



**ANPA**

**Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente**

**INDICATORI E INDICI  
ECOTOSSICOLOGICI E BIOLOGICI  
APPLICATI AL SUOLO**

**RTI CTN\_SSC 3/2000**

**ANPA**  
**Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente**  
*Dipartimento Stato dell'Ambiente, Controlli e Sistemi Informativi*

**Indicatori e indici  
ecotossicologici e biologici applicati al suolo  
Stato dell'arte**

Carlo Jacomini (ANPA), Pina Nappi (ARPA Piemonte),  
Giancarlo Sbrilli (ARPAT), Laura Mancini (ISS)

Con il contributo di: Patrizia Casarini (ARPA Lombardia), Paola Boschetti, Alberto Maffiotti (ARPA Piemonte, Sede centrale), Anna Maria Gaffodio, Claudia Ocelli, Agostino Profeta (ARPA Piemonte, Dip. Torino), Giorgio Amprimo, Giuseppe Crivellaro, Piero Ghisolfi, Pietro Giansanti (ARPA Piemonte, Dip. Grugliasco).

Responsabile di progetto ANPA  
Antonio Pugliese



Responsabile CTN\_SSC  
Renzo Barberis

## **Informazioni legali**

L'Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente o le persone che agiscono per conto dell'Agenzia stessa non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo rapporto.

Informazioni aggiuntive sull'argomento sono disponibili nel sito Internet (<http://www.sinanet.anpa.it>).

Supervisione editoriale a cura di:  
ARPA Piemonte

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Stampato in Italia

**Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente**  
*Dipartimento Stato dell'Ambiente, Controlli e Sistemi Informativi*  
Via Vitaliano Brancati, 48  
00144 Roma

**Centro Tematico Nazionale – Suolo e Siti Contaminati**  
*c/o Arpa Piemonte - Sede Centrale*  
Via della Rocca, 49  
10123 Torino

## **PRESENTAZIONE**

Tra i principali compiti dell'ANPA, e più in generale delle Agenzie ambientali (nazionale e regionali), v'è lo sviluppo e la gestione di un moderno sistema informativo che sia in grado di fornire, con la dovuta tempestività, un quadro organico e scientificamente solido delle condizioni ambientali.

Tale sistema rappresenta la naturale evoluzione del Sistema Informativo e di monitoraggio Ambientale (SINA), le cui competenze tecniche, finanziarie e programmatiche sono state trasferite di recente dal Ministero dell'Ambiente all'ANPA.

La sua denominazione è stata modificata in SINAnet, per evidenziarne l'architettura di sistema a "rete" e "distribuito", nella quale sono considerate fondamentali l'integrazione territoriale, quella tra sistema conoscitivo e sistema dei controlli, e l'integrazione con il sistema conoscitivo comunitario. L'architettura è, quindi, caratterizzata dal decentramento e dalla specializzazione delle principali funzioni. Infatti, nella rete SINAnet operano, con ruoli e compiti diversi, numerosi soggetti: il Ministero dell'Ambiente, le regioni, l'ANPA, i Centri Tematici Nazionali (CTN), i Punti Focali Regionali (PFR) e le Istituzioni Principali di Riferimento (IPR).

In particolare, i CTN hanno il compito di supportare l'ANPA in funzioni tecniche e informative su specifiche aree tematiche, focalizzando il loro intervento soprattutto sugli aspetti operativi dello sviluppo della base conoscitiva.

Tra i prodotti del lavoro del CTN vi sono documenti di diversa tipologia: linee guida, manuali, rapporti, ecc. Tali prodotti rientrano nell'attività di pubblicazione dell'ANPA, articolata in varie Serie.

Il presente documento è una delle prime pubblicazioni del Centro Tematico Nazionale "Suolo e Siti Contaminati" (CTN\_SSC), a seguito del lavoro svolto nel corso del 1999 e dei primi mesi del 2000. Esce in una prima edizione non definitiva, allo scopo di descrivere alcune delle attività messe in campo per recuperare, per quanto possibile, i ritardi conoscitivi che la matrice suolo ha accumulato, in virtù della sua complessità intrinseca e della scarsità di ricercatori specializzati e di fondi stanziati.

Ciò è vero non solo a livello nazionale, ma anche internazionale. A tutti i livelli è necessario, infatti, affrontare la sfida della conoscenza dei suoli da un punto di vista olistico, sfida che comprende non solo la conoscenza delle componenti chimico-fisiche, ma anche di quelle biologiche ed ecotossicologiche.

Nell'ambito delle attività del CTN\_SSC, è stata conferita priorità alla raccolta degli indicatori disponibili per questa matrice. Tra gli indicatori selezionati, e nell'ottica di indirizzare le attività della prossima rete nazionale di monitoraggio dei suoli, è stata prodotta questa prima rassegna delle tecniche di analisi e monitoraggio ecotossicologico e biologico dei suoli.

Ci auguriamo che l'attività svolta dal CTN\_SSC possa effettivamente contribuire al processo in atto per colmare i *gap* conoscitivi accumulati in tanti anni e permetta di

innescare un circuito virtuoso che produca informazioni utili e necessarie, ai tecnici come ai politici, per la corretta gestione e la salvaguardia degli ecosistemi terrestri.

Questo rapporto è destinato, prima di tutto, a coloro che, nell'ambito del sistema agenziale, possono trarre vantaggio dal lavoro svolto dai colleghi impegnati direttamente nel CTN. A tutti loro si chiede di valutare con attenzione il documento, sia ai fini immediatamente operativi, sia per formulare eventuali contributi emendativi.

**Roberto Caracciolo**

ANPA, Direttore del Dipartimento  
Stato dell'Ambiente  
Controlli e Sistemi Informativi

## **PREMESSA**

### **I CENTRI TEMATICI NAZIONALI**

I Centri Tematici Nazionali (CTN) rappresentano il principale strumento di supporto operativo all'ANPA per l'espletamento di quelle attività di pertinenza nazionale e di coordinamento generale delle attività di alimentazione della base conoscitiva.

Nell'ambito di un sistema informativo distribuito a rete, come si caratterizza il SINANet assume grande importanza la definizione di regole condivise per la realizzazione ed il funzionamento del sistema a tutti i livelli territoriali. Proprio per questo il compito principale dei CTN è il supporto all'ANPA nella definizione delle regole, che si esplicita nella definizione dei dati ritenuti indispensabili per la conoscenza delle matrici ambientali, nella verifica del funzionamento del sistema di acquisizione e trasmissione di questi dati dal livello locale a quello centrale, nel supporto all'ANPA nella produzione di reporting ambientale integrato e tematico.

I CTN attivati sono sei: Atmosfera, Clima ed Emissioni in aria (ACE), Acque Interne e Marino costiere (AIM), Agenti Fisici (AGF), Conservazione della Natura (CON), Rifiuti (RIF), Suolo e Siti Contaminati (SSC).

Ogni CTN è costituito da un insieme di più soggetti a livello regionale o nazionale in cui vengono individuati:

- Una ARPA Leader, con la quale ANPA stipula una Convenzione;
- Una o più ARPA Coleader;
- Altri soggetti (ARPA e Istituzioni Principali di Riferimento).

Gli obiettivi comuni per tutti i CTN sono:

- Rassegna della domanda di informazioni, derivante in particolare da leggi e norme europee e nazionali; è stato creato un metadatabase chiamato ODN (Osservatorio della Domanda di informazione proveniente dalla Normativa) nel quale sono state catalogate tutte le domande, implicite ed esplicite, individuate dai CTN;
- Predisposizione di un set di indicatori e indici utili a rappresentare tale domanda; le diverse centinaia di indicatori complessivamente individuati dai CTN sono stati catalogati in apposite schede contenenti le metainformazioni relative alla descrizione e costruzione di ciascun indicatore; tutte le schede sono raccolte in un database sugli indicatori;
- Definizione di un set più ridotto di indicatori giudicati significativi per rispondere alla domanda di informazione nazionale; ogni CTN ha provveduto ad identificare tale set, costituito da alcune decine di indicatori, seguendo criteri comuni concordati con l'ANPA; per ognuno di questi indicatori sono state compilate delle linee guida o manuali per la loro costruzione;
- Censimento delle fonti dei dati presenti sul territorio, con particolare riferimento a quelle utili per la costruzione degli indicatori significativi; come risultato di tale censimento, è stato creato il Catalogo italiano delle fonti dei dati ambientali (FONTI), inteso anche come contributo nazionale al Catalogue of Data Sources (CDS) europeo.

- Identificazione delle carenze informative emerse attraverso il confronto fra la domanda di dati da utilizzare per l'elaborazione degli indicatori significativi e la disponibilità effettiva di dati rilevati attraverso l'analisi delle fonti.

In una fase transitoria e sussidiaria, i CTN stanno anche svolgendo i compiti di reperimento dei dati necessari alla costruzione degli indicatori; in una fase a regime tale compito spetterà ai PFR, mentre i CTN dovranno vigilare sulla correttezza dei flussi dei dati verso l'ANPA.

Un ulteriore compito dei centri tematici è quello di supportare l'ANPA nelle attività di reporting ambientale generale e tematico. Queste attività si sono per ora esplicitate sia in occasione della preparazione dei documenti relativi alla terza ed alla quarta Conferenza Nazionale delle Agenzie ambientali, sia nella redazione di report tematici specifici.

## **IL CTN “SUOLO E SITI CONTAMINATI”**

I soggetti partecipanti al CTN SSC sono:

*Leader:* ARPA Piemonte

*Co-leader:* ARPA Liguria

*Partecipanti:* ARPA Emilia Romagna

ARPA Toscana

ARPA Veneto

*IPR:* Istituto Sperimentale Nutrizione Piante – Roma

Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo – Firenze

Istituto per la Chimica del Terreno – CNR – Pisa

Sono inoltre in corso collaborazioni con l'European Soil Bureau – JRC – Ispra (VA), l'Ente di Sviluppo Agricolo (ERSAL) della Regione Lombardia, il Dipartimento di Produzione e Valorizzazione Agroalimentare (DIPROVAL) dell'Università di Bologna, sede distaccata di Reggio Emilia, il Dipartimento di Chimica Analitica (DICA) dell'Università di Torino.

Il Comitato di Gestione del CTN SSC è al momento costituito dai seguenti componenti, in rappresentanza di tutti i soggetti Istituzionali partecipanti:

- Dott. Renzo Barberis, responsabile del CTN per l'ARPA Piemonte, struttura leader;
- Ing. Antonio Pugliese, responsabile per l'ANPA;
- Dott.sa Nicoletta Dotti, referente per l'ARPA Liguria, struttura coleader;
- Dott.sa Licia Rubbi, referente per l'ARPA Emilia Romagna, partecipante;
- Dott. Carlo Righini, referente per l'ARPA Toscana, partecipante;
- Dott. Paolo Giandon, referente per l'ARPA Veneto, partecipante;
- Dott. Giannantonio Petruzzelli, referente per la IPR Istituto di Chimica del Terreno del CNR di Pisa;
- Prof. Paolo Sequi, referente dell'Istituto Sperimentale per la Nutrizione delle Piante di Roma;

- Dott. Marcello Pagliai, referente dell'Istituto Sperimentale per lo Studio e la Difesa del Suolo di Firenze.

Le attività del CTN SSC comprendono l'esame della domanda di conoscenza sul suolo derivante da atti di indirizzo, convenzioni, leggi e norme a livello europeo e nazionale, l'individuazione di indicatori e indici utili a descrivere la matrice suolo, le linee guida per la costruzione di questi indicatori e indici, il censimento delle sorgenti dei dati necessari per la formulazione di indicatori e indici e l'acquisizione dei dati disponibili, la qualificazione e l'integrazione di questi dati; il CTN si occupa inoltre di molte altre attività correlate, legate ad esempio agli standard di qualità ambientale o alle guide tecniche sui metodi di analisi.

