stati riscontrati in aprile (3,48), maggio (3,24), agosto (3,19) e ottobre (2,93), mentre per gli indici di Evenness i valori massimi sono stati rilevati in agosto (0,96), aprile (0,94), ottobre (0,92) e settembre (0,86).

In aree soggette a forti e rapidi mutamenti è invece assolutamente indispensabile effettuare la replica del campionamento, mentre in ambienti già alterati diventa necessario trovare una o più aree-campione non influenzate dal fenomeno in studio, nelle quali operare una campagna di raccolte, per effettuare successivamente un confronto accettabile. Ciò presuppone comunque una profonda conoscenza della storia pregressa dell'ambiente di studio e delle aree limitrofe, per scegliere quelle validamente confrontabili.

Altri metodi, come la raccolta a vista su piante, foglie o fiori singoli (purché in quantità significative), l'adozione di ombrello entomologico (Jones-Walters, 1994) per catturare gli esemplari che vi si lasciano cadere scuotendo i rami sovrastanti, il posizionamento di anelli di cartone ondulato su tronchi e rami per prelevarvi i ragni che vi hanno cercato rifugio, l'esame di ripari particolari (legni cavi e cortecce sollevate, sas-

si infossati parzialmente nel terreno e simili), permettono invece di ricavare dati difficilmente utilizzabili in valutazioni di qualità ambientale.

#### **4.3.4 Discussione**

L'impiego dei ragni come bioindicatori si sta rivelando estremamente interessante, soprattutto per la valutazione qualitativa di alcuni habitat e per la stima delle ricadute ambientali di alcune tipologie di alterazioni, anche se l'attuale limitatezza delle conoscenze biologiche ed ecologiche riguardanti questo gruppo animale può anche non consentire l'ottenimento di quantità soddisfacenti di dati potenzialmente ricavabili.

In particolare è ancora da completare un quadro di riferimento valido per una sufficiente quantità di specie rinvenibili in differenti ambienti, che possa permettere di valutare la reale qualità dei dati ottenuti. Il lavoro da fare, in parte attualmente in corso d'opera, consiste quindi nell'arricchire le conoscenze biologiche ed ecologiche di base ed è assolutamente necessario per i ragni come per ogni altro gruppo animale.

##### *4.3.4.1 Limiti d'uso*

Alcune metodologie di raccolta necessitano che l'addetto al campionamento sia in grado di operare validamente le catture, cioè sia in possesso di nozioni pratiche riguardanti i punti preferiti di stazionamento e di rifugio dei ragni, conosca le loro modalità di movimento e di posizionamento, le forme di mimesi e mimetismo, le difese adottate contro la cattura: in pratica è necessaria una discreta esperienza per operare validamente i prelievi in natura. Ciò è assolutamente indispensabile nel caso della raccolta a vista in ambienti vegetati, mentre in ambienti privi di copertura può anche essere sufficiente una minor esperienza, cui deve però supplire una discreta destrezza. Ancora più facile è l'utilizzo del retino da sfalcio (una volta imparato il movimento corretto da imprimere all'attrezzo); il vaglio della lettiera richiede semplicemente una buona dose di pazienza e un'attenta osservazione dei materiali per individuare i ragni, spesso assai piccoli; l'impiego delle trappole a caduta necessita soltanto di una ridotta quantità di nozioni riguardanti il corretto posizionamento degli strumenti di cattura.

Il maggior limite d'uso è invece sicuramente costituito dall'assoluta necessità che la determinazione venga eseguita da tassonomi di valore e di grande esperienza, in grado di ridurre al minimo le incertezze riguardo al materiale fornito loro.

Invece, applicando per ogni tipologia ambientale la metodologia più adatta alla raccolta dei dati, ciascun ambiente si può prestare per studi sull'araneofauna, anche finalizzati alla valutazione delle sue condizioni di conservazione e dei danni eventualmente subiti. I risultati migliori possono comunque essere ottenuti da studi riguardanti ambienti vegetati, meglio se ecotonali.

Il periodo dell'anno che permette di ottenere risultati sufficientemente dettagliati è inoltre molto ampio, andando praticamente dalla tarda primavera all'inizio dell'autunno: le necessità di poter disporre del maggior numero possibile di esemplari determinabili (quindi adulti) permette infatti di spaziare a sufficienza nelle stagioni calde dell'anno. Sotto questo aspetto però, soprattutto per ricavare dati ambientali, può essere opportuno ripetere per almeno due volte, nel corso del medesimo anno, i campionamenti.

#### 4.3.4.2 Limiti di accettabilità dei risultati

Uno dei fattori che limitano maggiormente l'interpretazione dei risultati ottenuti è costituito sicuramente dall'attuale scarsa conoscenza riguardo a biologia ed ecologia delle specie di ragni italiani, mentre per esempio in Svizzera questo problema è stato fortemente limitato dalla disponibilità di un valido manuale (Maurer *et al.*, 1990). Per questo motivo è in corso di allestimento, a opera del Laboratorio di Ecologia degli Invertebrati del Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti terrestri dell'Università di Pavia, la prima banca dati dei ragni italiani su supporto informatico.

Il ricorso a semplici metodologie di interpretazione statistica dei dati raccolti permette spesso efficaci confronti tra aree-campione, come è stato validamente esemplificato da Nentwig (1993) nell'esame dell'araneofauna di Panama in riferimento a quella europea. Gli indici più facilmente utilizzabili, anche perché adottati quasi sempre dai differenti Autori, sono quelli riguardanti diversità (Shannon-Weaver) ed equiripartizione (Evenness): per esempio Nentwig (1993), dallo studio di 68 differenti comunità araneiche dell'Europa centrale, quantifica l'indice di diversità come compreso tra 1,24 e 4,2 e quello di equiripartizione tra 0,37 e 0,94.

Inoltre, non di rado, l'interpretazione dei dati viene resa complessa e problematica a causa della reale difficoltà di possedere elementi sufficienti riguardo alla storia naturale recente dell'ambiente di studio, riferita per esempio a eventuali contaminazioni, a frequenza e persistenza delle esondazioni, alla frequenza degli incendi e a eccessi di pascolo. Nel caso però di alterazioni non derivanti dalla presenza di sostanze chimiche, non o scarsamente biocompatibili, è possibile riconoscere la loro portata ecologica esaminando in modo corretto alcune caratteristiche ambientali, come la vegetazione dominante in aree con incendi frequenti o soggette a pascolo eccessivo.

#### 4.3.4.3 Problemi attinenti all'applicazione del metodo d'uso

Di importanza fondamentale è – come peraltro in tutte le indagini naturalistiche – la corretta determinazione degli esemplari raccolti. Pure essenziale è la scelta delle aree-campione e delle metodologie da applicare per una corretta esecuzione dello studio, in base ai problemi di indagine da affrontare.

Per quanto riguarda la determinazione, la scelta della stagione di esecuzione dell'indagine può facilitare (con la massima presenza di adulti) oppure rendere più complessa l'applicazione del metodo; in alcuni casi può divenire addirittura indispensabile la ripetizione dei campionamenti, quando questi vengono eseguiti in periodi dell'anno con troppo scarsa presenza di adulti.

Le aree-campione vanno inoltre valutate in sito, riguardo alla loro rappresentatività della situazione ambientale del territorio studiato, e ne vanno rilevate tutte le caratteristiche potenzialmente in grado di modificarne le popolazioni araneiche.

#### 4.3.4.4 Stato delle ricerche

In Italia sono stati eseguiti di recente e sono attualmente in corso numerosi studi di taglio ecologico, soprattutto in ambienti naturali o naturaliformi, finalizzati alla raccolta di una sufficiente quantità di dati di base. Gli elementi conoscitivi così ottenuti vengono poi progressivamente destinati, come materiale di confronto, all'interpretazione di quanto è possibile ricavare da indagini eseguite in ambienti soggetti a differenti tipologie di alterazione.

Per quanto riguarda in particolare le possibilità di impiego dei ragni come bioindicatori sono stati finora effettuati studi comparativi limitatamente ad alcuni agroecosistemi e all'influenza dei loro margini (Alderweireldt, 1989; Dennis *et al.*, 1992; Gropali *et al.*, 1994; Kromp *et al.*, 1992; Nazzi *et al.*, 1989), alle conseguenze di un incendio in ambiente appenninico e di uno sversamento di petrolio.

Inoltre è in corso di costante arricchimento una banca dati riguardante i ragni italiani, ove finora si sono potuti elaborare i dati sull'ecologia delle specie rinvenute in circa 30 territori distribuiti in gran parte d'Italia, studiati per mezzo di raccolte in oltre 200 aree-campione differenti, tutte descritte in modo dettagliato e finalizzato agli scopi della ricerca.

Per quanto riguarda gli studi eseguiti in altri paesi, mentre sono difficilmente paragonabili ai nostri quelli extracontinentali per le differenze faunistiche troppo rilevanti, in Europa sono disponibili alcune indagini di grande valore, riguardanti soprattutto l'araneofauna di agroecosistemi gestiti in modo differente e, in parte minore, i riflessi di alterazioni ambientali come gli incendi in ambienti forestali. Valutando infatti l'importanza delle pratiche agricole, uno studio eseguito in Olanda per sei anni consecutivi su 6 differenti colture (condotte in modo normale, con tecniche integrate oppure esclusivamente organiche) ha dimostrato la massima importanza della tipologia della derrata prodotta nel determinare abbondanza e varietà delle popolazioni araneiche, anziché l'impiego e le quantità di prodotti chimici, oltre al riconfermato valore degli elementi di margine delle colture (Booij *et al.*, 1992).

Per il fuoco viene invece stimato che le specie di ragni che vivono sulla superficie del terreno di boschi colpiti da incendi subiscono riduzioni numeriche comprese tra 9 e 31% rispetto alle aree non percorse dalle fiamme (Ahlgren, 1974). Una possibile complicazione nell'interpretazione dei dati può però derivare dalla dimostrazione, in ambienti di prateria nordamericani, che tutte le specie di ragni ivi presenti sono associate in modo significativo alle essenze che le costituiscono e in particolare con la loro fisionomia: gli incendi potrebbero quindi interessare l'araneofauna anche in modo indiretto, modificando cioè composizione e struttura dell'ambiente ospite.

#### 4.3.4.5 Potenzialità

Nei suoi prossimi e previsti sviluppi applicativi l'adozione dei ragni come bioindicatori si ipotizza possa essere applicata soprattutto nella valutazione della qualità ambientale, in particolare degli elementi ecotonali e degli agroecosistemi. Risulta infatti evidente, dall'osservazione diretta, che lungo margini ben conservati di ambienti poco alterati si può riscontrare un'elevata quantità di individui e specie differenti di ragni, come in alcune zone dei coltivi gestiti secondo modalità sufficientemente ecocompatibili.

Sono allo studio diverse possibilità di lettura speditiva dei dati di campagna, che verranno a breve collaudate in ambienti individuati come sperimentalmente accettabili.

Per quanto riguarda invece l'applicazione delle varie metodologie di raccolta e l'interpretazione dei dati derivanti, è necessario completare in modo più soddisfacente la banca dati, che permetterà una più valida interpretazione degli elementi raccolti in natura, ovviamente dopo la corretta determinazione degli esemplari.



### 4.3.5 Esempi

Gli studi attualmente disponibili riguardano tre importanti settori dell'impiego dei ragni come bioindicatori, riferendosi ai danni derivanti da biocidi di differente natura, all'importanza di alcuni fattori ambientali e alle modificazioni nell'araneofauna provocate da alterazioni di origine naturale, come un incendio. Per quanto riguarda invece l'impiego delle popolazioni di ragni come elemento per la valutazione dello stato di conservazione ambientale, soprattutto in aree ecotonali, le metodologie di indagine devono ancora essere ulteriormente affinate, prima di poter essere applicabili a un livello non sperimentale.

Di queste ricerche si sta occupando (con una serie di prelievi e con lo studio dei risultati in differenti aree italiane ed europee) un gruppo di lavoro presso il Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri dell'Università di Pavia. La finalità principale è quella di approfondire le conoscenze ecologiche riguardanti l'araneofauna italiana, per portare avanti il progetto della banca dati dei ragni italiani, finalizzata alla resa disponibile degli elementi biologici ed ecologici necessari all'interpretazione dei dati che progressivamente vengono raccolti nel corso di altre indagini simili.

#### 4.3.5.1 I ragni come bioindicatori di contaminazione da sostanze biocide

Il campo delle indagini sulle ricadute ambientali di sostanze chimiche biologicamente pericolose è un settore di indagine ancora poco approfondito: per questo gli esempi italiani riguardanti l'uso dei ragni come bioindicatori di danni derivanti dalla presenza di sostanze biocide sono piuttosto scarsi, anche se possono essere riferiti a un campionario sufficientemente ampio.

È stato infatti possibile, dall'esame e dallo studio di popolazioni araneiche in ambienti differenti, riconoscere l'impovertimento faunistico provocato da trattamenti (anche insetticidi) in meleti valtellinesi, l'influenza da molto scarsa a nulla dei normali trattamenti anticrittogamici in vigneti pavesi, rispetto all'importanza della presenza di vegetazione erbacea al piede delle viti, e la pesante influenza negativa, ancora a sette mesi di distanza, di uno sversamento di petrolio grezzo nei punti più prossimi al luogo dell'incidente.

Elaborando i dati ricavati da una campagna di trappolaggio in tre differenti meleti produttivi valtellinesi ne è risultata la dimostrazione della probabile forte influenza, oltre che della semplificazione ambientale, dei trattamenti eseguiti con biocidi: infatti, dal confronto con gli indici di comunità forniti da Nentwig (1993) per 68 aree centroeuropee, questi meleti si collocano tra i valori più bassi per l'indice di Shannon-Weaver, compreso tra 1,7 e 2,88 (contro 1,24 e 4,2) e in complesso nettamente al di sotto per l'indice di Evenness, compreso tra 0,22 e 0,38 (contro 0,37 e 0,94). Per completare il quadro con altri dati italiani, in coltivazioni legnose senza trattamenti insetticidi gli indici di Shannon-Weaver e di Evenness sono risultati rispettivamente 3,71 e 0,63 in un oliveto ligure, 3,32 e 0,78 in un oliveto dell'alto Lazio e 3,37 e 0,61 in un vigneto della pianura veronese.

Per valutare invece l'effetto dei trattamenti anticrittogamici sui ragni è stato eseguito un esame comparato di due vigneti posti alle prime pendici collinari dell'Oltrepò Pavese, limitrofi tra loro e gestiti in modo differente: l'uno con dieci trattamenti annui, concimazione delle viti e forte contenimento delle vegetazione erbacea, l'altro con gestione

biologica e contenimento manuale delle erbe al piede delle viti. In questo caso le differenze di popolamento araneico sono risultate estremamente ridotte, e determinate con ogni probabilità soltanto dalla diversa ricchezza della vegetazione erbacea. A conclusioni simili è giunto uno studio eseguito su un campo da golf in Lombardia, con la scarsità di ragni derivante verosimilmente dalla facilità di cattura di questi esemplari da parte dei loro predatori sulle erbe basse e uniformi, anziché dal forte impiego di diserbanti selettivi per la manutenzione del prato.

Di maggior interesse sono stati infine i dati derivanti dallo studio, a sette mesi dall'evento, in aree poste a differenti distanze dal punto di fuoriuscita di petrolio greggio da un pozzo situato in Piemonte. Infatti, pur considerando che la maggior parte dei ragni fosse in diapausa invernale al momento dell'incidente, era stato ipotizzato che la contaminazione potesse aver luogo secondo le seguenti modalità:

- penetrazione del petrolio nella lettiera e negli strati superficiali del terreno, dove sverna la quasi totalità dei ragni europei (circa l'85% secondo Foelix, 1982);
- copertura con conseguente blocco/riduzione degli scambi gassosi e/o penetrazione del petrolio e contaminazione interna delle sacche ovigere destinate alla schiusa primaverile (presente nel 7% circa delle specie europee secondo Foelix, 1982);
- penetrazione dei residui petroliferi dal substrato attraverso le zampe delle specie che non costruiscono apparati di cattura o che non distruggono/ricostruiscono in continuazione le tele, o loro trascinarsi operato dalla pioggia su di esse e ingestione, con la seta, da parte dei costruttori degli apparati di cattura più elaborati;
- intossicazione derivante dall'alimentazione con prede parzialmente contaminate, con possibili effetti di bioaccumulo delle porzioni più lentamente biodegradabili del petrolio.

Nell'area-campione più prossima al punto di sversamento (500 m di distanza) sono stati rinvenuti, con catture a vista, solo 3 esemplari della medesima specie, e nelle altre aree più prossime (650 e 750 m) tutti gli esemplari rinvenuti appartenevano a sole tre famiglie. La presenza di una specie costruttrice di tele elaborate nell'area più prossima alla fonte di contaminazione può però dimostrare l'influenza da scarsa a nulla delle eventuali ricadute sull'apparato di cattura, che viene quotidianamente distrutto e ingerito per essere ricostruito.

Tali dati non sono stati comunque di facile interpretazione, contrariamente a quelli derivanti da un'indagine eseguita impiegando, nella medesima zona, trappole a caduta: passando infatti da una distanza di 2000 metri dal pozzo danneggiato a 6150 metri, il numero di esemplari è andato da 4 a 26, il numero di specie da 2 ad almeno 6, il numero di famiglie da 1 a 4.

#### *4.3.5.2 I ragni come bioindicatori di alterazioni e di disturbo ambientali*

È stato possibile valutare le ricadute sull'araneofauna di un frequente elemento di danno ambientale, costituito dal fuoco, le cui conseguenze sono state rapportate alla sua locale gravità in ambienti prativi e boscati dell'Appennino settentrionale, studiati a due anni di distanza dall'evento.

La massima influenza rilevata ha riguardato la varietà specifica, con numerose specie di ragni, soprattutto nei boschi, rinvenute soltanto in ambienti non danneggiati dalle fiamme. Nei prati invece, dotati di alte erbe non soggette al pascolo, il fuoco sem-

bra aver agito come elemento di rinnovamento, eliminando le porzioni erbacee secche più prossime al terreno, forse anche in grado di intralciare gli spostamenti dei ragni che non utilizzano tele di caccia per la predazione. In questi ultimi infatti è stato trovato il 52,1% degli esemplari rinvenuti in tutte le aree con vegetazione erbacea, danneggiate e non, studiate, mentre per le aree boscate la situazione è stata opposta, con il 70,9% del totale delle catture effettuato in zone non percorse dalle fiamme, a dimostrazione del recupero sicuramente più lento dei popolamenti arboreo-arbustivi e delle loro popolazioni araneiche.

Ugualmente interessante è l'impiego dei ragni nella valutazione dei fattori di disturbo ambientale, tra i quali è stata per ora iniziata un'indagine riguardante i riflessi araneologici di portata e persistenza sul terreno delle acque di piena dei fiumi. Esaminando i popolamenti araneici di spiagge fluviali sottoposte a differente regime idrico durante le esondazioni sono infatti state rilevate notevoli differenze. Infatti lungo fiumi con acque di piena che spesso permangono a lungo sulle spiagge, come il tratto intermedio del Po, ricchezza e varietà dell'araneofauna dipendono anche dalla presenza di ambiti ben conservati, limitrofi alle spiagge, nei quali i ragni possano trovare riparo durante le esondazioni. Tale fattore sembra invece rivestire un'importanza molto più ridotta lungo fiumi con regime idraulico differente, come l'Adda planiziale, dove le acque di piena sostano di norma piuttosto brevemente fuori dall'alveo di magra. A risultati complessivamente simili è giunta un'indagine araneologica eseguita in Val Maggia (Canton Ticino).

#### 4.3.5.3 *I ragni come bioindicatori della qualità ambientale*

Dati più numerosi, in quanto ricavabili da tutte le indagini ecologiche finora eseguite in ambienti naturali e naturaliformi, oltre che in differenti agroecosistemi, possono dimostrare l'importanza degli studi araneologici nella valutazione della qualità ambientale e, nel caso di coltivi, della vicinanza di differenti elementi di margine (siepe, incolto inerbato) nel determinare presenza e abbondanza di ragni nei coltivi e sulle piante che li compongono.

A tale proposito è stata eseguita un'indagine riguardante i ragni catturati su piante di mais della Valpadana interna, situate presso siepi, margini incolti con vegetazione erbacea e al centro dei campi. È stato così possibile dimostrare come le piante con la massima presenza e varietà di ragni sono state quelle prossime a siepi, seguite da quelle presso margini inerbati, in grado quindi anch'essi di fungere da veri e propri serbatoi biologici, riguardo a questi predatori, nei riguardi della coltura studiata.

Pur se a livello piuttosto preliminare, è stato possibile individuare alcuni elementi in grado di modificare profondamente le popolazioni araneiche. Così, per esempio, la presenza di ventosità forte e costante nelle stagioni di attività dei ragni è in grado di impoverire le loro popolazioni in aree particolarmente soggette a tale fattore, come gli ambienti costieri, e lo stesso può essere dimostrabile per zone soggette a incendi frequenti oppure a operazioni forestali non equilibrate (tagli troppo ravvicinati e su superfici ampie, riduzione del sottobosco).

Per esempio sono state fatte raccolte araneiche in alcuni degli scarsi elementi ambientali situati al margine degli ampi coltivi del Foggiano, territorio soggetto a frequenti incendi e sottoposto a forte ventosità quasi costante, per farne una valutazione tramite il confronto con altri elementi simili, situati in altre parti d'Italia e in

situazioni ambientali circostanti completamente differenti. In questo modo è stato possibile stabilire, per aree-campione sufficientemente simili, la seguente graduatoria per gli indici di Shannon-Weaver (H) e Evenness (J): siepione ceduo misto padano H=2,92 e J=0,69, filare misto padano H=2,86 e J=0,58, filare pugliese di olmi H=1,2 e J=0,2. Invece confrontando, sempre con la medesima metodologia, l'araneofauna foggiana delle sponde del Cervaro con quella di altre aree-campione simili in Italia i valori ottenuti sono stati i seguenti: torrente presso il lago di Garda H=3,37 e J=0,84, torrente dolomitico H=1,92 e J=0,74, Cervaro H= 2,86 e J=0,7, rio nell'Isola d'Elba H=2,36 e J=0,6, fiume appenninico presso Urbino H=1,88 e J=0,59. In questo caso quindi la sufficiente estensione della vegetazione lineare lungo il Cervaro e la sua discreta varietà sembrano essere stati sufficienti a determinare (anche in presenza dei fattori negativi territoriali precedentemente esposti) un popolamento araneico abbastanza ricco ed equilibrato.

In modo quindi ancora da approfondire compiutamente, le indagini riguardanti i ragni possono essere validamente adottate, una volta definita a livello applicativo una metodologia standardizzabile, per valutazioni di qualità ambientale di ambienti naturali, naturaliformi e con ogni probabilità anche per alcune tipologie di agroecosistemi.

## Bibliografia

- Ahlgren, I. F.** 1974. The effects of fire on soil organisms. In: **Kozłowski, T. T. e Ahlgren, C. E.** (eds.). *Fire and ecosystems*. New York, Academic Press, 66.
- Alderweireldt, M.** 1989. An ecological analysis of the Spider fauna (*Araneae*) occurring in maize fields, Italian ryegrass and their edge zones, by means of different multivariate techniques. In: **Paoletti, M. G., Stinner, B. R. e Lorenzoni, G. G.** (eds.). *Agricultural ecology and environment*. Amsterdam, Elsevier, 293-306.
- Blandin, P., Christophe, T., Garay, I. e Geoffroy, J. J.** 1980. Les Arachnides et Myriapodes prédateurs en forêt tempérée. In: **Pesson, P.**, (ed.). *Actualités d'écologie forestière*. Paris, Gauthier-Villars, 477-506.
- Booij, C. J. H. e Noorlander, J.** 1992. Farming systems and Insect predators. In: **Paoletti, M. G. e Pimentel, D.** *Biotic diversity in agroecosystems*. Amsterdam, Elsevier, 125-135.
- Chinery, M.** 1993. *Spiders*. London, Whittet Books.
- Dennis, P. e Fry, G. L. A.** 1992. Field margins: can they enhance natural enemy population densities and general Arthropod diversity on farmland? In: **Paoletti, M. G. e Pimentel, D.** *Biotic diversity in agroecosystems*. Amsterdam, Elsevier, 95-115.
- Foelix, R. F.** 1982. *Biology of Spiders*. Cambridge (Massachusetts), Harvard University Press.
- Groppali, R. e Priano, M.** 1994a. Ragni e altri predatori. In: **Montermini, A.** (ed.). *L'Ifantria in Italia*. Bologna, Edagricole, 125-138.
- Groppali, R., Priano, M. e Pesarini, C.** 1994b. Osservazioni sui Ragni (*Araneae*) dei margini di coltivi a mais. *Atti XVII Conv. Naz. Ital. Entomol.*, Udine, 473-476.
- Jones-Walters, L. M.** 1994. *Keys to the families of British Spiders*. Field Studies Council, 197.
- Kromp, B. e Steinberger, K. H.** 1992. Grassy field margins and arthropod diversity: a case study on ground Beetles and Spiders in

- eastern Austria (*Coleoptera: Carabidae; Arachni - da: Aranei, Opiliones*). In: **Paoletti, M. G. e Pimentel, D.** Biotic diversity in agroecosystems. Amsterdam, Elsevier, 71-93.
- Maurer, R. e Haenggi, A.** 1990. Katalog der Schweizerischer Spinnen. Neuchatel, Schweizerischer Bund fuer Naturschutz. *Documenta Faunistica Helvetiae*, 12.
- Nazzi, F., Paoletti, M. G. e Lorenzoni, G. G.** 1989. Soil invertebrate dynamics of soybean agroecosystems encircled dy hedgerows or not in Friuli, Italy. First data. In: **Paoletti, M. G., Stinner, B. R. e Lorenzoni, G. G.** (eds.). Agricultural ecology and environment. Amsterdam, Elsevier, 163-176.
- Nentwig, W.** 1993. Spiders of Panama. Gainesville (Florida), The Sandhill Crane Press, 42-54.
- Uetz, G. W.** 1991. Habitat structure and Spider foraging. In: **Bell, S. S., McCoy, E. D. e Mushinsky, H. R.** (eds.). Habitat structure - the physical arrangement of objects in space. London, Chapman & Hall, 325-348.
- Wise, D. H.** 1993. Spiders in ecological webs. Cambridge, University Press.

#### 4.4 Pesci, anfibi e rettili - Sergio Frugis

##### 4.4.1 Introduzione

Per valutare le possibilità reali e il significato effettivo, specialmente sul piano pratico, dei pesci, degli anfibi e dei rettili quali bioindicatori è indispensabile una premessa di ordine generale valida per le tre classi (a onor del vero dovremmo includere una quarta classe, quella dei Ciclostomi che comprende le lamprede). Diremo subito che alcune caratteristiche e i rapporti filogenetici consentono considerazioni unitarie per le tre (quattro) classi di vertebrati più sopra citate, ma altre caratteristiche estremamente importanti dal punto di vista evolutivo, fisiologico ed eco-etologico meritano di essere esaminate separatamente per ciascuna classe.

Il piano strutturale di tutti i vertebrati è fondamentalmente unico col possesso di uno scheletro interno (endoscheletro) di tipo cartilagineo e/o osseo. Tale carattere, fondamentale evolutivamente, acquista un particolare significato *ambientale* perché richiede adattamenti fisiologici che consentano l'utilizzazione il più possibile efficiente dei sali di calcio che circolano negli ecosistemi. Naturalmente tutte le componenti saline nelle acque dolci (noi non ci occupiamo, in questa sede, di organismi marini o di acque salmastre) o negli alimenti assunti hanno importanza e la loro utilizzazione metabolica richiede adattamenti fisiologici da *vertebrato*. Un tratto fisiologico energetico in comune tra le quattro classi qui considerate è la eterotermia, la regolazione cioè della temperatura corporea, anche nello stadio adulto, basata in gran parte, se non esclusivamente, sulla temperatura ambiente. Non è difficile intuire come le escursioni termiche dell'aria, del suolo e delle acque assumano un ruolo essenziale nella vita di pesci, anfibi e rettili e nella scelta delle caratteristiche ambientali ottimali, anche a livello di microhabitat, nelle quali possano prosperare. I meccanismi attraverso i quali questi animali utilizzano nelle loro manifestazioni vitali

la propria eterotermia si sono quasi certamente evoluti indipendentemente, pur rappresentando sistemi più semplici, e pertanto limitanti, di quelli che hanno portato all'acquisizione della relativa autonomia e migliore sfruttamento di molteplici situazioni geoclimatiche negli uccelli e nei mammiferi attuali con la conquista dell'omeotermia, vale a dire alla (relativa) indipendenza della temperatura corporea da quella ambientale. Tale proprietà, da un punto di vista ecologico, mette queste due ultime classi di vertebrati in una posizione di sicuro vantaggio generale e in una posizione piuttosto diversa quali possibili bioindicatori.

Per quanto riguarda l'alimentazione, pesci, anfibi e rettili, specialmente quelli presenti in Italia, in particolare in Val Padana, sono essenzialmente predatori, almeno nello stadio adulto, e sono da considerare di massima consumatori secondari, a vari livelli, anche in funzione delle dimensioni. Pesci e anfibi, negli stadi larvali e in alcuni stadi giovanili, nutrendosi di sostanze vegetali, sono veri consumatori primari. Alcuni pesci poi, sia della nostra fauna autoctona che di quella di recente introduzione, sono consumatori primari anche da adulti (come alcune delle specie introdotte proprio per il controllo di forme di vegetazione acquatica ritenuta infestante). Per i rettili invece possiamo affermare che nella fauna italiana le specie sono tutte, in qualunque stadio, predatrici; quello che cambia è la dimensione delle prede, a seconda dello stadio di sviluppo, ma ciò non impedisce loro in genere di potersi adattare rapidamente a sfruttare fonti alimentari differenti, anche se spesso non sono in grado di variare passando da una alimentazione di origine animale a una vegetale.

Nei rettili la maggiore omogeneità alimentare è il frutto di una organizzazione morfostrutturale-fisiologica più avanzata, che si apprezza anche a livello delle strutture riproduttive e della loro efficienza; infatti sono, evolutivamente, i primi vertebrati ad avere l'amnios, un importantissimo annesso embrionale che difende l'embrione dagli insulti meccanici e ne regola parte degli scambi metabolici.

La densità (numero di individui per unità di superficie) e la diversità specifica di pesci, anfibi e rettili nei diversi ambienti variano grandemente e, in Italia e nella Pianura Padana in particolare, sono condizionate, in situazioni (teoriche) non degradate, dall'esiguo numero di specie della nostra fauna, per lo meno rispetto ai vertebrati omeotermi. Con le specie recentemente introdotte (circa una dozzina, sino al 1991; Gandolfi *et al.*, 1991), e quelle di presenza accidentale, il numero di specie di pesci delle acque interne italiane, isole comprese, è di circa una novantina; gli anfibi Urodela e Anuri non raggiungono le trenta specie e i rettili, con le tre specie di testuggini marine, comprendono quarantadue specie. Va inoltre ricordato che diverse specie di Urodela, qualche anuro e diversi rettili hanno una distribuzione alquanto localizzata e costituiscono relitti e/o endemismi di cui sappiamo pochissimo. Al confronto, le specie di uccelli che si rinvenivano in Italia sono almeno trentocinquanta e i mammiferi oltre cento.

Anche per quanto riguarda i vertebrati eterotermi il collegamento tra le varie specie e l'ambiente è riconoscibile come diretto, dipendendo dalle caratteristiche fisico-chimiche degli habitat, micro e macroclimatiche, dalla fisionomia della vegetazione ecc. Tuttavia, in alcuni casi, la distribuzione rivela caratteri di discontinuità difficilmente collegabili con evidenti differenze ambientali e le situazioni attuali sono molto spesso dovute a fenomeni di dissesto ambientale, di pesante antropizzazione o a fonti di inquinamento fisico-chimico di difficile lettura e individuazione. In alcuni casi poi le conoscenze distribuzionali attuali, già di per se stesse carenti, non sono riconducibili a

effettive variazioni recenti, per la quasi assoluta mancanza o inaffidabilità delle informazioni precedenti. La relativamente alta vagilità di pesci (nelle acque interne), anfibi e rettili rende difficile l'individuazione di fenomeni successionali in questi vertebrati che, nonostante tutto, sono potenzialmente degli ottimi bioindicatori almeno per le fini differenze di situazioni ambientali.

Questo lungo preambolo ci è sembrato fondamentale per valutare correttamente le potenzialità e l'effettivo uso dei vertebrati eterotermi quali bioindicatori. Allo stato delle attuali conoscenze, che a onor del vero vanno progredendo rapidamente, il pericolo è quello di trarre indicazioni aleatorie circa l'impatto che i vari fattori limitanti possono avere nel valutare lo stato, la presenza e il rischio che corrono molte specie di vertebrati eterotermi sul nostro territorio. Nei paragrafi successivi la trattazione degli argomenti sarà spesso condotta separatamente per le tre (quattro) classi di vertebrati considerate.

#### 4.4.2 Informazioni deducibili

Nonostante la scarsità, la frammentarietà e, spesso, il carattere aneddotico delle conoscenze sulla nostra fauna in generale i recenti e relativamente rapidi sviluppi degli studi ecoetologici sui vertebrati italiani consentono di ottenere dati riferibili allo stato di conservazione ambientale di diverse zone del nostro territorio, in particolare dell'Italia settentrionale, anche se ottimi lavori vengono condotti per l'Italia centrale, meridionale e insulare.

Diversi habitat tipici della situazione italiana vengono sempre più presi in considerazione dal punto di vista ecologico e conservazionistico, con una certa attenzione per le modifiche gestionali degli agroecosistemi (attualmente in atto), ma anche con un occhio particolarmente attento per quelle situazioni colturali dismesse o in via di definitivo abbandono.

Le nuove tecniche di reimpianto forestale e le cosiddette opere di manutenzione delle piantagioni industriali (pioppeti) o dei reimpianti boschivi creano tutte situazioni che cominciano a essere monitorate *ecologicamente* fornendo indicazioni utili per la valutazione dei normali parametri ecologici che ci dicono abbastanza chiaramente se gli interventi praticati o previsti sono, o meno, in grado di garantire un accettabile livello di *sanità ambientale*, presto rilevabile con la valutazione della diversità biotica. Così si è visto che la piantumazione regolare (a intervalli predeterminati) dei giovani alberi (esigenza industriale irrinunciabile nel caso dei pioppeti) non necessariamente è auspicabile, se applicata su larga scala, nel caso dei rimboschimenti veri e propri, perché la presenza su ampie superfici di alberi coetanei espone maggiormente ai rischi di danni da insetti parassiti per la mancanza di una sufficientemente complessa rete trofica che annoveri un numero di specie predatrici o comunque in grado di controllare, anche attraverso la competizione, le specie potenzialmente dannose per la normale crescita degli alberi. Una rapida indagine preliminare e l'accesso agli eventuali dati precedenti potrebbero facilmente indicare le essenze arboree più idonee al rimboschimento, pur tenendo presenti le eventuali esigenze (crescita) di tipo gestionale. La presenza residua di specie di rettili ed eventualmente, in base alla tipologia di partenza degli habitat, di anfibi (quali le cosiddette *rane rosse*), o di bosco permetterebbe di programmare gli interventi atti a mantenere e/o incrementare la diversità biologica, ovvero, in ultima analisi, la pos-

sibile complessità della rete trofica, senza ricorrere a lunghe, costose e quindi spesso irrealizzabili indagini faunistiche sulla entomofauna e sugli altri invertebrati.

Per la valutazione delle condizioni idrogeologiche e più generalmente edafiche della zona in questione, la fisionomia di partenza della località, la sua evoluzione e il suo successo gestionale possono essere dedotte, o anche previste, ricercando, o favorendo, la presenza di radure e di pozze, più o meno permanenti o a solo andamento stagionale, dove è facile desumere informazioni sulla qualità ambientale con la semplice osservazione o la raccolta di uova e/o girini di anfibii Anuri che, per esempio, a seconda delle specie, hanno esigenze di acque con determinate caratteristiche fisico-chimiche (come le escursioni circadiane e stagionali della temperatura). La presenza, l'abbondanza e l'eventuale successo di schiusa e di metamorfosi delle uova delle diverse specie offrono una rapida valutazione del grado di eventuale acidificazione delle acque, dovuta a caratteristiche del suolo e/o alla presenza di fattori artificiali di acidificazione che favoriscono la crescita abnorme della vegetazione acquatica e la conseguente riduzione dell'ossigeno disciolto e del ricambio gassoso in genere. Anche un modesto grado di acidificazione da piogge acide può essere rilevato biologicamente in modo abbastanza rapido, anche se non particolarmente accurato, con l'uso degli anfibii come bioindicatori. La presenza di determinate specie di rettili, la loro abbondanza (più difficile da rilevare) e il ritmo di crescita, con la valutazione delle classi di età, assumono significato di bioindicazione di fattori di squilibrio ambientale o di inquinamento. Ancora, le pratiche di pulizia dei boschi sino alla completa eliminazione del sottobosco sono sicura indicazione di estrema riduzione della biodiversità, con tutte le conseguenze pratiche e i possibili danni che una tale estrema semplificazione delle comunità comporta.

Per quanto riguarda le acque interne, tenendo presente la classificazione del Morandini (1957) che stabilisce in quattro grandi categorie la suddivisione di tali corpi idrici per il ruolo svolto dai pesci quali possibili bioindicatori, interessano:

- a) le sorgenti, intese quali affioramenti naturali di acque dal sottosuolo (in questo contesto, di particolare rilievo è la cosiddetta fascia delle risorgive ai margini della pianura padano-veneta, un tempo "costellata di fontanili, ambienti caratterizzati da acque a temperature pressoché costanti (10-14°C) in tutto il ciclo annuale" (Gandolfi *et al.*, 1991);
- b) i laghi, distinti in diversi tipi a secondo della loro origine e tipologia;
- c) i fiumi, distinti in almeno nove tipologie a seconda delle portate.

Per la presenza di associazioni ittiche, oltre alle portate, diversi altri fattori abiotici creano molteplici condizioni e tipologie, che a loro volta condizionano la composizione di tali associazioni, ma "la maggior parte delle nostre specie non è strettamente vincolata a una particolare condizione ambientale. Ciò determina sovrapposizioni faunistiche nelle zone di transizione da una condizione all'altra, rendendo di difficile applicazione il concetto di *zonazione ittica nei fiumi*" (Gandolfi *et al.*, 1991).

I fiumi europei, e quindi anche quelli italiani, potrebbero essere divisi, secondo Huet (1949), in quattro *zone*, procedendo da monte a valle, caratterizzate ciascuna in base alla specie dominante. Avremmo così una zona a trota, una a temolo, una a barbo e infine una a tinca. Alcuni Autori vi aggiungono una quinta zona, detta *delle acque salmastre*, localizzata negli estuari e delta, dove le acque dolci si mischiano in vario grado con quelle marine salate dando luogo a specchi d'acqua di varia estensione e durata.



Questi ultimi sono soggetti alle maree (se viene mantenuto il collegamento con il mare), possiedono caratteristiche del tutto peculiari e ospitano organismi con speciali adattamenti che consentono loro, tra l'altro, di affrontare e risolvere la regolazione osmotica dei propri liquidi interni (sangue, liquidi intracellulari ecc.) in un ambiente che cambia densità, salinità e conducibilità delle proprie acque, sia ciclicamente (maree), sia a seconda degli apporti di acqua dolce e/o salata, spesso in modo poco prevedibile, comunque in quantità e modi assai diversi a seconda delle fasce latitudinali in cui sboccano i fiumi. Zerunian (1982, 1984) constata però la difficoltà di utilizzare la suddivisione ecologica longitudinale dei fiumi (e torrenti) proposta da Huet e suggerisce di considerare quattro zone ecologicamente così definite:

- zona della trota (specie tipiche sono: la trota fario e, per l'Italia centrale, meridionale e insulare, la trota macrostigma): con acque limpide, ben ossigenate, a corrente decisamente veloce, spesso a rapide; fondo sassoso a massi, ciottoli o ghiaia grossolana; presenza scarsa o moderata di macrofite e temperatura che non supera di regola i 13-14°C;
- zona dei Ciprinidi a deposizione litofila (su fondali ciottolosi; sono specie tipiche: il barbo e il barbo canino): con acque limpide e con "torbide" di breve durata, con correnti veloci alternate a zone in cui l'acqua rallenta e diviene più profonda. Il fondo è a ghiaia fine o sabbia; la presenza di macrofite è moderata e la temperatura raramente supera i 18-19°C;
- zona dei Ciprinidi a deposizione fitofila (specie tipiche sono: la tinca e la scardola): con acque decisamente torbide e corrente decisamente bassa; fondo fangoso; abbondanti macrofite e temperatura che raggiunge anche i 25°C;
- acque salmastre.

Nella classificazione proposta da Zerunian le specie tipiche caratterizzano le diverse zone fluviali perché possiedono una valenza ecologica limitata, specialmente in periodo riproduttivo: le altre specie, a valenza ecologica più ampia, occupando più zone anche in periodo riproduttivo, non sono utili per caratterizzare la zonazione longitudinale dei fiumi e sono da considerarsi, sotto questo aspetto, indicatori ecologici poco validi.

Nei laghi, per la maggiore estensione e profondità delle acque, la zonazione si basa su altri criteri che considerano: una zona litoranea con maggiore o minore vegetazione a macrofite, una zona limnetica (a fanghi e limo) e una distribuzione verticale, spesso assai variabile, con la presenza di specie bentoniche (di fondo) quando i fondali sono sufficientemente profondi.

Nei fiumi dunque la presenza delle specie caratteristiche si presta all'individuazione di tratti abbastanza ben definiti ecologicamente e tali specie potrebbero essere buoni bioindicatori. Tuttavia le introduzioni, spesso di specie estranee alla nostra fauna ittica originaria, e i continui, sovente scriterati, ripopolamenti rendono estremamente aleatorie le caratterizzazioni o la semplice individuazione della qualità degli ambienti lacustri e fluviali. Ciononostante è indubbio che la presenza, soprattutto in periodo riproduttivo, di determinate specie in un tratto di fiume o in una zona di uno specchio lacustre indica acque con determinate caratteristiche fisico-chimiche (temperatura, quantità di ossigeno disciolto, composizione salina e quindi conducibilità, assenza o modesta presenza di sostanze tossiche). Altre specie, come quelle indicate nella classificazione di Zerunian, possono dare rapide indicazioni circa le caratteristiche del fondo, e valutazioni circa la maggiore o minore propensione a raccogliere nel sedimento

determinate sostanze, soprattutto nocive. Queste ultime, in funzione del tipo granulometrico e della composizione del fondo stesso, sono suscettibili di maggiore o minore diluizione, di eventuale eliminazione, di trasformazione in altri composti con differente azione biologica oppure di accumulo, per passare, attraverso la rete trofica, ad altri organismi, anche non legati al mezzo acqueo, sino all'uomo. Naturalmente per potere tener conto di tali indicazioni è necessario conoscere in modo sufficientemente dettagliato la biologia delle specie indicatrici, il che è ancor oggi difficilmente ottenibile.

A seconda delle abitudini di vita dei pesci nei diversi tratti del fiume si possono trarre alcune indicazioni generali sul consumo e sulla richiesta di ossigeno dell'intera comunità biotica di ciascun tratto (i cosiddetti indici di BOC, o consumo biologico di ossigeno e BOD, o domanda biologica di ossigeno). Anche in questo caso però le nostre conoscenze sugli adattamenti fisiologici delle diverse specie, sul *range* di tolleranza di alcuni parametri ambientali e sulla capacità di modificare certi tratti comportamentali per affrontare e/o evitare determinate situazioni sono ancora troppo frammentarie perché le indicazioni ottenibili siano affidabili. Lo stesso può dirsi per gli effetti biologici di determinate sostanze tossiche (fitofarmaci, insetticidi, metalli pesanti ecc.) di cui conosciamo magari l'azione dannosa, le dosi minime tollerabili, ma non i tempi e i modi di denaturazione, di eliminazione e di accumulo.

Il caso delle lamprede (classe dei Ciclostomi) è particolarmente indicativo. Nelle nostre acque interne, a detta degli Autori dell'inizio del secolo, era molto comune almeno una specie, la *Lampetra planeri*, con un ciclo di sviluppo complesso e con uno stadio larvale, l'ammocete, che viveva nei fondali fangosi per anni, filtrando col suo apparato buccale minuscole particelle di cibo (tra cui anche alghe silicee), per divenire adulto dopo una completa metamorfosi, sviluppando tra l'altro gli occhi di cui era privo e una bocca circolare che lo trasformava in parassita esterno dei pesci. Un'altra specie, la lampreda di fiume (*L. fluviatilis*), dopo la riproduzione, tornava al mare, lungo le coste, compiendo una migrazione anadroma nelle acque dolci per la riproduzione. Le carni saporite facevano delle lamprede un oggetto di pesca intensa. Attualmente le lamprede, in tutta Europa, sono in netta diminuzione, sino quasi all'estinzione in Italia e poiché la loro respirazione è branchiale, ma anche cutanea, il sospetto che l'inquinamento dei torrenti e delle acque delle risorgive sia la principale causa della loro quasi totale scomparsa è più che fondato, ma difficilmente dimostrabile. La drastica diminuzione di alcuni pesci essi pure anadromi quali gli storioni, un tempo abbastanza comuni nei nostri maggiori corsi d'acqua, è direttamente imputabile all'intervento umano, con la costruzione di dighe e sbarramenti che impediscono ai riproduttori di raggiungere le basse acque dei torrenti affluenti ove vengono deposte le uova. È chiaro che il valore di queste specie quali bioindicatori è assai modesto per la banalità delle cause che ne determinano la presenza/assenza. In altri casi ancora, per specie dalle esigenze particolari che ne farebbero ottimi bioindicatori, è la mancanza di notizie attendibili e sufficientemente complete per il passato a renderne vano l'uso, come è il caso dello spinarello. Questo "pesciolino", reso famoso dagli studi etologici di N. Tinbergen, è divenuto raro in molti tratti della Valle Padana, si ritiene per l'inquinamento di rogge, canali e fiumicciattoli, suoi habitat di elezione. Un'attenta lettura di un affidabilissimo studioso dell'ittiofauna italiana però ci svela che già all'inizio del secolo lo spinarello "mancava nel Piemonte, in Lombardia e in Sicilia" (Griffini, 1903). Attribuirne dunque l'assenza in tali regioni a fattori recenti è inesatto.

Per quanto concerne gli anfibi vale in linea di massima quanto è stato detto per lam-

prede e pesci, con alcune differenze però sia per gli Urodeli che per gli Anuri. L'impatto dei fattori ambientali, comprese le alterazioni da inquinamento, può essere diverso sia qualitativamente che quantitativamente per le uova, per le forme larvali e per gli adulti. La pelle sottile, che consente una respirazione prevalentemente cutanea, sensibile quindi ai fattori di disturbo o di inquinamento aereo, di rane e rospi adulti (che vivono e respirano fuori dall'acqua) ne fa teoricamente buoni indicatori biologici terrestri, per le alterazioni di habitat. Allo stadio larvale passato in acqua, in cui vengono anche deposte le uova, dove la respirazione avviene dapprincipio attraverso branchie esterne, sono i fattori di inquinamento dell'acqua e delle sostanze deposte sui fondali a essere avvertiti e ad agire in modo differente nei vari stadi. Così è possibile, per esempio, grazie agli anfibii registrare il verificarsi delle piogge acide o appurare la presenza di metalli pesanti altamente nocivi, senza esami tecnologicamente complessi e costosi.

Per gli Urodeli (salamandre e tritoni) le risposte alle situazioni ambientali possono essere diverse nelle forme terrestri, che si portano nei corpi idrici solo per la riproduzione, e in quelle acquatiche, che conducono tutta o la maggior parte della loro esistenza in acqua. La temperatura ha un'importanza fondamentale per entrambi i gruppi, sia per condizionarne i ritmi di attività, sia per determinarne la velocità di sviluppo. La temperatura, inoltre, condiziona direttamente la possibilità della disidratazione in ambiente terrestre, tanto che per le specie ad ampia diffusione si assiste al fenomeno dell'ibernazione e al fenomeno opposto dell'estivazione. L'inizio dell'attività riproduttiva, con l'arrivo alle pozze dove saranno deposte le uova, è finemente regolato dalle minime variazioni ambientali. In una recente ricerca, tuttora in corso presso il Dipartimento di Ecologia del Territorio dell'Università di Pavia, si è potuto verificare come le minime variazioni della temperatura dell'acqua in pozze di deposizione, distanti tra loro poche decine di metri, ma con diversa esposizione alla luce solare e ai venti, determinino differenze di deposizione anche di quindici giorni. Il ciclo comprendente sviluppo larvale, metamorfosi e accrescimento degli individui metamorfosati è anch'esso finemente regolato dalle temperature medie della giornata, dai minimi e massimi e dal grado di umidità dell'aria. Le registrazioni dei ritmi di attività, della durata dei tempi di inattività e del successo riproduttivo delle popolazioni locali potrebbero rivelare la tendenza a variazioni climatiche, prevedendo e anticipando le eventuali decisioni gestionali sul piano agro-forestale. Le dimensioni raggiunte alla metamorfosi sono direttamente influenzate dal pH delle acque e le opportune tecniche di rilevamento consentono di individuare rapidamente sul campo la loro eventuale acidificazione. Presso il Dipartimento di Biologia Animale della stessa Università, sono state svolte ricerche interessanti sulle scelte di habitat per la deposizione delle uova in diverse specie di rane e sulle modificazioni strutturali e fisiologiche negli Urodeli durante l'ibernazione.

Per quel che riguarda i rettili, pur valendo le considerazioni e le possibilità di lettura dei dati indicate per gli altri vertebrati eterotermi, va ricordato che gli aggiustamenti alle situazioni ambientali generali e locali risentono della maggiore capacità di questi animali di ricercare attivamente le condizioni migliori per il normale svolgimento della propria attività.

#### 4.4.3 Metodo d'uso

Le tecniche di raccolta, anche solo temporanea, degli esemplari delle diverse specie sono diverse per pesci, anfibii o rettili.

Un'elencazione di reti, trappole e lacci esula dallo scopo del presente lavoro. Qualunque metodo di cattura si usi, è però fondamentale accertarsi che non sia particolarmente traumatico e sia selettivo. Per i pesci e gli anfibi in acqua viene usato spesso lo storditore che provoca, col suo voltaggio opportunamente tarato, un temporaneo stordimento e facilita la cattura degli esemplari. Per l'impiego di questo strumento sicuramente efficace, ma ben poco selettivo, occorrono permessi speciali, così come per l'uso di reti, nasse e trappole in genere. Molte specie poi godono di assoluta protezione in base a convenzioni internazionali e a specifici regolamenti anche regionali per cui la raccolta deve essere giustificata sul piano scientifico, essere possibilmente temporanea e prevedere il sacrificio solo del minimo numero di esemplari necessario alle analisi istochimiche, alla raccolta di parti anatomiche da esaminare o ai rilevamenti biometrici che non si riescono a effettuare *in vivo*. Per i pesci si può approfittare del materiale raccolto dai pescatori dilettanti o professionisti. Va sempre tenuto presente lo scopo per cui si effettuano le raccolte di materiale e quando possibile è meglio ricorrere all'osservazione. Per lo studio degli spostamenti e dei telerilevamenti diversi sono i tipi di marcatura: dalle targhette metalliche o in plastica alle targhe sottocutanee ai segnalatori radio miniaturizzati, ai radio collari o alla marcatura con sostanze radioattive. Le analisi chimico-fisiche vanno condotte con strumenti adeguati e in laboratori attrezzati, spesso con dispiego di personale e costi non trascurabili che ne giustificano l'impiego in programmi opportunamente progettati. Per il reperimento e il dosaggio di sostanze nocive quali biocidi, metalli pesanti e comunque sostanze tossiche, si è rivelata particolarmente utile la gascromatografia (preferibilmente liquida), mentre le microscopie ottica ed elettronica servono egregiamente allo studio delle alterazioni strutturali dei diversi organi e tessuti.

I metodi di cattura dei rettili con trappole speciali, lacci e altro richiedono l'intervento di personale specializzato e precauzioni particolari nel caso dei serpenti velenosi o decisamente aggressivi. Salvo che si tratti di specie rare o di difficile cattura, l'esame di singoli individui ha ben poco significato per cui si dovrebbero prevedere campionamenti programmati. Naturalmente è indispensabile l'esatta determinazione specifica del materiale da esaminare e/o da marcare. Le normali tecniche di cattura, marcatura (anche temporanea) e ricattura, si sono rivelate utilissime per conoscere la distribuzione delle classi di età (quando queste sono riconoscibili) e il monitoraggio della dinamica delle varie popolazioni. In ogni caso la manipolazione degli animali va compiuta da mani esperte per evitare, come nel caso delle scaglie dei pesci o delle parti delicate (la coda) dei sauri, di causare danni irreparabili agli esemplari.

#### 4.4.4 Discussione

L'impiego dei vertebrati eterotermi quali bioindicatori può essere particolarmente valido teoricamente per una caratterizzazione anche di dettaglio di molti habitat e delle loro condizioni "di salute".

##### 4.4.4.1 Limiti d'uso

Dalla rapida indicazione dei metodi d'uso è facile dedurre che, essenzialmente, i limiti sono dati da:

- necessità di usare una notevole varietà di sistemi di cattura che richiede competenze specifiche, abilità ed esperienza;

- impossibilità di riconoscere molte delle specie nel periodo larvale e spesso anche giovanile;
- necessità di campionare in determinati periodi che coincidano con le fasi di attività e reperibilità delle specie, da un lato, e con i momenti di massimo uso delle sostanze inquinanti immesse nell'ambiente, dall'altro;
- quasi assoluta impossibilità, per i pesci, di avere popolamenti autoctoni di riferimento e popolazioni entro i limiti "normali" di capacità portante del corpo idrico;
- estrema temporaneità di molte pozze di deposizione per gli anfibi che impedisce il monitoraggio dei parametri in corso di studio.

#### 4.4.4.2 Limiti di accettabilità dei risultati

Come per altri componenti delle comunità biotiche, un serio limite all'accettabilità dei risultati è dato dalle ancor scarse e frammentarie conoscenze sulla biologia ed ecologia di molte specie, anche se bisogna riconoscere che negli ultimi decenni si sono fatti moltissimi progressi in questo campo. Il confronto tra diversi habitat e tra tipologie simili in zone territoriali diverse può comunque fornire dati utili, specialmente sulla biodiversità relativa, con l'uso dei comuni indici statistici per i quali spesso l'omogeneità dei dati e la loro comparabilità sono adeguate.

Naturalmente la deducibilità di informazioni accettabili, come indicazione di una determinata situazione ambientale, e le indicazioni suggeribili sul piano pratico per fermare una situazione buona o modificarne altre in senso positivo non dipendono solo dalla qualità (e quantità) dei dati raccolti, ma anche dalla possibilità di confrontare la situazione attuale con quella pregressa. Come per altri elementi floro-faunistici, una delle situazioni che meglio mette in luce tali difficoltà è quella che si presenta dopo un incendio della vegetazione.

Anfibi e rettili sono tra i vertebrati più seriamente compromessi da tale evenienza: spesso anche un incendio che ha interessato un'area di modeste dimensioni può avere catastrofiche conseguenze per piccole popolazioni che potevano costituire ponti di passaggio di materiale genetico tra nuclei limitrofi di individui di una data specie che per un motivo qualsiasi abbia una distribuzione frammentaria.

#### 4.4.5 Problemi attinenti all'applicazione del metodo d'uso

La corretta determinazione sistematica del materiale raccolto o comunque maneggiato è l'esigenza principale per una ricerca corretta. Contrariamente ad alcune prassi ecologiche, suggerite dalla necessità di procedere rapidamente per grandi linee, l'identificazione degli esemplari deve procedere sino alla loro assegnazione alle categorie infraspecifiche, addirittura, se possibile, sino alla popolazione di ecotipi locali. A parte l'ovvia difficoltà che spesso s'incontra nell'assegnare alla specie corretta certe classi di età o stadi di sviluppo degli individui raccolti, bisogna tener presente che per molti anfibi e diversi rettili italiani il livello tassonomico e quindi la loro collocazione sistematica sono ancora *sub judice* e non sempre le nuove decisioni sono accettate da tutti. Le forme giovanili degli eterotermi o le loro forme larvali creano spesso problemi di identificazione insormontabili che limitano l'esatta determinazione agli individui adulti la cui reperibilità è spesso stagionale.

La scelta delle zone da campionare in genere va fatta non in base alla casualità, bensì scegliendo aree particolarmente favorevoli alle specie che si vogliono o devono usa-

re quali bioindicatori. Le zone devono inoltre essere di accesso relativamente facile e tali da consentire la reiterazione delle indagini, l'eventuale nuova cattura, la raccolta di individui "marcati" o da marcare, l'applicazione del metodo della cattura-marcatura e ricattura. Quest'ultimo, infatti, si è rivelato pienamente efficace, in molti casi, per valutare non solo la consistenza numerica di una popolazione, ma anche il suo grado di scambio genetico con le popolazioni limitrofe e non. Come nel caso dei micromammiferi, è preferibile, quando esistono alternative, evitare che il marcaggio sia effettuato con metodi cruenti e/o mutilanti, non tanto per motivi etici quanto etologici, per evitare cioè che l'eventuale, anche lieve, mutilazione possa alterare il normale comportamento degli individui o li esponga a maggiori rischi di predazione, ancora una volta sfalsando quella che dovrebbe essere o rimanere una situazione naturale.

#### 4.4.6 Stato delle ricerche

Data la notevole potenzialità dei vertebrati eterotermi quali bioindicatori di differenti aspetti ambientali, bisogna riconoscere che le ricerche e gli studi specifici sull'argomento rimangono ancora troppo saltuari e frammentari. Recentemente tuttavia, grazie anche alla ripresa degli studi tassonomici cui abbiamo già accennato, la speranza di poter presto giungere all'impiego di *routine* di pesci, anfibi e rettili quali efficaci bioindicatori si va facendo sempre più reale. I lavori di numerosi studiosi italiani e stranieri stanno chiarendo, in parte almeno, diversi aspetti, sin qui trascurati, della biologia di molte entità tassonomiche caratteristiche o addirittura esclusive del nostro paese, mettendo in evidenza la necessità di procedere quanto più è possibile in termini di popolazioni, più che di specie, una volta giunti a una corretta attribuzione *specifica* delle forme coi metodi oggi a disposizione dei sistematici. Spesso infatti siamo di fronte a fenomeni di adattamento a determinanti parametri ambientali, caratteristici di ciascuna popolazione, con risposte differenziate di particolare valenza che limitano l'utilizzo più o meno generalizzabile di una specie quale bioindicatore.

Una chiara indicazione dell'accelerazione delle conoscenze di pesci, anfibi e rettili italiani si può ricavare dalla pubblicazione di opere aggiornate sui pesci delle acque interne (Gandolfi *et al.*, 1991) e degli atti dei convegni di erpetologia, che in questi ultimi anni si svolgono con cadenza annuale. Particolarmente indicativo della qualità delle ricerche in Italia ci sembra la pubblicazione degli Atti del I° Convegno Italiano di Erpetologia Montana (1994), dove per diverse specie vengono affrontati problemi che direttamente o indirettamente interessano l'uso degli anfibi e dei rettili quali bioindicatori. Recentemente poi, nell'ambito dei lavori della sezione di Conservazione della Natura del Dipartimento di Ecologia del Territorio dell'Università di Pavia, si è iniziato un programma specifico sulle differenze temporali del ciclo riproduttivo di alcuni anfibi (Anuri e Urodeli) in località spesso contigue, o molto vicine tra loro, della fascia pedemontana della Pianura Padana novarese. Sempre nello stesso dipartimento si sta esaminando la possibilità di iniziare un programma di ricerca per la riproduzione in cattività, a scopo di reimmissione in natura, di alcuni anfibi italiani a distribuzione limitata al nostro territorio nazionale.

A proposito dei lavori e delle ricerche di Autori stranieri, si deve riconoscere che notevole è il recente contributo alla conoscenza dei molteplici aspetti, ancora poco noti, della biologia dei vertebrati eterotermi, anche se ancora una volta le ricerche specifiche sul valore di questi animali quali bioindicatori sono decisamente trascurate. In Eu-

ropa si sono occupati del problema specialmente svedesi, tedeschi, inglesi, spagnoli, francesi e svizzeri, con studi interessanti, limitati però a singole specie o a specifici aspetti di alcuni fattori ambientali. Le piogge acide, la presenza di metalli pesanti, fertilizzanti e loro metaboliti e altre sostanze chimiche tossiche nelle acque, le bonifiche e il prosciugamento delle zone umide e di molte pozze hanno in notevole misura contribuito a eliminare o a rendere inospitali gli habitat riproduttivi di molti Anuri nei territori scandinavi, come ci dice Maria Berlekom già nel 1985. I problemi di conservazione e gestione del tritone crestato (*Triturus cristatus*) in Gran Bretagna sono stati oggetto di un importante simposio tenutosi nel Surrey nel 1994. Le riviste zoologiche svizzere hanno a più riprese accettato lavori sulla biologia (in particolare sull'ecologia) di rettili e anfibi europei. Oltreoceano, poi, Stati Uniti e Giappone hanno una vastissima produzione scientifica sui vertebrati eterotermi, con ottimi lavori dedicati all'individuazione dei parametri fisico-chimici, ecologici, fisiologici che regolano e/o condizionano la riproduzione, la demografia, la distribuzione e la sopravvivenza dei pesci delle acque interne, degli anfibi e dei rettili. A quanto mi risulta, quasi unicamente nel Nordamerica sono state eseguite ricerche metodiche sulla presenza e l'accumulo di sostanze tossiche (comprese le sostanze radioattive) nei serpenti. Di alcuni composti, a largo impiego in agricoltura, che si riversano tali e quali o metabolizzati nelle acque interne, conosciamo i tassi di accumulo, di trasformazione e di rilascio dopo la permanenza nei tessuti di certi pesci, come avviene per il rotenone in varie specie di pesci Ciprinidi. L'inquinamento delle acque si è dimostrato il principale fattore della depressione dei meccanismi immunitari nei pesci dulciacquicoli (Dunier, 1996). La rapidità di distruzione di habitat e le difficoltà di ripopolamento in anfibi e rettili dopo incendio sono state messe in evidenza negli USA.

#### 4.4.6.1 Potenzialità

Diverse e numerose sono le possibilità e il grado di sensibilità teoricamente insite nell'impiego dei vertebrati eterotermi come bioindicatori. In pratica alcune difficoltà ne restringono l'uso. Per i pesci la confusione attualmente esistente tra le comunità ittiche delle nostre acque interne, la continua introduzione di specie esotiche e il notevole tasso di ibridazione interspecifica complicano non poco la situazione e possono rendere vana l'interpretazione dei dati. Per quanto riguarda anfibi e rettili i problemi sono essenzialmente di altra natura. Le popolazioni di molte specie di entrambe queste classi sono in netta diminuzione, alcune sono estremamente ridotte e altre ultralocalizzate, non è quindi giustificato il prelievo di alcun esemplare che non possa essere rilasciato in brevissimo tempo senza che subisca danno alcuno, anche perché molti taxa godono di una protezione totale in base ad accordi e convenzioni internazionali. D'altro canto molte analisi richiedono materiale abbondante e il sacrificio degli esemplari raccolti, con l'asportazione di tessuti e/od organi per le tecniche istochimiche, la gascromatografia liquida ecc. Coesistono dunque esigenze sovente contrastanti e difficilmente conciliabili.

#### 4.4.7 Esempi

Nonostante la riferita inorganicità e l'apparente poca importanza data alla possibilità pratica di usare i vertebrati eterotermi quali bioindicatori affidabili, si deve riconoscere che attualmente disponiamo di studi sufficientemente aggiornati sulla biologia di

molti pesci delle acque interne e di numerosi anfibi e rettili, con una significativa crescita d'informazioni sulle specie europee e in particolare su quelle italiane. Nei capitoli precedenti si è già presentata l'occasione di citare diverse istanze in cui le recenti acquisizioni consentirebbero di servirsi del materiale biologico eterotermo dei vertebrati per monitorare e valutare con maggior facilità alcuni aspetti importanti delle situazioni ambientali in rapida trasformazione, soprattutto a causa delle attività umane. Non solo, ma la situazione attuale e le caratteristiche demografiche e distribuzionali di molti vertebrati eterotermi italiani consentono una valutazione di quelle che potrebbero esser state le situazioni pregresse di ordine ecologico almeno nell'ultimo secolo. Son già state accennate le cautele da usare per tale tipo di valutazioni. I lavori degli studiosi stranieri sono certamente più numerosi e condotti da più tempo che da noi, ma il *gap* delle conoscenze sulla realtà italiana potrebbe ridursi ulteriormente se l'attuale tendenza a pubblicare lavori di qualità persisterà o addirittura potrà progredire. In altre parole presto dovremmo essere in grado di usare come pratica di *routine* pesci, anfibi e rettili quali efficienti e sensibili bioindicatori. Gli esempi che verranno illustrati qui di seguito sono frutto di una scelta personale, in un certo senso arbitraria, basata sulle conoscenze di chi scrive e considerate tali da indicare al lettore le reali possibilità d'uso. I problemi legati alla trattazione di tre classi di vertebrati (eterotermi, si ricordi) nello spazio loro riservato nell'economia complessiva di quest'opera ci impone di esser sintetici e di limitarci, quando possibile, ai lavori italiani o che riguardano i *taxa* italiani.

