

# Relazione Tecnica

## Metodologie e indagini biologiche sullo stato di qualità ambientale del lago di Pietra del Pertusillo.

Relazione intermedia  
Dicembre 2014

Responsabile scientifico:

Laura Mancini

Collaboratori:

Stefania Marcheggiani, Filippo Chiudioni, Camilla Puccinelli, Diego Casinelli,  
Anna Maria D'Angelo, Emilio D'ugo, Roberto Giuseppetti.



Reparto Qualità Ambientale e Ittiocoltura

Premessa.....	3
1. Attività svolta.....	5
2 Valutazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua ai sensi della Direttiva 2000/60/CE.....	6
2.1 Lo stato ecologico .....	7
2.2 Recepimento della Direttiva 2000/60/CE in Italia .....	9
3 Area di studio .....	10
4. Materiali e Metodi.....	12
4.1 Analisi delle comunità macrofite .....	12
4.1.1 Campionamento, analisi del campione ed identificazione.....	12
4.1.2 Macrofite lacustri .....	12
4.1.3 Le macrofite nei corsi d'acqua guadabili .....	13
4.2 Analisi delle comunità diatomiche.....	14
4.2.1 Campionamento, analisi del campione ed identificazione.....	14
4.3 Analisi dei parametri chimico-fisici.....	15
4.4 Analisi microbiologiche.....	15
4.4.1 Rilevazione di <i>Escherichia coli</i> ed Enterococchi .....	16
4.4.2 Rilevazione di spore di Clostridi solfitoriduttori. ....	16
4.4.3 Rilevazione Salmonella.....	18
4.4.4 Virus.....	19
5. Risultati .....	20
5.1 Analisi delle componenti biologiche.....	20
5.1.1 Macrofite.....	20
5.1.2 Diatomee .....	21
5.2 Risultati dei parametri chimico-fisici.....	23
5.3 Analisi microbiologiche.....	24
5.3.1 Batteri.....	24
5.3.2 Virus.....	25
Considerazioni conclusive. ....	26
Bibliografia .....	27
Allegato A.....	30
Allegato B .....	33

## Premessa

Il sistema normativo che regola il settore delle acque in Europa e in Italia è stato radicalmente modificato negli ultimi anni sotto la spinta dell' aumentata consapevolezza dell'esauribilità della risorsa ed è stato sempre più orientato ad uno sviluppo sostenibile ed una gestione integrata delle risorse idriche. Per quanto riguarda l'Europa, l'ultimo traguardo di questa evoluzione è rappresentato dalla Direttiva 2000/60/CE (Europa, 2000), anche conosciuta come Direttiva Quadro sulle Acque (*Water Framework Directive, WFD*) e dalle direttive figlie sulle "Acque sotterranee", sulla "*Marine strategy*" e sull' "*Eutrophication*". La Direttiva *WFD* ha raggruppato in sé molta della precedente legislazione europea in materia di acque, coordinando ad esempio le norme stabilite con la Direttiva 96/61/CE e facendo proprie anche le norme di qualità ambientale (obiettivi di qualità), fissate dalla Direttiva 76/464/CE sulle sostanze pericolose.

La Direttiva Europea 2000/60/CE rappresenta il più importante e recente atto legislativo comunitario sulla tutela degli ambienti acquatici, istituendo un quadro per la protezione delle acque superficiali e sotterranee con lo scopo di mantenere e migliorare l'ambiente acquatico all'interno della Comunità Europea. Gli obiettivi della Direttiva sono: prevenire l'ulteriore deterioramento, proteggere e migliorare lo stato degli ecosistemi acquatici e delle zone umide associate, promuovere un utilizzo sostenibile dell'acqua basato sulla protezione a lungo termine delle risorse idriche disponibili, assicurare la progressiva riduzione dell'inquinamento delle acque sotterranee e prevenire il loro ulteriore inquinamento, contribuire a mitigare gli effetti delle inondazioni e della siccità.

Il suo aspetto innovativo è dato dall'importanza riconosciuta agli elementi biologici degli ecosistemi acquatici: la valutazione dello stato ambientale è incentrata sull'analisi di queste comunità.

Per quanto riguarda le acque superficiali vengono indicati, per tutti i tipi di corpi idrici, gli elementi specifici per la classificazione dello stato ecologico. Tali elementi sono costituiti da elementi biologici, elementi idromorfologici, chimici e chimico-fisici. Attraverso il monitoraggio si deve arrivare alla classificazione dei corpi idrici in base al loro stato di qualità ambientale e nel caso intervenire al fine di raggiungere un livello "buono" di qualità, attraverso l'applicazione di metodi di valutazione basati su indicatori ambientali.

La Direttiva, per valutare la funzionalità di un ecosistema acquatico, prevede l'indagine di tutti i livelli della catena trofica partendo dai produttori primari (fitobenthos, fitoplancton e macrofite) ai consumatori (macroinvertebrati e pesci). Le richieste della Direttiva hanno dato notevole impulso allo sviluppo di conoscenze e metodologie di indagine per l'analisi dei diversi elementi biologici

introducendo, per la prima volta, componenti biologiche come diatomee e macrofite nel monitoraggio dei corsi d'acqua.

La normativa in materia di monitoraggio della qualità ambientale delle acque superficiali e sotterranee prevede, in coerenza con i programmi delle direttive europee, la definizione di una rete di monitoraggio finalizzata alla valutazione dello stato ecologico dei corpi idrici superficiali e sotterranei.

## **1.Attività svolta**

Le attività svolte nell'ambito della convenzione ARPAB- ISS hanno previsto il campionamento su due differenti tipologie di corpo idrico con analisi di elementi biologici, analisi microbiologiche e valutazione dello stato ecologico.

### *Campionamento degli elementi biologici.*

Il campionamento delle diatomee è stato effettuato sia su corpi idrici fluviali che lacustri secondo i protocolli vigenti e svolgendo attività di supporto ai tecnici ARPAB riguardo alle criticità emerse durante le fasi di campionamento.

Le macrofite sono state campionate secondo i protocolli vigenti valutando le percentuali di copertura e raccogliendo campioni per il riconoscimento e la valutazione dello stato ecologico, supportando i tecnici ARPAB nell'attribuzione delle percentuali di copertura e nella fase di riconoscimento delle specie.

### *Valutazione dello stato ecologico.*

E' stato valutato lo stato ecologico dei siti indagati ed i risultati ottenuti sono riportati in questa relazione.

### *Campionamento e analisi microbiologiche.*

Il campionamento ha previsto il prelievo di acqua, acqua in presenza di schiuma e sedimento per le analisi batteriologiche e virologiche volte alla ricerca di *E.coli*, Enterococchi, Salmonella, Clostridi e virus enterici. I risultati sono riportati in questa relazione.

## **2 Valutazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua ai sensi della Direttiva 2000/60/CE**

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

Per quanto riguarda l'Europa, l'ultimo traguardo di questa evoluzione è rappresentato dalla Direttiva 2000/60/CE (Europa, 2000), anche conosciuta come Direttiva Quadro sulle Acque (*Water Framework Directive*) e dalle direttive figlie sulle "Acque sotterranee", sulla "*Marine strategy*" e sull' "Eutrophication". La Direttiva *WFD* ha raggruppato in sé molta della precedente legislazione europea in materia di acque, coordinando ad esempio le norme stabilite con la Direttiva 96/61/CE (Direttiva Nitrati) e facendo proprie anche le norme di qualità ambientale (obiettivi di qualità), fissate dalla Direttiva 76/464/CE sulle sostanze pericolose.

Un analogo processo di cambiamento è stato avviato anche in Italia a partire dalla prima legge sulla tutela delle acque L. 319/76 (Legge Merli, Italia 1976) e successive modifiche, proseguendo con la L. 36/94 (Legge Galli, Italia 1994) recante "Disposizioni in materia di risorse idriche". Quest'ultima ha introdotto il principio di salvaguardia del bene acqua per le generazioni future, evidenziando i concetti di risparmio nell'uso e di rinnovo delle risorse e garanzia della tutela del patrimonio idrico. Il processo di riforma della legislazione italiana in materia di acque è proseguito con l'emanazione del D.Lgs 152/99, recante disposizioni sulla tutela delle acque superficiali e sotterranee e marine dall'inquinamento (Italia, 1999).

Il D.Lgs 152/99 definisce, per la prima volta in Italia, la disciplina generale per la tutela delle acque superficiali e sotterranee, perseguendo gli obiettivi di prevenire e ridurre l'inquinamento, risanare e migliorare lo stato delle acque, proteggere le acque destinate ad usi particolari, garantire gli usi sostenibili delle risorse e mantenere la capacità naturale di auto depurazione dei corpi idrici, necessaria a sostenere comunità animali e vegetali ampie e ben diversificate. Il raggiungimento di questi fini è affidato ad una molteplicità di strumenti, tra questi, gli obiettivi di qualità ambientale, i piani di tutela ed il monitoraggio delle acque.