Per facilitare l'approccio ad una matrice così complessa come il suolo, pur essendo perfettamente consci dell'unicità della matrice stessa, sono state definite quattro diverse tematiche che vogliono rappresentare quattro aspetti particolari, ampiamente correlati tra loro, del suolo:

- *Qualità dei suoli (Tema 18)* – riguarda la rappresentazione del suolo attraverso le sue caratteristiche intrinseche, che meglio lo caratterizzano come matrice naturale in grado di svolgere le numerose e ben note funzioni;
- *Degradazione fisica e biologica del suolo (Tema 19)* – considera gli aspetti di degradazione della matrice suolo che, soprattutto nell'ultimo secolo, hanno portato o rischiano di portare ad una perdita di parte del suolo o delle sue funzionalità a causa del verificarsi di fenomeni degradativi o di utilizzo del suolo che possono considerarsi irreversibili, almeno nella scala temporale umana;
- *Contaminazione dei suoli da fonti diffuse (Tema 20)* – considera quegli aspetti qualitativi del suolo che possono essere progressivamente compromessi da un utilizzo dello stesso, soprattutto da parte dell'uomo, con modalità tali da non rispettare i naturali tempi di riequilibrio, vale a dire tali da compromettere la funzione del suolo come filtro biologico;
- *Contaminazione puntuale del suolo e siti contaminati (Tema 21)* – considera uno dei fenomeni più preoccupanti degli ultimi decenni, vale a dire il moltiplicarsi di situazioni di forte contaminazione di superfici ben definite di suolo da parte di attività antropiche, con necessità di interventi di bonifica che, spesso, non sono in grado di restituire al suolo la sua piena funzionalità.

Il CTN SSC esplica inoltre diverse attività di supporto all'ANPA sulle tematiche specifiche.



## SOMMARIO

Questo rapporto è stato redatto nell'ambito delle attività del Centro Tematico Nazionale "Suolo e Siti Contaminati" (CTN SSC). Alla sua realizzazione hanno collaborato tecnici dell'ANPA, dell'ARPA Piemonte, dell'ARPA Toscana e dell'Istituto Superiore di Sanità.

Il lavoro presenta lo stato dell'arte della conoscenza della matrice "suolo" in relazione agli aspetti ecotossicologici e biologici; conoscenza che deve ancora colmare una serie di ritardi tecnici negli strumenti a disposizione.

Pur riconoscendo l'importanza fondamentale del suolo per fornire il sostentamento alla vita, i suoli sono tra gli *habitat* meno studiati. Obiettivo di questo rapporto è di fare il punto della situazione sugli indicatori e indici ecotossicologici e biologici per il suolo, e di individuare, dopo un'adeguata diffusione tra gli esperti del settore, alcune linee di ricerca prioritaria da sviluppare e mettere a punto per il territorio nazionale, sia nell'ambito del sistema agenziale ANPA/ARPA/APPA, sia con gli Enti di ricerca, sia con le università.

Successivamente sarà trasferito il processo conoscitivo agli operatori del settore, al fine di attivare un monitoraggio biologico anche per questa matrice, con un eventuale inserimento della normativa di settore.

È riportato un conciso, ma esaustivo, *excursus* sugli strumenti ecotossicologici e biologici per lo studio dei suoli, attraverso la definizione anche dei bioindicatori, bioaccumulatori, dei saggi e degli indici. Si scende poi in dettaglio, riportando alcune metodologie per la valutazione della tossicità del suolo mediante organismi *test* allo scopo di effettuare prove di tossicità acuta e cronica, sia su elutriati, sia su matrice solida, vengono inoltre prese in esame le metodiche genotossicologiche.

Il lavoro riporta anche un aggiornamento sui più diffusi indici biologici del suolo: Maturity Index (nematodi), Indice di Qualità, rapporto Acari/Collemboli (microartropodi). In appendice si trova un'esauriva bibliografia.

## SUMMARY

This report is one of the results of the first years of activity of the Italian National Topic Centre "Soils and Contaminated Sites" (CTN SSC). It is the product of a joint collaboration among technical-scientific experts of Italian National Environment Protection Agency (ANPA), Regional Environment Protection Agencies of Tuscany (ARPAT) and Piedmont (ARPAP), and of National Health Institute (ISS). This work is the state of the art of ecotoxicological and biological knowledge on soils, which still has several technical gaps and delays in its available operative tools.

Although the fundamental importance of soil to sustain life is acknowledged, soils are poorly studied. Aims of this report are: to check out the situation on ecotoxicological and biological indicators and indices, and to illustrate, after a wide dissemination among the sector experts, some priority research lines to develop and set up for the whole Country within the agency system (ANPA/ARPA/APPA), as well as with Research Institutions and Universities.

A second phase will transfer the cognitive process to sector operators, so as to develop a biological monitoring even for this matrix, hopefully finding also some space in the sector normative.

A concise, yet exhaustive, review of ecotoxicological and biological tools to study soils is reported, with definitions of bioindicators, bioaccumulators, tests and indices. Moreover, details are given on some methodologies to assess soil toxicity by means of test organisms, to perform chronic and acute toxicity tests, both on elutriates and solid matrix, in addition to genotoxicology.

This report presents also a review on the widespread and more used soil biological indices: Maturity Index (nematodes), Quality Index, Mites/Springtails Ratio (microarthropods). A short synthesis of other methodologies used to characterise soils is also given. A broad bibliography is appended.



## INDICE

<b>PRESENTAZIONE.....</b>	<b>III</b>
<b>PREMESSA.....</b>	<b>V</b>
<b>SOMMARIO.....</b>	<b>VIII</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>VIII</b>
<b>INDICE.....</b>	<b>XI</b>
<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
<b>1. STRUMENTI BIOLOGICI PER VALUTARE LA QUALITÀ DEL SUOLO.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1 Bioindicatori.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Bioaccumulatori.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Saggi ecotossicologici.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4 Indici .....</b>	<b>8</b>
<b>2. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ DEL SUOLO.....</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Prove di tossicità acuta e cronica su elutriati.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Prove di tossicità su matrice solida.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Genotossicologia.....</b>	<b>15</b>
<b>3. VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DEL SUOLO.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 I nematodi.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2 L'indice di qualità (IQ).....</b>	<b>19</b>
<b>3.3 Il rapporto Acari/Collemboli.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4 Altre metodologie.....</b>	<b>21</b>
<b>CONSIDERAZIONI FINALI.....</b>	<b>22</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>24</b>

## **INTRODUZIONE**

### *Prefazione*

Questo rapporto è nato dalla necessità di disporre di strumenti conoscitivi per l'analisi ecotossicologica e il biomonitoraggio dei suoli. Nell'ambito delle attività del Centro Tematico Nazionale "Suolo e i Siti Contaminati" (CTN SSC), è sembrato importante partire dalla sintesi delle conoscenze in questi settori, per avviare quindi un processo conoscitivo interno al sistema agenziale ANPA/ARPA/APPA.

Lo sviluppo di tecniche utili alla conoscenza del suolo, per quanto riguarda i comparti ecotossicologico e biologico, è attività di ricerca relativamente recente. Soltanto negli ultimi anni, infatti, si è sancita con studi a livello mondiale l'importanza della biodiversità nell'ecologia dell'ecosistema suolo e, soltanto a metà degli anni '90, ricercatori a livello internazionale hanno proposto una caratterizzazione dei suoli basata sui saggi ecotossicologici e sulla matrice biologica.

Questo lavoro non vuole essere un punto d'arrivo, bensì mettere le basi per avviare, a livello nazionale, lo studio organico di questa matrice, individuando nel campo dell'ecotossicologia e della biologia del suolo linee di ricerca applicative da sviluppare in tempi brevi. In questo senso, l'ecotossicologia riveste un ruolo fondamentale per valutare gli effetti su alcuni organismi bersaglio, informazione ancora difficile da trasferire a tutti i livelli della catena trofica e alla conoscenza dell'ecosistema.

Disponiamo, per il settore ecotossicologico, di prove messe a punto per le acque. I saggi sugli organismi bersaglio strettamente legati al suolo sono in numero molto ristretto e spesso utilizzano specie non presenti nel nostro Paese. Gli sforzi futuri dovranno essere volti a poter mettere a punto prove con organismi autoctoni, rappresentativi della rete trofica dell'ecosistema suolo.

Per quanto riguarda invece lo sviluppo di indicatori biologici, si dispone già di alcuni studi effettuati in maniera discontinua sul territorio nazionale. Andranno, quindi, selezionati i gruppi più rappresentativi e le tecniche adatte, da sperimentare su aree campione.

La sede idonea per tale sperimentazione potrebbe essere la Rete Nazionale di Monitoraggio dei Suoli, che è in fase di progettazione e che potrà essere attivata in breve tempo.

Tutto questo potrà apportare quindi valore aggiunto allo studio dell'ecosistema suolo, in modo da indirizzare lo studio settoriale verso una visione finalmente olistica.

## *Il suolo*

Il suolo è un'entità vivente molto complessa, in grado di respirare, di assimilare elementi utili quali il carbonio e l'azoto, di degradare e mineralizzare i composti organici, di accumulare sostanze di riserva sotto forma di *humus*. Queste funzioni sono dovute all'innumerabile quantità di organismi micro e macroscopici che popolano il terreno e che intervengono attivamente con il loro metabolismo sulla composizione dello stesso, trasformandolo e rigenerandolo.

L'energia entra in questo sistema principalmente tramite la degradazione della materia organica morta, ossia dei residui delle piante e degli animali. La fertilità di un suolo naturale dipende quindi in modo significativo dalla velocità di trasformazione della materia organica, mediata dalla flora batterica.

Qualsiasi contaminazione del suolo, che inibisca o elimini i microrganismi in esso presenti o che modifichi la quantità e la qualità della materia organica, può portare un danneggiamento a breve o a lungo termine dell'intero ecosistema vegetazione-suolo. Nei terreni agricoli, la fertilità può essere incrementata applicando concimi organici o inorganici. La fertilità di un ecosistema naturale, invece, dipende quasi esclusivamente dai processi microbiologici (fissazione di N<sub>2</sub>, mineralizzazione di N, C, P, e S organico, trasformazioni della sostanza organica). In un ecosistema naturale, un declino della fertilità dovuto a sostanze o elementi tossici avrà, quindi, effetti proporzionalmente più importanti.

Purtroppo, al momento i suoli sono tra gli *habitat* meno studiati. I principi ecologici che la ricerca ha prodotto a livello macroscopico relativamente al suolo sono spesso trasferiti senza adattamento agli organismi che lavorano su scala microscopica, dando fondamenta incomplete per la previsione della sostenibilità. Ciò nonostante, gli ecologi hanno ripetutamente mostrato l'importanza del *biota edafico* per processi ecosistemici, come il riciclo dei nutrienti, l'accumulo di carbonio e il mantenimento della diversità vegetale, e inoltre, con studi che includono molti *taxa* all'interno di gruppi funzionali o trofici, per il controllo dei parassiti in agricoltura, per la biotecnologia e per la rimediazione dei rifiuti tossici. Chiaramente, tutte le specie del biota edafico sono strettamente legate alle interazioni biotiche che avvengono al di sopra del suolo e svolgono servizi ecologici che hanno un forte impatto sulla qualità della vita umana, oltre ad avere un enorme potenziale per produrre ulteriori benefici economici.

Il *biota edafico* è, tra le forme di vita del nostro pianeta, ancora una frontiera inesplorata, a dispetto della sua importanza critica per comprendere il funzionamento dell'ecosistema. Infatti, migliaia di specie di microbi e invertebrati popolano un singolo metro quadrato di suolo temperato, organismi che ampiamente ignoriamo sia per identità sia per il loro contributo al sostentamento della biosfera. Benché gli studi sulla biodiversità a livello mondiale abbiano evidenziato la carenza di studi sugli organismi edafici, esistono pochi scienziati con esperienza sulla tassonomia o l'ecologia del suolo.

Nel 1989, il *National Science Board* della *National Science Foundation* (1994) pubblicò un rapporto che aveva come obiettivo l'immediata collaborazione tra enti di ricerca internazionali sulla biodiversità del suolo. Più recentemente, diversi sforzi internazionali hanno riconosciuto il divario tra biota edafico e iperedafico, e hanno proposto una

caratterizzazione dei suoli (Heal *et al.*, 1993) e della loro componente biotica (Groombridge, 1992; Hawksworth & Ritchie, 1993; National Research Council, 1993).

Da un punto di vista generale, le reti trofiche che si possono individuare nel suolo sono riconducibili a tre grandi categorie (Ghilarov, 1949; Pokarzhevskii, 1996; Lavelle, 1997):

- le micro-reti, in cui interagiscono i microrganismi (batteri, alghe, lieviti e funghi) e gli animali più piccoli di 0,2 mm (protozoi, rotiferi, nematodi, tardigradi, ecc.), legate alla pellicola d'acqua nelle cavità del suolo, alla rizosfera e alla lettiera;
- le meso-reti, dove interagiscono tra loro i cosiddetti trasformatori della lettiera (mesofauna, animali compresi tra 2 e 0,2 mm), principalmente acari, collemboli, larve di ditteri e di coleotteri, enchitreidi, pseudoscorpioni, alcuni miriapodi, ecc., legate ai pori del suolo;
- le macro-reti, dove si rileva la presenza di organismi di dimensioni maggiori di 2 mm, e che tradizionalmente includono i cosiddetti "ingegneri del suolo", come termiti, formiche e lombrichi, ma in cui vanno inseriti anche molluschi, coleotteri, miriapodi, isopodi e vertebrati quali le talpe, in grado di spostarsi liberamente nel suolo.

