



Supporto tecnico scientifico per la valutazione dello stato ecologico e patogeni emergenti negli ecosistemi acquatici



Relazione Tecnica conclusiva

Accordo di collaborazione ISS-ARPAB
Fasc. Z1A

Giugno 2016

Responsabile scientifico:

Laura Mancini

Autori

Stefania Marcheggiani, Filippo Chiudioni, Camilla Puccinelli, Diego Casinelli,
Anna Maria D'Angelo, Emilio D'Ugo, Roberto Giuseppetti, Mario Figliomeni, Elisabetta Volpi e
Laura Mancini

*Reparto Qualità Ambientale e Ittiocoltura- Dipartimento Ambiente e Connessa Prevenzione
Primaria- ISS*

1. Premessa.....	3
2. Valutazione dello stato ecologico	4
3. Patogeni emergenti negli ecosistemi acquatici	5
4. Obiettivo.....	10
5 . Attività svolta.....	10
5.1 Attività di campo.....	12
5.2 Supporto in sede da parte degli Esperti ISS	13
5.3 Supporto Tecnico-scientifico per via telematica.....	15
5.4 Indagini biologiche sullo stato di qualità	16
6. Qualità Ambientale lago di Pietra del Pertusillo.....	17
6.1 Area di studio	17
6.2 Materiali e Metodi.....	20
6.2.1 Analisi delle comunità macrofittiche	20
Campionamento, analisi del campione ed identificazione.....	20
6.2.2 Analisi delle comunità diatomiche.....	22
Campionamento, analisi del campione ed identificazione.....	22
6.2.3 Analisi dei parametri chimico-fisici.....	23
6.2.4 Analisi microbiologiche	23
6.2.5 Virus.....	26
6.3 Risultati	28
6.3.1 Analisi delle componenti biologiche.....	28
3.3.2 Risultati dei parametri chimico-fisici.....	34
6.3.3 Analisi microbiologiche.....	34
7. Considerazioni conclusive	38
8. Bibliografia	39
9. Ringraziamenti	43
Allegato A-Schede descrittive delle stazioni	44
Allegato B-Schede di campionamento elementi biologici.....	47
Allegato C- Abstract e Poster.....	56

1. Premessa

Con l'emanazione del D.lgs 152 del 2006 (Italia, 2006) e dei successivi decreti attuativi, D.M. n 131/08 "Metodologie per l'individuazione dei Tipi Fluviali (Italia, 2008), D.M. 56/09 "Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento"(Italia, 2009) ed il D.M. 260/10 "Regolamento recante i criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali" (Italia, 2010), che recepiscono la Direttiva Quadro Acque 2000/60/CE (Unione Europea, 2000), gli elementi biologici hanno assunto un ruolo fondamentale nell'analisi dello stato di salute degli ecosistemi fluviali. La valutazione dello stato ecologico è basata, infatti, sull'analisi delle comunità vegetali e animali che popolano i corsi d'acqua. La Direttiva Acque, richiede per la prima volta, l' utilizzo di indicatori biologici, come diatomee, macrofite e pesci, in aggiunta ai macroinvertebrati, già presenti a livello normativo nel Decreto Legislativo 152/99 (Italia, 1999).

Dall' emanazione del D.Lgs. 152 del 2006 (Italia, 2006), Gruppi di lavoro si sono riuniti a livello nazionale per la stesura di Protocolli di Campionamento e Analisi (ISPRA, 2007); Gruppi di esperti hanno messo a punto metodi per la valutazione dello stato ecologico dei diversi elementi biologici (Buffagni *et al.*, 2008; Mancini & Sollazzo 2009; Minciardi *et al.*, 2009). L' applicazione di queste nuove metodologie, riportate nel D.M. 260/210 sono diventate dunque strumento obbligatorio per gli operatori tecnici delle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente. L' applicazione di queste nuove metodologie, riportate nel D.M. 260/2010 (Italia, 2010) sono diventate dunque strumento obbligatorio per gli operatori tecnici delle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente.

2. Valutazione dello stato ecologico

Il sistema normativo che regola il settore delle acque in Europa e in Italia è stato radicalmente modificato negli ultimi anni sotto la spinta della sempre più aumentata consapevolezza dell'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 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 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 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.

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.

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 diatomee sono state scelte come rappresentanti del fitobenthos nella valutazione dello stato ecologico essendo una delle componenti principali di quest'ultimo.