La Direttiva Europea 2000/60/CE rappresenta il più importante e recente atto legislativo comunitario sulla tutela degli ambienti acquatici, istituendo un quadro per la protezione delle acque superficiali e sotterranee con lo scopo di mantenere e migliorare l'ambiente acquatico all'interno della Comunità Europea. Gli obiettivi della Direttiva sono: prevenire l'ulteriore deterioramento, proteggere e migliorare lo stato degli ecosistemi acquatici e delle zone umide associate, promuovere

un utilizzo sostenibile dell'acqua basato sulla protezione a lungo termine delle risorse idriche disponibili, assicurare la progressiva riduzione dell'inquinamento delle acque sotterranee e prevenire il loro ulteriore inquinamento, contribuire a mitigare gli effetti delle inondazioni e della siccità.

Il suo principale aspetto innovativo è l'importanza riconosciuta agli elementi biologici degli ecosistemi acquatici: infatti la valutazione dello stato ambientale è incentrata sull'analisi di queste comunità.

La Direttiva presenta importanti differenze: per quanto riguarda le acque superficiali vengono indicati, per tutti i tipi di corpi idrici, gli elementi specifici per la classificazione dello stato ecologico. Tali elementi sono costituiti da elementi biologici, elementi idromorfologici, chimici e fisico-chimici. Per ognuno degli elementi di qualità vengono definiti gli stati di elevato, buono e sufficiente. Attraverso il monitoraggio si deve arrivare alla classificazione dei corpi idrici in base al loro stato di qualità ambientale e seguire l'evoluzione di questo stato, e nel caso intervenire, fino al conseguimento di un livello "buono" di qualità, attraverso l'applicazione di metodi di valutazione basati su indicatori ambientali.

Per quanto concerne gli ecosistemi lenticivi devono essere analizzate la composizione, abbondanza e biomassa del fitoplancton dell'altra flora acquatica dei macroinvertebrati bentonici e della fauna ittica.

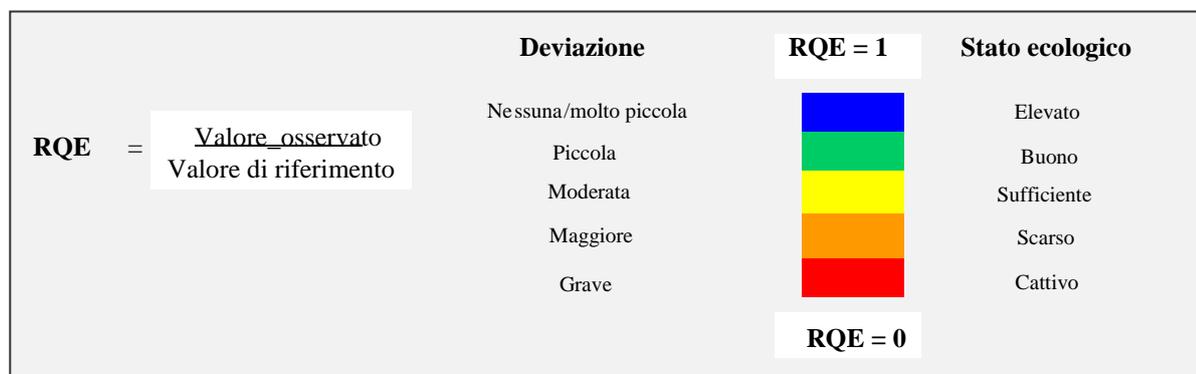
Il raggiungimento di questi fini è affidato principalmente al sistema di monitoraggio volto a definire lo stato delle acque e mirato a fornire le indicazioni per il risanamento e il conseguente raggiungimento degli obiettivi di qualità.

## ***2.1 Lo stato ecologico***

L'obiettivo principale della Direttiva è il raggiungimento di un "buono stato ecologico" per tutti i corpi idrici considerati significativi entro il 2015. Lo stato ecologico dei corpi idrici superficiali è l'espressione della complessità degli ecosistemi acquatici, della natura fisica e chimica delle acque e dei sedimenti, delle caratteristiche del flusso idrico e della struttura fisica del corpo idrico, considerando comunque prioritario lo stato degli elementi biotici dell'ecosistema: questo dovrà essere valutato per tutti gli elementi biologici; dovranno quindi essere definiti i suoi livelli di qualità ottima, buona e sufficiente. Lo stato ecologico vuole dunque essere la misura degli effetti dell'attività umana sugli ecosistemi acquatici: gli elementi di qualità biologica sono gli aspetti tipici di un ecosistema acquatico che possono essere valutati attraverso la struttura (composizione e abbondanza) delle loro comunità. Fondamentale, per la valutazione dello stato ecologico, è la

definizione delle “Condizioni di riferimento”. Si tratta di comunità biologiche, condizioni idromorfologiche, fisico-chimiche, che determinano i valori degli elementi di qualità rappresentativi di uno stato ecologico elevato.

Attraverso il monitoraggio si deve arrivare alla classificazione dei corpi idrici in base al loro stato di qualità ambientale e seguire l’evoluzione di questo stato, e nel caso intervenire, fino al conseguimento di un livello “buono” di qualità, attraverso l’applicazione di metodi di valutazione basati su indicatori ambientali. In particolare per ogni componente biologica di qualità è richiesto: lo studio della sua composizione tassonomica, il rapporto tra taxa sensibili e tolleranti e l’analisi di comunità in termini di abbondanze relative, che metta in luce eventuali fenomeni di dominanze e squilibri tra taxa. Lo stato ecologico deve essere espresso come Rapporto di Qualità Ecologica, RQE (Fig.1), tra i valori ricavati dal monitoraggio dei corpi idrici e quelli attesi per siti di tipologia analoga in condizioni di riferimento. Lo stato di qualità dei corpi idrici viene quindi definito come rapporto calcolato tra “i valori dei parametri biologici riscontrati in un dato corpo idrico superficiale a quelli costatabili nelle condizioni di riferimento applicabili al medesimo corpo. Il rapporto è espresso come valore numerico compreso tra 0 ed 1: i valori prossimi a 1 tendono allo stato ecologico elevato, quelli prossimi allo 0 allo stato ecologico pessimo”.



**Figura 1.** Valutazione dello stato ecologico espresso in RQE.

Il maggior rilievo dato agli indicatori biologici, ha reso necessari approfondimenti, messe a punto, o modifiche di metodi per la valutazione delle singole componenti biologiche, tenendo in considerazione che la Direttiva non specifica le metodologie per l’analisi degli elementi di qualità individuati, delegando la loro definizione agli Stati Membri.

A livello europeo è stata sviluppata la *Common Implementation Strategy* (Strategia Comunitaria di Implementazione) (CIS, 2005), il cui scopo principale è quello di fornire supporto all’implementazione di questa normativa mediante lo sviluppo di attività e linee guida, messe a punto da esperti del settore sui suoi elementi chiave.

A livello nazionale Sono stati inoltre formati gruppi di lavoro coordinati da ISPRA (Istituto Superiore per la Protezione dell'Ambiente), a cui hanno partecipato rappresentanti delle Agenzie e delle Istituzioni di ricerca nazionali, che hanno prodotto i protocolli per i metodi di campionamento per tutti gli elementi di qualità biologica delle acque dolci superficiali (macroinvertebrati bentonici, diatomee bentoniche, macrofite e fauna ittica) e per gli elementi chimico-fisici a sostegno degli elementi biologici. Il Volume "Metodi biologici per le acque parte I" è pubblicato sul sito web dell'ISPRA alla pagina: "[http://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/manuali-lineeguida/MLG\\_\\_111\\_2014\\_Metodi\\_Biologici\\_acque.pdf](http://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/manuali-lineeguida/MLG__111_2014_Metodi_Biologici_acque.pdf)" dove sono pubblicati i nuovi protocolli 2014.

## ***2.2 Recepimento della Direttiva 2000/60/CE in Italia***

A livello nazionale la Direttiva è stata recepita attraverso l'emanazione dei seguenti decreti da parte del Ministero dell' Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare:(M.A.T.T.M.): il DL.vo n. 152/06 recante "Norme in materie ambientali" (Italia, 2006), il Decreto Ministeriale n 131/08 "Metodologie per l'individuazione dei Tipi Fluviali (Italia, 2008), il Decreto Ministeriale 56/09 "Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento"(Italia, 2009) ed il Decreto Ministeriale 260/10 "Regolamento recante i criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali" (Italia, 2010).

### 3 Area di studio

Il lago di Pietra del Pertusillo è un lago artificiale all'interno del territorio dei comuni di Grumento Nova, Montemurro e Spinoso. Il lago è stato costruito tra il 1957 e il 1962, a sbarramento del fiume Agri (Fig.2).