#### 4.4.7.1 Pesci, anfibi e rettili come bioindicatori di sostanze biocide

La fisiologia e le caratteristiche strutturali di questi vertebrati risentono direttamente o meno della presenza, della immissione negli ecosistemi e della quantità di sostanze e prodotti che sappiamo essere tossici e addirittura letali in determinate concentrazioni.

Diversi insetticidi a base di cloruri organici (come il Lindano e il tristemente famoso DDT), insetticidi fosforati (Trichlorofon e Dichlorvos, prodotto di degradazione del primo nell'acqua) e l'Atrazina, usatissimo erbicida, sono in grado in diversa misura di provocare una depressione grave delle difese immunitarie nei pesci e, presumibilmente, almeno nelle forme larvali di molti anfibi. Questi prodotti sono di impiego quasi universale in agricoltura e, come per il DDT, nonostante il divieto di impiego in molti paesi, trovano applicazione clandestina, data la disponibilità di scorte ingenti. Praticamente tutti i metalli pesanti (manganese, magnesio, zinco, cromo, rame, piombo e mercurio), oltre ad avere tossicità diretta, sono in grado di causare immunodepressione a livello di vari meccanismi biochimici, anche attraverso una ridotta o alterata azione di diversi ormoni. Non sfugge certo al lettore l'alto rischio cui si espongono molte popolazioni umane (Dunier, 1996).

L'inquinamento atmosferico e l'acidificazione, specialmente delle acque, si è visto che possono condizionare negativamente l'habitat degli anfibi in due modi (Berlekorn, 1985): da un lato l'ambiente chimico viene direttamente alterato dalla riduzione dei valori di pH; dall'altro questi mutamenti chimici agiscono sull'ambiente biologico portando a condizioni di competizione e predazione del tutto nuove. Nei laghi e stagni *acidificati* gli stadi metamorfici (girini) degli anfibi non solo vengono esposti agli effetti diretti dell'aumento di concentrazione degli ioni idrogeno, ma l'acidificazione



aumenta anche l'accumulo di alluminio e altri metalli. Anche i pesci risentono degli stessi effetti delle larve degli anfibi, esse pure come i primi dotati di respirazione branchiale. Le branchie si intasano di alluminio. I pesci, inoltre, si sono dimostrati sensibilissimi all'acidificazione delle acque in cui vivono negli stadi di uovo e avannotti. Anche rettili, sia terrestri che acquatici (*Emys orbicularis* o testuggine acquatica), sono soggetti ad analoghi effetti tossici del loro ambiente, tenendo però presente che la respirazione polmonare li rende molto più sensibili ai fenomeni di accumulo nei tessuti e negli organi. Una delle specie di anfibi per la quale gli studi hanno fornito molteplici utili approcci alla possibilità di usare i vertebrati eterotermi come bioindicatori è la *Rana temporaria*, nelle diverse fasi del suo ciclo vitale. Elevata concentrazione di idrogenioni (pH = 4,5) associata a dosi elevate (rispetto ad acque naturali pure intorno alla neutralità) di ioni monomeriche di alluminio (MAI) mostrano effetti subletali e/o letali, in natura legati soprattutto alla quantità di alluminio presente e alla riduzione della temperatura dell'acqua, mentre, in laboratorio, sembrano prevalere gli effetti del basso pH (Beattie *et al.*, 1992). Diversa sensibilità sembrano avere gli stadi acquatici di *Rana dalmatina*. I tensioattivi (detersivi di uso industriale e domestico) sono molto dannosi per anfibi Anuri e Urodeli, ma la tolleranza alle diverse componenti di questi inquinanti varia a seconda delle specie. Probabilmente questa differenza di risposta deriva anche dalle diverse strategie usate dalle singole specie o, nell'ambito intraspecifico, dalle singole popolazioni, adattate a differenti situazioni ambientali quali la latitudine e l'altitudine (Guyotant *et al.*, 1996).

I rettili, probabilmente anche per il fatto di essere, evolutivamente, i primi vertebrati amnioti, sembra possano essere ottimi indicatori per molti inquinanti ambientali, anche se, ancora una volta, la scarsità di lavori specifici, le relativamente poche specie testate e l'assoluta difformità dei metodi di indagine, che rendono impossibile un'affidabile confronto e generalizzazione delle indicazioni, divengono un ostacolo all'applicabilità gestionale o predittiva dell'uso dei rettili quali bioindicatori.

A mia conoscenza, l'unica esauriente sintesi di quanto si sa degli effetti degli inquinanti ambientali è quella realizzata da Russel J. Hall, per lo statunitense *Fish and Wildlife Service* del Dipartimento degli Interni (1980). Nonostante le specie passate in rassegna siano tutte nordamericane, le conclusioni generali possono valere anche per le specie paleartiche e italiane. Specie anche evolutivamente molto vicine possono differire notevolmente nella loro sensibilità a un dato inquinante. L'affinità sistematica (il grado di parentela) può avere quindi solo un valore indicativo. Le specie ad alto livello trofico sembrano più sensibili ai contaminanti organoclorurati (molti diserbanti e insetticidi), ma in misura assai diversa. L'effetto dei contaminanti varia notevolmente a seconda dello stato fisiologico dell'animale, specialmente nel caso dei prodotti liposolubili che si accumulano nel tessuto adiposo. I metaboliti dei pesticidi e degli altri inquinanti possono essere meno o più tossici e/o accumulabili del prodotto di origine. La maggior parte degli inquinanti agisce su specifici sistemi enzimatici cellulari e quindi tali sostanze possono causare una notevole varietà di effetti subletali in differenti organismi. Le specie, poi, con ciclo vitale lungo tendono a essere danneggiate da quei prodotti inquinanti che sono più a lungo persistenti nell'ambiente. Inoltre le diverse classi di inquinanti possono avere diversi luoghi di azione. Gli insetticidi clorati inibirebbero il trasporto dei cationi, ma quantità a effetto tossico acuto agiscono sulla trasmissione neuronale. Inoltre l'applicazione massiccia e su larga scala di molti insetticidi, come la pre-

senza sul terreno di alte dosi di sostanze tossiche, agiscono direttamente causando la morte dei rettili, anche perché per questi eterotermi bastano assunzioni di dosi molto più basse rispetto a uccelli e mammiferi.

#### *4.4.7.2 Pesci, anfibi e rettili come indicatori della qualità, delle alterazioni e del disturbo ambientali*

Le differenze e le oscillazioni nittemerali e stagionali, anche minime, del grado di ossigenazione (spesso legato alla velocità di scorrimento) delle acque dolci costituiscono una condizione importante per la presenza di determinate specie nei bacini idrici naturali, o comunque minimamente influenzati dalle attività umane. Questa situazione ideale con ogni probabilità non esiste più nel nostro come in molti altri paesi, se si escludono le acque di alta montagna.

Naturalmente molti altri sono i fattori che caratterizzano la diversa qualità delle acque naturali continentali (salinità, conduttività, pH, assenza o presenza percentuale diversa di sostanze chimiche di origine "naturale" ecc.), ma forse ciò che più condiziona i popolamenti animali e, in misura apparentemente minore, anche vegetali, è la temperatura. Teoricamente dunque, conoscendo le esigenze delle singole specie, o perlomeno delle cosiddette specie chiave, potremmo dalla loro presenza-assenza avere una rapida valutazione, sia pur grossolana, sulla qualità delle acque di un tratto di fiume, di un lago, di un fontanile, di una roggia ecc. In pratica però non è sempre così facile per i motivi che sono già stati anticipati. Tutti i composti, più o meno consapevolmente riversati nelle acque dalle attività umane, rendono spesso poco affidabile se non addirittura vana la valutazione biologica delle acque, mentre la valutazione di laboratorio, fisico-chimica, per quanto meno immediata, rimane l'unica affidabile posto che sia possibile reiterare le analisi per poter identificare le variazioni quanti-qualitative di determinati parametri che ci interessa individuare e definire. In laboratorio, poi, è spesso possibile identificare, definire e quantificare diversi fattori biologici importanti, quali la carica batterica. Certamente sarà possibile in futuro trarre dalle componenti biologiche che troviamo nelle acque maggiori e più precise indicazioni anche gestionali del patrimonio idrico.

Quanto è stato detto, sia pur velocemente, a proposito dei pesci, vale anche per gli anfibi, precisando che spesso sono indicatori di qualità, di alterazioni strutturali e/o di disturbo delle acque più le forme larvali, tutti gli stadi acquatici degli anfibi e gli adulti che conducono vita terrestre piuttosto che quelli del tutto acquatici (Urodeli).

Per i rettili la situazione sembra essere meglio precisabile nel senso che sono numerose le specie che con la loro presenza-assenza ci aiutano a capire quali siano le alterazioni ambientali eventualmente intervenute in un determinato territorio e i fattori di disturbo. Così, per esempio, la deforestazione, la semplificazione floristica di un pascolo, l'alterazione della composizione specifica e della fisionomia di una zona boscata sono rapidamente identificabili, non tanto nel loro aspetto, spesso evidente, quanto nel loro impatto sulle comunità animali. Un prato, a prima vista ben conservato, se risulta privo, per esempio, di lucertole è sicuramente poco vario in composizione floristica, è trattato con biocidi o ha il terreno variamente inquinato perché l'assenza o l'estrema rarefazione dei piccoli rettili lacertidi testimoniano un altrettanto pesante assenza o rarefazione di invertebrati (soprattutto insetti). In altre occasioni la presenza o l'assenza di determinate specie di rettili (per esempio ramarri o certe specie di ofidi) stanno a indicare la presenza di caratteristiche dell'habitat alterate nel senso di una

maggior aridità o di una squilibrata evapotraspirazione. Altre volte è la mancanza di una o più caratteristiche tipologiche a rendersi manifesta. Così in una serie di ricerche ancora in corso, presso la cattedra di Conservazione della Natura e delle sue Risorse del Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri dell'Università di Pavia, si è documentata l'importanza fondamentale che riveste la presenza di rive con precise caratteristiche fisionomiche per determinare la presenza in zone palustri della testuggine d'acqua dolce (*Emys orbicularis*). Sponde in leggera pendenza, con vegetazione erbacea presente, con suolo preferibilmente sabbioso e poco cedevole, esposte a sud o sud-est, con poco o nullo disturbo in primavera-estate e vegetazione circostante tale da rendere difficile la predazione, sono elementi indispensabili a garantire un'abbondante deposizione di uova in buche-nido sicure e con una produttività tale da permettere la presenza di una popolazione stabile di questo rettile testudinato, ovunque in netto declino, sino alla locale estinzione (Frugis *et al.*, 1996).

## Bibliografia

- Beattle, R. C. e Tyler-Jones, R.** 1992. The effect of low pH and Aluminium on Breeding Success in the Frog *Rana temporaria*. *Journal of Herpetology*, 26, 4, 353-3660.
- Berlekom, M.** 1985. Frogs. Acid Magazine. National Swedish Environmental Board. Solna. Sweden.
- Gent, T. e Bray, R.** (eds.) 1994. Conservation and Management of great crested newts. Proceedings of a Symposium held on 11 January 1994 at Kew Gardens, Richmond, Surrey. British Nature.
- Dunier, M.** 1996. Water pollution and immunosuppression of freshwater fish. *Ital. J. Zool.*, 63, 303-309.
- Eisler, R.** 1990. Boron hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates. A synoptic review. Biological Report 85 (1.20) April 1990 - Contaminant Hazard Reviews Report 20 Fish and Wildlife Service. US Department of the Interior.
- Fanfani, A.** 1997. Principi di Conservazione della Natura. Casa Editrice Scientifica Internazionale, Roma.
- Gandolfi, G., Zerunian, S., Torricelli, P. e Marconato, A.** 1991. I Pesci delle acque interne italiane. Ministero dell'Ambiente, Unione Zoologica Italiana. Istituto Poligrafico dello Stato, Roma.
- Griffini, A.** 1903. Ittiologia Italiana. U. Hoepli, Milano.
- Guiyetant, R., Batesti, Y., Maud, C. e Nelva, A.** 1996. Preliminary results on reproduction tactics in *Rana temporaria* (Amphibia, Anura) living at high altitudes in the Northern Alps (France). In: Atti del 1° Convegno di Erpetologia Montana. *Studi Trent. Sci. Nat. Acta Biol.*, 71, 253-254.
- Hall Russel, J.** 1980. Effects of environmental contaminants on reptiles: a review. USA Department of Interior, Fish & Wildlife Service. Scientific Report-Wildlife N. 228. Washington DC.
- Huet, M.** 1949. Aperçu des relations entre la ponte et les populations piscicoles dans les eaux courantes. *Scweizer. Z. Hydrol.*, 11, 333-351.
- Malcevschi, S.** 1982. Indici ambientali e studi di impatto. SITE/ATTI 4, Parma.
- Malcevschi, S., Bisogni, L. G. e Gariboldi, A.** 1996. Reti Ecologiche e interventi di miglioramento ambientale. Il Verde Editoriale, Milano.
- Morandini, G.** 1957. Le acque interne. In: L'Italia Fisica, IX. Touring Club Italiano, Milano.

## 4.5 Uccelli e mammiferi - Luciano Bani, Luciana Bottoni, Lorenzo Fornasari e Renato Massa

### 4.5.1 Introduzione

#### 4.5.1.1 Inquinamento

**Definizione:** *introduzione nell'ambiente naturale di sostanze di origine chimica o biologica, o di fattori fisici, in grado di provocare disturbi, danni o alterazioni all'ambiente stesso.*

Nella definizione di inquinamento si fa riferimento ad alterazioni chimiche, biologiche e anche fisiche. Ciò significa che dovrebbero essere considerati effetti di inquinamento non solo quelli misurabili in un corpo d'acqua (o in una porzione di atmosfera o di suolo) in seguito al rilascio di sostanze tossiche estranee all'ambiente, ma anche quelli misurabili su un territorio che venga privato della sua copertura di vegetazione naturale e venga poi ricoperto in misura notevole di cemento e/o di asfalto.

- ALTERAZIONE/DISTRUZIONE DELL'HABITAT E DELLE CATENE ALIMENTARI  
*inquinamento fisico o biologico*
- IMMISSIONE DI SOSTANZE INQUINANTI  
*inquinamento tossicologico*

#### 4.5.1.2 Gli ecosistemi naturali

Gli ecosistemi naturali sono il risultato *pro tempore* di un equilibrio dinamico instauratosi in migliaia o milioni di anni di evoluzione. L'uomo stesso rappresenta una delle specie originatesi nell'ultimo milione di anni nel quadro di questi fenomeni e la sua sopravvivenza è rimasta dipendente fino a poche migliaia di anni fa dagli altri organismi che compongono tale sistema. Di fronte alla fragilità delle catene alimentari, alla struttura complessa degli ecosistemi che può essere facilmente distrutta e modificata, di fronte all'importanza che riveste la diversità biologica come meccanismo di protezione nei confronti dei drastici cambiamenti all'interno dei sistemi ecologici, è ovvio che ci si preoccupi degli effetti che possono determinare talune azioni collettive dell'umanità, per esempio il rilascio di pesticidi nell'ambiente con il risultato del loro bioaccumulo in particolari specie, la rimozione fisica degli habitat o, ancora, la distruzione diretta di specie che occupano posizioni-chiave nelle catene alimentari.

Pertanto, assume un significato sempre maggiore il valore di indicatore di qualità ambientale che spesso viene attribuito alle diverse specie che formano il sistema ecologico.

Per esempio, l'impollinazione di alcune piante diverrebbe impossibile senza gli insetti, la germinazione di alcuni semi non potrebbe avvenire senza il passaggio di questi attraverso il tubo digerente di determinate specie animali, il mantenimento di popolazioni vitali è fortemente condizionato dall'influsso della predazione. Esistono poi molti altri processi ecologici per i quali i meccanismi di azione non sono ben conosciuti o dei quali addirittura non si conosce con esattezza neppure l'esistenza.

Per tale motivo diviene indispensabile adottare misure che prendano in conside-

razione il *monitoraggio degli ecosistemi* e che siano in grado di fornire informazioni circa le strategie di conservazione e ripristino ambientale, soprattutto in ecosistemi fortemente alterati dall'azione dell'uomo. In questo senso il fine ultimo dei monitoraggi ambientali è di verificare l'esistenza delle condizioni necessarie per il mantenimento dell'integrità delle catene alimentari e, quindi, delle reti ecologiche. Queste dovrebbero consentire un equilibrato funzionamento dell'ecosistema e, in caso di prelievo di risorse biologiche, una loro oculata amministrazione che ne consenta un uso sostenibile nel tempo.

#### 4.5.1.3 Fauna e ambiente

In biologia, da molto tempo si studiano i legami esistenti tra l'ambiente e i singoli organismi viventi che vi si trovano.

Le ricerche sull'ecologia animale prendono in considerazione in primo luogo i rapporti tra le diverse specie e le caratteristiche ambientali all'interno dei singoli ecosistemi. A livello di comunità, questo metodo di lavoro si è spesso tradotto nel tentativo di identificare le faune corrispondenti a diverse situazioni ambientali. Una volta noti i fattori ambientali che determinano la distribuzione spazio-temporale degli animali, si possono formulare ipotesi sugli effetti delle perturbazioni su tali sistemi. In tale senso gli animali possono essere utilizzati quale strumento per monitorare la qualità ambientale.

Pertanto, si può definire indicatore un organismo o un insieme di organismi (comunità) che risulti abbastanza strettamente associato a particolari condizioni ambientali e la cui presenza si possa considerare indice di tali condizioni.

Di fondamentale importanza risulta essere la definizione a priori del tipo di disturbo che si vuole misurare e della scala alla quale si vuole indagare l'effetto del disturbo agente sugli ecosistemi.

In generale, vari gruppi di invertebrati fungono da ottimi indicatori a livello di biotopi, habitat e aree geografiche di estensione relativamente ridotta, mentre i vertebrati superiori (uccelli e mammiferi) risultano essere più idonei a monitorare habitat e paesaggi.

In particolare, gli uccelli sono stati più volte utilizzati per valutazioni su larga scala della qualità ambientale e per la pianificazione dell'uso del territorio, trattandosi del gruppo di vertebrati terrestri più ricco di specie e più facilmente osservabile.

Un approccio relativamente più recente risulta essere l'utilizzazione dei mammiferi, e in particolare dei carnivori, quali bioindicatori. Gli studi su questo gruppo di animali si sono fatti sempre più numerosi dopo il recente riconoscimento di alcuni gruppi di mammiferi come potenziali indicatori nel campo di applicazione dell'*ecologia del paesaggio*. In precedenza, l'utilizzazione dei mammiferi quali indicatori ecologici era rimasta relegata allo studio della dispersione di sostanze tossiche nell'ambiente; si utilizzavano topi, ratti, conigli e lepri che venivano trattati come accumulatori di veleni, quali insetticidi ed erbicidi. Tali studi si svolgevano spesso all'interno di laboratori, in condizioni controllate dall'operatore e non prendevano quasi mai in considerazione ciò che poteva effettivamente verificarsi all'interno delle reti ecologiche naturali.

Negli ultimi decenni, sull'onda dell'incidente di Chernobyl, i mammiferi sono stati inoltre utilizzati anche per monitorare l'inquinamento determinato dalla fuoriuscita di elementi radioattivi.

Poiché gli uccelli e mammiferi si trovano ai vertici delle piramidi, essi sono direttamente influenzati dalle popolazioni di specie animali da loro predate e presentano quindi una particolare valenza ecologica. Nella maggioranza dei casi è infatti l'entità delle popolazioni predate a regolare quella delle popolazioni predatrici, cosicché i vertebrati superiori finiscono per riassumere, a livello sia di individui sia di popolazioni, le alterazioni che avvengono lungo l'intera catena alimentare e quindi nel complesso dell'ecosistema.

Nel caso dello studio delle alterazioni chimiche dell'ambiente, uccelli e mammiferi, come strumento di monitoraggio, si differenziano dagli altri gruppi animali a causa della differente sensibilità ai disturbi: in questo caso il carattere che li contraddistingue dagli invertebrati, normalmente utilizzati come bioindicatori, è l'elevata longevità. Per tale motivo, dal punto di vista tossicologico, i vertebrati terrestri risultano maggiormente adatti a misurare effetti di tossicità cronica piuttosto che acuta, per la quale risultano invece più efficienti gli invertebrati.

Inoltre mammiferi e uccelli, come peraltro gli invertebrati, vivono in svariate tipologie ambientali (ubiquità), il che ne consente l'utilizzo come bioindicatori in diverse circostanze.

La presenza di una specie in un determinato habitat non dipende soltanto dalle caratteristiche ambientali della singola stazione di rilevamento, ma anche dalla presenza di habitat simili nelle aree circostanti. Recenti ricerche di ecologia del paesaggio hanno messo in luce come la distribuzione delle specie in habitat frammentati dipenda dalla presenza di nuclei funzionali (*core areas*) di habitat di elevata qualità prossimi tra loro e collegati da corridoi faunistici (*corridors*), che consentano lo scambio genetico tra le diverse sotto-popolazioni che abitano i frammenti di ambiente residuale.

I nuclei funzionali possono rappresentare aree cosiddette di sorgente (*sources*), cioè abitate da sotto-popolazioni stabili, in cui la natalità supera la mortalità; più raramente possono ridursi a gorgi (*sinks*), cioè aree la cui popolazione ha una mortalità superiore alla natalità e dipende quindi dall'immigrazione dalle aree di sorgente. Il complesso di sotto-popolazioni delle sorgenti e dei gorgi presenta scambi genetici e costituisce quindi una meta-popolazione.

I corridoi sono gli elementi del paesaggio destinati a collegare i diversi nuclei funzionali; essi sono aree, talora a sviluppo lineare talaltra a mosaico, che possiedono caratteristiche ambientali tali da consentire alle specie di spostarsi tra i diversi nuclei funzionali attraversando una matrice di ambienti non molto adeguati alla permanenza della specie oppure di colonizzare nuove aree.

Negli ultimi 40-50 anni l'agricoltura ha subito notevoli trasformazioni, determinando profondi cambiamenti nel territorio e nello stato delle risorse naturali. Ciò è avvenuto soprattutto per mezzo di una specializzazione e una concentrazione dell'agricoltura nelle zone di pianura. Si è assistito infatti alla trasformazione fondiaria delle aziende agricole incentrata su un aumento dimensionale degli appezzamenti con una conseguente scomparsa dei tradizionali filari e delle siepi. Inoltre si è assistito a una semplificazione e banalizzazione dell'ambiente rurale: poche specie vegetali vengono coltivate su più vaste superfici e in modo ripetuto, abbandonando la pratica delle rotazioni colturali. Hanno poi avuto una sempre maggior diffusione i prodotti chimici. Benché sia ormai proibito l'utilizzo

di erbicidi e insetticidi altamente tossici, rimane tuttavia legale l'impiego di molti fitofarmaci che, pur non entrando pericolosamente nelle catene alimentari umane, alterano quelle degli ecosistemi naturali. Di pari passo l'impiego massiccio di fertilizzanti artificiali ha alterato il normale sviluppo delle coltivazioni, che ora crescono molto più velocemente. Grazie a un'intensa meccanizzazione dei lavori agricoli, si possono avere più semine e più raccolti in una stessa stagione, con un ambiente in continua evoluzione e sempre meno adatto a ospitare le comunità selvatiche naturali.

Appare quindi importante, per mantenere un certo grado di funzionalità degli ecosistemi naturali in aree fortemente modificate dell'uomo, conservare la più alta diversità ambientale possibile, con il ripristino dei filari e dei boschetti, che oltre che ad avere funzione di zona di rifugio per la fauna, fungono soprattutto da corridoi tra le aree a maggior naturalità (nuclei funzionali), così da aumentare la connettività e diminuire l'effetto della frammentazione all'interno del paesaggio.

La frammentazione agisce sui livelli di popolazione attraverso tre meccanismi principali che concorrono tutti al decremento della diversità biologica all'interno dell'habitat originario: 1) la perdita percentuale di habitat originale, 2) la progressiva riduzione dell'estensione dei frammenti e 3) l'aumento dell'isolamento dei frammenti residui. In paesaggi con proporzioni elevate di habitat originario, i frammenti di estensione ridotta sono ancora situati nelle vicinanze di porzioni di habitat simile di estensione maggiore che fungono da sorgenti e quindi non presentano una marcata diminuzione di specie. Oltrepassato un valore soglia, l'eccessivo isolamento dei frammenti di habitat originario inizia a influenzare in altro modo la dimensione delle popolazioni all'interno dei frammenti, provocando una diminuzione superiore rispetto a quella imputabile alla semplice perdita di habitat. Questa soglia sembra situarsi tra il 10 e il 30% di habitat utilizzabile sia per gli uccelli sia per i mammiferi; quando l'habitat residuo è ridotto a valori di circa il 20%, nel paesaggio iniziano a presentarsi frammenti piccoli e isolati, con un incremento esponenziale nella distanza dei frammenti limitrofi. Tra le specie europee, mostrano questo tipo di occupazione dei frammenti di bosco il picchio muratore *Sitta europaea*, l'arvicola rossastra *Clethrionomys glareolus* e lo scoiattolo *Sciurus vulgaris*. A riprova, la presenza dello scoiattolo in Italia è risultata dipendere dalla distanza della più vicina area di habitat-sorgente nei frammenti boschivi della Pianura Padana, il cui paesaggio è chiaramente alterato oltre la soglia sopportabile, mentre in aree appenniniche meno modificate si registra esclusivamente la dipendenza dalla superficie dei frammenti. Va sottolineato a ogni modo che l'aumento della frammentazione può tradursi in un aumento localizzato della ricchezza e diversità di specie, con effetti più generali che sono però di diminuzione della biodiversità, attraverso la scomparsa delle specie che dipendono direttamente dalla presenza di habitat estesi e continui. L'aumento di biodiversità segue infatti una funzione che evidenzia un incremento di biodiversità iniziale, passando da un habitat uniforme a uno discontinuo (effetto margine), a cui segue una diminuzione progressiva del numero delle specie. È evidente che un tale effetto-margine, negativo, avrà un peso maggiore se le dimensioni dei corpi boschivi sono ridotte, fino a giungere alla totale scomparsa delle specie più sensibili (specie forestali).

Per tutti questi motivi, i vertebrati superiori risultano essere ottimi indicatori utiliz-

zabili sia in studi di monitoraggio, sia in studi finalizzati al ripristino ambientale. Va tuttavia precisato che:

- i vertebrati superiori, come del resto tutti gli animali e le piante, fanno parte di sistemi complessi;
- che i differenti gruppi di animali, così come le differenti specie, rispondono in modo diverso a disturbi simili;
- che le risposte possono apparire diverse in funzione della scala alla quale si sta indagando.

Quindi la scelta dell'indicatore diviene di fondamentale importanza e deve essere sempre attuata in funzione del tipo di disturbo indagato e della scala alla quale si deve effettuare il monitoraggio.

#### **4.5.2 La fauna vertebrata superiore come strumento di monitoraggio ambientale**

##### *4.5.2.1 Uccelli*

Le numerose specie appartenenti alla classe degli uccelli consentono di determinare, con le loro presenze e i loro indici di abbondanza, la distribuzione e la qualità dei diversi ambienti. In Europa, per esempio, durante la stagione riproduttiva sono presenti 514 specie nidificanti, delle quali circa 240 in Italia e 180 in Lombardia.

Gli uccelli sono organismi che si prestano a essere usati come bioindicatori, sia di inquinamento chimico, sia di inquinamento fisico e biologico (alterazione dell'habitat e delle catene alimentari).

Oltre a comprendere specie particolarmente adatte a monitorare l'effetto dell'immissione nell'ambiente di sostanze chimiche tossiche (per esempio insettivori, rapaci), gli uccelli annoverano anche specie e comunità adatte a essere utilizzate come indicatori delle alterazioni strutturali dell'ambiente (per esempio specie forestali ed ecotonali, rapaci). Alcune specie risentono notevolmente gli effetti di frammentazione del territorio e pertanto possono essere utilizzate per monitorare il grado di diversità ambientale e predisporre misure di gestione al fine di aumentare il grado di *connettività* del paesaggio.

##### *4.5.2.2 Mammiferi*

In Europa vivono 184 specie di mammiferi, se si escludono le specie accidentali e quelle introdotte o mantenute e allevate dall'uomo. Ve ne sono 145 di mammiferi terrestri (Insettivori 21, Chiroterri 30, Roditori 52, Lagomorfi 4, Carnivori 25, Artiodattili 13) e 39 di mammiferi marini (Pinnipedi 8, Cetacei 31).

In Italia sono presenti 95 specie di mammiferi terrestri (Insettivori 16, Chiroterri 29, Roditori 23, Lagomorfi 4, Carnivori 14, Artiodattili 9).

Molti studi di monitoraggio ambientale si basano su analisi di tipo anatomo-istopatologico, che misurano gli effetti del bioaccumulo di pesticidi nella fauna selvatica nonché la circolazione di questi composti all'interno delle catene alimentari. I mammiferi, inoltre, sono ancora più sensibili alla distruzione degli habitat. Se per gli uccelli, infatti, il volo facilita i fenomeni di dispersione, per i mammiferi il fatto di doversi spostare a terra compromette notevolmente la possibilità di diffondersi tra parcelle di habitat a loro idonee, le quali si trovano divise da una matrice di ambienti notevolmente trasformati dallo sfruttamento antropico e che rappresentano



una barriera invalicabile per le specie di mammiferi più esigenti (per esempio Carnivori).

### 4.5.3 Informazioni deducibili

#### 4.5.3.1 Comunità di uccelli

Le comunità di uccelli nidificanti appaiono un valido strumento per monitorare la qualità ambientale, per mezzo della distribuzione e dell'abbondanza delle specie. La composizione faunistica rispecchia la fisionomia del territorio, le condizioni climatiche e l'influenza antropica, così come le variazioni che intervengono in essa rispecchiano le modificazioni nella struttura del paesaggio (distruzione degli ecosistemi forestali naturali, modificazione strutturale degli stessi, rimozione di alcuni elementi dell'ecosistema).

I recenti sviluppi dell'ecologia del paesaggio mettono in luce come le caratteristiche ecologiche di singole stazioni dipendano tanto dalle caratteristiche ambientali presenti nella stazione, quanto dalla frequenza e dalla estensione di quelle stesse caratteristiche nel territorio circostante. Ne deriva che l'esistenza e la conservazione delle reti ecologiche dipendono anche dal mantenimento (o eventualmente dal ripristino) degli habitat circostanti e potenzialmente idonei dove, seppur non sia presente la comunità indicatrice nel suo insieme, vi sia comunque la presenza di alcune specie appartenenti a essa.

Le comunità rappresentano quindi ottimi indicatori per quanto riguarda il monitoraggio ambientale a livello di paesaggio o ecosistema, mentre si prestano meno a monitorare gli effetti di particolari sostanze chimiche utilizzate in agricoltura. Per queste indagini risultano essere più adeguati gli studi condotti su opportune specie bersaglio o su particolari specie appartenenti a gruppi omogenei dal punto di vista dell'alimentazione.

Comunità con un elevato numero di specie indicano un'alta diversità ambientale, cioè presenza di habitat eterogenei. Tale situazione rappresenta spesso un buon compromesso in habitat frammentati ma non completamente pregiudicati quali quelli agricoli, in cui la diversità ambientale può essere assicurata dalla presenza dei tradizionali elementi di diversificazione del paesaggio quali filari, siepi, boschetti e piccole zone umide.

#### 4.5.3.2 Passeriformi

Tra gli uccelli, i Passeriformi sono sovente utilizzati quali bioindicatori in ragione del grande numero di specie e della semplicità di rilevamento in quanto uccelli canori.

La presenza di specie bersaglio può infatti indicare l'esistenza di una particolare condizione ecologica. Si possono distinguere specie bersaglio poco selettive le quali possono dare indicazioni circa la quantità di habitat disponibile. Per esempio, l'indice di abbondanza della capinera *Sylvia atricapilla*, rappresenta un buon indicatore della copertura forestale. Le specie bersaglio selettive (oltre a rispecchiare la quantità di una data tipologia ambientale) tendono soprattutto a indicare la qualità della stessa. È questo il caso del picchio muratore *Sitta europaea* che, oltre a selezionare territori con una copertura forestale di discreta estensione, indica anche una buona qualità della vegetazione arborea, vale a dire una formazione boschiva che presenta caratteristiche evolutive naturali o prossime a queste (stadi di media o elevata maturità serale).

I Passeriformi, oltre a prestarsi al monitoraggio di alterazioni strutturali in seno alle reti ecologiche, possono anche dare indicazioni circa l'inquinamento chimico, per mezzo del monitoraggio dei cosiddetti gruppi trofici, insiemi di specie a regime alimentare simile. Semplici variazioni nell'abbondanza dei diversi gruppi trofici possono far presupporre l'esistenza di qualche fattore di disturbo.

Il gruppo trofico dei granivori (per esempio Fringuellidi) può per esempio essere un ottimo indicatore di inquinamento da erbicidi. L'erbicida utilizzato in agricoltura si accumula all'interno o sulla superficie dei semi che vengono ingeriti dagli uccelli. L'effetto di tali sostanze si può misurare quantitativamente attraverso variazioni demografiche e qualitativamente attraverso esami biochimici effettuati sui tessuti degli uccelli.

Allo stesso scopo può essere utilizzato il gruppo trofico degli insettivori, per quanto concerne gli insetticidi.

In alcuni casi i decrementi demografici di determinate specie sono riconducibili a cause diverse, lontane da fenomeni locali quali modificazioni ambientali o inquinamento chimico. È quanto si è verificato per la sterpazzola *Sylvia communis* e per il topino *Riparia riparia*, migratori transahariani, che si riproducono nel Paleartico e svernano in Africa, a sud del Sahara. A partire dagli anni Sessanta, queste specie hanno subito un forte decremento delle popolazioni nella maggior parte dei Paesi europei in seguito a un periodo di eccezionale siccità verificatosi nei quartieri di svernamento del Sahel.

#### 4.5.3.3 Rapaci

I rapaci, sia diurni (Falconiformi) sia notturni (Strigiformi), svolgono un ruolo di fondamentale importanza nel mantenimento dei delicati equilibri dinamici che nella biosfera regolano i rapporti tra produttori (vegetali fotosintetici), consumatori primari (animali erbivori o fitofagi), consumatori di secondo ordine o di ordine superiore (animali carnivori predatori o necrofagi) e bioriduttori (funghi e batteri), che mineralizzano la sostanza organica. La predazione infatti, oltre a svolgere un'azione di controllo sugli animali predati (le popolazioni di predatori sono tuttavia a loro volta controllate da una retroazione esercitata dagli andamenti demografici delle specie predate), esercita anche un'azione selettiva. Per tale motivo la scomparsa dei rapaci all'interno delle reti ecologiche indica un'alterazione dei rapporti all'interno degli ecosistemi e l'instaurarsi di una condizione potenzialmente instabile nei rapporti tra le popolazioni delle prede e dei predatori.

L'accumulo di DDT si è dimostrato fatale per molte specie di uccelli. Il DDT, così come altri insetticidi a base di idrocarburi contenenti cloro, interferisce nel processo di formazione del guscio cosicché le uova risultano più fragili, rompendosi prima della schiusa. Quindi quantità innocue per il singolo individuo risultano invece letali soprattutto per le popolazioni di specie predatrici che si nutrono di prede che, lungo la catena biologica, accumulano tali sostanze chimiche all'interno dei tessuti adiposi. Questo fenomeno ha colpito in particolare modo le popolazioni di falconiformi, che si nutrono tra l'altro di uccelli insettivori (anello della catena alimentare interessato dalla contaminazione di DDT), e quelle di pellicani, che si nutrono di pesci, nel cui tessuto adiposo si riscontra un forte accumulo di tali sostanze insetticide cloridrate. I residui del DDT, infatti, riversandosi in mare, vengono

assorbiti dalle particelle di detrito e vengono poi assorbiti dagli organismi detritivori e dai pesci.

Analoghi risultati sono stati riscontrati per quanto riguarda la concentrazione lungo la catena alimentare di alcuni radionuclidi prodotti dalla fissione atomica, i quali risultano innocui se viene considerata esclusivamente la concentrazione di rilascio, ma che diventano estremamente pericolosi in seguito ai processi di bioaccumulo.

Per tali motivi i saggi di tossicità effettuati sugli organismi senza tenere conto dei processi che intervengono lungo le catene forniscono solo informazioni parziali.

#### 4.5.3.4 Chiroterri

Tutte le specie di Chiroterri italiani sono esclusivamente insettivore. Tale regime alimentare li porta ad accumulare notevoli concentrazioni di sostanze tossiche di origine antropica (piombo e altri metalli pesanti, erbicidi, insetticidi ecc.). Un analogo fenomeno di bioaccumulo è noto anche per altri mammiferi (per esempio insettivori), ma rispetto a questi, i pipistrelli hanno una maggiore longevità (le specie più grandi possono superare i 20 anni di età) e quindi possono accumulare nei propri tessuti concentrazioni più elevate di elementi e composti inquinanti.

La particolare biologia dei pipistrelli li rende inoltre particolarmente sensibili agli effetti degli inquinanti: il basso tasso riproduttivo, i tempi relativamente lunghi di gestazione e allattamento, la tendenza delle femmine a riunirsi in grandi gruppi per il parto e l'allevamento dei piccoli, fanno sì che anche singoli eventi infausti (persino limitati a una sola colonia riproduttiva) possano influire sul popolamento di una intera regione.

I pipistrelli non sono tuttavia soltanto indicatori di inquinanti dal punto di vista tossicologico; è anche vero che la presenza di determinate specie può essere indice di particolari condizioni ambientali. Molti pipistrelli necessitano infatti di determinati habitat per potersi alimentare e riprodurre. Le specie cosiddette fitofile (nottole *Nyctalus* spp., orecchioni *Plecotus* spp. e alcune specie di vespertilio *Myotis* spp.) ovvero quelle caratteristiche delle formazioni forestali, sono legate ad ambienti boschivi più o meno continui e con presenza di almeno alcuni alberi maturi che possano offrire ripari diurni. Una tale situazione è attualmente riscontrabile soltanto in alcuni lembi residui di formazioni forestali naturali e mature, che spesso si trovano ormai talmente isolate le une dalle altre da impedire il necessario scambio genetico tra le diverse popolazioni. Per tale motivo alcune specie di Chiroterri risultano indicatori di ambienti poco alterati o comunque con buona potenzialità.

#### 4.5.3.5 Micromammiferi

Analogamente a quanto si è esposto in merito al ruolo di indicatori svolto dai Chiroterri quali animali predatori di insetti volanti, i mammiferi insettivori possono fornire informazioni circa l'efficienza della rete ecologica nel passaggio tra insetti mangiatori di piante e predatori primari, nonché sull'eventuale influenza di alterazioni chimiche nell'ambiente. Un tale ruolo non può essere invece svolto dai Roditori che sono, a loro volta, prevalentemente fitofagi. Molte specie di Roditori (per esempio il topo selvatico *Apodemus sylvaticus*) possono però essere utilmente impiegate nel biomonitoraggio quali indicatori di contaminazione da pesticidi tramite analisi biochimiche o anatomo-istopatologiche.

Altre volte l'indicazione della contaminazione ambientale può essere messa in evidenza, oltre che da normali analisi di laboratorio sui tessuti degli animali, anche

da variazioni nella densità di popolazione: questi cambiamenti possono essere determinati sia dall'effetto letale che taluni pesticidi hanno sugli individui appartenenti alla popolazione riproduttiva, sia attraverso l'influsso negativo che tali composti hanno sulla riproduzione delle specie, oppure ancora sulla sopravvivenza dei neonati. Non è inoltre da sottovalutare l'influenza che taluni composti chimici utilizzati in agricoltura possono avere sul comportamento degli animali, senza causarne necessariamente la morte.

In generale, la biomassa delle comunità di micromammiferi è correlata alla diversità ambientale sia in modo indiretto in quanto a una maggiore diversità ambientale corrisponde una maggiore biomassa di secondo ordine (entomofauna), sia in modo diretto in quanto la diversità degli ambienti fornisce una maggiore quantità di siti adeguati alla vita degli Insettivori. Per contro, recenti studi provano che la ricchezza di specie dei micromammiferi non è necessariamente correlata alla diversità ambientale. Essa può quindi dipendere da altri fattori, quali l'esistenza di corridoi faunistici che mettano in contatto differenti aree fungendo da vie di diffusione per le specie animali. Analizzando la ricchezza di specie dei micromammiferi, è quindi possibile utilizzarli come bioindicatori a livello di reti ecologiche e quindi di paesaggio.

#### 4.5.3.6 Carnivori

La distribuzione sul territorio dei mammiferi carnivori di media taglia (volpe e Mustelidi), è oggi fortemente influenzata dalla presenza dell'uomo e dalle modificazioni della struttura fisica dell'ambiente. La presenza della volpe *Vulpes vulpes* dipende sia dalla presenza di prede sia dall'esistenza di rifugi adeguati. Nel corso degli ultimi decenni, la volpe ha tuttavia manifestato una confidenza via via sempre maggiore nei confronti dell'uomo e ha iniziato a frequentare ambienti talora anche fortemente antropizzati dove essa ha smesso di cibarsi delle sue prede abituali, sfruttando invece le discariche di rifiuti, spesso localizzate presso la maggior parte dei piccoli nuclei abitati e alle periferie dei grandi centri urbani. Per tale motivo la volpe può essere giudicata un dubbio bioindicatore, in quanto il suo carattere eclettico l'ha ormai portata ad assumere abitudini alimentari diverse da quelle originarie.

Ottimi indicatori rappresentano invece i Mustelidi, quali tasso *Meles meles*, ermellino *Mustela erminea*, donnola *Mustela nivalis*, faina *Martes foina*, martora *Martes martes*, puzzola *Mustela putorius*. In primo luogo si tratta di Carnivori, e quindi al vertice delle catene alimentari; la loro presenza risulta indice di sistemi ecologici in buona salute o non eccessivamente alterati (va tuttavia notato che alcune specie sono più esigenti di altre e quindi più sensibili ai disturbi). Inoltre per quanto concerne l'ecologia del paesaggio i Mustelidi si prestano a monitorare lo stato dell'ambiente nelle sue componenti di diversità spaziale e strutturale.

#### 4.5.3.7 Altri mammiferi

Molte specie di mammiferi terrestri, quali per esempio camoscio *Rupicapra rupicapra*, stambecco *Capra ibex*, lontra *Lutra lutra*, orso *Ursus arctos*, così come la maggior parte delle specie marine (Cetacei e Pinnipedi), hanno una distribuzione talmente ristretta da trovarsi al cosiddetto limite della scala di rarità; ciò compromette un loro utilizzo quali indicatori ambientali di valore generale, pur restando indici di ambienti a elevato valore scientifico e conservazionistico (*hot spots*).

La lontra, laddove le sue popolazioni non risultino così rare e localizzate come in Italia, può essere un ottimo indicatore di qualità ambientale (ambienti ripariali), soprattutto in rapporto alla qualità delle acque.

Altre specie invece risultano inadatte a essere utilizzate quali indicatori degli ecosistemi: la loro presenza sul territorio è infatti controllata soprattutto dall'uomo in relazione al loro elevato interesse venatorio; ciò avviene per esempio per il cinghiale *Sus scrofa*, il capriolo *Capreolus capreolus* e la lepre *Lepus europaeus*.

La lepre è stata peraltro utilizzata quale indicatore ambientale nel monitoraggio dell'inquinamento chimico; in particolare su di essa è stata studiata l'influenza della contaminazione ambientale da parte dei composti organici dello stagno, utilizzati in agricoltura come biocidi nei confronti di batteri, funghi, alghe e invertebrati nonché di alcuni fitofarmaci. Inoltre su di essa si è anche evidenziato il possibile effetto sinergico che potrebbe verificarsi in ambienti contaminati in seguito alla contemporanea presenza di più sostanze chimiche.

#### 4.5.4 Metodi d'uso e loro validità

##### 4.5.4.1 Censimenti

Gli strumenti che consentono la raccolta dei dati sulla distribuzione e sull'abbondanza della fauna sono i censimenti. Tali rilevamenti sono tanto più importanti e informativi quanto più rientrano in ampi progetti di ricerca che si pongano particolari finalità, quali l'*individuazione di aree di interesse conservazionistico*, il *monitoraggio delle popolazioni di animali* oppure la *determinazione dello stato dell'ambiente*.

Alla base di tutti i tipi di censimenti stanno le registrazioni di dati grezzi quali il numero degli individui per unità di superficie ovvero per chilometro percorso o per unità di tempo impiegato. Le osservazioni devono essere effettuate con metodi standardizzati in modo tale da offrire risultati confrontabili, e le aree di studio devono essere chiaramente definite. Quando i rilevamenti interessano le stesse aree in periodi successivi, essi vengono definiti monitoraggi e tendono a identificare cambiamenti nell'abbondanza, nella distribuzione e nell'ecologia delle diverse specie.

Molto importante nei monitoraggi è l'interpretazione dei dati raccolti, che dovrebbero servire a stabilire l'effetto dei cambiamenti ambientali operati dall'uomo sugli organismi. Si tratta di distinguere quando una popolazione risponde al cambiamento del proprio habitat e quando, invece, ad altri fattori globali quali possono essere le diverse condizioni meteorologiche o le variazioni climatiche. Un modo per discriminare le cause umane da quelle naturali è di avvalersi del confronto con ambienti incontaminati. Tuttavia questo tipo di aree è sempre più raro e, talvolta, il loro confronto con gli habitat antropizzati non è sempre attuabile per l'abbondante numero di variabili che entrano in gioco differenziando ogni caso da tutti gli altri. Per mettere in luce le relazioni di causa-effetto, diviene allora indispensabile studiare un certo numero di specie (per esempio comunità), ovvero selezionare le specie le cui fluttuazioni possano riflettere gli andamenti di un gruppo più ampio (per esempio un gruppo trofico) e fornire in tal modo un'interpretazione dell'influenza dei cambiamenti di determinate variabili ambientali. Tutti i metodi utilizzati rappresentano compromessi tra accuratezza dei risultati ed efficienza di lavoro. Infatti, per gli scopi del monitoraggio non è necessario sviluppare metodi esenti da er-

rori, ma piuttosto conoscere l'influenza degli stessi in modo da standardizzarli e rendere i risultati confrontabili da un anno all'altro.

La validità dei risultati ottenuti dipende evidentemente: (a) dalla rappresentatività del campionamento; (b) dalla precisione del metodo di censimento. Data l'importanza di questi concetti, è opportuno spiegarli in qualche dettaglio.

#### 4.5.4.2 Caratteristiche dei metodi di campionamento

Adottare un certo tipo di *campionamento* significa decidere il numero e la distribuzione dei campioni da rilevare per poterli poi utilizzare per estrapolare la densità di popolazione in tutta la zona che interessa. A tale scopo, il requisito essenziale di ogni metodo di campionamento è che il numero e la distribuzione dei campioni selezionati sia rappresentativo dell'intero territorio che si intende studiare.

Tra le tecniche di campionamento più usate ricordiamo:

- il *campionamento casuale semplice*: tra le  $n$  unità che compongono la popolazione statistica se ne estraggono a sorte  $m$  cosicché ciascuna unità ha la stessa probabilità di venire selezionata. Per esempio, su 100 tavolette di una mappa dell'Istituto Geografico Militare se ne estraggono a sorte 10 per decidere quali territori esplorare;
- il *campionamento sistematico*: in questo caso, le unità di campionamento non vengono estratte a sorte, ma sono invece distribuite regolarmente all'interno di tutta la popolazione statistica. Nell'esempio sopra riportato, le 10 tavolette da considerare sarebbero scelte tra le 100 esistenti in ragione di una ogni 10: per esempio la decima, la ventesima, la trentesima e così via andando da sinistra a destra e dall'alto in basso oppure la prima, la undicesima, la ventunesima ecc.;
- il *campionamento stratificato*: prevede la suddivisione di una popolazione eterogenea in alcune sotto-popolazioni omogenee in ciascuna delle quali si effettua poi un campionamento casuale. Per esempio, se tra le 100 tavolette degli esempi precedenti ve ne fossero 20 di montagna, 30 di collina e 50 di pianura, un campionamento stratificato dovrebbe prevedere di scegliere casualmente due tavolette tra le 20 di montagna, 3 tra le 30 di collina e 5 tra le 50 di pianura.

È evidente, dunque, che la proprietà essenziale di un metodo di campionamento è la sua *rappresentatività*, cioè la sua capacità di riflettere fedelmente nei campioni le caratteristiche dell'intera popolazione. La maggiore o minore rappresentatività del metodo è collegata anche alla sua efficienza: il rapporto tra la varianza di una serie di campioni raccolti con un certo metodo rispetto a una seconda serie contenente informazioni già conosciute a priori. Per esemplificare questo concetto si pensi di effettuare una serie di campionamenti, da utilizzare per un censimento, in una vasca da 100 metri cubi nella quale si sa che sono stati rilasciati 100 pesci. Una volta raccolto il campione ed estrapolati i risultati, è possibile verificarne l'efficienza osservando quanto si discosta da 100 il risultato finale.

La terza proprietà importante di un metodo di campionamento è la sua *intensità*, definibile come il rapporto tra le dimensioni del campione e le dimensioni della popolazione statistica. A parità di efficienza, un metodo è tanto migliore quanta più bassa è l'intensità di campionamento richiesta. In altre parole, se il campionamento è bene organizzato, dovrebbe bastare un campione di dimensioni modeste per ottenere un risultato affidabile (si pensi ai cosiddetti *exit-poll* all'uscita delle urne elettorali).

#### 4.5.4.3 Caratteristiche di un metodo di rilevamento

Queste sono legate alla capacità del metodo di minimizzare gli errori di misura nonché di assicurare un elevato rapporto tra benefici e costi. Possiamo così definire un certo numero di parametri.

*Fedeltà*: è la capacità di un metodo di misura di replicare i risultati quando ci si trovi in condizioni identiche.

*Accuratezza*: è la capacità del metodo di avvicinarsi al valore reale, evitando sovrastime o sottostime.

*Sensibilità*: è il potere di risoluzione, ossia la più piccola differenza di valori misurabile; nel caso dei censimenti, la scala non è continua (come quando, per esempio, si pesa un oggetto), ma discreta e la più piccola differenza possibile corrisponde a un individuo in più o in meno. Questa massima discriminazione è evidentemente tanto più facile quanto più piccolo è il numero di individui da contare.

*Precisione*: indica l'intervallo entro il quale si ha una determinata probabilità (in genere del 95%) di trovare il valore esatto della misura che si effettua. Il concetto di precisione comprende quelli di fedeltà, accuratezza e sensibilità.

La mancanza di precisione di una misura può derivare da una mancanza di sensibilità dello strumento di misura oppure da una sua mancanza di accuratezza o fedeltà. È importante sottolineare che *le prestazioni finali dell'intero sistema di misura sono determinate dalle prestazioni della proprietà più scadente*. Per esempio, sappiamo che è inutile fornire un binocolo di altissima qualità a una persona che non è in grado di riconoscere le diverse specie di uccelli e per contro sappiamo che anche il migliore conoscitore di questi non potrà effettuare un conteggio soddisfacente se non dispone di un buon binocolo ovvero se non dispone di riflessi pronti.

*Efficienza*: è il rapporto tra la precisione di una misura e il suo costo.

#### 4.5.4.4 Tipi di errore

Gli errori che si commettono effettuando una misura possono essere *sistematici* ovvero *accidentali*. I primi, che si ripetono sempre in egual misura e segno, sono dovuti a difetti degli apparecchi (includendo in questa definizione anche i rilevatori umani) e si possono evitare eliminando le cause che li determinano. I secondi sono invece dovuti a piccole cause contingenti e possono pertanto essere di entità e di segno variabile. Questi errori non sono mai completamente eliminabili, ma è possibile tenerli sotto controllo calcolando gli scarti ovvero la varianza della serie di valori misurati.

La precisione è pertanto un parametro che dipende dalla particolare tecnologia del metodo impiegato e non ha nulla a che vedere con la scelta di un metodo *assoluto* o *relativo* di conteggio.

#### 4.5.4.5 Metodi assoluti e metodi relativi

Un metodo di censimento assoluto viene definito così perché porta alla determinazione di una *densità di popolazione* (organismi per unità di superficie ovvero di volume) invece che di un semplice *indice di abbondanza*, legato alla densità da una relazione quantitativa non conosciuta (organismi per ora di rilevamento ovvero per chilometro percorso o ancora catturati con una certa rete tesa per un certo tempo e via dicendo).

A prima vista potrebbe sembrare che i metodi assoluti debbano comunque essere i migliori dato che sono gli unici a fornire vere e proprie densità di popolazione. A fron-

te di questo vantaggio, questi metodi risultano tuttavia molto spesso laboriosi e dispendiosi e pertanto poco efficienti. Inoltre, la conoscenza delle densità di popolazioni è spesso poco utile persino ai fini della gestione faunistica di una determinata specie. Può servire ben poco venire a conoscere per mezzo di una lunga e laboriosa operazione di mappaggio il numero di picchi muratori *Sitta europaea* che si possono trovare in un ettaro di foresta quando si può facilmente constatare che gli uccelli sono più abbondanti laddove la foresta è matura mentre diventano molto rari laddove è giovane. Analogamente, ha poca importanza la conoscenza del numero di *Turdus* spp. che svernano in una certa area mediterranea per regolarne l'attività venatoria quando può bastare ripetere anno dopo anno un conteggio relativo che garantisca che l'attività si sta svolgendo senza gravi ripercussioni demografiche.

In generale, quindi, i metodi relativi risultano più semplici e altrettanto utili e pertanto vengono messi in atto molto più spesso di quelli assoluti. Le tecniche di esecuzione sono molto varie e possono comprendere catture con modalità standardizzate per mezzo di reti o trappole, ascolto di vocalizzazioni di uccelli, conteggi di artefatti, ciuffi di pelo o feci, statistiche sul numero di animali di una determinata specie abbattuti in un certo periodo ecc. I metodi assoluti, invece, comportano generalmente un conteggio completo in una serie di piccole aree (ovvero di piccoli volumi d'acqua o di terreno) nonché una successiva estrapolazione dei risultati ottenuti a un'area molto più vasta, omogenea con quella dei campioni.

#### 4.5.4.6 Metodo della cattura e ricattura

Un metodo laborioso, ma molto usato, è quello cosiddetto della cattura e ricattura in cui l'estrapolazione viene effettuata catturando in un'area determinata un certo numero di animali che vengono poi marcati e quindi rilasciati in libertà. Dopo pochi giorni si cattura nuovamente e quindi si desume il numero totale di animali presenti nell'area studiata con una semplice proporzione. Ammettendo di avere catturato, marcato e rilasciato in un'isoletta un totale di 40 lucertole e, dopo una settimana, di averne catturate nello stesso posto 45 di cui 10 marcate, potremmo dire che:

$$10 : 45 = 40 : x$$

e quindi:

$$x = 45 * 40 / 10 = 180$$

Si tratta, quindi, di un metodo assoluto che richiede che vengano attuate due sessioni di catture successive in rapida sequenza, evitando che nel frattempo si possa verificare qualsiasi fenomeno di natalità, mortalità, immigrazione, emigrazione in misura tale da potere invalidare i risultati.

#### 4.5.4.7 Uccelli

*Metodi assoluti (mappaggi).* Nei censimenti dell'avifauna, il metodo più noto è quello del mappaggio; si tratta di un metodo di tipo assoluto in quanto si prefigge il conteggio totale di tutti gli individui, appartenenti a una o più specie, presenti su un'area definita con lo scopo di determinare densità assolute (numero di coppie per unità di superficie). Condizione indispensabile è la presenza stabile degli uccelli nell'area di studio; situazione che per la maggior parte delle specie si verifica sol-



tanto durante la stagione riproduttiva. Il metodo del mappaggio è stato utilizzato a partire dal 1964 dal *British Trust for Ornithology* nel Regno Unito per il monitoraggio dell'avifauna nidificante; il progetto, chiamato *Common Bird Census* (CBC) ha incluso tutte le specie di uccelli trovate nelle aree campione. Il CBC ha concentrato gli sforzi su due categorie ambientali, le zone boschive e le zone agricole, con il risultato che le unità di campionamento selezionate sono rappresentative solo di queste aree e non dell'intero territorio nazionale. Il metodo del mappaggio è comunque altamente costoso in termini di tempo e di impegno di risorse umane ed è certamente più adatto a studi di specie particolari in aree limitate piuttosto che a monitoraggio su larga scala. Il suo successo nel Regno Unito è indubbiamente dovuto alla diffusa cultura naturalistica di quel Paese e non sarebbe facilmente ripetibile altrove.

*Metodi relativi (transetti e punti di ascolto).* Per mezzo dei transetti lineari e dei punti d'ascolto si raccolgono dati sull'abbondanza relativa delle singole specie (indici di abbondanza espressi nei modi più diversi, per esempio uccelli per chilometro percorso a piedi). Ciò consente di raccogliere informazioni sui cambiamenti nell'abbondanza osservabile passando da un ambiente all'altro o da un periodo all'altro dell'anno. Transetti e punti di ascolto possono essere attuati anche nel corso di una sola rapida uscita, determinando uno sforzo per unità di campionamento notevolmente più basso rispetto al mappaggio. Il vantaggio dei metodi relativi consiste anche nella possibilità di ottenere un numero molto più elevato di campioni rappresentativi di habitat e aree differenti con un conseguente aumento della significatività degli indici di popolazione. Inoltre, i due suddetti metodi relativi, se utilizzati entro limiti di distanza predefiniti, si trasformano in metodi assoluti dato che forniscono informazioni sulle densità. Il transetto viene utilizzato di preferenza per la raccolta di dati su aree estese, soprattutto quando ci si trova in ambiente omogeneo. I campionamenti puntiformi, invece, sono più indicati per ottenere informazioni in ambienti eterogenei e sono stati utilizzati come base per tutti i programmi di monitoraggio sugli uccelli nidificanti di sviluppo recente. I dati raccolti con questi programmi permettono di ottenere chiare informazioni sulle fluttuazioni annuali e a lungo termine, interpretabili su base geografica, ambientale, meteorologica o climatica.

*Rapaci.* Il censimento dei rapaci pone particolari problemi a causa della bassa densità con la quale essi sono generalmente presenti sul territorio e per il fatto che essi spesso nidificano in aree remote e inaccessibili.

I rapaci veleggiatori, quali la poiana *Buteo buteo*, il falco pecchiaiolo *Pernis apivorus*, l'aquila reale *Aquila chrysaetos*, possono essere censiti nelle giornate soleggiate, quando il sole riscaldando il terreno determina la formazione di correnti ascensionali che consentono a questi grandi uccelli di veleggiare all'interno dei propri territori.

Per i rapaci non veleggiatori e forestali, come l'astore *Accipiter nisus* o lo sparvierio *Accipiter gentilis*, il censimento può essere effettuato con il metodo cosiddetto del *nest-cluster*. I rilevamenti si effettuano generalmente all'inizio della primavera e prevedono l'annotazione della presenza di individui nei pressi o all'interno dei boschi. In seguito se ne ricercano le tracce nel sottobosco (feci, penne di prede o borre) e infine il nido. Una volta individuato quest'ultimo, si traccia un cerchio sulla mappa che ha come centro il sito di nidificazione in modo da delimitare l'area del territorio di una coppia. A questo punto, si potrà iniziare la ricerca del successivo nido nell'area boscata esterna al precedente cerchio tracciato e così via.

#### 4.5.4.8 Chiroterri

*Conteggio nei rifugi diurni e invernali.* Per lungo tempo l'unica tecnica utilizzata per la raccolta di dati quantitativi sui Chiroterri delle regioni temperate è stata l'ispezione dei rifugi diurni e dei rifugi invernali (posatoi frequentati con regolarità). Applicando questo tipo di rilevamento occorre tenere presente che le varie specie di Chiroterri utilizzano normalmente più rifugi nel corso del ciclo annuale: di solito almeno un rifugio estivo, separato per maschi e femmine, e uno invernale. I due siti raramente coincidono, in molti casi anzi si trovano a decine oppure a centinaia di chilometri di distanza, fatto che implica l'esistenza di veri e propri fenomeni migratori. In estate, le femmine gravide si riuniscono nelle cosiddette *nursery* raccogliendosi in colonie normalmente composte da 10 a oltre 100 individui dove partoriscono e allevano in cooperazione i piccoli. I maschi vivono spesso da soli o in gruppi esigui.

*Impiego di tecniche miste.* La tecnica più completa consiste nel controllo dei posatoi, associato a un rilevamento con l'impiego di *bat-detector*, cioè un apparecchio di ricezione in grado di convertire gli ultrasuoni in una serie di frequenze udibili. Se i rifugi sono di facile accesso, il censimento può essere operato mediante conteggio diretto (posatoi di modeste dimensioni) oppure mediante cattura con reti giapponesi (*mist-nets*), inanellamento e ricattura (posatoi di notevoli dimensioni). Nel caso in cui i posatoi siano inaccessibili, come per esempio in ambienti cavernicoli, la stima del numero di individui può venire effettuata con l'impiego di fotocellule in coppia (che permettono di determinare il numero di passaggi) o di macchine fotografiche (fotografie a intervalli regolari sulle uscite del posatoio) montate all'uscita dei rifugi.

Il rilevamento delle specie arboricole appare più legato a eventi casuali. Per le catture in volo, il metodo più usato utilizza reti verticali a maglia fine montate in postazioni fisse oppure manovrate da uno o più operatori al passaggio degli individui. Discreti risultati si possono ottenere mediante l'utilizzazione di *mist nets* opportunamente tese nei corridoi fra la vegetazione matura ad alto fusto. In alternativa, nel caso di corridoi preferenziali di volo, si può utilizzare la cosiddetta *tuttle-trap*, composta da due intelaiature parallele sulle quali sono tesi fili metallici. L'animale viene catturato quando, in volo, urta nel sistema di fili e cade in un sacco posto sotto l'intelaiatura. Interessanti risultati si ottengono anche mediante l'impiego di sistemi di *mist net* tese nelle immediate vicinanze di sorgenti luminose (lampade, lampioni stradali) che attirando l'entomofauna determinano i percorsi di caccia dei Chiroterri.

*I rilevatori ultrasonici.* L'uso di apparecchiature di rilevamento degli ultrasuoni emessi dai pipistrelli (*bat-detector*) è di fondamentale importanza per il riconoscimento degli individui in volo. Lo strumento seleziona bande di frequenza relativamente ristrette, che vengono semplicemente divise per dieci (per esempio da 100 a 10 kHz), o sottoposte ad alterazioni più complesse, attraverso l'addizione a un segnale oscillatorio interno, che rende i suoni in uscita meglio discriminabili per l'orecchio umano. Ciò che si ascolta è un suono che rappresenta l'intera vocalizzazione; pertanto, anche specie che emettono sulla stessa frequenza possono venire distinte acusticamente in base alla scansione e alla modulazione dei suoni uditi.

L'impiego del *bat-detector* è particolarmente utile per le specie i cui posatoi sono difficilmente localizzabili, oppure sono sparsi in un'area vasta. Con l'ausilio di un rilevatore di ultrasuoni e di un registratore è possibile identificare i Chiroterri presenti in

un'area campione, effettuando un rilevamento della distribuzione delle differenti specie, in stazioni fisse o lungo transekti. Il metodo è consigliato per indagini faunistiche su larga scala, allo scopo di individuare aree di particolare interesse naturalistico oppure per eseguire un programma di monitoraggio ambientale. I suoni registrati sul campo vengono analizzati successivamente in laboratorio e paragonati con le registrazioni di confronto; in questo modo è possibile arrivare alla identificazione di quasi tutti i soggetti registrati sul campo.

#### 4.5.4.9 Micromammiferi

La tecnica più utilizzata per i censimenti dei micromammiferi è rappresentata dal trappolaggio. Tale metodo utilizza due differenti modalità basate sull'uso di altrettanti diversi tipi di trappole: *trappole da morto* e *trappole da vivo*. Le prime basano il loro funzionamento sullo scatto di una molla che attraverso una leva uccide istantaneamente il piccolo mammifero che, attirato da un'esca, cade nella trappola. Le seconde sono costruite in modo da non uccidere l'animale e sono costituite da contenitori che lo ingabbiano oppure da contenitori a pozzo che non ne consentono la fuga una volta che vi è caduto. Chiaramente, le trappole sono di dimensione differente in funzione della taglia dell'animale da catturare.

Le trappole da morto, pur essendo meno accettabili dal punto di vista etico, risultano essere più efficienti e il loro utilizzo può essere giustificato quando oltre alla cattura si intenda prelevare campioni di tessuto dal corpo dell'animale per effettuare indagini di vario tipo. Le trappole da vivo sono invece indispensabili quando si vogliono effettuare accurate stime di densità assoluta mediante la tecnica di cattura-marcatura-ricattura.

Una metodologia frequentemente adottata nello studio dei micromammiferi risulta essere quella relativa all'analisi delle borre dei rapaci notturni (Strigiformi), predatori che si nutrono in prevalenza di questi animali, abitualmente inghiottendo le loro prede intere e dandosi la pena di sminuzzarle soltanto quando sono troppo grosse. Il cibo ingollato viene attaccato dai succhi gastrici, che sciolgono le parti commestibili, mentre rimangono intere le parti ossee, le pelli e i peli dei mammiferi, così come le penne degli uccelli e gli esoscheletri di chitina degli insetti. Le borre, di dimensioni variabili in funzione delle specie di Strigiformi, si accumulano nei pressi dei loro posatoi più frequentati. Dal loro accurato esame si possono trarre molte informazioni circa la fauna locale di micromammiferi.