Ciascun organismo in questi tre sistemi è legato agli altri direttamente o indirettamente, ma per lo più ne è indipendente per quanto riguarda le risorse alimentari. Le micro-reti, principalmente per quanto riguarda batteri, alghe e protozoi, svolgono un ruolo fondamentale a livello locale, partecipando alla formazione di associazioni di specie ed esercitando funzioni indispensabili, sebbene in un'area d'azione assai ristretta, nell'ordine di qualche centimetro cubico. Il tempo di sviluppo di una sequenza successionale (tempo ecologico) è dell'ordine di giorni o mesi; il tempo di *turnover biologico* (cioè quello necessario ai flussi di nutrienti per ricolmare le riserve di nutrienti) varia da un giorno a una settimana.

Le meso-reti hanno una funzione di regolazione e disseminazione delle micro-reti, di apertura e rivestimento dei microcanali di aerazione del suolo, di triturazione e digestione della materia organica in decomposizione (che aumenta la superficie attaccabile dalle micro-reti), e di formazione di complessi organici e organo-minerali che sequestrano alcune sostanze e ne mobilizzano altre. L'ordine di grandezza spaziale varia da qualche centimetro a pochi metri; il tempo ecologico varia da una settimana ad alcuni mesi, il tempo di *turnover biologico* da giorni a mesi.

Le macro-reti possono modificare in modo notevole anche ampi tratti di terreno (si pensi a un termitaio), scavando cavità che permettono una circolazione condotta dell'acqua, consumando in misura rilevante la sostanza organica in decomposizione e controllando in numero e qualità le sottostanti reti. Il tempo ecologico varia da qualche settimana a mesi, quello di *turnover biologico* impiega mesi o anche anni (Pokarzhevskii, 1996).

## 1. STRUMENTI BIOLOGICI PER VALUTARE LA QUALITÀ DEL SUOLO

Nel presente capitolo vengono riportati i principali strumenti biologici ed ecotossicologici che possono essere applicati al suolo.

L'*ecotossicologia* è la scienza che, utilizzando metodi e concetti propri della tossicologia, applica i principi dell'ecologia e della chimica ambientale allo studio degli effetti delle sostanze tossiche sugli ecosistemi. Inizialmente l'utilizzo di *test* biologici era rivolto unicamente alla definizione di quanto già accaduto; attualmente, la prospettiva nella quale si inseriscono i test biologici include l'approccio predittivo, utilizzando le analisi come strumento previsionale per la valutazione del rischio ambientale.

Un *saggio ecotossicologico* è una prova che utilizza un sistema biologico come bersaglio. Essa richiede che un organismo vivente sia posto a contatto per un determinato periodo con una sostanza in esame e che si valuti la risposta mostrata dall'organismo (Maffiotti *et al.* 1997).

Da un punto di vista tossicologico, un organismo vivente è costituito da diversi siti, ciascuno dei quali svolge differenti funzioni (immissione, accumulo, azione, metabolismo ed escrezione). L'*immissione* corrisponde ai modi d'ingresso dell'inquinante nell'organismo (contatto, ingestione).

Nei siti di *accumulo*, gli xenobiotici sono in stato inerte dal punto di vista tossicologico, almeno finché il sito (in genere si tratta di depositi di grasso, micelle lipoproteiche, o membrane cellulari) non viene metabolizzato (ad es. in seguito a malattia, denutrizione o migrazione, ma anche nel periodo riproduttivo). Nei siti di *azione* (tossica), la sostanza interagisce con una macromolecola endogena (ad es., una proteina o il DNA) o con una struttura (ad es., una membrana) e tale interazione causa il manifestarsi dell'effetto tossico in tutto l'organismo. I siti di *metabolismo* sono essenzialmente gli enzimi che metabolizzano gli xenobiotici. Questo processo avviene solitamente in due fasi, una prima biotrasformazione, tramite ossidazione, idrolisi, idratazione o riduzione, che determina in genere la produzione di *metaboliti* con gruppi idrossile, ed una seconda fase in cui il metabolita attraversa reazioni di coniugazione fino a trasformarsi in un *coniugato*. La maggior parte delle volte il metabolismo determina una detossificazione, ma in alcuni casi anche l'attivazione delle sostanze tossiche. I siti di *escrezione* eliminano il composto originale o un prodotto della sua biotrasformazione (un metabolita o un coniugato), se gli organismi sono esposti a composti xenobiotici idrofobici, l'escrezione avviene soprattutto sui prodotti della biotrasformazione (più polari).



In termini tossicocinetici, i compartimenti entro cui si può dividere l'organismo (non necessariamente corrispondenti ai siti succitati, ma piuttosto agli organi e tessuti interessati dall'azione della sostanza xenobiotica) contengono quantità discrete di xenobiotico soggette a particolari tassi di trasferimento e biotrasformazione. La modellizzazione di questi compartimenti spesso semplifica esageratamente i complessi percorsi metabolici. Per taluni organismi, tuttavia, l'organismo può essere considerato come un unico compartimento, semplificando la descrizione del modello. In tali organismi, l'esposizione a un livello costante di inquinante causa l'incremento della concentrazione nell'organismo per un certo periodo di tempo. Il tasso d'ingresso della sostanza nell'organismo è rapido, finché non si raggiunge un plateau, e allora si dice che il sistema è in "steady-state", in cui l'immissione della sostanza si equilibra con l'escrezione. Se cessa l'esposizione, la concentrazione nell'organismo dell'inquinante inizia a diminuire. In questi casi semplici, la formulazione di modelli lineari aiuta a seguire la cinetica della sostanza (come ad es.  $-dC/dt = KC$ , o  $C_t = C_0 e^{-Kt}$ , dove  $C$  è la concentrazione nell'organismo,  $C_0$  è la concentrazione al momento in cui cessa l'esposizione,  $C_t$  è la concentrazione al tempo  $t$ ,  $K$  è il tasso di perdita fisso e  $-dC/dt$  è il tasso di perdita della sostanza da parte dell'organismo). I fattori di bioconcentrazione o bioaccumulo hanno poco o nullo valore se prima non è stato raggiunto lo "steady-state", dato che si applicano solo a particolari periodi di tempo, e non indicano le concentrazioni massime che possono essere toccate.

Per "*Fattore di Bioconcentrazione*" (BCF) si intende la concentrazione nell'organismo/ concentrazione nell'ambiente e per "*Fattore di Bioaccumulo*" (BAF) si intende il rapporto tra la concentrazione nell'organismo e la concentrazione nel cibo o nell'acqua ingeriti.

## 1.1 Bioindicatori

Gli organismi vengono definiti "bioindicatori" quando, in presenza di concentrazioni di inquinanti, subiscono variazioni rilevabili del loro stato naturale. Un organismo può quindi essere considerato un buon bioindicatore qualora manifesti reazioni identificabili a differenti concentrazioni di dati inquinanti. I principali sintomi o *endpoints* presi in considerazione sono generalmente i seguenti:

- variazioni nella struttura della comunità;
- modificazioni morfologiche;
- variazioni della vitalità (modificazioni fisiologiche);
- danni al patrimonio genico.

Più organismi insieme possono essere utilizzati quali bioindicatori, in particolare modo quando i fenomeni inquinanti provocano variazioni misurabili a livello di ecosistema o di comunità. È prassi ormai consolidata il valutare la tossicità di matrici complesse, quali quelle ambientali, mediante una batteria di bioindicatori, allo scopo di analizzare il più ampio spettro di effetti su organismi con risposte differenti ai vari composti presenti nelle matrici.

Un buon bioindicatore dovrebbe possedere le seguenti caratteristiche:

- sensibilità agli inquinanti;
- ampia distribuzione nell'area di indagine;
- scarsa mobilità;
- lungo ciclo vitale;
- uniformità genetica.

Le attività di bioindicazione possono essere condotte su vari livelli d'integrazione biologica. Secondo Van Gestel e Van Brummelen (1996), il termine bioindicazione è riservato a tutte le attività a livello dell'organismo (intero organismo) o superiore (popolazioni, comunità, ecosistemi).

Si ricorda ancora una volta che un buon bioindicatore è tale quando esiste una relazione quantitativa tra la risposta biologica e le concentrazioni di esposizione a un inquinante.

## **1.2 Bioaccumulatori**

Il termine di bioaccumulatore si impiega quando le concentrazioni di determinate sostanze inquinanti all'interno di un organismo sono utilizzate per la ricostruzione dei patterns di deposizione nell'ambiente in cui l'organismo vive. I Bioaccumulatori sono, quindi, organismi in grado di sopravvivere alla presenza di un contaminante, assimilato dalle matrici ambientali (aria, acqua, suolo), accumulandolo e permettendone una qualificazione e una quantificazione.

Un buon bioaccumulatore deve possedere i requisiti di seguito indicati:

- alta tolleranza agli inquinanti che sono oggetto della sperimentazione;
- capacità di accumulare indefinitamente;
- ampia distribuzione nell'area di studio;
- scarsa mobilità;
- lungo ciclo vitale.

Anche nel caso degli organismi bioaccumulatori è importante la definizione di una relazione biunivoca tra le concentrazioni degli inquinanti nell'ambiente e quelle all'interno del bioaccumulatore stesso. Gli organismi bioaccumulatori sono attualmente utilizzati in molte reti di sorveglianza allestite sul territorio europeo, come nel caso del progetto GEMS (*Global Environment Monitoring System*), nel quale sono utilizzate le proprietà accumulatrici di muschi e licheni per quanto riguarda i metalli pesanti. Altri organismi bioaccumulatori, quali i mitili, sono impiegati nei programmi di monitoraggio della qualità delle acque marine costiere, stante la loro capacità di accumulare al loro interno metalli pesanti, sostanze organiche e microrganismi patogeni. Infine, anche insetti quali le api possono essere considerate dei bioaccumulatori e sono impiegate nella valutazione del fall-out di metalli pesanti, fitofarmaci e sostanze radioattive.

### 1.3 Saggi Ecotossicologici

Gli anni recenti hanno visto una proliferazione di termini simili e che in parte si sovrappongono.

La misurazione di variabili biochimiche e fisiologiche negli individui o nei loro prodotti d'escrezione, che fornisce informazione sull'esposizione o sul danno, generalmente va sotto il nome di *Biomarker* (McCarthy & Shugart, 1990). Il termine *Bioreporter System* è usato per un uno strumento molecolare, spesso utilizzando cellule modificate geneticamente, per trasformare la presenza di una sostanza chimica in un segnale facilmente misurabile, come la luminescenza (Aarts *et al.*, 1993). Un *Biosensore* (chiamato anche *Bioprobe*), vedi Rawson (1993), è un mezzo fisico che permette di percepire una sostanza chimica come un segnale elettrico derivato da un biocatalizzatore, come un enzima o un anticorpo. Un *Bioassay* è un sistema di saggio ecotossicologico, generalmente di breve durata e con un protocollo definito, in cui l'attività di una sostanza chimica è misurata come un effetto avverso su alcune specie *test*. Infine, tutte queste attività possono essere ripetute nel tempo, ciò è in genere chiamato *Biomonitoraggio* (Hopkin, 1993).

La finalità del biomonitoraggio è di indicare la "salute" degli ecosistemi in cui si sospetta che sia stata rilasciata una concentrazione biologicamente significativa di un inquinante. Hopkin (1993) identifica quattro possibili approcci per monitorare gli effetti dell'inquinamento sugli ecosistemi: 1) valutare l'impatto sulla struttura della comunità; 2) misurare le concentrazioni dell'inquinante nei tessuti di specie sentinella; 3) quantificare gli effetti sulla *performance* individuale; e 4) rilevare la presenza di razze alterate geneticamente, resistenti agli inquinanti.

Il biomonitoraggio si vale delle variazioni ecologiche indotte dalle alterazioni dell'ambiente; queste ultime si manifestano in modo più o meno evidente a tre diversi livelli:

- accumulo di sostanze inquinanti negli organismi;
- modificazioni morfologiche e strutturali degli organismi;
- modificazioni nella composizione delle comunità animali e vegetali.

Alcuni inquinanti possono essere assimilati dagli organismi in misura maggiore di altri. Ciò può essere misurato tramite il fattore di *bioconcentrazione* (BCF).