Si trova a 532 metri di altitudine sul livello del mare, occupa una superficie di 75 chilometri quadrati ed ha una capienza massima di circa 155 milioni di metri cubi d'acqua. Il paesaggio circostante è ricoperto da boschi che scendono fino alle sponde del lago (alcuni alberi perfino oltre, risultando parzialmente sommersi dalle acque). La forma piuttosto articolata, con diversi rami laterali, fa sì che questo invaso abbia un aspetto fortemente "naturalizzato" e ben integrato nel contesto ambientale in cui si trova. La sua realizzazione ha dato vita ad un invaso in grado di rispondere ad un uso plurimo delle risorse idriche, quali la sfruttamento dell'energia idroelettrica e l'irrigazione di oltre trentacinquemila ettari di terreno tra Basilicata e Puglia ed è uno dei punti di partenza dell'acquedotto pugliese.

Il Lago di Pietra del Pertusillo è incluso nel territorio del Parco dell'Appennino Lucano Val d'Agri Lagonegrese, fa anche parte del sistema di aree protette Natura 2000 della Regione Basilicata, costituito da Siti di Interesse Comunitario (SIC) e Zone a Protezione Speciale (ZPS) che hanno lo scopo di tutelare habitat e specie, di particolare pregio ed interesse, individuati nelle direttive comunitarie.

A causa delle notevoli escursioni, nel corso dell'anno, del livello delle acque le sponde del lago non sono caratterizzate da specie arbustive ed erbacee tipiche degli ambienti lacustri, come ad esempio i canneti, la cui sopravvivenza è resa difficoltosa da lunghi periodi di emersione.



**Figura 2.** Lago di Pietra del Pertusillo (fonte google maps)

Sono state selezionate un totale di tre stazioni di campionamento (Tab.1): una stazione a centro lago (VL1), una in prossimità della riva del lago (VL5) ed una sul fiume Agri ( VA08). Le immagini dei siti campionati sono riportate in Appendice A.

**Tabella 1.** Codifica e georeferenziazione delle stazioni di campionamento.

<b>Codice stazione</b>	<b>Stazione</b>	<b>Corpo idrico</b>	<b>Latitudine</b>	<b>Longitudine</b>
VL1	Centro lago	Lago	40°16'38.92''N	15°59'53.88''E
VL5	Masseria Crisci	Lago	40°17'13.24''N	15°57'23.77''E
VA08	Fiume Agri	Fiume	40°19'28.46''N	15°49'19.47''E

## **4. Materiali e Metodi**

### ***4.1 Analisi delle comunità macrofittiche***

#### **4.1.1 Campionamento, analisi del campione ed identificazione**

Il campionamento delle macrofite, nelle tre stazioni selezionate, è stato eseguito nel periodo primaverile-estivo (Giugno 2014) seguendo i protocolli per le macrofite lacustri e per le macrofite nei corsi d'acqua guadabili. Questo periodo è indicato come quello di maggior sviluppo della vegetazione acquatica come riportato da protocollo (ISPRA, 2014).

Le macrofite presenti nelle stazioni di campionamento sono state identificate in campo per evitare il più possibile l'alterazione del sito. Le specie non identificate in campo sono state prelevate, poste in contenitori refrigerati a 4°C in assenza di luce e trasportate in laboratorio per la successiva fase di riconoscimento.

#### **4.1.2 Macrofite lacustri**

Il campionamento è stato eseguito seguendo il protocollo per le macrofite in ambiente lacustre (ISPRA, 2014).

Il procedimento d'indagine è stato eseguito in 4 fasi:

I FASE. Raccolta preliminare di informazioni e sopralluogo per valutare la presenza di macrofite.

II FASE. Individuazione dei siti in base alle informazioni raccolte nel corso della fase I. Questa fase è stata svolta a bordo di un'imbarcazione, in modo da potersi inoltrare all'interno del lago.

III FASE. Descrizione delle caratteristiche ambientali dei siti e del territorio a ridosso dei siti medesimi annotando tali informazioni sulla scheda di campionamento predisposta. Sono stati annotati i fattori che possono incidere sulla presenza della vegetazione acquatica.

IV FASE. È stato stabilito il numero di transetti da analizzare in base alla copertura macrofittica e, per la scarsa copertura macrofittica presente, si è scelto di eseguire un solo transetto. Il transetto è disposto all'interno del sito e in posizione ortogonale rispetto alla riva. I punti di osservazione sono 4: uno verso prua e uno verso poppa da ciascun lato della barca. Per ogni intervallo è stata misurata la profondità, si sono rilevate le coordinate GPS, si è determinato il tipo di fondale ed infine sono state annotate nella scheda di campo le specie rinvenute.

### 4.1.3 Le macrofite nei corsi d'acqua guadabili

Per l'analisi della comunità macrofittica sono state seguite le indicazioni riportate nel manuale "Metodi biologici" per le acque correnti (ISPRA, 2014). Nell'ambito della stazione si è valutata la copertura complessiva della comunità a macrofite presente in acqua in termini di copertura percentuale della comunità rispetto alla superficie della stazione. Successivamente, percorrendo controcorrente e a *zig zag*, da un sponda all'altra, l'intero sviluppo della stazione, si è rilevata la presenza di tutti i taxa attribuendone la percentuale di copertura delle singole specie presenti ed effettuandone la raccolta. Sono stati raccolti campioni il più possibile completi (radici, fusto, foglie, fiore) per consentire una corretta determinazione della specie. Per non influenzare lo sviluppo della comunità si è provveduto, come raccomandato, a raccogliere solo il materiale strettamente necessario per l'identificazione.

Per l'identificazione degli individui campionati sono stati utilizzati manuali di riconoscimento e chiavi dicotomiche (Bourrelly, 1966; Pignatti, 1982).

### Valutazione dello stato ecologico

L'*Indice Biologique Macrophytique en Rivière* (IBMR) (Minciardi *et al.*, 2009) si basa sull'analisi della comunità delle macrofite acquatiche per valutare lo stato trofico dei corsi d'acqua, ed è applicabile a tutti i corsi d'acqua interni.

L'IBMR si fonda sull'uso di una lista di taxa indicatori per i quali è stata valutata, in campo, la sensibilità, in primo luogo, nei confronti delle concentrazioni di azoto ammoniacale e ortofosfati. L'indice, essendo finalizzato alla valutazione dello stato trofico, è determinato e nel contempo correlabile non solo alla concentrazione di nutrienti ma anche ad altri fattori quali, soprattutto, la luminosità e la velocità della corrente.

L'IBMR è un indice misurabile in corrispondenza di una stazione e deve essere calcolato sulla base di un rilievo. Il rilievo consiste nell'osservazione in situ della comunità macrofittica e prevede che, in campo, sia effettuato il campionamento, un primo riconoscimento e la valutazione delle coperture dei taxa presenti.

Il calcolo dell'IBMR si effettua mediante l'uso di una lista floristica di taxa indicatori a ciascuno dei quali è associato un valore indicatore (che varia da 0 a 20) di sensibilità ad alti livelli di trofia.

Per quanto riguarda il rilievo del parametro copertura si procede come prescritto dal suddetto protocollo, giungendo alla definizione, per ciascuno dei taxa presenti, prima ad un valore di copertura percentuale relativa e successivamente (eseguendo la proporzione del valore di copertura

percentuale relativa alla percentuale di copertura totale delle macrofite presenti nella stazione) ad un valore di copertura reale.

## ***4.2 Analisi delle comunità diatomiche***

### **4.2.1 Campionamento, analisi del campione ed identificazione**

Il campionamento, il trattamento dei campioni e tutte le altre fasi di lavoro in laboratorio sono stati condotti seguendo il manuale “Metodi biologici” (ISPRA, 2014). Le comunità bentoniche nelle stazioni VL5 e VA08 sono state prelevate grattando con uno spazzolino a setole rigide i substrati litici naturali (pietre e ciottoli) o in assenza di questi ultimi su macrofite coprendo una superficie totale di campionamento di 100 cm<sup>2</sup>.

La comunità planctonica nella stazione VL1 è stata campionata utilizzando un retino da fitoplancton collegato ad una bottiglia provvista di rubinetto per il prelievo del campione.

Al fine di osservare i frustuli delle Diatomee per l'identificazione, i campioni sono stati trattati usando perossido d'idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30 %) per eliminare la sostanza organica e acido cloridrico (HCl al 37% m/v) per dissolvere i carbonati. Successivamente il campione di frustuli di diatomee è stato montato su vetrini, utilizzando una resina ad elevato indice di rifrazione e in ogni campione sono state contate e identificate almeno 400 valve utilizzando un microscopio ottico (Nikon Optiphot-2) a 1000 ingrandimenti ad immersione.

Per l'identificazione fino a livello di specie, e quando possibile di varietà, è stato utilizzato un sistema di analisi delle immagini, costituito da una camera per microfotografia connessa al microscopio e ad un computer, e da un software, utilizzato per digitalizzare e analizzare le immagini dei frustuli delle diatomee. Le alghe sono state riconosciute al livello di specie utilizzando manuali di riconoscimento ed articoli scientifici (Krammer & Lange-Bertalot, 1986; 1988; 1991a; 1991b; Round *et al.*, 1990; Van Dam *et al.*, 1994; Lange-Bertalot 2000; 2001; 2002; 2003, Hoffman *et al.*, 2013).