Per ottenere risultati su vasta scala risulta utile abbinare l'analisi delle borre al censimento delle tane dei micromammiferi, in modo da ottenere sia informazioni qualitative che quantitative circa la composizione faunistica e l'abbondanza delle comunità.

#### 4.5.4.10 Carnivori

Il metodo più utilizzato e più redditizio per la raccolta dei dati sui carnivori di media taglia (mustelidi e volpe) è rappresentato dal rilevamento delle fatte (feci) e delle impronte. Le fatte consentono l'identificazione delle specie presenti sul territorio attraverso la determinazione dei peli in esse contenuti. La presenza dei peli all'interno delle fatte è determinata dalle operazioni di pulizia del vello che l'animale compie abitualmente. Va notato che i peli dei carnivori all'interno delle fatte sono quasi sempre abbastanza facilmente distinguibili dai peli delle specie predate poiché quest'ultimi risultano decisamente più minuti rispetto a quelli dei loro preda-

tori. I censimenti vengono solitamente effettuati secondo metodologie standardizzate in aree campione e rappresentative dei diversi ambienti che fanno parte dell'area di studio.

Un sistema di rilevamento alternativo è quello effettuato tramite l'analisi delle impronte lasciate dai carnivori che si recano presso esche appositamente approntate. L'esca, costituita da pezzi di carne oppure sostanze chimiche di sintesi (per esempio acido capronico), viene messa all'interno di un recipiente contenente un colorante, posto al centro di un'area circolare formata da carta assorbente. In questo modo quando il carnivoro fa visita all'esca lascia sulla superficie della carta le tracce del proprio passaggio.

#### 4.5.5 Tempi

I tempi di rilevamento in campagna dipendono essenzialmente dal ciclo biologico delle specie o dal gruppo biologico considerati, oltre che dalla tecnica di censimento utilizzata.

##### 4.5.5.1 Uccelli

Il periodo della stagione in cui effettuare i rilevamenti dell'avifauna nidificante è compreso tra maggio e giugno, intervallo di tempo che permette di includere l'epoca di nidificazione di tutte le possibili specie ed escludere il principale movimento migratorio.

I punti di ascolto devono iniziare di prima mattina, quando gli uccelli sono più attivi e quindi più facilmente rilevabili. In ogni stazione, durante il rilevamento (in genere 10 minuti), si registrano su un'apposita scheda tutti gli individui di ciascuna specie visti o sentiti e, quando possibile, si segnala il sesso, l'età e le principali attività in corso come, per esempio, canto, trasporto di materiale per il nido, cibo per la nidiata ecc. In questo modo diviene successivamente possibile analizzare i dati sia come numero di individui che come numero di coppie, secondo determinate convenzioni. La metodologia di censimento prevede l'annotazione delle variabili ambientali e la registrazione di alcune condizioni meteorologiche che potrebbero influenzare il rilevamento (temperatura, visibilità, vento, precipitazioni, copertura del cielo), oltre che le condizioni del terreno, la quota e l'esposizione.

##### 4.5.5.2 Chiroteri

Il ciclo biologico dei Chiroteri impone alcune limitazioni nella loro utilizzazione quali bioindicatori. Il numero dei pipistrelli in attività è infatti molto variabile in funzione dei fenomeni meteorologici, del periodo dell'anno e dei ritmi luce-buio. Il periodo dell'involo dei giovani è un momento di forte variabilità per il numero di individui osservabili, così come durante le fasi dello svezzamento le femmine divengono invece meno osservabili; in tali periodi di elevata variabilità numerica negli effettivi, i censimenti non sono molto utili. I rilevamenti vanno quindi effettuati possibilmente nel corso dei mesi di maggio e di giugno, quando le femmine non sono impegnate nello svezzamento della prole e quando ancora i giovani non si sono involati. La scelta della fascia oraria nel corso della giornata si effettua valutando il periodo di massima attività giornaliera, che per la maggior parte delle specie coincide con le prime quattro o cinque ore dopo il tramonto.

Il periodo del letargo può invece essere utile per verificare la presenza delle sostan-

ze chimiche tossiche e dei metalli pesanti in seguito alla mobilitazione dei grassi. A questo scopo risulta utile analizzare i tessuti degli individui deceduti recuperabili in seno alle colonie ibernanti.

#### 4.5.5.3 Altri mammiferi

I mammiferi, in genere, non presentano particolari problemi per la scelta del periodo di censimento, anche se appare opportuno limitare i lavori di campo alla primavera, quando si ha la massima attività dopo il periodo invernale, e alla fase autunnale, quando si assiste a un altro picco di attività in seguito all'approvvigionamento energetico che precede l'inverno.

È tuttavia raccomandabile limitare al più breve intervallo di tempo possibile le operazioni di rilevamento in modo da avere la massima omogeneità tra i dati raccolti.

#### 4.5.6 Conclusioni

È chiaro dunque che l'approccio multidisciplinare può fornire un quadro molto più completo dello stato dei sistemi ecologici, rispetto a quello offerto da studi settoriali di laboratorio. Se da un lato le tecniche di laboratorio consentono di capire i singoli processi che avvengono in condizioni controllate, dall'altro appare indispensabile integrare tali tecniche con indagini di campo a opportuni livelli e scale al fine di verificare l'effetto di disturbi in ambienti complessi quali sono quelli naturali.

Secondo gli attuali principi dell'ecologia integrata, il monitoraggio ambientale non deve considerare soltanto nella valutazione dei disturbi che interessano i singoli habitat, ma deve prendere in considerazione l'intero paesaggio, in ragione del fatto che un eventuale disturbo interessa anche gli habitat adiacenti con i quali si hanno continui scambi energetici.

Le specie di vertebrati terrestri risultano ottimi bioindicatori a livello di paesaggio quando se ne conoscano esattamente le caratteristiche biologiche quali i cicli riproduttivi e la valenza ecologica. Molto importante per questi studi risulta essere la conoscenza della selettività ambientale e delle capacità di dispersione delle singole specie. I vertebrati terrestri appartengono infatti a quattro categorie con diverso grado di selettività ambientale e di attitudine alla dispersione:

- specie non selettive per l'habitat, con grande capacità di dispersione;
- specie non selettive per l'habitat, con bassa capacità di dispersione;
- specie selettive per l'habitat, con grande capacità di dispersione;
- specie selettive per l'habitat, con bassa capacità di dispersione.

È evidente che le prime due categorie non risultano particolarmente utili come bioindicatori, mentre la terza ben si adatta per una gestione complessiva del territorio, in cui le misure adottate riguardano il mantenimento di standard ambientali minimi soltanto in determinate aree. La quarta categoria è invece la più utile per una pianificazione territoriale che riguardi anche la qualità della matrice generale del territorio poiché alterazioni della struttura di questa possono facilmente provocare estinzioni locali mettendo subito in evidenza l'insorgenza di un problema di qualità ambientale.

#### 4.5.7 Stato delle ricerche ed esempi

Per il futuro, l'aspetto più promettente delle ricerche riguardanti l'uso dei bioindicatori consisterà probabilmente nell'uso di dati ambientali in collegamento con da-

ti di distribuzione e abbondanza di particolari specie o comunità per formulare scenari ambientali determinati. È chiaro, per esempio, che le esigenze ambientali dell'alce *Alces alces*, della lontra *Lutra lutra* ovvero dell'albanella *Circus pygargus* sono nettamente diverse dal punto di vista applicativo e anche da quello dell'impegno economico e sociale nella gestione di una determinata porzione di territorio. Opportuni modelli di simulazione matematica, come quelli recentemente applicati nei Paesi Bassi, pongono le basi per un modo nuovo e molto più ampio di intendere i bioindicatori, non solo per diagnosticare situazioni di degrado locale più o meno grave, ma anche e soprattutto per pianificare il ripristino di un paesaggio di elevata qualità a livello provinciale o regionale. Da questo punto di vista, si deve onestamente dire che, nel nostro Paese, c'è ancora moltissimo da fare. Urge soprattutto la produzione di archivi a scala dettagliata delle caratteristiche ambientali salienti del territorio nazionale per potere mettere in relazione questo tipo di informazioni con la presenza e l'abbondanza di determinate specie o comunità faunistiche. Uno sforzo notevole in tal senso è attualmente in atto in Lombardia nel Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio (DISAT) dell'Università degli Studi di Milano, per descrivere in dettaglio lo stato attuale di qualità e frammentazione del territorio e il suo uso funzionale da parte dei vertebrati. C'è da augurarsi, perciò, che questo appuntamento non venga mancato dai nuovi progetti su scala regionale o nazionale sulla distribuzione e l'abbondanza dei vertebrati terrestri.

## Bibliografia

- Andrewartha, H. G. e Birch, L. C. 1984. The Ecological Web. The University of Chicago Press, Chicago.
- Bibby, C. J., Buegess, N. D. e Hill, D. A. 1992. Bird Census Techniques. Academic Press, London.
- Bischoff, N. T. e Jongman, R. H. G. 1993. Development of Rural Areas in Europe: The Claim for Nature (Preliminary and backgrounds studies), V79. Netherlands Scientific Council for Government Policy.
- Di Fidio, M. 1995. Difesa della natura e del paesaggio. Pirola.
- Fasola, M. (ed.) 1989. Atti del II seminario Italiano Censimenti Faunistici dei Vertebrati. *Sup - pl. Ric. Biol. Selvaggina*, XVI.
- Fornasari, L., Bani, L., Bonfanti, I., De Carli, E. e Massa, R. 1998. A carnivore survey in a man-modified land: North-Western Lombardy. In: Griffiths, M. I. e Buskirk, S. W. (eds.). "Mustelids in a modern world". In stampa.
- Fornasari, L., Bani, L., Bonfanti, I., De Carli, E. e Massa, R. 1998. Species sensitivity concept as an approach for landscape evaluation. Proceedings of the 14<sup>th</sup> Int. Conf. of EBCC, Cottons, in stampa.
- Harms, W. B. 1995. Scenarios for nature development. DLO Winand Staring Centre. Wageningen, The Netherlands.
- Ingegnoli, V. 1997. Esercizi di Ecologia del Paesaggio. Città Studi Edizioni, UTET.
- Jeffrey, D. W. e Madden, B. 1991. Bioindicators and Environmental Management. Academic Press, London.
- Massa, R., Boni, L., Bottoni, L., De Carli, E., e Fornasari, L. 1998. Birds as a tool for a "landscape toxicology". Proceedings of the 14th Int. Conf. of EBCC, Cottons, in stampa.
- Massa, R., Bani, L., Bottoni, L. e Fornasari, L. 1997. An evaluation of lowland reserve effectiveness for forest bird conservation. First Mee-

ting of the European Ornithological Union, in corso di stampa.

Wiens, J. A. 1989. The Ecology of Bird Communities - Vol. 1 & 2. Cambridge University Press, Cambridge.

## 4.6 Mammiferi, danno a livello cellulare - Carlo Alberto Redi, Silvia Garagna e Maurizio Zuccotti

### 4.6.1 Introduzione

Tutti i sistemi agro-forestali ospitano una vasta comunità di specie animali, potenziale bersaglio di agenti inquinanti introdotti passivamente (per esempio, da ricaduta con le piogge o con i fumi portati dai venti) o attivamente (per esempio, pesticidi e fertilizzanti per la migliore resa delle attività produttive) nell'ambiente. La bio-disponibilità degli agenti xenobiotici in un ecosistema determina poi la loro assunzione da parte degli animali per via topica e per via alimentare (le due principali vie di assunzione), grazie anche alla catena trofica che lega gli invertebrati ai vertebrati. È oggi accettato dalla comunità scientifica che una corretta valutazione della qualità ambientale di un sistema agro-forestale possa essere stabilita solo con l'impiego congiunto di parametri chimico-fisici e di bioindicatori del rischio biologico. Questa procedura sottende un valore aggiunto molto significativo per le metodologie che stanno alla base della rilevazione dei contesti chimici e biologici; semplificando: la metodologia che utilizza i parametri chimico-fisici è prevalentemente di tipo induttivo (studio della presenza e concentrazione di determinate sostanze per verificarne gli effetti), quella che impiega i bioindicatori è di tipo deduttivo (dagli effetti si risale alla causa). È chiaro che negli scenari ambientali attuali, in cui la qualità ambientale di un sistema agro-forestale dipende da fattori prossimi (per esempio tipo e concentrazione di pesticidi) e da fattori lontani (per esempio qualità e quantità delle ricadute atmosferiche), l'uso di bioindicatori aumenta la possibilità di individuare situazioni di inquinamento e rischio ambientale che specificatamente caratterizzano una determinata area. In particolare, con opportune metodologie di tipo comparativo, evidenzia le condizioni nocive area-specifiche in quanto permette di valutare variabili di fondamentale importanza, quali:

- assunzione e biodisponibilità dei inquinanti presenti e potenzialmente tossici;
- azione genotossica derivante dalla assunzione combinata di diverse sostanze simultaneamente presenti, anche nei limiti normativi; (certamente è questo il valore aggiunto dei saggi che impiegano reagenti biologici);
- individuazione di sostanze di nuova produzione industriale, sintetizzate *ex-novo*.

La linearità della relazione tra concentrazione/dose degli agenti tossici ed entità degli effetti dannosi ne permette un utilizzo non solo di tipo qualitativo (descrittivo), ma in particolare quantitativo. I bioindicatori sono quindi ottimi sistemi di misura per la qualità ambientale.

È bene ricordare che la sola industria chimica sintetizza ogni giorno due-tre nuove molecole (di cui è sconosciuta l'azione biologica) e per il legislatore nazionale e sovranazionale, quanto per il responsabile locale, si innesca un meccanismo di rincorsa per verificarne il potenziale rischio per la salute dell'uomo e dell'ambiente. L'impiego di metodiche tradizionali, che forniscono parametri chimici e fisici, per stabilire i valori normativi di riferimento, presenta, in questo nuovo scenario, dei limiti concettuali e operativi che solo l'impiego dei bioindicatori permette di superare. *Concettuali*, poiché le valutazioni di rischio sono riferite a condizioni ideali di studio in cui viene assunta la presenza del solo agente in esame, mentre la maggiore potenzialità genotossica è in realtà esercitata da miscele di agenti, come si ritrovano negli ambienti urbani, agricoli e industriali; purtroppo, nello stabilire i livelli normativi di presenza di determinate sostanze, non viene superato, per ragioni tecniche, questo grave inconveniente. *Operativi*, per il tempo necessario allo svolgimento di indagini di chimica analitica per valutare le concentrazioni ambientali e stabilire la dose letale o potenzialmente genotossica grazie alla sperimentazione in laboratorio. L'utilizzo di bioindicatori permette di giungere in tempi brevissimi a conclusioni solide per indicare la presenza o meno di rischio biologico (per esprimere quindi la qualità di una determinata area).

#### **4.6.2 Informazioni deducibili**

L'utilizzo dei mammiferi quali bioindicatori permette di rilevare la qualità ambientale dei sistemi agro-forestali (per esempio degrado, frammentazione, inquinamento). Il monitoraggio dell'inquinamento, con tecniche biologiche che si avvalgono dei mammiferi quali bioindicatori, permette di evidenziare fundamentalmente il rischio ambientale, inteso come rischio nel fruire di una determinata zona (per viverci: sito abitativo o di lavoro; per utilizzarne risorse trofiche ivi prodotte, considerando il fatto che tutte le sostanze utilizzate per le attività produttive dei sistemi agro-forestali, o che li colpiscono involontariamente, per esempio per l'uso di acque contaminate, entrano nella catena trofica).

I mammiferi hanno una grande capacità di tamponare le variazioni ambientali (intese in senso lato), ivi comprese quelle negative, adattando i propri processi fisiologici alle mutate condizioni, grazie all'accendersi di meccanismi di riparo. La rilevazione in termini bio-medici del funzionamento di questi processi (unito al fatto che i mammiferi si ritrovano in tutti i tipi di ambiente o vi possono essere posizionati) trasforma i mammiferi in bioindicatori d'uso universale per valutazioni di danno e rischio ambientali nonché per monitorare la presenza di sostanze xenobiotiche e agenti di natura fisica potenzialmente dannosi. I danni possono anche esprimersi a livello di comunità (con la rarefazione della diversità di specie presenti o con un diminuito numero di individui per specie presenti, con la loro scomparsa/comparsa) a livello di singoli individui (con alterazioni delle condizioni etologiche, morfologiche e fisiologiche ritenute tipiche per quella specie).

Il quadro concettuale all'interno del quale si attua l'utilizzo di mammiferi quali bioindicatori dell'inquinamento e del rischio ambientale di un'area agro-forestale deriva proprio dalla possibilità di seguire metodologie canonizzate per il loro censimento e la valutazione del loro stato di salute, ricavandone in tal modo indicatori del rischio biologico: mutagenesi, genotossicità, teratogenesi e cancerogenesi.



### 4.6.3 Metodo d'uso

Tutti i mammiferi, sia micromammiferi sia macromammiferi, presenti nei sistemi agro-forestali sono utilizzabili per saggi capaci di rivelare il rischio biologico; tutte le sostanze utilizzate, anche in addizione, nella produzione, gestione e fruizione dei sistemi agro-forestali, sono monitorabili (come pure condizioni e attività correlate, quali inquinamento delle acque, dell'aria, luoghi di scarico e deposito, stabulazione di animali domestici, confronto agricoltura biologica verso tradizionale) con una indicazione finale di quantificazione del danno e del rischio biologico. Anche le aree desertificate possono essere monitorate con micromammiferi posti in condizioni di esposizione al rischio per tempi prescelti. Risulta chiaro come negli attuali contesti ambientali sia auspicabile il monitoraggio del rischio biologico per la costruzione di maglie di rilevamento, eco-spaziali ed eco-temporali e per archivi storici, quali utili strumenti di monitoraggio e verifica della corretta politica di programmazione e gestione delle aree agro-forestali soggette a inquinamento (dati ante- e post-utilizzo), nonché del loro recupero per futuri insediamenti.

Per dare a ricercatori e amministratori operanti nel campo ambientale strumenti incisivi di indagine, le due principali agenzie di monitoraggio e di sviluppo delle strategie per la valutazione dei danni genotossici (da agenti chimici e fisici), la statunitense Environmental Protection Agency (EPA) e la Commissione Europea (Direttorato Generale XI, Ambiente Sicurezza nucleare e Protezione civile e XII, Scienza, Ricerca e Sviluppo), hanno da tempo elaborato delle linee guida e delle raccomandazioni specifiche al riguardo. Di recente, per il monitoraggio dei danni ambientali dovuti a inquinamento da agenti chimico-fisici e per la valutazione e gestione del rischio biologico che ne deriva, entrambe le agenzie suggeriscono, accanto all'impiego di saggi di tipo tradizionale, quali la valutazione della morfologia (SMT) e del grado di aneuploidia (SAT) degli spermatozoi, con particolare riferimento a quelli dei piccoli Roditori, e l'analisi della frequenza di micronulei negli eritrociti policromatici (MPCE), anche l'utilizzo del saggio "cometa" (COMET assay, Fairbain *et al.*, 1995).

### 4.6.4 Discussione

A livello organismico, gli indicatori più significativi nei mammiferi sono le cellule germinali (spermatozoi e oociti, in tutte le fasi dello sviluppo degli individui) e le cellule nucleate del sangue (gli eritrociti; i globuli rossi maturi dei mammiferi sono anucleati). Sono questi i reagenti biologici di maggiore interesse poiché presentano le caratteristiche citologiche più idonee (ciclo cellulare continuo e citodifferenziazione) a individuare interferenze con il ciclo cellulare (preposto alla generazione di nuove cellule nei sistemi istologici soggetti a rinnovo), capaci di esprimere danni, e poiché sono preposte alla formazione delle nuove generazioni (basti pensare al capitale di germoplasma costituito dagli spermatozoi e dagli oociti degli operatori esposti alle sostanze inquinanti dei sistemi agro-forestali e a quelli delle specie animali di interesse economico che fruiscono di tale sistemi) e alla formazione di cellule la cui non corretta differenziazione è immediatamente evidente per i negativi effetti sulla salute dell'uomo e degli animali. Certamente la facilità del prelievo di queste cellule rispetto ad altre, per esempio quelle del fegato e del rene, prelievo effettuabile anche senza sacrificio dell'animale, ne ha privilegiato l'uso per lo sviluppo dei saggi biologici. Saggi di ultima generazione, quali il saggio COMET, sono comunque attuabili su qualunque tipo cel-

lulare. La legislazione italiana (recependo un suggerimento della Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale, CCTN, del 1987) indica una procedura di saggio per stabilire la mutagenicità delle sostanze in esame che, seguendo le linee guida adottate anche da altri Paesi, prevede tre livelli di indagine.

Al primo livello si valutano l'azione sui geni degli eucarioti, i danni cromosomici ai mammiferi e il danno al DNA. Gli effetti a livello biochimico e molecolare possono essere rivelati come alterazioni nei livelli enzimatici, nella struttura delle membrane cellulari e nella struttura del DNA. È chiaro come questi cambiamenti a livello subcellulare inducano una serie di risposte strutturali e funzionali al successivo livello di organizzazione biologica. Per esempio, complessi processi come la regolazione ormonale, il metabolismo basale, la risposta del sistema immunitario possono essere danneggiati da agenti inquinanti e questi primi effetti possono eventualmente alterare la capacità dell'organismo di crescere, riprodursi e anche sopravvivere. Tutti questi cambiamenti sono misurabili e servono come bioindicatori della pressione ambientale da inquinamento e, cosa ancora più importante, indicano precocemente il danno ambientale.

Al secondo e al terzo livello si prevede l'impiego delle cellule germinali e delle cellule nucleate del sangue per rilevare indizi significativi della qualità ambientale.

Tra i molti saggi attuabili, la valutazione integrata dei dati ottenibili da quelli SMT, SAT, MPCE e COMET, anche su una sola specie di mammifero, permette di valutare con grande attendibilità il rischio biologico in un'area di interesse, come si voglia estesa. È comunque bene considerare più specie, ottenendo così garanzie di poter valutare una maggiore o minore specie-sensibilità a un agente inquinante. Un fenomeno di questo tipo può verificarsi infatti, per citare un esempio, in conseguenza delle diverse abitudini di vita degli animali, quali il contatto o meno con il terreno e il tipo di alimentazione. L'uso dei micromammiferi assicura un massimo di contatto con i terreni. Il numero di siti di campionamento varia in dipendenza del grado di disomogeneità dei fattori biologici, chimici e geologici che caratterizzano l'area in studio. Nella condizione ideale di assenza di disomogeneità, un sito potrebbe essere sufficiente. Nella pratica è buona norma applicare maglie di rilevazione su scala 100 m o 1 km in dipendenza dalla presenza di una sorgente puntiforme (discarica, centrali, luoghi di stoccaggio o di produzione) o estesa (attività distributiva, irrigazioni) dei possibili inquinanti. In assenza di informazioni storiche o di uso attuale, il numero di siti su cui campionare va programmato in base al progetto di utilizzo futuro, considerando sia l'attività (creazione di un parco a fini ricreativi, ritorno al coltivo) sia l'estensione dell'area da utilizzarsi, massimizzando il numero di siti, distanziati a 1 km, su transetti cardinali (per considerare variabili quali le direttrici di venti capaci di determinare accumuli locali di inquinanti). È chiaro che la mancata cattura in alcuni siti non inficia il valore finale della maglia poiché tutti i mammiferi hanno vagilità tali da ritenere coperta l'informazione acquisibile, anche in assenza di più punti, poiché gli esemplari dei punti vicini sono "portatori" di informazioni sovrapponibili spazialmente. Il minimo numero di siti da rilevare per ritenere significativa la procedura di analisi e valutazione del rischio va determinato caso per caso considerando le caratteristiche geobiochimiche dell'area, se questa ha sofferto un inquinamento molto localizzato o diffuso omogeneamente e altre possibili variabili ritenute di significato in base alla "storia" del sito in esame. Il campionamento di due specie diverse, con un minimo numero di

esemplari per sito di campionamento, offre ottime garanzie di significatività del dato. Il numero di esemplari per sito può essere ridotto anche a 3-4, con maschi e femmine. Ciò assicura di poter valutare oltre alla variabilità intra-individuale anche variazioni di risposta inter-individuali e inter-sessi (fenomeni questi noti, per esempio, per l'azione delle diossine).

La presenza di femmine gravide ha un potenziale di informazione enorme: permette infatti di acquisire un dato cruciale per la valutazione del rischio biologico in quanto offre l'opportunità di analizzare gli embrioni e i feti, conoscendo quindi l'effetto genotossico dei inquinanti su dei momenti di sviluppo altrimenti non studiabili. Va sottolineato che di frequente l'effetto avverso di sostanze xenobiotiche si esercita non sull'adulto, ma sui suoi stadi di sviluppo precedenti: cellule germinali, embrioni, feti e stadi perinatali sino al termine dell'allattamento. Quando il numero degli esemplari catturati è ridondante è buona norma allestire una colonia in laboratorio e mantenerla per un tempo sufficiente al fine di acquisire informazioni utili per stabilire il possibile recupero dagli effetti nocivi (transitorietà o permanenza delle alterazioni riscontrate in campo) e di realizzare studi di embriologia dinamica (si possono prelevare embrioni, feti e piccoli a tempi predeterminati), altrimenti limitati ai tempi di sviluppo campionati e al materiale abortivo (embriologia statica). È importante ricordare che le strutture che effettuano questo tipo di ricerche devono essere dotate di stabulari e di permessi di attività sperimentale regolarmente accordati agli edifici che ospitano gli stabulari, approvati nel protocollo sperimentale di ricerca e rilasciati dalle autorità locali (Sindaco, Prefetto, Veterinario provinciale, USSL, Ministero Sanità). I tempi necessari all'ottenimento di informazioni attendibili sono molto brevi, se comparati con altre procedure tradizionali di tipo analitico e tossicologico, essendo nell'ordine dei 6 mesi per l'esecuzione di studi pilota con l'intera batteria di saggi SMT, SAT, MPCE e COMET su almeno una specie con 3-4 individui ciascuna 3-5 siti di rilevazione (disposti in qualsivoglia maglia). È chiaro che questi tempi si riducono anche a 1-2 mesi per una indicazione focale o si dilatano a 1-2 anni per una maglia spaziale "fitta" con una indicazione temporale (da valutare di volta in volta in un'analisi costi/benefici). Emerge forte la necessità, oltremodo auspicabile, di repliche e controlli tali da creare maglie di dati eco-spaziali ed eco-temporali a livello nazionale e sovranazionale: certamente una simile maglia spaziale e temporale costituirebbe, almeno a livello regionale e provinciale, uno strumento operativo di insostituibile utilità per gli operatori istituzionalmente preposti alle decisioni. Inoltre permetterebbe ponderate riflessioni e offrirebbe strumenti operativi per la pianificazione, gestione e recupero del bene ambientale, per la verifica della bontà delle decisioni assunte e per negoziazioni con l'opinione pubblica.

I saggi sugli spermatozoi (aberrazioni morfologiche, SMT e di contenuto in DNA, SMA) vengono effettuati dopo prelievo degli spermatozoi dal *vas deferens* dell'animale (non spermatozoi testicolari o epididimali, poiché in questi tratti anatomici lo spermatozoo non ha ancora completato la propria maturazione), diluizione degli stessi in soluzioni fisiologiche con successiva strisciatura su vetrini istologici e colorazioni differenziali per il DNA e le proteine. Il processo di formazione di uno spermatozoo, e in particolare l'acquisizione della forma matura e funzionale tipica per ogni specie, è un processo biologico molto complesso e controllato da molti geni: l'interferenza esercitata dagli agenti chimici e fisici ai tanti e diversi livelli di regolazione dell'espressione genica preposta alla formazione di una cellula così sofisticata ne deregola il funzionamento, portando alla

formazione di forme aberranti. Anche il contenuto in DNA (espressione del normale corredo cromosomico dello spermatozoo euploide e che ha un valore in picogrammi specie-specifico, per esempio 7,0 pg per il topo e 7,2 per l'uomo) viene valutato su questo tipo di preparati istologici, impiegando microdensitometri per determinare quantitativamente il DNA, dopo opportune reazioni citochimiche per la sua rivelazione. La valutazione percentuale delle principali aberrazioni morfologiche, mediante conteggi eseguiti al microscopio, e del grado di aneuploidia del DNA (la percentuale di spermatozoi con contenuti in DNA più bassi e più alti del valore euploide, espressione della presenza di più cromosomi, con potenziale nascita di trisomici, o della loro assenza, perdite abortive di monosomici), eseguita grazie a conteggi effettuati da più operatori, è confrontata attraverso metodi statistici atti a rivelarne la significatività, con analoghe percentuali desunte da indicatori biologici campionati in aree di controllo o con individui mantenuti in condizioni di stabulazione standard permette di segnalare il rischio di disordini riproduttivi (insorgenza di subfertilità/sterilità, minore natalità, alterazioni teratologiche dei neonati, nascita di trisomici, potenziale genotossicità somatica).

L'applicazione del saggio dei micronuclei (MPCE) alle cellule del midollo osseo (caratterizzate da un basso tasso endogeno di aberrazioni spontanee e da un alto grado di proliferazione), di ben più rapida esecuzione rispetto a quello degli spermatozoi, già di per sé "rapido", permette di misurare direttamente i danni cromosomici prodotti dalla esposizione agli agenti inquinanti. I globuli rossi maturi dei mammiferi non posseggono nucleo (DNA) e sono attrezzati di sola emoglobina in grande quantità. Questo stadio differenziativo è raggiunto dopo molte mitosi (moltiplicazioni cellulari) che prevedono, a partire da una forma cellulare giovane e dotata di nucleo, la produzione di molte cellule. È possibile, con opportune colorazioni istologiche di applicazione routinaria in laboratorio, riconoscere i diversi tipi morfologici, addestrare al loro riconoscimento personale specializzato e valutare la percentuale di eritrociti giovani, indifferenziati e portatori di nucleo, caratterizzati dalla presenza di micronuclei alla periferia del nucleo maggiore. I giovani eritrociti si colorano prevalentemente in azzurro, con varie sfumature (policromatici), mentre i normociti, quelli adulti, in rosa e sono distinguibili in un campo microscopico. Una volta individuati vengono esaminati ad alto ingrandimento microscopico per valutare se siano presenti micronuclei: questi ultimi sono l'espressione di cromosomi interi che non hanno segregato correttamente a uno dei due poli della cellula nel corso della mitosi o anche di frammenti di cromosomi, fenomeni entrambi rivelatori di mutagenicità.

#### **4.6.5 Esempi**

Esiste una vasta e consolidata bibliografia, come ben validate sono le procedure di esecuzione e verifica delle metodologie impiegate, sull'uso combinato dei saggi SMT, SAT e MPCE per il monitoraggio del rischio biologico e per la verifica dei rimedi adottati nelle politiche di gestione e recupero, sia per inquinanti chimici che fisici.

A partire dagli ultimi anni Ottanta, la tecnologia per l'analisi *extra situm* del DNA, in particolare la gel elettroforesi applicata al DNA di una singola cellula (avanzamento scientifico concettualmente rilevante poiché permette di coniugare le informazioni dell'indagine scientifica a livello morfologico con quelle del livello molecolare e non di porle in dicotomia), ha permesso di sviluppare un indicatore biologico di ultima generazione (saggio COMET) capace di individuare rotture (a singolo e a doppio fila-

mento) a livello della doppia elica del DNA di una singola cellula. È chiaro come questa opportunità tecnica permetta di rivelare agenti capaci di danneggiare il DNA e di analizzare anche sottopopolazioni cellulari sensibili a tale danno in termini di quantificazione del danno stesso. Gli agenti inquinanti potenzialmente colpiscono qualunque tipo cellulare di qualunque organismo animale, invertebrato e vertebrato. Il saggio COMET, nel caso dei mammiferi e di altri vertebrati, permette in particolare di analizzare cellule dell'epidermide, del fegato, della milza, del rene, del midollo osseo e gli spermatozoi. È noto dalla letteratura scientifica che frequentemente l'insorgenza di processi neoplastici (tumoriali) è dovuta alla deregolazione di una sottopopolazione cellulare di un determinato tessuto. I saggi microchimici, pure sensibili, non possono cogliere, per motivi intrinseci alle metodiche analitiche, differenze tra popolazioni, se non teoricamente dopo loro frazionamento, fatto questo impedito dall'assenza di marcatori cellulari idonei a tale scopo o comunque non noti in anticipo. Il saggio COMET è una microgel elettroforesi su singola cellula, attuata su vetrino da microscopia ove, in dipendenza delle condizioni chimico-fisiche utilizzate per la lisi, la denaturazione e la successiva elettroforesi del DNA (alcaline o neutre), è possibile rivelare rotture a singolo o doppio filamento della elica del DNA e rilevarle con l'osservazione in microscopia a fluorescenza, esaminando la "corsa" elettroforetica del DNA di ogni singola cellula. Il genoma (DNA) integro, fuoriuscito dalla cellula, non migra, mentre quello danneggiato per rotture a singola o doppia elica migra (con una corsa a forma di cometa, COMET) quando esposto all'azione di un campo elettroforetico, proporzionalmente alla quantità di rotture presenti, poiché i frammenti di DNA hanno minore peso molecolare rispetto al DNA integro. È chiara la potenzialità del saggio (è specifico, sensibile, attuato su singola cellula e quantificabile) e il vasto interesse esistente a un suo impiego nei biomonitoraggi. Il facile prelievo di migliaia di cellule, il loro incorporamento in agarosio su vetrino da microscopia, la loro lisi ed elettroforesi permettono di esaminare rotture del DNA e la presenza di siti alcalino-sensibili grazie alla corsa del DNA. In tal modo, la forma della cometa viene a essere proporzionale al danno presente: più è estesa la cometa, maggiore è il danno. I vantaggi di COMET sono chiari: i dati sono raccolti a livello di singola cellula (conoscendo così la distribuzione intercellulare del danno); sono necessarie poche cellule; qualunque cellula eucariota è analizzabile (ampio spettro di specie animali e diversi organi dell'animale sono utilizzabili come bioindicatori); il saggio è, relativamente, poco costoso; uno spettro molto ampio di agenti chimici e fisici sono saggiabili.

L'utilizzo di bioindicatori derivati dall'applicazione congiunta dei saggi SMT, SAT, MPCE e COMET su una o più specie animali offre agli operatori il vantaggio del superamento di possibili limiti geografici, stagionali e ambientali imposti dall'utilizzo di altri bioindicatori. Va inoltre sottolineato che ciascuno dei saggi ricordati, anche impiegato in singolo, può essere considerato sintetico di più indicatori parziali. Certamente il loro utilizzo integrato porta l'accettabilità dei risultati a essere ottima come l'esperienza, a livello internazionale e nazionale, ha dimostrato. Il disporre anche di indicatori parziali permette di risalire, verificato il rischio biologico, alla causa specifica: questo strumento operativo è a volte di massima rilevanza per gli operatori istituzionali preposti alle decisioni operative (*decision makers*) nei contenziosi legati al controllo dell'adeguamento ai limiti normativi da parte di attività industriali o agro-forestali; offre inoltre la possibilità di valutare gli

effetti da esposizione cronica e/o acuta e di verificare l'efficacia delle azioni poste in essere, a breve e lungo termine, per il recupero.

Lo stato delle ricerche ambientali per il monitoraggio dell'inquinamento e del recupero basate sull'utilizzo di bioindicatori da mammiferi è ricco, a livello internazionale, negli USA. Qui, già a partire dagli anni Quaranta, sono state create maglie di rilevamento spaziali e temporali che in un primo momento hanno privilegiato, per ragioni di storia della scienza intrinseche al metodo scientifico, la valutazione chimico-fisica dei contaminanti unita alla sperimentazione animale in laboratorio sulla loro tossicità. Ben presto si sono affiancati gli studi con i bioindicatori a livello di comunità di invertebrati e vertebrati (in particolare pesci per l'evidente interesse sui sistemi acquatici), per giungere negli ultimi decenni all'impiego dei bioindicatori da mammiferi nella valutazione del rischio per la specie umana e formalizzando, da parte dell'ente governativo preposto, la Environmental Protection Agency, il loro uso in linee guida e in procedure di verifica e controllo (vedi bibliografia).

A livello nazionale è ricco il panorama di laboratori con eccellente preparazione per eseguire i saggi che la normativa attuale impone (di chimica analitica, di tossicologia e di microbiologia). Difficile è indicare strutture specifiche che impieghino bioindicatori da mammiferi, al di fuori di pochi laboratori universitari, del CNR e dell'Istituto Superiore di Sanità; si sconta infatti un certo ritardo nell'adeguarsi a tali impieghi poiché la cultura biologico-cellulare e molecolare non si è ancora coniugata del tutto con quella ecologico-ambientale, che ancora tende a utilizzare metodiche di maggiore sintesi nella propria indagine. Il metro riduzionista portato dalle tecniche biologico-cellulari e molecolari, se ben amalgamato con le raffinate conoscenze a livello di comunità e di popolazioni, è lo strumento più utile, negli scenari ambientali attuali, contrassegnati da forte complessità di agenti biologici e abiologici, per lo studio e conservazione del bene-capitale *ambiente*. Premesso, per chiarezza, questo aspetto di rilievo nella formazione culturale dell'ecologo, dello studioso di problematiche ambientali come dell'operatore ambientale, l'elenco delle strutture potenzialmente in grado di svolgere saggi per la valutazione del rischio biologico con l'impiego di bioindicatori da mammiferi potrebbe essere ampio, poiché la strumentazione necessaria può essere considerata di normale corredo per un buon laboratorio di citometria e biologia molecolare. Sono la "vocazione" del laboratorio (di ricerca o di analisi) e il capitale umano che lo costituisce a limitare, allo stato attuale, il numero delle strutture in grado di realizzare studi applicativi così come esposti. Il problema rimanda quindi al recepimento in tempi brevi, da parte delle istituzioni preposte, del mutato quadro concettuale nella valutazione del rischio biologico (valutazioni di concentrazioni di contaminanti, studi di laboratorio sulla loro tossicità, studi di campo sulle comunità e popolazioni e, ormai in termini non più procrastinabili, valutazione del rischio biologico con bioindicatori) e quindi alla formazione e all'addestramento del personale. Potenzialmente, tutti i laboratori provinciali di Igiene e Profilassi, di microbiologia e delle USSL dispongono del capitale umano ed economico necessario ad attrezzarsi per studi di bioindicatori. Ciò detto, vanno ricordati:

- Centro Comune di Ricerca, di Ispra, che pure ospita il *Centro Europeo per la Validazione dei Metodi Alternativi* per la valutazione della genotossicità, della Commissione Europea, Ispra;

- Laboratorio di Tossicologia Comparata ed Ecotossicologia dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma;
- "Gruppo per lo studio dei vertebrati quali bioindicatori per il monitoraggio dell'inquinamento ambientale" del Dipartimento di Biologia Animale e dell'Uomo, Università "La Sapienza", Roma;
- "Laboratorio di Biologia dello Sviluppo" del Dipartimento di Biologia Animale, Università di Pavia, che pure ospita il "Centro di Studio per l'Istochimica" del CNR, Pavia.

A essi si devono lavori guida che rendono ragione anche degli studi svolti a livello nazionale sotto il profilo teorico (sviluppo di strategie di indagine), metodologico (affinamento di saggi e loro trasposizione a diversi organismi) e applicativo (valutazione dell'inquinamento dell'aria, del suolo, da centrali nucleari, solo per citarne alcuni). Va ricordato inoltre lo sforzo della Fondazione Lombardia per l'Ambiente che, in termini antesignani, ha finanziato il monitoraggio con i bioindicatori del "Bosco delle Querce" (ex-zona A) e della zona B di Seveso, dove è stato applicato per la prima volta in Italia il saggio COMET a problematiche ambientali.

### Nota

I riferimenti bibliografici sono di una vastità tale da scoraggiare una loro elencazione. Considerato però che i principali fruitori di questa breve divulgazione saranno gli operatori istituzionalmente preposti alla tutela ambientale a livello regionale, provinciale e di municipalità, vengono indicati alcuni riferimenti essenziali, cartacei e su media elettronici, utili per ritrovare le linee guida legislative e operative, le applicazioni e alcuni esempi portanti a livello internazionale che possono aiutare nella valutazione della fattibilità di questo tipo di ricerche e applicazioni sui mammiferi quali bioindicatori. Vengono inoltre forniti gli indirizzi Internet ove si trovano o motori di ricerca utilizzabili per sviluppare il proprio profilo di interesse o nodi per la navigazione a siti di agenzie governative e non-governative, a siti di associazioni non-profit e di ricerca militare:

*Siti Internet:*

- 1) Environmental Protection Agency (EPA) del governo statunitense:

<http://www.calepa.cahwnet.gov/>

Contiene informazioni riguardanti: legislazione, profili di tossicità, problemi ambientali in senso lato, resoconti di casi specifici, metodologie e procedure, glossario dei termini, sempre più specialistici, rassegna stampa.

- 2) Agency for Toxic Substances and Disease Registry's (ATSDR) del governo statunitense:

<http://atsdr1.atsdr1.cdc.gov:8080/hazdat.html>

Contiene informazioni e liste delle sostanze più dannose (Top 20 e Top 275) con indicazioni dei loro profili tossicologici e accesso al bollettino federale USA.

- 3) Agenzia per i danni ambientali delle Fiandre (OVAM):

<http://www.ovam.be/internetrefs/english.htm>

Contiene informazioni sui problemi ambientali in Europa e un archivio molto ricco di problematiche specifiche, dalle politiche ambientali alle tecnologie per l'ambiente.

- 4) Dipartimento di Chimica della Università del Kentucky (USA):

<http://www.chem.uky.edu/resources/msds.html>

Contiene informazioni di estrema utilità per gli operatori ambientali poiché hanno sviluppato un intero database di MSDS (Material Safety Data Sheets) tra cui intere sezioni dedicate ai pesticidi (PIPs, Pesticide Information Profiles)

<http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/ghindex.html>

a cui gli operatori possono rivolgersi per ottenere informazioni su effetti ecologici, tossicologici, genotossici e destino ambientale delle sostanze di cui debbono occuparsi per problemi regolatori o di disastri ambientali.

## Bibliografia

**Carere, A., Mohn, G. R., Parry, J. M., Sors, A. I., e Nolan, C. V.** (eds.) 1995. Report EUR 15945 EN.

**Commissione Europea: Direttorato Generale XI e XII.** Methods and testing strategies for evaluating the genotoxic properties of chemicals.

**Fairbairn, D. W.** *et al.* 1995. The comet assay: a

comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.

**US-EPA 1983.** Relazione del gruppo di lavoro dell'Ufficio per i Pesticidi e le Sostanze Tossiche. An evaluation of the mouse sperm morphology tests and other sperm tests in nonhuman mammals. *Mutation Research*, 115, 1-72.



## Capitolo 5

# Approccio multispecie nell'utilizzo di bioindicatori

Marina Camatini, Anita Colombo, Patrizia Bonfanti,  
Nicola Dell'Orto e Davide Cantelli

## 5.1 Introduzione

La tossicità è l'effetto negativo che si verifica in un sistema biologico a causa di un composto tossico o di una miscela di tossici; tale effetto si evidenzia nell'alterazione di una o più funzioni quali sopravvivenza, motilità, crescita, fotosintesi ecc., in seguito a esposizione allo xenobiotico.

La valutazione di tossicità in acqua si effettua introducendo nel campione in esame un dato numero di organismi e verificando se le risposte differiscono da quelle di organismi di controllo immessi in un campione d'acqua privo di contaminanti (Bonfanti *et al.*, 1997).

Il parametro *saggio di tossicità*, così come compare nella tabella A della legge 76/319, non ha mai avuto una vasta applicazione, nonostante rivesta un ruolo di fondamentale importanza nella definizione dei limiti previsti per gli scarichi in acque di superficie. Da un punto di vista preoperativo va riconosciuto che il saggio di tossicità che utilizza alcune specie di pesci previsto dalla legge Merli pone diversi problemi:

- l'allevamento richiede l'uso di vasche di grandi dimensioni dotate di un ricambio continuo dell'acqua che deve essere di buona qualità e priva di cloro;
- questi saggi sono condotti su individui adulti, ma è importante tener presente che nel ciclo vitale degli organismi gli stadi di sviluppo embrionale presentano una maggiore suscettibilità ai composti tossici rispetto agli adulti. Una concentrazione massima di non effetto determinata per gli organismi adulti può risultare letale per gli embrioni, con la conseguenza di una compromissione della sopravvivenza della specie;
- tali saggi richiedono lunghi tempi di esecuzione per poter dare una risposta attendibile, e quindi non possono esser proposti come saggi di routine, come richiesto dalla legge.

L'incremento dell'interesse scientifico sia nazionale che internazionale nei confronti dei saggi di tossicità, con lo sviluppo di diverse metodiche e normative (CEE, ISO, OECD, ASTM, EPA) e l'accresciuto interesse per le metodiche a carattere biologico da parte degli operatori preposti al controllo, fanno ritenere che in un futuro prossimo i saggi di tossicità incontreranno unanime consenso.

I saggi biologici infatti consentono:

- un'esauriente copertura analitica a completamento delle analisi chimiche e una corretta interpretazione dei dati ottenuti nei confronti di tutti gli inquinanti potenzialmente individuabili;
- la valutazione dell'azione congiunta di più composti tossici presenti contemporaneamente in acque superficiali.

Fino a ora i test di tossicità sono stati condotti secondo le linee guida OECD su singole specie; questo tipo di approccio fornisce risposte che non possono essere estese a tutti gli organismi appartenenti all'ecosistema in esame.

I test di tossicità di breve durata, di facile impiego e basso costo rappresentano l'indispensabile strumento per la gestione di complesse situazioni di inquinamento idrico quando prendono in considerazione contemporaneamente effetti di diverso tipo e organismi appartenenti a livelli trofici diversi (EEC 1987; Horning *et al.*, 1985; EPS 1990).

Fra i molteplici bioindicatori disponibili l'alga verde unicellulare *Selenastrum capricornutum*, il crostaceo *Daphnia magna* e l'anfibio anuro *Xenopus laevis* (Colombo *et al.*, 1993), rappresentano una scelta adeguata per valutare la presenza di composti inquinanti in sistemi naturali e per monitorarne l'effetto (Bonfanti *et al.*, 1997; Dell'Orto *et al.*, 1997).

Queste specie presentano un elevato livello di sensibilità ai composti tossici e le conoscenze sulle loro risposte ai tossici sono più numerose e approfondite che per qualsiasi altro organismo acquatico (Lewis, 1993; Persoone *et al.*, 1993; Colombo *et al.*, 1993; Camatini *et al.*, 1994; Camatini, 1997; Bonfanti *et al.*, 1994).

## 5.2 Informazioni acquisibili

L'impiego contemporaneo degli organismi sopracitati può fornire informazioni utili sul grado di inquinamento di fiumi e laghi, sugli effetti di immissioni più o meno accidentali di sostanze quali pesticidi, rifiuti industriali e domestici. Inoltre i test biologici possono essere utilizzati per valutare la tossicità di acque in entrata e in uscita da depuratori e di percolati di discariche di rifiuti solidi urbani (Ciccotelli *et al.*, 1996; Bonfanti *et al.*, 1997).

Una prima stima dell'attività biologica di inquinanti può essere effettuata con test di tossicità acuta condotti in tempi brevi compresi tra le 24 e le 96 ore di esposizione. Lo scopo è quello di determinare la concentrazione di una sostanza o miscela di sostanze, in grado di produrre mortalità e nel caso delle alghe di produrre inibizione della crescita.

La risposta deve essere di facile individuazione con il minimo errore possibile. Nei pesci e negli anfibi viene valutato il parametro mortalità, considerato un dato quantale (del tipo tutto o nulla), mentre nei Crostacei può essere più semplice verificare l'immobilità.

Il primo esempio fornisce i valori delle concentrazioni letali (per esempio  $LC_{50}$ , intesa come concentrazione che provoca la morte del 50% degli organismi utilizzati nel test).

Nel secondo esempio si parla più precisamente di concentrazione efficace (per esempio  $EC_{50}$ , intesa come concentrazione in grado di produrre, a un determinato tempo di trattamento, una incidenza pari al 50% dell'effetto quantale scelto).

I test di tossicità cronica sono un valido strumento per valutare il potenziale tossico degli xenobiotici in quanto vengono condotti per tempi più lunghi rispetto ai test di tossicità acuta, permettendo di individuare concentrazioni efficaci inferiori a quelle determinate nei test di tossicità acuta.

Nei Crostacei Cladoceri, grazie alla notevole rapidità del loro ciclo biologico, il saggio viene condotto sull'intero ciclo vitale, evidenziando alterazioni a livello della riproduzione che si esprime nella riduzione nel numero dei nati.

Gli anfibi Anuri rendono possibile l'esecuzione di test di teratogenesi; infatti la fecondazione *in vitro*, facilmente realizzabile, porta a un numero elevato di embrioni con sviluppo sincrono.

Questi test valutano l'embriotossicità di uno xenobiotico durante i primi stadi di sviluppo embrionale, identificando parametri quali ritardo di sviluppo e malformazioni (Colombo *et al.*, 1993; Vismara *et al.*, 1993; Bonfanti *et al.*, 1997).

## 5.3 Metodi e limiti di utilizzo

### 5.3.1 Illustrazione dei materiali e delle procedure

#### 5.3.1.1 Test di fitotossicità

L'alga verde *Selenastrum capricornutum* per la facilità di mantenimento di colture in condizioni standard e per la sensibilità, è utilizzata in molti test le cui metodiche sono proposte dalla normativa (EPA 1990, OECD 1984 ecc.). Il test di crescita algale consente di valutare la qualità delle acque su un produttore primario che rappresenta l'anello più basso della catena trofica (Bonfanti *et al.*, 1997).

Il test viene allestito secondo il procedimento qui descritto:

il *medium* di coltura, utilizzato per mantenere colture stock degli organismi, viene preparato aggiungendo 2 ml/l di ognuna delle seguenti quattro soluzioni in acqua bidistillata (tabella 5.1).

---

**Soluzione 1:** nitrato di sodio 25,5 g/l, cloruro di magnesio esaidrato 12,164 g/l, cloruro di calcio biidrato 4,41 g/l, acido bórico 182,52 mg/l, cloruro di manganese tetraidrato 415,38 mg/l, cloruro di zinco 3,27 mg/l, cloruro di cobalto esaidrato 1,428 mg/l, cloruro di rame biidrato 0,012 mg/l, molibdato di sodio biidrato 7,62 mg/l, cloruro di ferro (3+) 160 mg/l, EDTA bisodico biidrato 300 mg/l

---

**Soluzione 2:** solfato di magnesio eptaidrato 14,7 g/l

---

**Soluzione 3:** fosfato potassio bibasico 1,044 g/l

---

**Soluzione 4:** bicarbonato di sodio 15 g/l

---

Tabella 5.1 - Soluzioni utilizzate per il *medium* di coltura di *Selenastrum capricornutum*.

Il *medium* viene utilizzato per la crescita dei campioni controllo e come acqua di diluizione delle acque da testare.

Una coltura stock di alghe viene preparata trasferendo 1 ml di inoculo, proveniente da una coltura in crescita attiva, in un volume di *medium* di coltura in condizioni controllate. La coltura stock è mantenuta a una temperatura di 24 +/- 2°C con luce fluorescente bianca (intensità 400 +/- 40 ft-c) e in agitazione costante (100 cpm). Il test ha inizio iniettando, con una siringa sterile, 1 ml di inoculo algale nelle beute contenenti le acque da testare. Le beute vengono poi mantenute per tutta la durata del test alle condizioni sperimentali indicate per la coltura stock. Le sostanze tossiche eventualmente presenti nelle acque possono essere rapidamente degradate o essere particolarmente volatili; per queste ragioni il loro effetto viene spesso rilevato solo durante i primi giorni del test. Per ottenere un quadro completo della tossicità del campione viene effettuato quotidianamente un prelievo per controllare la crescita algale.

Alla fine del test viene misurata la crescita algale. Questa misura può essere effettuata attraverso la quantificazione *in vivo* della clorofilla presente nei campioni con l'utilizzo di uno spettrofluorimetro. Questo metodo, che presenta degli innegabili vantaggi in termini di praticità e velocità di esecuzione, consiste nel prelevare gior-

nalmente 2 ml da ogni campione per la lettura allo spettrofluorimetro. La lettura viene effettuata con una luce di eccitazione alla lunghezza d'onda di 420 nm e una luce di emissione a 684 nm previa sottrazione di un bianco rappresentato dalla lettura del campione prima dell'inoculo algale. Dal valore dell'intensità della luce di emissione della clorofilla viene ricavata la concentrazione con una retta di taratura.

Il test è ritenuto accettabile se la concentrazione di cellule nel campione controllo eccede la quantità di 10 milioni cellule/ml e se non si hanno variazioni maggiori del 10% nelle tre repliche.

### 5.3.1.2 Test di tossicità con *Daphnia magna*

*Daphnia magna* presenta un buon livello di sensibilità ai tossici (Persoone *et al.*, 1993; Bonfanti *et al.*, 1997) e offre notevoli facilitazioni sul piano operativo; per questi motivi è richiesto per saggi di controllo ambientale e raccomandato dalle principali organizzazioni (OECD 1984; AFNOR 1983; EPS 1990).

L'acqua di allevamento della *Daphnia* deve presentare le caratteristiche fisico-chimiche riportate nella tabella 5.2:

Durezza di 150 mg CaCO <sub>3</sub> /l
Ca/Mg = 4
Na/H = 10
Alcalinità = 110-120 mg/CaCO <sub>3</sub> /l
pH 7,5-8,5

Tabella 5.2 - Caratteristiche dell'acqua utilizzata per l'allevamento di *Daphnia magna*.

Questa soluzione viene aerata per 24 ore prima del suo impiego, alla temperatura di 20°C, con aria compressa priva di contaminanti.

Quotidianamente alla coltura viene somministrata una dieta costituita da lievito (*Saccaromyces cerevisiae*) e alghe (*Selenastrum*) a una concentrazione di 300.000 cellule/ml.

I materiali sono costituiti da recipienti di vetro borosilicato (*beacker*) aventi un volume utile di 50 ml; questi non danno luogo a processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possano interferire con il saggio.

Il test viene condotto a temperatura costante (20±2°C) in condizioni alterne di luce (16 h, 300 lux) e di buio (8 h).

Per i saggi sono stati utilizzati i neonati di *Daphnia magna* di età inferiore alle 24 ore. A questo scopo, quattro o cinque giorni prima dell'allestimento del saggio viene individuato nelle vasche di allevamento e isolato in acqua di diluizione un numero adeguato (circa 10) di femmine adulte (4-5 mm di lunghezza corporea) prossime al parto, riconoscibili per il colore aranciato delle uova presenti nella camera di incubazione.

Giornalmente le femmine selezionate vengono alimentate come descritto precedentemente e i piccoli rimossi.

#### 5.3.1.3 Test di tossicità acuta

In ciascuno dei 6 recipienti vengono trasferiti 10 neonati di *Daphnia*. Per tutta la durata del test (24 h) gli animali non vengono nutriti.

Al termine del saggio vengono contati gli organismi immobili cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore.

Il saggio non viene considerato valido se nelle soluzioni controllo la percentuale di individui immobili o galleggianti supera il 10%, e quando a fine test, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione dell'ossigeno disciolto risulta essere inferiore ai 2 mg/l.

#### 5.3.1.4 Test di tossicità cronica

Il test di tossicità cronica (28 giorni) viene condotto su quasi l'intero ciclo vitale della *Daphnia*, permettendo di individuare con maggiore sensibilità gli effetti di basse concentrazioni di xenobiotici.

Per ogni campione vengono utilizzati 8 organismi di 12 +/- 12 h di età mantenuti singolarmente per 28 giorni in *beacker* contenenti 50 ml di campione da testare nelle medesime condizioni sperimentali descritte per l'allevamento.

Per tutta la durata del test, ogni tre giorni viene somministrata una dieta a base di *Selenastrum* e *Saccharomyces*, entrambi a una concentrazione di 300.000 cell/ml, e in ogni *beacker* viene rinnovata l'acqua in esame.

Inoltre vengono effettuati controlli giornalieri per valutare:

- mortalità;
- età della prima deposizione di uova, considerata l'inizio dell'attività riproduttiva degli organismi;
- frequenza e regolarità delle uova;
- conteggio e rimozione dei neonati per ciascun individuo;
- misura della lunghezza dell'animale alla fine del test;
- conteggio e rimozione di eventuali piccoli morti e uova abortive per ciascun individuo.

Dai dati ottenuti è possibile calcolare per ciascun campione i seguenti valori:

- età media all'inizio della riproduzione;
- numero di neonati per *Daphnia* per giorno, cioè il rapporto tra il numero totale di neonati per *Daphnia* e il numero di giorni di sopravvivenza;
- misura media delle *Daphnia* alla fine del test.

#### 5.3.1.5 Test di teratogenesi con *Xenopus laevis*

*Xenopus laevis* è un ottimo modello sperimentale in quanto facilmente allevabile e disponibile; esso permette la fecondazione *in vitro* delle uova (Vismara *et al.*, 1993) mediante la quale è possibile ottenere un numero notevole di embrioni con sviluppo sincrono per test di teratogenesi. Questo test è stato messo a punto negli USA negli anni Ottanta-Novanta (Dawson *et al.*, 1987; Bantle *et al.*, 1989) come test di *prescreening* per le nuove molecole ogni anno immesse nell'ambiente; ha ampia applicabilità in quanto permette la valutazione di qualità delle acque di ecosistemi naturali.

Al fine di stimolare l'ovulazione 700-1000 U di gonadotropina corionica umana (Sigma Chemical CO) vengono iniettate nella sacca perilinfatica di femmine adulte. Dopo 16 ore si procede alla fecondazione *in vitro* delle uova, utilizzando una sospensione di

spermatozoi ottenuta sminuzzando i testicoli in soluzione DBT (NaCl 1,19 mM, KCl 2,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, Tris-Cl 10 mM).

Le uova fecondate sono mantenute in una soluzione fisiologica (NaCl 1,25 g, NaHCO<sub>3</sub> 0,192 g, KCl 0,06 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,03972 g, CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,12 g, MgSO<sub>4</sub> 0,156 g per due litri di soluzione, pH tra 7,8 a 8,2) e poste in termostato a 23°C (Piardi).

Dopo selezione, gli zigoti che hanno raggiunto lo stadio di blastula matura (8 h dopo la fecondazione), vengono divisi in gruppi sperimentali di 8 per ciascuna capsula Petri e messi in presenza delle acque da testare.

Tutte le prove sono condotte in doppio. La soluzione fisiologica costituisce l'acqua per i controlli negativi.

A intervalli di 24 h, per un totale di 120 h dalla fecondazione si procede alla conta e rimozione dei morti e al ricambio delle soluzioni di trattamento.

Dopo 5 giorni vengono valutati i seguenti parametri:

- mortalità;
- malformati, mediante analisi microscopica degli embrioni (Zeiss, Stemi V6); a questo scopo gli embrioni vengono anestetizzati con MS222 (Sigma Chemical CO);
- inibizione di crescita; a tale scopo embrioni vivi e non malformati, fissati in formalina 0,6%, vengono acquisiti con apposito software (Wanalyst/Eidoips) misurati al computer in seguito ad acquisizione. I criteri valutati a fine test sono percentuale di mortalità alle 120 ore, percentuale di malformazione alle 120 ore, inibizione di crescita.

In seguito a trasformazione in arcsen (radQ di p) dei valori %, sono condotti l'analisi *One-Way* ANOVA e il test Tukey per valutare l'analisi della varianza. Analogamente sono condotti con i valori % i test non parametrici U di Mann-Whitney, X<sup>2</sup> e Kruskal Wallis. La correlazione dei dati è effettuata mediante analisi multivariata Listwise e Kendall.

La concentrazione che determina una inibizione di crescita è valutata secondo il test *t* di Student.

Tutte le analisi sono condotte mediante programma al computer Statgraphics.

## 5.4 Esempio di applicazione

Quale esempio di sperimentazione dei test proposti vengono illustrati bioindicatori utilizzati per valutare la qualità delle acque del torrente Arno nell'ambito della ricerca (vedi appendice al volume). Il torrente Arno nasce in territorio del comune di Gazzada e scende in direzione nord-sud lungo l'omonima Valdarno. Nella sua parte montana collinosa, cioè fino all'ingresso nell'abitato di Gallarate, questo corso d'acqua riceve gli apporti di numerosi rivi secondari che ricevono scarichi fognari, civili o industriali. A valle di Gallarate il torrente Arno non riceve più affluenti, e il bacino idrografico si riduce a una fascia di qualche decina di metri. Il torrente Arno lungo il suo percorso drena da lungo tempo un consistente numero di scarichi di comuni varesini caratterizzati da insediamenti industriali e termina spagliando nelle campagne di Castano Primo, aumentando di anno in anno le superfici allagate.

Queste acque filtrano lentamente nel terreno ormai impermeabilizzato alimentando la falda freatica superficiale.

Nel corso delle attività del progetto “Effetti dell’inquinamento sui sistemi agro-forestali: tecniche biologiche di monitoraggio e recupero” sono state condotte prove tossicologiche su prelievi di acque effettuati nei seguenti siti:

- **sito 1:** acqua della sorgente del torrente;
- **sito 2:** acqua del torrente nel comune di Castano Primo, a monte del collettore di emissione del depuratore S. Antonino;
- **sito 3:** acqua della zona iniziale dello spagliamento a valle del collettore di emissione;
- **sito 4:** acqua della zona più meridionale dello spagliamento;
- **sito 5:** acqua in uscita dal depuratore di S. Antonino;
- **sito A:** zona limitrofa a quella interessata dallo spagliamento mai raggiunta dalle acque;
- **sito B:** zona sottoposta a inondazione negli anni precedenti e attualmente non più inondata;
- **sito B’:** zona sottoposta a inondazione stagionale e attualmente non allagato (dal mese di marzo);
- **sito C:** zona costantemente inondata (sedimento).

#### 5.4.1 Risultati del test con il modello *Selenastrum capricornutum*

La popolazione di *Selenastrum capricornutum* viene esposta per 96 ore con metodo statico a una serie di diluizioni dell’acqua campionata dal torrente Arno.

Sulle acque da testare sono state eseguite le seguenti diluizioni (tabella 5.3):

Diluizioni	Acqua Arno	Medium
100%	50 ml	0 ml
30%	35 ml	15 ml
10%	5 ml	45 ml
3%	1,5 ml	48,5 ml
1%	0,5 ml	49,5 ml
Controllo	0 ml	50 ml

Tabella 5.3 - Diluizioni delle acque testate con il test di crescita algale di *Selenastrum capricornutum*.

Ogni diluizione è stata testata in triplo. Le acque dell’Arno hanno una quantità di nutrienti variabile a seconda del sito di prelievo, una scarsa crescita algale potrebbe quindi essere dovuta sia a una tossicità intrinseca delle acque stesse, sia a una loro naturale mancanza di nutrienti (acque oligotrofiche). Per ovviare a questo inconveniente, a ogni campione analizzato vengono aggiunti un uguale quantitativo di nutrienti a una concentrazione di 2 ml/l.

Possibili interferenze possono essere causate dalla presenza di agenti patogeni, di organismi predatori o dai nutrienti naturali presenti nelle acque da testare. Questi in-



convenienti vengono parzialmente evitati sterilizzando le beute a una temperatura di 120°C per 30 minuti.

Ogni giorno è stata registrata la concentrazione cellulare di ogni campione suddiviso per serie di ripetizione, tipo di acqua e diluizione; alla fine del test è stata calcolata la percentuale di inibizione e sovracrescita algale rispetto al campione controllo utilizzando la seguente formula:

$$\text{sovracrescita algale} = \frac{\text{percentuale inibizione / media concentrazione cellulare del campione} \times 100}{\text{media concentrazione cellulare del controllo} - 100}$$

Sono state inoltre evidenziate le curve di crescita dei singoli campioni per tutta la durata del test.

Le concentrazioni algali ottenute con campioni di acqua non diluiti prelevati dai diversi siti sono variabili; alla sorgente è stata calcolata una sovracrescita algale del 67,85% che aumenta a 99,8% per le acque a monte del depuratore di S. Antonino (figura 5.1). Le acque in uscita dal depuratore provocano invece una inibizione media della crescita pari al 60,94% che viene quasi completamente annullata nelle acque raccolte a valle dello scarico del depuratore; la situazione di sovracrescita algale si ristabilisce nelle acque dello spagliamento con un valore del 45,38% rispetto al controllo (figura 5.1).