Con le sostanze inorganiche, l'entità del *bioaccumulo* a lungo termine dipende dal tasso di escrezione. Per esempio, animali con uno scheletro, un esoscheletro o un guscio calcareo accumulano piombo o stronzio in maggiori quantità di organismi senza tali strutture, perché le sostanze citate seguono i percorsi metabolici del calcio che, nei primi organismi, sono evoluti per un'elevata efficacia di assimilazione.

Le metodiche tossicologiche sono utilizzate per la determinazione e la valutazione degli effetti tossici acuti e cronici esercitati da matrici ambientali contaminate, su organismi o gruppi ad esse esposte.

L'effetto *tossico acuto* si evidenzia in un lasso di tempo breve e, comunque, inferiore al tempo di generazione dell'organismo in esame, e prevede la valutazione di *endpoints* facilmente evidenziabili quali, ad esempio, l'immobilizzazione o la morte degli organismi impiegati nei saggi.

L'effetto *tossico cronico* si sviluppa, viceversa, in un periodo di tempo più elevato, può coinvolgere più generazioni di individui esposti e produce risposte che non compromettono la sopravvivenza degli organismi.

La tossicità viene, di solito, ricercata su matrici liquide che possono essere costituite da campioni di acque di scarico, acque superficiali, acque di falda, eluati<sup>1</sup> o elutriati<sup>2</sup> di matrici solide quali, ad esempio, i sedimenti fluviali.

L'utilizzo di organismi viventi in prove di tossicità è codificato in precise metodologie e protocolli applicativi che si rinvencono in moltissime normative tecniche nazionali e internazionali.

## 1.4 Indici

Il monitoraggio delle comunità di macroinvertebrati è usato ampiamente nei sistemi acquatici. Nei primi tempi, gli schemi erano basati sulle risposte della comunità al rilascio di nutrienti nelle acque dolci. I siti venivano valutati con un numero che rappresentava il "punteggio" che si assegnava a una data contaminazione (Reynoldson & Metcalfe-Smith, 1992, Metcalfe, 1989). Tali sistemi a punteggio erano adatti per valutare l'arricchimento organico, ma non erano applicabili per valutare l'impatto di diversi inquinanti, dato che le sensibilità relative dei diversi taxa possono variare. Una seconda generazione di schemi si concentrava su misure di ricchezza ed equilibrio nella distribuzione degli individui tra le specie, e portò allo sviluppo di indici di diversità come quelli di Shannon Wiener e di Simpson. Benché essi siano ancora usati nell'analisi dei monitoraggi, la loro utilità è stata ridimensionata, sia perché le conclusioni tratte in alcuni sistemi non sono sempre valide in altri, sia perché non sempre la diversità decresce con l'aumento della concentrazione dell'inquinante (Bengtsson & Rundgren, 1984, 1988; Hopkin, 1993). Un sistema più recente per valutare lo schema delle comunità è il *River Invertebrate Prediction and Classification System* (RIVPACS), un modello con molte variabili per predire la fauna presente in un sito inalterato dalle caratteristiche note. Le comunità rilevate possono essere comparate con quelle calcolate dal modello, permettendo una valutazione dei potenziali effetti biotici dell'inquinamento (Wright *et al.*, 1989). Questo sistema consente di prevedere le abbondanze relative, i punteggi biotici e la presenza di specie e famiglie.

---

<sup>1</sup> Eluato: rimozione di una sostanza adsorbita su una matrice porosa per mezzo di un flusso di solvente.

<sup>2</sup> Elutriato: processo di rimozione mediante lavaggio, da una matrice solida, di particolato fine e sostanze solubili.

Rispetto ad altre matrici (aria, acqua), la ricerca e l'applicazione di strumenti biologici per identificare la qualità biologica del suolo mostrano ancora un notevole ritardo, imputabile soprattutto alle carenze conoscitive sugli ecosistemi edafici e sui loro singoli componenti. A oggi, si hanno esperienze sperimentali e applicative che fanno principalmente riferimento ai tre strumenti biologici (bioindicatori, bioaccumulatori, saggi ecotossicologici); il monitoraggio delle comunità del suolo è in uno stadio di sviluppo iniziale.

A titolo di esempio è utile ricordare tra i bioindicatori i *macroinvertebrati* che si rinvencono nei corsi d'acqua dolce e i *licheni epifiti*. I primi sono utilizzati per la valutazione della qualità ambientale delle acque correnti mediante l'impiego dell'*Indice Biotico Esteso* (IBE) (Ghetti, 1997), mentre i secondi sono utilizzati per la valutazione della qualità dell'aria previa determinazione dell'indice IAP (*Index of Atmospheric Purity*), indice che attualmente viene definito come BL (Biodiversità Lichenica) (Nimis, 1999).

## 2. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ DEL SUOLO

Rispetto all'acqua e all'aria, il suolo appare immobile e spazialmente eterogeneo. I costituenti dei vari tipi di suolo possiedono una gran capacità di trattenere contaminanti ambientali, specialmente quelli costituiti da molecole apolari o da ioni bi-trivalenti carichi positivamente; in conseguenza di ciò, il suolo si comporta come una trappola per gli inquinanti e la sua concentrazione è in genere più alta rispetto a quella degli altri comparti ambientali.

Per effettuare una stima dei rischi ecologici da dati residui, è necessario conoscere le concentrazioni dell'organismo oltre le quali le funzioni fisiologiche sono irreversibilmente compromesse. Le concentrazioni corporee letali (*Lethal Body Concentrations* - LBCs) possono essere stimate a seguito di esperimenti in cui l'incremento della mortalità con il tempo d'esposizione è osservato in connessione con la concentrazione di metalli nel corpo. Per esempio, le LBCs per il cadmio sono state stimate per diversi rappresentanti della comunità di invertebrati del suolo. La tossicità può essere misurata come LC<sub>50</sub> (50% di concentrazione letale, che rappresenta la concentrazione di una sostanza che provoca la mortalità del 50% degli organismi). Può anche essere valutata l'EC<sub>50</sub> (50% di concentrazione efficace), diversa dall' LC<sub>50</sub> in quanto l'effetto misurato potrebbe non essere la morte.

Nel considerare le prove ecotossicologiche per la valutazione dei contaminanti presenti nei suoli, le specie utilizzate dovrebbero essere selezionate sulla base della loro rappresentatività entro la comunità ecologica presente nel suolo. I criteri da utilizzarsi nel reperire tali specie dovrebbero tener presente le similarità tossicologiche tra specie tassonomicamente vicine. A tale riguardo uno studio condotto su quattro specie di lombrichi (Neuhauser *et al.*, 1986) suggerisce che le correlazioni tra le EC<sub>50</sub> delle specie siano assai elevate.

Le determinazioni sulla tossicità dei suoli possono essere condotte sia direttamente sulla matrice solida sia su campioni di elutriato. Questi ultimi subiscono gli stessi trattamenti effettuati sulle matrici acquose e, a tale proposito, è auspicabile che quanto prima le prove che coinvolgono gli elutriati, siano standardizzate e recepite nelle normative tecniche ufficiali.

Le prove di tossicità condotte direttamente sulla matrice solida risentono, a differenza delle normali prove di tossicità acquatica, delle interazioni tra il suolo e il componente tossico, interazioni che esercitano effetti non trascurabili sulla biodisponibilità delle sostanze tossiche. Anche in questo campo risulterebbe necessario standardizzare i sistemi di esposizione al fine di ottenere risultati tra loro comparabili.

## 2.1 Prove di tossicità acuta e cronica su elutriati

### *Preparazione dell'elutriato acquoso*

La preparazione dell'elutriato per prove tossicologiche non è codificata in Italia.

L'elutriato è preparato utilizzando acqua *standard* con caratteristiche chimiche predefinite; il rapporto tra matrice solida e acqua *standard* può variare a seconda dei metodi da 1/4 (V/V) a 1/10 (V/P). Il tempo di contatto tra matrice solida e solvente risulta di circa 24 ore. L'elutriato può essere filtrato e, quindi, sottoposto a prove di tossicità.

### *Prove di tossicità acuta*

Le prove condotte su elutriati di sedimenti fluviali e marini possono essere ritenute un patrimonio ormai acquisito da parte di alcuni laboratori di ecotossicologia dell'ARPA Piemonte nonché dell'ARPA Lombardia e dell'ARPA Toscana. Allo stesso modo sono da ritenersi consolidate le esperienze tossicologiche condotte sul terreno tal quale, eseguite presso l'ARPA Lombardia e l'ARPA Toscana. Per quanto attiene alle prove di tossicità, è utile ribadire la similitudine tra le indagini condotte sui sedimenti e le prove eseguite su campioni di suolo. In entrambi i casi l'approccio prevede l'estrazione con mezzo acquoso o, per indagini particolari, tramite solventi caratteristici dei composti presenti all'interno della matrice e in essi solubili, e la successiva risospensione di tali estratti in un mezzo non tossico nei confronti del bioindicatore che si intende utilizzare nello studio ecotossicologico. L'estrazione con mezzo acquoso consente di simulare il lavaggio dei suoli contaminati da parte delle acque meteoriche.

### *Prova di tossicità con batteri luminescenti ("Vibrio fischeri")*

La prova si basa sulla riduzione dell'emissione luminosa da parte di batteri bioluminescenti sottoposti a contatto con una sostanza che risulta tossica a un controllo. La risposta si ottiene, di regola, in tempi brevi (5, 15 e 30 minuti). La produzione di luce scaturisce da una reazione enzimatica in cui l'enzima luciferasi ossida un'aldeide alifatica ad acido carbossilico con emissione luminosa. Il risultato è riportato come EC<sub>50</sub>, che consiste nella concentrazione efficace della sostanza tossica in grado di causare un decremento del 50% della luminosità batterica rispetto al controllo dopo un tempo fissato di esposizione. La prova risulta normata in Italia con il seguente riferimento: IRSA-CNR, 1996, giugno 1996: 1-8.

### *Prova di tossicità con "Daphnia magna"*

Il crostaceo *Daphnia magna* viene considerato particolarmente adatto alle prove di tossicità poiché è ubiquitario, è maneggevole per le sue dimensioni e perchè il suo allevamento richiede costi e spazi limitati. Inoltre è reperibile tutto l'anno, presenta un buon livello di sensibilità ai tossici, origina individui geneticamente identici, in numero elevato, con accrescimento isomorfo. La prova di tossicità acuta dura 24 ore in

condizioni di temperatura di 20 °C e con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. La risposta della prova consiste nell'immobilizzazione dei crostacei. Il risultato è riportato come IC<sub>50</sub> che consiste nella concentrazione della sostanza tossica capace di causare l'immobilizzazione del 50% della popolazione esposta dopo un tempo fissato di esposizione. La prova risulta normata in Italia con il seguente riferimento: IRSA-CNR, 1996, giugno 1996: 1-8.

#### *Prova di tossicità con Chironomidi*

In Italia non sono disponibili prove standardizzate con questi insetti, ma esistono protocolli approvati da alcune organizzazioni internazionali come l'OCSE e l'USEPA. L'OCSE ha predisposto un documento *draft* sulle linee guida per valutare gli effetti dell'esposizione prolungata a fitofarmaci e a inquinanti industriali sulle larve bentoniche dei ditteri chironomidi *Chironomus riparius*, *C. yoshimatsui* e *C. tentans* (OCSE, 1998). Per *C. riparius* e *C. tentans* sono disponibili alcuni protocolli sviluppati negli Stati Uniti, in Canada e in Europa (ASTM/E, 1993; BBA, 1995; Environment Canada, 1994; European Commission, 1994; SETAC, 1993; US-EPA, 1994, 1996a, 1996b), nonché dei ring-test (BBA, 1995; US-EPA, 1996c). Possono anche essere usate altre specie ben documentate come, per esempio, *C. yoshimatsui* (Sugaya, 1997).

#### *Prova di inibizione dell'allungamento dell'apparato radicale*

Questa prova valuta la fitotossicità del suolo attraverso la verifica dell'eventuale effetto di prodotti fitotossici sulla germinazione dei semi. Il saggio prende in considerazione la germinazione e l'accrescimento radicale dei semi di *Lepidum sativum* (crescione inglese), pianta particolarmente sensibile alla presenza di fattori fitotossici, dopo un periodo di incubazione a 27°C per 24 ore. Il campione, portato a una umidità dell'85%, viene lasciato in contatto con acqua distillata per 2 ore; sull'estratto acquoso ottenuto, sia tal quale che diluito, si effettua il test di germinazione su 5 repliche con 10 semi di *Lepidum sativum* posti in capsula Petri, contenente carta bibula. Dopo incubazione si contano i semi germinati e la loro lunghezza radicale. Si determina l'indice di germinazione Ig come percentuale di semi germinati per la loro lunghezza radicale rispetto al controllo (acqua distillata). Questo metodo è stato messo a punto per i compost (Nappi *et al.*, 1990). La prova risulta normata in Italia con il seguente riferimento: metodo UNI 10780, 1998.