### **Valutazione dello stato ecologico**

La valutazione dello stato ecologico in questo studio è stata effettuata applicando l'indice EPI-L per le comunità diatomiche lacustri (Marchetto *et al.* 2013) e l'*Intercalibration Common Metrics index* (ICMi) (Mancini & Sollazzo, 2009) per le comunità fluviali. Entrambi i metodi di classificazione prevedono l'identificazione delle diatomee a livello di specie.

L'indice EPI-L utilizza la formula delle medie ponderate: i pesi trofici (p) e i valori indicatori (v) delle singole specie sono stati ricavati dall'insieme dei dati raccolti nei laghi italiani, limitatamente alle specie che rappresentavano almeno l'1% del conteggio in 3 o più laghi e che raggiungevano una percentuale minima del 3% in almeno un lago.

L'indice può essere quindi applicato ad ogni sistema lacustre, a condizione che almeno il 70% delle diatomee identificate, sia presente nella lista riportata nell'indice.

L'ICMi è un indice multimetrico, composto dalla media aritmetica degli RQE di due indici, l'Indice di Sensibilità agli Inquinanti IPS (CEMAGREF, 1982) e l'Indice Trofico TI (Rott *et al.*, 1999).

Entrambi gli indici sono basati sulla formula di Zelinka e Marvan (1961) ed attribuiscono ad ogni specie un valore di sensibilità (affinità/tolleranza) all'inquinamento e un valore di affidabilità come indicatore.

Nel calcolo dell'IPS si tiene conto principalmente della sensibilità delle specie all'inquinamento organico e di conseguenza è indicativo di alti livelli di trofia e di inquinamento organico. Nel calcolo del TI, invece, si prende in considerazione la sensibilità delle specie all'inquinamento trofico e questo è altamente correlato con bassi livelli di trofia e di inquinamento organico; è inoltre sensibile al carico di nutrienti di origine naturale (Kelly *et al.*, 2006).

### ***4.3 Analisi dei parametri chimico-fisici***

I parametri chimico-fisici quali Temperatura dell'acqua, pH, Ossigeno Disciolto e Conducibilità sono stati misurati in campo utilizzando una sonda multiparametrica 556 MPS (YSI).

### ***4.4 Analisi microbiologiche***

Le analisi microbiologiche sono state eseguite sui campioni d'acqua delle stazioni VL1 e VL5. Nella stazione VL1 sono stati campionati 50 litri di acqua di superficie in taniche sterili, precedentemente avvinate con acqua del sito, e trasportati ad una temperatura di 4°C. In laboratorio il campione di 50 litri di acqua è stato sottoposto ad un'operazione di concentrazione utilizzando un filtro da dialisi ed una soluzione di *backflush* composta da 5 mL di Tween 80, 100 mg di esafosfato di sodio (Napp, Sigma), 0,01 mL di antischiuma B emulsione (Sigma). La concentrazione del campione prevede una fase di "filtrazione" in cui i microorganismi aderiscono al filtro ed una di "eluizione" in cui vengono risospesi attraverso un processo di eluizione inversa (*backflushing*) ottenendo 1 litro di acqua concentrata. Sul campione di acqua concentrata sono state eseguite analisi batteriologiche per la ricerca di *E.coli* ed Enterococchi ed analisi per la ricerca di virus enterici.

Nella stazione VL1 per la ricerca di, *E.coli*, Enterococchi, Salmonella e Clostridi su campioni di acqua non concentrata, sono stati prelevati e trasportati a 4°C due litri di acqua.

Nella stazione VL5 sono state eseguite analisi batteriologiche per la ricerca di *E.coli* ed Enterococchi, prelevando due litri di acqua e 500 mL di acqua nella zona in cui era presente schiuma. Nella stazione VL5 utilizzando una benna sono stati prelevati circa 1000 g di sedimento posti in un contenitore di vetro sterile fornito di tappo a vite, per la ricerca di Clostridi.

Di seguito vengono descritte le tecniche di analisi per i diversi microrganismi ricercati.

#### **4.4.1 Rilevazione di *Escherichia coli* ed Enterococchi**

Le analisi per il rilevamento di *E. coli* ed Enterococchi sono state eseguite seguendo il metodo delle membrane filtranti (APHA, 2005).

Del sito VL1 e VL5 sono stati filtrati, per ciascun parametro, tre aliquote del campione da 100 mL di acqua ed acqua con presenza di schiuma rispettivamente. Inoltre del sito VL1 sono stati filtrati per ciascun parametro, tre aliquote da 10mL di acqua concentrata.

Una volta terminata la fase della filtrazione, le membrane sono state poste su capsule Petri contenenti i terreni di coltura selettivi *Tryptone Bile Agar with X-Glucuronide Medium* (TBX) (Oxoid lotto 536346) e *Slanetz Bartley Medium* (SB) (Oxoid lotto 528449) rispettivamente per l'isolamento di *E. coli* e di Enterococchi.

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

Dopo l'incubazione su TBX sono state contate le colonie che mostravano una colorazione blu-verde presunte *E. coli*. Le colonie rosso scuro-marrone sviluppatesi su agar SB sono state considerate ed enumerate come Enterococchi. Nei risultati sono stati riportati i valori medi ottenuti da ogni singola replica ed espressi come Unità Formanti Colonie (UFC) su volume di acqua analizzata. In ogni prova è stato eseguito il controllo positivo e negativo e il 5% delle colonie è stato sottoposto a conferma mediante test biochimici con il sistema miniaturizzato API20E (BioMérieux).

#### **4.4.2 Rilevazione di spore di Clostridi solfito-riduttori**

##### *Campioni di acqua*

Per la ricerca nell'acqua delle spore di clostridi solfito-riduttori, è stata utilizzata la tecnica di filtrazione su membrana e quella dell'inclusione in agar.

Tre aliquote di acqua, della stazione VL1, da 100 mL, sono state filtrate ed i filtri posti in capsule Petri contenenti il terreno selettivo agarizzato *Sulphite Polymixium Sulphadiazine Agar* (SPS)

(OXOID lotto 0E2303). In condizioni di asepsi sono stati posti sulla superficie delle membrane alcuni millilitri di terreno, mantenuto liquido a bagnomaria ad una temperatura di 50°C, per favorire la crescita dei microrganismi in condizioni di anaerobiosi. Dopo la solidificazione dello strato superficiale di terreno, si è proceduto all'incubazione. I risultati sono stati riportati come valori medi ottenuti sommando le colonie di ogni singola replica ed espressi come *UFC* in 100 mL.

Tre aliquote di campione da 1 mL sono state disposte, con una pipetta sterile, in capsule Petri dove è stato successivamente versato il terreno *SPS*, mantenuto liquido a bagnomaria ad una temperatura di 50°C. Con movimenti rotatori lenti, il terreno è stato miscelato con il campione ed è stato lasciato solidificare. I risultati sono stati riportati come valori medi ottenuti sommando le colonie di ogni singola replica ed espressi come *UFC* per millilitro.

### *Campioni di sedimento*

La metodica di isolamento da campioni di sedimento prevede i seguenti punti: tre aliquote da 5 grammi di sedimento vengono trasferite in beute sterili e addizionate con 45 mL di acqua fisiologica tamponata sterile ( $K_2HPO_4$  3g/L,  $KH_2PO_4$  1g/L, NaCl 8,5 g/L; pH 7,2±0,2) +0,1% Tween 80. Successivamente i campioni vengono sottoposti ad omogeneizzazione meccanica su piastra magnetica per 30 minuti. Segue un trattamento termico a 80-85 °C per 10 minuti con un successivo raffreddamento veloce sotto acqua corrente, al fine di inattivare tutte le forme vegetative e favorire la sporulazione. Operando in condizioni di sterilità, (cappa a flusso laminare, *Biohazard AURA B3*) per evitare eventuale contaminazione e rispettare le norme di sicurezza, in quanto tali microrganismi appartengono ad una classe di rischio 2 come citato nell'elenco degli agenti biologici classificati nel titolo X del D.Lgs.81/08 (Italia 2008), si prelevano da ciascuna delle tre sospensioni 0,1 mL di sovrantante, tal quale e diluito  $10^{-1}$ , che vengono depositi in doppio su piastre Petri. All'interno delle piastre viene versato il terreno *Sulphite Polymixium Sulphadiazine Agar*, (*SPS*) (OXOID lotto 0E2303), mantenuto liquido a bagnomaria ad una temperatura di 50°C, si agita delicatamente per favorire l'omogeneizzazione del campione e si lascia solidificare per poi procedere all'incubazione delle piastre. I risultati ottenuti sono espressi come valori medi in *UFC* per grammo di sedimento.