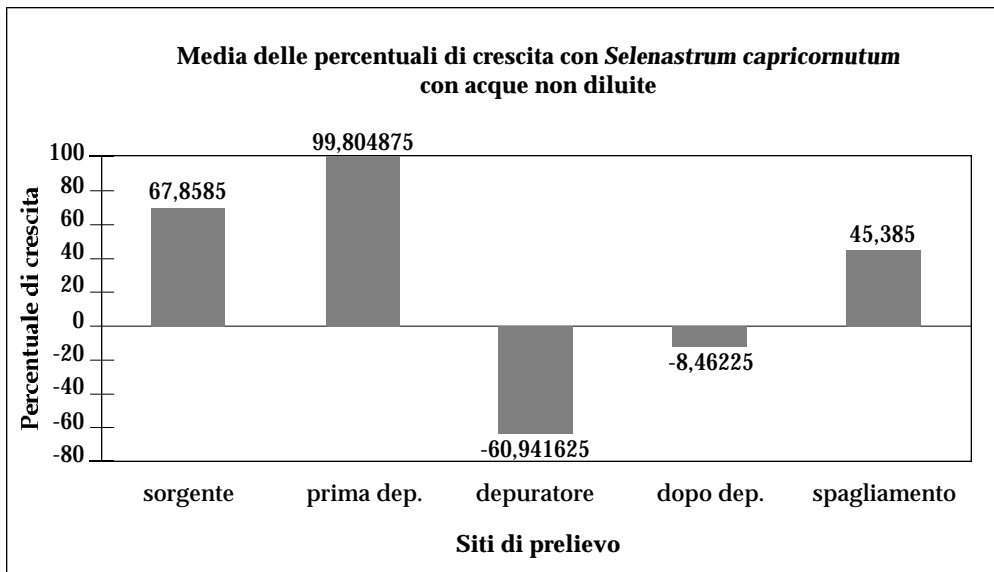


Figura 5.1 - Media delle percentuali di crescita con *Selenastrum capricornutum* con acque non diluite.

Esperimenti condotti nel periodo maggio-novembre con acque non diluite hanno evidenziato l'andamento della percentuale della crescita del *Selenastrum*.

Le acque della sorgente (sito 1) provocano quasi sempre una sovracrescita algale, che raggiunge valori massimi con i campioni di acque raccolti prima dello scarico del depuratore e minimi con le acque del depuratore stesso; i campioni di questo sito hanno infatti provocato, a eccezione di un esperimento, una costante algostasi (figura 5.2).

Le alghe trattate con acque prelevate dopo il depuratore (sito 3) hanno avuto una crescita maggiore rispetto a quelle testate con acque in uscita dall'impianto (sito 5). Le acque del sito 3 hanno provocato inibizione e sovracrescita algale probabilmente in relazione alla portata del torrente che in particolari periodi dell'anno è scesa al di sotto del volume di acqua immesso dall'impianto di depurazione (figura 5.2).

Le acque dello spagliamento (sito 4) infine hanno causato una sovracrescita algale in quasi tutti gli esperimenti da noi condotti dimostrando una notevole capacità di recupero rispetto alle acque dei siti a più diretto contatto con gli scarichi dell'impianto di depurazione (figura 5.2).

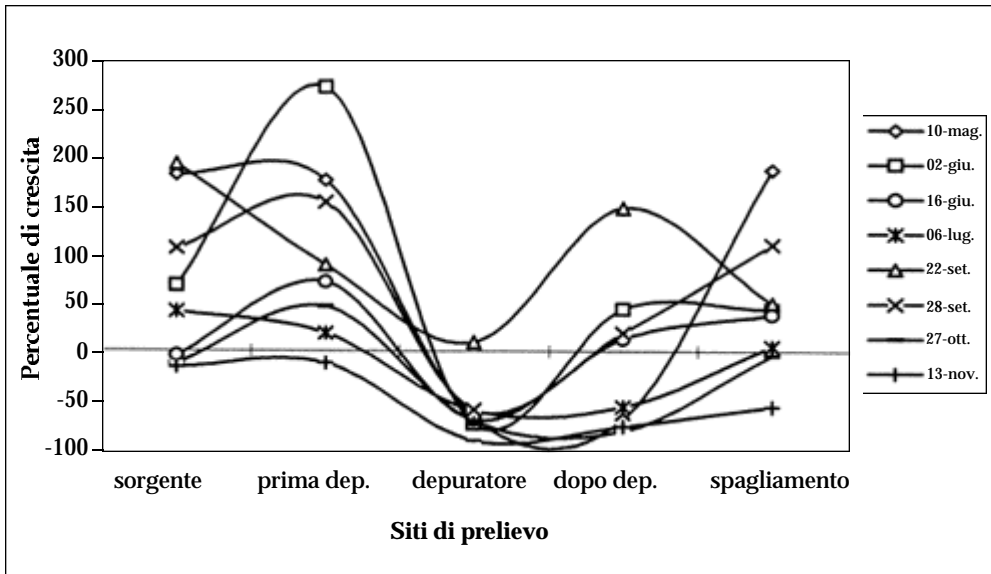


Figura 5.2 - Andamento percentuale di crescita con *Selenastrum capricornutum* con acque non diluite.

Le curve di crescita hanno mostrato un andamento strettamente correlato al periodo di prelievo. Nella figura 5.3 sono evidenziati due picchi di crescita nel periodo di fine maggio e fine settembre in concomitanza con elevate precipitazioni e notevole diluizione del carico inquinante. Le acque in uscita dal depuratore in questi periodi hanno determinato comunque una inibizione della crescita probabilmente dovuta alla ridu-

zone dei tempi di ritenzione nell'impianto per consentire il rapido deflusso di grossi volumi di acqua in entrata (figura 5.3).

I periodi di giugno-luglio e ottobre-novembre sono stati invece caratterizzati da scarse precipitazioni; ciò ha determinato una minore crescita algale probabilmente dovuta a una maggiore concentrazione di inquinanti (figura 5.3).

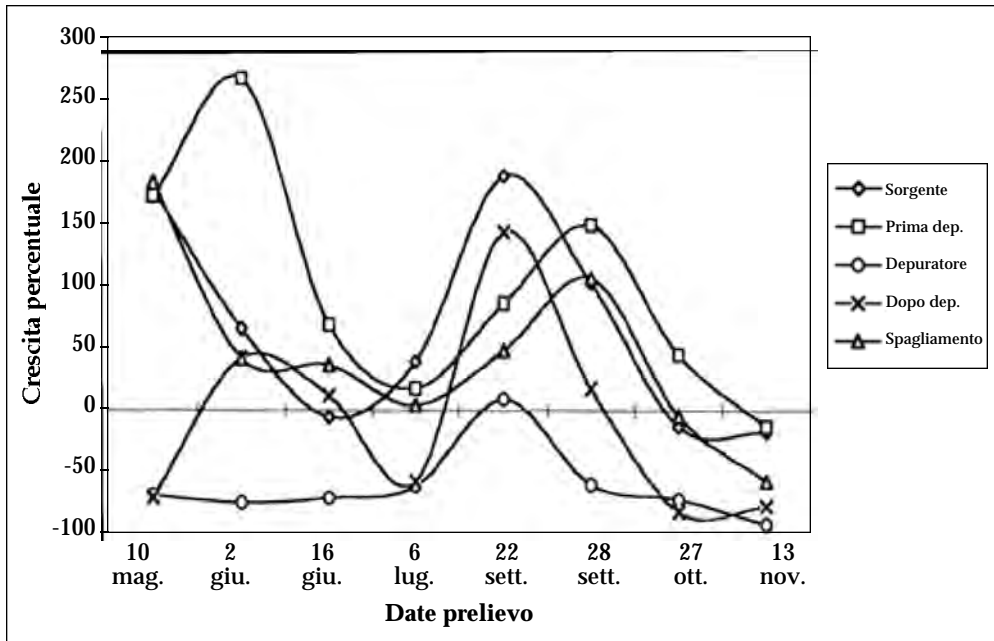


Figura 5.3 - Andamento delle percentuali di crescita di *Selenastrum capricornutum* con acque non diluite.

Esperimenti condotti con campioni di acque del torrente Arno diluite con *medium* di coltura hanno evidenziato, dopo correlazione statistica (*one-way ANOVA*), un incremento della crescita algale rispetto alle acque non diluite e ai campioni controllo (figura 5.4).

Dal grafico è evidente che le condizioni più favorevoli alla crescita algale sono ottenute con diluizioni del 10-30% alle quali la concentrazione di inquinanti non ha ancora raggiunto livelli critici in rapporto alla quantità di nutrienti presenti nelle acque. Nel campione non diluito (100%) la crescita della coltura algale diminuisce nonostante la presenza di un maggiore quantitativo di nutrienti. Questo andamento non è stato riscontrato nelle acque della sorgente probabilmente a causa della scarsa quantità di materiale organico e inorganico rispetto alle acque degli altri siti di prelievo.

La situazione raffigurata nel grafico precedente è confermata dalle maggiori percentuali di sovracrescita dei campioni diluiti al 30% rispetto a quelli *in toto* (figura 5.5).

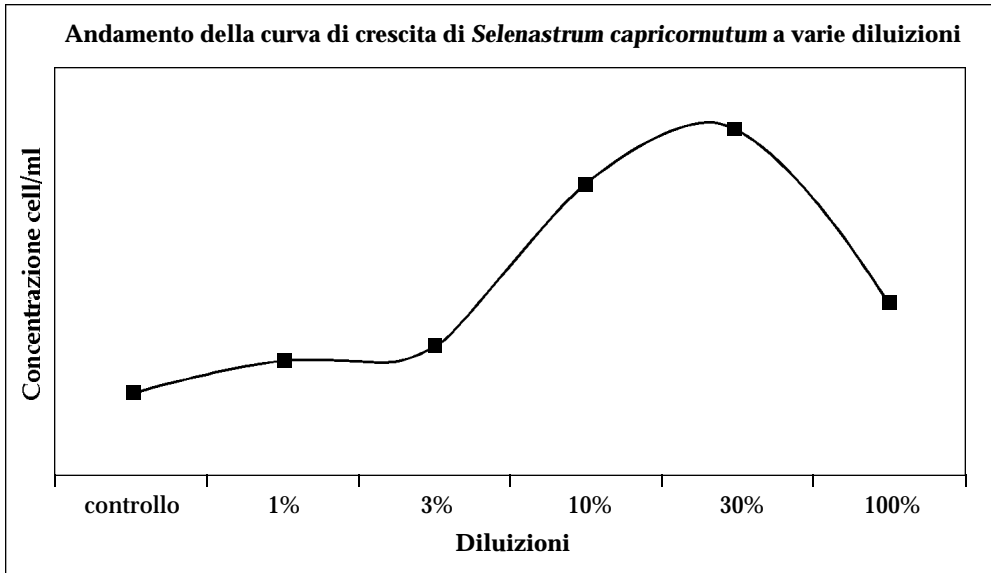


Figura 5.4 - Andamento della curva di crescita di *Selenastrum capricornutum* a varie diluizioni.

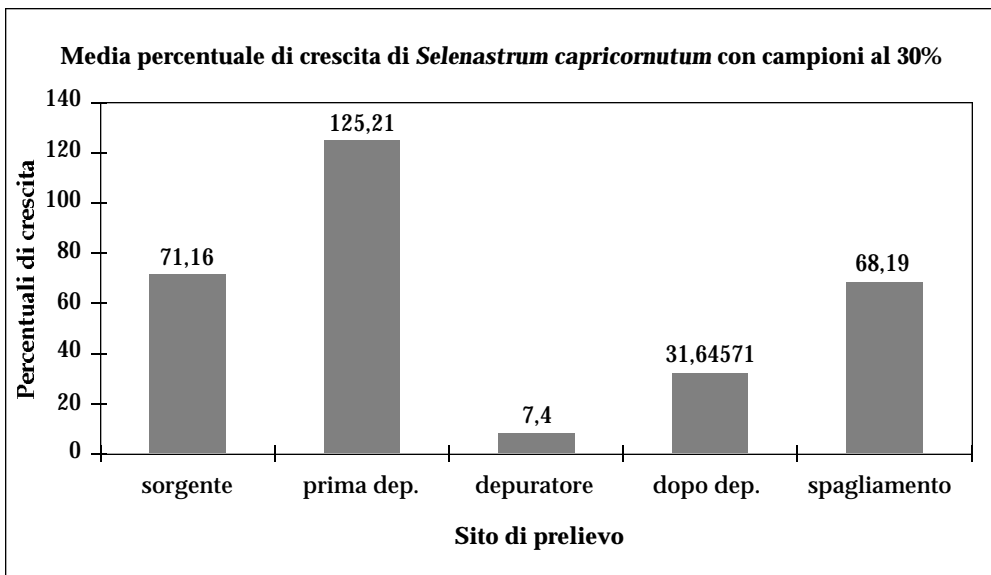


Figura 5.5 - Media percentuale di crescita di *Selenastrum capricornutum* con campioni al 30%.

## 5.4.2 Risultati ottenuti con *Daphnia magna*

### 5.4.2.1 Test acuto

Sono stati condotti saggi di tossicità della durata di 96 ore con neonati di *Daphnia* di età inferiore alle 24 ore. Gli esperimenti condotti con campioni di acqua *in toto* non hanno dimostrato, dopo analisi statistica (U di Mann-Whitney), differenze tali da essere statisticamente significative per il parametro mortalità (figura 5.6).

Il test statistico parametrico della *t* di Student ha confermato gli stessi risultati, ottenuti precedentemente. La mortalità media, espressa in percentuale (figura 5.6), per ogni sito è: 13,75% per la sorgente, 18,125% per la zona prima del depuratore, 11,875% nella zona dopo il depuratore, 19,375% spagliamento, 11,875% all'uscita del depuratore e 3,75% per il controllo.

Questi dati non hanno permesso di identificare il parametro  $LC_{50}$ , dimostrando un basso livello di tossicità che non compromette la sopravvivenza delle *Daphnia* (figura 5.6).

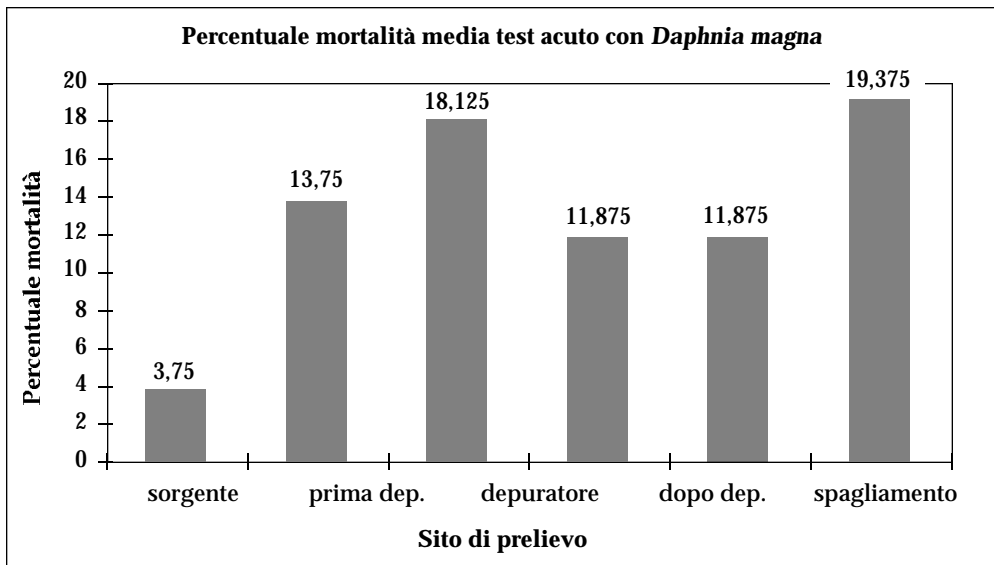


Figura 5.6 - Percentuale della mortalità media - test acuto con *Daphnia magna*.

### 5.4.2.2 Test cronico

Con questo test sono stati valutati i seguenti parametri: % di mortalità, numero di giorni di sopravvivenza, età della prima deposizione, numero medio di neonati prodotti giornalmente dalle femmine e lunghezza media delle *Daphnia* alla fine del test.

Le analisi statistiche, condotte utilizzando due tipi di metodi (*t* di Student e *One-Way* analisi della varianza-ANOVA), hanno evidenziato risultati simili tra loro.

Il parametro della lunghezza alla fine del test è risultato significativo con il metodo *one-way* ANOVA ( $p < 0,05$ ) in tutti gli esperimenti cronici condotti (figura 5.7).

Il metodo ANOVA ha evidenziato che la lunghezza media delle *Daphnia* cresciute

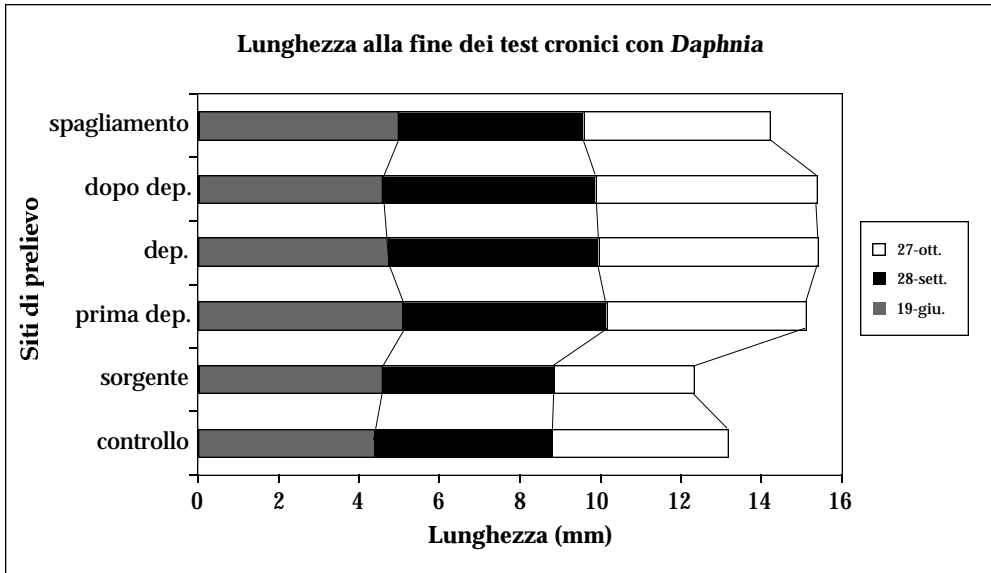


Figura 5.7 - Lunghezza alla fine dei test cronici con *Daphnia*.

nel *medium* controllo e nelle acque della sorgente è minore rispetto a quella degli organismi cresciuti nelle acque degli altri siti considerati. Solo per il test del 19 giugno, il *Multiple Range Analysis* ha evidenziato dimensioni maggiori per le *Daphnia* cresciute nelle acque dei siti 2 (prima del depuratore) e 4 (spagliamento) (figura 5.7).

Il parametro numero di neonati per giorni di sopravvivenza è risultato significativo (*one-way ANOVA*) in ognuno dei test cronici condotti (figura 5.8).

Il numero di piccoli nati è risultato significativamente inferiore ( $p < 0,05$ ) per le *Daphnia* cresciute nelle acque controllo e sito 1 (sorgente) a quelle cresciute negli altri siti.

Nel test del 28 settembre è stata inoltre rilevata una maggiore produzione di neonati ( $p < 0,01$ ) per gli individui cresciuti nelle acque dei siti 5 (depuratore) e 3 (dopo depuratore) (figura 5.8).

Il parametro età della prima deposizione è risultato essere significativamente minore (*Multiple Range Analysis*,  $p < 0,05$ ) per gli individui esposti alle acque del sito 3 e 4 rispetto a quella del controllo.

Questi dati hanno dimostrato una correlazione statistica positiva tra mortalità e pH delle acque, numero dei neonati e valori di COD e cadmio, numero di neonati e andamento del tipo di acque testate (dalla sorgente allo spagliamento).

#### 5.4.3 Risultati dei test di teratogenesi con *Xenopus laevis*

La valutazione del rischio teratogeno delle acque del torrente Arno ha evidenziato risultati variabili in relazione ai siti e al periodo di campionamento.

I parametri mortalità e malformazione (%) degli embrioni hanno evidenziato una significatività statistica (*Multiple Range Analysis*, <sup>2</sup>- Test U Mann Whithney,  $p < 0,05$ ) rispetto al controllo solo in pochi esperimenti (tabella 5.4).

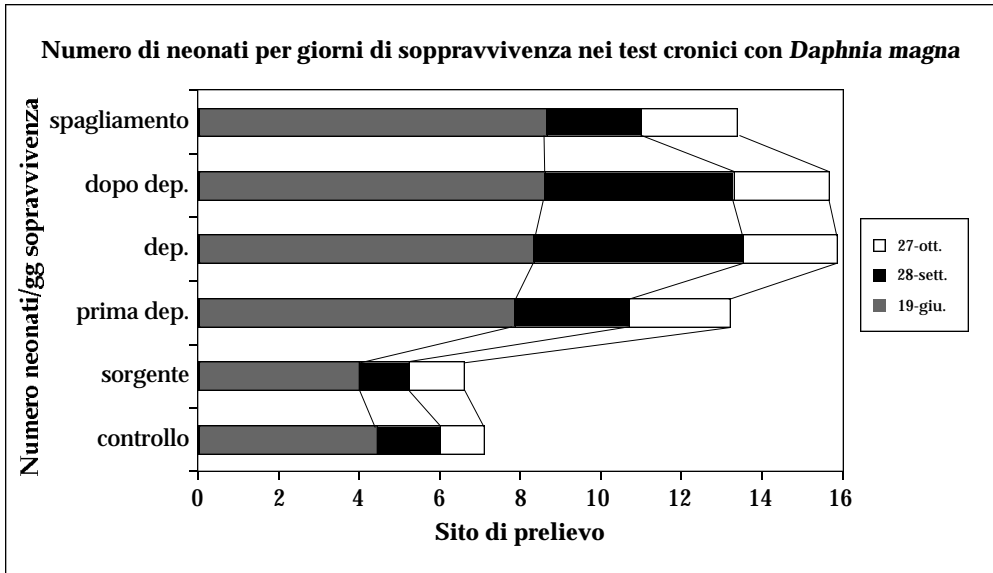


Figura 5.8 - Numero di neonati per giorni di sopravvivenza nei test cronici con *Daphnia magna*.

prelievo	sorg.			prima depuratore			dopo depuratore			fine g spagliamento		
	mort. %	malf. %	lung.	mort. %	malf. %	lung.	mort. %	malf. %	lung.	mort. %	malf. %	lung.
16/3/94	6	24,5	8,43*	11	29,75	9,62	100*			100*		
10/5/94	12,5	29,5	8,04*	10,5	15,5	9,72	10,5	23,5	9,74	5	68	9,03
17/5/94	11	12,25	9,41*	8	20,5	10,14	7,75	28,5	10	6,25	21	10,04
31/5/94	44	26,5	9,765	37,5	31,5	9,95	40,5	28	9,735	22	32	9,825
14/6/94	12,5	32,5	9,91	12,52	15	9,905	18,5	8	9,92	15,5	21	9,92
5/7/94	22	8,5	10,01	15,5	27,5	10,17	34,5*	33	9,749	31,5*	16	9,815
6/9/94	22	41,5	8,63*	19	31,5	9,34	28	26	9,52	28	51	9,79
13/9/94	38*	39,5	9,68	56,5*	41,5	9,36	37,5*	22,5	9,37	44*	31,58	9,87
27/9/94	27	16,6	9,8	16,6	39,33	10,07	12,6	33,6	9,99	10,33	36,6	10,08
4/10/94	12,75	22,75	9,56	4,75	19,57	9,67	14	27*	9,9	7,75	9,75	9,73
18/10/94	36,5	21,5	9,39	0	31,5	9,47	3	43*	9,16	15,5	37,5	9,92

\* p<0,05

Tabella 5.4 - Lunghezza media (mm), percentuale di mortalità e malformazione degli embrioni di *Xenopus laevis*.

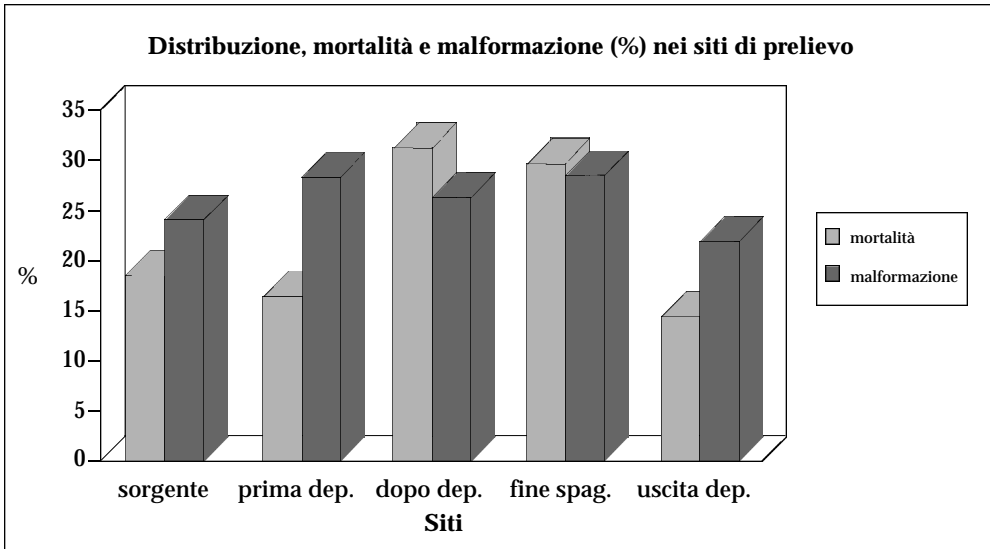


Figura 5.9 - Distribuzione della mortalità e della malformazione (%) nei siti di prelievo.

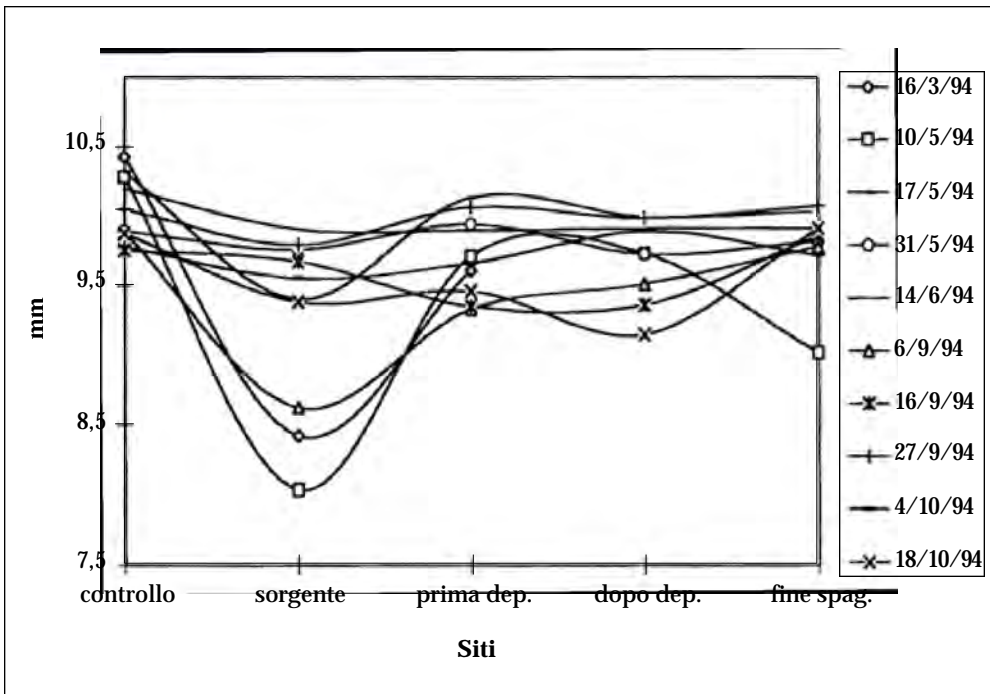


Figura 5.10 - Andamento della lunghezza media degli embrioni nei siti di prelievo.



Si può pertanto affermare che le acque del torrente Arno non mostrano effetto tossico e teratogeno su embrioni di *Xenopus laevis*.

I risultati ottenuti permettono comunque di estrapolare dall'andamento medio della mortalità che i siti 1, 3 e 4 sono quelli a maggiore tossicità (figura 5.9). L'andamento della malformazione media indica il sito 4 potenzialmente teratogeno (figura 5.9).

L'andamento generale ottenuto nei diversi esperimenti ha dimostrato che la lunghezza media dei trattati con l'acqua del sito 1 (sorgente) è sempre inferiore a quella degli embrioni controllo e trattati con le acque degli altri siti. In soli due casi (prelievo del 16/03/94 e del 10/05/94), la lunghezza media degli individui trattati con le acque del sito 1 è statisticamente inferiore a quella dei controlli (test *t* di Student e Dunnett,  $p < 0,05$ ) (figura 5.10).

## 5.5 Considerazioni conclusive sulle indagini tossicologiche

I risultati ottenuti utilizzando differenti bioindicatori appartenenti a diversi livelli della catena trofica (*Selenastrum*, *Daphnia* e *Xenopus*) e test (teratogenesi, acuto e cronico) permettono di affermare che le acque del torrente Arno non sono permanentemente tossiche o teratogene. La tossicità a volte riscontrata è attribuibile a fenomeni sporadici probabilmente correlata a scarichi anomali.

L'impiego in parallelo dei test qui utilizzati dimostra una sensibilità della risposta molto simile da parte degli organismi scelti. Pertanto risulta plausibile proporre questi test di facile esecuzione, di breve durata e basso costo nella valutazione di qualità ecologica di corsi d'acqua.

Tuttavia la presenza di scarichi anomali puntiformi merita attenzione in quanto essi, se frequenti, potrebbero alterare gli ecosistemi naturali presenti costituiti da una numerosa comunità di invertebrati e vertebrati acquatici soprattutto nella zona terminale dello spagliamento.

## Bibliografia

Association française de normalisation (AF-NOR) 1983. Essais des Eaux, Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*. Norme française homologuée, NF T90-301. Association française de normalisation, Paris, France.

Bantle, J. A., Fort, D. J. e James, B. L. 1989. Identification of developmental toxicants using the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX). *Hydrobiologia*, 188/189, 577-585.

Bonfanti, P., Colombo, A., Ciccotelli, M., Doldi, M., Dell'Orto, N. e Camatini, M. 1994. Cy-

tochrome P-450 induction in *Xenopus laevis* as biomarker for monitoring exposure to B[a]P. In: European Conference on Biomarkers in Environmental Toxicology, 33.

Bonfanti, P., Colombo, A., Urani, C., Cantelli, D. e Camatini, M. 1997. Markers biologici per la valutazione della qualità delle acque. *Acqua - Aria*, 6, 77-82.

Camatini, M. 1997. Molecular approaches to evaluate pollutants. Proceedings of the international symposium on integrated ecotoxicology, from molecules/organism to ecosystem. *Chemosphere*, in press.

- Camatini, M., Bonfanti, P., Colombo, A. e Doldi, M.** 1994. DNA adducts in target organs of an aquatic vertebrate exposed to a widespread environmental contaminant. *Contributions to Animal Biology*, 129-136.
- Ciccotelli, M., Dell'Orto, N., Cantelli, D. e Camatini, M.** 1996. A three-component freshwater test system for biomonitoring superficial water quality. In: Sixth Setac Europe Annual Meeting, 231.
- Colombo, A., Bonfanti, P., Urani, C., Bernardini, G., Vismara, C., Presutti, C. e Camatini, M.** 1993. Biological models for toxicology research. Proceedings International Congress on Health Effects of Hazardous Waste, Atlanta, 39-45. Academic Press, New York.
- Dawson, J. e Bantle, J. A.** 1987. Development of a reconstituted water medium and preliminary validation of the Frog Embryo Teratogenesis Assay- *Xenopus* (FETAX). *Appl. Toxicol.*, 7(4), 237-234.
- Dell'Orto, N., Cantelli, D. e Urani, C.** 1997. Cellular targets in response to dioxin exposure. Proceedings of the international symposium on integrated ecotoxicology, from molecules/organism to ecosystems. *Chemosphere*, in press.
- Environmental Protection Series (EPS)** 1990. Biological test method: acute lethality test using *Daphnia* Report EPS 1/RM/11, Environment Canada, 57.
- European Economic Community (EEC)** 1987. Methods for the determination of ecotoxicity: algal inhibition test. EEC Directive, 79/831, Annex V, Part C.
- Horning, W. B. e Weber, C. I.** 1985. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. US EPA, Report EPA/600/ 4-85/014, 161.
- Lewis, M. A.** 1993. Freshwater primary producers. *Handbook of Ecotoxicology*, 1, 28-50.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD)** 1984. Alga growth inhibition test, Test Guideline n. 201. OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Paris.
- Persoone, G. e Janssen, C. R.** 1993. Freshwater invertebrate toxicity test. *Handbook of Ecotoxicology*, 1, 51-65.
- Vismara, C., Bernardini, G., Bonfanti, P., Colombo, A. e Camatini, M.** 1993. The use of *in vitro* fertilization in frog embryo teratogenesis assay in *Xenopus* (FETAX) and its applications to ecotoxicology. *Sci. Total Environ.*, proceedings SECOTOX Amsterdam, 135, 141-149.

# Capitolo 6

## Bioindicatori a livello di popolazioni e comunità

Mauro G. Mariotti, Alberto Meriggi, Anna Occhipinti Ambrogi,  
Andrea Buffagni, Paolo Galli, Marco Marchetti e Mario A. Gomarasca

## 6.1 Flora e vegetazione - Mauro G. Mariotti

### 6.1.1 L'importanza delle piante vascolari come bioindicatori

I termini bioindicatore e biomonitoraggio acquistano significati diversi a seconda dei campi nei quali sono utilizzati. Per un ecologo, specie o comunità vengono interpretate come bioindicatori quando la loro presenza o assenza serve a indicare il modo in cui uno o più fattori ambientali agiscono: il grado di alcalinità o acidità del suolo, la presenza di un particolare rapporto tra magnesio e calcio nel substrato, il grado di umidità nell'aria, la temperatura minima invernale, il tipo e l'intensità del pascolo, la ricorrenza di incendi, un certo tipo di disturbo recato dall'uomo ecc.

L'approccio naturalistico all'ambiente permette di vedere ogni singolo elemento dell'ambiente stesso (pianta, animale, terreno ecc.) come se fosse situato su un nodo di molteplici rapporti che lo legano a tutti gli altri. Ciò porta a evidenziare la complessità del sistema e a valutare con molta prudenza il legame tra presenza/assenza di una specie o comunità e il manifestarsi di una singola e definita condizione relativa a uno o più parametri abiotici o biotici. Tale prudenza deriva dalla consapevolezza dell'esistenza di un numero elevato di sinergie e contrasti per gran parte poco evidenti e misurabili.

Il termine bioindicatore, tuttavia, è salito alla ribalta solo quando è stato utilizzato per scopi applicativi in relazione a fenomeni di inquinamento. Il monitoraggio diretto rileva se una o più sostanze superano soglie predefinite e, quindi, se vi è inquinamento, ma risulta quasi inutile per valutare la qualità complessiva dell'aria, dell'acqua o del suolo, determinata dagli effetti delle sostanze. A questo scopo può senz'altro risultare efficace l'utilizzo dei bioindicatori e in particolare quello di organismi, relativamente semplici, sensibili all'azione generale degli inquinanti (licheni, muschi, alghe, macroinvertebrati). Inoltre, altri organismi (molti dei quali possono essere definiti bioaccumulatori perché in grado di assumere e conservare dosi più o meno rilevanti di elementi o sostanze particolari) mostrano relazioni quantitativamente definite o definibili con la concentrazione di questa o quella sostanza inquinante e possono funzionare come veri e propri *biomonitor*. Nell'ambito vegetale, se si eccettuano alcune *cultivar* appositamente selezionate, sono piuttosto rare le piante che presentano una risposta lineare a crescenti concentrazioni di singoli inquinanti, mentre più frequenti sono quelle che rivelano l'effetto globale degli inquinanti permettendo valutazioni sulla qualità del mezzo (aria, acqua, suolo).

Mentre licheni e alghe, organismi più semplici, hanno per lo più rapporti esclusivi o privilegiati con un unico mezzo ambientale (per esempio aria o acqua), le piante superiori sono dei sistemi molto più complessi relazionati strettamente con l'aria, l'acqua, il suolo e tutta la componente biotica. Esse sono pertanto più fortemente influenzate da numerosi parametri ambientali e la loro presenza/assenza o le loro caratteristiche sono determinate anche da molteplici fattori naturali o seminaturali diversi dagli inquinanti. Non è pertanto facile distinguere ciò che può apparire una risposta a una situazione generale di inquinamento da una risposta a più tipi di stress (disturbo antropico, aridità ecc.). Se ciò è vero per un singolo individuo, ancora più lo è per una comunità costituita da numerosi individui di specie diverse.

Gli studi sulle comunità vegetali condotti con criteri fitosociologici o con altri criteri scientifici, altrettanto validi, hanno comunque portato a verificare che la presen-

za/assenza o le caratteristiche di alcune di queste stesse comunità sono in relazione con situazioni di inquinamento particolare. A questo riguardo diversi dati derivano da ricerche sulle comunità di macrofite in ambienti acquatici e si riferiscono perciò a situazioni di inquinamento idrico, mentre più rari sono quelli relativi a situazioni di inquinamento atmosferico o del suolo.

Da tempo vengono condotti studi su suoli metalliferi naturali o seminaturali (substrati ultramafici, depositi di miniere ecc.) e su terreni artificialmente preparati che hanno consentito di distinguere i livelli di sensibilità o tolleranza di numerose piante rispetto ai metalli pesanti; questi studi offrono una potenzialità concreta di sviluppi nel campo del biomonitoraggio anche in condizioni ambientali diverse, dove la presenza dei metalli nel suolo deriva da inquinamento apportato dall'uomo.

Ma uno dei ruoli essenziali dello studio delle comunità vegetali nell'ambito del biomonitoraggio è la preventiva definizione dei caratteri ambientali, indispensabile per la scelta dei siti e per la predisposizione di una rete di indagine adatta alla comparazione dei dati ottenuti anche in altri settori disciplinari. La caratterizzazione delle comunità vegetali permette infatti la corretta comparazione su scala geografica ed è indispensabile per quella cronologica soprattutto a una distanza di tempo di diversi anni.

Lo studio delle comunità non deve essere disgiunto da quello delle popolazioni, pertanto i campi di indagine possono essere distinti in *flora* e *vegetazione*.

La flora corrisponde all'insieme delle entità vegetali (specie e ranghi subordinati come sottospecie, varietà ecc.) presenti in un territorio predeterminato; la vegetazione è invece rappresentata dall'insieme delle comunità vegetali e dei rapporti che intercorrono fra esse e col resto dell'ambiente. Pertanto quando si parla di flora ci si riferisce a un elenco di specie (pioppo, frassino, ontano, biancospino, carice pendula, luppolo ecc.); quando si parla di vegetazione ci si riferisce a un elenco di comunità vegetali (bosco di frassini e ontani, pascolo di sesleria alberato ecc.).

Flora e vegetazione rappresentano risposte molto complesse a tutti i fattori ambientali (abiotici e biotici) e al loro variare: non sono stabili, ma soggette a cambiamenti che possono essere periodici e ricorrenti (per esempio legati al variare delle stagioni) o a processi omeostatici che tendono al ripristino di situazioni di equilibrio quando queste sono state alterate dal condizionamento di uno o più fattori. Se si verifica un versamento di liquami azotati su un terreno la flora ne risente e lo manifesta con l'ingresso o l'aumento nella sua composizione di specie nitrofile, che persisteranno fintanto che le condizioni edafiche resteranno modificate; se un territorio coperto da foresta viene investito da una nube di inquinanti, si può verificare una moria di alberi che aumenta la disponibilità di luce al suolo e favorisce lo sviluppo dello strato erbaceo (in situazioni particolarmente gravi, la comunità forestale viene sostituita da un'altra dominata dalle erbe). In entrambi gli esempi, però, appena cessata l'influenza del fattore di disturbo, la flora e la vegetazione tendono a ripristinare lo stato di maggiore equilibrio con le condizioni generali (soprattutto climatiche ed edafiche) dell'area.

Le analisi della flora e della vegetazione permettono di individuare alcuni segnali che indicano la qualità dell'ambiente nel suo complesso (più la vegetazione è distante dal *climax*, cioè dalla formazione vegetale in maggiore equilibrio col clima, maggiore è l'artificialità); altrettanto si può dire se la flora presenta un numero elevato di specie sinantropiche o comunque legate all'uomo nella loro diffusione.

Le piante e le comunità vegetali che reagiscono a un inquinante con meccanismi di sensibilità/tolleranza lo manifestano in diversi modi valutabili ai fini di una bioindicazione:

- presenza/assenza, o meglio, comparsa/scomparsa (termini che offrono un'idea del dinamismo);
- aumento/diminuzione (del numero di individui, dell'estensione ecc.);
- alterazione delle caratteristiche.

### **6.1.2 I metodi**

Per l'analisi floristica i metodi sono fondati essenzialmente sui censimenti delle piante spontanee e sull'elaborazione e valutazione dei dati ottenuti. Ciò che potrebbe apparire una semplice osservazione o raccolta e identificazione di piante è, in realtà, una operazione un po' più complessa.

Si possono distinguere diverse fasi di lavoro, che partono da una chiara individuazione e delimitazione dell'area e proseguono con i censimenti veri e propri nei periodi più opportuni e proficui e con un'identificazione sicura delle piante per concludersi con l'elaborazione dei dati e la loro valutazione ai fini delle indagini applicative. Tutto ciò deve essere condotto da un geobotanico che conosca o abbia le capacità di conoscere i caratteri floristici della regione in cui opera.

La delimitazione dell'area di indagine deve tenere conto delle esigenze applicative, ma soprattutto deve seguire criteri di omogeneità ecologica e deve permettere di ottenere dati sulla flora di un comprensorio più vasto.

Occorre perciò individuare almeno due scale: una di conoscenza generale del comprensorio (vallata, bacino, gruppo montuoso ecc.) e una, più dettagliata, relativa al sito oggetto di specifica indagine. Sono perciò utili i dati derivanti da tutti i censimenti floristici effettuati nel passato o in tempi più recenti, ma sono anche necessari censimenti effettuati appositamente.

Per lo studio della vegetazione è necessario ricorrere ai rilevamenti fitosociologici eseguiti su quadrati permanenti o transetti lineari ben delimitati, adottando, ove possibile, scale di copertura delle singole specie più dettagliate rispetto a quelle tradizionalmente usate nella maggior parte dei Paesi europei (le scale Braun-Blanquet o Pignatti sono utili e speditive, ma è preferibile indicare direttamente la percentuale di copertura stimata con la maggiore accuratezza possibile). Naturalmente, aumentando il numero dei rilevamenti si riduce l'errore statistico e si ottiene un quadro più completo della vegetazione. Su scala vasta si possono condurre anche gli studi sui complessi di vegetazione che stimano la percentuale delle diverse associazioni vegetali in un'unità di paesaggio, per esempio in una valle, ma in questo campo siamo solo agli inizi e ci si deve rivolgere a personale con notevole professionalità ed esperienza. Ancora più utile è la cartografia della vegetazione: una volta individuate le tipologie vegetazionali tramite i rilevamenti, si georeferenziano le aree occupate dalle singole tipologie. Maggiori sono il dettaglio e la scala, maggiori sono le possibilità di individuare in seguito variazioni, eventualmente interpretabili come indicatrici di fenomeno di inquinamento a scala locale, tuttavia anche le indagini effettuate a scale più generiche possono dare utili indicazioni su variazioni importanti, che necessiteranno di uno sforzo interpretativo maggiore.

Grande importanza assume l'elaborazione dei dati ottenuti con i censimenti flo-

ristici e i rilevamenti vegetazionali; tale fase si avvale oggi delle tecnologie informatiche e permette di operare agevolmente distinzioni fra situazioni differenti (per esempio in ipotesi inquinate o non inquinate) con criteri maggiormente oggettivi. Tuttavia anche questa fase, nel caso dell'individuazione di bioindicatori, dipende dal possesso o meno di dati reali sul livello di legame tra presenza/assenza o abbondanza/scarsità di una determinata specie o comunità e un inquinante o classe di inquinanti. Le maggiori conoscenze al riguardo si riferiscono al rapporto fra alcune specie o associazioni vegetali e alcuni metalli pesanti o sostanze azotate in genere. In alcuni casi questo rapporto è stato codificato numericamente attraverso l'adozione di indici ecologici (che riguardano più in generale il rapporto piante/fattori ambientali) elaborati sulla base di esperienze non sempre metodologicamente precise, ma per lo più efficaci e veritiere, anche se talora influenzate dalle condizioni delle aree geografiche (Germania, Gran Bretagna e Svizzera soprattutto) nelle quali sono stati condotti gli studi relativi. Il problema che deve essere oggi affrontato è quello di verificare se tali indici siano validi per le situazioni italiane. Gli indici ecologici più utilizzati sono quelli di Ellenberg (1974) e di Landolt (1977) e possono essere adottati in Lombardia, territorio che ricade nelle regioni fitogeografiche centroeuropea e alpina, con maggiore sicurezza di quanto sarebbe possibile in una regione peninsulare a gravitazione mediterranea. Tali indici, insieme con altre conoscenze che si stanno sempre più acquisendo, sono utili anche per valutare più correttamente certe situazioni che possono essere attribuite a inquinamento, ma dipendono da fattori naturali o seminaturali (geomorfologici, microclimatici ecc.). Importanti valutazioni possono essere fatte in riferimento all'habitat di appartenenza delle singole specie: per esempio, una semplice verifica del numero delle specie non forestali e della loro diffusione all'interno di un bosco (lontano dal margine) può portare a considerazioni sul grado di disturbo al quale è sottoposta la formazione boschiva e sul suo livello di qualità globale. A queste considerazioni preliminari possono poi seguire indagini più accurate per verificare l'esistenza o meno di fenomeni di inquinamento che alterano la copertura delle chiome e l'irraggiamento al suolo, tenendo presente che ciò può avvenire anche a causa di altri fattori, come per esempio la diffusione di parassiti, l'invecchiamento degli alberi ecc.

Utili elaborazioni si ottengono anche considerando i tipi corologici o, in qualche caso, le forme biologiche d'appartenenza delle specie rilevate. Lo spettro corologico, cioè la composizione percentuale relativa all'origine geografica delle diverse specie può infatti variare anche a seguito dell'incidenza di fattori non naturali ed evidenziare un aumento delle specie a larga diffusione (cosmopolite) e di quelle estranee alla flora locale (specie esotiche avventizie). I confronti fra gli spettri corologici calcolati in situazioni naturali e in situazioni alterate permettono di confermare l'esistenza di fattori di stress, degrado o disturbo (*figura 6.1*).

Analogamente si potrebbe constatare, in relazione alla forma biologica (aspetto di ciascuna specie, determinato principalmente dalla posizione delle gemme come risposta alle condizioni climatiche generali), un aumento delle terofite, cioè delle piante a ciclo breve, che riescono a sopportare lo stress riducendo il loro periodo vegetativo e riproduttivo a pochi mesi e a eliminare a ogni generazione eventuali sostanze inquinanti accumulate (*figura 6.2*).

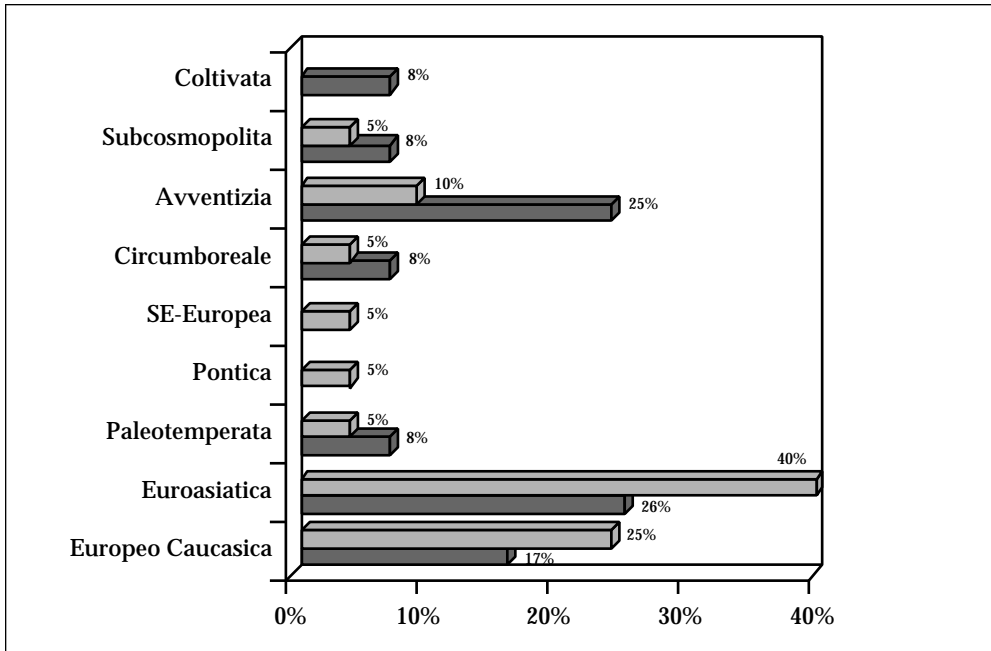


Figura 6.1 - Spettri corologici di aree boschive allagate dalle acque di spagliamento del torrente Arno a valle del depuratore di S. Antonino (provincia di Varese) (grigio) e aree di controllo vicine (chiaro). Le specie esotiche (avventizie) e subcosmopolite sono in percentuali assai maggiori nelle aree sottoposte a stress.

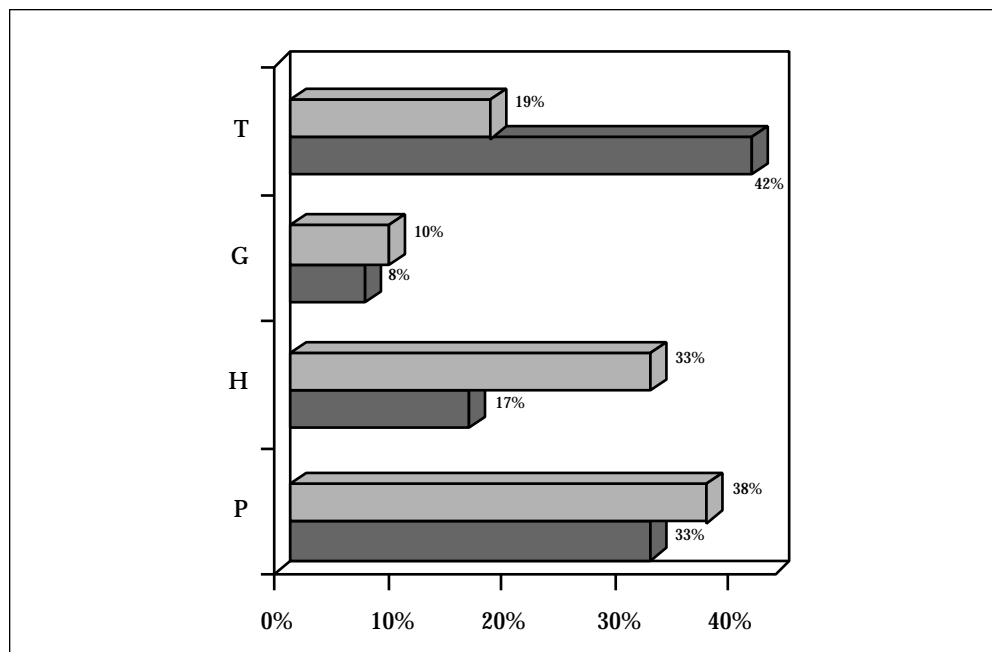
Elaborazioni relative al grado di fitodiversità delle comunità inteso come numero di specie presenti possono fornire utili indicazioni se correlate ad altri dati e interpretati assieme all'eventuale dominanza di una specie a elevata capacità competitiva in situazioni di stress.

Interessante è inoltre lo studio a livello di popolazione di alcune specie che possono fornire una bioindicazione: variazioni improvvise del numero di individui (in aumento o in diminuzione) possono testimoniare l'esistenza di fenomeni acuti di stress, riferibili o non all'inquinamento. In qualche caso, però, può essere necessaria un'analisi fine della popolazione perché vi sono specie che comprendono popolazioni eterogenee, con individui tolleranti e individui sensibili non distinguibili morfologicamente, ma solo fisiologicamente. In qualche caso le differenze sono invece rilevabili fenologicamente con un anticipo o un ritardo della fioritura.

Altri studi riguardano la stima della produttività, per esempio attraverso la valutazione delle variazioni della biomassa prodotta, che può essere limitata ad alcune specie o gruppi di specie distinti sulla base della struttura vegetazionale (strato erbaceo, arbustivo e arboreo) o della sistematica (singole specie dominanti, famiglie).

Un tipo di indagine particolare, ma utile riguarda la flora pollinica nelle formazioni forestali, cioè il complesso dei pollini e delle spore che giungono a livello del terreno nell'ambito di una foresta. Studi di questo tipo possono essere agevolmente condotti





**Figura 6.2** - Spettri biologici di aree boschive allagate dalle acque di spagliamento del torrente Arno a valle del depuratore di S. Antonino (provincia di Varese) (grigio) e aree di controllo vicine (chiaro). Le terofite a ciclo breve (T) sono in percentuali assai maggiori nelle aree sottoposte a stress.

da specialisti in actuopalinologia: con l'esame dei pollini "catturati" da trappole naturali come i cuscinetti di muschio è stato verificato che la componente pollinica extralocale è molto maggiore laddove si riscontrano danni di nuovo tipo, probabilmente a causa della minore copertura delle chiome.

### 6.1.3 Alcuni esempi

#### 6.1.3.1 L'ambiente acquatico

Le zone umide e le comunità vegetali di piante superiori (macrofite acquatiche) hanno subito nel corso di questo secolo una riduzione sempre più accentuata nel numero, nell'estensione e nella loro qualità e complessità.

Le cause di questo declino sono molteplici: interrimenti naturali, bonifiche, drenaggi, ma anche inquinamento. Appare importante, anche alla luce delle direttive comunitarie, sviluppare un progetto di monitoraggio della qualità ambientale relativa alle zone umide ed esistono concrete possibilità di attuazione al riguardo verificando sia globalmente lo sviluppo delle formazioni macrofitiche sia puntualmente la dinamica delle popolazioni di alcune specie vegetali sensibili.

La cartografia delle formazioni vegetali idro-igrofile ripetuta a distanza di intervalli di tempo annuali e la relativa informatizzazione dei dati con metodologie GIS può fornire

indicazioni importanti sulla qualità dell'acqua. In altri stati europei è stato verificato che gli erbicidi sopprimono l'invasione di nuove macrofite acquatiche sino a 500 m dalla sorgente ed eliminano le macrofite già insediate sino a 200 m (Remillard *et al.*, 1992). Un esempio di specie già utilizzata come bioindicatore per il monitoraggio delle condizioni dell'ambiente acquatico è la cannuccia di palude (*Phragmites australis*). Si tratta di una specie facilmente riconoscibile, molto sensibile alle variazioni di temperatura, livello idrico e salinità; fattori che incidono sul declino di questa specie sono la distruzione degli habitat, la modifica dei regimi idrologici, il pascolo, l'interrimento naturale, ma anche la diminuzione della qualità dell'acqua e in particolare l'eutrofizzazione e il livello dei nitrati. A riprova di quanto affermato nell'introduzione di questo capitolo circa la complessità delle relazioni che interessano le piante superiori, occorre però fare attenzione anche ad altri fattori come attacchi di afidi e lepidotteri che possono ridurre la crescita della cannuccia di palude persino del 60% (Marks *et al.*, 1994). In Lombardia il monitoraggio delle popolazioni di questa specie limitato ad aree non sottoposte a pascolo, incendio e con fenomeni d'interrimento controllati, laddove non vi siano contrasti economici con l'eventuale invasività della specie medesima potrebbe fornire un quadro importante sulla qualità ambientale rispetto anche all'inquinamento idrico. È da ricordare infatti che tale specie può venire spesso sostituita da altre meglio adattate a condizioni di maggiore eutrofizzazione, come la tifa (*Typha latifolia*).

Unitamente al controllo delle popolazioni di cannuccia di palude, sarebbe utile una verifica della presenza o effettiva scomparsa di alcune specie riportate nel libro rosso delle piante d'Italia. Per la Lombardia si evidenziano quattro specie indicate come sensibili all'inquinamento: *Utricularia intermedia* (pianta acquatica carnivora estinta, ma da verificare nel Bergamasco, sull'Adda), *Carex appropinquata* (specie "minacciata" di palude che caratterizza un'associazione vegetale delle pianure alluvionali – *Caricetum appropinquatae* – segnalata al Lago Ganna), *Isoetes echinospora* (una felce lacustre, che ha risentito drasticamente dell'inquinamento ed è in via di progressiva rarefazione, ancora segnalata nel Bresciano al Lago d'Agna, Lago Lungo, La Lametta, Lago Cuppetti inferiore) e *Isoetes malinverniana* (altra felce arcaica tipica dei canali, sensibile ai prodotti chimici utilizzati in agricoltura, segnalata nella provincia di Pavia).

L'aumento nella diffusione di altre specie, come *Ceratophyllum demersum*, *Glyceria maxima*, *Typha latifolia*, *Ranunculus sceleratus* più o meno nitrofile, indicherebbe invece un aumento degli apporti azotati nelle acque.

#### 6.1.3.2 Gli inquinanti organici nel terreno

Le specie che si ritrovano principalmente sui terreni con tenore di sostanze nutritive (fosforo, potassio e soprattutto azoto) in eccesso, assenti sui suoli poveri di queste sostanze, e quindi indicatrici di fertilizzazione molto elevata, sono diverse. Alcune sono localizzate in habitat sinantropici (margini di percorsi, strade, autostrade e ferrovie, campi coltivati ecc.), ma possono acquistare un valore particolare quando le ritroviamo in ambienti naturali o seminaturali: qui, a seconda dell'estensione delle loro popolazioni, possono effettivamente indicare, oltre che generici interventi di disturbo antropico, un inquinamento del terreno localizzato o diffuso dovuto ad apporti organici la cui fonte può essere facilmente individuata nel pascolo intensivo o nelle emissioni da camini e ciminiera, ma, in qualche caso, è più difficile da reperire. Nella tabella 6.1 sono elencate le specie che hanno un elevato indice di legame con gli apporti di sostanze azotate nel terreno.

Anche le comunità che infestano o, meglio, infestavano le colture e quelle dei greti fluviali si differenziano sempre meno per un'accentuazione in queste ultime dei caratteri di nitrofilia, terofitismo ed esotismo. Il continuo disturbo delle cenosi naturali e il continuo apporto di sostanze organiche da parte delle acque ha facilitato la diffusione di specie dotate delle stesse strategie di sopravvivenza messe in atto per lottare contro le difficoltà riscontrabili in una coltura. Analizzando le percentuali di queste tre categorie di specie - nitrofile, a ciclo breve ed esotiche - si ottiene un quadro chiaro della qualità di un ambiente.

Nei boschi lombardi si assiste a una sempre maggiore diffusione di specie decisamente nitrofile, erbacee, come: *Bidens frondosa*, *Solidago gigantea*, *Phytolacca americana*, o legnose come: *Amorpha fruticosa*, *Robinia pseudoacacia*, *Prunus serotina* (prugnolo tardivo), tutte di origine nordamericana. In particolare la diffusione del prugnolo tardivo ha rappresentato e rappresenta un esempio che indica chiaramente fenomeni di disturbo persistenti *in loco* o avvenuti anche a media distanza. In alcuni casi, l'elevata invasività di questa specie, derivante anche dalla grande capacità riproduttiva vegetativa, ha portato alla sostituzione quasi completa di specie autoctone, come la farnia (*Quercus robur*) e a una diminuzione generalizzata del livello di diversità: in formazioni con prugnolo tardivo le specie vegetali spesso si contano sulle dita di una mano. Ciò non deriva proba-

Famiglia	Specie	Famiglia	Specie
Aracee	<i>Dracunculus vulgaris</i>	Crucifere	<i>Alliaria petiolata</i> <i>Barbarea bracteosa</i> <i>Brassica oleracea</i>
Boraginacee	<i>Asperugo procumbens</i> <i>Lappula deflexa</i>		Graminacee
Chenopodiacee	<i>Chenopodium bonus-henricus</i> <i>Chenopodium glaucum</i> <i>Chenopodium rubrum</i> <i>Chenopodium vulvaria</i>	Labiate	<i>Ballota nigra</i> <i>Leonurus cardiaca</i> <i>Lamium album</i> <i>Marrubium vulgare</i>
		Poligonacee	<i>Rumex alpinus</i>
Composite	<i>Arctium lappa</i> <i>Arctium minus</i> <i>Arctium nemorosum</i> <i>Arctium tomentosum</i> <i>Bidens cernua</i> <i>Bidens radiata</i> <i>Bidens tripartita</i> <i>Carduus crispus</i> <i>Matricaria discoidea</i> <i>Onopordon acanthium</i> <i>Pulicaria vulgaris</i> , <i>Senecio cordatus</i> <i>Senecio subalpinus</i> <i>Xanthium italicum</i> <i>Xanthium orientale</i> <i>Xanthium strumarium</i>	Rubiacee	<i>Galium aparine</i> <i>Galium spurium</i>
		Solanacee	<i>Hyosciamus albus</i> <i>Hyosciamus niger</i>
		Urticacee	<i>Parietaria diffusa</i> <i>Parietaria officinalis</i> <i>Urtica dioica</i> <i>Urtica urens</i>

Tabella 6.1 - Specie della flora italiana indicatrici di tenore elevato di sostanze azotate nel terreno selezionate in base agli indici di Landolt (1977).

bilmente solo dalla capacità concorrenziale del prugnolo tardivo, ma anche da condizioni di stress edafico sopportabili solo da poche specie resistenti, condizioni in parte determinate da inquinamento del terreno e/o delle falde idriche superficiali.

Anche in ambienti non forestali, ma rari e da tutelare in Lombardia, come le brughiere a *Calluna vulgaris*, alcune variazioni nel corteggio floristico possono indicare un aumento degli apporti azotati nel terreno. È infatti dimostrato che, sottoponendo a fertilizzazioni azotate il suolo o a fumigazioni le formazioni dominate da *Avenella flexuosa* e *Calluna vulgaris*, la prima aumenta la crescita e compete con successo con la seconda: apporti azotati nel suolo o fumigazioni rinforzano perciò la capacità competitiva delle erbe e innescano la trasformazione delle brughiere in pascoli (Mickel *et al.*, 1991).

### 6.1.3.3 Piante e metalli pesanti

Lo studio dei rapporti fra piante e metalli pesanti è il campo nel quale forse vi è maggiore attenzione da parte degli ecologi e dei botanici.

Come detto, molte conoscenze derivano da indagini condotte su terreni metalliferi naturali (per lo più ofiolitici) o in aree minerarie, più che in terreni contaminati dall'uomo incidentalmente (discariche, depositi di scorie industriali ecc.). In alcune di queste ricerche il vantaggio è che il fattore limitante o meglio condizionante (cioè la concentrazione del metallo) può essere analizzato con relativa facilità e la risposta alla tossicità del metallo, esprimibile come tolleranza genotipica delle popolazioni, può essere verificata con test come la crescita radicale, la produzione di biomassa, l'attività enzimatica ecc. Questi modelli sono, però, semplici e utili a fini applicativi se il fattore condizionante è effettivamente tale e ben definito. Ciò si può verificare in condizioni naturali solo su rocce nude, litosuoli o suoli scarsamente evoluti e in condizioni artificiali solo su depositi relativamente puri e recenti di inquinanti metallici. Quando il terreno è evoluto, quando ai depositi si mescola terreno agricolo o quando la zona inquinata subisce altri disturbi (allagamento, apporto organico ecc.) si instaurano fenomeni (lisciviazioni, neutralizzazioni, percolamenti, precipitazioni) che mutano gradualmente o bruscamente la possibilità di assorbimento dei metalli da parte delle piante cosicché in molti casi questo non rappresenta più un fattore di condizionamento. In molte situazioni il totale di metalli realmente disponibile per le piante non è elevato e il ruolo di condizionamento viene assunto da un altro fattore, come la scarsità di nutrienti, la disponibilità di ossigeno ecc. In tutti questi casi il modello classico di studio diventa più complesso e difficilmente utilizzabile ai fini applicativi.

In relazione ai metalli si possono distinguere:

- piante *sensibili*, che tendono a scomparire più o meno bruscamente in presenza di elevate concentrazioni di metalli;
- *metallofite assolute*, che vegetano esclusivamente o quasi su suoli metalliferi (specie di *Alyssum*, *Viola* e cloni di *Armeria*, *Festuca*);
- *pseudometallofite* rinvenibili anche su suoli non contaminati (cloni di *Agrostis*);
- *elettive*, più abbondanti e vigorose su suoli metalliferi;
- *indifferenti o metallovaghe*, che possono essere più o meno abbondanti e non particolarmente vigorose su suoli metalliferi (specie di *Plantago*, *Achillea* ecc.);
- *accidentali*, cioè specie per lo più ruderali che evitano i suoli contaminati e su questi perdono vigore.

Alcune piante tollerano elevate concentrazioni di metalli grazie a processi fisiologi-

ci di esclusione a livello radicale; altre, più rare, sono invece in grado di accumulare ioni metallici nel fusto e nelle foglie. Fra queste ve ne sono (*iperaccumulatori*) che concentrano quantità di metalli a livelli particolarmente alti. Ve ne sono infine che riescono a vivere anche su suoli metalliferi, ma mostrano una particolare morfosi (nanismo, arrossamento, microfillia ecc.) o una differente fenologia (anticipo della fioritura, accorciamento del ciclo riproduttivo ecc.).

Nella *tabella 6.2* sono elencate specie della flora italiana (quasi tutte presenti anche in aree lombarde) che mostrano diverse reazioni rispetto ai metalli pesanti e le loro possibili utilizzazioni per il controllo dell'inquinamento. Alcune sono proprie di ambienti alpini e pongono problemi nel loro impiego a quote inferiori, altre possono essere utilizzate solo con test di laboratorio su terreni da analizzare e implicano l'impiego sia degli ecotipi tolleranti sia di quelli sensibili.