#### *Prove di tossicità cronica*

Le prove di tossicità cronica da effettuarsi sull'elutriato coinvolgono specie differenti sia dal punto di vista filogenetico sia per la posizione all'interno della catena trofica.

#### *Prova di tossicità algale*

La prova algale a 72 o 96 ore permette di evidenziare l'effetto tossico cronico mediante l'inibizione di crescita della specie algale rispetto a un controllo. La crescita algale può essere misurata mediante numerosi sistemi come, per esempio, il conteggio diretto delle cellule algali mediante contaglobuli elettronico o camere di Burker per lettura al microscopio; la misura della densità ottica direttamente nelle cuvette di crescita a 670 nm; la misura della clorofilla *in vivo* mediante la fluorescenza. Il metodo che utilizza



*Selenastrum capricornutum* (*Raphidocellis subcapitata*) risulta standardizzato con la sigla UNI EN 288692. L'ARPA Toscana si è dotata di un metodo riportato nel manuale "Metodologia di saggio algale per il controllo delle acque di scarico e dei corpi idrici ricettori", ARPAT-CEDIF, 1998 (Sbrilli, 1998).

#### *Prova di tossicità con Collemboli*

I Collemboli sono insetti apterigoti ubiquitari nel suolo, relativamente ben investigati. Per saggiare la tossicità, possono venire utilizzate diverse specie (*Onychiurus* spp., *Folsomia candida*, *Tullbergia granulata* e *Orchesella cincta*).

L'organismo più idoneo risulta però *Folsomia candida* (Smith *et al.*, 1998). L'*endpoint* è rappresentato dal numero di sopravvissuti e di nati alla fine del periodo sperimentale. Per l'esecuzione del *test* si può adottare la stessa matrice che viene utilizzata per le prove di tossicità con Anellidi, in modo che i risultati possano essere confrontati. Sono in atto processi di standardizzazione a livello internazionale.

#### *Prova di tossicità cronica con "Ceriodaphnia dubia"*

La prova prevede il controllo della fertilità a 7 giorni. Le forme giovanili degli individui sono esposte in un sistema statico rinnovato per la durata di 7 giorni (durante i quali si ha lo sviluppo di tre generazioni), a differenti concentrazioni della matrice. I risultati della prova sono basati su valutazioni del tenore di sopravvivenza e di riproduzione della specie. Il metodo è normato in Italia con il seguente riferimento: IRSA-CNR, 1998, Notiziario dei metodi analitici. Maggio 1998: 8-13.

Per suoli salmastri possono essere utilizzati organismi marini come, ad esempio, i *Misidi* (IRSA-CNR, 1998, Notiziario dei metodi analitici. Istituto di Ricerca sulle Acque – CNR, maggio 1998: 1-8) oppure il *test* algale condotto con alghe marine come *Dunaliella tertiolecta* o *Phaeodactylum tricornerutum*.

## **2.2 Prove di tossicità su matrice solida**

### *Misura dell'attività respiratoria dei batteri del suolo*

La prova (Metodo ISO/DS 14240-1: 1997) misura l'attività respiratoria microbica attraverso la determinazione della produzione di CO<sub>2</sub>.

Tale determinazione avviene in un sistema chiuso (respirometro), con l'apporto continuo dell'O<sub>2</sub> consumato; per misurare la respirazione indotta dal substrato, il campione viene miscelato uniformemente con una soluzione di glucosio. L'incubazione avviene a 22 °C per più di 24 ore. Si misura la produzione di CO<sub>2</sub> per unità di tempo (ora) e per 100 g di materia secca; tale misura si ottiene dal tratto lineare della curva respiratoria. L'attività respiratoria microbica è influenzata dal contenuto acquoso del campione e dalla sua temperatura. Pertanto questi parametri devono essere portati alle condizioni *standard* (40-60 % di umidità e 22 °C). La composizione chimica dei suoli naturali è una variabile che influenza notevolmente la determinazione.

### *Prova per la valutazione del potere nitrificante del suolo*

La prova misura la velocità di formazione dei nitriti nel campione di suolo, dopo incubazione per 5 ore a una temperatura di 25 °C. Si effettuano cinque repliche, di cui due utilizzate come bianco. L'ulteriore ossidazione a nitrati viene bloccata con l'aggiunta di NaClO<sub>3</sub>. La quantità di nitriti formati si rileva mediante metodo colorimetrico. La quantità di NO<sub>2</sub> (in ngN/g\*5h) prodotta da 1 g di materia secca fornisce un'indicazione del potere nitrificante; un'attività nitrificante inferiore al valore soglia indica un effetto tossico sull'attività metabolica della microflora del suolo. Per suoli agricoli, il tempo di incubazione di 5 ore è sufficiente, in caso di suoli contaminati è necessario prolungare il periodo di incubazione. Un'attività nitrificante bassa può essere causata, oltre che dalla contaminazione del terreno sottoposto a prova, anche da un numero insufficiente di microrganismi del suolo: per questo motivo, si standardizza un apporto di nutrienti prima dell'esecuzione della prova. I test di nitrificazione hanno un'alta sensibilità rispetto a quelli effettuati su piante e lombrichi. Ciò potrebbe comportare la possibilità di falsi positivi: quindi, in caso di positività, è necessario procedere a ulteriori ricerche.

### *Prova di tossicità con Anellidi (“Eisenia fetida”)*

L'utilizzo di lombrichi nella valutazione ecotossicologica dei suoli è stato sviluppato a partire dagli anni '80 e, successivamente, è stato standardizzato in diversi protocolli applicativi (EPA, OECD, EEC, ecc.). Il vantaggio di tale tecnica è rappresentato dall'assenza di trattamenti della matrice; i metodi tuttavia non evidenziano particolare sensibilità.

In particolare la prova (Metodo ISO 11268-1) valuta la tossicità dei suoli utilizzando il lombrico *Eisenia fetida*, sia per prove di *screening*, sia per prove definitive. Vengono considerate, per la valutazione della tossicità, la percentuale di sopravvivenza e la differenza tra il peso iniziale della massa di lombrichi e il loro peso finale. Si utilizzano per la prova unicamente lombrichi adulti, sessualmente maturi, con clitello ben sviluppato e un'età compresa tra sei mesi e un anno. La percentuale di mortalità riscontrata è comparata con dati presenti in letteratura in base alla tipologia di suolo. Gli animali utilizzati devono avere un peso iniziale unitario omogeneo ed essere sottoposti alle seguenti condizioni di prova: aerazione continua, umidità controllata, temperatura di 20 + 2 °C ed illuminazione di 400-800 lux. La prova viene effettuata su quattro repliche e la valutazione avviene mediante la conta dei lombrichi sopravvissuti dopo un periodo di incubazione di 14 giorni; se la mortalità è superiore al 20% il terreno è considerato tossico.

### *Prova di tossicità con batteri luminescenti (“Vibrio fischeri”) su matrice solida*

Questa procedura permette agli organismi di entrare in contatto diretto con il campione solido previa sospensione dello stesso in un mezzo acquoso. Questa prova fornisce, in genere, risultati con tossicità uguali o più alte rispetto alle prove sugli elutriati, probabilmente a causa di una maggiore biodisponibilità dovuta al contatto diretto delle particelle con gli organismi batterici. Il contenuto organico del suolo potrebbe, tuttavia, determinare un adsorbimento dei batteri alla matrice solida difficilmente valutabile, con conseguente rischio di risultati falsamente positivi.

### *Attività microbica del suolo*

Non si tratta di una prova di tossicità ma di una stima della carica microbica presente nel suolo, ed in particolare dei principali gruppi (batteri aerobi totali, batteri anaerobi totali, miceti totali, ecc.) che sono rappresentativi della comunità microbica, considerando la densità della popolazione un indicatore dello *status biologico* del suolo. La carica microbica è rilevabile mediante inoculo di una quantità specifica di estratto del suolo, sia tal quale che diluito, in substrati colturali opportunamente selezionati; successivamente si effettua l'incubazione a temperature specifiche e controllate, per un periodo di tempo che varia da 7 a 20 giorni, in funzione del gruppo microbico ricercato. Al termine del periodo prescelto, si valuta il numero di cellule microbiche in 1 g di campione (peso secco). La determinazione è soggetta a un'ineliminabile imprecisione statistica, inoltre non tutti i microrganismi del suolo possono essere isolati o verificati per via colturale.

## **2.3 Genotossicologia**

### *Panagrellus redivivus*

La prova con il nematode *Panagrellus redivivus* è utilizzata per la valutazione dell'impatto ambientale di contaminanti in fase solida (sedimenti, suoli, fanghi industriali, ecc.). La principale caratteristica di questa prova, ancora poco utilizzata in Italia, è rappresentata dal fatto che, durante le 96 ore di durata della stessa, il nematode attraversa quattro stadi di crescita contraddistinti da caratteristiche fisiologiche e dimensionali ben conosciute. In presenza di sostanze contaminanti a effetto tossico, si assisterà all'arresto della crescita o alla morte dell'organismo. Mediante il monitoraggio di un numero definito di individui (ca. 100) per un tempo di 96 ore in presenza di concentrazioni diversificate della matrice ambientale, è possibile valutare gli effetti letali e/o subletali. In particolare, il numero di individui morti dà un'indicazione dell'effetto letale (tossicità acuta), mentre il numero di organismi ai vari stadi di crescita (J2, J3, J4) fornisce una stima degli effetti subletali (tossicità cronica). La crescita del nematode dallo stadio J2 a J3 o J4 prevede l'espressione di un numero limitato di geni. D'altro canto, la crescita dallo stadio J4 allo stadio adulto richiede l'intervento di un numero cospicuo di geni. Molti mutageni conosciuti possono inibire selettivamente il passaggio da J4 ad adulto, e quest'inibizione di crescita può essere utilizzata come un'indicazione del potenziale mutagenetico/genotossico del campione. La prova è ritenuta oggi molto promettente.

### *Mutatox*

La prova Mutatox utilizza uno speciale mutante oscuro del batterio bioluminescente *Vibrio fischeri* in grado di evidenziare la presenza di agenti genotossici. Il ceppo utilizzato, infatti, mostra un incremento della produzione di luce quando viene fatto crescere in presenza di concentrazioni subletali di agenti genotossici. Aliquote di batteri reidratati vengono incubate in presenza di diluizioni scalari della matrice ambientale oggetto di indagine, in un mezzo di crescita contenente o meno la frazione S9 (estratti epatici con funzione di ossidasi mista). Gli agenti genotossici sospetti vengono definiti

come quelle matrici che inducono un incremento dell'emissione di luce di almeno due volte la media dell'emissione dei controlli. La prova è attualmente utilizzato abitualmente presso il Dipartimento ARPA di Grugliasco su matrici ambientali e, in modo particolare, sui sedimenti fluviali.

#### *Prova dei micronuclei*

I micronuclei sono piccoli nuclei derivanti da frammenti acentrici o da interi cromosomi che, in seguito ad anomalie del fuso, non si sono separati correttamente nel corso dell'anafase e sono conseguentemente evidenziabili come nuclei secondari nelle cellule figlie. La prova dei micronuclei su linee cellulari viene utilizzato come indicatore dei danni al DNA indotti da agenti fisici e chimici. Il sistema cellulare utilizzato è costituito da una linea cellulare immortalizzata di Hamster Cinese (CHO-K1). La tecnica utilizzata è quella introdotta da Fenech e Morley, basata sull'utilizzo della citocalasina B per bloccare la citodieresi delle cellule che sono andate incontro a mitosi. La prova può essere intrapresa con cellule di fava e di cipolla.