## *Incubazione*

L'incubazione avviene in anaerobiosi, ponendo le piastre in apposita giara (OXOID) in cui è stato posto un generatore di CO<sub>2</sub> (busta *Anaerogen*, OXOID lotto 2D02-25-14). Le giare vengono messe ad incubare in una stufa termostata (*Intercontinental*) a 36±1 °C per 24 ore. Questa temperatura, selezionata dopo diverse prove, si è dimostrata essere quella più idonea per la crescita dei Clostridi. Dopo il periodo di incubazione, si effettua la conta diretta delle colonie caratterizzate da una colorazione grigio-nera, di dimensioni 3-5 mm di diametro. Le colonie, immerse nello spessore dell'agar, devono la loro caratteristica colorazione alla riduzione del solfito in solfuro, operata da tali microrganismi. Le colonie ben isolate vengono trasferite, mediante anse sterili (*Sterile Hard IUL*, *Copan Innovation*), su terreno *Tryprone Soya Agar* (TSA) (OXOID lotto 107) ed incubate sempre in condizioni di anaerobiosi (giara + busta). Le colonie ben isolate sulle piastre di TSA, vengono trasferite in soluzione fisiologica sterile per essere sottoposta ai test biochimici per l'identificazione. In ogni prova è stato eseguito il controllo positivo e negativo e, di norma solo il 5% delle colonie viene sottoposto ad identificazione biochimica (API20A), ma in questo caso, essendo esiguo il numero di colonie rilevato, il test di identificazione è stato eseguito su tutte le colonie presenti.

### **4.4.3 Rilevazione Salmonella**

Le analisi per il rilevamento di Salmonella sono state eseguite seguendo il metodo della filtrazione su membrana e successiva semina in terreno selettivo. E' stato filtrato 1L di campione utilizzando una pompa ad acqua, su membrane di porosità di 0,45 µm (APHA, 2005). Segue un prearricchimento in 100mL di acqua peptonata ed incubazione a 37°C per 24ore. Dopo tale periodo, tre aliquote da 100µL del brodo di prearricchimento vengono inoculate in tre provette contenenti 10mL di un brodo di arricchimento, il *Rappaport Vassiliadis* (RVS) (Merk lotto VM236766), ed incubate a 44°C per 24ore. Dopo incubazione, con ansa sterile da 1µL, si esegue uno striscio su piastre di agar *McConkey* (Merk lotto VM327265) che vengono poi incubate a 37°C per 24ore. Le colonie lattosio-negative, di colore giallo, presunte Salmonelle, vengono contate e ripassate su un terreno agarizzato non selettivo ed incubate a 37°C per 24ore. Dopo incubazione si procede all'identificazione mediante sistema miniaturizzato API20E (BioMerieux). In ogni prova è stato eseguito il controllo positivo e negativo. I risultati vengono espressi come presenza-assenza in un litro di campione analizzato nelle tre repliche.

#### **4.4.4 Virus**

Le analisi per la ricerca di specie virali enteriche sono state eseguite su aliquote di *backflush* estraendo gli acidi nucleici virali successivamente sottoposti a reazione di Real Time PCR.

##### **Estrazione acidi nucleici virali**

Allo scopo di estrarre contemporaneamente gli acidi nucleici virali a RNA ed a DNA, 500 µl di campione ambientale concentrato (*backflush*) sono stati estratti con una metodica che associa una soluzione guanidinica ad alto contenuto di sali con biglie magnetiche (*nuclisens lysis buffer*, Biomerieux).

Gli acidi nucleici ottenuti sono stati poi quantificati attraverso una lettura eseguita in spectrostar nano (BMG LABTECH).

##### **Real time PCR per genomi virali**

Allo scopo di individuare la presenza delle specie virali enteriche maggiormente significative, l'RNA e il DNA estratti sono stati sottoposti a reazione di *Real Time Polymerase Chain Reaction* (PCR). Le reazioni sono state eseguite con una selezione di oligonucleotidi e sonde virali specifici per: Adenovirus umani 40 and 41, Epatite A, Epatite E, Noroviruses GI e GII, Rotaviruses A, Mammalian Orthoreovirus, Enterovirus umani (Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus).

## 5. Risultati

### 5.1 Analisi delle componenti biologiche

#### 5.1.1 Macrofite

Nella stazione VL1 (centro lago) non sono state rilevate macrofite a causa dell'elevata profondità del Lago mentre nella stazione VL5 sono state trovate due specie macrofite (Tab.2) con una copertura uniforme di *Paspalum distichum* della fascia riparia fino a circa 1m di profondità.

**Tabella 2.** Macrofite nella fascia riparia della stazione VL5

Specie	Abbondanza
<i>Paspalum distichum</i> L.	Presente uniformemente sulla fascia riparia
<i>Scirpus holoschoenus</i> L.	1 esemplare

Nella stazione VA08 (fiume Agri) è stata rilevata un'elevata copertura macrofita con un numero significativo di specie. In Tabella 3 sono riportate le specie macrofite identificate e la relativa percentuale di copertura. Alcune macrofite non sono state identificate a livello di specie a causa dell'assenza dei caratteri distintivi necessari al riconoscimento ( Es.: infiorescenze).

**Tabella 3.** Comunità macrofita presente nella stazione VA08 (p= copertura inferiore al 5%)

Copertura macrofita totale = 75%	
Specie	Percentuale di copertura relativa (%)
Alga globosa	p
<i>Alisma lanceolatum</i> With.	p
<i>Callitriche palustris</i> L.	5%
<i>Carex pendula</i> Hudson	p
Carex spp. A	p
Carex spp. B	p
<i>Cladophora</i> spp.	p
<i>Equisetum</i> spp.	p
<i>Fontinalis antipyretica</i> L. ex Hedw.	15%
<i>Groenlandia densa</i> (L.)Fourr.	5%
Juncus spp. A	p
Juncus spp. B	p
<i>Nasturtium officinale</i> R.Br.	p
<i>Paspalum distichum</i> L.	p
<i>Polygonum amphibium</i> L.	p
<i>Potamogeton crispus</i> L.	30%
<i>Ranunculus trichophyllus</i> Chaix	25%
<i>Sparganium erectum</i> L.	15%
<i>Typha latifolia</i> (L.)	5%
<i>Veronica anagallis aquatica</i> L.	p

### 5.1.2 Diatomee

Le diatomee campionate nella stazione VL1 hanno mostrato una comunità semplificata con la presenza di 10 specie e una dominanza di *Cyclotella bodanica* (Tab. 4).

**Tabella 4.** Comunità diatomica nella stazione di campionamento VL1.

Specie	Abbondanza
<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	2
<i>Cyclotella bodanica</i> Eulenstein ex Grunow	114
<i>Cymbella excisa</i> Kützing	1
<i>Encyonema caespitosum</i> Kützing	1
<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D.G.Mann	1
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	1
<i>Melosira varians</i> C.Agardh	4
<i>Navicula hofmanniae</i> Lange-Bertalot	1
<i>Nitzschia fonticola</i> (Grunow) Grunow	1
<i>Nitzschia hantzschiana</i> Rabenhorst	1

Nella stazione VL5 la comunità diatomica è stata campionata su macrofite (*Paspalum distichum* L.) a causa del substrato limoso che ricopriva uniformemente i ciottoli presenti. Sono state trovate un totale di 15 specie con la dominanza di *Achnantheidium minutissimum* (Tab. 5).

**Tabella 5.** Comunità diatomica nella stazione di campionamento VL5.

Specie	Abbondanza
<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	89
<i>Craticula molestiformis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot	1
<i>Cyclotella bodanica</i> Eulenstein ex Grunow	30
<i>Cymbella affinis</i> Kützing	4
<i>Cymbella excisa</i> Kützing	2
<i>Encyonema caespitosum</i> Kützing	1
<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D.G.Mann	3
<i>Gomphonema subclavatum</i> (Grunow) Grunow	1
<i>Melosira varians</i> C.Agardh	3
<i>Navicula capitatoradiata</i> Germain	8
<i>Navicula cryptocephala</i> Kützing	8
<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	2
<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Rabenhorst	3
<i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow	1
<i>Nitzschia paleacea</i> Grunow	1

La comunità diatomica della stazione VA08 è costituita da un totale di 36 specie ed è caratterizzata dalla dominanza di tre specie: *Achnantheidium minutissimum*, *Cocconeis placentula* e *Navicula tripunctata*, (Tab. 6).