<b>Bioaccumulatori e metallofite (utilizzabili come indicatori del fenomeno)</b>	<b>Metallo</b>
<i>Alyssum bertolonii</i> (iperaccumulatore)	Ni
<i>Alyssum argenteum</i>	Ni
<i>Thlaspi rotundifolium</i> ssp. <i>cepaefolium</i>	Zn
<i>Viola dubyana</i>	Zn, Pb, Cu
<b>Ecotipi in grado di accumulare a seconda delle condizioni (utilizzabili come <i>biomonitor</i> e/o recupero ambientale)</b>	
<i>Agrostis tenuis</i>	Zn
<i>Artemisia vulgaris</i>	Cd, Zn
<i>Cerastium latifolium</i>	Cr
<i>Festuca rubra</i>	Zn
<i>Minuartia verna</i>	Zn, Ni, Cu
<i>Rumex acetosa</i>	Cu, Pb, Zn
<i>Thlaspi rotundifolium</i>	Ni, Co
<i>Thlaspi sylvium</i> (= <i>T. alpinum</i> auct.)	Ni, Co
<b>Ecotipi in grado di accumulare a seconda delle condizioni, con morfosi particolari (nanismo, arrossamento ecc.) (utilizzabili come <i>biomonitor</i>)</b>	
<i>Agrostis tenuis</i>	
<i>Anthoxanthum odoratum</i>	
<i>Cerastium holosteoides</i>	Pb, Zn
<i>Luzula lutea</i>	Ni
<i>Silene vulgaris</i>	Ni, Zn, Cu
<i>Solidago virgaurea</i>	Ni

(segue)

<b>Specie con ecotipi tolleranti ed ecotipi sensibili (utilizzabili come indicatori in test e/o recupero ambientale)</b>	
<i>Acer pseudoplatanus</i>	
<i>Agrostis stolonifera</i>	Pb, As
<i>Agrostis tenuis</i>	Cu, Fe, Pb, As
<i>Betula pendula</i>	
<i>Cerastium fontanum ssp. glabrescens</i>	Cu, Fe, Pb, Zn
<i>Deschampsia caespitosa</i>	Cu, Ni, Zn, Pb, Al, Co
<i>Festuca rubra</i>	Cu, Pb, Zn, Fe
<i>Jasione montana</i>	As
<i>Minuartia verna</i>	Pb, Zn
<i>Silene italica</i>	Ni
<i>Silene vulgaris</i>	Ni, Cd
<i>Thymus praecox</i>	Cu, Pb, Zn, Fe
<i>Trifolium repens</i>	Cu

**Tabella 6.2** - Specie della flora italiana utilizzabili per il controllo dell'inquinamento da metalli pesanti.

A queste specie se ne possono aggiungere altre, dotate di tolleranza generalizzata agli stress, che possono sopportare, per lo più con meccanismi di esclusione, concentrazioni rilevanti di metalli. Nell'ambito della ricerca "Effetti dell'inquinamento su sistemi agro-forestali: tecniche biologiche di monitoraggio e recupero" (vedi Sintesi delle attività del progetto) su cumuli di scorie di fonderia presso Figino Serenza (provincia di Como) si è rilevata la presenza di *Acer pseudoplatanus*, *Arrhenatherum elatius*, *Artemisia vulgaris*, *Calystegia sepium*, *Frangula alnus*, *Solidago gigantea*. Ai margini degli stessi cumuli si sono rinvenute anche *Phytolacca americana*, *Buddleja davidii*. La frequenza di esotiche dimostra ancora una volta la capacità di indicare situazioni di disturbo e di stress, inclusi gli eventi di inquinamento acuto e cronico. *Solidago gigantea* ha dimostrato di tollerare bene situazioni difficili, accumulando anche elevate concentrazioni di Cd e Zn, e ciò è in accordo con le capacità di sopravvivenza di una congenere, *Solidago nemoralis*, che domina incontrastata per oltre un decennio le miniere di carbone della Virginia occidentale (Skousen *et al.*, 1994).

Anche se esula dall'oggetto di questa pubblicazione, non si può fare a meno di accennare che lo studio delle metallofiti e in particolare di quelle accumulatrici appare promettente soprattutto ai fini del restauro ambientale di zone contaminate con prospettive di coltivazioni destinate al recupero industriale di metalli pesanti, vere e proprie miniere vegetali.

#### 6.1.3.4 Le condizioni atmosferiche urbane

Le condizioni ambientali della città di Milano sono variate enormemente nel corso di questo secolo. Sono noti effetti patologici sulle piante determinati dalla presenza di in-

quinanti, ma è meno noto l'effetto sulla vegetazione esercitato dalla temperatura dell'aria, in particolare dal potenziamento e ampliamento dell'*isola di calore*; la differenza delle temperature rilevate nei nuclei più urbanizzati e nelle estreme periferie è particolarmente accentuata: le temperature medie mensili differiscono di oltre 2°C in gennaio, febbraio e giugno e le minime giornaliere differiscono addirittura di 3-4°C nel tardo autunno e in inverno (Schieroni, 1993). A questo si aggiunge un riscaldamento generalizzato: le medie decennali tra i valori massimi e minimi giornalieri sono salite dai 12,9°C del periodo 1910-1919 ai 14,1°C del periodo 1980-1989 (Schieroni, 1993). Questi due fenomeni, il potenziamento dell'isola di calore e il riscaldamento del microclima milanese, sono chiaramente indicati dalle piante. Frattini (1994) ha messo in evidenza come l'ombrellifera tropicale *Hydrocotyle sibthorpioides* sia diffusa nella zona centrale di Milano e manchi nella zona periferica; nel centro, essa si localizza, peraltro, solo nelle aiuole più piccole o riparate e manca nelle zone verdi più ampie e fresche come il Parco Sempione e i Giardini Pubblici. Un'altra esotica, nordamericana di climi caldi, *Bidens bipinnata*, si è diffusa quasi esclusivamente tra le rotaie dei tram della città, favorita dal riscaldamento dell'aria da parte dei motori delle vetture in transito, dall'attrito delle ruote sui binari oltre che dall'irraggiamento solare (maggiore laddove si depositano sostanze oleose e ossidi di ferro dal colore scuro). *Bidens bipinnata* manca invece sui tracciati tranviari extraurbani localizzati al di fuori dell'isola di calore. L'esistenza dell'isola di calore determina sfasamenti della fioritura e della comparsa delle foglie in robinia, ipocastano e numerose altre specie, con anticipi vistosi nelle aree centrali rispetto a quelle periferiche ed extraurbane. Il riscaldamento del microclima degli ultimi decenni è testimoniato anche dall'aumento recente di specie termofile come *Inula graveolens*, *Lobularia maritima*, *Lagurus ovatus*, *Silybum marianum*, *Pyracantha coccinea* e diverse altre, alcune a gravitazione mediterranea. Alcune di queste specie sono favorite nella loro diffusione dai tracciati ferroviari e si insediano inizialmente presso gli scali merci (*Inula graveolens* si ritrova presso la ferrovia anche a Brescia), ma rappresentano comunque un chiaro sintomo di variazioni microclimatiche importanti anche ai fini del controllo della qualità dell'aria. Il valore di queste indicazioni è maggiore allorché si operino corrette comparazioni fra gli studi floristici del passato e quelli odierni.

#### 6.1.4 I limiti

Il successo nella individuazione di bioindicatori fra le specie vascolari e fra le comunità vegetali potrà derivare solo dalla ripetizione accurata delle indagini, con gli stessi metodi e nelle stesse aree, per periodi sufficientemente lunghi e da un numero elevato di studi. Non ci si dovranno aspettare risultati immediati dopo pochi anni di ricerche, ma si dovrà attendere anche il confronto con situazioni rilevate a distanza di cinque, dieci, venti e più anni. Questo appare finora il limite maggiore perché si scontra con esigenze politico-amministrative e gestionali, ma anche con difficoltà nel mantenimento costante delle aree e dei metodi di indagine.

I vantaggi sono rappresentati dal quadro d'insieme sulla qualità dell'ambiente che gli studi geobotanici riescono a offrire e dai costi piuttosto contenuti rispetto ad altre indagini. Tutti gli studi necessari possono essere condotti dalle strutture universitarie e buona parte di essi anche da professionisti autonomi, laureati in Scienze Naturali o in Scienze Biologiche. Purtroppo in Italia, ma anche in altri Paesi europei, gli studi geobotanici sulle popolazioni e sulle comunità di piante superiori applicati al monito-

raggio dell'inquinamento hanno avuto quasi sempre un ruolo ancillare di secondo piano rispetto a quelle che utilizzano organismi inferiori più semplici (licheni, muschi) e a quelle ecofisiologiche relative agli individui vegetali intesi singolarmente. Il reale coinvolgimento dei geobotanici rispetto a questi problemi è ancora marginale e da ciò derivano due difficoltà. La prima è rappresentata dalla scarsità di dati disponibili – facilmente rilevabile con una ricerca bibliografica – e riguarda principalmente i geobotanici stessi che si trovano a operare in un campo ancora quasi vergine. La seconda dovrebbe maggiormente interessare gli altri ricercatori ed è rappresentata dalla scarsa consapevolezza di operare in un campo molto complesso dove ogni considerazione derivante da studi su singoli individui non può essere estrapolata ed estesa a comunità che possono sembrare uguali, ma che per uno specialista del settore sono profondamente diverse.

## Bibliografia

- Ellenberg, H.** 1974. Zeigerwerte der Gefässpflanzen Mitteleuropas. *Scripta Geobotanica*, 9, 97.
- Frattini, S.** 1994. Osservazioni su alcuni aspetti recenti e relitti della flora della città di Milano in rapporto alle isole termiche. In: Atti del Colloquio: problematiche floristiche delle aree urbane, Genova 21 maggio 1993, *Allionia*, 32, 207-214.
- Landolt, E.** 1977. Ökologische Zeigerwerte zur Schweizer Flora. *Veröff. Geobot. Inst. ETH, Stiftung Rübel, Zürich*, 64, 1-171.
- Mariotti, M. G. e Carnelli, A. L.** 1995. Isolamento e biodiversità nelle popolazioni vegetali: implicazioni sul controllo dell'inquinamento ambientale. In: Atti Convegno: isolamento e biodiversità nelle popolazioni vegetali: problemi biosistemati, floristici e conservazionistici, Sassari 13-14 maggio 1994. *Boll. Soc. Sarda Sc. Nat.*, 30, 199-216.
- Marks, M., Lapin, B. e Randall, J.** 1994. *Phragmites australis (P. communis): Threats, Management, and Monitoring*. *Natural Areas Journal*, 14, 285-294.
- Mickel, S., Brunschön, S. e Fangmeier, A.** 1991. Effects of Nitrogen-Nutrition on Growth and competition of *Calluna vulgaris* (L.) Hull and *Deschampsia flexuosa* (L.) Trin. *Angew. Botanik*, 65, 359-372.
- Remillard, M. M. e Welch, R. A.** 1992. GIS Technologies for aquatic macrophyte studies: I. Database development and changes in the aquatic environment. *Landscape Ecology*, 7, 151-162.
- Schieroni, A.** 1993. Evoluzione del microclima milanese nel corso del secolo XX - CH<sub>4</sub>. *En. Met.*, 1, 16-23.
- Skousen, J. G., Johnson, C. D. e Garbutt, K.** 1994. Natural Revegetation of 15 Abandoned Mine Land Sites in West Virginia. *J. Environ. Qual.*, 23, 1224-1230.



## 6.2 Fauna - *Alberto Meriggi*

### 6.2.1 Introduzione

Una comunità animale può essere definita in modo generico come un raggruppamento di popolazioni di specie che coesistono nello spazio e nel tempo. In quanto tale una comunità ha delle proprietà particolari che non hanno le popolazioni che ne fanno parte. Per esempio, la diversità delle specie presenti nella comunità, i limiti alla presenza di specie in competizione, l'organizzazione della rete trofica, la biomassa totale e la produttività globale sono solo alcune delle proprietà che possono caratterizzare una comunità. Dal punto di vista umano, una comunità animale è un'unità di zoocenosi che noi riusciamo a classificare in base a caratteristiche o proprietà che hanno per noi stessi un significato; vale a dire che nel definire una comunità si impone per forza di cose un punto di vista antropocentrico e non è possibile che sia altrimenti, considerati gli enormi problemi che lo studio scientifico delle comunità animali deve affrontare. Infatti una comunità animale è un sistema complesso che per essere descritto ha bisogno di modi semplici. Le difficoltà nascono, in particolare, dall'enorme massa di dati che le comunità animali offrono al ricercatore e che richiedono di essere adeguatamente organizzati e analizzati per poter essere utilizzati per confronti e per il riconoscimento di modalità regolari che si ripetono nel tempo e nello spazio al ripetersi di determinate condizioni. Altri problemi nascono poi dalla necessità, che spesso si pone, di definire i confini spaziali delle comunità. Se questo può essere fatto, sempre con difficoltà, per organismi stabili e sedentari, all'interno di ambienti nettamente separati da altri, l'operazione diventa quasi impossibile con organismi mobili in ambienti che sfumano l'uno nell'altro senza apparente soluzione di continuità.

A causa di questi problemi molto spesso gli studiosi delle comunità non considerano tutti gli organismi presenti in una determinata area, ma piuttosto fissano la loro attenzione su di un singolo gruppo tassonomico (per esempio insetti, uccelli, micro-mammiferi ecc.) o su specie accomunate dalla posizione nella rete trofica (erbivori, carnivori, detritivori ecc.). Si può quindi parlare della comunità di uccelli di una foresta o della comunità di pesci di un corso d'acqua o, ancora, della comunità di detritivori di uno stagno. Adirittura possono essere selezionati gruppi di specie anche molto lontane dal punto di vista tassonomico che sfruttano la stessa classe di risorse ambientali in modo simile: le corporazioni di specie. In questo caso si ha una più stretta corrispondenza tra comunità e ambiente in cui essa vive.

### 6.2.2 Parametri descrittivi delle comunità

Le comunità animali possono essere descritte utilizzando un loro attributo principale che possiamo chiamare diversità specifica. La misurazione della diversità specifica richiede una serie di assunzioni che normalmente vengono ignorate dagli ecologi delle comunità (Krebs, 1989).

La prima assunzione è che l'argomento di studio sia ben definito. La misurazione della diversità richiede prima di tutto una chiara definizione del livello tassonomico da considerare. Nella maggior parte dei casi viene presa in considerazione la diversità specifica, ma non vi sono ragioni per non considerare la diversità a livello generico oppure sottospecifico. All'interno del sistema di classificazione, poi, viene assunto che tutti gli individui assegnati a una particolare classe siano uguali e questo può porre al-

cuni problemi: per esempio, nelle specie in cui i sessi hanno dimensioni differenti i maschi possono essere raggruppati insieme alle femmine? Oppure gli stadi larvali possono essere considerati uguali a quelli adulti? Normalmente queste differenze vengono ignorate quando si misura la diversità all'interno di una comunità animale. Similmente la maggior parte delle misure di diversità assume che le specie siano tutte ugualmente differenti, ma questo può non essere vero in molti casi.

Le misure della diversità richiedono una stima dell'importanza delle diverse specie nella comunità e questo può essere fatto utilizzando le abbondanze specifiche, oppure la biomassa, oppure ancora la produttività. La misura più diffusa è l'abbondanza, ma in alcuni casi (per esempio lo zooplancton) è stato visto che la produttività fornisce stime più attendibili.

Come già accennato nell'introduzione, un altro problema deriva da quanto della comunità animale occorrerebbe includere nel campione. In altre parole si dovrebbe definire precisamente la collezione di specie da prendere in considerazione. La maggior parte degli studiosi delle comunità isolano un segmento dell'insieme: per esempio l'avifauna o la teriofauna. Raramente le misure di diversità coprono i diversi livelli trofici e ancor più raramente vengono applicate all'intero *pool* di specie presenti nella comunità. Un suggerimento convincente è quello di concentrare le analisi sulle parti della comunità che sono funzionalmente interagenti, vale a dire le corporazioni di specie. Queste spesso comprendono diversi livelli trofici e includono specie molto lontane dal punto di vista tassonomico.

#### 6.2.2.1 *Le misure della diversità*

La diversità specifica di una comunità animale può essere misurata in vari modi, tra cui i più usati sono la ricchezza specifica, l'eterogeneità e, a essa strettamente connessa, l'uniformità.

#### 6.2.2.2 *Ricchezza specifica*

È il più vecchio e semplice concetto di diversità specifica, cioè il numero di specie nella comunità o nel segmento di comunità preso in considerazione. Il problema basilare nella misurazione è che spesso non è possibile elencare tutte le specie di una comunità animale. Più facile risulta la misura della ricchezza specifica se si considera solo una parte della comunità e, più ridotta è questa porzione, maggiore è l'affidabilità delle stime di ricchezza specifica. Conteggi completi di specie possono essere effettuati, per esempio, per comunità di uccelli e di mammiferi su superfici limitate e di anfibi, rettili e pesci in regioni temperate. Le cose però si complicano e le stime diventano spesso inattendibili se si vogliono enumerare tutte le specie in comunità di insetti o invertebrati del suolo.

La domanda che si pone è come si può misurare la ricchezza specifica quando si ha a disposizione solo un campione della ricchezza totale della comunità.

In primo luogo occorre determinare la dimensione sufficiente del campione necessaria ad avere una rappresentazione realistica del numero di specie nella comunità. In linea generale, man mano che aumenta la dimensione del campione, aumenta anche il numero di specie contattate fino a un certo punto oltre il quale il numero di specie rimane costante o comunque l'incremento non è apprezzabile. Questo punto in cui si raggiunge il cosiddetto *plateau* rappresenta il campione minimo necessario e sufficiente (figura 6.3).

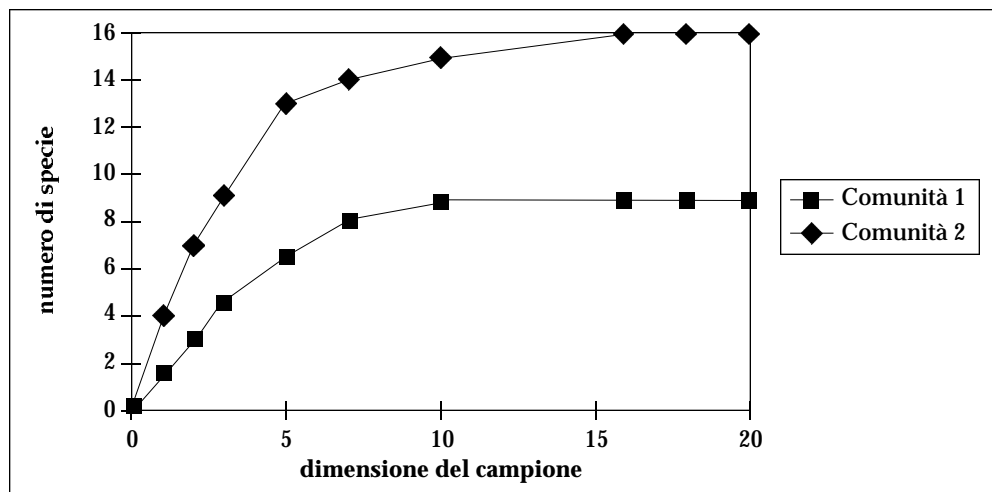


Figura 6.3 - Relazione tra dimensione del campione e numero di specie contattate in due comunità con ricchezza specifica diversa.

In secondo luogo, in particolare quando si vogliono comparare diverse comunità in cui la ricchezza specifica è stata misurata su campioni di dimensioni differenti, è opportuno standardizzare tutti i campioni a una dimensione comune. Uno dei metodi più utilizzati è quello cosiddetto di rarefazione (Krebs, 1989). La rarefazione è un metodo statistico per stimare il numero atteso di specie in un campione casuale di individui preso da una comunità. In pratica, il metodo risponde alla seguente domanda: se il campione consiste di  $n$  individui (con  $n < N$ , dove  $N$  è il numero di individui del campione totale), quale numero di specie dovrebbe essere osservato? È importante notare che se il campione totale ha  $S$  specie e  $N$  individui, il campione rarefatto dovrebbe avere  $n < N$  e  $s < S$ . La formula per calcolare il numero atteso di specie è la seguente (Krebs, 1989):

$$E(\hat{S}_n) = \sum_{i=1}^s 1 - \frac{\binom{N - N_i}{n}}{\binom{N}{n}}$$

dove:

$E(\hat{S}_n)$  = Numero atteso di specie in un campione casuale di  $n$  individui

$S$  = Numero totale di specie registrate

$N_i$  = Numero di individui della specie  $i$

$N = \sum N_i$  = Numero totale di individui registrato

$n$  = dimensione del campione (numero di individui) scelto per la standardizzazione ( $n < N$ )

$\binom{N}{n} = \frac{N!}{n!(N-n)!}$  = Numero di combinazioni di  $n$  individui che possono essere scelte da un set di  $N$  individui

Dal numero di specie è possibile inoltre calcolare la varianza:

$$\text{Var}(\hat{S}_n) = \binom{N}{n}^{-1} \left\{ \sum_{i=1}^s \binom{N-N_i}{n} \left[ 1 - \frac{\binom{N-N_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right] + 2 \sum_{i=1}^{s-1} \sum_{j=i+1}^s \binom{N-N_i-N_j}{n} \frac{\binom{N-N_i}{n} \binom{N-N_j}{n}}{\binom{N}{n}} \right\}$$

e, quindi, effettuare confronti statistici tra campioni diversi presi all'interno della stessa comunità o tra comunità differenti.

Per utilizzare correttamente questo metodo di calcolo della ricchezza specifica è però importante conoscere alcune restrizioni al suo uso (Krebs, 1989). Prima di tutto i campioni da comparare devono essere simili dal punto di vista tassonomico. Inoltre il metodo di campionamento deve essere assolutamente identico nei diversi campioni per evitare che metodi diversi permettano di contattare specie diverse. Infine i campioni dovrebbero essere presi da habitat simili in quanto è ovvio che habitat differenti (per esempio una foresta di latifoglie e una di conifere) abbiano diversità e ricchezza specifica molto differenti.

Una assunzione importante del metodo della rarefazione è che tutti gli individui nella comunità siano distribuiti casualmente rispetto agli altri individui della stessa specie o di altre specie. In realtà, la maggior parte delle distribuzioni che si riscontrano nel mondo animale è di tipo aggregato o contagioso e questo può causare errori di sovrastima nel calcolo della ricchezza specifica, tanto più marcati quanto è maggiore l'aggregazione. Per ridurre questa possibilità di errore l'unico modo è quello di usare campioni grandi e distribuiti attraverso tutta la comunità oggetto di studio.

### 6.2.2.3 Eterogeneità

Quando si considera solamente il numero di specie in una comunità come misura della sua diversità specifica viene trascurato un importante aspetto quantitativo. Infatti la diversità specifica è ovviamente differente nel caso di due comunità entrambe con 10 specie, ma di cui la prima ha ogni specie rappresentata da un numero uguale di individui e la seconda ha una specie con il 90% degli individui totali della comunità. Ecco allora che si rende necessaria l'adozione di misure di eterogeneità che possano fornire informazioni precise su come sono distribuiti gli individui della comunità nelle diverse specie ivi rappresentate (figura 6.4).

Generalmente il concetto di eterogeneità è considerato sinonimo di diversità.

La più semplice misura che tenga conto sia delle distribuzioni delle abbondanze sia della ricchezza specifica è l'indice di diversità di Simpson che si calcola determinando per ciascuna specie la proporzione di individui o la biomassa relativa sul totale del campione rappresentativo della comunità (Begon *et al.*, 1989):

$$D = 1 / \sum_{i=1}^s p_i^2$$

dove:

D = indice di diversità di Simpson;

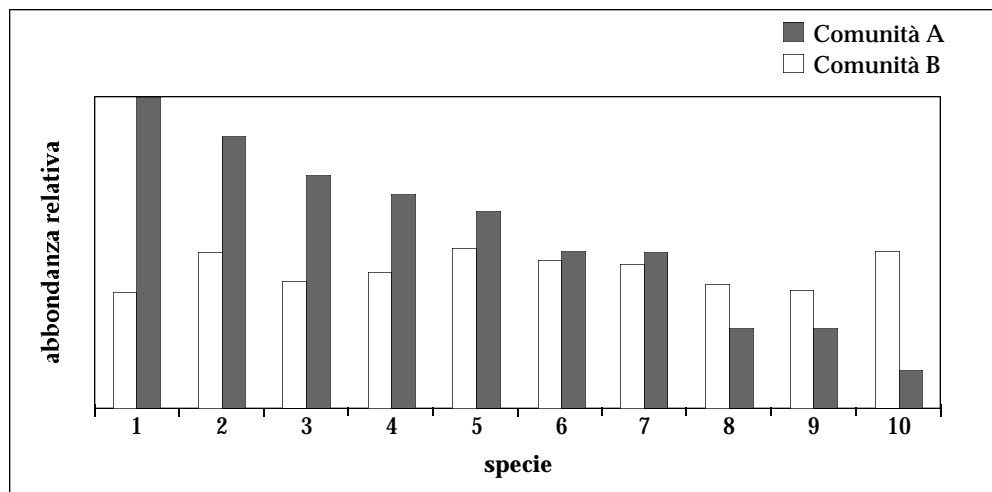


Figura 6.4 - Eterogeneità in due ipotetiche comunità con uguale ricchezza specifica. La comunità B è più eterogenea perché gli individui sono più uniformemente ripartiti tra le specie.

$s$  = numero di specie nella comunità (ricchezza specifica);

$p_i$  = abbondanza relativa o proporzione di individui della specie  $i$ .

Secondo questa formulazione l'indice aumenta di valore all'aumentare dell'equipartizione degli individui della comunità tra le singole specie. Esistono altre formulazioni dell'indice di Simpson a partire da quella originaria:

$$D = \sum_{i=1}^s p_i^2$$

che fornisce in pratica una misura della probabilità di prendere due organismi a caso che siano specie differenti.

Per convertire questa probabilità in una vera misura di diversità è opportuno usare la misura complementare di  $D$  (Krebs, 1989):

$$1-D = 1 - \sum_{i=1}^s p_i^2$$

Secondo Pielou (1969) questa misura è valida solo per popolazioni infinite, mentre per popolazioni finite lo stimatore appropriato è:

$$1-D = 1 - \sum_{i=1}^s \left[ \frac{n_i (n_i - 1)}{N (N - 1)} \right]$$

dove:

$n_i$  = numero di individui della specie  $i$  nel campione,

$N = n_i$  = numero totale di individui nel campione;

$s$  = numero di specie nel campione.

Mac Arthur (1972) ha usato il reciproco della formulazione originale dell'indice di Simpson:

$$1/D = 1 / \sum p_i^2$$

La misura complementare dell'indice (1-D) varia da 0 (bassa diversità) ad almeno 1 (1-1/s), mentre il reciproco (1/D) varia da 1 a  $s$ , il numero di specie nel campione.

Trattando il campione preso dalla comunità come una collezione vale a dire un universo statistico completo, è possibile utilizzare la statistica inferenziale; lo stesso può essere fatto se il campionamento viene effettuato con unità campione di vario tipo (Pielou, 1969, Routledge, 1980).

Un'altra misura della diversità specifica molto utilizzata dagli ecologi delle comunità è l'indice di Shannon-Wiener:

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \log_2 p_i$$

dove:

$H'$  = indice di diversità di Shannon;

$s$  = numero di specie nel campione;

$p_i$  = proporzione o abbondanza o biomassa relativa della specie  $i$  nel campione.

La formulazione originaria prevede il logaritmo in base 2, ma possono essere utilizzate anche la base  $e$  e dei logaritmi naturali e la base 10 poiché sono tutte tra loro convertibili moltiplicando per un'appropriata costante.

L'indice  $H'$  aumenta con l'aumentare di specie nella comunità e a parità di specie aumenta con l'aumentare dell'eterogeneità. Un'altra formulazione dell'indice di Shannon-Wiener è la seguente (Mac Arthur, 1965):

$$N_i = e^{H'}$$

dove:

$e = 2,71828$ ;

$H'$  = indice di Shannon-Wiener calcolato con i logaritmi in base naturale;

$N_i$  = numero di specie egualmente comuni che produrrebbero la stessa diversità di  $H'$ .

L'uso di  $N_i$  al posto di  $H'$  è raccomandato poiché l'unità in cui è espresso l'indice, vale a dire numero di specie, è più chiaramente comprensibile dagli ecologi (Krebs, 1989).

Come si vedrà in seguito, ai fini dell'uso delle comunità come indicatori biologici, è molto importante distinguere tra misure di eterogeneità del primo tipo e del secondo. Le misure del primo tipo sono più sensibili alle variazioni delle specie rare nel campione della comunità, mentre quelle del secondo tipo sono più sensibili alle variazioni delle specie più abbondanti. L'indice  $H'$  e in particolare l'indice  $N_i$  sono misure del primo tipo, mentre l'indice di Simpson è una misura del secondo tipo. La scelta tra misure del primo o del secondo tipo dovrebbe essere fatta a priori tenendo conto dell'interesse che si può avere nel mettere in evidenza le specie rare o quelle dominanti nella comunità oggetto di studio.

### 6.2.2.4 Uniformità

È cosa conosciuta che la maggior parte delle comunità animali contiene poche specie dominanti e molte che sono relativamente rare o comunque poco comuni. Le misure di uniformità cercano di quantificare questa disomogenea ripartizione degli individui nei confronti di un'ipotetica comunità in cui tutte le specie siano ugualmente comuni.

L'approccio più comune per calcolare l'uniformità è quello di rapportare una misura di eterogeneità al valore massimo che assumerebbe nel caso in cui ogni specie nel campione sia rappresentata dallo stesso numero di individui. Sono possibili due formulazioni:

$$\text{Uniformità} = \frac{D}{D_{\max}}$$

oppure

$$\text{Uniformità} = \frac{D - D_{\min}}{D_{\max} - D_{\min}}$$

dove:

$D$  = valore osservato dell'indice di diversità specifica;

$D_{\max}$  = valore massimo possibile dell'indice di diversità, date  $s$  specie e  $N$  individui;

$D_{\min}$  = valore minimo possibile dell'indice di diversità, date  $s$  specie e  $N$  individui.

Tutte le misure di uniformità variano tra 0 e 1.

Per l'indice di Simpson la massima diversità viene raggiunta quando tutte le abbondanze sono uguali ( $p = 1/s$ ):

$$D_{\max} = \frac{1}{s}$$

Anche per l'indice di Shannon-Wiener la diversità massima possibile viene registrata quando  $p = 1/s$ :

$$H'_{\max} = -s \left( \frac{1}{s} \log_2 \frac{1}{s} \right) = \log_2 s$$

I valori minimi per i due indici sono dati rispettivamente da:

$$D_{\min} = \frac{(s-1)(2N-s)}{N(N-1)}$$

e

$$H'_{\min} = \log N - \left( \frac{N-s+1}{N} \right) [ \log (N-s+1) ]$$

Utilizzando l'indice  $N_1 = e^H$  l'uniformità può essere stimata direttamente da:

$$\text{Uniformità} = \frac{N_1}{s}$$

### 6.2.3 Comportamento dei parametri descrittivi delle comunità animali

I parametri descrittivi delle comunità animali trattati nel paragrafo precedente vengono influenzati in vario modo da vari fattori ambientali e non, nonché dal livello di stress ambientale. Per questo motivo è possibile utilizzare le comunità animali stesse come bioindicatori in grado di rilevare modificazioni ambientali, non misurabili direttamente, dovute a varie categorie di agenti che vanno dalle sostanze inquinanti di origine industriale e urbana, ai pesticidi utilizzati nelle pratiche agricole, alle modificazioni del paesaggio dovute all'intervento diretto dell'uomo. Deve essere però subito precisato che, salvo particolari gruppi tassonomici, le comunità animali non possono essere usate per indicare che una particolare attività negativa per l'ambiente è in atto oppure che è presente una determinata sostanza inquinante. Piuttosto le comunità possono evidenziare cambiamenti avvenuti ed è compito del ricercatore e del tecnico mettere in relazione tali cambiamenti con le possibili cause. Un altro fatto importante da tenere in considerazione quando si vogliono utilizzare le comunità animali come bioindicatori è che determinati valori osservati di ricchezza specifica, eterogeneità e uniformità di per sé non danno alcuna indicazione sul livello di stress ambientale, ma devono essere confrontati con valori teorici di riferimento. Vale a dire che deve essere effettuato sempre un paragone, possibilmente su basi statistiche, con una comunità ipotetica in un ambiente ipotetico non sottoposto a fattori di stress. Questa operazione non è sempre facile perché spesso mancano i valori di riferimento rilevati in comunità naturali in ambienti integri. La soluzione può essere il confronto con situazioni reali di cui si conosca a sufficienza il grado di alterazione e gli agenti che l'hanno causato.

Esaminiamo ora il comportamento dei tre parametri fondamentali descrittivi delle comunità animali e le informazioni che si possono dedurre dalle loro variazioni in differenti situazioni.

#### 6.2.3.1 Ricchezza specifica

Il numero di specie in una comunità aumenta con l'aumentare dell'area presa in considerazione e con la dimensione del campione; di questo si deve tenere conto quando si vogliono confrontare comunità di ambienti simili per evidenziare un qualunque tipo di stress ambientale. I confronti devono essere quindi sempre effettuati tra campioni delle stesse dimensioni e tra aree di studio di superficie equiparabile.

La relazione tra il numero di specie e la superficie può essere dovuta in parte al fatto che aumentando l'area aumentano anche i tipi di habitat inclusi e di conseguenza le specie che vi possono abitare, in parte a un effetto indipendente che si verifica in particolare nelle isole di habitat dove il numero di specie è il risultato del bilancio tra tasso di colonizzazione e tasso di estinzione che è minore in isole di habitat grandi. La diversità del paesaggio, derivante dal numero di tipi di habitat presenti a parità di superficie e dal loro grado di giustapposizione, è anch'essa un fattore correlato positiva-



mente alla ricchezza specifica. In particolare, per molti gruppi tassonomici, la diversità strutturale della vegetazione gioca un ruolo importantissimo nell'incrementare il numero di specie presenti all'interno di una comunità. Per esempio una comunità ornitica di una foresta monostratificata e coetanea avrà un numero di specie nettamente inferiore di quella di una foresta a più strati e disetanea. Il perché è piuttosto ovvio: il bosco con maggiore diversità strutturale può ospitare anche le specie che vivono e nidificano nello strato cespugliare oltre a quelle più specifiche dello strato arboreo alto. Una ricerca effettuata in Lombardia sulle comunità di micromammiferi in 6 differenti tipi di habitat ha messo in evidenza come la ricchezza e la diversità specifica fossero correlate positivamente con la diversità strutturale a livello del micro-habitat (Canova *et al.*, 1991). In questo studio il maggiore numero di specie (6) era stato trovato nei boschi naturali di salici pluristratificati e disetanei e, secondariamente, nei cespuglieti (5 specie) e nei boschi naturali maturi (4 specie), mentre il numero più basso era stato rinvenuto in una zona di prato e nei pioppeti coltivati (2 e 1 specie rispettivamente). Importante notare come le specie di insettivori (*Sorex* sp. e *Crocidura* sp.) fossero presenti solamente negli ambienti naturali (boschi e cespuglieti). I risultati di questo studio confermano inoltre che la ricchezza specifica può essere utilizzata come parametro indicatore del grado di naturalità degli habitat cioè del livello di manipolazione cui sono sottoposti dagli interventi umani.

Alcuni agenti inquinanti e in particolare le sostanze chimiche utilizzate in agricoltura possono influire direttamente o indirettamente sul numero di specie delle comunità animali. Il tipo di azione diretto o indiretto dipende da quale porzione della comunità è considerata. Così, per esempio, un insetticida comunemente usato in agricoltura agirà direttamente sulla comunità di insetti riducendo i livelli di popolazione di molte specie e provocando la sparizione delle specie più sensibili dalle zone sottoposte a trattamento. Lo stesso insetticida riducendo la disponibilità alimentare per le specie di uccelli e mammiferi insettivori ne provocherà l'allontanamento dall'area trattata riducendo drasticamente la ricchezza specifica delle corrispondenti comunità.

L'azione degli erbicidi, invece, si può rivolgere, in prima istanza, alle popolazioni di consumatori primari (invertebrati e vertebrati) che vengono numericamente ridotte e secondariamente sui predatori (invertebrati e vertebrati) dei quali le specie meno generaliste possono arrivare all'estinzione locale con riduzione della ricchezza specifica della comunità.

Spesso le specie più sensibili o specializzate che risentono maggiormente dell'azione degli inquinanti e di altri fattori di stress ambientale vengono sostituite da specie meno sensibili e più generaliste cosicché la ricchezza specifica della comunità rimane invariata, ma cambia la composizione. La composizione specifica quindi deve essere debitamente valutata quando si vogliono utilizzare le comunità animali come bioindicatori. In particolare importanti ai fini delle valutazioni sono i rapporti tra specie preda e specie predatrici, tra i consumatori dei diversi ordini e tra specie generaliste e specializzate sia nell'alimentazione, sia nelle esigenze di habitat. Inoltre la presenza nella comunità di specie particolarmente sensibili ai diversi fattori di stress e di specie rare o indicatrici di alterazioni di tipo particolare, è un elemento di notevole aiuto nel formulare ipotesi sulle cause che hanno portato ai cambiamenti registrati.

### 6.2.3.2 Eterogeneità e uniformità

L'eterogeneità e, parallelamente, l'uniformità delle comunità animali hanno comportamenti particolari, a volte contrapposti, a seconda del tipo di ambiente che si prende in considerazione e della comunità che si vuole utilizzare.

Una regola generale è che l'eterogeneità aumenta con l'aumentare della diversità ambientale intesa sia come numero di tipi di habitat alternati, sia come diversità strutturale della vegetazione. Questo perché aumenta il numero di specie presenti in una comunità. Anche l'uniformità che però è indipendente dal numero di specie che vengono registrate, aumenta all'aumentare della diversità ambientale e strutturale. Con un maggiore numero di tipi di habitat strutturalmente diversificati, oltre a essere presenti più specie, si avrà anche una maggiore equipartizione degli individui della comunità. In altre parole, le diverse popolazioni tenderanno a essere egualmente numerose.

Il problema principale nell'uso dell'eterogeneità e dell'uniformità delle comunità animali come indicatori di alterazioni ambientali dovute a inquinamento di varia origine o a modificazioni dirette della vegetazione e del paesaggio, è che non sempre diversità specifica e qualità dell'habitat sono direttamente correlate. Per esempio, se in un complesso forestale si procede al disboscamento parziale e alla messa a coltura di appezzamenti, in un primo tempo si otterrà un aumento delle specie (almeno per alcune comunità), dell'eterogeneità e anche dell'uniformità, a causa dell'incremento dei margini e della creazione di nuovi tipi di habitat. Procedendo nella distruzione della foresta però la ricchezza specifica diminuisce con parallela riduzione della diversità della comunità animale. Se consideriamo le comunità di avifauna, la loro diversità specifica può essere considerata un buon indice della qualità ambientale di zone coltivate. Infatti, tanto l'eterogeneità quanto l'uniformità saranno più elevate in zone coltivate tradizionalmente con alternanza di diversi tipi di coltivi a rotazione e con presenza di elementi fissi del paesaggio a vegetazione naturale quali siepi, filari, piccoli boschi e incolti e nettamente più basse nelle monocolture. In ambienti forestali però le comunità ornitiche mostrano usualmente modalità del tutto differenti. Infatti in foreste estese, poco frazionate e lasciate alla loro naturale evoluzione, la diversità specifica tenderà a ridursi progressivamente man mano che il bosco diventa più maturo e si avvia allo stadio di climax. Un esempio estremo può essere considerato quello della foresta di faggio (*Fagus sylvatica*) dell'orizzonte submontano. In questo ambiente, a causa dell'uniformità della vegetazione e della quasi totale assenza di strato arbustivo, possono vivere pochissime specie di uccelli. La situazione è ben diversa se si riduce il grado di naturalità dell'ambiente forestale con ceduazioni e impianti di essenze alloctone o frazionando la superficie a bosco: in questi casi aumentano la ricchezza e la diversità specifica.

### 6.2.4 La scelta delle comunità da utilizzare come bioindicatori

Gli indicatori sono variabili che misurano le caratteristiche di un ecosistema importanti per il loro valore e la cui grandezza indica divergenze da un certo stato considerato un obiettivo. Le condizioni, quindi, di un ecosistema possono essere predette dal valore delle variabili di stato e dei processi a esse connessi (Grillas, 1996). Le comunità animali possono essere considerate degli indicatori di composizione, che riflettono cioè gli attributi di composizione dell'ecosistema a qualunque scala esso sia considerato. In più sono bioindicatori di tipo indicativo in contrapposizione a quelli di tipo ac-

cumulativo; la composizione di specie, la ricchezza e la diversità specifica vengono usate per monitorare il disturbo e la ripresa di ecosistemi. L'uso appropriato delle comunità animali nel monitoraggio ambientale richiede però che coprano differenti livelli di organizzazione dagli invertebrati, agli anfibi, ai pesci, agli uccelli e infine ai mammiferi. Per essere considerata un valido bioindicatore una comunità dovrebbe avere le seguenti caratteristiche:

- essere facilmente identificabile a livello tassonomico;
- essere facilmente delimitabile nello spazio;
- essere facilmente campionabile con metodi standard e poco costosi;
- essere effettivamente dipendente nella composizione e nei valori di ricchezza e diversità specifica da caratteristiche ambientali a loro volta dipendenti dall'azione di vari fattori di stress;
- avere distribuzione cosmopolita in quanto l'assenza di specie con esigenze ecologiche molto ristrette e distribuzione limitata non può essere associata con l'inquinamento o altro;
- comprendere specie di importanza economica come risorsa o in quanto nocive alle attività umane.

Tenendo in considerazione quanto sopra esposto, occorre selezionare le comunità animali in modo che risultino degli indicatori effettivi di cambiamenti dovuti all'inquinamento o ad altri fattori di stress.

#### 6.2.4.1 Macroinvertebrati acquatici

I macroinvertebrati acquatici sono stati spesso utilizzati a livello di comunità (Molluschi e Crostacei) per il monitoraggio di fiumi, laghi e corsi d'acqua minori. In particolare per la classificazione dei livelli trofici e per la stima dell'inquinamento delle acque da metalli, erbicidi, insetticidi organoclorati e organofosfati e PCB. L'elevata variabilità nella distribuzione e nell'abbondanza delle specie nello spazio e nel tempo richiede un notevole sforzo di campionamento e di analisi con conseguenti costi elevati, soprattutto in termini di tempo.

#### 6.2.4.2 Insetti

Le comunità di insetti possono essere utilizzate in modo efficace per avere indicazioni sullo stato sia di ambienti acquatici sia di ambienti terrestri. In ogni caso è bene limitare il campionamento a singoli gruppi tassonomici perché i diversi metodi di trappolaggio sono selettivi nei confronti dei diversi gruppi. Se si volesse utilizzare una larga porzione della comunità, comprendente differenti gruppi, occorrerebbe adottare contemporaneamente più metodi di campionamento ma risulterebbe comunque difficoltoso comparare l'abbondanza delle diverse specie e le analisi si arresterebbero a un livello qualitativo, cioè di lista di specie presenti.

Le comunità di insetti acquatici o le specie che hanno lo stadio larvale a vita acquatica (per esempio Chironomidi, Odonati ecc.) possono essere utilizzate come gli altri macroinvertebrati acquatici per valutare il livello trofico di corpi idrici e il loro stato di inquinamento.

Per gli ambienti terrestri molto utilizzate sono le comunità di Lepidotteri, sia come stadi larvali, sia come adulti, e di Odonati, come adulti (Pollard, 1991; Riddiford e Bawey, 1992; Pollard e Yates, 1993). Gli stadi larvali delle farfalle sono molto legati alle

condizioni delle piante di cui si nutrono e possono essere usati per valutare le condizioni delle foreste. In particolare è stato visto che nelle piante sotto stress per inquinamento dell'aria hanno luogo alterazioni biochimiche che influenzano le popolazioni larvali dei Lepidotteri e di conseguenza la struttura delle loro comunità. Alcune specie rispondono positivamente allo stress delle piante evitando i composti difensivi e avvantaggiandosi del nitrogeno solubile messo in circolazione come risposta allo stress. Le specie più generaliste possono essere meno sensibili ai cambiamenti delle specie ospite preferite che non quelle più specializzate. Così lo stress delle piante può portare a modificazioni drastiche della struttura di intere comunità di Lepidotteri la cui natura dipende dall'intensità e dalla durata dello stress. L'effetto ultimo del declino delle foreste per inquinamento può essere un cambiamento della diversità specifica che può avvenire anche in condizioni di stress moderato o leggero (Martell e Mauffette, 1997).

Le comunità di Odonati sono molto sensibili all'inquinamento da pesticidi e in particolare da insetticidi in quanto le popolazioni di libellule, essendo specie predatrici, risentono fortemente della disponibilità delle loro prede. Altre comunità utilizzate per la valutazione della qualità ambientale sono quelle dei Coleotteri Carabidi.

#### 6.2.4.3 Pesci

Le comunità ittiche come composizione specifica, ricchezza e diversità costituiscono validi indicatori dello stato dei corsi d'acqua. Soprattutto sono utilizzabili per la stima del livello trofico, della quantità di ossigeno disciolto nell'acqua e dell'inquinamento da fitofarmaci, insetticidi e altre sostanze utilizzate in agricoltura che possono essere presenti nelle acque interne correnti e stagnanti e agire direttamente sulle specie di pesci e sulle loro prede. Il campionamento delle comunità ittiche richiede comunque costi elevati per le attrezzature che vengono impiegate e per il tempo necessario. Inoltre è necessario tenere conto delle variazioni di portata, livello e temperatura dei corsi d'acqua che hanno luogo naturalmente o che sono indotte dalle attività antropiche (per esempio regimazione e captazione per usi agricoli, idroelettrici ecc.) e che possono avere influenza diretta e indiretta sulla composizione della comunità e sull'abbondanza delle singole specie.

#### 6.2.4.4 Anfibi

Le comunità di anfibi Anuri e Urodeli sono molto sensibili alle condizioni dell'habitat. In particolare le comunità si impoveriscono, cioè diminuisce la ricchezza e la diversità specifica, con la riduzione e la perdita di zone umide naturali. La sostituzione di queste con zone umide artificiali, quali per esempio le coltivazioni di riso, non è sufficiente a mantenere la presenza di diverse specie e quindi una struttura delle comunità quale si avrebbe in presenza di ambienti naturali per la deposizione delle ovature. Le comunità di anfibi sono piuttosto facili da campionare, almeno qualitativamente, ricercando le ovature nelle pozze e negli stagni nel periodo riproduttivo. È comunque necessario ripetere più volte i sopralluoghi per contattare tutte le specie presenti che hanno differente sensibilità alle variazioni delle caratteristiche fisiche e chimiche delle acque.

#### 6.2.4.5 Uccelli

Le comunità ornitiche, come già accennato in precedenza, sono strettamente dipendenti dalla struttura e dalla composizione dell'habitat. Più un ambiente è diversificato negli strati di vegetazione e nei tipi di habitat, più le comunità risultano ricche ed

eterogenee. Questa non è sempre un'indicazione di un'elevata qualità ambientale ma lo è solo per le zone più intensamente sfruttate e modificate dalle attività antropiche.

La composizione della comunità e la presenza di specie predatrici e di insettivori può essere un indicatore del livello di inquinamento da pesticidi. È stato dimostrato che è più utile usare tutte le specie presenti piuttosto che singole corporazioni individuate in base all'ambiente di foraggiamento o di nidificazione (Degraaf e Chadwick, 1984).

Il campionamento richiede un'elevata contattabilità alla vista o all'udito per tutte le specie presenti. Tale situazione si può avere solamente nel periodo riproduttivo quando quasi tutte le specie sono territoriali e manifestano la loro presenza col canto. Le perturbazioni atmosferiche riducono notevolmente la contattabilità per cui è necessario utilizzare per i censimenti giornate senza vento e serene nel periodo primaverile da aprile a giugno. Per essere sicuri che tutte le specie presenti siano contattate occorre ripetere più volte i censimenti aumentando il numero di uscite all'aumentare della complessità ambientale e del numero di specie presenti, fino a quando nessuna nuova specie viene più registrata. Per la valutazione della composizione specifica della comunità occorre tenere presente che alcune specie possono essere fortemente condizionate dal prelievo a scopo venatorio e di controllo per la riduzione di danni. La gestione venatoria del territorio può anche comportare la comparsa improvvisa ed effimera di alcune specie che sono oggetto di periodiche immissioni.

#### 6.2.4.6 Mammiferi

In questa classe di vertebrati le comunità più utilizzate come indicatori della qualità ambientale in senso lato sono i micromammiferi e i Chiroteri.

I micromammiferi sono facilmente campionabili e sono strettamente legati per quanto riguarda la ricchezza e la diversità specifica alla naturalità degli habitat. Negli ambienti sottoposti a variazioni drastiche della copertura vegetale e a lavorazioni periodiche del suolo come i campi coltivati, le comunità sono in genere povere di specie. In alcuni casi estremi si arriva a registrare la presenza di una o due specie al massimo. Nelle aree dove la vegetazione naturale è più presente e dove si riducono i trattamenti con pesticidi, le comunità si arricchiscono con la presenza di specie insettivore.

Il campionamento quantitativo delle comunità presenta qualche problema per la selettività delle trappole utilizzate e richiede un maggior dispendio economico e di tempo.

Le comunità di Chiroteri sono molto sensibili all'inquinamento con insetticidi che riduce fortemente la disponibilità alimentare per queste specie di mammiferi volatori. Il campionamento, essendo questi animali notturni, è difficoltoso. Al momento è possibile solamente valutare il numero di specie presenti e identificarle con l'uso di uno strumento chiamato *Bat-detector*, sintonizzabile sulle frequenze degli ultrasuoni emessi durante il volo e che sono specie specifiche.

#### 6.2.5 Stato delle ricerche

In Italia l'uso delle comunità animali come bioindicatori è scarsamente sviluppato, se si eccettuano i macroinvertebrati acquatici, alcuni gruppi di insetti e gli uccelli. Anche in questi casi però lo stato delle ricerche non è molto avanzato. In particolare vengono usualmente applicati metodi messi a punto in altre situazioni ambientali e viene trascurata la ricerca metodologica.

Gli studi inerenti le possibilità di utilizzo delle comunità animali come bioindicatori sono nettamente più avanzati all'estero e soprattutto negli Stati Uniti dove sono stati presi in considerazione diversi gruppi identificabili sia dal punto di vista tassonomico sia come corporazioni che usano le medesime risorse.

In generale dalle ricerche effettuate è emerso che le comunità che raggruppano le specie più mobili, in particolare uccelli e mammiferi, sono di scarsa utilità nell'identificazione dei fattori che hanno causato alterazioni ambientali, ma permettono solamente di mettere in evidenza situazioni di stress, le cui cause devono essere poi identificate con indicatori più precisi. Per contro le comunità animali in genere permettono di evidenziare l'esistenza di stati di alterazione e di squilibrio che non risulterebbero da analisi effettuate con indicatori di altro tipo. Per esempio le comunità di uccelli possono essere utilizzate come indicatori di cambiamenti generali che non potrebbero essere misurati, se non con grandi difficoltà, con tecniche standard. Gli uccelli però spesso rispondono ad alcuni effetti secondari della causa primaria e così perdono efficacia come reali indicatori dei cambiamenti (Morrison, 1986).

## Bibliografia

- Begon, M., Harper, J. L. e Townsend, C. R.** 1989. Ecologia. Individui popolazioni comunità. Zanichelli, Bologna, 570-783.
- Canova, L. e Fasola M.** 1991. Communities of small mammals in six biotopes of northern Italy. *Acta Theriologica*, 36, 73-86.
- Degraaf, R. M. e Chadwick, N. L.** 1984. Habitat classification: a comparison using avian species and guilds. *Environmental Management*, 8, 511-518.
- Grillas, P.** 1996. Identification of indicators. In: **P. Tomas Vives** (ed.). Monitoring Mediterranean Wetlands: A Methodological Guide. Med Wet Publication; Wetlands International, Slimbridge, UK e ICN, Lisbona, 35-60.
- Krebs, C. J.** 1989. Ecological methodology. Harper & Row, New York, 293-322.
- Mac Arthur, R. H.** 1965. Patterns of species diversity. *Biol. Rev.*, 40, 510-533.
- Mac Arthur, R. H.** 1972. Geographical ecology. Harper & Row, New York.
- Martell, J. e Mauffette, Y.** 1997. Lepidopteran communities in temperate deciduous forest affected by forest decline. *Oikos*, 78, 48-56.
- Morrison, M. L.** 1986. Bird population as indicator of environmental change. In: **Johnston, R. F.** (ed.): Current Ornithology, Vol. 3. Plenum Press, New York e Londra, 429-451.
- Pielou, E. C.** 1969. An introduction to mathematical Ecology. Wiley, New York.
- Pollard, E.** 1991. Monitoring butterfly numbers. In: **Goldsmith, F. B.** (ed.). Monitoring in Conservation and Ecology. Chapman e Hall, Londra, UK, 78-111.
- Pollard, E. e Yates, T. J.** 1993. Monitoring butterfly for ecology and conservation. Chapman e Hall, Londra UK, 274.
- Riddiford, N. J. e Bowey, K.** 1992. S'Albufera butterfly and dragonfly transect methodology. In: **Riddiford, N. J. e Perring F.** (eds.). Monitoring for environmental changes. The Earthwatch Europe S'Albufera Project. A summary report of the third season's work 1991. Earthwatch Europe, Oxford, UK, 54-59.
- Routledge, R. D.** 1980. Bias in estimating the diversity of large, uncensused communities. *Ecology*, 61, 276-281.

## 6.3 Indicatori biologici e valutazione della qualità delle acque - Anna Occhipinti Ambrogi, Andrea Buffagni e Paolo Galli

### 6.3.1 Generalità

L'uso di bioindicatori nei sistemi agro-forestali va opportunamente esteso agli ambienti acquatici, che costituiscono un sottosistema ecologico fortemente integrato con quello subaereo sia negli ambienti forestali, generalmente montani o collinari, sia negli ambienti agrari, più comunemente di pianura.

I corsi d'acqua che interessano questi ambienti interagiscono in modo determinante con il bacino idrografico, essendo condizionati nelle loro caratteristiche morfologiche ed ecologiche dagli apporti d'acqua e di sostanze dilavate dai terreni; d'altra parte la quantità e la qualità dell'acqua dei corpi idrici superficiali sono di fondamentale importanza nel determinare la produttività e la sostenibilità degli ecosistemi rivieraschi e terrestri in tutto il territorio circostante. La legge 89/183, istitutiva delle Autorità di Bacino, riflette tale consapevolezza di unitarietà nella gestione delle risorse naturali.

Due sono i criteri principali del monitoraggio biologico: gli indici e i saggi di qualità.

I saggi biologici di qualità comprendono i test di allarme, i test di tossicità, di bioaccumulo, di biodegradazione e di eutrofizzazione, mentre gli indici biologici si avvalgono dello studio in campo di popolazioni e comunità.

Gli indici biologici negli ambienti acquatici sono comunemente utilizzati sia a livello della ricerca di base, per la descrizione della qualità delle acque, sia a livello applicativo, da parte di numerose autorità locali, e recentemente sono stati introdotti nella normativa italiana e comunitaria (Decreto Legge 92/130 e proposta di direttiva della Commissione delle Comunità Europee relativa alla qualità ecologica delle acque 8/7/94).

In queste applicazioni si fa generalmente ricorso a indici che descrivono la struttura delle comunità presenti nei corpi d'acqua in esame piuttosto che a singoli organismi o specie presenti naturalmente o introdotti negli ambienti oggetto di studio; nel presente capitolo si farà quindi riferimento a tali consolidate esperienze, con particolare riguardo all'Indice Biotico Esteso, che vanta un gran numero di positivi casi di applicazione nelle condizioni italiane.

### 6.3.2 Indici basati sul *macrobenthos*

Le attività di monitoraggio e valutazione degli ecosistemi acquatici finalizzate alla loro gestione sostenibile sono generalmente limitate alle misure chimiche di qualità delle acque, tuttavia, queste ultime spesso non consentono un'adeguata valutazione dei possibili effetti dell'inquinamento sulle risorse biologiche acquatiche.

La valutazione diretta dello stato di salute delle comunità biologiche di un corpo d'acqua presenta notevoli vantaggi rispetto alla sola valutazione di parametri chimici, che possono essere così sintetizzati:

- gli organismi integrano le condizioni ambientali nel tempo, permettendo quindi di ridurre la frequenza delle misure istantanee di qualità delle acque necessarie per caratterizzare adeguatamente tutte le situazioni esistenti;
- assolvono inoltre alla funzione di allarme precoce, in quanto sono sensibili a inquinamenti intermittenti o con effetti non immediatamente evidenti, che possono sfuggire al monitoraggio chimico anche molto intensivo;

- infine, le valutazioni biologiche possono essere in grado di mettere in luce le conseguenze di variazioni nel deflusso idrico, della degradazione degli habitat fluviali, dell'eccessivo sfruttamento di risorse biologiche e di altre modificazioni a carico del corso d'acqua. Essi integrano cioè anche gli effetti di stress non direttamente attribuibili alla qualità delle acque e ne indicano l'impatto cumulativo.

Essendo impossibile condurre valutazioni su tutto lo spettro delle comunità biologiche acquatiche, sono state condotte indagini comparative sui vantaggi e gli svantaggi offerti dall'esame dei principali popolamenti, da cui è emersa una preferenza per l'uso dei macroinvertebrati, che presentano, tra gli altri, i seguenti benefici:

- sono ben rappresentati nella maggior parte dei corsi d'acqua e sono relativamente facili da raccogliere e classificare;
- sono sensibili a un ampio spettro d'inquinanti, reagendo abbastanza velocemente e spesso in modo graduale;
- la loro eterogeneità di composizione tassonomica in termini di *phyla* e di gruppi rappresentati, anche considerando il livello trofico e gli adattamenti ecologici, fa aumentare la probabilità che almeno alcuni di questi organismi siano sensibili a variazioni delle condizioni ambientali di qualsiasi tipo;
- sono generalmente sedentari, permettendo di caratterizzare situazioni locali ben determinate;
- hanno cicli vitali sufficientemente lunghi per consentire la registrazione di eventi occasionali di modifica della qualità dell'acqua, rappresentando quindi una risposta integrata nel tempo alle variazioni dell'ambiente in cui vivono, ma non tali da impedire una ricolonizzazione relativamente rapida delle zone fluviali gravemente colpite da tali eventi.

In generale, gli indici che utilizzano i macroinvertebrati si basano quindi sull'assunto che gli impatti prodotti sull'ambiente da modificazioni fisiche e chimiche si riflettono sulla composizione in specie, sul numero totale di specie, sul numero totale di individui per ogni specie e sulle proporzioni relative delle specie all'interno delle comunità.

Vanno peraltro segnalati alcuni svantaggi inerenti l'uso dei macroinvertebrati per il biomonitoraggio, tra i quali possiamo citare i principali:

- le comunità dei macroinvertebrati acquatici sono molto sensibili alle variazioni, spesso anche di piccola entità, delle caratteristiche granulometriche e tessiturali dei sedimenti, rendendo così difficile, in particolari tipologie fluviali, la discriminazione tra gli effetti dell'inquinamento e quelli imputabili al substrato;
- il ciclo vitale è spesso complesso e costituito da un certo numero di stadi, alcuni dei quali non acquatici, per cui va posta particolare cautela nell'interpretare le variazioni stagionali di composizione della comunità;
- l'eterogeneità spaziale della distribuzione è normalmente elevata, e si richiede un elevato numero di repliche di campionamento.

Come già detto, si ritiene opportuno illustrare in questa sede con maggior dettaglio uno dei metodi proposti per il biomonitoraggio delle acque correnti, derivato dalla letteratura internazionale e adattato alla situazione italiana a seguito di un lungo processo di utilizzo pratico, attuato in molte regioni italiane grazie anche alla costante opera di diffusione del metodo svolta dal Centro Italiano di Studi di Bio-



logia Ambientale (CISBA) in collaborazione con la Provincia Autonoma di Trento, sotto la guida scientifica del prof. P. F. Ghetti. A partire dal 1984 tale attività ha consentito la formazione di un vasto gruppo di operatori di strutture pubbliche (Regioni, Provincie, USSL, Comuni, Enti Parco ecc.) e di professionisti che, operando nei rispettivi territori, hanno consentito la stesura di una carta di qualità su 12.000 km di corsi d'acqua italiani, oltre che una continua verifica e perfezionamento del metodo (Ghetti, 1995; 1997). Inoltre, per il riconoscimento dei macroinvertebrati dei corsi d'acqua italiani, sempre a cura della Provincia Autonoma di Trento, sono stati pubblicati alcuni manuali, che costituiscono eccellenti strumenti per la diagnosi tassonomica ai livelli richiesti dall'indice (Sansoni, 1988; Campaioli *et al.*, 1994) e che si aggiungono alla collana "Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne" (Ruffo, 1977-1985) e "Promozione della Qualità dell'Ambiente" (Ghetti e Bonazzi, 1981) edite dal CNR.

Verrà fatto inoltre cenno ad altri sistemi di indici, utilizzati per lo più all'estero e potenzialmente utili in situazioni particolari.

#### 6.3.2.1 *Indice Biotico Esteso (IBE)*

Scopo dell'indice è quello di formulare diagnosi della qualità di ambienti di acque correnti sulla base di modificazioni nella composizione delle comunità di macroinvertebrati, indotte da fattori di inquinamento delle acque e dei sedimenti o da significative alterazioni fisiche dell'alveo bagnato.

Esso deriva dal *Trent Biotic Index* elaborato per l'Autorità di bacino del fiume Trent in Inghilterra (Woodiwiss, 1964) e successivamente aggiornato sotto la denominazione di *Extended Biotic Index* (EBI) e adattato per l'applicazione standardizzata ai corsi d'acqua italiani con il nome di *Indice Biotico Esteso* - IBE (Ghetti, 1997).

I principi generali su cui si fonda il calcolo del valore dell'indice possono essere così sintetizzati.

Il metodo si fonda concettualmente su di un confronto tra la composizione di una comunità attesa e la composizione della comunità presente in un determinato tratto di fiume.

La definizione del valore di indice è fondata sulla presenza degli organismi più esigenti in termini di qualità dell'ambiente e sulla ricchezza totale in *taxa* della comunità.

In termini pratici, viene utilizzata una tabella a due entrate, che consente di tradurre, con criteri uniformi, l'informazione specialistica delle liste tassonomiche in una scala di valori di indice applicabile in modo omogeneo e comparabile su differenti tipologie di acque correnti. In ogni tipologia analizzata, la scala di valori di indice rileva in modo armonico successivi livelli dello stato di qualità, da una condizione ottimale a una condizione di massimo degrado.

La descrizione dell'utilizzo del metodo prevede una tabella a due entrate (*tabella 6.3*) in cui sulle righe sono riportati alcuni gruppi di macroinvertebrati che, dall'alto verso il basso, riflettono una sempre minore sensibilità ai fattori di alterazione della qualità dell'ambiente. Nelle colonne sono invece riportati degli intervalli numerici che fanno riferimento al numero totale di Unità Sistematiche rinvenute nella stazione di campionamento.

Le Unità Sistematiche considerate dal metodo sono quelle riportate, al livello di classificazione stabilito, nella *tabella 6.4*. La semplificazione adottata consente di ridurre in modo sostanziale le difficoltà e il tempo necessari per una completa classificazione a li-

Gruppi faunistici che determinano con la loro presenza l'ingresso orizzontale in tabella (primo ingresso)		Numero totale delle Unità Sistematiche costituenti la comunità (secondo ingresso)								
		0-1	2-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36...
Plecotteri presenti ( <i>Leuctra</i> ) <sup>o</sup>	più di una U. S.	-	-	8	9	10	11	12	13*	14*
	una sola U. S.	-	-	7	8	9	10	11	12	13*
Efemerotteri presenti (escludere <i>Baetidae</i> , <i>Caenidae</i> ) <sup>oo</sup>	più di una U. S.	-	-	7	8	9	10	11	12	-
	una sola U. S.	-	-	6	7	8	9	10	11	-
Tricotteri presenti (comprendere <i>Baetidae</i> e <i>Caenidae</i> )	più di una U. S.	-	5	6	7	8	9	10	11	-
	una sola U. S.	-	4	5	6	7	8	9	10	-
Gammaridi e/o Atiidi e/o Palemonidi presenti	tutte le U. S. sopra assenti									
		-	4	5	6	7	8	9	10	-
Asellidi e/o Nifargidi presenti	tutte le U. S. sopra assenti									
		-	3	4	5	6	7	8	9	-
Oligocheti o Chironomidi	tutte le U. S. sopra assenti									
		1	2	3	4	5	-	-	-	-
Altri organismi	tutte le U. S. sopra assenti									
		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda:

<sup>o</sup>: nelle comunità in cui *Leuctra* è presente come unico *taxon* di Plecotteri e sono contemporaneamente assenti gli Efemerotteri (o presenti solo *Baetidae* e *Caenidae*), *Leuctra* deve essere considerata a livello dei Tricotteri per definire l'entrata orizzontale in tabella;

<sup>oo</sup>: per la definizione dell'ingresso orizzontale in tabella le famiglie *Baetidae* e *Caenidae* vengono considerate a livello dei Tricotteri;

-: giudizio dubbio, per errore di campionamento, per presenza di organismi di *drift* erroneamente considerati nel conteggio, per ambiente non colonizzato adeguatamente, per tipologie non valutabili con l'IBE (per esempio sorgenti, acque di fusione di nevai, acque ferme, zone deltizie, salmastre);

\*: questi valori di indice vengono raggiunti raramente nelle acque correnti italiane (da Ghetti, 1997, mod.).