#### *Prova di Ames*

La prova, messa a punto da Ames, utilizza ceppi di *Salmonella typhimurium* auxotrofi per l'istidina esposti al campione da saggiare. Se nel campione sono presenti composti mutageni, questi provocano la retromutazione al fenotipo selvatico di alcune cellule, permettendone la crescita su di un terreno minimo. La prova è condotta utilizzando due ceppi con diversa specificità, capaci di rilevare la presenza di mutageni che agiscono con meccanismi d'azione diversa (*S. typhimurium* TA98: inserzione o delezione di basi azotate; *S. typhimurium* TA100: sostituzione di basi azotate). La mutagenicità di un campione è stimata calcolando il *Mutagenic Ratio* (M.R. = revertenti netti / revertenti spontanei). Questa prova è utilizzata in modo abituale presso il dipartimento ARPA di Grugliasco su matrici ambientali tra loro assai diversificate, quali per esempio sedimenti fluviali, campioni ambientali provenienti da siti contaminati e il particolato atmosferico fine (PM 10) trattenuto dai filtri delle stazioni di monitoraggio della qualità dell'aria.

#### *SOS Chromotest*

Le lesioni al DNA attivano normalmente dei meccanismi di riparazione, indicati complessivamente come *risposta SOS*. Il *SOS Chromotest* fornisce un'indicazione quantitativa dell'entità dell'attivazione di questi meccanismi. La prova si basa sull'utilizzo di un microrganismo (*Escherichia coli* PQ37) nel quale il promotore di uno dei principali geni (SFTA) coinvolti nella risposta SOS è stato posto a monte del gene della  $\beta$ -galattosidasi, in modo che l'attivazione di SFTA porti alla produzione dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi. Il livello di  $\beta$ -galattosidasi è, quindi, dosato spettrofotometricamente. In parallelo, viene monitorata l'attività della fosfatasi alcalina, che fornisce indicazioni sulla tossicità del campione in esame ed elimina la possibilità di fornire risultati falsi negativi. La mutagenicità del campione viene stimata dal fattore di induzione (I.F.) calcolato dal rapporto tra l'induzione in assenza e in presenza del campione. Dal punto di vista applicativo, per questo *test* valgono le considerazioni di cui al punto precedente.

### 3. VALUTAZIONE DELLA QUALITÀ DEL SUOLO

Il grado di stabilità di un ecosistema viene determinato, generalmente, come indice di qualità in funzione della ricchezza in *taxa* di organismi presenti. Pertanto più specie sono presenti in un dato ecosistema, maggiore è la sua stabilità. Infatti, l'inquinamento indotto dalle attività antropiche (per esempio concimazioni, uso di fitofarmaci, scarico di rifiuti tossici) agisce sulle specie più sensibili che scompaiono dall'ecosistema stesso.

La perdita di specie da un sistema provoca cambiamenti nella struttura, negli scambi energetici e nei processi dell'ecosistema. In numerosi lavori recenti, le variazioni nell'abbondanza e la presenza o assenza di specie sono state utilizzate come misura finale dell'impatto biologico di un inquinante (Hopkin, 1993; Jepson, 1993; Posthuma & van Straalen, 1993; Pearson, 1994; Korthals *et al.*, 1996; Spurgeon *et al.*, 1996). Per utilizzare questi studi allo scopo di monitorare l'impatto dell'inquinamento, le tecniche dovrebbero essere semplici e relativamente veloci da applicare (Spurgeon *et al.*, 1996). I gruppi faunistici adatti al monitoraggio delle comunità dovrebbero corrispondere il più possibile a quanto enunciato da Pearson (1994). In pratica dovrebbero: 1) avere una tassonomia ben nota e stabile, 2) essere conosciuti in tutta la loro storia naturale; 3) essere facilmente campionabili, facili da manipolare e da identificare; 4) avere *taxa* superiori (ordine, famiglia, tribù, genere) con distribuzione geografica ampia coprente diversi tipi di *habitat*; 5) avere *taxa* inferiori (specie, sottospecie) specializzati e sensibili ai cambiamenti ambientali; 6) avere una potenziale importanza economica; 7) avere modelli di biodiversità riflessi da altri *taxa*, vicini o no. Gli studi di monitoraggio che utilizzano gli invertebrati hanno il potenziale di fornire un mezzo largamente applicabile per valutare lo stato dell'ambiente e l'impatto dell'inquinamento. I problemi principali sono le difficoltà nell'identificazione di molti gruppi e il tempo richiesto per i campionamenti, in particolar modo se si analizzano molti siti per definire i gradienti di risposta (Spurgeon *et al.*, 1996). Per questo, in passato, molti studi erano incentrati sulla valutazione degli effetti su specifici gruppi di invertebrati (Bengtsson & Rungren, 1984, 1988; Bengtsson *et al.*, 1983; Read *et al.*, 1987). Spurgeon *et al.* (1996) propongono tre gruppi (lombrichi, isopodi e ragni) come rappresentanti idonei degli invertebrati edafici, a parte le relazioni con gli altri *taxa* che sono pressoché sconosciute per quasi tutti i gruppi edafici. Tuttavia, dal loro lavoro emerge che il numero e la diversità di specie sono tra i parametri più sensibili, mentre l'abbondanza risulta meno indicativa. Va posta attenzione sul gruppo scelto, perché anche da ciò si possono avere risposte differenti: le comunità di lombrichi sembrano rispondere chiaramente a gradienti di metalli pesanti, viceversa i ragni sembrano sensibili a diversi fitofarmaci cui i lombrichi sono tolleranti. La ricerca di una "specie più sensibile" tramite *test* di tossicità in laboratorio è stata ormai accantonata dalla moderna ecotossicologia (Spurgeon *et al.*, 1996).

Per colmare il vuoto esistente nelle conoscenze degli effetti dell'inquinamento su una singola specie o sugli ecosistemi, è necessario sviluppare urgentemente nuovi sistemi di bioindicatori con maggiore realismo ambientale (Cairns, 1992, Korthals *et al.*, 1996). Studiare i cambiamenti indotti dall'inquinamento sulla struttura delle comunità animali in natura può essere un importante passo verso il superamento di questo vuoto (Korthals *et al.*, 1996). Il vantaggio di tali studi è che essi includono anche meccanismi per cui l'inquinamento influenza indirettamente la comunità, come per esempio la modifica della disponibilità di cibo. Ciò può portare a una migliore comprensione del ruolo che le interazioni ecologiche hanno nelle risposte tossicologiche a sistemi più complessi (Clements, 1994).

La struttura del popolamento edafico è considerata un utile strumento di indagine degli equilibri biologici, biochimici o biofisici del suolo e delle variazioni dovute a fattori di perturbazione naturali o antropici. Si può affermare, quindi, che la presenza di una pedofauna ricca e varia è indice di un suolo in buone condizioni di equilibrio biodinamico.

Per uno studio approfondito sul grado di stabilità dell'ecosistema va sottolineata l'importanza di standardizzare il più possibile le metodologie di campionamento, incluso il numero di campioni minimo necessario per ottenere un prelievo significativo.

Per la valutazione della qualità del suolo possono essere utilizzati indici basati sugli invertebrati come bioindicatori. A tal fine, sono stati proposti: per i nematodi il *Maturity Index* (MI), per gli artropodi appartenenti alla meso e macrofauna, *l'indice di qualità* del suolo (IQ), il *rapporto Acari/Collemboli*, ecc.

### 3.1 I nematodi

I Nematodi sono presenti, con 15.000 specie descritte, nei sistemi sia acquatici sia terrestri. Circa la metà delle specie note conduce vita libera, le restanti sono considerate parassite di piante o animali. Zullini (Milano), da oltre vent'anni, ha proposto l'impiego dei nematodi a vita libera come indicatori della qualità delle acque interne. Bongers (1990) ha introdotto il suo *Maturity Index* (MI), più tardi utilizzato per i suoli terrestri (de Goede & Bongers, 1995). Tale indice ordina le famiglie di nematodi lungo un gradiente numerato da 1 a 5. A un'estremità del gradiente si collocano i *colonizzatori estremi* ("c"; specie a strategia -r; punteggio c-p = 1), con tempi di generazione dell'ordine di alcuni giorni, all'altro estremo si collocano i *persistenti estremi* ("p"; specie a strategia -K; punteggio c-p = 5), con tempi di generazione dell'ordine di un anno. Il valore medio del punteggio ricavato sulla base della frequenza di ciascun gruppo in un determinato ambiente è il MI. Più l'indice cresce, più l'ecosistema si avvicina alle condizioni di integrità; valori dell'indice tra c-p 1 e c-p 2 sono tipici di ambienti sovraccarichi di materia organica. L'approccio del MI permette di discriminare anche le diverse fonti di inquinamento: la risposta della comunità a eutrofizzazione, fertilizzazione, sversamenti di oli, fanghi e diversi *stress* fisici si evidenzia con un incremento del numero di *taxa* con valori di c-p bassi, con una minima alterazione del numero di *taxa* con valori di c-p elevati (Ettema & Bongers, 1993; de Goede e Bongers, 1995). Una diminuzione della maggior parte dei *taxa*, in particolar modo di quelli con

valori di c-p elevati sembra essere in relazione con gli effetti a lungo termine della presenza di sostanze tossiche in condizioni di scarsa disponibilità di cibo (Ruess *et al.*, 1993; Korthals *et al.*, 1996). Entrambi questi cambiamenti possono essere visti come retrogressioni nella successione della comunità di nematodi. Una revisione delle applicazioni del MI in studi ambientali, comprendenti tra l'altro effetti di inquinamento idrico, metalli pesanti, eutrofizzazione, fuoriuscite di olio, fanghi, acidificazione, *stress* fisici e tipi di aratura è data da de Goede e Bongers (1995). Korthals *et al.* (1996) propongono una modifica del MI, denominata MI2-5. Sostanzialmente si tolgono dal computo i *taxa* con c-p1 per evitare (soprattutto in casi di abbondanza di sostanza organica) che il loro numero aumenti fino a falsare le risposte dell'indice. L'indice MI2-5 sembra quindi più sensibile ad indicare anche il tipo di inquinamento, oltre che la variazione nella comunità (Popovici, 1994; Korthals *et al.*, 1993, 1996). Secondo gli stessi autori, è opportuno testare l'utilità del concetto legato al MI anche su altri gruppi di organismi, specialmente per quegli animali che hanno differenti modalità d'esposizione all'inquinamento (Korthals *et al.*, 1996).

### 3.2 L'indice di qualità (IQ)

Le comunità di artropodi presenti nel suolo sono alla base di un indice di qualità (Casarini *et al.*, 1990) per la valutazione dello stato dei suoli sottoposti alle pratiche agricole e, più in generale, sottoposti a contaminazione da sostanze tossiche.

#### *Gli organismi bioindicatori*

Un criterio di classificazione degli animali presenti nel suolo, basato sulle loro dimensioni, suddivide gli organismi in: microfauna, mesofauna e macrofauna.

In particolare la comunità di artropodi appartenenti alla meso e macrofauna è proposta come sistema bioindicatore della qualità del suolo.

Per l'identificazione degli organismi è ritenuto accettabile un livello di determinazione tassonomica pari all'Ordine. L'identificazione spinta ad un tale livello è ritenuta sufficiente per ottenere informazioni significative e, contemporaneamente, può essere eseguita anche da operatori non specialisti.

Tra le principali Unità Sistematiche identificabili si ricordano le seguenti: Isopoda, Pseudoscorpiones, Araneae, Acarina, Simphyla, Pauropoda, Diplopoda, Chilopoda, Collembola, Protura, Diplura, Tysanoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Coleoptera, Diptera (Pitea *et al.*, 1998).

Recenti ricerche sull'utilizzo dei microartropodi come bioindicatori suggeriscono di includere in ogni monitoraggio quante più Unità Sistematiche possibile, dato che effetti nascosti possono colpire un dato *taxon* a concentrazioni che non influenzano gli altri (Jones, 1991; Posthuma & van Straalen, 1993; Dallinger & Rainbow, 1993; Siepel, 1994; Beylich *et al.*, 1995; Franchini & Rockett, 1996; Iturrondobeitia *et al.*, 1997; Migliorini & Bernini, 1999). Ad un primo livello, l'identificazione degli individui campionati può mantenersi ad un livello superiore a quello di specie, mentre su alcuni

gruppi l'indagine tassonomica può scendere a livelli di dettaglio maggiori, soprattutto se l'abbondanza specifica di tali gruppi risponde a basse concentrazioni d'inquinamento (Spurgeon *et al.*, 1996).

#### *Determinazione dell'Indice di Qualità (IQ)*

Per i campioni ed i controlli si determinano i 2 seguenti parametri:

- *la diversità*; intesa come numero complessivo di Unità Sistematiche;
- *l'abbondanza*; intesa come numero totale di individui raccolti.

L'Indice I.Q. è definito come somma dei rapporti tra le diversità del campione rispetto al controllo e quello dell'abbondanza del campione rispetto al controllo.