**Tabella 6.** Comunità diatomica nella stazione di campionaento VA08.

Specie	Abbondanza
<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	98
<i>Amphora pediculus</i> (Kützing) Grunow	12
<i>Cocconeis pediculus</i> Ehrenberg	4
<i>Cocconeis placentula</i> Ehrenberg	79
<i>Cocconeis placentula</i> var. <i>lineata</i> (Ehrenberg) van Heurck	12
<i>Cyclotella bodanica</i> Eulenstein ex Grunow	4
<i>Cymbella neocistula</i> Krammer	/
<i>Cymbella compacta</i> Østrup	2
<i>Cymbella excisa</i> Kützing	3
<i>Cymbella parva</i> (W.Smith) Kirchner	2
<i>Diatoma vulgare</i> Bory	4
<i>Encyonema minutum</i> (Hilse) D.G.Mann	3
<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D.G.Mann	4
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	1
<i>Gomphonema pumilum</i> (Grunow) E.Reichardt & Lange- Bertalot	3
<i>Gomphonema tergestinum</i> (Grunow) Fricke	/
<i>Gyrosigma obtusatum</i> (Sullivant & Wormley) C.S.Boyer	/
<i>Navicula antonii</i> Lange-Bertalot	5
<i>Navicula capitatoradiata</i> Germain	11
<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	7
<i>Navicula cryptotenelloides</i> Lange-Bertalot	3
<i>Navicula gregaria</i> Donkin	4
<i>Navicula lanceolata</i> (C.Agardh) Kützing	2
<i>Navicula tripunctata</i> (O.F.Müller) Bory de Saint-Vincent	88
<i>Nitzschia amphibia</i> Grunow	1
<i>Nitzschia capitellata</i> Hustedt	/
<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Grunow	9
<i>Nitzschia fonticola</i> (Grunow) Grunow	3
<i>Nitzschia hantzschiana</i> Rabenhorst	3
<i>Nitzschia hungarica</i> Grunow	2
<i>Nitzschia linearis</i> . (Agardh) W. Smith	1
<i>Nitzschia palea</i> (Kützing) W.Smith	4
<i>Planothidium delicatulum</i> (Kützing) Round & Bukhtiyarova	/
<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Bukhtiyarova	/
<i>Reimeria sinuata</i> (Gregory) Kociolek & Stoermer	/
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C.Agardh) Lange-Bertalot	6

Dalle abbondanze delle comunità macrofite e diatomiche sono stati calcolati gli indici per la valutazione dello stato ecologico.

Vengono di seguito riportati i risultati ottenuti dal calcolo dell'ICMi (Tab. 7) calcolato sui valori di copertura delle specie in tabella 3, dell'indice EPI\_L (Tab. 8) calcolato sulle abbondanze delle specie diatomiche identificate nella stazione VL5 (Tab. 5) e dell'ICMi (Tab. 9) calcolato sulle abbondanze delle specie diatomiche identificate nella stazione VA08 (Tab. 6)

Tali metodi esprimono il Rapporto di Qualità Ecologica (RQE) tra i valori riscontrati nel sito oggetto di studio e i valori di riferimento in un range che va da 0 a 1 (Fig. 1). I valori di riferimento utilizzati sono quelli riportati nel Decreto Ministeriale 260/2010 (Italia, 2010).

**Tabella 7.** Valutazione dello stato ecologico nella stazione VA08 con l'utilizzo delle macrofite.

Stazione	RQE_IBMR	Stato ecologico
VA08	0,95	Elevato

**Tabella 8.** Valutazione dello stato ecologico nella stazione VL5 con l'utilizzo delle diatomee.

Stazione	RQE_EPI-L	Stato ecologico
VL5	0,50	Sufficiente

**Tabella 9.** Valutazione dello stato ecologico nella stazione VA08 con l'utilizzo delle diatomee.

Stazione	RQE_ICMi	Stato ecologico
VA08	0,75	Buono

Nelle stazione VL5 non è stato possibile calcolare l'indice biotico utilizzando le macrofite a causa dell'insufficiente copertura macrofita.

Nella stazione VL1 non è stato calcolato l'indice per il fitoplancton in quanto sono state campionate le sole diatomee.

## ***5.2 Risultati dei parametri chimico-fisici***

Di seguito sono riportati i valori dei parametri chimico-fisici misurati nelle tre stazioni di campionamento (Tab.10).

**Tabella 10.** Parametri chimico-fisici.

Stazione	T°	Cond. μS/cm	O <sub>2</sub> mg/l	pH
<b>VL1</b>	23,14	553	10,50	7,37
<b>VL5</b>	24,86	554	10,51	7,41
<b>VA08</b>	15,51	570	7,72	7,17

Le schede di campo per le componenti biologiche (diatomee e macrofite) sono riportate in Appendice B.

## 5.3 Analisi microbiologiche

### 5.3.1 Batteri

I risultati delle analisi microbiologiche del lago di Pietra del Pertusillo sono riportati nelle tabelle 11 e 12.

Nella stazione VL1 le analisi batteriologiche hanno mostrato assenza di *E.coli*, Enterococchi e Salmonella. Per quanto riguarda i Clostridi sono state rilevate 2 UFC/100mL nelle repliche C1 e C2. (Tab.11)

**Tabella 11.** Risultati microbiologici ottenuti dalle analisi su campioni di acqua della stazione VL1.

	<i>E.coli</i>		Enterococchi		Salmonella	Clostridi	
	UFC/100mL	UFC/10mL backflush	UFC/100mL	UFC/10mL backflush	presenza-assenza/L	UFC/100mL	UFC/mL
<b>Campione</b>	0	0	0	0	assente	1.3	0
<b>Controllo positivo</b>	<i>E.coli</i> : ATCC25922		<i>E. faecalis</i> : ATCC19433		<i>S.typhimurium</i> : ATCC14028	<i>C. perfringens</i> : ATCC12918	
	+	+	+	+	+	+	+
<b>Controllo negativo</b>	<i>E. faecalis</i> : ATCC19433		<i>E.coli</i> : ATCC25922		<i>E.coli</i> : ATCC25922	No inoculo	
	-	-	-	-	-	-	-

Dalle analisi su campioni di acqua, acqua in presenza di schiuma e sedimento nella stazione VL5 è possibile notare come un numero significativamente maggiore di *UFC/100mL* di *E.coli* ed Enterococchi siano state rilevate nel campione di acqua con presenza di schiuma. Le analisi batteriologiche per la ricerca di Clostridi hanno evidenziato l'assenza di *UFC* nelle repliche con diluizione  $10^{-1}$  mentre sono state rilevate colonie nelle tre repliche del campione tal quale (Tab.12).

**Tabella 12.** Risultati microbiologici ottenuti nelle analisi su campioni di sedimento della stazione VL5.

	<i>E.coli</i>		Enterococchi		Clostridi	
	<i>UFC/100mL</i>	<i>UFC/100mL</i> acqua-schiuma	<i>UFC/100mL</i>	<i>UFC/100mL</i> acqua-schiuma	Tal quale <i>UFC/gr</i>	$10^{-1}$ <i>UFC/gr</i>
<b>Campione</b>	1	8	5	21	2.6	0
<b>Controllo positivo</b>	<i>E.coli</i> : ATCC25922		<i>E. faecalis</i> :ATCC19433		<i>C. perfringens</i> : ATCC12918	
	+	+	+	+	+	+
<b>Controllo negativo</b>	<i>E. faecalis</i> : ATCC19433		<i>E.coli</i> : ATCC25922		Sedimento sterile	
	-	-	-	-	-	-

### 5.3.2 Virus

Le analisi su campioni di backflush non hanno mostrato presenza di Adenovirus umani 40 and 41, Epatite A, Epatite E, Noroviruses GI e GII, Rotaviruses A, Mammalian Orthoreovirus, Enterovirus umani (Poliovirus, Echovirus, Coxsakievirus).

## **Considerazioni conclusive**

In questa relazione sono riportati i risultati delle analisi sperimentali svolte sui campioni delle stazioni del lago del Pertusillo e del fiume Agri.

Altre indagini ambientali sono in fase organizzativa ed i risultati ottenuti verranno presentati nella relazione finale al termine dell'attività di supporto tecnico-scientifico svolta dall'ISS nell'ambito della convenzione.

## Bibliografia

APHA, AWWA, WPCF. *Standard methods for the examination of water and waste-water*. 21th ed. Washington DC: American Public Health Association; 2005.

Bourelly P., 1966. *Les algues d'eau douce*. Éditions N. Boubée & Cie. Tome I-II-III.

CEMAGREF, 1982. *Etude des methodes biologiques d'appréciation quantitative de la qualité des eaux*. Rapport Q. E. Lyon-A. F. Bassin Rhone- Mediterranée Corse. Lyon: CEMAGREF.

Marchetto A., Agostinelli C., Alber R., Beghi A., Bracchi S., Buzzi F., Carena E., Cavalieri S., Cimoli F., Costarossa S., Crescentini I, Della Bella V., Di Brizio M., Fioravanti M., Fogliati P., Formenti R., Galbiati M., Galimberti F., Macor A., Mancini L., Marcheggiani S., Marchi G., Musazzi S., Nicola A., Padula R., Pozzi S., Puccinelli C., Rinaldi E., Rustighi C., Testa P., Thaler B., Vendetti C., Zorza R., 2013. "Indice per valutazione della qualità delle acque lacustri italiane a partire dalle diatomee epifitiche ed epilittiche (EPI-L)". In "Indici per la valutazione della qualità ecologica dei laghi. CNR-ISE, 2013 pp. 75-92.