Tabella 6.3 - Tabella per il calcolo del valore dell'IBE.

vello specifico delle comunità, spesso oggettivamente irrealizzabile, pur preservando un'ampia parte dell'informazione biologica.

Il valore dell'indice è dato dal numero riportato nella casella che si trova all'incrocio della riga di entrata orizzontale con la colonna di entrata verticale.


Per passare dai valori di indice alle classi di qualità, che consentono di esprimere la qualità dei corsi d'acqua mediante 5 intervalli di giudizio, più ampi e quindi utilizzabili per rappresentare anche graficamente lo stato di qualità di un determinato corso d'acqua, si utilizza una tabella di conversione (tabella 6.5).

Gruppi faunistici	Livelli di determinazione tassonomica
Plecotteri	genere
Tricotteri	famiglia
Efemerotteri	genere
Coleotteri	famiglia
Odonati	genere
Ditteri	famiglia
Eterotteri	famiglia
Crostacei	famiglia
Gasteropodi	famiglia
Bivalvi	famiglia
Tricladi	genere
Irudinei	genere
Oligocheti	famiglia

Altri taxa considerati nel calcolo dell'IBE

*Sialidae* (Megalotteri)  
*Osmylidae* (Planipenni)  
*Prostoma* (Nemertini)  
*Gordiidae* (Nematomorfi)

**Tabella 6.4** - Livello di determinazione tassonomica richiesto per la determinazione delle Unità Sistematiche (U.S.) (da Ghetti, 1997).

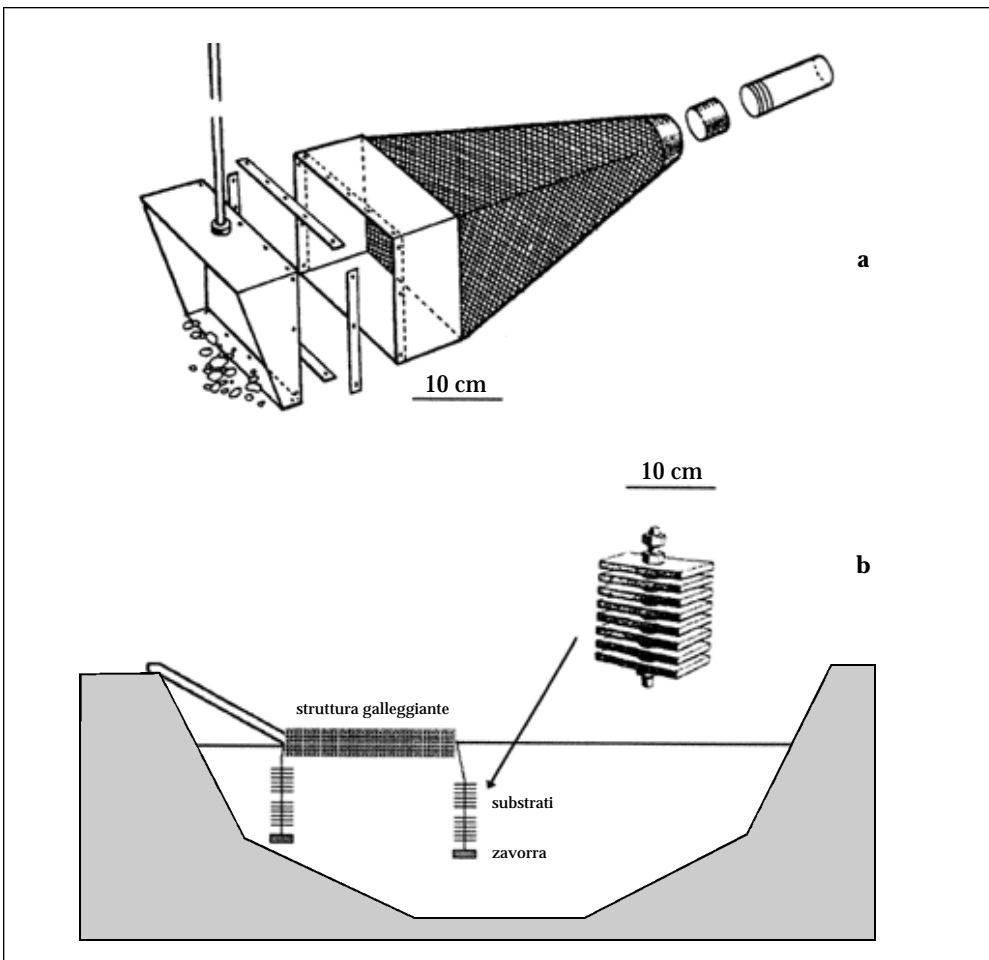
Classi di qualità	Valore di IBE	Giudizio di qualità	Colore e/o retinatura relativa alla classe di qualità
classe I	10-11-12-...	Ambiente non inquinato o comunque non alterato in modo sensibile	azzurro ..... .....
classe II	8-9	Ambiente con moderati sintomi di inquinamento o di alterazione	verde ---- //////
classe III	6-7	Ambiente inquinato o comunque alterato	giallo $\bar{x}$ $\bar{x}$ $\bar{x}$
classe IV	4-5	Ambiente molto inquinato o comunque molto alterato	arancione $\bar{x}\bar{x}\bar{x}\bar{x}$
classe V	0-1-2-3	Ambiente fortemente inquinato o fortemente alterato	rosso 

**Tabella 6.5** - Tabella di conversione dei valori dell'IBE in classi di qualità, con relativo giudizio e colore per la rappresentazione in cartografia. I valori intermedi fra due classi vanno rappresentati mediante tratti alternati con colori o retinature corrispondenti alle due classi. (da Ghetti, 1997).

Il complesso delle procedure da seguire per l'applicazione dell'indice può essere suddiviso in tre fasi:

- indagini preparatorie;
- attività di campo e compilazione della scheda di rilevamento;
- attività di laboratorio.

La fase preparatoria all'applicazione dell'indice comprende operazioni quali l'organizzazione del gruppo di lavoro (composto da almeno due operatori qualificati e addestrati), la scelta delle stazioni di campionamento (incluso il sopralluogo nei siti individuati), l'allestimento del materiale (tra cui l'attrezzatura di prelievo, costituita da retini immanicati con prolunga e raccoglitori terminali di riserva) (figura 6.7a).



**Figura 6.7** - Schema di un retino immanicato con raccoglitore terminale (a); substrato artificiale a lamelle di masonite ancorato a strutture galleggianti nell'alveo fluviale (b) (da Battegazzore, 1991 mod.).

L'attività di campagna prevede il ricorso a un campionamento di tipo qualitativo o semiquantitativo, tenendo presente che l'obiettività della diagnosi formulata sulla base dell'IBE è condizionata dalla significatività del campionamento. Il retino va posizionato contro corrente e ben appoggiato sul fondo; si raccoglie quindi un campione in ogni microhabitat che si incontra lungo un transetto obliquo che attraversa completamente l'alveo bagnato. Terminato il campionamento si procede sul campo alla separazione degli organismi, analizzando piccole porzioni del campione, fino a completo esaurimento dello stesso. Nella comunità campionata è possibile a volte rinvenire alcuni *taxa* solo occasionalmente presenti in quell'ambiente. Si tratta di una piccola quota di organismi, indicata col termine di *drift*, che la corrente costantemente riesce a trasportare a valle per eventi accidentali o in relazione a particolari fasi dei cicli vitali. Questi organismi, non facendo stabilmente parte della comunità, non vanno considerati nel calcolo dell'indice. Il criterio da seguire per stabilire la presenza nel campione di organismi di *drift* è riportato nel manuale di applicazione del metodo (Ghetti, 1997). Risulta quindi di fondamentale importanza una prima valutazione dell'indice in campo, perché solo così è possibile rendersi conto di eventuali anomalie nel campionamento ed effettuare verifiche e repliche. Sempre a questo scopo, nell'ultima formulazione dell'IBE, viene data particolare importanza alla compilazione della scheda di campo, che comprende numerosi dati descrittivi della stazione e consente all'operatore esperto di ipotizzare quale dovrebbe essere la situazione attesa, per quella tipologia fluviale, in assenza di alterazioni ambientali.

Incertezze nella classificazione di alcuni *taxa* vanno invece rimandate al controllo in laboratorio.

Nella terza fase, quella di laboratorio, si procede quindi alla classificazione definitiva delle comunità campionate con l'uso di strumenti ottici e con guide tassonomiche adeguate. Si compila quindi la scheda definitiva, analizzando criticamente la struttura della comunità sulla base delle risultanze di campo e si assegna il corrispondente valore dell'IBE.

Sistemi computerizzati, recentemente messi a punto, come l'Easy EBI (Vendegna e Grandis, 1996) consentono, una volta identificate le Unità Sistematiche, il calcolo automatico dei rispettivi valori dell'indice biologico e l'immediata visualizzazione delle sue variazioni lungo il profilo fluviale.

*Limiti d'uso.* L'indice può essere applicato in tutti gli ambienti di acque correnti stabilmente colonizzati, escludendo solo alcuni ambienti in cui il valore dell'indice è "naturalmente" basso, come tratti prossimi a sorgenti oligotrofiche, acque di nevaio, ambienti di foce, ambienti con acque ferme per lunghi periodi.

Il monitoraggio non dovrebbe essere eseguito nel periodo immediatamente successivo a un'asciutta o a una forte piena. I tratti di pianura dei grandi fiumi o di grandi canali presentano a volte difficoltà nell'operare correttamente il campionamento per l'elevata profondità dell'acqua, la varietà e la dispersione dei microhabitat, le differenze tra sponda e sponda. Qui il campionamento deve essere eseguito mediante tecniche idonee che prevedono anche l'uso di substrati artificiali (figura 6.7 b). Inoltre, il campionamento non dovrebbe essere eseguito immediatamente a valle dell'immissione di uno scarico o di un affluente, ma a miscelazione avvenuta, poiché l'indice ha lo scopo di valutare la qualità del corpo recettore e non dello scarico.

*Limiti di accettabilità dei risultati.* L'indice rileva lo stato di qualità di un determinato tratto di corso d'acqua integrando nel tempo gli effetti di diverse cause di turbativa; è quindi dotato di una buona capacità di sintesi. Nel contempo esso non consente di identificare e quantificare, secondo una relazione di causa-effetto, i fattori che hanno indotto queste modificazioni; esso possiede quindi una bassa capacità analitica. L'indice segnala una condizione di qualità ecologica complessiva e solo indirettamente è possibile ipotizzare gli effetti dovuti alla qualità chimica e fisica delle acque. Nel monitoraggio di qualità deve quindi considerarsi un metodo complementare al controllo chimico e fisico, in particolare per la definizione della qualità delle acque in funzione degli usi per le attività umane. Assume invece un ruolo centrale nella definizione della qualità dell'acqua in funzione della protezione della vita acquatica. Può essere correttamente utilizzato per diagnosi di qualità di interi reticoli idrografici, per l'individuazione di ambienti di elevato pregio ambientale, come supporto alla stesura delle carte ittiche, per il controllo periodico di sezioni di un corso d'acqua – per esempio a monte e a valle di un depuratore – per l'individuazione di scarichi abusivi, per analisi di impatto ambientale o per monitorare e valutare l'efficacia di azioni di risanamento in ambienti fluviali compromessi.

Per quanto concerne il significato dei giudizi di qualità forniti dall'IBE, non bisogna inoltre dimenticare che esso è stato originariamente sviluppato e messo a punto per valutare soprattutto l'inquinamento di tipo organico, anche se si è in seguito dimostrato un utile strumento per rilevare differenti fonti di alterazione della qualità dell'acqua e dell'ambiente fluviale nel suo complesso. In particolare, la gradualità e la linearità della risposta dell'indice ai diversi tipi di modificazione ambientale necessita di ulteriori verifiche sperimentali di campo.

*Problemi attinenti l'applicazione del metodo.* Una corretta applicazione dell'IBE richiede:

- un'adeguata conoscenza della sistematica e dell'ecologia dei popolamenti d'invertebrati;
- la garanzia di una buona efficienza di cattura e la corretta separazione degli organismi;
- la conoscenza dell'ambiente da studiare;
- la capacità di un'interpretazione critica dei dati raccolti.

Le possibilità di errore connesse con la mancanza delle condizioni citate sono ampiamente discusse nel manuale di applicazione dell'IBE (Ghetti, 1997), che si preoccupa altresì di dettagliare le procedure per ridurre al minimo le fonti di errore.

*Esempio di applicazione.* L'esempio qui riportato si riferisce alla valutazione della qualità biologica di alcuni corsi d'acqua dell'alta Valtellina (Buffagni, 1995), operata mediante l'applicazione dell'EBI (*Extended Biotic Index*: Ghetti, 1986), indice che rappresenta la formulazione dell'IBE (Ghetti, 1997) comunemente utilizzata in Italia fino a oggi.

Tra il mese di luglio del 1991 e l'ottobre del 1992 sono state studiate numerose stazioni lungo il corso del fiume Adda, che raccoglie le acque valtelinesi e le recapita nel Lago di Como, e in due suoi importanti affluenti: i torrenti Roasco e Poschiavino. I prelievi di fauna macrobentonica sono stati effettuati nel corso di sei campagne di campionamento, tra le quali due estive e due invernali, prima e dopo i periodi di massima presenza turistica in Valtellina.

L'alto bacino dell'Adda presenta situazioni territoriali anche molto diverse tra loro

che determinano, a livello dei corpi idrici, il manifestarsi di fattori di perturbazione dell'ambiente acquatico di varia natura; tra questi, appaiono particolarmente rilevanti l'inquinamento organico, le variazioni di livello dell'acqua, l'intasamento interstiziale e l'instabilità del substrato. Nonostante la complessità del quadro risultante da queste diverse fonti di alterazione delle comunità bentoniche, che ha reso a volte assai problematica l'interpretazione dei dati biologici, l'indice biotico utilizzato ha comunque consentito di evidenziare in modo chiaro i principali *trend* di modificazione della qualità delle acque.

Per quanto riguarda la situazione invernale del fiume Adda, è stato messo in evidenza un andamento simile, spostandosi da monte a valle, nel dicembre 1991 e nel febbraio 1992 con però valori di qualità più bassi in quest'ultimo mese (figura 6.8 a).

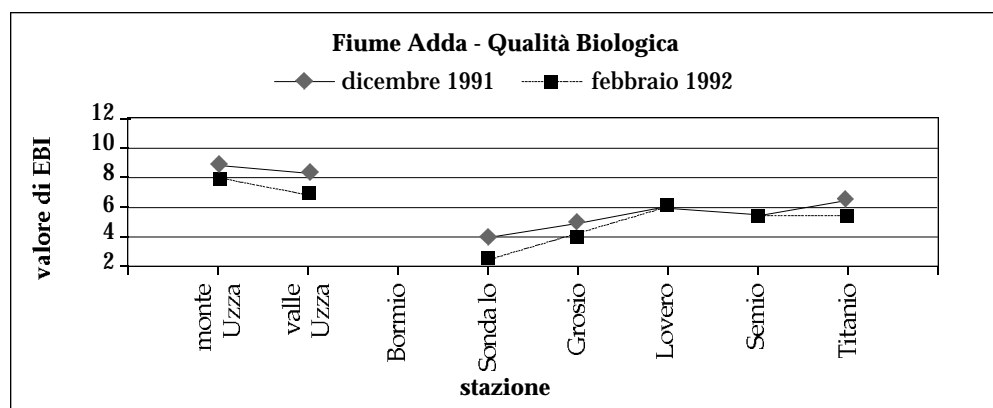


Figura 6.8a - Valori dell'indice EBI in alcune stazioni valtellesi del fiume Adda: situazione invernale.

In entrambi i periodi tra le prime due stazioni studiate – rispettivamente a monte e a valle di un'opera di presa d'acqua per uso idroelettrico in località Uzza – è stato rilevato un lieve peggioramento della qualità biologica: si passa da valori dell'EBI 9 e 8 a valori 9/8 e 7 rispettivamente (III/II Classe di Qualità); ciò è probabilmente imputabile alle ridotte possibilità di colonizzazione da monte degli organismi bentonici per la presenza dello sbarramento. Spostandosi più a valle, all'interno dell'abitato di Bormio, non è stato possibile utilizzare in modo corretto l'EBI in alcuna data di prelievo, in quanto le rapide variazioni di livello dell'acqua – fino alla sua totale assenza – non hanno mai consentito una completa e stabile colonizzazione dei macroinvertebrati acquatici, rendendo così inapplicabile l'indice. All'altezza di Sondalo la qualità biologica è risultata decisamente compromessa (IV/V Classe di Qualità). Ciò è facilmente spiegabile considerando che la stazione di Sondalo è posta pochi chilometri a valle del depuratore di Cepina, che collette gli scarichi civili provenienti dall'alta valle e i cui reflui – pur dopo i trattamenti di rimozione della sostanza organica – rappresentavano, una volta reimmessi in alveo e

miscelati con quelli provenienti dai paesi a monte non interessati dal collettamento, carattere di disturbo per le biocenosi acquatiche. Spostandosi ulteriormente verso valle si nota un miglioramento di qualità fino a Lovero, dopodiché i valori dell'EBI rimangono sostanzialmente invariati in entrambe le date di campionamento (III/IV Classe di Qualità). Tra il campionamento di dicembre e quello di febbraio, nel tratto compreso tra la stazione più a monte e Grosio, risulta evidente un calo di circa una unità nei valori di EBI. Il forte incremento di presenze turistiche tra i due campionamenti – che triplicano nell'arco di tre mesi – è verosimilmente la causa di questo calo di qualità biologica evidenziato con efficacia dall'indice impiegato. Nel tratto più a valle, caratterizzato da afflussi turistici molto ridotti, non sono state invece riscontrate differenze di qualità tra dicembre e febbraio.

La qualità delle acque nel periodo estivo (non riportata in figura in quanto ricalca in generale le tendenze sopra descritte) si è tuttavia rivelata peggiore di quella del periodo invernale, probabilmente per le più elevate temperature dell'acqua che possono aver influito sui livelli di ossigenazione. È interessante sottolineare come, tra le due stazioni più a monte in località Uzza, il descritto sbarramento in questa stagione abbia verosimilmente operato da filtro, trattenendo in misura considerevole la sostanza organica, il limo e i solidi sospesi trasportati verso valle, con conseguente leggero miglioramento della qualità biologica da monte a valle, oltre lo sbarramento (al contrario di quanto osservato in inverno).

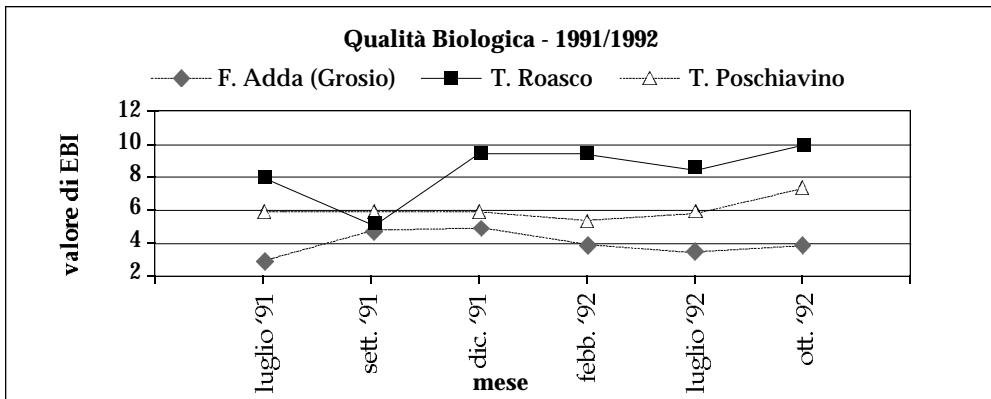


Figura 6.8 b - Valori dell'indice EBI in alcune stazioni valtelinesi del fiume Adda: variazioni stagionali in due immissari dell'Adda, i torrenti Roasco e Poschiavino, prima del punto d'immissione e sull'Adda stesso in località Grosotto.

In figura 6.8 b sono riportati i valori di EBI ottenuti nel torrente Roasco e nel torrente Poschiavino, appena a monte della loro immissione nel fiume Adda, e in quest'ultimo, all'altezza di Grosotto, tra il luglio 1991 e l'ottobre 1992. I tre corsi d'acqua hanno presentato livelli di qualità dell'acqua assai diversi tra loro: l'Adda, qui molto inquinato, è classificabile in IV/V Classe di Qualità, con i valori più alti di EBI in settembre e dicembre 1991; nel torrente Poschiavino, la qualità biologica si è mantenuta abba-



stanza stabilmente intorno al valore dell'EBI 6 (III Classe di Qualità, ambiente inquinato), salvo mostrare un lieve incremento all'ultima data di campionamento; un miglioramento della qualità biologica nell'ottobre 1992 si è manifestato anche nel torrente Roasco (EBI=10, ambiente non inquinato), che si è mantenuto di norma in II Classe di Qualità (ambiente leggermente inquinato) tranne che nel settembre 1991. In quest'occasione, la struttura della comunità macrobentonica e il corrispondente valore di EBI (5) testimoniano un recente disturbo di forte intensità, che ha determinato un crollo di due Classi di Qualità (dalla II Classe di Qualità alla IV). In questo caso l'indice è stato in grado di mettere in evidenza, in una stazione esente da inquinamento di tipo organico, il probabile effetto di lavori di manutenzione della diga di Fusino, in Val Grosina; la comunità macrobentonica ha peraltro mostrato di potersi ristabilire in tempi relativamente brevi: nell'arco di pochi mesi si è infatti osservata una II/I Classe di Qualità.

L'indice EBI si è rivelato un utile strumento di analisi e gestione anche in situazioni ambientali particolari, come nel caso della valutazione della qualità complessiva dei canali di carico e scarico delle acque di una raffineria (Birkemeyer *et al.*, 1995). Trattandosi di canali artificiali di piccole dimensioni, la cui portata subisce notevoli variazioni, quale giudizio complessivo di qualità ambientale è stata utilizzata in questo caso la media dei valori ottenuti nel corso di 13 campionamenti mensili effettuati nell'arco di un anno. In questo caso l'applicazione dell'indice ha permesso di mettere in evidenza una diminuzione di qualità ambientale fra i canali in ingresso, in seconda Classe di Qualità, e quelli in uscita che passano in terza Classe; l'indice si è inoltre rivelato strumento sensibile a piccole modifiche ambientali verificatesi nel corso dei campionamenti, così da poter essere utilizzato come strumento di controllo in proposte di gestione, atte a migliorare la qualità dei Canali Stessi, sia attraverso un attento uso delle acque, sia attraverso opere di rinaturazione delle sponde e riduzione delle operazioni di pulizia e sfalcio dei canali stessi.

#### 6.3.2.2 Biological Monitoring Working Party-score (BMWPs)

Il Biological Monitoring Working Party-score (BMWPs), ha ottenuto un grande successo ed è attualmente utilizzato in molti Paesi europei. L'indice, anche pubblicato come metodo standard (ISO, 1979; 1984), è stato sviluppato per valutare la qualità biologica delle acque in Gran Bretagna e costituisce una semplificazione del *Chandler's score* (Chandler, 1970), poiché utilizza, a differenza di quest'ultimo, l'identificazione a livello di famiglia. Il calcolo del punteggio (*score*), attraverso il quale è definita la qualità biologica della stazione in esame, viene effettuato attribuendo a ogni famiglia di organismi raccolta un corrispondente punteggio e sommando quindi i singoli valori per ottenere il punteggio complessivo della stazione (*site score*). Quando il valore dell'indice è superiore a 100 si è in genere in presenza di una buona qualità delle acque. Agli organismi sensibili all'inquinamento sono stati attribuiti punteggi elevati (fino a 10) e a quelli tolleranti punteggi più bassi (*tabella 6.6*). Per ottenere un campione significativo è prevista la raccolta degli invertebrati in differenti habitat (ghiaia, roccia, detrito, limo ecc.) rappresentativi del corso d'acqua.

Nonostante le dimostrate qualità del BMWPs, per ovviare alla rilevante influenza della tipologia fluviale (erosionale o di deposito) e di habitat, nonché per fornire una base di maggiore obiettività all'attribuzione degli *scores* alle singole famiglie, è

Famiglie	Punteggio
<i>Siphonuridae, Heptageniidae, Leptophlebiidae, Ephemerellidae, Potamanthidae, Ephemeridae, Taeniopterygidae, Leutridae, Capniidae, Perlodidae, Perlidae, Chloroperlidae, Aphelocheiridae, Phryganeidae, Molannidae, Beraeidae, Odontoceridae, Leptoceridae, Goeridae, Lepidostomatidae, Brachycentridae, Sericostomatidae</i>	10
<i>Astacidae, Lestidae, Agriidae, Gomphidae, Cordulegasteridae, Aeshnidae, Corduliidae, Libellulidae, Psychomyiidae, Philopotamidae</i>	8
<i>Caenidae, Nemouridae, Rhyacophilidae, Polycentropodidae, Limnephilidae</i>	7
<i>Neritidae, Viviparidae, Ancylidae, Hydroptilidae, Unionidae, Corophiidae, Gammaridae, Platycnemididae, Coenagriidae</i>	6
<i>Mesoveliidae, Hydrometridae, Gerridae, Nepidae, Naucoridae, Notonectidae, Pleidae, Corixidae, Haliplidae, Hygrobiidae, Dytiscidae, Gyrinidae, Hydrophilidae, Clambidae, Helodidae, Dryopidae, Eliminthidae, Chrysomelidae, Curculionidae, Hydropsychidae, Tipulidae, Simuliidae, Planariidae, Dendrocoelidae</i>	5
<i>Baetidae, Sialidae, Piscicolidae</i>	4
<i>Valvatidae, Hydrobiidae, Lymnaeidae, Physidae, Planorbidae, Sphaeriidae, Glossiphoniidae, Hirudidae, Erpobdellidae, Asellidae</i>	3
<i>Chironomidae</i>	2
<i>Oligochaeta</i>	1

Tabella 6.6 - Tabella per l'assegnazione dei punteggi secondo l'indice BMWPs.

stata recentemente effettuata una ridefinizione dei punteggi di riferimento dei *taxa* considerati dall'indice (Walley e Hawkes, 1996). I nuovi punteggi, calcolati sulla base di circa 17.000 campionamenti di fauna bentonica e relativi a 85 famiglie di macroinvertebrati, rispecchiano in generale i valori originali, ma ne differiscono in molti casi. L'utilizzo di questa versione aggiornata dell'indice, almeno in Gran Bretagna, potrà probabilmente migliorarne l'applicabilità e l'efficacia.

### 6.3.2.3 Average Score Per Taxon (ASPT)

La sensibilità media degli organismi presenti in un campione è spesso indicata come Average Score Per Taxon ed è ottenuta dividendo il punteggio del BMWP, o il Chandler's score, per il numero di *taxa* presenti. Un'interessante caratteristica di questo indice è che il suo valore è indipendente dal numero di *taxa* rinvenuti nel campione e, per questo motivo, esso sembra essere meno influenzato dalle dimensioni del campione raccolto (Armitage *et al.*, 1983). Questo indice sembra inoltre risentire in misura minore della tipologia del corso d'acqua e delle variazioni stagionali delle comunità macrobentoniche (Pinder *et al.*, 1987).

A fronte di una limitata capacità di rilevare variazioni della struttura della comunità bentonica in condizioni di qualità compromesse, l'ASPT è in grado di valutare scostamenti anche ridotti dalla condizione di buona qualità delle acque (Cao *et al.*, 1996), espressa da valori di questo indice superiori a quattro.

#### 6.3.2.4 River InVertebrate Prediction and Classification System (RIVPACS)

Il River InVertebrate Prediction and Classification System (RIVPACS) è stato proposto da Wright *et al.* (1989) per ovviare agli inconvenienti posti, negli altri indici biotici, dalla eterogeneità degli ambienti fluviali da classificare (ruscelli di montagna, grandi fiumi di pianura, torrenti temporanei ecc.). Esso si basa su un software in grado di operare previsioni della presenza/assenza di determinati *taxa* in differenti tipologie di corsi d'acqua. Alla base del RIVPACS vi è l'assunto che la presenza di questi *taxa* dipenda dai livelli di alcune variabili ambientali di tipo chimico-fisico. Sono quindi state sviluppate, sulla base delle caratteristiche delle comunità macrobentoniche presenti in ambienti privi di alterazioni qualitative di rilievo, equazioni di regressione multipla, in grado di prevedere la probabilità di occorrenza dei *taxa* bentonici più comuni in funzione di alcune delle principali variabili ambientali, con esplicita esclusione del livello di inquinamento. Tra le variabili di tipo fisico, possono per esempio essere ricordate distanza dalla sorgente, pendenza del corso d'acqua, altitudine, portata, velocità di corrente media, profondità, eterogeneità del substrato, percentuale di copertura macrofittica, temperatura media dell'aria ecc. Tra quelle di tipo chimico alcalinità totale, pH, ossigeno disciolto, azoto totale, fosforo ortofosfato ecc. Il principale utilizzo di questo sistema predittivo è quello di indicare comunità di riferimento o attese per una determinata stazione, in assenza di fenomeni inquinanti, a partire dai valori di tali variabili rilevati in campo. La misura dello scarto tra la comunità attesa così definita e quella osservata durante il campionamento sarà indicatrice dell'intensità dell'alterazione strutturale della biocenosi, a sua volta dipendente dall'intensità dell'evento inquinante (Metcalf-Smith, 1994).

Inoltre, la comunità di riferimento di volta in volta fornita da RIVPACS può essere selezionata considerando la tipologia fluviale a cui la stazione in esame appartiene e la stagione di campionamento. A ciò si accompagna la possibilità di scegliere un livello variabile di identificazione tassonomica (specie o famiglia) e di stimare la presenza degli organismi in classi di abbondanza utilizzando diverse combinazioni delle variabili ambientali. Il programma fornisce anche stime dei valori di BMWPs, di ASPT e del numero di *taxa*.

#### 6.3.2.5 Indici di integrità biotica

Un approccio alternativo a quello degli indici biotici di qualità finora esaminati può essere identificato nello studio dell'integrità biotica di un ecosistema. Essa, riferendosi a un sistema ecologico, può essere definita come la sua capacità di produrre e mantenere una comunità biologica bilanciata, integrata e reattiva; tale comunità deve inoltre essere caratterizzata da una composizione in specie, da una diversità e da un'organizzazione funzionale simili a quelle di un ambiente analogo in condizioni naturali (Karr *et al.*, 1986). Il concetto è quindi riferito alle possibili alterazioni indotte dalle attività dell'uomo nell'ecosistema acquatico che, per possedere l'integrità biotica, deve manifestare composizione, struttura e funzionalità non compromesse. L'insieme di integrità biotica, chimica e fisica costituisce, in termini più generali, l'integrità ecologica.

L'uso del concetto di integrità biotica degli ecosistemi acquatici ha trovato il suo primo utilizzo relativamente alla fauna ittica (Karr, 1981), da sempre privilegiata tra le va-

rie componenti biologiche dei fiumi per l'evidente importanza sociale ed economica che riveste. L'Indice di Integrità Biotica (IBI: Karr *et al.*, 1986) prevede il calcolo di tre gruppi di variabili relative a composizione e ricchezza specifica, struttura trofica e, in ultimo, abbondanza e stato di salute dei pesci. Le variabili del primo gruppo, sei in totale, comprendono la definizione del numero totale di specie, del numero di specie e dell'identità di particolari gruppi tassonomici (per esempio pesci sole) e del numero di specie intolleranti. Le variabili relative alla struttura trofica sono, semplicemente, le percentuali di presenza dei pesci onnivori, dei ciprinidi insettivori e dei piscivori. Il terzo gruppo comprende l'abbondanza complessiva, la percentuale di individui ibridi e quella di individui non in buone condizioni (malattie, tumori, anomalie scheletriche ecc.). Per ognuna di queste variabili, anche in funzione delle dimensioni del fiume e della regione geografica, sono state definite le modalità di variazione: per esempio la percentuale di pesci onnivori aumenta al diminuire della qualità ambientale e quindi dell'integrità biotica; sono poi stati identificati dei valori soglia che permettono di delimitare tre differenti classi di integrità per ciascuna variabile. Al momento dell'applicazione dell'indice sarà quindi attribuito a ogni variabile uno dei seguenti punteggi:

- 5 se non si notano scostamenti dai valori attesi per un sito in condizioni naturali;
- 3 se tali scostamenti sono rilevabili, ma non molto evidenti;
- 1 se sono molto evidenti.

La somma di tutti i punteggi costituirà il *site score*, che potrà a sua volta ricadere in una delle cinque classi di integrità biotica definite dagli Autori. La classe più bassa, a cui corrisponde un'integrità biotica molto scarsa, è caratterizzata dalla presenza di pochi pesci (prevalentemente introdotti e tolleranti), di forme ibride e di individui in cattive condizioni fisiche. Le condizioni della comunità ittica corrispondente a un'eccellente integrità biotica (la classe di più elevata qualità ambientale) sono invece confrontabili con le migliori rinvenibili in assenza di disturbo antropico; sono presenti, con tutte le classi di taglia e una struttura trofica bilanciata, le specie tipiche degli habitat campionati e della tipologia del corso d'acqua, compresi i *taxa* intolleranti.

Negli Stati Uniti, questo indice ha trovato una larga applicazione e ne sono state sviluppate diverse versioni, adattate alle differenti ecoregioni e anche all'ambiente lacustre.

Per quanto riguarda il panorama scientifico italiano, sono presenti pochi indici basati sulla fauna ittica; tra questi, l'Indice Ittico (Lodi e Badino, 1991) si propone come strumento per definire la qualità biologica dei corsi d'acqua e utilizza tre parametri: il numero di specie presenti, il numero totale di individui e il numero medio di classi di taglia per l'intero popolamento, che ne suggerirebbero un avvicinamento all'IBI. Pur potendo forse fornire, in qualche caso, informazioni di significato più generale rispetto al macrobenthos, l'uso dei pesci per valutare il grado di integrità biotica sul territorio italiano non sembra poter essere del tutto soddisfacente. Lo scarso numero di specie ittiche presenti nei corsi d'acqua montani da un lato, e la costante e generalizzata immissione di specie alloctone dall'altro, sembrano infatti limitare, almeno per il momento, le potenzialità di indici di questo tipo. Non a caso, infatti, è stato proposto l'uso di indici e coefficienti per definire lo stato di degrado dell'ittiofauna autoctona (Bianco, 1990) che, in alcune regioni italiane, appare compromessa irreversibilmente; ciò rende così probabilmente ingiustificato l'utilizzo dei pesci per valutare l'integrità biotica, per la quale è necessario fornire valori di riferimento osservabili in aree non alterate.

L'approccio sviluppato da Karr (1981), che prevede il simultaneo studio di molte variabili riferite a una componente biologica per definire il grado di integrità biotica, è stato applicato anche alle comunità macrobentoniche. L'Indice Bentonico di Integrità Biotica (B-IBI: Kerans e Karr, 1994) è molto simile, come impostazione generale, all'IBI ed è stato sviluppato per i fiumi presenti nella valle del Tennessee (Stati Uniti sud-orientali). Con l'esclusione della diversificazione in stadi di sviluppo e della presenza di individui affetti da patologie, esso propone infatti l'uso delle stesse variabili presenti nell'IBI, adattate ai rappresentanti della comunità macrobentonica; nell'indice, esse sono divise in due gruppi, relativi alla struttura della comunità e alla sua organizzazione funzionale. I parametri legati agli aspetti strutturali sono:

- la ricchezza in *taxa* complessiva;
- la ricchezza in *taxa* di alcuni gruppi selezionati (Efemerotteri, Tricotteri, Plecotteri e molluschi intolleranti);
- la percentuale di Chironomidi, Oligocheti e dei due *taxa* dominanti.

I parametri scelti come indicatori della funzionalità sono l'abbondanza totale e le percentuali degli organismi appartenenti ai vari ruoli trofici (onnivori, detritivori, predatori ecc.). Tra queste variabili, sono state identificate come particolarmente significative la ricchezza in *taxa* complessiva, quella degli efemerotteri e dei Tricotteri, la dominanza e la percentuale di predatori. L'indice, sviluppato in modo rigoroso, consente inoltre un'applicazione differenziata nelle due principali categorie di habitat presenti nei corsi d'acqua: quelle di *pool* (aree lentiche) e di *riffle* (aree lotiche).

In modo analogo, qualche anno prima, l'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente dell'Ohio (Ohio EPA, 1987) ha proposto un indice simile nell'impostazione, ma che considera solo parametri di tipo strutturale: l'Indice di Comunità degli Invertebrati (ICI).

All'interno di un completo protocollo di valutazione della qualità biologica dei corsi d'acqua – intesa nel senso più ampio del termine – che prevede livelli successivi di indagine mediante lo studio di organismi macrobentonici e pesci (*Rapid Bioassessment Protocols*), l'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente statunitense (US EPA, 1989) ha proposto anch'essa lo studio di vari parametri (8) della comunità bentonica. Oltre ad alcuni simili per impostazione a quelli già visti per gli altri indici citati, sono qui presenti rapporti di abbondanza tra organismi appartenenti a diversi ruoli trofici (per esempio raschiatori/filtratori), il rapporto tra l'abbondanza degli efemerotteri, plecotteri e tricotteri (non tolleranti) e quella dei chironomidi (tolleranti) e il calcolo di indici di similarità tra le stazioni studiate. È interessante notare come il protocollo preveda, per alcune delle variabili proposte, il confronto con una stazione di riferimento che rappresenti il fiume in assenza dell'ipotetica alterazione, e quindi un giudizio finale espresso in termini percentuali.

In Italia il concetto di integrità biotica non è ancora stato sviluppato adeguatamente e mancano metodologie che permettano di valutarla in modo globale. Per quanto riguarda le singole componenti biologiche, Karr (1991) auspica lo studio e lo sviluppo di parametri che consentano di approdare, una volta integrati, a una più efficace valutazione della qualità complessiva dell'ambiente. Recentemente, è stato proposto per il territorio italiano un metodo che fornisce un giudizio sullo stato di integrità della comunità degli Efemerotteri (Buffagni, 1997), insetti le cui larve rivestono un ruolo di assoluto rilievo nei corsi d'acqua italiani. Questo metodo consiste nel calcolare, analogamente a quanto visto per l'ASPT, un punteggio medio per il sito in esame (MAS:

Mayfly Average Score) sulla base di singoli punteggi (1, 3 e 5) assegnati ai vari *taxa* di Efemeroteri, in rapporto alle loro capacità di segnalare condizioni di alterazione. Il MAS mostra prevedibili correlazioni con gli indici di qualità biologica e potrebbe rivelarsi un utile strumento per evidenziare situazioni e aree di particolare rilievo dal punto di vista dell'integrità e della diversità biologiche, stimate attraverso la comunità degli Efemeroteri. L'indice, la cui applicazione richiede uno sforzo aggiuntivo molto limitato rispetto agli indici di qualità utilizzati in Italia (EBI; IBE), potrebbe essere a essi affiancato, rappresentando anche una proposta per ricavare più informazioni dall'imponente mole di dati normalmente raccolta durante le campagne di biomonitoraggio e solo scarsamente valorizzata.

### 6.3.3 Indici basati su altre componenti

#### 6.3.3.1 Il sistema saprobico

Questo sistema di classificazione delle acque correnti è stato proposto già nei primi anni del secolo, e ha dato origine, a partire dagli anni Cinquanta, a diversi indici, basati sulla presenza di specie indicatrici (non solo macroinvertebrati, ma anche batteri, protozoi, rotiferi ecc). Il termine saprobio si riferisce all'utilizzo di sostanze della catena del detrito da parte degli organismi, e gli indici descrivono soprattutto le condizioni di qualità dovute al carico organico dei corsi d'acqua.

Una descrizione sintetica del metodo è fornita da Morpurgo (1996).

Nel calcolo dell'indice si considerano:

- il valore saprobico attribuito a ogni singola specie o *taxon* sulla base delle conoscenze relative alla presenza della specie in acque a diverso grado di carico organico;
- il peso indicatore della specie, che rappresenta il grado di valenza ecologica della specie, che sarà tanto più elevato quanto più la specie è caratteristica di un determinato e ristretto ambito di valori di carico organico;
- la stima dell'abbondanza degli organismi campionati appartenenti alla specie considerata.

Per quanto gli indici derivati dal sistema saprobio siano utilizzati abbastanza estesamente e si sia definita anche una loro standardizzazione, per lo più in area tedesca, le critiche più radicali al loro utilizzo rilevano le seguenti deficienze:

- il grado di definizione tassonomica è insufficiente per alcuni gruppi, mentre per altri sussistono difficoltà di attribuzione;
- è necessario un forte impegno di campionamento; le liste e i valori attribuiti alle specie non sono applicabili facilmente a realtà diverse da quella mitteleuropea;
- il sistema non è applicabile ad altri tipi di inquinamento al di fuori di quello organico;
- la tolleranza all'inquinamento delle diverse specie è attribuita soggettivamente, soprattutto sulla base di dati osservazionali e non sperimentali;
- ogni *taxon* è considerato separatamente, senza alcuna informazione desunta dalla struttura della comunità.

#### 6.3.3.2 L'indice nematodologico

L'indice nematodologico, formalizzato da Zullini (1976), consente di definire e controllare la qualità di corpi d'acqua sia lotici che lentici, in base alla presenza di alcune

particolari famiglie di nematodi, per le quali sono ben note le esigenze ecologiche. I nematodi fanno parte della microfauna, che comprende organismi di dimensioni solitamente inferiori al millimetro, quali protozoi, rotiferi, tardigradi, gastrotrichi e altri, diffusi ubiquitariamente sia in acque correnti che stagnanti. La conoscenza delle esigenze trofiche delle specie di nematodi rinvenute consente un giudizio sulla qualità ambientale dei siti di raccolta. Infatti le specie che si nutrono di batteri prevalgono soprattutto in ambienti degradati, ricchi di materiale organico e poveri in ossigeno, mentre le specie che si nutrono di alghe o di microfauna prevalgono in acque pulite e ben ossigenate. Inoltre, grazie al loro relativamente breve ciclo vitale (alcune settimane) risultano particolarmente utili nel mettere in luce l'impatto di scarichi puntiformi. L'indice si basa sulla presenza percentuale di individui appartenenti alla famiglia *Rhabditidae*, rispetto al numero totale degli altri nematodi. Nonostante la significatività dei risultati ottenuti (Zullini, 1988), le speciali procedure richieste per la raccolta e l'isolamento di questi organismi, non visibili a occhio nudo, unitamente alle indubbie difficoltà nel riconoscimento sistematico, che comportano il ricorso a specialisti del gruppo, ne limitano l'applicabilità. Non bisogna infatti dimenticare che un buon indicatore per essere veramente tale deve essere anche facilmente applicabile.

#### 6.3.3.3 L'ittiofauna

I pesci vengono ritenuti buoni indicatori di effetti a lungo termine e di modificazioni a livello soprattutto macroambientale grazie ad alcune loro caratteristiche, fra le quali principalmente la durata dei loro cicli vitali, anche di alcuni anni, e la possibilità di spostamento (Karr *et al.*, 1986), che, a differenza di quanto avviene per il *benthos*, li svincola da particolari situazioni microambientali. Sono presenti anche in corsi d'acqua di piccole dimensioni, ad eccezione di quelli più gravemente inquinati; inoltre la comunità ittica è generalmente costituita da specie con diverse abitudini alimentari (onnivori, erbivori, insettivori, planctivori, piscivori) in grado così di fornire indicazioni sullo stato di salute generale dell'ambiente. Il campionamento e l'identificazione a livello di specie risultano relativamente facili e ben note sono le esigenze ecologiche delle singole specie. Tuttavia, per quanto riguarda la situazione italiana, come già detto nel paragrafo sull'indice di integrità biotica, difficilmente la comunità ittica può essere utilizzata come indicatrice, a causa delle continue campagne di ripopolamento effettuate nella maggior parte dei nostri corsi d'acqua, anche ai fini della pesca sportiva, e attuate spesso con specie alloctone, particolarmente resistenti e competitive nei riguardi dell'ittiofauna autoctona.

#### 6.3.4 L'uso di bioindicatori in ambiente lacustre

Analogamente a quanto avvenuto nelle acque correnti per l'inquinamento di tipo organico, nei laghi l'uso dei bioindicatori è stato per lo più finalizzato alla sola definizione del loro stato trofico. Con la rilevante eccezione dell'acidificazione dei laghi causata dalle precipitazioni acide, che riguarda alcune regioni dell'Europa settentrionale ed è stata relativamente ben studiata, altre forme di alterazione non hanno infatti, per il momento, visto la messa a punto di specifici indicatori biologici, atti a valutarne le conseguenze sugli ecosistemi lacustri. Tra queste possibili cause di alterazione possono per esempio essere citate la contaminazione da microinquinanti organici e metalli, le modificazioni fisiche e idrologiche delle caratteristiche dei laghi e l'introduzione di specie esotiche.

Per quanto riguarda il fenomeno dell'eutrofizzazione dei laghi, che può essere in-

dotto da apporti di nutrienti e di sostanza organica di origine antropica dal bacino circostante, i bioindicatori hanno trovato, per lo più localmente, una discreta applicazione. Spesso però essi non sono in grado di discriminare tra condizioni estreme di inquinamento organico e condizioni estreme di eutrofizzazione (Premazzi e Chiaudani, 1992), portando quindi al parallelo impiego – peraltro sempre auspicabile – di analisi di tipo chimico/fisico.

Tra gli indici sviluppati, alcuni dei quali considerano il fitoplancton, lo zooplancton o i pesci, la maggior parte si basa sugli organismi macrobentonici. Oligocheti e Ditteri Chironomidi sono i principali gruppi utilizzati, in quanto spesso dominanti negli ecosistemi lacustri e rappresentati da un elevato numero di specie con differenti esigenze ecologiche. L' *Environmental Index* (Howmiller e Scott, 1977), sviluppato in America settentrionale e basato sullo studio degli Oligocheti, consente di definire lo stato trofico dei laghi calcolando e rapportando tra loro le abbondanze delle specie tolleranti, poco tolleranti e intolleranti. Analogamente, Lang (1984) ha messo a punto per i laghi svizzeri una lista di specie di Oligocheti che, una volta definita la dominanza di una specie rispetto alle altre all'interno della taxocenosi, consente di classificare il lago come oligotrofico, mesotrofico o eutrofico. Per quanto concerne i Chironomidi, lo studio approfondito della loro comunità può portare a una anche più dettagliata classificazione trofica dei laghi (Saether, 1979).

Sono inoltre stati messi a punto, per i laghi scandinavi, altri indici relativamente semplici da applicare (Wiederholm, 1980), tra cui il rapporto tra gli Oligocheti e i Chironomidi sedentari, che presentano buone correlazioni con parametri legati alla trofia dei laghi. Tra i principali pregi di questo tipo di indici vanno senz'altro ricordati la semplicità di calcolo e la buona correlazione con parametri chimici che esprimono la trofia del lago; tra i limiti le oggettive difficoltà di identificazione di alcuni organismi (che richiedono l'intervento di un esperto), la loro efficacia il più delle volte verificata solo in ambito locale e il fatto che, considerando spesso un'unica componente bentonica, essi forniscono una valutazione incompleta dello stato dell'ecosistema.

Tra gli indici sviluppati più recentemente, meritano di essere citati gli indici Bo (*indice biologico litorale*) e Bz (*indice di deficit faunistico*), proposti e discussi da Verneaux *et al.* (1995), la cui applicazione ha consentito di classificare su base biologica alcuni laghi francesi. L'indice Bo esprime il potenziale biogenetico delle zone litorali dei laghi, mentre il Bz rappresenta l'evoluzione delle biocenosi bentoniche (all'interfaccia acqua/sedimento) con l'aumentare della profondità. I due indici vengono calcolati sulla base della diversità, della densità e della composizione della comunità bentonica, i cui rappresentanti vengono identificati a livello generico. Bo è particolarmente correlato con la mineralizzazione (conducibilità e parametri a essa associati), mentre Bz con l'ossigenazione dell'acqua e la scarsità di sostanza organica residuale nei sedimenti.

### **6.3.5 Stato delle ricerche e potenzialità future**

Lo stato attuale delle ricerche sul biomonitoraggio delle acque interne vede afferinarsi alcuni approcci al problema, soprattutto in Gran Bretagna e USA, che prevedono una notevole sistematizzazione dei dati e delle misure ottenute non solo dall'applicazione dei protocolli di monitoraggio, ma anche appositamente rilevati per definire situazioni di confronto con ambienti non disturbati.



Il già citato software RIVPACS (paragrafo: *River InVertebrate Prediction and Classification System*) è fondato infatti su un database (ottenuto da indagini in 438 siti su 80 fiumi diversi) per la previsione delle comunità attese in diverse situazioni ambientali.

Un tale sforzo organizzativo e scientifico è giustificato dalla necessità di proteggere la qualità delle acque correnti sicuramente minacciata anche nel nostro Paese. Le peculiarità geomorfologiche, climatiche e biogeografiche del territorio italiano non permettono peraltro di adottare acriticamente modalità e approcci sviluppati in altri paesi, ed è consigliabile, a nostro avviso, continuare sulla strada finora percorsa con successo, in modo da fornire una base conoscitiva ampia e articolata delle applicazioni dell'indice IBE finora condotte sui corsi d'acqua della penisola. Tale base conoscitiva andrebbe utilizzata per una successiva elaborazione che mettesse in luce le comunità di riferimento per le varie tipologie dei corsi d'acqua italiani.

Una riflessione sulle prospettive della ricerca in ecologia delle acque non può prescindere dall'inquadramento più generale entro le linee guida sviluppatesi recentemente in idrobiologia.

Come si è visto, uno dei principali nodi da affrontare nella messa a punto dei bioindicatori è costituito dall'eterogeneità degli ambienti che si incontrano lungo il corso di un fiume, dalla sorgente alla foce. Il *River Continuum Concept*, descritto per la prima volta da Vannote *et al.* nel 1980 e ripreso in seguito da diversi Autori, rappresenta uno strumento concettuale che integra un ampio spettro di dati sulla struttura e il funzionamento degli ecosistemi fluviali. Secondo questa teoria l'ecosistema fluviale costituisce un gradiente di condizioni che si sviluppano lungo l'asta fluviale, a partire dalle sorgenti fino alla zona di foce, in modo tale che le caratteristiche presenti in un certo tratto sono fortemente correlate e dipendenti non solo dalle condizioni dei tratti situati a monte, ma dell'intero bacino idrografico. Un importante pregio di questa teoria è che, definite le particolarità geomorfologiche e le dinamiche stagionali idrologiche e termiche come riferimento di base, le caratteristiche biologiche essenziali degli ecosistemi di acque correnti possono essere previste in modo affidabile.

A scopo di esempio si citano alcune proposizioni derivanti dal *River Continuum Concept* (Cummins, 1993) che hanno indubbio interesse per gli scopi trattati in questo contributo all'uso dei bioindicatori delle acque interne.

Le condizioni geomorfologiche e idrologiche, regolando la quantità di materiale in sospensione, organico e minerale, determinano la struttura della componente biologica (in particolare macrobentonica), la cui composizione viene espressa, a seconda del ruolo trofico svolto dagli organismi, per gruppi funzionali e non più secondo un criterio di tipo tassonomico.

Si distinguono così gli sminuzzatori (*shredders*), organismi in grado di frammentare la sostanza organica grossolana (CPOM) costituita prevalentemente da foglie, lettiera e materiale alloctono all'asta fluviale e di trasformarla in materiale organico più fine (FPOM) utilizzato a sua volta dagli organismi filtratori e raccoglitori (*collectors*); vi sono poi gli erbivori o pascolatori (*grazers*), che si nutrono di produttori, rappresentati prevalentemente dal cosiddetto *periphyton* (insieme di alghe unicellulari che aderiscono a qualsiasi oggetto immerso, laddove le condizioni di luminosità garantiscano la possibilità di fotosintesi), mentre scarsa o del tutto assente, a causa della velocità di corrente, è la componente fitoplanctonica; e infine i predatori (*predators*), più o meno costanti lungo tutta l'asta fluviale. Le variazioni percentuali di un gruppo di organi-

smi rispetto all'altro riflettono non solo i cambiamenti che si verificano naturalmente in un corso d'acqua, a partire dalla sorgente fino al tratto terminale, ma anche modificazioni indotte dall'azione antropica. Infatti, mentre in un tratto montano, fortemente ombreggiato dalla presenza di vegetazione arborea, prevalgono gli sminuzzatori e sono quasi del tutto assenti i produttori, e di conseguenza anche i pascolatori, in un tratto intermedio la progressiva trasformazione della sostanza organica grossolana in materiale più fine, accompagnata da migliori condizioni di luminosità, garantisce la presenza sia dei filtratori che degli erbivori; al contrario gli sminuzzatori riducono la loro presenza. Nei tratti terminali, l'accresciuta torbidità delle acque dovuta al materiale in sospensione, determinerà la presenza quasi esclusiva dei filtratori. I predatori costituiscono una percentuale costante, ancorché modesta, lungo tutta l'asta fluviale.

In condizioni di disturbo (immissione di scarichi organici, forte erosione dovuta per esempio a disboscamento) l'aumento del FPOM in sospensione determinerà la presenza predominante di filtratori, anche in tratti fluviali che in condizioni naturali avrebbero supportato una comunità più diversificata in termini di gruppi funzionali. Le variazioni di indici come P/R (rapporto fra produzione primaria e respirazione della comunità) o sminuzzatori/filtratori, il cui valore risulta prevedibile per determinati tratti fluviali, possono dare informazioni sul grado di disturbo subito dal sistema.

Il *River Continuum Concept* è stato ulteriormente integrato, negli anni più recenti, con paradigmi interpretativi utili per scale di maggiore dettaglio, quali il *Riparian Influence Concept* (RIC, Gregory *et al.*, 1991), che considera la stretta interazione tra la zona di riva e il canale inondato, il *Patch Dynamics Concept* (PDC, Pringle *et al.*, 1988) e l'*Hydraulic Stream Ecology Concept* (HSEC, Stazner *et al.*, 1988), che forniscono una guida per identificare modelli ripetitivi di habitat e di portata.

In conclusione, le potenzialità future di miglioramento degli strumenti di biomonitoraggio ai fini della gestione integrata degli ambienti acquatici e del loro bacino versante risiedono nei risultati derivanti sia dalla ricerca applicata (adattamento degli indici alle condizioni particolari incontrate), sia dalla ricerca idrobiologica di base, attraverso un'appropriata generalizzazione dei concetti, distinguendo le diverse scale dei fenomeni trattati.

## Bibliografia

Armitage, P. D., Moss, D., Wright, J. F. e Furse, M. T. 1983. The performance of a new biological water quality score system based on macroinvertebrates over a wide range of unpolluted running water sites. *Water Research*, 17 (3), 333-347.

Battegazzore, M. 1991. Definizione della qualità delle acque del fiume Po mediante lo studio delle comunità macrobentoniche. IRSA, Atti del Convegno: La qualità delle acque del fiume Po negli anni 90, Ferrara 18-20 aprile 1991. *Quad. Ist. Ric. Acque*, 92, 13.1-13.72.

Bianco, P. G. 1990. Proposta di impiego di indici e di coefficienti per la valutazione dello stato di degrado dell'ittiofauna autoctona delle acque dolci. *Riv. Idrobiol.*, 29 (1), 131-149.

Birkemeyer, T., Cantonati, M., Dalmazzo, A. e Occhipinti Ambrogi, A. 1995. Indagini sulla qualità dei canali circostanti la raffineria di Sannazzaro de' Burgundi (Pavia). *Quad. Staz. ecol. civ. Mus. St. nat. Ferrara*, 9, 47-58.

Buffagni, A. 1995. La qualità biologica di alcuni corsi d'acqua dell'alta Valtellina. *Acqua-Aria*, 1, 77-85.

- Buffagni, A.** 1997. Mayfly community composition and the biological quality of streams. In **Landolt e Sartori** (eds.): *Ephemeroptera e Plecoptera: Biology-Ecology-Systematics*. Fribourg, 235-246.
- Campaioli, S., Ghetti, P. F., Minelli, A. e Ruffo, S.** 1994. Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane. Vol.1. Provincia Autonoma di Trento, 357.
- Cao, Y., Bark, A. W. e Williams, W. P.** 1996. Measuring the responses of macroinvertebrate communities to water pollution: a comparison of multivariate approaches, biotic and diversity indices. *Hydrobiologia*, 341, 1-19.
- Chandler, J. R.** 1970. A biological approach to water quality management. *Journal of Water Pollution Control*, 69, 415-422.
- Cummins, K. W.** 1993. Invertebrates. In: **Calow, P. e Petts, G. E.** (eds.). *Rivers Handbook*. Blackwell Scientific Publ. Oxford, UK, 234-250.
- Ghetti, P. F.** 1986. I macroinvertebrati nell'analisi di qualità dei corsi d'acqua. Manuale di applicazione Indice Biotico: EBI modificato. Provincia Autonoma di Trento, 111.
- Ghetti, P. F.** 1995. Indice Biotico Esteso (IBE). Metodi di Analisi per ambienti di acque correnti. Notiziario dei Metodi Analitici, IRSA (CNR), ISSN: 0392-1425, 1-24.
- Ghetti, P. F.** 1997. Indice Biotico Esteso (IBE) I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti. Manuale di applicazione. Provincia Autonoma di Trento, 222.
- Ghetti, P. F. e Bonazzi, G.** 1981. I macroinvertebrati nella sorveglianza ecologica dei corsi d'acqua. Collana del Progetto Finalizzato: Promozione della Qualità dell'Ambiente, CNR AQ/1/127.
- Gregory, S. V., Swanson, F. J., McKee, W. A. e Cummins, K. W.** 1991. An ecosystem perspective of riparian zone. *Bio. Sci*, 41, 540-551.
- Howmiller, R. P. e Scott, M. A.** 1977. An environmental index based on relative abundance of oligochaetes species. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 49, 809-815.
- ISO (International Standards Organisation)** 1979. Assessment of the Biological Quality of Rivers by a Macroinvertebrate Score. ISO/TC147/SC5/WG6/N5, British Standards Institution, London.
- ISO (International Standards Organisation)** 1984 Assessment of the water and habitat quality of rivers by a macroinvertebrate score. ISO/TC147/SC5/WG6/N40, British Standards Institution, London.
- Karr, J. R.** 1981. Assessment of biotic integrity using fish communities. *Fisheries*, 6 (6), 21-27.
- Karr, J. R.** 1991. Biological integrity: a long neglected aspect of water resources management. *Ecological Applications*, 1, 66-84.
- Karr, J. R., Fausch, K. D., Angermeier, P. L., Yant, P. R. e Schlosser, I. J.** 1986. Assessing Biological Integrity in Running Waters - A Method and Its Rationale. Illinois Natural History Survey, Special Pub. 5, 29.
- Kerans, B. L. e Karr, J. R.** 1994. A benthic index of biotic integrity (B-IBI) for rivers of the Tennessee Valley. *Ecological Applications*, 4, 768-785.
- Lang, C.** 1984. Eutrophication of lakes Lemana and Neuchâtel (Switzerland) indicated by oligochaete communities. *Hydrobiologia*, 115, 131-138.
- Lodi, E. e Badino, G.** 1991. Classificazione delle acque fluviali (zona dei cipriniformi) mediante l'Indice Ittico. *Atti Accademia Scienze Torino*, 125 (5-6), 192-203.
- Metcalf-Smith, J. L.** 1994. Biological water quality assessment of rivers: use of macroinvertebrate communities. In: **Calow, P. e Petts, G. E.** (eds.). *The Rivers Handbook*, Vol II, Blackwell Sci. Pub., London, 144-170.
- Morpurgo, M.** 1996. Descrizione sintetica del Saprobienindex. *Biologia Ambientale*, 2-3, 13-29.
- OhioEPA** 1987. Biological Criteria for the Protection of Aquatic Life: Vol I. Division of Water

Quality Monitoring and Assessment, Surface Water Section, Columbus, Ohio.

**Pinder, L. C. V., Ladle, M., Gledhill, T., Bass, J. A. e Matthews, A. M.** 1987. Biological surveillance of water quality, 1. A comparison of macroinvertebrate surveillance methods in relation to assessment of water quality, in a chalk stream. *Archiv für Hydrobiologie*, 109, 207-226.

**Premazzi, G. e Chiaudani, G.** 1992. Ecological quality of surface waters. Commission of the European Communities, EUR 14563 EN.

**Pringle, C. M., Naiman, R. J., Bretschko, G., Karr, J. R., Oswood, M. A., Webster, J. R., Welcomme, R. L. e Winterbourn, M. J.** 1988. Patch dynamics of lotic systems: the stream as a mosaic. *J. North Amer. Benth. Soc.*, 7, 503-524.

**Ruffo, S. (ed.)** 1977-1985. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne. Collana del progetto finalizzato: Promozione della qualità dell'ambiente, CNR, Roma.

**Saether, O. A.** 1979. Chironomid communities as water quality indicators. *Holarct. Ecol.*, 2, 65-74.

**Sansoni, G.** 1988. Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati dei corsi d'acqua italiani. Provincia Autonoma di Trento, pp. 192.

**Stazner, B., Gore, J. A. e Resh, V. H.** 1988. Hydraulic stream ecology: observed patterns and potential applications. *J. North Amer. Benth. Soc.*, 7, 307-360.

**US EPA** 1989. Rapid Bioassessment Protocols For Use In Streams And Rivers - Benthic Macroinvertebrates and Fish, Office of Water Regulation and Standards, Washington DC, EPA/444/4-89-001.

**Vannote, R. L., Minshall, G. W., Cummins, K. W., Sedall, K. W. e Cushing, K. W.** 1980. The river continuum concept. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37, 130-137.

**Vendegna, V. e Grandis, D.** 1996. Easy EBI. Software per la diagnosi e la rappresentazione geografica della qualità biologica dei corsi d'acqua. Supplemento ai *Quaderni del Centro di Ricerca sulle Acque*, Università di Pavia.

**Verneaux, J., Schmitt, A. e Verneaux, V.** 1995. Classification biologique des lacs jurassiens à l'aide d'une nouvelle méthode d'analyse des peuplements benthiques III. Relations entre données biologiques et variables du milieu. *Annls Limnol.*, 31 (4), 277-286.

**Walley, W. J. e Hawkes, H. A.** 1996. A computer-based reappraisal of the Biological Monitoring Working Party scores using data from the 1990 river quality survey of England and Wales. *Water Research*, 30 (9), 2086-2094.

**Wiederholm, T.** 1980. Use of benthos in lake monitoring. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 52, 537-547.

**Woodiwiss, F. S.,** 1964. The biological system of stream classification used by Trent River Board. *Chemistry and Industry*, 14, 443-447.

**Wright, J. F., Armitage, P. D., Furse, M. T. e Moss, D.** 1989. Prediction of invertebrate communities using stream measurements. *Regulated Rivers: Research and Management*, 4, 147-155.

**Zullini, A.** 1976. Nematodes as indicators of river pollution. *Nematol. medit.*, 4, 13-22.

**Zullini, A.** 1988. The Ecology of Lambro river. *Riv. Idrobiol.*, 27 (1), 39-58.

## 6.4 Approcci cartografici e telerilevamento - Marco Marchetti e Mario A. Gomarasca

### 6.4.1 Premessa

La preservazione della biodiversità è obiettivo comunemente accettato e condiviso a livello internazionale, spesso con la conseguente necessità di porre limiti all'uso delle risorse naturali, o quantomeno con la pratica adozione di sistemi conservativi di gestione (Global Biodiversity Strategy, 1992). La gestione deve essere sostenibile e va adottata nei processi decisionali prima di tutto su scala territoriale vasta, predisponendo adeguate linee di assetto del territorio. La ratifica formale a livello di trattati, dalla Global Biodiversity Strategy di Rio (Convenzione internazionale stipulata nel 1992 e ratificata dal nostro Parlamento) alle risoluzioni delle conferenze ministeriali del processo di Helsinki sulla protezione delle foreste europee (Strasburgo, 1990 e Helsinki, 1993 e 1996), ha impegnato gli stati al monitoraggio su scala nazionale della biodiversità e a preservare le caratteristiche naturali degli ecosistemi.

È significativo constatare che Paesi a forte tradizione forestale, quali Svezia, Finlandia, Norvegia e Svizzera abbiano negli ultimi quattro anni rifatto la legislazione forestale nazionale, connotandola di un forte indirizzo gestionale in senso sostenibile nonché di dotazione di strumenti conoscitivi di verifica continua dei cambiamenti in atto. Anche la Francia, ha prontamente (Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, 1995) ri-orientato i propri strumenti conoscitivi, utilizzando in modo nuovo i parametri e gli attributi che da sempre tiene sotto controllo con la potente struttura statale dedicata all'inventario continuo delle risorse forestali. Nel nostro Paese la tematica è al momento allo stato embrionale, come dimostrano i rari eventi scientifici sul tema, la scarsa partecipazione agli organismi comunitari che di questo si occupano, nonché la carenza di informazioni.