Il valore dell'indice si colloca tra 0 e 2; il valore 0 indica che la diversità e l'abbondanza del campione sono nulle; il valore 2 indica che la diversità e l'abbondanza del campione sono uguali a quelle del controllo.

Valori compresi tra 0 e 0,5 indicano condizioni di elevato degrado delle caratteristiche del suolo; valori compresi tra 1,5 e 2 evidenziano condizioni prossime alla normalità e valori compresi tra 0,5 e 1,5 depongono per situazioni intermedie.

Ad esempio valori inferiori a 0,5 sono stati rilevati in agroecosistemi sottoposti a trattamenti fitosanitari drastici e prolungati; valori superiori a 1 sono tipici di agrosistemi dove non vengono effettuate arature né trattamenti fitoiatrici al suolo. In prossimità di alcune discariche abusive i valori di diversità sono risultati ridotti ad un quarto, mentre i valori di abbondanza sono risultati inferiori di circa la metà rispetto ai controlli.

La determinazione dell'Indice di Qualità I.Q. può costituire un primo test agevole e poco costoso nelle analisi di qualità dei suoli. L'indice individua possibili alterazioni dell'equilibrio biodinamico dello strato superficiale dei suoli, che possono essere dovute alla presenza di sostanze tossiche. Nelle operazioni di monitoraggio ambientale e di controllo di aree sottoposte a bonifica questo metodo può fornire un'immagine dell'evoluzione qualitativa del suolo.

L'indice di qualità viene valutato dalla letteratura in modo particolarmente positivo, anche se il parametro rappresentato dalla abbondanza è forse sovrastimato rispetto al parametro diversità; questo indice è stato utilizzato in particolari casi specifici quali ad esempio i danni indotti dall'impiego di fitofarmaci su terreni produttivi (Casarini *et al.*, 1993), sversamenti accidentali di sostanze tossiche sul terreno, valutazione delle biomasse in agricoltura. Esperienze utilizzando gli indici di qualità sono state condotte dalle ARPA di Pavia e Parabiago, dalla società NQA di Pavia, e dalla Prof.ssa Santagostino dell'Università degli Studi di Milano.



### 3.3 Il Rapporto Acari/Collemboli

Con le medesime metodologie di campionamento, di estrazione e di osservazione microscopica utilizzate per la determinazione dell'indice I.Q. è possibile calcolare il rapporto Acari/Collemboli (Bachelier, 1986).

Il quoziente che ne deriva è ritenuto un indice capace di rappresentare le condizioni biodinamiche del suolo. In particolare, in condizioni di equilibrio la percentuale di Acari, rispetto ai Collemboli, è elevata; essa tende a diminuire a favore di questi ultimi con l'aumentare della degradazione delle biocenosi. Tale metodologia tuttavia non sembra avere avuto successo nel mondo scientifico, così come quella utilizzata da ricercatori giapponesi (Aoki, 1967; Aoki *et al.*, 1977) che si basa sul rapporto Acari Oribatei/Altri Acari. Infatti, piuttosto che ad un approccio tassonomico, attualmente si cerca di utilizzare un sistema di raggruppamento funzionale (O'Neill *et al.*, 1986; Wodarz *et al.*, 1992; Siepel, 1994; Paoletti & Sommaggio, 1996), che corrisponda maggiormente alla complessità dell'ambiente e della comunità biologica del suolo.

### 3.4 Altre metodologie

Riccardo Groppali, dell'Università di Pavia (Groppali, 1999), riporta altri contributi sull'uso degli artropodi terrestri come bioindicatori dell'inquinamento. In particolare, riporta dati sull'applicazione dell'I.Q., di alcuni studi su artropodi predatori (Ragni e Carabidi), Lepidotteri Ropaloceri (farfalle) e Imenotteri (api) che, applicati in casi specifici si sono rivelati estremamente utili. Nel caso specifico, in Gran Bretagna sono state impiegate trappole a caduta per studiare gli effetti delle diverse pratiche su Ragni e Coleotteri Carabidi e si è riscontrato che, dalla complessità strutturale della vegetazione e dalla diversità floristica, dipendono direttamente diversità e abbondanza specifica di tali Artropodi. L'impiego di fitofarmaci ha un forte impatto negativo sui Carabidi (soprattutto come intossicazione diretta) e sui Ragni (anche indirettamente riducendo la varietà floristica); inoltre l'impiego di fertilizzanti e di tecniche colturali impattanti, come arature e movimenti del terreno, modificano profondamente le popolazioni viventi nel terreno. Alcuni studi specialistici, ad esempio determinando alcune specie di Ropaloceri, senza operare cattura, hanno permesso di valutare il differente uso di margini di coltivi a gestione convenzionale e assoggettati a forme di lotta guidata: nei primi, la cavolaia piccola (*Pieris rapae*) trascorre la maggior parte del suo tempo in volo (95,9%), mentre nei secondi, il volo occupa il 42,6% del tempo, l'alimentazione il 32,3% e la sosta il 20,8%. Un'altra metodologia consiste nei raccoglitori automatici di api morte negli alveari, posizionati sperimentalmente nelle aree di studio. Un esempio di studio delle spoglie di questi insetti, effettuato nei pressi di Venezia, ha permesso di rilevarvi nel 1993 la presenza di vari prodotti pericolosi per la salute umana. Le prospettive più interessanti per lo sviluppo di tali indici derivano dagli studi di Paoletti (Padova) per quanto attiene la fauna dei suoli agricoli, Zullini (Milano) per i nematodi, Bernini (Siena) per gli acari oribatei (Migliorini e Bernini, 1999) e Parisi (Parma) per i collemboli.

## CONSIDERAZIONI FINALI

L'uso degli invertebrati, per valutare i siti terrestri in termini di conservazione, attualmente, comporta difficoltà di interpretazione oppure è limitato ad ambienti ristretti.

Volendo colmare le necessità e i vuoti conoscitivi, bisogna porsi almeno due domande: che rappresentatività ha il sopralluogo per quel sito? Quanto sono comparabili i risultati ottenuti con quelli di altri siti?

Per rispondere in maniera esauriente a queste domande, si devono affrontare tre livelli di problemi:

- Problemi ambientali, quali la diversità delle aree, l'eterogeneità degli habitat, la varietà delle cause di stress.
- Problemi di campionamento, quali la scelta del bersaglio, la valutazione preliminare del sito, le metodologie da adottare, l'efficacia (intesa come rappresentatività della popolazione campionata, in termini di dimensione e varietà) ed il successo (inteso come numero di specie o individui raccolti per unità di sforzo).
- Problemi d'interpretazione, dovuti essenzialmente a carenze conoscitive.

Come risposta a queste esigenze, si possono proporre tre fasi di approccio; la prima consiste nel creare, all'interno del CTN "Suolo e Siti Contaminati", un Gruppo di lavoro per raccogliere tutte le informazioni utili ed aggiornate disponibili e per conoscere le persone coinvolte e le strutture che potrebbero partecipare al lavoro.

La seconda fase prevede la stesura di manuali metodologici per definire e rendere organica la fase dei campionamenti (vista la necessità di armonizzare le attività a livello nazionale ed europeo) e facilitare quindi i confronti.

Nella terza fase si dovrebbe cercare di diffondere quanto più estesamente possibile le conoscenze così acquisite, producendo linee guida, rapporti tecnici e manuali di campo per gli operatori del settore.

In conclusione, da un lato va posta attenzione alla selezione dei gruppi oggetto d'indagine, poiché la loro scelta potrebbe determinare risultati assai differenti. Ciò è confermato dal lavoro di Spurgeon *et al.* (1996), che propongono lombrichi, ragni e isopodi come gruppi rappresentativi delle comunità di invertebrati edafici, ma avvertono ad esempio che i lombrichi rispondono bene ai metalli pesanti, ma non ai pesticidi, mentre i ragni sono più sensibili proprio a questi ultimi.

D'altro canto, l'applicazione di questo tipo di studi va allargata alle indagini finalizzate non solo a valutare gli impatti causati da stress di natura chimica, ma anche a quei tipi di attività che determinano fenomeni di degrado fisico e biologico, come le modificazioni strutturali, i cambiamenti climatici e d'uso del suolo, l'erosione, la desertificazione, ecc.

Infine, questioni su cui va posta un'attenzione particolare sono l'assegnazione delle specie ai gruppi funzionali (strategie riproduttive, di dispersione, alimentari), come evidenziato da lavori recenti (per esempio Siepel, 1994), e la determinazione delle ridondanze all'interno dei gruppi funzionali. Queste priorità emergono dalla necessità di definire l'entità delle perdite di funzionalità dei suoli, associate con l'agricoltura intensiva, la deforestazione, l'inquinamento ambientale ed il cambiamento climatico globale.

Il biota edafico maggiormente a rischio sono i gruppi funzionali con poche specie tra i trituratoria della materia organica, i bioturbatori del suolo, i batteri nitrificanti ed azotofissatori, nonché le micorrize. Per risolvere queste priorità di ricerca, sono necessari (Brussard *et al.*, 1997) un approccio sperimentale che utilizzi esperienze sul campo a lungo termine e su larga scala e le metodologie moderne della geostatistica e del GIS.

## BIBLIOGRAFIA

- Aarts, J.M.M.J.G., Denison, M.S., De Haan, L.H.J., Schalk, J.A.C., Cox, M.A. & Brouwer, A., 1993. A receptor-mediated luciferase expression: a tool for monitoring dioxin-like toxicity. *In*: H. Fiedler, H. Frank, O. Hutzinger, W. Parzefall, A. Riss, & S. Safe (Eds.), *Organohalogen Compounds*, Riegelink, Vienna. Pp. 361-364.
- Aoki, J.-I., 1967. Microhabitats of Oribatid Mites on a Forest Floor. *Bulletin of the National Science Museum* **10** (2): 133-138.
- Aoki, J.-I., Harada, H., Miyawaki, A., 1977. Relation between Fauna of Soil Mites (Oribatei) and Human Impacts in Four Main Natural Forest Regions in Kanagawa Prefecture, Central Japan. *Bulletin of the Inst. of Env. Science and Technology, Yokohama National Univ.* **3** (1): 121-133.
- ASTM/E 1383-93, 1993. *Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates*.
- Bachelier, G., 1986. *La vie animale dans le sol*. O.R.S.T.O.M., Paris, 171-196.
- Baudo, R., *et al.*, 1999. Test di germinazione ed allungamento radicale. *Acqua Aria* **2**: 69-85.
- BBA, 1995. *Long-term toxicity test with Chironomus riparius: Development and validation of a new test system*. Edited by M. Streløkke & H. Köpp.
- Bengtsson, G. & Rundgren, S., 1984. Ground-living invertebrates in metal-polluted forest soils. *Ambio* **13**: 29-33.
- Bengtsson, G. & Rundgren, S., 1988. The Gusum case: a brass mill and the distribution of soil Collembola. *Can. J. Zool.* **66**: 1518-1526.
- Beylich, A., Fründ, H.-C., Graefe, U., 1995. Environmental Monitoring of Ecosystems and Bioindication by Means of Decomposer Communities. *Newsletter on Enchytraeidae* **4**: 25-34.
- Blundo, C.M. (Ed.), 1991. Saggio di Tossicità con *Daphnia*. *Quaderno Ist. Ric. Acque IRSA-CNR* **93** – ISSN 0390-6329.
- Bongers, T., 1990. The Maturity Index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species composition. *Oecologia* **83**: 14-19.
- Brussaard, L., Behan-Pelletier, V.M., Bignell, D.E., Brown, V.K., Didden, W., Folgarait, P., Fragoso, C., Freckman, D.W., Gupta, V.V.S.R., Hattori, T., Hawksworth, D.L., Klopatek, C., Lavelle, P., Malloch, D.W., Rusek, J., Soderstrom, B., Tiedje, J.M., Virginia, R.A., 1997. Biodiversity and ecosystem functioning in soil. *Ambio*, **26** (8): 563-570.
- Cairns, J., 1992. The threshold problem in ecotoxicology. *Ecotoxicology* **1**: 3-16.
- Casarini, P., Camerini, G. & Carbone, M., 1990. Agricoltura ed alterazioni della fauna del suolo. Individuazione di indicatori biologici e indici biotici. *Biologia Ambientale* **3-4**: 5-14.