*Common Implementation Strategy (CIS)*, 2005. Guidance Document N° 14, Guidance on the Intercalibration Process 2004-2006: <https://circabc.europa.eu/sd/a/366c3e9c-4780-4c9d-bb39-c47262915c45/Guidance%20No%2014%20-%20Intercalibration%20process.pdf>

ISPRA, 2014. *Metodi biologici per le acque*. <http://www.isprambiente.gov.it/files/pubblicazioni/manuali-lineeguida/metodi-biologici-acque>

Italia, 1976. Decreto legislativo 10 maggio 1976 n. 319. Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento. G.U. 29 maggio 1976 n. 141.

Italia, 1994 Legge n 36 del 5 gennaio 1994, n. 36 Disposizioni in materia di risorse idriche. Gazzetta Ufficiale n 14 del 19 Gennaio 1994, Supplemento Ordinario n. 11.

Italia, 1999. Decreto legislativo 11 maggio 1999 n. 152 Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - Supplemento Ordinario, n. 124 del 29 maggio 1999. Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole

Italia, 2006. Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n.152. Norme in materia ambientale. Gazzetta Ufficiale- Supplemento Ordinario n. 96 del 14 aprile 2006.

Italia, 2008 . Decreto Legislativo 11 Agosto 2008, n. 131. «Regolamento recante i criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici (tipizzazione, individuazione dei corpi idrici, analisi delle pressioni) per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, recante : Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo». Gazzetta Ufficiale Supplemento Ordinario Serie generale n. 187 dell 11/8/2008

Italia, 2008. Decreto Legislativo 6 febbraio 2008 n. 8. Testo Unico sulla Sicurezza. Gazzetta ufficiale del 30 Aprile 2008.

Italia, 2009. Decreto 14 Aprile 2009, n.56. Regolamento recante «Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, recante Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo». Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario n. 83, 30 maggio 2009.

Italia, 2010. Decreto Legislativo 29 giugno 2010, n. 128. “Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, a norma dell'articolo 12 della legge 18 giugno 2009, n. 69 Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali - Modifica norme tecniche Dlgs 152/2006. Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario n. 187/L Agosto 2010.

Hoffmann, Werum & Lange-Bertalot, 2013. *Diatomeen im Süßwasser - Benthos von Mitteleuropa*. Bestimmungsflores Kiesalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie.

Krammer K, Lange- Bertalot H, 1986. Bacillariophyceae 1 Teil: Naviculaceae In: Ettl H. (Ed). *Süßwasserflora von Mitteleuropa Stuttgart*: Gustav Fischer- Verlag

Krammer K, Lange- Bertalot H, 1988. Bacillariophyceae 2 Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. In: Ettl H.(Ed). *Süßwasserflora von Mitteleuropa Stuttgart*: Gustav Fischer- Verlag

Krammer K, Lange- Bertalot H, 1986. Bacillariophyceae 3 Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: Ettl H.(Ed). *Süßwasserflora von Mitteleuropa Stuttgart*: Gustav Fischer- Verlag;

Krammer K, Lange-Bertalot H. 1991a. Bacillariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. In: Ettl H, et al. (Ed.). *Süßwasserflora von Mitteleuropa Stuttgart*: Gustav Fischer-Verlag.

Krammer K, Lange- Bertalot H, 1991b. Bacillariophyceae 4 Teil: Achnathaceae Kritische Ergänzungen zu Navicula und Gomphonema In: Ettl H.(Ed). *Süßwasserflora von Mitteleuropa Stuttgart*: Gustav Fischer- Verlag

Krammer K, Lange- Bertalot H, 2000. Bacillariophyceae 5 Teil: English and French translation of the keys In: Ettl H.(Ed). *Süßwasserflora von Mitteleuropa Stuttgart*: Gustav Fischer- Verlag

Lange-Bertalot H (Ed.), 2001. *Diatoms of Europe: diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats* edited by Horst Volume 2: Lange Bertalot, Horst: Navicula sensu stricto, 10 Genera Separated from Navicula sensu stricto, Frustulia Ruggell: Gantner Verlag.

Lange-Bertalot H. (Ed.), 2002. *Diatoms of Europe: diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats*. Volume 3: Krammer, Kurt: Cymbella Ruggell: Gantner Verlag.

Lange-Bertalot H (Ed.), 2003. *Diatoms of Europe: diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats Elsewhere* Volume 4: Krammer, Kurt: Cymbopleura, Delicata, Navicymbula, Gomphocymbellopsis, Afrocybella, Supplements to Cymbelloid taxa Ruggell: Gantner Verlag.

Mancini L, Sollazzo C (Ed.) 2009. Metodo per la valutazione dello stato ecologico delle acque correnti: comunità diatomiche. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 09/19).

Minciardi M.R., Spada C.D., Rossi G.L., Angius R., Orrù G., Mancini L., Pace G., Marcheggiani S., Puccinelli C., 2009. Metodo per la valutazione e la classificazione dei corsi d'acqua utilizzando la comunità delle macrofite acquatiche. Roma: ENEA; RT/2009/23/ENEA.

Pignatti S., 1984. La flora d'Italia. Bologna: Ed. Agricole.

Rott E, Pfister P, van Dam H, Pipp E, Pall K, Binder N, Ortler K., 1999. *Indikationslisten für Aufwuchsalgen in Österreichischen Fliessgewässern*. Teil 2: Trophieindikation und autokologische Anmerkungen Bundesministerium für Land-und Forstwirtschaft. Wien: Wasserwirtschaftskataster.

Round F.E., Crawford R.M. & Mann D.G., 1990. *The diatoms: biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, 747 pp.

Unione Europea, 2000. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. OJ, L 327 (22.12.2000), pp. 1-72

# Allegato A

## Stazioni di campionamento

<b>Stazione di campionamento</b>	Centro Lago
<b>Codice stazione</b>	VL1
<b>Coordinate</b>	40°16'38,92"N ; 15°59'53,88"E



<b>Stazione di campionamento</b>	Masseria Crisci
<b>Codice stazione</b>	VL5
<b>Coordinate</b>	40°17'13.24"N ; 15°57'23.77"E



<b>Stazione di campionamento</b>	Fiume Agri
<b>Codice stazione</b>	VA08
<b>Coordinate</b>	40°19'28.46"N; 15°49'19.47"E



# Allegato B

Schede di campo.

## STAZIONE VL1

Scheda campionamento diatomee lacustri

<b>Lago (toponimo)</b>	<b>Stazione (toponimo o sigla)</b>	<b>Coordinate geografiche della stazione (UTM32-WGS84)</b>
PIETRA DEL PERTUSILLO	VL1	Nord <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">40°16'38,92"N</span> Est <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">15°59'53,88"E</span>
<b>Data:</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">12.06 2016</span>	<b>Ora:</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">11.10</span>	
<b>Meteo:</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">SOLEGGIATO</span>	<b>Disco di Secchi:</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">5</span> m	
<b>Operatore:</b> _____	<b>Strumento prelievo:</b> <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">PETINO</span>	

Profondità (m)	Temperatura (°C)	PAR ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
0	23,06	Valore corrispondente al 100 %
1	22,09	<span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 100px; height: 15px;"></span>
2		Valore corrispondente al 1%
3		<span style="border: 1px solid black; display: inline-block; width: 100px; height: 15px;"></span>
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		

## STAZIONE VL5

### SCHEMA CAMPIONAMENTO DIATOMEE BENTONICHE LACUSTRI

Data del Prelievo: 12.06.2016 ore: 10.40

Identificativo del campione: VLS (MASERIA CRISCI)

Tipologia di substrato campionato: MACROFITE

Sito di campionamento: LAGO PERTUSILLO

Punto di campionamento: VLS

Contenitore: PROVETTA 50ml Quantità prelevata: 25ml

Parametri rilevati su campo:

CHIMICI FISICI

.....

.....

.....

#### INFORMAZIONI SUL SITO

Bacino idrografico di appartenenza	AGRI
Sito di riferimento a livello nazionale	NO
Tipologia lacustre	ARTIFICIALE
Latitudine	40° 17' 13,24" N
Longitudine	15° 57' 23,77" E
Altitudine s.l.m.(metri)	
Composizione del substrato	COTTONI : 60% LIMO : 55% MACROFITE : 5%
Ombreggiatura	60%

<b>Morfologia generale</b>	2	
<b>Idrologia generale</b>	2	
<b>* valore</b>	1=non alterato; 2= poco alterato; 3= molto alterato	
<b>Substrato campionato</b>	MACROFITE	
<b>Vegetazione ripariale</b>	RIMBOSCHIMENTO ARTIFICIALE	
<b>Uso del territorio</b>		
Urbanizzazione	2	
Agricoltura	1	
Uso ricreativo	2	
<b>* valore</b>		

Altre Osservazioni:..... PRESENZA AVANNOTTI

Scheda campionamento macrofite lacustri.