È peraltro largamente sentita la necessità di sistemi davvero efficienti, sotto il profilo tecnico-economico, per conoscere e monitorare la diversità forestale, sia a livello di popolamenti su larga scala, sia su base ecosistemica territoriale; come del resto già verificato in passato per altre componenti tecniche nel settore ambientale (Corona *et al.*, 1993).

Inoltre, nessuno dei numerosi indici abitualmente impiegati ha buone capacità predittive a lungo termine. Ciò ha aperto la strada a ricerche volte alla definizione di terminologie nuove in sostituzione di quelle tradizionali sovente confuse e ridondanti (Kennel, 1996), alla scelta degli standards alla valutazione delle tendenze dinamiche delle risorse forestali (Parviainen, 1996).

Le ricerche a livello di popolamento possono condurre alla messa a punto di nuove linee guida di assetto forestale, che consentano soluzioni progettuali tese ad aumentare la varietà di habitat e l'eterogeneità del paesaggio, aumentando la biodiversità. Gli alberi e la loro organizzazione spaziale (struttura dei soprassuoli) sono strettamente interrelate con tutte le altre parti dell'ecosistema foresta, come il suolo, la flora, la fauna e il suo comportamento. Ecco perché gli studi strutturali e floristici sui processi dinamici giocano un ruolo chiave (La Marca *et al.*, 1996) nella descrizione degli indicatori di biodiversità. Bisogna definire nuovi parametri chiave (per esempio, gli attributi relativi alle componenti senescente e morta) e ridefinire quelli esistenti: ricercare la standardizzazione, le differenze tra foreste naturali e non (il grado di naturalità delle

foreste del continente è in discussione aperta e attuale nel mondo forestale europeo), il grado di disturbo e la sua influenza, i confronti anche economici tra selvicoltura sostenibile e produttiva.

A livello di paesaggio forestale le necessità più urgenti riguardano lo sviluppo di metodi inventariali per la globalità dell'ecosistema. Ciò implica un uso intelligente del telerilevamento nei GIS e delle tecniche di visualizzazione delle diverse unità di gestione (Corona *et al.*, 1993) del mosaico di ecosistemi che compongono il tessuto forestale, includendo orli, margini, radure, aree incluse e miste ecc. (Marchetti *et al.*, 1996). Inoltre il fattore protezione, e il controllo specificamente forestale, da non delegare alle sole aree protette (biotopi, vecchi boschi, area di influenza idrologica, localizzazione di foreste e altri sistemi complessi, arbusteti, cespuglieti e mantelli, coltivazioni arboree abbandonate, aree d'influenza di vecchi insediamenti rurali, praterie naturali, formazioni particolari – rupicole, costiere, d'alta quota) in alternativa a usi diversi del suolo (La Marca, 1983).

È necessario quindi provvedere alla messa a punto di piattaforme metodologiche che consentano di contabilizzare e verificare i cambiamenti negli habitat e negli ecosistemi in relazione alla conservazione della biodiversità. Utilizzare strumenti che abbiano facilità di dialogo con le attuali tecniche di gestione e pianificazione forestale, che fanno sempre più largo impiego di telerilevamento e GIS, e chiudere il divario esistente tra le dichiarazioni e risoluzioni internazionali e la disponibilità di tecnologie e metodi appropriati (Gomasasca, 1997).

#### **6.4.2 La diversità forestale. Definizioni e scale di misurazione**

La diversità biologica, brevemente detta biodiversità, può essere definita come la variabilità totale della vita sulla Terra. A Rio è stata anche definita come la “variabilità tra gli organismi viventi di tutte le forme includendo, *inter alia*, gli ecosistemi acquatici, marini e terrestri e i complessi ecologici di cui sono parte” (*Global Biodiversity Assessment - GBA*, 1995). L'uso del termine si è allargato di anno in anno coprendo un'ampia varietà di aspetti diversi, a differenti scale e in vari campi di attività, che ha portato al diffondersi di neologismi, sinonimi e termini correlati che focalizzano la biodiversità, la biologia conservazionistica, la gestione sostenibile anche in termini socioeconomici e perfino le scienze umane.

Le tre classiche componenti della biodiversità sono quelle genetica, specifica ed ecosistemica. Al loro fianco vengono ora proposte la concentrazione specifica e la diversità a livello di paesaggio, contenenti tutti i livelli biologici. L'approccio è basato sull'inventario della biodiversità ecosistemica, e il fine primario è la sua conservazione.

La diversità ecologica si riferisce al numero di specie in una data area, al loro ruolo, al modo in cui la composizione specifica cambia muovendosi nella regione e alle loro modalità di aggruppamento insieme ai processi che hanno luogo tra e in questi ecosistemi. È opportuno notare come tale definizione sia in perfetta sintonia con approcci di studio e interpretazione dei paesaggi vegetali naturali e non ormai in uso anche nelle nostre realtà di metodi e sistemi di inventario delle risorse naturali. Il progetto Carta Forestale nella regione Liguria, per esempio, ha cercato di costruire le serie di vegetazione e il concatenamento degli ecosistemi dei paesaggi nei diversi biomi.

Prima di indicare metodi di analisi spaziale per la ricerca diretta della diversità a livello di paesaggio, è opportuno ricordare come la ricchezza di specie sia da sempre l'indicatore fondamentale (Peet, 1974), con diversi indici misuratori:

- alfa, per la diversità in un'area di date dimensioni;
- beta tra aree differenti e lungo specifici gradienti;
- gamma, la cui comprensione ha implicazioni dirette a livello di paesaggio (Franklin, 1993), per la diversità totale in una regione.

Gli ecosistemi inoltre sono disposti in modo complesso nello spazio, generalmente in mosaici indifferenziati, nei quali si stenta a riconoscere facilmente un adeguato livello di classificazione. Partendo dalle regioni bio-geografiche a livello mondiale e scendendo ai biomi, alle eco-regioni e ai tipi fisionomici, si passa poi a una scala più piccola nella quale i paesaggi si dividono in ecosistemi e in comunità. La rappresentazione di tale complessità dipende quindi dalle scale di lavoro:

- a livello locale gli studi vengono generalmente guidati da necessità specifiche e così i campionamenti spesso condotti a livello di singolo biotopo negli ecosistemi di aree protette, piccoli bacini o comprensori forestali;
- il livello regionale include studi di più ecosistemi a livello di entità politico-amministrative o grandi sistemi fluviali o intere eco-regioni;
- a livello globale invece si considera semplicemente la vastità dell'area in esame, con la risoluzione sempre più bassa dei livelli regionale e locale. Questo richiede quasi sempre l'uso di dati telerilevati a livello di biotopo e di paesaggio, insieme a rilievi puntuali secondo specifici sistemi di campionamento che permettano l'estrapolazione di misure su base statistica e cartografica. Limitazioni sono date proprio dalle possibilità di visitare e campionare a sufficienza il fenomeno in esame per poterne risolvere la variabilità intrinseca, nonché per poter assicurare una sufficienza accuratezza e quindi affidabilità della misura telerilevata (Gomasasca, 1997).

#### 6.4.3 Metodi di misurazione della diversità forestale

La biodiversità rientra primariamente tra le variabili che suscitano crescente interesse nel campo degli inventari forestali multirisorse per la raccolta di dati sull'uso multiplo dei boschi e delle foreste; purtroppo, la sua specificità ne fa un parametro di difficile accesso in termini esaustivi in quanto costoso da rilevare in forma diretta. Ciò, infatti, è in contrasto con l'attuale tendenza a ridurre i tempi delle rilevazioni di campo negli inventari, mentre sta crescendo l'uso di converso dei dati telerilevati, affidabili ed economici su grandi aree, e con la dote aggiuntiva di facilitare l'aggiornamento delle informazioni anche in tempi brevi, potendo così controllare le dinamiche temporali altrimenti aleatorie, come dimostra proprio l'esperienza del nostro Paese che ha pochi, disomogenei, e mai aggiornati o addirittura ultimati processi inventariali in corso (Ferrara, 1991).

Tradizionalmente, inoltre, la conservazione della biodiversità si è sempre interessata in particolare modo alle specie minacciate di estinzione; ma a questo approccio, costoso e poco efficace in molti casi, si sta dimostrando spesso preferibile il livello degli habitat.

Nel caso della diversità forestale alcuni attributi descrittivi classici sono l'estensione, la struttura, la composizione specifica, la biomassa e la produttività, lo stato vegetativo. Alcuni di questi possono essere utilmente studiati anche tramite telerileva-

mento, specie quando si ricercano inferenze a livello complessivo di paesaggio, per cui le potenzialità di disegno sinottiche, sincroniche e olistiche delle immagini sono molto alte (Walsh *et al.*, 1990). Pur non esistendo ancora metodi generali codificati, esistono innumerevoli esperienze applicative che consentono di monitorare la copertura vegetale, l'uso del suolo, i danni forestali e altri aspetti legati soprattutto ai cambiamenti e ai processi sia a livello di biotopo che di ecosistema.

Le componenti della diversità forestale rispetto all'uso del telerilevamento, soprattutto spaziale, sono la composizione, la struttura, la tendenza (McCormick *et al.*, 1996). La prima si riferisce all'identità, la distribuzione e la proporzione relativa degli elementi del paesaggio presenti in un'area forestale. La componente strutturale è quella della distribuzione spaziale – tipo di copertura, densità, numero, forma, dimensioni, dispersione ecc. – delle particelle, poligoni, comprensori presenti. La tendenza, componente temporale, riguarda i cambiamenti che hanno luogo nella composizione e nella struttura di un paesaggio forestale nel tempo. Per ognuna di queste componenti possono essere studiati degli indicatori, variabili chiave e parametri numerici analizzabili in modo quantitativo.

Alcuni esempi riguardano, a livello globale, l'uso dei dati a bassa risoluzione dei satelliti meteorologici della serie AVHRR (Advanced very high resolution radiometer) per la misura della differenza di concentrazione di biomassa nei boschi di conifere dei Paesi dell'Europa boreale (Hame *et al.*, 1994), per la preparazione di una carta forestale continentale con l'evidenza dei diversi tipi di frammentazione nelle varie parti d'Europa, preparata dall'Agenzia Spaziale Europea, e per l'analisi spettrale a livello di eco-regioni (Ricotta *et al.*, 1996). Olsen *et al.*, (1993) hanno proposto una dimensione frattale modificata per considerare la forma dei poligoni rappresentanti i soprassuoli forestali e la loro distribuzione e uniformità nel paesaggio, utilizzando i dati a media risoluzione del satellite Landsat sensore Thematic Mapper (TM) come in altre esperienze nei nostri ambienti (Corona *et al.*, op.cit.); analogamente De Jong e Burrough (1995) hanno impiegato la dimensione frattale per separare strutture diverse in tipologie mediterranee. Podolsky (1994) ha osservato inoltre un alto grado di correlazione tra la ricchezza biologica e quella del paesaggio misurata sulle immagini TM.

Con il lancio dei satelliti commerciali ad alta risoluzione, con risoluzione inferiore a 5 m saranno a breve possibili azioni inventariali a livello di singolo soprassuolo, particella e albero.

#### **6.4.4 Indicatori di diversità strutturale nelle immagini digitali**

Le immagini digitali possiedono parecchie caratteristiche che permettono classificazioni numeriche e, tramite queste, lo studio della diversità nelle strutture forestali.

Esse derivano dai valori di riflettanza di un *pixel* e dei segmenti o gruppi di segmenti areolari (tabella 6.7, Parmes, 1996). Oltre ai valori di tonalità, nelle analisi numeriche delle immagini (soprattutto derivate da satellite - digitali alla fonte), si possono usare caratteri spaziali quali la forma e la dimensione dei poligoni, la loro tessitura e distribuzione (*pattern*), e le relazioni contestuali o topologiche che sussistono tra unità cartografiche, delineate per esempio a livello di coperture del suolo.

La tessitura, tradizionalmente, è sempre stata divisa in statistica e strutturale (Haralick, 1979). La prima è una variazione quasi casuale dei valori di riflettanza vicini,



Caratteristiche della unità di riferimento	F(i)	f(x,y,z)
<b>pixel</b>	valori di riflettanza da bande, date e sensori differenti	posizione
<b>poligoni o segmenti</b>	tessitura = variabilità statistica dei valori di tonalità	geometria = dimensioni e forma, compattezza, direzione
<b>gruppi di segmenti</b>	contesto = analisi della classificazione dei segmenti confinanti	pattern = strutture geometriche, frammentazione anche granulare, direzionalità

Tabella 6.7 - Caratteristiche delle immagini digitali (Parmes, 1996). I caratteri in colonna F(i) quantificano la variabilità dei valori di riflettanza. I caratteri in colonna f(x,y,z) sono invece basati su posizione e strutture geometriche degli oggetti.

Indicatori direttamente misurabili dalle immagini o da dati ausiliari		Indicatori di biodiversità forestale, attualmente usati nei rapporti internazionali e generalmente derivati da dati di campagna
Caratteri delle immagini digitali	Altri dati ausiliari	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- tessitura, secondo Haralick</li> <li>- indici di frammentazione:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>*superfici, contorni, bordi e forma dell'area</li> <li>*densità, dimensioni e variabilità dei biotopi</li> <li>*indici di Shannon e Simpson (compresi gli indici di uniformità)</li> <li>*ricchezza relativa dei biotopi</li> </ul> </li> <li>- organizzazione spaziale di poligoni, segmenti, patches:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>*omogeneità</li> <li>*dominanza</li> <li>*contagio e dispersione</li> <li>*dimensione frattale</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- topografia e sue derivate fisiografiche (in particolare da DEM)</li> <li>- numero di aree naturali protette</li> <li>- biotopi minori quali sorgenti, ruscelli, margini</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- numero di biotopi (per esempio Siti Natura 2000 della Direttiva Habitat: SIC, SIN, SIR, di importanza comunitaria, nazionale e regionale)</li> <li>- rarità dei biotopi</li> <li>- biotopi chiave (per esempio categorie ufficiali dell'Elenco Ufficiale delle Aree Protette nazionali)</li> <li>- numero ed estensione delle foreste antiche (secondo le possibili diverse definizioni WWF, EEA, WCMC)</li> <li>- ammontare delle foreste naturali e seminaturali (questo dato è per esempio uno degli indicatori ufficiali del prossimo rapporto dell'Agenzia Europea dell'Ambiente DOBRIS +3)</li> </ul>

Tabella 6.8 - Indicatori di diversità strutturale nelle analisi spaziali delle immagini digitali.

mentre la seconda quantifica struttura, forma e posizione dei pixel (Picture Element, unità elementare di cui sono costituite le immagini raster) o dei poligoni.

È possibile calcolare le caratteristiche spaziali dei paesaggi forestali dalle immagini grezze (*raw level*), quando i valori dei toni di grigio dei singoli canali dei diversi sensori descrivono la diversità a livello di comunità o ecosistema (almeno a livello di popolamento forestale omogeneo per fisionomia e struttura). In genere in questi casi, dopo le fasi di correzione geometrica e atmosferica che devono rimuovere gli effetti distorsivi e la variabilità delle condizioni di illuminazione, si fa sempre ricorso a una pre-segmentazione dell'immagine in automatico, separando le unità spaziali naturali del paesaggio (zone omogenee) per tonalità. Obiettivo della segmentazione è il riconoscimento e l'estrazione di limiti naturali, per limitare l'artificialità imposta dalla risoluzione spaziale dei sensori. Il grande vantaggio di questa operazione è l'incorporazione del contenuto di informazione spaziale dell'immagine nella successiva fase di classificazione (McCormick *et al.*, op.cit.).

Subito dopo vengono calcolati gli attributi geometrici dei segmenti o delle unità cartografiche riconosciute: forma e dimensione, distribuzione dei poligoni e frequenza dei loro limiti descrivono la diversità del paesaggio, mentre il rapporto esistente tra le dimensioni e la lunghezza dei loro confini ne esprime la complessità.

Nel caso in cui si disponga di immagini di aree conosciute o di buona dotazione di dati ausiliari, o ancora, con dati a migliore risoluzione spaziale e spettrale, si può pensare di utilizzare l'analisi contestuale, ricercando più in dettaglio le origini delle caratteristiche dell'eterogeneità spaziale studiandone per esempio la frammentazione, spesso derivata da interventi umani.

Esistono diversi indici di diversità che misurano la quantità di informazione presente, soprattutto per confrontare paesaggi diversi o epoche di un processo evolutivo, che considerano sia la presenza che la variabilità nell'abbondanza delle specie, difficili però da interpretare.

Gli indici derivabili con metodi di telerilevamento, nel confronto con sistemi tradizionali comunemente usati, forniscono migliori risultati integrando dati di campo, o altri dati ausiliari disponibili in forma cartografica su GIS.

La *tabella 6.8* riassume gli attributi misurabili utilizzando le caratteristiche spaziali e tessiturali delle immagini digitali, utili per quantificare il grado di omogeneità o eterogeneità di un paesaggio.

Per lo studio dei paesaggi forestali sono particolarmente utili gli indici di frammentazione. L'indice di Simpson, per esempio, rappresenta la probabilità che ogni tipologia casualmente selezionata sia diversa da un'altra; più alto è il valore dell'indice, maggiore è anche la probabilità che una coppia di poligoni casualmente scelti rappresentino biotopi differenti.

Nell'ecologia del paesaggio, la struttura è stata definita come distribuzione di energia, di materiali e di specie, in funzione del numero, della forma, della dimensione, del genere e della configurazione degli elementi del paesaggio (o ecosistemi, Forman *et al.*, 1986). Gli attributi relativi alla misurazione dell'organizzazione spaziale dei poligoni assumono così sempre più valore nella misura della diversità, e inoltre dell'evoluzione fisionomico-strutturale dei popolamenti forestali. Le misure di diversità strutturale possono risultare utili nello studio ecologico di un'area: alcuni habitat, tipicamente rappresentati da forme specifiche, sono frequentemente associati a specie particolari; l'abbondanza relativa di fauna e flora negli ecotoni è strettamente connessa al grado di frammentazione; le interazioni tra comunità e

cenosi forestali dipendono largamente dal loro livello di connettività e compenetrazione, e questo vale ancora di più per lo studio dei corridoi biotici nelle aree a forte presenza antropica.

La dominanza è il complemento dell'uniformità e, misurando l'estensione e la prevalenza di una o poche tipologie, può indicare il grado con il quale specie dipendenti da specifici habitat possono pervadere il paesaggio, oltre a riflettere direttamente la diversità delle classi di copertura.

Il contagio quantifica la frammentazione attraverso il grado di aggregazione e agglutinazione delle unità cartografiche, ed è un metodo di stima per specie che necessitano di aree omogenee di un particolare tipo di foresta o struttura forestale per mantenersi stabili (per esempio nelle intense dinamiche vegetazionali legate all'ecologia del fuoco tra gli ecosistemi mediterranei, o nella ricerca di corridoi ecologici, o di modelli interpretativi a isole).

Ancora, la dimensione frattale, descrive la complessità delle forme, e, usando calcoli di rapporto area-perimetro fornisce misure dirette di complessità dell'organizzazione spaziale; è un indicatore adatto alle specie che abitano i margini o habitat multipli, nonché alla scelta di specie indici di aree omogenee vaste e contigue.

Nel contesto degli studi sulla diversità a livello regionale e globale, dove massima è la potenzialità dei dati telerilevati, è in ogni modo conveniente puntare all'integrazione dei sistemi e dei dati tradizionali a disposizione, con quelli che fanno uso del telerilevamento: si pensi alle potenzialità di analisi e derivazione di indicatori quantitativi, applicando questi metodi alla caratterizzazione e al monitoraggio nel tempo di basi di dati quali quelle della rete Natura 2000 o del sistema delle aree naturali protette nazionali e regionali (Corona *et al.*, 1997).

#### 6.4.5 Telerilevamento e tendenze evolutive

Si è visto come l'ecologia del paesaggio comprenda gli studi di architettura del paesaggio (*spatial pattern*), delle interazioni tra poligoni diversi in un dato mosaico, e si è accennato allo studio dei cambiamenti, dell'evoluzione nel tempo di queste componenti.

Molte ricerche sono state dedicate alla gestione del paesaggio per scopi multi-risorse, e molti strumenti e tecniche sono stati sviluppati impiegando la tecnologia GIS (Turner, 1989). Il paesaggio infatti, è composto da una sommatoria di differenti *patches* (letteralmente pezzi, poligoni, elementi) disposti come detto a mosaico (Urban *et al.*, 1987). Negli inventari forestali questi elementi corrispondono ai popolamenti (McGarigal, 1994), a particelle che diventano unità cartografiche, e che è possibile dividere in classi strutturali usando semplici attributi quali la specie prevalente, l'età, la fertilità e altri (Uutera *et al.*, 1995), che vengono presi in considerazione assieme agli attributi geometrici già visti, per il calcolo della diversità strutturale.

Il dominio del telerilevamento e dei GIS riguarda lo studio di questi attributi e la loro integrazione in sistemi multilivello e multitemporali con dati ancillari.

Si è già accennato ai metodi di analisi e alle necessità di segmentazione delle immagini prima della classificazione degli indicatori e dell'integrazione con altri dati; questa può essere eseguita con algoritmi diversi, ma sempre con lo scopo di dividere in aree omogenee, strati, e unità di compartimentazione il paesaggio in esame attraverso i parametri spaziali e spettrali.

A questo punto può avvenire l'analisi degli indicatori, per esempio secondo lo schema seguente:

Indicatori di biodiversità		
indicatori di tessitura e frammentazione	dati ausiliari: - modelli digitali del terreno - mappe digitali - aree protette - ecc.	verità al suolo disponibile
Analisi ed elaborazioni GIS		
determinazione della biodiversità con: - interpretazione delle immagini telerilevate - integrazione con dati al suolo - utilizzo di altri piani raster e vettoriali		
confronto e analisi di immagini multitemporali e/o confronto con zone diverse		

Il confronto e il rilievo dei cambiamenti in date diverse (*change detection analysis*) assume particolare importanza.

I cambiamenti possono essere ciclici o permanenti: “l'analisi del cambiamento è il processo di identificazione delle differenze di stato di un oggetto o di un fenomeno, osservandolo in differenti momenti” (Singh, 1989). Le variazioni di riflettanza (la parte della radiazione elettromagnetica riflessa dagli elementi in una scena e rilevata dai sensori sui satelliti) sono determinate da cambiamenti delle caratteristiche delle classi di copertura del suolo, più che da variabilità di altri fattori quali le condizioni atmosferiche, l'illuminazione della scena, l'umidità del suolo, le fasi fenologiche; questi fattori vengono infatti ridotti scegliendo immagini adeguate. Gli algoritmi applicati nelle operazioni di *change detection* fanno uso di confronti post-classificazione tramite matrici di contingenza e produzione di mappe derivate le cui legende esprimono la dinamica evolutiva subita da ciascun *pixel* o poligono, anche parziale seguendo diverse procedure e sequenze di operazioni.

Un secondo tipo di analisi riguarda lo studio delle dinamiche nel tempo di fenomeni pervasivi dell'ecosistema (*time series analysis*).

Entrambe possono essere fondate su basi quantitative e/o qualitativa: la differenza sta soprattutto sulla natura dei dati, espressione di differenti grandezze scalari per lo stesso oggetto la prima (immagini digitali multi- e iper-spettrali), e differenze tipologiche come il caso delle classi cartografiche di una carta di copertura vegetale, nel caso di studi qualitativi.

#### 6.4.5.1 Un esempio applicativo (Bottai et al., 1997)

Le potenzialità dei dati telerilevati di diverse fonti per rilevazioni fitosanitarie sulle foreste sono basate sull'uso sinergico di dati, che vengono trattati mediante sistemi informativi geografici (GIS) capaci di integrarli, elaborarli e gestirli in forma organizzata.

Tra i dati utilizzati sono preponderanti quelli telerilevati da aereo e da satellite e di particolare interesse sono quelli prodotti dal sensore iperspettrale aviotrasportato MIVIS (Multispectral Infrared/Visible Imaging Spectrometer) a elevata risoluzione sia spaziale, sia soprattutto spettrale (Bianchi, 1994).

La mappatura del livello di danno alle foreste è effettuabile con metodologie diverse:

- campionamento inventariale in campo secondo le indicazioni del Regolamento UE 94/1091;
- fotointerpretazione di riprese fotografiche aeree effettuate con pellicole all'infrarosso ad alta risoluzione (Kodak SO131);
- trattamento e classificazione di immagini iperspettrali MIVIS riprese da aereo in contemporanea con le fotografie aeree (stesso volo); altezza di volo variabile tra 2500 m e 3000 m di quota con dimensioni dei *pixel* di circa 3 metri;
- trattamento e classificazione di immagini LANDSAT/TM.

I dati rilevati con le diverse tecniche devono essere organizzati in un Sistema Informativo Territoriale – in questo caso definito Sistema Informativo Forestale – da cui si possono realizzare:

- carte di uso del suolo e per la componente forestale la carta dei tipi strutturali e vegetazionali;
- carte del livello di deperimento del bosco.

*Area d'indagine.* L'Altopiano del Cansiglio; con forti caratteri di carsismo, l'area è caratterizzata da rilievi che superano i 1500 m s.l.m. Di proprietà del demanio regionale del Veneto, l'area è ben assestata e caratterizzata da cenosi forestali di particolare interesse; i consorzi vegetali più rappresentati sono: la faggeta montana, la faggeta subalpina, l'abeti-fageto montano, l'abeteto montano, l'abeti-pecceta, la pecceta montana, la pecceta delle doline.

*Elaborazioni.* L'affidabilità dell'utilizzo dei dati iperspettrali da aereo per la discriminazione delle principali caratteristiche delle formazioni vegetali (composizione specifica, stato fitosanitario, stadio di sviluppo ecc.) consente di operare a scale e rilevare dettagli non possibili da immagini da satellite attualmente disponibili a media bassa risoluzione geometrica e/o spettrale. Selezionando alcune tra le prime 28 bande (spettrometri del visibile e dell'infrarosso vicino) e le ultime 10 bande (spettrometro dell'infrarosso termico) si possono eseguire interpretazioni visive o assistite al calcolatore. Dalle immagini multispettrali si individuano le firme spettrali di conifere e latifoglie e delle piante con diverso grado di defogliazione o clorosi delle chiome. Questa operazione risulta particolarmente problematica con i sensori satellitari, che presentano risoluzioni spaziali non idonee (a partire, in bianco e nero, da 100 m<sup>2</sup>) per valutare le singole chiome (la chioma di una pianta matura in bosco può raggiungere mediamente 20-30 m<sup>2</sup>). Inoltre con gli spettrometri satellitari anche la risoluzione spettrale risulta molto limitata (max 6 bande in confronto alle 102 del MIVIS).

Viceversa con le immagini MIVIS l'operazione è più agevole. Utilizzando le immagini aeree all'infrarosso si valuta lo stato fitosanitario delle singole chiome e si confrontano con visualizzazioni in falso colore (RGB 18,13,7) o a colori reali (13,7,4), dove i numeri sono le corrispondenti bande del MIVIS, e si individuano a video i *pixel* corrispondenti a piante di specie diverse e con chiome di diverso livello di clorosi o defogliazione. Si riesce in questo modo a definire con grande accuratezza la firma spettrale di conifere e latifoglie e di piante con diverso livello di danno.

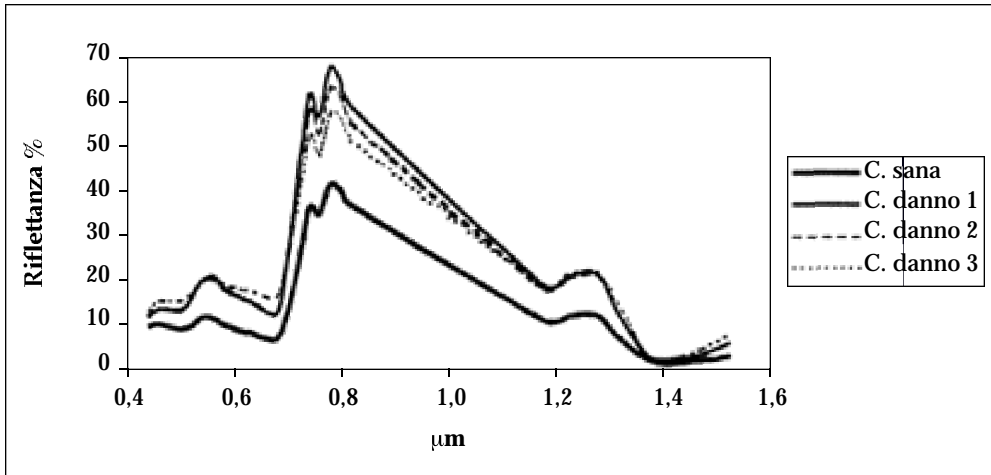


Figura 6.9 - Firme spettrali delle conifere.

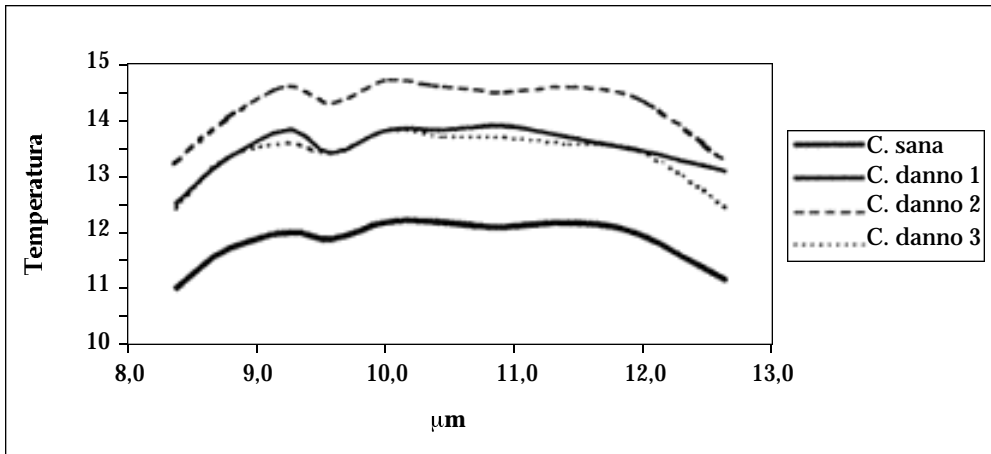


Figura 6.10 - Risposta termica per le conifere.

Si procede poi alla fase di classificazione delle immagini utilizzando una metodologia mista con controlli al suolo (*supervised*) e senza controlli (*unsupervised*) (Gomasca, 1997).

Il risultato della classificazione deve poi essere confrontato con foto-aree Infrarosso-Falso Colore (IR-FC) e con le carte forestali disponibili con varie tecniche tra cui la selezione di aree di controllo e analisi della precisione, tramite il confronto tra i *pixel* classificati e aree campione di verità al suolo in una matrice di confusione per stimare gli errori di omissione e di commissione.

Le carte forestali e dei livelli di danno delle foreste ottenute dalla classificazione vengono poi confrontate con le carte omologhe ottenute per fotointerpretazione delle ri-

prese aeree all'infrarosso e con i risultati dell'inventario dei danni alla foresta effettuati a terra.

La spazializzazione dei diversi livelli informativi disponibili conduce alla redazione della carta forestale e della carta dei danni finale.

La puntuale descrizione dei principi del telerilevamento, delle piattaforme di ripresa da satellite e da aereo e dei sensori da essi trasportati, delle tecniche di elaborazione e visualizzazione delle immagini, e dei Sistemi Informativi Geografici è rimandata al volume: *Introduzione a Telerilevamento e GIS per la Gestione delle Risorse Agricole e Ambientali* (Gomasca, 1997), Edizioni AIT, Firenze.

## Bibliografia

- Bianchi, R. e Marino, C.M.** 1994. MIVIS-MIDAS: sistema di acquisizione dati iperspettrali da piattaforma aerea per il telerilevamento delle risorse ambientali, CNR - Progetto LARA - Pomezia (Roma).
- Corona, P. e Ferrara, A.** 1993. Analisi della configurazione spaziale in soprassuoli forestali. Atti seminario UNIF-ENEA-AISF-ISAF, Brasmine, 329-340.
- Corona, P. e La Marca, O.** 1993. Elementi di metodo per valutazioni tecniche nel settore ambientale. *Genio Rurale*, 12, 45-54.
- Corona, P. e Marchetti, M.** 1997. Riflessioni su monitoraggio e conservazione della natura in Italia. *Italia Forestale e Montana, Attualità e Cultura*, 1, 55-59.
- De Jong, S. M. e Burrough, P. A.** 1995. A fractal approach to the classification of mediterranean vegetation in remotely sensed images. *PE&RS*, 61,(8), 1041-1053.
- Ferrara, A.** 1991. Gli inventari forestali a livello regionale: l'esperienza della SAF. *Mondoperaio*, 44 (4), 23-25.
- Forman, R. T. T. e Godron, M.** 1986. *Landscape Ecology*. John Wiley & Sons, New York.
- Franklin, J. F.** 1993. *The fundamentals of ecosystem management with applications in the Pacific Northwest. Defining sustainable forestry*. Island press. Washington DC, 1996.
- Global Biodiversity Assessment, **Heywood, V. H.** (ed.) 1995. UNEP. Cambridge University Press.
- Global Biodiversity Strategy** 1992. Guidelines for actions to save, study and use earth's biotic wealth sustainably and equitably. World Resources Institute, The World Conservation Union, UNEP.
- Gomasca, M. A.** 1997. *Introduzione a telerilevamento e GIS per la Gestione delle Risorse Agricole e Ambientali*. Edizioni DIT - Firenze, 250.
- Hame, T., Salli, A., Andersson, K., Lohi, A. e Rauste, Y.** 1994. Estimation of biomass and other characteristics of Boreal forest over extensive area using NOAA-AVHRR data. Proceedings of the EUROPTO, Roma, 26-30 settembre.
- Haralick, R. M.** 1979. Statistical and structural approach to texture. *Proceed. IEEE*, 67(5), 786-804.
- IUFRO XX World Congress** 1995. *Caring for the forest: research in a changing world*. Proceedings, 6-12 August 1995, Tampere, Finland. Vol. II, Gummerus Printing.
- Kennel, M.** 1996. Biodiversity: a diversity in definition. Proceedings of Assessment of biodiversity for improved forest planning, ottobre 1996, Kluwer Academy Press, in stampa.
- Kohl, M. e Paivinen, R.** (eds.) 1996. *FIRS - Definition of a system of nomenclature for mapping european forest and for compiling a pan-*

European forest information system. SAI-JRC, WSL-FNP, EFI. EUR 16416, Luxembourg, 1996, 1-238.

**La Marca, O.** 1993. Sui criteri per la perimetrazione di aree protette in Italia. Convegno: Il Parco Nazionale del Gargano, Monte S. Angelo (FG), 21-23 maggio.

**La Marca, O., Marziliano, P., Moretti, N. e Pignatti, G.** 1996. Dinamica strutturale e floristica in un ceduo di leccio. *Ann. Acc. Ital. Scienze Forestali*, 44, 236-256.

**Mc Cormick, N. e Folving, S.** 1996. Monitoring European forest biodiversity at regional scale using satellite remote sensing. Proceedings of Assessment of biodiversity for improved forest planning, ottobre, Kluwer Academy Press, in press.

**McGarigal, K.** 1994. Spatial Pattern Analysis Program for Quantifying Landscape Structure. Forest Science Dept. Oregon State University.

**Marchetti, M., Campaiola, F., Lozupone, G. e Tosi, V.** 1996. Clearings and margins survey in forest inventory for diversity assessment in Liguria region. Proceedings of Assessment of biodiversity for improved forest planning, ottobre 1996, Kluwer Academy Press, in press.

**Ministère de l'Agriculture et de la Pêche - Direction de l'Espace Rural et de la Forêt** 1995. Les indicateurs de gestion durable des forêts françaises, aprile 1995.

**Olsen, E. R., Ramsey, R. D. e Winn, D. S.** 1993. A modified fractal dimension as a measure of landscape diversity. *PE&RS*, 59, (10), 1517-1520.

**Parnes, E.** 1996. Landscape analysis from satel-

lite imagery. In: **Bachmann, P., Kuusela, K. e Uuttera, J.** (eds). Assessment of biodiversity for improved forest management. EFI, Joensuu, Finland.

**Parviainen, J.** 1996. Information needs. Proceedings of Assessment of biodiversity for improved forest planning, ottobre 1996, Kluwer Academy Press, in press.

**Peet, R. K.** 1974. The measurements of species diversity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 5, 285-307.

**Podolsky, R.** 1994. A method for estimating biodiversity directly from digital earth imagery. *Earth Observation Magazine*, June.

**Ricotta, C., Ramsey, D., Falconer, A. e Marchetti, M.** 1996. A fractal approach for the characterization of NOAA-AVHRR NDVI profiles for broad scale ecoregions. Proceedings of Assessment of biodiversity for improved forest planning, ottobre 1996, Kluwer Academy Press, in press.

**Turner, M. G.** 1989. Landscape Ecology: the effect of pattern on process. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 20, 171-197.

**Urban, D. L. O'Neill, R. V. e Shugart, H. H. Jr.** 1987. Landscape Ecology: a hierarchical perspective can help scientist understand spatial pattern. *BioScience*, 37, 119-127.

**Uuttera, J., Maltamo, M. e Kuusela, K.** 1995. An approach to a method for monitoring habitat diversity in boreal coniferous forests. EFI, manuscript.

**Walsh, S. J., Cooper, J. W., Essen, I. E. e Gallagher, K. R.** 1990. Image enhancement of Landsat TM and GIS data integration for evaluation of resources characteristics. *PE&RS*, 56, 1135-1141.



# Sintesi delle attività del progetto



*Parte prima*

---

**Effetto dell'inquinamento  
sui sistemi agro-forestali:  
tecniche biologiche  
di monitoraggio e recupero**

## Obiettivo e impostazione del progetto

Il progetto si poneva come obiettivo principale l'esame degli effetti dell'inquinamento dell'aria e dei suoli su alcuni tra i più diffusi sistemi agricoli e forestali della Lombardia, allo scopo di mettere a punto tecniche per il monitoraggio e la valutazione di tali effetti e per il recupero di ambienti contaminati.

Il progetto venne originariamente impostato secondo 10 linee di ricerca tra loro complementari (condotte da altrettante Unità Operative), avente ciascuna come obiettivo l'approfondimento di un diverso aspetto di monitoraggio e valutazione del danno provocato da agenti inquinanti e la messa a punto di specifiche tecniche per analizzare la situazione o per mitigare e/o recuperare i danni.

Ciascuna linea di ricerca si fondava pertanto su un suo specifico approccio disciplinare secondo le competenze seguenti: biologia forestale, genetica agraria e forestale, patologia vegetale, entomologia agraria e forestale, fisiologia vegetale, biochimica vegetale, ecotossicologia, chimica analitica, fisica e chimica dell'atmosfera, microbiologia del suolo, chimica del suolo. Il progetto si è articolato in due parti: la prima relativa alla formulazione originaria del progetto esecutivo ha riguardato le dieci linee di ricerca delle altrettante Unità Operative e ha prodotto come risultato applicativo la messa a punto e/o la verifica di metodologie di valutazione degli effetti di varie classi di sostanze inquinanti su sistemi biologici vegetali di interesse agricolo e naturale.

La seconda parte del progetto, sviluppata in parallelo alla prima, è stata formulata a progetto già avviato per venire incontro alle esigenze di maggiore trasferibilità dei risultati via via conseguiti a casi concreti di aree territoriali della regione, oggetto di effetti particolarmente negativi da inquinamento.

Le quattro aree scelte furono le seguenti:

1. **Valtellina** (Sondrio) per gli aspetti relativi al deperimento forestale;
2. area del **torrente Arno** (Varese) per gli aspetti relativi ai danni, in sito agrario, derivanti da inquinamento dell'acqua e dei suoli;
3. **Parco del Ticino** (località "La Fagiana", provincia di Milano) per gli aspetti di danno biologico da inquinamento dell'aria in un'area naturale protetta;
4. area circostante l'**ex ferriera "Orsenigo"** a Figino Serenza (Como) per gli aspetti relativi alla bonifica, tramite organismi vegetali, di suoli inquinati da attività minerarie e industriali.

## Risultati conseguiti dalle singole Unità Operative

### **Linea 1**

#### **Valutazione degli ecosistemi forestali sottoposti a condizione di stress ambientale**

*Responsabile:*

Dr. F. Di Girolamo, Azienda Regionale delle Foreste della Lombardia

Gli studi e le ricerche svolte rappresentano il tentativo più significativo attuato in Italia per la comprensione dei rapporti causa/effetto esistenti tra inquinamento dell'ambiente e deperimento degli ecosistemi forestali.

In primo luogo sono stati messi a punto e applicati protocolli metodologici utilizzabili in ogni situazione analoga, ove sia richiesta una campagna di osservazioni sulle condizioni sanitarie di ecosistemi forestali interessati da alterazioni indotte da uno o più fattori di stress.

In secondo luogo le tecniche e la strumentazione utilizzate hanno consentito la parametrizzazione quali-quantitativa di numerose componenti biotiche e abiotiche dell'ecosistema forestale.

I dati rilevati da terra, attraverso le metodologie sopra ricordate, sono stati confrontati con la fotointerpretazione delle immagini aeree, permettendo di mettere a punto un sistema più completo di valutazione del danno anche in aree forestali di difficile accesso.

I dati ottenuti serviranno per confrontare nel tempo l'andamento dei parametri di osservazione in funzione delle variazioni e fluttuazioni dei fattori ambientali fornendo, in tal modo, appropriati indici ecologici per l'inquadramento ambientale dell'area di osservazione permanente.

Queste considerazioni possono essere fatte sia per i dati di ripresa aerea che per i dati rilevati da terra quali le alterazioni della chioma residua (decolorazione, arricciamento fogliare, dimensioni delle foglie) e le alterazioni della ramificazione, della fioritura e della fruttificazione. È interessante rilevare che i dati relativi a questi parametri concordano con quelli inerenti alla trasparenza della chioma.

Successivi approfondimenti di laboratorio, condotti con tecniche di microscopia ottica ed elettronica, hanno evidenziato che le sintomatologie osservate sono molto simili a quelle descritte in letteratura relativamente alle specie forestali e, nei casi studiati sul territorio, abbastanza simili a quelle indotte da fumigazioni da ozono a elevate concentrazioni in ambiente controllato.

## **Linea 2**

### **Valutazione del danno genetico al patrimonio agro-forestale da inquinamento ambientale**

*Responsabile:*

Prof. M. Sari-Gorla, Dipartimento di Genetica, Università di Milano

Sono stati messi a punto dei marcatori molecolari (RAPD) basati sulla tecnica della PCR che consentono di individuare un numero praticamente illimitato di *loci*, coprendo uniformemente l'intero genoma di specie vegetali agricole o forestali fornendo profili di amplificazione caratteristici di ciascun individuo appartenente alla specie. A partire dai marcatori RAPD è stato possibile produrre una classe di marcatori più raffinati, denominati SCAR, che individuano *loci* singoli geneticamente definiti. Sono stati utilizzati in tutto 18 marcatori RAPD e 6 SCAR per la stima dei parametri delle popolazioni forestali.

È stata valutata l'efficienza dei marcatori a localizzazione nota e si è potuta costruire una genoteca per la specie forestale più diffusa tra le conifere delle Alpi lombarde (abete rosso).

Si è poi caratterizzata e descritta a livello molecolare, mediante l'uso dei suddetti marcatori, la variabilità genetica entro e tra popolazioni forestali delle aree studiate e

proceduto all'analisi della strutturazione genetica studiando le relazioni tra la struttura genetica delle due popolazioni.

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza un certo grado di differenziamento tra la variabilità e la struttura genetica di due popolazioni forestali, caratterizzate da differente grado di danno biologico probabilmente indotto da inquinamento atmosferico. La pressione selettiva differenziale esercitata dagli agenti inquinanti sulle popolazioni studiate potrebbe pertanto contribuire a spiegare le significative differenze osservate nelle frequenze geniche ad alcuni *loci* e nella struttura genetica delle due popolazioni.

La diversità genetica per la popolazione del sito a minor danno ambientale è maggiore di quella del sito maggiormente danneggiato: ciò è consistente con un effetto di erosione genetica operante in maggior misura nel sito maggiormente esposto allo stress ambientale. In particolare alcune regioni del genoma risultano più differenziate di altre, indicando che in queste regioni siano presenti *loci* coinvolti nella tolleranza agli stress ambientali quali, per esempio, quelli caratteristici dell'inquinamento atmosferico.

### Linea 3

#### Monitoraggio dell'inquinamento atmosferico mediante utilizzo di piante spia

<i>Responsabile:</i>	Prof. G. Belli, Istituto di Patologia Vegetale, Università di Milano
----------------------	--

Gli obiettivi originari dell'Unità Operativa erano i seguenti:

1. individuazione di specie vegetali presenti in aree agricole e forestali della Lombardia con sintomi di sofferenza da inquinamento e definizione della sintomatologia;
2. valutazione della frequenza e della gravità degli effetti dell'inquinamento sulla vegetazione in Lombardia e realizzazione di relative mappe;
3. caratterizzazione di piante spia da utilizzarsi in sistemi coltivati o naturali per l'allestimento di stazioni di monitoraggio biologico dell'inquinamento atmosferico.

Il risultato di maggior rilievo (obiettivo 1) è costituito dalla caratterizzazione di una serie di specie vegetali danneggiate da inquinamento dell'aria e individuate sulla base dei rilevamenti effettuati nel corso dei sopralluoghi in varie aree agro-forestali del territorio lombardo e dei successivi esami diagnostici. Le specie più studiate sono state le seguenti:

*conifere:* abete bianco, abete rosso, larice, pino nero;

*latifoglie:* pioppo, salice, robinia, farnia, platano, ciliegio nero, nocciolo, orniello, ontano nero, olmo, carpino bianco;

*arbustive:* biancospino, sambuco, corniolo, rododendro, mirtillo.

Per quanto riguarda la sintomatologia rilevata sulle conifere si sono riscontrate sostanziali affinità con quanto descritto in precedenti indagini eseguite nella regione Lombardia. I dati acquisiti per le altre specie sono da considerarsi un contributo originale in quanto molto scarse o nulle sono le informazioni relative alle suddette specie esistenti in letteratura.

Nel complesso le informazioni acquisite sono da ritenersi utili per future pratiche diagnostiche nell'ambito della valutazione dello stato dell'ambiente.

Quanto alle piante spia da utilizzarsi per l'allestimento di stazioni di monitoraggio biologico (obiettivo 3), si sono caratterizzate le seguenti specie vegetali indicate dalla letteratura come possibili indicatori di inquinamento atmosferico e in particolare di ozono: noce, nocciolo, grano saraceno, fagiolo, erba medica, pomodoro, pomodoro selvatico, rapanello, lattuga, spinacio.

Con le prove effettuate nel corso del primo anno di lavoro si è potuto verificare la non soddisfacente risposta di: noce, grano saraceno, lattuga e spinacio. Per quanto riguarda l'erba medica si sono individuate due *cultivar* (Boreal e La rocca) che sono risultate molto utili sia per la chiarezza nella manifestazione dei sintomi che per le buone caratteristiche vegetative delle piante.

Nel secondo anno della ricerca (utilizzando la metodica delle Open Top Chambers messe a disposizione dal laboratorio di Ecologia Terrestre dell'ENEL-CRAM) si è saggiata la sensibilità delle sei specie vegetali ritenute migliori, dopo lo *screening* del primo anno, verso l'ozono che rappresenta, nell'ambiente extraurbano lombardo, l'inquinante più pericoloso nella stagione estiva (tipica del massimo sviluppo vegetativo delle piante). È apparsa evidente l'efficacia, per sensibilità e prontezza di risposta, come sistema di biomonitoraggio del pomodoro selvatico, specie praticamente ignorata dalla letteratura scientifica corrente.

Si segnalano inoltre come particolarmente interessanti le due *cultivar* prima ricordate di erba medica che in precedenza non erano mai state utilizzate come piante-spia per l'ozono.

Risulta infine confermata l'utilità del fagiolo *cv.* Nerina e del pomodoro *cv.* Roma già saggiate in precedenza da altri autori.

#### **Linea 4**

#### **Studio delle possibilità offerte da alcuni insetti per valutare effetti di inquinamento su ecosistemi naturali e agro-forestali**

*Responsabile:*

Prof. L. Süss, Istituto di Entomologia Agraria, Università di Milano

Gli obiettivi della ricerca si sono articolati su tre linee:

1. valutazione degli effetti di inquinanti sullo sviluppo di lepidotteri "non bersaglio";
2. interferenza dei trattamenti antiparassitari sull'artropodofauna di meleti;
3. valutazione degli imenotteri apoidei (ape domestica e bombi) come indicatori dello stato ambientale.

#### *Risultati*

##### **Obiettivo n.1**

È stata studiata l'azione di fungicidi triazolici (Propiconazolo, Penconazolo, Myclobutanil e Bitertanolo) nei confronti di alcuni insetti-test (ortotteri, lepidotteri, coleotteri). Benché questi fungicidi utilizzati per le prove abbiano dimostrato in generale una ridotta tossicità acuta nei confronti degli insetti-test prescelti, le prove effettuate hanno evidenziato possibili effetti "mediati" di tali composti, in particolare sul baco da seta che, per la sua sensibilità, è stato proposto quale "bioindicatore" da numerosi Autori.

**Obiettivo n. 2**

Scopo di questa ricerca è stato quella di evidenziare l'entomofauna derivata e susistente in alcuni meleti a seguito di trattamenti antiparassitari; località interessata da tale lavoro è stato il conoide di Ponte in Valtellina. Gli antiparassitari studiati sono stati: Nomolt, Dodina, Orthene, Confidor, Tumar, Mimic, Pivot. Il raffronto tra il potere abbattente di DDVP (Dichlorvos) e quello di altri insetticidi, alcuni dei quali sperimentali, impiegati nei meleti di Ponte in Valtellina ha permesso di evidenziare una bassa selettività nei confronti dell'artropodofauna utile da parte dei seguenti prodotti: Dodina, Orthene, Tumar e Pivot. Migliore, invece, il rispetto dei medesimi organismi ausiliari dimostrato da Nomolt; molto selettivi, infine, si sono rivelati Confidor e Mimic.

**Obiettivo n. 3**

Il raffronto fra l'andamento delle concentrazioni di alcuni metalli pesanti nei pollini raccolti nel 1994 in due località valtellinesi, l'una posta in un contesto poco inquinato (Gualtieri-Valmalenco), l'altra in zona a maggiore impatto antropico (Ponte in Valtellina) e la fenologia delle fioriture delle essenze botaniche bottinate nelle stesse località dalle api non ha posto in evidenza differenze significative tra le due aree.

Taluni metalli pesanti, infatti, hanno mostrato concentrazioni nei pollini costanti ed uguali nelle due zone nel corso della stagione vegetativa, mentre zinco e rame hanno rivelato fluttuazioni, per altro non chiaramente correlabili a precisi fattori ambientali.

**Linea 5**

**Uso di sistemi biologici per il controllo dell'inquinamento dei suoli e fitosalubrità**

<i>Responsabile:</i>	Prof. M. Cocucci, DIFCA, Sezione di Fisiologia Vegetale, Università di Milano
----------------------	---

Si sono presi in esame alcuni ambiti rappresentativi di situazioni di degrado ambientale conducendo su di essi uno studio geobotanico differenziale della vegetazione, allo scopo di individuare comunità e specie sensibili e resistenti a vari inquinanti. Su tali specie e su altre specie di interesse agrario è stato indirizzato il lavoro di individuazione di parametri biochimici e fisiologici utilizzabili come indicatori indiretti della presenza di inquinanti non facilmente identificabili (anche per ragioni economiche). Infine è stato condotto uno studio delle risposte della pianta alla presenza di inquinanti (in particolare cadmio) nel tentativo di individuare nuovi parametri utili allo scopo.

I siti scelti per l'individuazione di piante spia sono stati i seguenti:  
*torrente Arno* (area interessata dalle esondazioni del torrente Arno compresa principalmente nei territori comunali di Lonate Pozzolo-Varese e Castano Primo-Milano);  
*ferriera Orsenigo* (Figino Serenza-Como): area caratterizzata da ingenti quantitativi di residui di scorie di lavorazione dell'acciaio;  
*miniere* (giacimento di galena argentifera di Valvassera in Valganna-Varese, la miniera di piombo di Val Calolden-Lecco, le miniere di Parre e del monte Arera comprese nel distretto metallifero di Gorno, rispettivamente in Val Seriana e in Val Serina-Bergamo).

Lo studio geobotanico differenziale di ambienti inquinati e salubri ha permesso l'individuazione di alcune piante spia (per esempio *Prunus serotina*, *Silene vulgaris*) potenzial-



mente utilizzabili per il monitoraggio di aree contaminate. In particolare è stato possibile individuare due popolazioni di *Silene vulgaris* con differente sensibilità al cadmio che hanno mostrato diversa capacità di crescita su terreno inquinato da metalli pesanti.

Tra i parametri biochimici e fisiologici utilizzabili come indicatori della presenza di inquinanti non facilmente identificabili tramite misura diretta è risultato particolarmente interessante quello relativo alla variazione dei livelli dei tioli acido solubili, molecole legate ai meccanismi di detossificazione delle piante verso agenti xenobiotici. Tale parametro sembra più sensibile rispetto a quelli normalmente utilizzati nei test di fitotossicità e può rappresentare un indicatore generalizzato della sofferenza della pianta in presenza di diversi fattori inquinanti.

### **Linea 6**

#### **Impatto dell'inquinamento agro-forestale sulla riproduzione e sviluppo di organismi animali**

*Responsabile:*

Prof. M. Camatini, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università di Milano

I protocolli di biomonitoraggio ambientale proposti nell'originario progetto esecutivo hanno mostrato buona applicabilità, facile esecuzione e una approfondita indagine dell'effetto tossico, teratogeno, cancerogeno di molti composti su sistemi animali.

#### *FETAX*

In accordo con quanto proposto il test di teratogenesi FETAX (che utilizza l'anfibio anuro *Xenopus laevis*) si è rivelato un facile e veloce test applicabile all'analisi non solo di singoli composti tossici, ma anche di miscele complesse quali quelle testate in questi anni in sistemi acquatici naturali o di acque reflue. Il protocollo sperimentale è stato modificato nel corso della ricerca ottenendo alcuni importanti vantaggi rispetto all'originario (fecondazione artificiale *in vitro*, migliore selezione delle uova, aumento della durata del test da 96 a 120 ore).

#### *<sup>32</sup>P labeling*

La tecnica di individuazione degli addotti al DNA mediante <sup>32</sup>P labeling è stata applicata a studi *in vitro* e *in vivo* nel campo della cancerogenesi sperimentale e nel monitoraggio biologico in seguito a esposizione a xenobiotici. Il metodo, rivelatosi altamente sensibile, ha una grossa potenzialità di applicazione sulla popolazione umana e non. In questo test il <sup>32</sup>P viene incorporato nel DNA dopo esposizione ad agenti chimici e ciò permette di tenere in conto le possibili attivazioni metaboliche che possono verificarsi nell'organismo e la maggiore vulnerabilità del DNA nella fase replicativa. Il test permette quindi di identificare potenziali carcinogeni nell'ambiente e di stimarne il rischio.

#### *Artemia salina*

L'analisi comparativa dei test effettuati conferma una buona sensibilità dell'organismo a composti tossici. In considerazione della sensibilità dimostrata, della semplicità di realizzazione e della rapidità di risposta il test è da preferirsi al test respi-

rometrico. Con questo test è possibile individuare la presenza di sostanze tossiche a livelli che, solo per esposizione prolungata, risultano tossici anche su altre specie animali. Il test è particolarmente sensibile per sostanze insetticide ad attività anti-colinesterasica.

#### *Eisenia foetida*

Si è concluso che questo semplice test sul lombricide è abbastanza sensibile da poter predire effetti tossici sulle altre popolazioni animali presenti nell'ambiente terrestre.

### **Linea 7**

#### **Inquinanti organici e sistemi vegetali: una caratterizzazione mediante spettrometria di massa**

<i>Responsabile:</i>	Dr. R. Bagnati, Istituto "Mario Negri", Milano
----------------------	--

Obiettivo di questa linea di ricerca era l'analisi di alcuni microinquinanti organici in sistemi vegetali e in campioni di aria e precipitazioni atmosferiche delle stesse zone al fine di valutare situazioni locali di inquinamento ambientale.

I siti scelti per le misure sono stati individuati, in accordo con le altre unità operative del progetto, in due aree della Valtellina caratterizzate da una diversa situazione fitosanitaria della vegetazione.

Gli inquinanti ricercati appartenevano alle due classi degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e dei nitrofenoli (NF).

La presenza degli IPA in aree montane e rurali è dovuta principalmente al trasporto, da aree urbane o industriali, attraverso l'atmosfera o le precipitazioni. I nitrofenoli sono stati indicati da alcuni autori, a causa della loro fitotossicità, come possibili responsabili, o corresponsabili, dei danni forestali di nuovo tipo.

In questa linea di ricerca sono stati presi in considerazione per l'analisi 15 IPA e 6 nitrofenoli raccomandati dalla Environmental Protection Agency degli USA. Tali inquinanti sono stati analizzati in campioni di aghi di abete rosso e foglie di faggio oltreché in campioni di aria (particolato e fase gassosa) e acqua piovana delle due differenti località.

I dati ottenuti nei due siti montani considerati non hanno dimostrato un diverso flusso di IPA e nitrofenoli attraverso la misura diretta di tali composti nell'aria e nelle precipitazioni.

Nei campioni vegetali raccolti nel corso delle due campagne di campionamento, non sono state trovate differenze significative tra i due siti nei livelli di IPA; tuttavia i livelli medi di nitrofenoli erano più alti (circa il doppio) nel sito che presentava il maggior danno forestale.

Quest'ultimo risultato si può interpretare in due modi diversi: la presenza di fattori ambientali (per esempio una maggiore situazione di inquinamento locale) che influenzano le reazioni di formazione a partire dai precursori oppure uno stato di sofferenza della vegetazione già presente per altri motivi che influenzano in modo negativo la velocità di degradazione di questi composti all'interno dei tessuti vegetali.

**Linea 8****Recupero di terreni con caratteristiche di tossicità per inquinamento organico e inorganico***Responsabile:*

Prof. G. Zocchi, DIFCA, Sezione di Biochimica Agraria, Università di Milano

Le attuali tecniche utilizzate per il trattamento di suoli inquinati da composti inorganici e metalli pesanti, per altro costose, prevedono l'asporto del terreno e il suo confinamento in apposite discariche oppure l'uso di processi chimici di immobilizzazione dei metalli, seguiti da interventi alla superficie del suolo per eliminare la penetrazione dell'acqua o il trattamento del terreno con soluzioni in grado di desorbire e lisciviare i metalli.

La possibilità di utilizzare in suoli contaminati da ingenti quantità di metalli pesanti piante in grado di accumulare tali elementi al loro interno permetterebbe di sviluppare metodi alternativi di bonifica e di ridurre notevolmente i costi di recupero.

In questa linea di ricerca si sono approfonditi i meccanismi mediante i quali alcuni organismi vegetali riescono ad accumulare grandi quantità di metalli al proprio interno senza manifestare sintomi di tossicità.

Una delle risposte metaboliche delle piante alla presenza di metalli è l'induzione della sintesi di peptidi denominati fitochelatine. Tali molecole sarebbero in grado di sequestrare i metalli pesanti riducendone l'azione tossica all'interno della cellula.

Si è scelto come sito fortemente inquinato da metalli pesanti l'area dismessa dell'ex ferriera Orsenigo a Figino Serenza in provincia di Como. Lo *screening* effettuato sulle piante spontaneamente cresciute in quest'area ha permesso di identificare alcune specie vegetali non solo resistenti ma anche in grado di accumulare questi elementi. Due specie in particolare, l'*Artemisia vulgaris* e la *Solidago gigantea*, si sono dimostrate efficienti nell'assorbimento e traslocazione dei metalli pesanti contenuti nel suolo di quest'area.

Tali piante, tipiche peraltro dei nostri climi, potrebbero essere utilizzate per la bonifica di terreni caratterizzati da elevate concentrazioni di questi inquinanti.

Anche il cetriolo e il frumento, cresciuti in presenza di cadmio, sono indotti ad accumulare notevoli quantità di questo elemento nella parte aerea della pianta.

Si è altresì osservato che l'utilizzo di condizioni culturali capaci di modificare le caratteristiche chimico-fisiche del terreno (pH, stato redox, CSC) potrebbe indurre un aumento nella capacità di assorbimento di alcuni metalli pesanti da parte di piante appositamente coltivate nell'area da bonificare. Per esempio la carenza di ferro sembra stimolare nel cetriolo l'assorbimento di cadmio da parte delle radici.

Il lavoro svolto in questi due anni ha permesso di raccogliere dati interessanti sulla possibilità di utilizzo delle piante quali mezzi per la bonifica di terreni inquinati. Ulteriori studi dovrebbero essere indirizzati verso l'identificazione e la caratterizzazione delle molecole sintetizzate dalle cellule vegetali in risposta ad alte concentrazioni di metalli e verso l'analisi dei meccanismi di trasporto dei metalli all'interno degli organi della pianta.

**Linea 9****Valutazione del rischio ecotossicologico della biodegradazione di molecole xenobiotiche di origine industriale in funzione del disinquinamento ambientale**

*Responsabile:* Prof. A. Ferrari, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università di Milano

Le ricerche effettuate hanno riguardato composti inquinanti organici di sintesi diffusamente presenti nella realtà lombarda e nei suoli padani in particolare.

Ci si è dapprima interessati dell'erbicida bensulfuron-metile (il principio attivo del prodotto commerciale Londax) appartenente alle solfonil-uree, importante classe di erbicidi di recente introduzione nell'impiego agricolo. La presenza di questi erbicidi è stata tra l'altro monitorata nei canali della foce del Po e dal PMIP di Ferrara, che ha rilevato punte stagionali di presenza.

Nonostante le solfoniluree siano in uso da 15 anni, pochi sono i dati disponibili in letteratura sui meccanismi della loro degradazione microbica.

L'altra classe di inquinanti che è stata considerata è quella dei clorofenoli; essi sono ampiamente utilizzati dall'industria e dall'agricoltura come solventi, agenti disinfettanti e antiparassitari. Il loro impiego crescente nel corso degli anni ha determinato preoccupanti livelli di inquinamento del suolo, rappresentando un pericolo per la salute dell'uomo e, in generale, per l'equilibrio dell'intero ecosistema.

Con interventi mirati di *bioremediation* è possibile contribuire al disinquinamento di aree contaminate da clorofenoli mediante l'uso di microrganismi opportunamente selezionati per le loro capacità degradative nei confronti di tali composti.

Dall'insieme dei risultati ottenuti nel caso del bensulfuron-metile, si può concludere che la constatata biodegradazione microbica può essere considerata un dato positivo, rappresentando uno dei fattori che contribuiscono alla breve persistenza del prodotto non solo nei suoli ma anche nelle acque, come starebbe a indicare il recente interesse mostrato dal magistrato del Po.

Quanto ai clorofenoli, i risultati ottenuti mostrano la degradabilità del 2,4,6-TCF nelle condizioni sperimentali impiegate sia nelle prove in *batch* sia in quelle condotte con i microcosmi da laboratorio. Benché la microflora autoctona nel suolo analizzato sia capace di degradare il 2,4,6-TCF addizionato, il processo degradativo viene accelerato in presenza del microrganismo *Pseudomonas testosteroni*.

**Linea 10****Stima della presenza delle sostanze xenobiotiche nei fanghi attraverso test di fitotossicità e saggi sul suolo**

*Responsabile:* Prof. P. L. Genevini, DIFCA, Sezione di Chimica del Suolo, Università di Milano

L'impiego agricolo di biomasse di scarto (fanghi di depurazione, compost) mostra innegabili vantaggi sia in termini di smaltimento che di utilizzo diminuendo da un lato i costi di inattivazione e dall'altro quelli di fertilizzazione.

Dal punto di vista ecotossicologico, tuttavia, i fanghi provenienti dalla depurazione

delle acque reflue si caratterizzano, nell'ambito degli ammendanti organici, per la presenza di sostanze inorganiche e organiche normalmente estranee al sistema suolo-pianta (metalli pesanti e sostanze xenobiotiche), sostanze che ne rendono pertanto problematico e comunque non facile l'impiego.

L'impiego di sistematiche analisi chimiche, al di là dei costi notevoli, non è comunque in grado di fornire sufficienti informazioni circa la tossicità potenziale di queste sostanze tanto a livello degli organismi vegetali che dei consumatori primari e secondari.

L'uso di indicatori ambientali, al contrario, può colmare queste lacune in quanto questi riescono a esprimere sinteticamente la complessa realtà del sistema suolo-pianta e consentono di tenere in considerazione le interazioni tra sostanze tossiche. In questo senso assume carattere fondamentale la conduzione di test biologici con bioindicatori vegetali per un corretto progetto di riutilizzo agronomico dei fanghi di depurazione e di altre matrici organiche di origine civile e agro-industriale.

Sono state pertanto condotte una serie di prove su singoli contaminanti presenti comunemente in queste matrici di scarto al fine di ottenere una valutazione comparativa della sensibilità di diverse specie vegetali nel riconoscere classi di sostanze chimiche diverse.

Tre specie vegetali (lattuga, ravanello e frumento), scelte tra quelle indicate nelle metodiche raccomandate dalle linee guida USEPA e OECD, sono state confrontate per la loro sensibilità alla presenza di metalli pesanti (Zn, Cd e Cu), di cloruro di sodio e di fenoli a diverso grado di clorurazione.