- Casarini, P. & Camerini, G., 1993. Biological indicators of agricultural influence on poplar groves, vineyards and sugar beets. *In*: M.G. Paoletti, W. Foissner, D. Coleman (Eds.). *Soil biota, nutrient cycling and farming systems*. Lewis Publishers. 123-131.
- Clements, W.H., 1994. Assessing contaminant effects at higher levels of biological organization. *Environ. Toxicol. Chem.* **13**: 357-359.
- Dallinger, R. & Rainbow, P.S. (Eds.), 1993. *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. Lewis, Chelsea, USA.
- de Goede, R.G.M. & Bongers, T., 1995. The nematode Maturity Index. Manual of methods for research on the ecology of nematodes. *Techniques in nematode ecology*, Soc. of Nematodologists.
- Environment Canada, 1994. *Test for Growth and Survival in sediment using Larvae of Freshwater Midges (Chironomus tentans or Chironomus riparius)*. Draft Biological Test Method. Final-draft.
- Ettema, C.H. & Bongers, T., 1993. Characterization of nematode colonization and succession in disturbed soil using the Maturity Index. *Biol. And Fertil. of Soils* **16**: 79-85.
- European Commission, 1994. *Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances*. Final Report to the Report No: EC 3738. Programme Co-ordinator: R. Fleming.
- Franchini, P. & Rockett, C.L., 1996. Oribatid mites as “indicator” species for estimating the environmental impact of conventional and conservation tillage practices. *Pedobiologia* **40**: 217-225.
- Gasparo, D. & Zappa, L., 1994. *Organismi come bioindicatori ambientali*. Ecothema – Regione Friuli Venezia Giulia. Pp 217.
- Ghetti, P.F., 1997. *Indice Biotico Esteso (IBE) – I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque dolci. Manuale di applicazione*. Prov. Aut. Trento, Agenzia per la Protezione dell’Ambiente. Pp. 222.
- Górny, M. & Grüm, L. (Eds.), 1993, *Methods in Soil Zoology*. Elsevier - Amsterdam, London, New York, Tokyo - & PWN - Polish Scientific Publishers, Warszawa: 460 pp.
- Groppali, R., 1999. Gli artropodi terrestri come bioindicatori dell’inquinamento ambientale. *In*: il veterinario nella protezione dell’ambiente. *Rapporto ISTISAN 99/13*. Ed. by A. Joppolo, L. Achene, M.G. Cappello.
- Groombridge, B. (Ed.), 1992. *Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources*. Chapman and Hall, London.
- Guzzella, L., 1996. Saggio di Tossicità Acuta con Batteri Luminescenti. *Suppl. al Quaderno Ist. Ric. Acque IRSA-CNR* **100**: 342 pp.
- Hawksworth, D. L. & Ritchie, J. M., 1993. *Biodiversity and Biosystematic Priorities: Micro-organisms and Invertebrates*. CAB International, Wallingford, UK.

- Heal, O.W., Struwe, S., & Kjoller, A., (1993). Diversity of Soil Biota and Ecosystem Function. *In: B. Walker et al. (Eds.). Global Change and Terrestrial Ecosystem.* IGBP, Vol. 1. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Hopkin, S.P., 1993. *In situ* biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. *In: P. Calow (Ed.), Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 397-427.
- IRSA-CNR, 1998. Notiziario dei metodi analitici. Maggio 1998.
- IRSA-CNR, 1996. Notiziario dei metodi analitici. Giugno 1996.
- Iturrondobeitia, J.C., Saloña, M.C., Pereda, J., Caballero, A.I. & Andrés, M.C., 1997. Oribatid mites as an applied tool in studies on bioindication: a particular case. *Abh. Ber. Naturkundemus. Görlitz* **69** (6): 85-96.
- Jepson, P.C., 1993. Insects, spiders and mites. *In: P. Calow (Ed.), Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 299-325.
- Jones, D.T., 1991. *Biological Monitoring of Metal Pollution in Terrestrial Ecosystems*. Ph.D. Thesis, Univ. di Reading, UK.
- Korthals, G.W., Bongers, T., Alexiev, A.D. & Lexmond, Th.M., 1993. Influence of copper and pH on a terrestrial nematode community. *Poster presentato alla SETAC World Conference*, marzo 1993, Portogallo.
- Korthals, G.W., de Goede, R.G.M., Kammenga, J.E. & Bongers, T., 1996. The Maturity Index as an instrument for risk assessment of soil pollution. *In: N.M. van Straalen & D.A. Krivolutsky (Eds.), Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Kluwer Academic Publishers, NL. Pp. 85-93.
- Lavelle, P., 1997. Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research*, **27**: 93-132.
- Maffiotti, A. & Bona, F., 1997. Introduzione all'ecotossicologia. *In: F. Bona, A. Maffiotti e L. Volterra. Analisi e recupero dei sedimenti marini. Quaderni di tecniche di protezione ambientale*. Pitagora Editrice Bologna. 139 pp.
- McCarthy, J.F. & Shugart, L.R., 1990. *Biomarkers of Environmental Contamination*, Lewis Publ., Boca Raton.
- McInnis, R., 1997. Toxicity/Genotoxicity of solid phase samples using *Panagrellus redivivus*. *Environmental Toxicology and Water Quality* **12**: 185-193
- Metcalfe, J.L., 1989. Biological water quality assessment running waters based on macro-invertebrate communities: History and present status in Europe. *Environ. Pollut.* **60**: 101-139.
- Migliorini, M. & Bernini, F., 1999. Oribatid mite coenoses in the Nebrodi Mountains (Northern Sicily). *Pedobiologia* **43**: 372-383.
- National Research Council, 1993. *Research Priorities in Tropical Biology*. National Academy Press, Washington, D.C.
- Nappi, P., Vicenzino, E., Barberis, R., 1990. Criteri per la valutazione della qualità dei compost. *Acqua Aria*, **3**:261-268.

- National Science Board, 1989. *Loss of Biological Diversity: A Global Crisis Requiring International Solutions*. National Science Foundation, Washington, D.C.
- Neuhauser, E.F., Durkin, P.R., Malecki, M.R. & Anatra, M., 1986. Comparative toxicity of ten organic chemicals to four m species. *Comp. Biochem. Physiol.* **83C**: 197-200.
- Nimis, P.L., 1999. Linee guida per la bioindicazione degli effetti dell'inquinante tramite la biodiversità dei Licheni epifiti. Atti del workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale. ANPA Serie 2. Pp 267-277.
- Norton, T.W., 1994. An overview of modelling fine-scale variation in environmental regimes in complex landscapes with comments on applications to invertebrate survey, monitoring and conservation. *Memoirs of the Queensland Museum* **36** (1): 173-177. Brisbane.
- OECD, Draft Document, May 1998. *OECD guidelines for the testing of chemicals. Proposal for a new guideline. Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment*. Scaricabile tramite l'indirizzo <http://www.oecd.org/ehs/test/9871.doc>.
- O'Neill, R.V., De Angelis, D.L., Waide, J.B., Allen, T.F.H., 1986. *A hierarchical concept of ecosystems*. Princeton University Press, Princeton, N.J., 253 pp.
- Paoletti, M.G. & Sommaggio, D., 1996. Biodiversity indicators for sustainability. Assessment of rural landscapes. In: N.M. van Straalen & D.A. Krivolutsky (Eds.), *Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Kluwer Academic Publishers, NL. Pp. 123-140.
- Pearson, D.L., 1994. Selecting indicator taxa for quantitative assessment of biodiversity. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B 345**: 75-79.
- Piervittori, R., 1999. Licheni come bioindicatori della qualità dell'aria: stato dell'arte in Italia. In: C. Piccini & S. Salvati (Eds.), *Atti del Workshop "Biomonitoraggio della qualità dell'aria sul territorio nazionale"*, Roma, 26-27 nov. 1998. ANPA, Roma. Pp. 97-121.
- Pitea, D., De Cesaris, A.L. & Marchetti, G., 1998. *Individuazione, caratterizzazione e campionamento di ammassi abusivi di rifiuti pericolosi*. Ricerche e risultati. Fondazione Lombardia per l'Ambiente. 214 pp.
- Pokarzhevskii, A.D., 1996. The problem of scale in bioindication of soil contamination. In: N.M. van Straalen & D.A. Krivolutsky (Eds.), *Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Kluwer Academic Publishers, NL. Pp. 111-121.
- Popovici, I., 1994. Nematodes as indicators of ecosystem disturbance due to pollution. *Stud. Univ. Babeş-Bolyai, Biol.* **37** (2), 1992: 15-27.
- Posthuma, L. & van Straalen, N.M., 1993. Heavy-metal adaptation in terrestrial invertebrates: A review of occurrence, genetics, physiology and ecological consequences. *Comp. Biochem. Physiol.* **106 C**: 11-38.
- Rawson, D.M., 1993. Bioprobes and biosensors. In: P. Calow (Ed.), *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. Pp. 428-437.
- Read, H.J., Wheeler, C.P. & Martin, M.H., 1987. Aspects of the ecology of Carabidae (Coleoptera) from woodlands polluted by heavy metals. *Environ. Pollut.* **48**: 61-76.

- Reynoldson, T.B. & Metcalfe-Smith, J.L., 1992. An overview of the assessment of aquatic ecosystem health using benthic invertebrates. *J. Aquat. Ecosys. Health* **1**: 295-308.
- Ruess, L., Funke, W. & Breunig, A., 1993. Influence of experimental acidification on nematodes, bacteria and fungi: soil microcosms and field experiments. *Zool. Jb. Syst.* **120**: 189-199.
- Sbrilli, G., Limberti, A., Caldini, G. & Corsini, A., 1998. *Metodologia di saggio algale per il controllo dei corpi idrici e delle acque di scarico*. ARPAT - CEDIF, Serie Ricerche e Formazione, Quaderno n. 8. Firenze:191 pp.
- SETAC, 1993. *Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments*. Dal Workshop WOSTA tenuto in Olanda.
- Siepel, H., 1994. *Structure and Function of Soil Microarthropod Communities* Ph.D. Thesis, Univ. di Wageningen, NL.
- Smith, P. & Van Gestel, A.D.M., 1998. Effects of soil type, prepercolation and ageing on bioaccumulation and toxicity of zinc for springtail *Folsomia candida*. *Environ. Toxicol Chem.***7**: 1132-1141.
- Spurgeon, D.J., Sandifer, R.D. & Hopkin, S.P., 1996. The use of macroinvertebrates for population and community monitoring of metal contamination – Indicator taxa, effect parameters and the need for a soil invertebrate prediction and classification scheme (SIVPACS). In: N.M. van Straalen & D.A. Krivolutsky (Eds.), *Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Kluwer Academic Publishers, NL. Pp. 95-110.
- Steinberg, S.M., *et al.*, 1995. A review of environmental applications of bioluminescence measurements. *Chemosphere* **11**: 2155-2197.
- Sugaya, Y., 1997. Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. *Jp. J. Sanit. Zool.* **48** (4): 345-350.
- Thomas, J.M., 1987. Statistical approaches to screening hazardous waste sites for toxicity. In: Proceedings of the US-EPA Symposium on Solid waste testing and quality assurance. Washington, **2**: 113-133.
- US-EPA, 1994. *Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*. 600/R-94/024.
- US-EPA, 1996a. Draft Method for the “Pilot” Round-Robin Chronic Sediment Toxicity Test with the Midge *Chironomus tentans*. Prepared by T. Norberg-King, P. Sibley & D. Benoit, Duluth.
- US-EPA/OPPTS 850.1735, 1996b. *Whole sediment Acute Toxicity Invertebrates*.
- US-EPA/OPPTS 850.1790, 1996c. *Chironomid Sediment Toxicity Test*.
- Van Gestel, C.A.M. & Van Brummelen, T.C., 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*.
- Viganò, L., 1996a. Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Cerodaphnia dubia*. *Suppl. al Quaderno Ist. Ric. Acque IRSA-CNR* **100**: 342 pp.
- Viganò, L., 1996b. Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Mysidopsis bahia*. *Suppl. al Quaderno Ist. Ric. Acque IRSA-CNR* **100**: 342 pp.



- Vighi, M. & Bacci, E., 1998. *Ecotossicologia*. UTET. Pp. 237.
- Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M. & Peakall, D.B., 1996. *Principles of ecotoxicology*. Taylor & Francis. Pp. 321.
- Wodarz, D., Aescht, E. & Foissner, W., 1992. A Weighted Coenotic Index (WCI): Description and application to soil animal assemblages. *Bio. Fertil. Soils* **14**: 5-13.
- Wootton, J.T., 1998. Effects of Disturbance on Species Diversity: A Multitrophic Perspective. *The American Naturalist* **152** (6): 803-825.
- Wright, J.F., Armitage, P.D., & Furse, M.T., 1989. Prediction of invertebrate communities using stream measurements. *Reg. Rivers Res. Manage.* **4**: 147-155.