Schede di campagna

A 1 - Descrizione del sito

**Lago (toponimo)** PIETRA DEL PERTUSILLO

**Data:** 12.06.2016 **Ora:** 10.40

**Meteo:** SOLEGGIATO **Disco di Secchi:** 5,00 m

**Operatore:** \_\_\_\_\_

**Sito n°** 1

**Coordinate (UTM32-WGS84) dei margini del sito**

<b>Inizio (riva)</b>	<b>N</b>	<u>60°17'13,26"N</u>	<b>E</b>	<u>15°57'23,77"E</u>
<b>Fine</b>	<b>N</b>	<u>60°17'13,26"N</u>	<b>E</b>	<u>15°57'23,77"E</u>

**Caratteristiche della zona di costa a ridosso del sito**

<b>Vegetazione</b>	<b>Linea di costa</b>	<b>Uso del suolo</b>	<b>Linea di costa</b>
Bosco	<input checked="" type="checkbox"/>	Tessuto urbano	<input type="checkbox"/>
Arbusti	<input checked="" type="checkbox"/>	Parchi urbani e aree sportivo o ricreative	<input checked="" type="checkbox"/>
Alberi e arbusti	<input checked="" type="checkbox"/>	Aree portuali	<input type="checkbox"/>
Erba alta	<input type="checkbox"/>	Strade, parcheggi, piste ciclabili, sentieri	<input type="checkbox"/>
Canneti, cariceti	<input type="checkbox"/>	Zone coltivate	<input type="checkbox"/>
Paludi	<input type="checkbox"/>	Zone industriali	<input type="checkbox"/>
Prati, pascoli	<input type="checkbox"/>	Altro	<input type="checkbox"/>
Orti, giardini	<input type="checkbox"/>		
Aree senza vegetazione	<input type="checkbox"/>		
Altro	<u>STRADA</u>		<input type="checkbox"/>

<b>Tipologia della zona costiera</b>	<b>Caratteristiche particolari</b>
Rive ripide	<input type="checkbox"/>
Rive piatte	<input checked="" type="checkbox"/>
Muri	<input type="checkbox"/>
Altro	<input type="checkbox"/>
<b>Tipologia degli argini</b>	
Pietre, massi	<input type="checkbox"/>
	Accumulo di legname morto o trasportato <input type="checkbox"/>
	Scarichi, rifiuti o inquinamento <input type="checkbox"/>
	Afflussi (canali, fiumi, torrenti) <input type="checkbox"/>
	Emissario <input type="checkbox"/>
	Scaricatori (canali, drenaggio) <input type="checkbox"/>

A 2.1 - Scheda di campionamento macrofite

**Lago (toponimo)** PIETRA DEL PERTUSILLO

**Data:** 17.06.2014 **Ora:** 10.40

**Meteo:** SOLEGGIATO **Disco di Secchi:** 5,00 m

**Operatore:** \_\_\_\_\_

**Sito n°** 1

**Transetto n°** 1

**Coordinate (UTM32-WGS84) dei limiti del transetto**

<b>Inizio (riva)</b>	<b>N</b>	<u>60°17'13.24"N</u>	<b>E</b>	<u>15°57'23.77"E</u>
<b>Fine</b>	<b>N</b>	<u>60°17'13.24"N</u>	<b>E</b>	<u>15°57'23.77"E</u>

**Strumento di campionamento:**  Batiscopio  Telecamera  Rastrello

Intervallo di profondità (m)	Profondità* (m)	Coordinate* (UTM32-WGS84)		Osservazioni o campionamento	Specie presenti				
					Sp1**	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5
<u>0 - 1 m</u>	<u>1</u> m	N		Poppa - DX	1	2			
				Poppa - SX	1				
	E		Prua - DX	1					
			Prua - SX	1					
<u>1 - 2 m</u>		N		Poppa - DX					
				Poppa - SX					
	E		Prua - DX						
			Prua - SX						
<u>2 - 3 m</u>		N		Poppa - DX					
				Poppa - SX					
	E		Prua - DX						
			Prua - SX						
<u>3 - 4 m</u>		N		Poppa - DX					
				Poppa - SX					
	E		Prua - DX						
			Prua - SX						
<u>4 - 5 m</u>		N		Poppa - DX					
				Poppa - SX					
	E		Prua - DX						
			Prua - SX						
<u>5 - 6 m</u>		N		Poppa - DX					
				Poppa - SX					
	E		Prua - DX						
			Prua - SX						
<u>6 - 7 m</u>		N		Poppa - DX					



## STAZIONE VA08



### SCHEDA PER L'ANALISI DELLE COMUNITÀ DIATOMICHE

FIUME: <i>Agrà</i>	SITO: <i>VA08</i>
DATA: <i>17.06.2016</i>	OPERATORE

#### INFORMAZIONI SUL SITO

<b>Bacino idrografico di appartenenza</b>	<i>AGRA</i>	
<b>Sito di riferimento a livello nazionale</b>	si/no	<i>NO</i>
<b>Tipologia fluviale</b>	Idroecoregione (Her)	<i>18</i>
<b>Macrotipo fluviale</b>	Alpino/Centrale/Mediterraneo	<i>Mh</i>
<b>Latitudine</b>	<i>40°19'28.46" N</i>	
<b>Longitudine</b>	<i>15°49'19.27 E</i>	
<b>Altitudine</b>	s.l.m. [m]	<i>535</i>
<b>Area del bacino idrografico</b>	[km <sup>2</sup> ]	<i>1770</i>
<b>Distanza dalla sorgente</b>	[km]	
<b>Geologia</b>	siliceo, calcareo o misto	
<b>Substrato</b>	% composizione del substrato : massi e ciottoli (>256 mm), pietre (64 - 256 mm), ghiaia e ciottoli (2 - 64 mm), sabbia/limo/argilla (<2 mm), POM <i>GHIAIA: 20% SABBIA: 35% SABBIA/LIMO: 45%</i>	
<b>Ombreggiatura</b>	[%]	<i>10%</i>

<b>Morfologia generale</b>	profilo del canale/alterazioni della sezione trasversale, morfologia del canale)	<i>1</i>
	alterazioni habitat, alterazioni delle sponde	<i>1</i>
<b>Idrologia generale</b>	idrologia del fiume, barriere, influenze a monte delle barriere, hydropeaking, sistemi di prelievo acqua, dighe	<i>1</i>
<b>* valore</b>	1=non alterato; 2= poco alterato; 3= molto alterato	
<b>Parametri chimico-fisici</b>		
Temperatura H <sub>2</sub> O	°C	<i>15,51</i>
pH		<i>7,17</i>
O <sub>2</sub> disciolto	<i>mg/L</i>	<i>77,2</i>
<del>COND.</del>		<i>570</i>
<b>Vegetazione ripariale</b>		
<b>Uso del territorio</b>		
Urbanizzazione		<i>1</i>
Agricoltura		<i>2</i>
Uso ricreativo		<i>1</i>
<b>* valore</b>	1=assente; 2=presente; 3=diffuso	
<b>Note supplementari</b>		



## SCHEDA DI CAMPIONAMENTO MACROFITE

<b>Cod. Stazione:</b> VA08	<b>Coordinate:</b> 40°19'28.46"N; 15°29'19.44"E
<b>Estensione Stazione m.:</b> 100	<b>Operatore:</b>
<b>Uso del suolo a ridosso del sito:</b> NATURALE/AGRICOLA	<b>Data:</b> 12.06.2014

### Velocità di corrente

Impercettibile o molto lenta	
lenta	
media e laminare	X
Media e con limitata turbolenza	
elevata e quasi laminare	
Elevata e turbolenta	
molto elevata	

### Grado di ombreggiamento in alveo

Soleggiato	X
parzialmente ombreggiato	
ombreggiato	

### Torbidità

Chiara	X
leggermente torbida	
torbida	
opaca	

### Granulometria

	%
Roccia	
Massi	
Ciottoli	20
Ghiaia	35
Sabbia	25
Limo	20

Percentuale di copertura complessiva (%): 75%

Specie e percentuali relative (%)

Alga globosa: P	Veronica angelliaquatica: P
Alisma lanceolatum: P	
Callitriche palustris: 5%	
Carex perovskiae: P	
Carex A: P	
Carex B: P	
Clethra: P	
Equisetum: P	
Fontinalis antipyretica: 15%	
Gracilaria densa: 5%	
Juncus A: P	
Juncus B: P	
Najasstrum officinale: P	
Paspalum distichum: P	
Polygala amphibium: P	
Potamogeton crispus: 30%	
Ranunculus trichophyllus: 25%	
Sagittaria erecta: 15%	
Typha latifolia: 5%	

Profondità m: 0,5

Strumento utilizzato per il campionamento: ✓

Tipologia del substrato: NATURALE

#### Parametri chimico-fisici

T °C: 15,51

Cond. µS/cm: 570

pH: 7,17

O<sub>2</sub> (mg/l): 7,72