Si è concluso che la lattuga sembrerebbe la specie più adatta a rilevare i potenziali fitotossici di biomasse di scarto, essendo risultata la più sensibile tra quelle sottoposte ai test. I parametri da prendere in considerazione sembrano per ora essere sia il peso secco che fresco della produzione epigea.

Risulta anche di particolare interesse il test di allungamento radicale con frumento, rivelatosi di breve durata (5 giorni), di facile conduzione e di sensibilità superiore rispetto agli altri test condotti con la stessa specie.

### **Metodologie sperimentali di monitoraggio ambientale messe a punto e verificate dal progetto**

#### **Metodologie fisico-chimiche per il monitoraggio di inquinanti dell'aria in ambiente rurale**

- misura in continuo di inquinanti inorganici dell'aria;
- misure di ozono mediante campionatori passivi;
- misura di inquinanti inorganici in particolato atmosferico (deposizioni secche);
- misura di inquinanti inorganici nella nebbia e nubi (deposizioni occulte);
- metodologie per la raccolta e misura di inquinanti inorganici nelle deposizioni atmosferiche (deposizioni umide);
- metodologia per il campionamento attivo dell'aria e analisi degli idrocarburi policiclici aromatici e dei nitrofenoli;
- analisi degli idrocarburi policiclici aromatici e dei nitrofenoli in precipitazioni atmosferiche (deposizioni umide);
- metodologia per la raccolta delle deposizioni umide e delle precipitazioni nevose in pieno campo e sotto chioma in ambito forestale.

### **Metodologie di biomonitoraggio dell'inquinamento ambientale in aree rurali**

Valutazione dello stato ambientale mediante bioindicatori (analisi geobotanica e impiego di licheni):

- utilizzo di piante spia per la valutazione di inquinanti atmosferici;
- test di tossicità acuta e cronica mediante insetti indicatori (Lepidotteri);
- valutazione dello stato ambientale mediante Imenotteri apoidei;
- utilizzo di piante spia per l'identificazione dell'inquinamento del suolo;
- analisi dei tioli nelle piante per la valutazione dell'inquinamento del suolo;
- metodi di identificazione di piante accumulatrici di metalli pesanti;
- analisi delle fitochelatine come indice di inquinamento da metalli pesanti.

### **Metodologie chimiche per la misura di nutrienti e inquinanti in materiale biologico**

- Analisi dei nutrienti e metalli pesanti in foglie.
- Analisi del bioaccumulo e dello stato nutrizionale delle piante.
- Analisi degli idrocarburi policiclici aromatici in foglie e aghi.
- Analisi di nitrofenoli in foglie.

### **Metodologie biochimiche per la valutazione della risposta delle piante a inquinanti dell'aria**

- Dosaggio dell'attività dell'enzima ascorbico perossidasi.
- Dosaggio dell'attività dell'enzima superossido dismutasi.
- Dosaggio dell'attività dell'enzima glutatione reduttasi.
- Dosaggio delle concentrazioni di acido ascorbico e acido deidro ascorbico.

### **Misure biologiche dello stato fitosanitario delle foreste**

- Valutazione della trasparenza della chioma delle piante.
- Valutazioni fenologiche del ciclo biologico delle piante.
- Metodologie per l'inventario del fogliame.
- Monitoraggio della copertura vegetale mediante riprese aeree e loro interpretazione.
- Misure delle variazioni dell'accrescimento delle piante.
- Analisi dendrocronologiche.
- Valutazioni fitopatologiche e istochimiche delle alterazioni fogliari.
- Valutazioni mediante microscopia ottica delle alterazioni fogliari.
- Valutazione mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) delle alterazioni fogliari.
- Valutazione mediante microscopia elettronica a scansione (SEM) delle alterazioni fogliari.

### **Misure della variabilità genetica in popolazioni vegetali agricole e forestali**

- Valutazioni del polimorfismo genetico in popolazioni di specie agricole e forestali.
- Valutazione della divergenza genetica di popolazioni di specie agricole forestali.
- Produzioni di sonde genomiche e cDNA di abete rosso.

**Test di tossicità nelle acque mediante specie animali**

- Test di teratogenesi FETAX.
- Analisi mediante tecniche con marcatura <sup>32</sup> P.
- Test di tossicità acuta e cronica su *Artemia salina franciscana*.
- Test di tossicità acuta e cronica su *Daphnia magna*.
- Test di tossicità su *Selenastrum capricornutum*.
- Test di tossicità acuta e cronica su *Eisenia foetida foetida*.
- Test di tossicità su *Coturnix coturnix japonica*.

**Metodologie per l'analisi di suoli e fanghi**

- Metodologia per la raccolta di campioni del suolo.
- Valutazione ecotossicologica del suolo mediante tecniche microbiologiche.
- Valutazione di biodegradabilità di sostanze tossiche.
- Test di fitotossicità su fanghi di depurazione e ammendanti del suolo mediante la valutazione della germinazione.
- Test di fitotossicità su fanghi di depurazione e ammendanti del suolo mediante la valutazione dello stato vegetativo.





*Parte seconda*

---

**Indagini su singoli  
ambiti territoriali**

## Premessa

Le Unità Operative coinvolte nell'originario progetto esecutivo operavano, come è noto, su aspetti diversi non solo per disciplina, ma anche per obiettivo d'indagine. Erano infatti, previste due linee di ricerca, l'una rivolta alla definizione di tecniche innovative per il monitoraggio ambientale, l'altra tendente a ricercare e verificare nuove metodologie per il recupero di suoli inquinati. Inoltre alcune Unità operavano su effetti legati all'inquinamento dell'aria, altre su problemi legati prevalentemente all'inquinamento del suolo.

Il progetto, nella sua impostazione generale, riguardava i sistemi agro-forestali. Era quindi opportuno calare l'esperienza del progetto su aspetti reali e pratici trovando, nel territorio della regione Lombardia, situazioni ambientali su cui potessero essere orientate le competenze scientifiche attivate dal progetto.

La scelta di queste realtà territoriali poteva essere effettuata solo utilizzando aree già in precedenza oggetto di attenzione e di indagine da parte delle Autorità regionali preposte alla tutela dell'ambiente e di enti scientifici a esse collegati in modo da acquisire un inquadramento generale del sito e dell'evoluzione della sua situazione ambientale. Il rapporto tra fattori di inquinamento ed effetti su sistemi ambientali si manifesta, infatti, nel corso di lunghi periodi di tempo e uno studio, per essere efficace, deve tener conto di serie di dati, ancorché parziali, che coprano un arco di tempo significativo.

Le informazioni di base sulle aree territoriali prescelte sono state ottenute dalla Regione Lombardia e dalla Azienda Regionale delle Foreste della Lombardia. In particolare l'Azienda Regionale delle Foreste, coinvolta da qualche anno nelle indagini fitosanitarie del patrimonio forestale lombardo all'interno di iniziative più vaste su scala nazionale e sovranazionale, aveva indicato già dal 1992 alla Fondazione aree del territorio forestale lombardo che presentavano problemi di deperimento legato a cause non ancora note.

La Regione Lombardia, da parte sua, ha invece fornito informazioni sui siti a rischio ambientale del territorio lombardo fornendo in particolare informazioni relative al lavoro di Italimpianti per il Consorzio di Risanamento dei torrenti Arno, Rile e Tenore e quelle relative al piano di bonifica delle aree contaminate della regione Lombardia legate a problemi di inquinamento delle acque e dei suoli raccolte da Lombardia Risorse.

Sulla base di tutte queste considerazioni si è proceduto, pertanto, all'individuazione di quattro diversi siti del territorio lombardo ove applicare le competenze e le esperienze maturate dalle diverse Unità Operative del progetto coinvolgendo e coordinando anche altri gruppi di ricerca non direttamente coinvolti nel progetto della Fondazione ma interessati, per compito istituzionale o per interesse scientifico, a queste nuove indagini.

Le quattro aree prescelte sono state quindi le seguenti:

1. **Valtellina** (Sondrio) per gli aspetti relativi al deperimento forestale;
2. area del **torrente Arno** (Varese) per gli aspetti relativi ai danni, in sito agrario, derivanti da inquinamento dell'acqua e dei suoli;
3. **Parco del Ticino** (località "La Fagiana", provincia di Milano) per gli aspetti di danno biologico da inquinamento dell'aria in un'area naturale protetta;

4. area circostante l'ex ferriera "Orsenigo" a Figino Serenza (Como) per gli aspetti relativi alla bonifica, tramite organismi vegetali, di suoli inquinati da attività minerarie e industriali.

## 1. Sito forestale di montagna (Valtellina, Sondrio)

L'individuazione di un sito forestale di montagna, oggetto di degrado dovuto a cause non note ma probabilmente dipendenti da agenti inquinanti, doveva rispondere ad alcune caratteristiche. Era necessario poter individuare, nell'ambito dell'area, zone a differente grado di danno da monitorare in termini di confronto, in situazioni ambientali differenti solo per pochi aspetti.

La finalità era quella di acquisire un ampio numero di informazioni su una serie, la più completa possibile, di variabili ambientali per poi escludere o confermare l'implicazione dei diversi fattori che potevano contribuire al diverso stato di degrado osservato sia a livello di comunità che di singolo individuo.

L'impostazione del lavoro era indubbiamente ambiziosa, tenuto conto delle forze e soprattutto dei tempi a disposizione. Si era tuttavia convinti che bisognasse impostare un'indagine che non fosse, come quasi sempre era avvenuto nel passato, una semplice "fotografia", per quanto accurata, di una situazione, ma che costituisse una valutazione critica, utilizzando approcci disciplinari e metodologici diversi, di tutti i parametri ambientali in grado di produrre un'azione di danno.

La scelta della zona è caduta sulla Valtellina per una serie di motivazioni:

- la valle, una delle maggiori delle Alpi, costituisce uno dei più interessanti sistemi naturali europei sotto il profilo sia ecologico che idrogeologico;
- l'area risultava essere già stata oggetto di indagini ambientali (nell'ambito dell'attività istituzionale dell'Azienda Regionale delle Foreste) che la indicavano rispondente alle esigenze prima descritte;
- la Valtellina era stata ed è tuttora oggetto di particolare attenzione da parte della Regione Lombardia anche in conseguenza dei recenti dissesti idrogeologici.

La zona si colloca, da un punto di vista morfologico ed ecosistemico, in un contesto sovranazionale tale cioè da offrire la possibilità di utilizzare il lavoro di monitoraggio ambientale per il confronto con indagini di aree limitrofe in corso da parte degli stati esteri confinanti.

Gli aspetti affrontati in termini di competenze sono stati i seguenti:

1. Valutazione dello stato delle foreste	<i>Azienda Regionale delle Foreste della Lombardia</i>
2. Indagini geobotaniche	<i>DIFCA, Sez. Fisiologia delle Piante - UNI MI</i>
3. Aspetti genetici delle popolazioni forestali	<i>Dipartimento di Genetica e Biologia dei Mi - croorganismi - UNI MI</i>
4. Valutazioni fisiologiche e biochimiche delle piante forestali	<i>Dipartimento di Genetica e Biologia dei Mi - croorganismi - UNI MI</i>
5. Andamento e modificazione dell'entomofauna	<i>Istituto di Entomologia Agraria - UNI MI</i>

(segue)

6. Analisi degli inquinanti inorganici dell'atmosfera	Fondazione Lombardia per l'Ambiente
7. Analisi dei microinquinanti organici	Istituto "Mario Negri"
8. Studi di chimica del suolo	DIFCA, Sezione di Chimica del suolo - UNI MI
9. Studi di microbiologia del terreno	Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche - UNI MI
10. Monitoraggio mediante piante spia	Istituto di Patologia Vegetale - UNI MI

Queste Unità Operative sono state affiancate da altri enti ed istituzioni che hanno collaborato gratuitamente alla realizzazione di una rete di collegamenti sulle aree interessate ampliando il numero dei parametri ambientali studiati e permettendo di rendere più completo il lavoro svolto. In particolare vanno ricordati e ringraziati:

- ENEL-CRAM di Milano per il monitoraggio del deperimento forestale con riprese aeree IRFC;
- ERSAL di Milano per la registrazione dei parametri meteo-climatici;
- CNR-IRSA di Brugherio per il monitoraggio delle deposizioni atmosferiche;
- Istituto di Botanica dell'Università di Pavia per le analisi dendrocronologiche;
- Istituto di Fisica Generale e Applicata dell'Università di Milano per la raccolta e l'analisi delle polveri atmosferiche;
- Istituto di Patologia Vegetale dell'Università di Milano (prof. G. G. Conti e dr. G. Violini) per le osservazioni al microscopio ottico ed elettronico (TEM e SEM) dei campioni di aghi di abete prelevati nelle due aree;
- USSL n. 9 ( Sondrio) per il monitoraggio in continuo degli inquinanti dell'aria (sito 1). Amministrazione Provinciale di Sondrio per il monitoraggio in continuo degli inquinanti dell'aria (sito 2).

Si segnala infine che le indagini relative al monitoraggio degli inquinanti atmosferici (condotte in collaborazione con ARF, ERSAL, Istituto di Fisica Generale ed Applicata, USSL di Sondrio e Amministrazione provinciale di Sondrio) sono state coordinate direttamente dalla Fondazione attraverso il suo Coordinatore scientifico e la dr. R. Dell'Era.

#### *Risultati e conclusioni*

La ricerca svolta sul rapporto tra deperimento forestale e variabili ambientali in Valtellina, costituisce il più organico e articolato studio sul degrado di ecosistemi forestali mai effettuato in Italia e si colloca, per completezza e rigore delle metodologie impiegate, a livello dei migliori studi di settore condotti in Europa e negli Stati Uniti.

La ricerca è stata di natura applicativa e i suoi risultati sono coerenti con la filosofia adottata dalla Fondazione di legare le proprie ricerche a problemi rilevanti e specifici del territorio lombardo e rientranti nei compiti istituzionali di monitoraggio e tutela ambientale degli enti territoriali.

È doveroso, tuttavia, ricordare che il problema del deperimento forestale (che costituisce una delle più preoccupanti "piaghe" ambientali dell'Europa) non è a tutt'oggi oggetto di univoche interpretazioni da parte della comunità scientifica e costituirà ve-

rosimilmente ancora per parecchi anni oggetto di discussione, non meno di altri drammatici problemi quali l'effetto serra e il buco dell'ozono.

Uno dei motivi che rendono ardua la risoluzione a livello scientifico di questo problema è costituito dalla complessità e dalle dinamiche temporali dei sistemi sotto indagine. Gli ecosistemi vegetali, a differenze di quelli animali, hanno tempi di risposta di parecchi anni o addirittura di parecchie generazioni (in termini di specie vegetali) e sono caratterizzati da una serie molto complessa di interazioni tra risposte fisiologiche, meccanismi di adattamento, fattori ambientali e fluttuazioni stagionali di tali fattori. Va ricordato che per tali ragioni i principali progetti di ricerca in corso, su specifici sistemi forestali della Germania e degli Stati Uniti, hanno solitamente una durata tra i cinque e i quindici anni.

La durata biennale del progetto non poteva pertanto fornire una risposta esaustiva a un problema tanto complesso e di portata sovranazionale; poteva tuttavia mettere a punto dei sistemi e metodologie d'indagine che, adottati in modo integrato, fossero in grado di condurre a una diagnosi molto più precisa dello stato di salubrità delle foreste lombarde e dei principali fattori ambientali in grado di influenzarla.

Questo obiettivo è stato compiutamente e brillantemente raggiunto dal progetto.

In particolare si segnalano i seguenti risultati:

1. È stata messa a punto una serie di protocolli sperimentali di monitoraggio ambientale molti dei quali mai applicati a ecosistemi forestali italiani che hanno permesso il superamento del divario fino a oggi esistente tra la capacità di intervento degli enti di salvaguardia ambientali italiani e le corrispondenti istituzioni degli altri paesi affacciati alla regione alpina.
2. Si sono messi in grado sia la Regione Lombardia che l'Azienda Regionale delle Foreste di poter procedere ad analisi ambientali sulle foreste della regione con strumenti d'indagine tra i più avanzati al mondo e in ogni caso enormemente superiori per completezza e risoluzione a quelli precedentemente impiegati.
3. I sistemi di monitoraggio ambientale attivati sono in gran parte trasferibili a ogni situazione analoga di ecosistemi forestali di montagna e di pianura dentro e fuori la regione.
4. I sistemi di monitoraggio biologico messi a punto permettono notevoli risparmi in termini economici per le valutazioni di inquinamento ambientale rispetto alla metodica analitica (basata unicamente su misure di carattere fisico e chimico) attualmente usata dalle USL ma non impiegabile per ragioni di costo, di gestione e di logistica in sistemi naturali in aree poco accessibili.
5. L'analisi di tutte le componenti ambientali investigate ha portato alla conclusione (da prendersi, per i motivi prima ricordati, con grande prudenza) che i due sistemi della Valtellina esaminati (Val Gerola e Val Masino) e caratterizzati da un fattore di degrado forestale agli estremi della scala di valutazione non mostrano sostanziali differenze **se non per la presenza a livelli assai elevati di ozono nel sito a maggior deperimento**. Nessuno aveva mai svolto in Italia questo tipo di misure. Ciò è stato possibile (per superare l'ovvia difficoltà di trasferire in sito l'automezzo dotato delle centraline automatiche per la misura degli inquinanti) con piccoli dosimetri messi recentemente a punto dall'Università di Monaco e prodotti dalla ditta svizzera PASSAM di Zurigo. Le misure effettuate hanno rilevato che, mentre le concentrazioni atmosferiche di ozono nel sito "sano" sono inferiori

ri alla soglia di tossicità per tutte le specie vegetali presenti, i livelli di ozono del sito ad alto grado di sofferenza biologica sono quasi doppi e comunque superiori alle soglie di tossicità per molte specie vegetali (mancano dati in letteratura sulle reali soglie di tossicità per le specie forestali).

Sarebbe indubbiamente molto interessante (e auspicabile) che si investighi a questo punto:

- A. la presenza di altre specie atmosferiche inquinanti con effetti biologici analoghi a quelli prodotti dall'ozono;
- B. le cause della presenza di ozono a tali livelli solo in una delle due zone considerate; a tal fine occorrerebbero più complete campagne di misura in tutta la Valtellina e la messa a punto di un modello meteorologico e diffusionale che spieghi questa concentrazione di ozono in funzione del movimento di masse d'aria inquinate dalla Pianura Padana e/o da zone ad alte emissioni antropiche di precursori dell'ozono;
- C. la messa a punto di indicatori biologici del danno da ozono più veloci e precisi di quelli attualmente impiegati che registrano il danno solo dopo anni e spesso a situazione fitosanitaria già compromessa.

#### *Ricadute del progetto*

A seguito dei risultati ottenuti dal progetto la Comunità Europea ha approvato e finanziato un progetto che riprende ed estende nel tempo alcune delle linee di ricerca promosse dal progetto FLA: in particolare l'ARF beneficerà nel 1996 e 1997 di contributi comunitari per due progetti (EDAFO ed ESPERIME) aventi come oggetto il rapporto tra deposizioni atmosferiche e degrado forestale.

Il PMIP di Milano, avuta conoscenza dei risultati del progetto FLA, ha proposto una collaborazione per estendere l'indagine nella direzione dei punti A e B precedentemente illustrati come promettenti sviluppi della ricerca svolta.

Il CNR (in attesa dell'avvio del progetto finalizzato Ambiente) ha proposto che continui la collaborazione tra FLA e IRSA sullo studio degli effetti delle deposizioni umide sugli ecosistemi vegetali della Valtellina

L'ARF ha chiesto alla FLA che continui la collaborazione sulle metodologie di analisi del deperimento forestale in Lombardia in relazione all'inquinamento dell'aria, delle acque e dei suoli.

## **2. Sito agrario (Area di spagliamento del torrente Arno - Varese)**

### *Premessa*

L'individuazione di un sito agrario interessato da inquinamento del suolo realizzato nel tempo per apporti successivi di agenti inquinanti non prodotti in loco era necessariamente legata ad una zona in cui l'inquinamento fosse stato veicolato dall'acqua.

Questa situazione era garantita dalla presenza di due condizioni estreme:

- la presenza di territori coltivati soggetti, per necessità irrigue, a inondazioni continue di acque inquinate da agenti indesiderati di non sicura origine;
- la presenza di territori non più utilizzati in agricoltura soggetti a inondazioni occasionali, anche se ricorrenti, di acque inquinate da scarichi civili e industriali.

La prima situazione era facilmente individuabile in numerose marcite della Pianura Padana; essa offriva un oggetto di studio più omogeneo, ma era legata a situazioni di danno biologico dovute a cause di inquinamento imprevedibile e puntiforme.

La seconda situazione, benché accompagnata dallo svantaggio della eterogeneità della fonte di inquinamento e dall'avanzamento dello stato di degrado, forniva un campo sperimentale ove meglio si collocavano le diverse competenze disponibili e risultava la situazione più diversificata sia per gli aspetti biologici che per l'entità delle condizioni di degrado.

L'area dell'indagine è stata quindi individuata all'interno del Parco del Ticino tra i comuni di Castano Primo e Lonate Pozzolo dove le acque del torrente Arno, non trovando uno sbocco naturale, si disperdono sulla campagna. Le inondazioni hanno iniziato a verificarsi intorno agli anni 50 quando lo sviluppo delle aree urbanizzate e industrializzate a monte ha provocato l'aumento dei deflussi superficiali e, contemporaneamente, il degrado delle acque dovuto all'immissione nell'Arno degli scarichi fognari civili ed industriali.

Fino ad allora le acque del torrente venivano impiegate in agricoltura per l'irrigazione dei terreni a nord del canale Villoresi, ma in seguito furono progressivamente lasciate spagliare in un'area a monte della SP32.

Fino al Settecento la cartografie della zona indicavano come sbocco del torrente Arno il fiume Ticino, a valle di Somma Lombardo. Carte successive, invece, inducono a ritenere che il torrente Arno si disperdesse naturalmente nella zona di Lonate Pozzolo e che venisse assorbito dal terreno ciotoloso.

Gli scarichi fognari, di cui quei terreni sono stati recettori per anni, hanno causato una sorta di loro impermeabilizzazione provocando il progressivo allargamento dell'area che raggiunge oggi i 300 ettari causando, nel corso degli anni, anche notevoli disagi per la frequente interruzione della strada che congiunge Turbigo a Lonate.

Gli aspetti affrontati in termini di competenze sono stati i seguenti:

1. Indagini geo-botaniche	DIFCA - UNI MI
2. Indagine forestale	Azienda Regionale delle Foreste
3. Analisi dell'entomofauna	Istituto di Entomologia Agraria - UNI MI
4. Analisi biochimiche e fisiologiche vegetali	DIFCA, Sezione di Fisiologia e Biochimica - UNI MI
5. Analisi tossicologiche delle acque	Dipartimento di Scienze dell'Ambiente - UNI MI
6. Analisi chimica dei suoli e delle acque	DIFCA, Sezione Chimica del Suolo - UNI MI
7. Analisi degli inquinanti organici	Istituto "Mario Negri"
8. Aspetti patologici vegetali	Istituto di Patologia Vegetale - UNI MI

Sono stati attinti dati ed informazioni sull'area dai seguenti enti ed istituzioni:

- Consorzio Intercomunale per il risanamento dei torrenti Arno, Rile e Tenore;
- Lombardia Risorse;

- PMIP Varese;
- Regione Lombardia - Servizio Acque;
- SOGEIVA - Società Gestione Impianti Varese.

*Risultati e conclusioni*

Obiettivo primario delle ricerche svolte sul torrente Arno non era tanto lo studio del sito, ma la predisposizione e la verifica di metodi d'indagine rivolti soprattutto al monitoraggio di territori caratterizzati da dinamiche di fenomeni altamente irregolari.

Il quadro che si trae dalla notevole mole di dati geobotanici, entomologici, chimici, fisiologici e tossicologici ottenuti con le indagini svolte è di una seria compromissione ambientale anche se non irrecuperabile e legata soprattutto a fenomeni periodici di inquinamento "acuto" che si innestano su una situazione di fondo deteriorata. Le indagini hanno comunque dimostrato che è possibile controllare lo stato di qualità delle acque, dei suoli e della componente biologica sia con rilevamenti in situ, sia con campionamenti, analisi e test di laboratorio e che sarebbe utile allestire una rete di monitoraggio basata su protocolli precisi e impiegabile nello studio di situazioni analoghe dentro e fuori regione.

Relativamente alle possibilità di recupero di aree inquinate con caratteristiche analoghe si potrebbero prospettare le seguenti ipotesi:

- favorire lo sviluppo dell'area come ecosistema umido;
- favorire lo sviluppo dell'area come ecosistema boschivo e/o coltivato.

Nella prima ipotesi si tratterebbe di lasciare spagliare il torrente, lavorando soprattutto sulla qualità delle acque, sulla delimitazione fisica delle aree umide mediante sbarramenti e sull'asportazione dei rifiuti speciali disseminati in tutta l'area.

La seconda ipotesi risulta più complessa e prevede interventi sulle acque, sui rifiuti speciali, sui suoli e sedimenti. Per quanto riguarda le acque si dovrebbe provvedere alla loro canalizzazione allo scopo di bonificare l'area. Per i rifiuti speciali gli interventi sarebbero gli stessi della prima ipotesi. Il destino di suolo e sedimenti, invece, prevede una serie di interventi atti a recuperare i primi in situ riducendone le potenzialità inquinanti e i secondi, in virtù del loro elevato contenuto in carbonio organico, come ammendanti su zone agricole limitrofe.

### **3. Area dismessa - Ex ferriera "Orsenigo" di Figino Serenza (Como)**

*Premessa*

Uno degli obiettivi del progetto numero due era quello di studiare la possibilità di utilizzare approcci biologici per il recupero di suoli inquinati da interventi antropici.

Il lavoro di base, affrontato nella prima parte del progetto, prendeva in considerazione due aspetti particolari; il primo riguardante la biodegradabilità da parte dei microrganismi del terreno da molecole potenzialmente tossiche utilizzate in agricoltura, il secondo la possibilità di utilizzare le piante per bonificare il terreno dalla presenza di elementi tossici, in particolare metalli pesanti. Questo secondo approccio risultava fortemente innovativo e tale da poter ricevere apporti determinanti dallo studio di un sito ambientale.

La scelta del sito è stata effettuata utilizzando il lavoro di censimento delle aree lom-



barde da bonificare effettuato da Lombardia Risorse, società pubblica della Regione Lombardia. Questo lavoro mette a disposizione, sotto forma di schede, i siti ambientali codificati con un breve riassunto delle loro caratteristiche con particolare riferimento al tipo di inquinamento e allo stato in cui versa il territorio, con l'indicazione di eventuali indagini particolari in attuazione di progetti di bonifica.

Il sito da noi scelto è stato quello della ex miniera di Figino Serenza, caratterizzato da un forte inquinamento da metalli pesanti e dal fatto che, da molto tempo, non è stato oggetto né di apporti di nuovi inquinanti, né di interventi di bonifica. Questa situazione garantisce pertanto la condizione di disporre di un territorio in cui, nel lungo periodo, si fossero realizzate condizioni per la selezione di piante capaci di adattamenti legati all'accumulo di metalli pesanti al loro interno. Gli aspetti indagati, in relazione alle competenze e ai tempi disponibili sono stati i seguenti:

Indagine geobotanica	DIFCA - UNI MI
Analisi del contenuto in metalli pesanti nelle piante e nel suolo	DIFCA, Sezione di Fisiologia delle Piante - UNI MI
Biochimica e fisiologia dei processi di adattamento delle piante	DIFCA, Sezione di Fisiologia delle Piante - UNI MI

Le seguenti istituzioni hanno fornito informazioni relative all'area:

- Lombardia Risorse;
- USSL 12 di Cantù;
- Comune di Figino Serenza.

#### *Risultati e conclusioni*

Le ricerche sull'area dell'ex-ferriera Orsenigo hanno permesso la caratterizzazione di una serie di specie vegetali selezionate naturalmente su terreni contaminati da metalli pesanti e in grado di accumularli senza conseguenze fisiologiche contribuendo in tal modo alla graduale bonifica dei suoli.

Il sito, nonostante il livello di degrado, si presta molto bene come area permanente di indagine, come "palestra" per studi sulle tendenze dinamiche della vegetazione in ambienti di "deserto" artificiale e per la eventuale sperimentazione di ecotipi vegetali utilizzabili negli interventi di recupero.

Le attuali tecniche utilizzate per la bonifica di suoli inquinati da metalli pesanti, per altro assai costose, prevedono o l'asporto del terreno e il suo confinamento in apposite discariche, o l'uso di processi chimici per immobilizzare il metallo, seguiti da interventi alla superficie del suolo per eliminare la penetrazione dell'acqua o l'asporto e il trattamento del terreno con soluzioni in grado di desorbire e lisciviare i metalli. Queste metodiche utilizzate non sono però, nella maggior parte dei casi, risolutive; esse costituiscono semplici palliativi che rimandano il problema in quanto lasciano, anche se in forme poco solubili, gli elementi inquinanti nel terreno.

Dato che le modificazioni create in un terreno non sono quasi mai irreversibili, si possono ripresentare condizioni in cui l'inquinante diventa di nuovo disponibile.

La possibilità di utilizzare, in terreni inquinati da ingenti quantità di metalli pesanti, piante che accumulano tali elementi al loro interno, permetterebbe quindi di sviluppare

metodi alternativi di bonifica biologica e di ridurre notevolmente i costi di recupero.

Esistono infatti piante che si sono adattate a vivere su tali terreni: alcune di esse hanno sviluppato meccanismi che escludono dall'assorbimento radicale i metalli pesanti, altre invece, le cosiddette piante accumulatrici, sono in grado di accumularli al loro interno senza manifestare sintomi di tossicità.

L'utilizzo di differenti specie di provata capacità accumulatrice con differente morfologia radicale e differente sviluppo vegetativo in combinazione tra di loro potrebbero rappresentare quindi un efficiente metodo di bonifica di terreni inquinati.

#### 4. Sito forestale di pianura - Parco del Ticino: località "La Fagiana" (Milano)

##### *Premessa*

Fra i possibili siti di pianura interessati da fenomeni di inquinamento atmosferico, si è preso in considerazione un'area del Parco del Ticino, denominata "La Fagiana" che era stata segnalata dalla direzione del Parco in quanto particolarmente danneggiata, presumibilmente da fenomeni di inquinamento. L'interesse di tale area era dato dal fatto che si trova al centro del maggiore parco fluviale della Lombardia.

Un primo sopralluogo eseguito nell'area suddetta all'inizio del 1994 con i tecnici del Parco, aveva avvalorato l'ipotesi che la causa prevalente dell'evidente stato di sofferenza della vegetazione forse da riferire a fenomeni di inquinamento atmosferico.

Per esaminare in dettaglio la situazione sono state attivate le seguenti indagini:

Monitoraggio patologico e individuazione di piante spia di inquinanti atmosferici	<i>Istituto di Patologia Vegetale - UNI MI</i>
Indagine geobotanica	<i>DIFCA - UNI MI</i>
Analisi chimica del suolo	<i>DIFCA, Sezione Chimica del Suolo - UNI MI</i>
Analisi chimiche fogliari	<i>Dipartimento di Genetica e Biologia dei Microrganismi - UNI MI</i>

##### *Risultati e conclusioni*

L'uso delle piante spia ha dimostrato una situazione differente a seconda della sottozona osservata: nelle aree più interne al bosco le piante spia non hanno manifestato sintomi attribuibili a un possibile inquinamento atmosferico, nelle aree marginali, potenzialmente più esposte agli inquinanti, sulle piante spia sono comparse clorosi e necrosi estese, con intensità crescente verso la fine del mese di settembre.

L'indagine geobotanica ha evidenziato condizioni diffuse di degrado, in alcune zone più accentuate per la riduzione della copertura arborea, con conseguente maggiore illuminazione del sottobosco ed espansione delle specie esotiche.

L'analisi chimica del suolo non ha riscontrato deviazioni accentuate dei parametri pedologici tipici (pH, metalli pesanti, contenuto di sostanza organica) dai valori di suoli in buono stato.

In conclusione, l'indagine ha portato a risultati in parte contraddittori e non generalizzabili, probabilmente anche a causa del troppo breve periodo di osservazione e di controllo.

## **Gli Autori**

- Francesco Guazzo Albergoni** Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Milano, via Celoria 26 - 20133 Milano. Tel. 02-26604396.
- Michele Aleffi** Dipartimento di Botanica ed Ecologia, Università degli Studi di Camerino, via Pontoni 5 - Camerino (MC). Tel. 0737-632526/402707.
- Luigi Allievi** Dipartimento di Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel. 02-23955838, fax 02-70630829.
- Silvia Assini** Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Università degli Studi di Pavia, via S. Epifanio 14 - 27100 Pavia. Tel. 0382-23069, fax 0382-34240.
- Luciano Bani** Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano, via Emanuelli 15 - 20126 Milano. Tel. 02-64474514, fax 02-64474500. E-mail: cobil@alpha.disat.unimi.it
- Giuseppe Belli** Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel. 02-23691129, fax 02-70631287. E-mail: patoveg@unimi.it
- Patrizia Bonfanti** Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano, via Emanuelli 15 - 20126 Milano. Tel. 02-64474510, fax 02-64474500. E-mail: luciana@alpha.disat.unimi.it
- Luciana Bottoni** Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano, via Emanuelli 15 - 20126

Milano. Tel. 02-64474510, fax 02-64474500.  
E-mail: luciana@alpha.disat.unimi.it

**Andrea Buffagni** Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR, Reparto Sperimentale di Idrobiologia Applicata, via Della Mornera 25 - 20047 Brugherio (MI). Tel. 039-2004303, fax 039-2004692.

**Filippo Bussotti** Dipartimento di Biologia Vegetale, Laboratorio di Botanica Forestale e Applicata, Università degli Studi di Firenze, piazzale Cascine 28 - 50144 Firenze. Tel. 055-3288369, fax 055-360137. E-mail: fbussotti@cesit1.unifi.it

**Marina Camatini** Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano, via Emanuelli 15 - 20126 Milano. Tel. 02-64474502, fax 02-64474503. E-mail: marina@alpha.disat.unimi.it

**Davide Cantelli** Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano, via Emanuelli 15 - 20126 Milano. Tel. 02-64474502, fax 02-64474503.

**Maurizio Cocucci** Dipartimento di Fisiologia delle Piante Coltivate e Chimica Agraria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel. 02-26607216, fax 02-2663057. E-mail: difca@imiucca.csi.unimi.it.

**Anita Colombo** Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano, via Emanuelli 15 - 20126 Milano. Tel. 02-64474502, fax 02-64474503.

**Alberto Cozzi** LINNAEA Ambiente Srl, via Sirtori 37 - 50137 Firenze. Tel. 055-608073, fax 055-608311. E-mail: mc6094mclink.it

**Nicola Dell'Orto** Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano, via Emanuelli, 15 - 20126 Milano. Tel. 02-64474502, fax 64474503.

**Annamaria Ferrari** Dipartimento di Scienze e Tecnologia Alimentari e Microbiologiche, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel. 02-23955839, fax 02-70630829. E-mail: annamaria.Ferrari@unimi.it

**Marco Ferretti** LINNAEA Ambiente Srl, via Sirtori 37 - 50137 Firenze. Tel. 055-608073, fax 055-608311. E-mail: mc6094@mclink.it

**Anna Fontana** CNR, Centro di Studio sulla Micologia del Terreno, viale Mat-

tioli 25 - 10125 Torino. Tel. 011-6502927, fax 011-655839.

- Lorenzo Fornasari** Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano, via Emanuelli 15 - 20126 Milano. Tel. 02-64474508, fax 02-64474500. E-mail: cobil@alpha.disat.unimi.it
- Sergio Frugis** Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Università degli Studi di Pavia, via S. Epifanio 14 - 27100 Pavia. Tel. 0382-23069, fax 0382-34240.
- Paolo Galli** Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano, via Emanuelli 15 - 20126 Milano. Tel. 02-64474206, fax 02-64474503.
- Silvia Garagna** Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale e Centro di Studio per l'Istochimica del CNR, Università degli Studi di Pavia, piazza Botta 9 - 27100 Pavia. Tel. 0382-506323, fax 0382-506290. E-mail: garagna@ipv36.unipv.it
- Carmen Gigliotti** Dipartimento di Fisiologia delle Piante Coltivate e Chimica Agraria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel. 02-26607224, fax 02-2663057. E-mail: difca@imiucca.csi.unimi.it
- Paola Girgenti** Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel. 02-23691934. E-mail: entom@imiucca.csi.unimi.it
- Mario A. Gomasasca** Associazione Italiana di Telerilevamento, CNR-IRRS Telerilevamento, via Bassini 15-20133 Milano. Tel. 02-23699291/23699300. E-mail: mario@irrs.mi.cnr.it
- Riccardo Groppali** Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Università degli Studi di Pavia, via S. Epifanio 14 - 27100 Pavia. Tel. 0382-2309, fax 0382-34240.
- Marco Marchetti** Associazione Italiana di Telerilevamento, via Cocchi 4 - Firenze. Tel. e fax 055-570395.
- Mauro G. Mariotti** Dipartimento di Fisiologia delle Piante Coltivate e Chimica Agraria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel. 02-26607218, fax 02-2663057. E-mail: mauro.mariotti@unimi.it
- Maria Teresa Marrè** Centro di Studio della Biologia Molecolare e Cellulare delle Piante del CNR, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel. 02-26604390, fax 02-2361070.

- Renato Massa** Dipartimento di Scienze dell' Ambiente e del Territorio, Università degli Studi di Milano, via Emanuelli 15 - 20126 Milano. Tel. 02-64474510, fax 02-64474500. E-mail: rmassa@alpha.disat.unimi.it
- Alberto Meriggi** Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Pavia, piazza Botta - 27100 Pavia. Tel. 0382-506292, fax 0382-506290.
- Paola Nola** Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Università degli Studi di Pavia, via S. Epifanio 14 - 27100 Pavia. Tel. 0382-23069, fax 0382-34240. E-mail: pnola@ipv36.unipv.it
- Anna Occhipinti Ambrogi** Sezione Ecologia, Dipartimento di Genetica e Microbiologia, Università degli Studi di Pavia, via S. Epifanio 14 - 27100 Pavia. Tel. 0382-304610, fax 0382-528496. E-mail: occhipin@ipvgen.unipv.it
- Maurizio G. Paoletti** Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova, via Trieste 75. Tel. 049-8276304-5, fax 049-8276300/8272213. E-mail: paoletti@civ.bio.unipd.it; web site: <http://www.bio.unipd.it/agroecology/>
- Giovanna Puppi Branzi** Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università degli Studi di Bologna, via Irnerio 42 - 40126 Bologna. Tel. 051-351280, fax 051-242576.
- Carlo Alberto Redi** Laboratorio di Biologia dello Sviluppo, Dipartimento di Biologia Animale e Centro di Studio per l'Istochimica del CNR, Università degli Studi di Pavia, piazza Botta 9 - 27100 Pavia. Tel. 0382-506306, fax 0382-506290. E-mail: redi@ipv36.unipv.it
- Alberto Rivetta** Dipartimento di Fisiologia delle Piante Coltivate e Chimica Agraria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel. 02-26607219, fax 02-2663057. E-mail: difca@imiucca.csi.unimi.it
- Francesco Sartori** Dipartimento di Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Università degli Studi di Pavia, via S. Epifanio 14 - 27100 Pavia. Tel. 0382-23069, fax 0382-34420. E-mail: sartori@et.unipv.it
- Luciano Süß** Istituto di Entomologia Agraria, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel 02-23691923. E-mail: entom@imiucca.csi.unimi.it

**Mariagrazia**

**Valcuvia Passadore** Dipartimento Ecologia del Territorio e degli Ambienti Terrestri, Università degli Studi di Pavia, via S. Epifanio 14 - 27100 Pavia. Tel. 0382-23069, fax 0382-34240  
E-mail: valcuvia@et.unipv.it

**Guido Violini**

Istituto di Patologia Vegetale, Università degli Studi di Milano, via Celoria 2 - 20133 Milano. Tel. 02-23691129, fax 02-70631287.

**Maurizio Zuccotti**

Fondazione Lombardia per l'Ambiente, Foro Bonaparte 12 - 20121 Milano. Tel. 02-809169, fax 02-72002398.





## Sigle e abbreviazioni

AFNOR Association française de normalisation  
AIA Associazione Italiana di Aerobiologia  
AM Funghi endomicorrizici arbuscolari  
API Kit identificazione lieviti e batteri  
ARF-Lombardia Azienda Regionale Foreste  
ASPT Average Score Per Taxon  
ASTM American Society for Testing Material  
ATP Adenosintrifosfato  
B-IBI Indice Bentonico di Integrità Biotica  
BOC Consumo biologico di ossigeno  
BOD Domanda biologica di ossigeno  
Bel B Piante di tabacco insensibili  
Bel W3 Piante di tabacco sensibili  
BMWPs Biological Monitoring Working Party-score  
BZ2 Gene Bronze2 di mais  
CBC Common Bird Census  
CCTN Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale  
CISBA Centro Italiano di Studi di Biologia Ambientale  
COD Consumo ossigeno  
COMET Saggio cometa - elettroforesi  
CPOM Sostanza organica grossolana  
DAPI Colorante per conte al microscopio  
DMC Concentrazione di materia secca  
DNA Acido desossiribonucleico  
DNP-GS 1-cloro-2,4-dinitrobenzene  
EM Funghi ectomicorrizici  
P450 Enzimi appartenenti alle citocromo monoossigenasi  
EPA Agenzia per la Protezione dell'Ambiente  
EPTC Sulfossido  
FPOM Materiale organico più fine  
GST25 di frumento  
GST26 di frumento  
GSTs glutatione s-transferasi  
GUS b-glucuronidasi

HSEC Hydraulic Stream Ecology Concept  
IAP Indici di Purezza Atmosferica  
IBE Indice Biologico Esteso  
IBI Indice di Integrità Biotica  
ICI Indice di Comunità degli Invertebrati  
IDF Indici di danno fogliare  
IPG Rete europea dei Giardini Fenologici Internazionali  
ISO International Organization for Standard  
LDP Piante longidiurne  
MAS Mayfly Average Score  
MCI Minima concentrazione inibente  
MPCE Frequenza micronuclei negli eritrociti policromatici  
MPN Most Probable Number  
NDP Piante neutrodiurne  
OECD Organization for Economic Cooperation and Development  
OTC Open Top Chamber  
P4501A citocromo  
PCR Polymerase Chain Reaction  
PDC Patch Dynamics Concept  
RIC Riparian Influence Concept  
RIVPACS River InVertebrate Prediction and Classification System  
RWC Contenuto relativo di acqua  
SAT Saggio del grado di aneuploidia spermatozoi  
SBI Società Botanica Italiana  
SDP Piante brevidiurne  
SDW Peso secco specifico  
SEM Microscopio Elettronico a Scansione  
SMT Saggio per la valutazione della morfologia spermatozoi  
SOD Superossido dismutasi  
TCA Acidi tricarbossilici  
TCDD-EQ 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina  
TEM Microscopio Elettronico a Trasmissione  
TWC Contenuto percentuale di acqua nella foglia a pieno turgore  
UFC Unità formanti colonia  
WC Contenuto percentuale di acqua

# Indice analitico

- abete bianco**, 85, 127-129, 330
- Abies alba* Mill., 129
- Abies balsamea*, 39
- Accipiter gentilis*, 229
- Accipiter nisus*, 229
- Acer pseudoplatanus*, 120, 274
- Achillea*, 272
- Aeshnidae, 302
- Afidi, 185, 270
- agar, 71, 73, 75
- Agriidae, 302
- Agrostis*, 272
- Agrostis stolonifera*, 274
- Agrostis tenuis*, 273-274
- Alces alces, 234
- alghè**, 51, 56, 61-62, 66, 88, 206, 225, 247-248, 254, 264, 307, 309
- alghè verdi**, 88
- Alliaria petiolata*, 271
- Allium ascalonicum*, 115
- Allium cepa*, 114
- Allium sativum*, 115
- Alyssum*, 272
- Alyssum argenteum*, 273
- Alyssum bertolonii*, 273
- Amaranthus caudatus*, 38
- Amorpha fruticosa*, 271
- Ancylidae, 302
- Anfibi**, **201-215**, 247, 278, 287-288, 333
- Angiosperme**, 151, 154
- Anthoxanthum odoratum*, 273
- Anuri**, 202, 204, 207, 210-211, 213, 247, 288, 333
- ape**, **184-189**, 331
- ape domestica**, 184, 186, 331
- Aphelocheiridae, 302
- Apis mellifera*, L. 184
- Apium nodiflorum* (L.) Lag., 54
- Apocrita, 185
- Apodemus sylvaticus*, 223

- Apoidea*, 185  
*Aquila chrysaetos*, 229  
*Aracnida*, 190  
*Araneae*, **190-200**  
*Arctiumlappa*, 271  
*Arctium minus*, 271  
*Arctiumnemorosum*, 271  
*Arctium tomentosum*, 271  
*Ardea herodias*, 46  
*Armeria*, 272  
*Arrhenatherum elatius*, 274  
*Artemia salina*, **333**  
*Artemisia vulgaris*, 273-274, 335  
**Artiodattili**, 220  
**Artropodi**, 190, 192  
**Ascomiceti**, 80, 88  
*Asellidae*, 302  
**Asellidi**, 294  
*Asperugo procumbens*, 271  
*Astacidae*, 302  
**Atiidi**, 294  
*Avenellaflexuosa*, 272  
*Azotobacter*, 75-76  
*Baetidae*, 294, 302  
*Ballota nigra*, 271  
*Barbareabraceosa*, 271  
**barbo canino**, 205  
**Basidiomiceti**, 80, 88  
**batteri ammonificanti**, 76  
**batteri azotofissatori**, 75-76  
**batteri nitrificanti**, 70, 72, 75  
**batteri o Schizomiceti**, 66-67, 70-72, 75-76, 78, 82-84, 139, 222, 225, 306-307  
**benthos**, 307  
*Beraeidae*, 302  
*Betula pendula*, 141, 274  
**Betulacee**, 154  
**biancospino**, 265, 330  
*Bidens bipinnata*, 275  
*Bidens cernua*, 271  
*Bidens frondosa*, 271  
*Bidens radiata*, 271  
*Bidens tripartita*, 271  
**Bivalvi**, 295  
**bombi**, 185, 331  
*Brachycentridae*, 302  
*Brassica oleracea*, 271  
*Brassica oleracea var. capitata L.*, 115  
*Brassica rapa L.*, 115-116  
*Brassica sp.*, 141  
**Briofite**, 54, **102-112**  
*Buddleja davidii*, 274  
*Buteo buteo*, 229  
*Caenidae*, 292, 294, 302  
*Callitriche palustris L.*, 54-56  
*Callitriche stagnalis Scop.*, 54

- Calluna vulgaris*, 272  
*Calystegia sepium*, 274  
 Capniidae, 302  
*Capraibex*, 224  
*Capreoluscapreolus*, 225  
**Carabidi**, 288  
*Carduuscrispus*, 271  
*Carexappropinquata*, 270  
**carice pendula**, 265  
*Caricetumappropinquatae*, 270  
**Carnivori**, 217, 220-222, 224, **231-232**, 277  
*Cenococcumgeophilum*, 85  
*Cerastium fontanum ssp. glabrescens*, 274  
*Cerastium holosteoides*, 273  
*Cerastium latifolium*, 273  
*Ceratophyllumdemersum* L., 54  
**Cetacei**, 220, 224  
*Chara div. sp.*, 51  
*Chenopodiumalbum*, 116  
*Chenopodiumbonushenricus*, 271  
*Chenopodiumglaucum*, 271  
*Chenopodiumrubrum*, 271  
*Chenopodiumvulvaria*, 271  
 Chironomidae, 302  
**Chironomidi**, 287, 294, 305, 308  
 Chironominae, 82  
*Chironomus*, 183  
*Chironomusanthracinus*, 182  
*Chironomus plumosus*, 182  
*Chironomus salinarius* Kieff., 181  
**Chiroterri**, 220, 223, **230-231**, **232-233**, 289  
 Chlorococcales, 56  
 Chloroperlidae, 302  
 Chrysomelidae, 302  
**Cianobatteri**, 88  
**Ciclostomi**, 201, 206  
**Ciprinidi**, 205, 211  
**ciprinidi insettivori**, 304  
**ciprinidi piscivori**, 304  
*Circus pygargus*, 234  
**Cladoceri**, 247  
**cladonie**, 89  
 Clambidae, 302  
*Clethrionomys glareolus*, 219  
**clostridi**, 76  
 Coenagriidae, 302  
**Coleotteri**, 175, 179, 288, 295, 331  
**Coleotteri Curculionidi**, 176  
**Conifere**, 108, 124, 129, 139, 142-145, 154, 179, 280, 316, 321-322  
 Cordulegasteridae, 302  
 Corduliidae, 302  
 Corixidae, 302  
 Corophiidae, 302  
**Corilacee**, 154  
*Cratoneuron*, 103  
*Crocidura sp.*, 285

- Crostacei**, 247, 287, 295
- Cryphalus piceae* **Ratz.**, 177-178
- Cucurbita pepo*, 141
- Curculionidae, 302
- Daphnia magna*, 247, **249-250**, 257-258, 339
- Dendrocoelidae, 302
- Deschampsia caespitosa*, 274
- detritivori**, 223, 277, 305
- Diamesinae, 183
- Dicotiledoni**, 141
- Digitaria sanguinalis*, 116
- Ditteri**, 180, 182, 295, 308
- Dracunculus vulgaris*, 269
- Dryocoetes autographus* **Ratz.**, 177
- Dryocoetes hectographus* **Reit.**, 177
- Dryopidae, 302
- Dytiscidae, 302
- Echinochloa crus-galli*, 271
- Efemerotteri**, 294-295, 305-306
- Eliminithidae, 302
- Elodea canadensis* **Michx.**, 54
- Elodea densa* **Caspary**, 21, 53-57, 59-61, 63
- Emysorbicularis*, 213, 215
- Endochironomus*, 182
- Endogone*, 80
- Eophila tellini*, 302
- Epatiche**, 104
- Ephemeraeidae, 302
- EphemereLLidae, 302
- erba medica div. cv.**, 161, 331
- Ericacee**, 69
- Ericales, 68-69
- Erpobdellidae*, 302
- Eterotteri**, 295
- Eumiceti (muffe e lieviti)**, 66, 70, 72, 75, 78, 82-84
- Fagacee**, 154
- faggio**, 68, 113, 132, 286, 334
- Fagus sylvatica* **L.**, 113, 132, 286
- Falconiformi**, 222
- Festuca*, 272
- Festuca rubra*, 273-274
- Fontinalis antipyretica*, 54, 106
- formiche**, 185
- Frangula alnus*, 274
- frassino**, 108, 121, 265
- Fraxinus americana*, 141
- Fraxinus excelsior*, 120
- Fraxinus ornus*, 120
- Fraxinus sp.*, 108
- Fringuelli**, 222
- frumento**, 40, 115, 335, 337
- funghi**, 58, 67-69, 79-80, 85, 88, 90, 113, 123, 133, 139, 177, 222, 225
- Fusycoccum amygdali*, 58
- Galium aparine*, 271
- Galium spurium*, 271

- Gammaridae, 302
- Gammaridi**, 294
- Gasteropodi**, 295
- Gastrotrichi**, 307
- Gerridae, 302
- gladiolo div. cv.**, 161
- Gladiolus gandavensis*  
cv. **Snow Princess**, 163, 167
- Glomales, 81
- Glossiphoniidae, 302
- Glyceriamaxima, 270
- Goeridae, 302
- Gomphidae, 302
- Gordiidae - **Nematomorfi**, 295
- Groenlandiadensa **Fourr.**, 54-56
- Gyrinidae, 302
- Haliplidae, 302
- Helodidae, 302
- Heptageniidae, 302
- Hirudidae, 302
- Hordeumvulgare*, 141
- Hottonia palustris* L., 54
- Hydrobiidae, 302
- Hydrocotylesibthorpioides*, 275
- Hydrometridae, 302
- Hydrophilidae, 302
- Hydropsychidae, 302
- Hydroptilidae, 302
- Hygrobiiidae, 302
- Hylurgops glabratus* **Zet.**, 177
- Hyosciamusalbus*, 271
- Hyosciamusniger*, 271
- Hypnumcupressiforme*, 105
- ifantria**, 191
- Imenotteri**, 185
- Insetti**, 162, 174-189, 190, 203, 214, 216, 223, 231, 277-278, 285, **287-288**, 289, 305
- Insettivori**, 220, 222-224, 285, 289, 304, 307
- Inulagraveolens*, 275
- invertebrati**, 195, 204, 214, 217-218, 225, 235, 241, 261, 264, 278, 285, 287, 298, 301, 305
- ippocastano**, 275
- Ipstypographus* L., 177-178
- Irudinei**, 295
- Isoetesechinospora*, 270
- Isoetesmalinverniana*, 270
- Jasione montana*, 274
- Lactuca sativa* L., 115
- Lagomorfi**, 220
- Lagurus ovatus*, 275
- Lamium album*, 271
- Lampetrafluviatilis*, 206
- Lampetra planeri*, 206
- lampreda di fiume**, 206
- lamprede**, 201, 206
- Larixdecidua* **Mill.**, 129
- Larus argentatus*, 46
- Lemna trisulca* L., 54

- Leonurus cardiaca*, 271  
*Lepidostomatidae*, 302  
**Lepidotteri**, 270, 287-288, 331  
*Leptoceridae*, 302  
*Leptophlebiidae*, 302  
*Lepus europaeus*, 225  
*Lestidae*, 302  
*Leuctra*, 294  
*Leutridae*, 302  
*Libellulidae*, 302  
**Licheni**, 37, 68, **88-99**, 108, 264, 276  
*Limnephilidae*, 302  
*Lobularia maritima*, 275  
*Lolium multiflorum*, 145, 148, 167  
*Lolium perenne*, 41, 167  
**lombrichi**, 172-173  
*Lappula deflexa*, 271  
**luppolo**, 265  
*Lutra lutra*, 224, 234  
*Luzulalutea*, 273  
*Lycosidae*, 191  
*Lymnaeidae*, 302  
**macrobenthos**, **291-310**  
**macroinvertebrati**, 264, 287, 289, 292-293, 299, 302, 306  
**macromammiferi**, 237  
**mais**, 40, 46, 199  
*Malus spp.*, 141  
**Mammiferi**, 202, 214, **216-234**, **235-244**, 278, 285, 287, **289**, 290  
*Marrubium vulgare*, 271  
*Martes foina*, 224  
*Martes martes*, 224  
*Matricharia discoidea*, 271  
*Medicago sativa*, 141, 163  
**Megalotteri**, 295  
*Meles meles*, 224  
*Mesoveliidae*, 302  
**Metanobatteri**, 72, 76  
**micromammiferi**, 210, **223-224**, **231**, 237-238, 277, 285, 289  
*Minuartia verna*, 273-274  
*Molannidae*, 302  
**Molluschi**, 287, 305  
**mosca domestica**, 174  
**Muschi**, 103-107, 264, 269, 276  
*Mustela erminea*, 224  
*Mustela nivalis*, 224  
*Mustela putorius*, 224  
**Mustelidi**, 224, 231  
*Myotis div. sp.*, 223  
*Myriophyllum spicatum* L., 54-56  
*Najas marina* L., 54  
*Naucoridae*, 302  
**Nematomorfi**, 295  
**Nemertini**, 295  
*Nemouridae*, 302



- Nepidae*, 302  
*Neritidae*, 302  
*Nicotianatabacum*, 165  
*Nicotianatabacumcv. Bel-W3*, 147, 163, 166-167  
**Nifargidi**, 294  
*Notonectidae*, 302  
*Nyctalus div. sp.*, 223  
*Octodrilus*, 174  
**Odonati**, 287-288, 295  
*Odontoceridae*, 302  
*Oligochaeta*, 302  
**Oligocheti**, 294-295, 305, 308  
**olmi**, 200  
*Onopordonacanthium*, 271  
**ontano**, 265  
*Orthocladiinae*, 182-183  
*Orthotrichumaffine*, 109  
*Orthotrichumdiaphanum*, 109  
**orzo**, 46, 81  
*Osmylidae - Planipenni*, 295  
*Ostryacarpinifolia*, 153  
**Palemonidi**, 294  
*Panicum miliaceum L.*, 115-116  
*Parietariaofficinalis*, 271  
*Parietariadiffusa*, 271  
*Parmelia*, 97  
**Passeriformi**, **221-222**  
*Pelargonium zonale*, 38  
**pellicani**, 222  
*Perlidae*, 302  
*Perlodidae*, 302  
*Pernisapivorus*, 229  
**Pesci**, **201-215**, 222-223, 226, 242, 246-247, 277-278, 287-288, 304-305, 307-308  
**sole**, 304  
*Phaseolusvulgaris*, 39  
*Philopotamidae*, 302  
*Phragmitesaustralis*, 270  
*Phryganeidae*, 302  
*Physidae*, 302  
*Phytolaccaamericana*, 271, 274  
*Piceaabies*, 119  
*Piceaexcelsa*, 38, 126, 129, 142  
*Picea rubens*, 39  
*Piloderma croceum Erikss. et Hjortst.*, 85  
**Pinnipedi**, 220, 224  
**pino strobo**, 140  
*Pinus banksiana*, 141  
*Pinus pinaster*, 153  
*Pinus pinea*, 153  
*Pinus sp.*, 179  
*Pinusstrobos*, 141  
*Pinussylvestris L.*, 38, 117, 126, 129  
*Pinustaeda L.*, 117  
**pioppo**, 265, 330  
**pipistrelli**, 223, 230, 232  
*Piscicolidae*, 302

*Pityogenes chalcographus* L., 176, 178

Planariidae, 302

**Planipenni**, 295

Planorbidae, 302

*Plantago*, 272

Platycnemididae, 302

**Plecotteri**, 294-295, 305

*Plecotus* **div. sp.**, 223

Pleidae, 302

*Poa annua*, 141

Polycentropodidae, 302

*Polygraphuspolygraphus* L., 177

*Populus tremuloides*, 141

Portulacaoleracea, 116

Potamanthidae, 302

*Potamogetoncrispus* L., 54

*Potamogeton nodosus* L., 54

*Potamogeton perfoliatus* L., 54

*Potamogeton pusillus* L., 54

**prostoma - Nemertini**, 295

**Protisti**, 66

**Protozoi**, 66, 306-307

*Prunus armeniaca* **div. cv.**, 163

*Prunus serotina*, 167, 271

*Pseudevernia furfuracea*, 97

Psychomyiidae, 302

*Pteridium aquilinum*, 141

*Pulicaria vulgaris*, 271

*Pyracantha coccinea*, 275

*Quercus ilex*, 153, 167

*Quercus robur*, 271

*Quercus* **sp.**, 108

**ragni**, **190-200**

*Rana*

*dalmatina*, 213

*temporaria*, 213

*Ranunculus*

*fluitans* L., 54-56

*sceleratus*, 270

**rapaci**, 220, **222-223**, 229, 231

*Raphanus sativus*, 41

**var. radicola Perzoon**, 115

**Rettili**, **201-215**, 278

Rhabditidae, 307

Rhyacophilidae, 302

*Ricciafluitans* L., 54

*Riparia riparia*, 222

*Robiniapseudoacacia*, 271

**Roditori**, 220, 223, 237

**Rotiferi**, 306-307

*Rubus* **spp.**, 141

*Rumex*

*acetosa*, 271

*alpinus*, 271

*Rupicapra rupicapra*, 224

*Saccaromyces cerevisiae*, 249

**salamandre**, 207

**Salicacee**, 154

- scardola*, 205  
*Sciurus vulgaris*, 219  
**Scolitidi**, 175-179, 189  
*Selenastrum*, 51, 249-250, 261  
*Selenastrumcapricornutum*, 56, 247-248, **252-256**  
*Senecio cordatus*, 271  
*Seneciosubalpinus*, 271  
*Sergentia*, 182  
*Sericostomatidae*, 302  
*Setariaviridis*, 116  
**sfagni**, 103  
*Sialidae - Megalotteri*, 295, 302  
*Sileneitalica*, 274  
*Silenevulgaris*, 273-274, 332-333  
*Silybummarianum*, 275  
*Simuliidae*, 302  
*Siphonuridae*, 302  
*Sittaeuropaea*, 219, 221, 228  
**soia**, 46, 141  
*Solidagogigantea*, 116, 271, 274, 335  
*Solidagonemoralis*, 274  
*Solidagovirgaurea*, 273  
*Sorex sp.*, 285  
**sorgo**, 81  
*Sphaeriidae*, 302  
*Spinacea oleracea* (cv. **Subito e Dinamo**), 162-163  
**Strigiformi**, 220, 229  
*Sus scrofa*, 223  
*Sylvia atricapilla*, 221  
*Sylvia communis*, 222  
*Symphyta*, 185  
**tabacco**, 37, 46, 147, 164, 166  
**tabacco cv. Bel W-3**, 140, 161, 164, 166-167  
*Taeniopterygidae*, 302  
*Tanytarsini*, 182  
**Tardigradi**, 307  
**temolo**, 204  
**testuggine acquatica**, 213  
**testuggini**, 203, 215  
*Thalassiosira weissflogii*, 38  
*Thlaspi rotundifolium*, 273  
*Thlaspi rotundifolium ssp. caepaeifolium*, 273  
*Thlaspi sylvium*, 273  
*Thymus praecox*, 274  
*Tilia sp.*, 108  
**tinca**, 204-205  
*Tipulidae*, 302  
**topo**, 217, 223, 240  
*Tortula papillosa*, 109  
*Tortula ruralis*, 109  
**Tricladi**, 295  
**Tricotteri**, 293-294, 305  
**trifoglio**, 81  
*Trifolium repens div. cv.*, 163, 274  
*Triticum aestivum L. var. florida*, 115-116  
**tritone crestato**, 211

- tritoni*, 207  
*Triturus cristatus*, 211  
*trota*, 204-205  
*trota fario*, 205  
*trota macrostigma*, 205  
*Turdus spp.*, 226  
*Typhalatifolia*, 270  
**Uccelli**, 46, 202, 214, **216-234**, 277-278, 284, 286-290  
**Ulmacee**, 154  
*Unionidae*, 302  
**Urodeli**, 202, 207, 210, 213-214, 288  
*Ursus arctos*, 224  
*Urtica dioica*, 271  
*Urtica urens*, 163, 271  
*Utricularia intermedia*, 270  
*Vallisneria spiralis*, 54  
*Valvatidae*, 302  
*Veronica anagallis-aquatica L.*, 54  
**Vertebrati**, 201-203, 207-213, 217-218, 220, 233-235, 241-243, 285, 289  
**vespe**, 185  
*Vigna radiata*, 46  
*Viola dubyana*, 273  
*Viola spp.*, 139, 272  
**vite**, 161  
*Vitis vinifera div. cv.*, 163  
*Viviparidae*, 302  
*Vulpesvulpes*, 224  
*Xanthium italicum*, 271  
*Xanthium orientale*, 271  
*Xanthium strumarium*, 271  
*Xenopus laevis*, 247, 250, 258, 260-261, 333  
**zanzare**, 174  
*Zea mays*, 38, 116  
**Zigomiceti**, 80

**COPIA NON COMMERCIABILE  
E IN DISTRIBUZIONE GRATUITA**

*Finito di stampare  
presso "Arti Grafiche by Juri Iodice"  
di Sannazzaro, Pavia  
nel mese di maggio 1998.*

***La Fondazione Lombardia per l'Ambiente*** è stata istituita dalla Regione Lombardia nel 1986 come ente di carattere morale e scientifico per valorizzare l'esperienza e le competenze tecniche acquisite in seguito al noto incidente di Seveso del 1976. La Fondazione ha come compito statutario lo svolgimento di attività di studi e ricerche volte a tutelare l'ambiente e la salute dell'uomo con particolare attenzione agli aspetti relativi all'impatto ambientale di sostanze inquinanti. A tal fine collabora, nei propri programmi di ricerca e formazione, con le università lombarde – rappresentate nel consiglio di amministrazione – il CNR, il Centro Comune di Ricerca di Ispra e gli organismi tecnici dei principali enti di ricerca nazionali e regionali.

*Il monitoraggio affascina. Dallo sport al mondo degli affari, dalla valutazione dello stato di salute di persone e di popoli a quella della qualità della vita, dalla bontà di un prodotto ai sondaggi sull'opinione dei cittadini, non vi è settore che sfugga alla tentazione di fare classifiche e di controllare come queste si modificano nel tempo.*

*Anche l'uso strumentale e sistematico delle manifestazioni biologiche come indicatrici di perturbazioni indotte dalle attività dell'uomo sull'ambiente e il conseguente monitoraggio delle condizioni ambientali tramite bioindicatori rientrano in questo importante tipo di attività di controllo.*

*Il libro intende fare il punto su tale vivace settore della ricerca scientifica, soprattutto volto alla individuazione e alla messa a punto delle modalità e possibilità d'uso dei bioindicatori.*

*I testi offrono una panoramica delle ricerche e dei metodi di indagine scientifica percorribili per studiare e, soprattutto, controllare nel tempo l'ambiente attraverso il biomonitoraggio, non trascurando le possibilità di integrazione con il rilevamento di tipo strumentale.*

*Specialisti diversi fanno una rapida panoramica delle possibilità di biovalutazione offerte dai principali gruppi sistematici animali e vegetali, estendendo la trattazione anche ai livelli di organizzazione biologica subcellulare e a quelli di popolazioni e comunità.*