Le richieste della Direttiva hanno dato notevole impulso allo sviluppo di conoscenze e allo sviluppo di metodologie di indagine per l'analisi dei diversi elementi biologici introducendo componenti biologiche come diatomee e macrofite per la prima volta 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 e l'effettuazione di un articolato ciclo di monitoraggi finalizzati alla valutazione dello stato chimico, ecologico dei corpi idrici superficiali e sotterranei.

In particolare è stato individuato per gli ambiti fluviali un sistema di indicatori biologici finalizzato alla valutazione dello stato ecologico dei corpi idrici stessi.

3. Patogeni emergenti negli ecosistemi acquativi

"L'acqua non è un prodotto commerciale, bensì un patrimonio che va protetto, difeso e trattato come tale" (Unione Europea, 2000).

Il monitoraggio della qualità dell'acqua è di fondamentale importanza per il controllo della salute pubblica. Le infezioni trasmesse attraverso il consumo diretto ed indiretto di acque contaminate sono correlate alla diffusione di microrganismi comunemente presenti batteri, virus e protozoi. Cambiamenti dei parametri ambientali, dovuti ad esempio ai cambiamenti climatici o agli stili di vita, possono determinare insorgere di infezioni causate da patogeni e patogeni emergenti poiché le nuove condizioni possono favorire la sopravvivenza di alcuni microrganismi a discapito di altri. Tutto ciò è causa di preoccupazione, la gestione della prevenzione della salute pubblica dei rischi derivanti dal contatto e /o consumo di acqua contaminata è affidata sino ad oggi, all'utilizzo di indicatori microbiologici.

Le malattie idrotrasmesse sono patologie infettive dell'uomo e degli animali, associate all'uso diretto o indiretto dell'acqua contaminata causate da microrganismi o da agenti patogeni

(WHO, 2002). A partire dagli anni '70 - '80 l'attenzione del mondo scientifico è stata rivolta prevalentemente al controllo delle sostanze chimiche potenzialmente pericolose presenti nelle acque. In questo ambito sono state effettuati molti studi applicati, riguardanti il rischio chimico come solventi clorurati ed erbicidi, associato alle acque potabilizzate per la stretta connessione con la salute umana, mentre è stato trascurato il rischio legato alla componente microbiologica (AWWA, 1999). Solo più tardi l'attenzione è stata rivolta agli agenti patogeni. I rischi microbiologici legati all'acqua contaminata non derivano solo dall'uso diretto della medesima, ma anche da vie indirette come il consumo di molluschi e pesci, dall'ingestione di acqua durante la balneazione, dalle fioriture algali, dal consumo di ortaggi, frutta e verdura freschi contaminati dalle acque ad uso irriguo (Tauxe, 1997; UNEP, 1997;1998). Il rischio di focolai di malattie diarroiche dovute a patogeni enterici è alto sia in paesi industrializzati che non (Noji, 1997; Ahem et al., 2005). L'aumento del numero di epidemie correlate al consumo di acqua potabile nei paesi industrializzati, ha portato, negli ultimi anni, ad una maggiore attenzione verso le problematiche connesse alla presenza di microrganismi patogeni nelle risorse idriche, anche potabilizzate (Carraro et al., 2004). Il 35% delle epidemie causate da una contaminazione microbiologica è stato attribuito a parassiti (*Giardia duodenalis* e *Cryptosporidium parvum*), il 45% a batteri (*Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*) e il 20% a virus (*Calicivirus*) (Lee et al., 2002). Complessivamente è da ritenere che l'incidenza delle patologie idrodifuse nei paesi industrializzati sia certamente sottostimata. A livello europeo non è presente un sistema di sorveglianza organizzato per le patologie di questa origine ed è possibile ipotizzare che molte gastroenteriti siano di origine idrica, dovute al consumo di acqua contaminata o al consumo di alimenti contaminati dall'acqua (Carraro et al, 2004). In questi Paesi, il moderno concetto di protezione delle risorse idriche e lo sviluppo di tecniche di potabilizzazione sempre più efficaci come disinfezione, chiariflocculazione e filtrazione, hanno portato all'eradicazione virtuale delle patologie idrodifuse, eliminando quelle causate dai cosiddetti "patogeni classici", come *Salmonella* Tiphys o *Vibrio cholerae*. Tuttavia, nel corso dei secoli, si è assistito ad un cambiamento delle condizioni degli ecosistemi acquatici dovuto a diversi fattori:

- ✓ l'aumento della captazione per la distribuzione ad uso irriguo e potabile,
- ✓ l'invecchiamento e deterioramento degli impianti di trattamento e della rete idrica,
- ✓ la permanenza di sorgenti di inquinamento microbiologico delle acque (scarichi municipali, effluenti dei depuratori, scarichi industriali ed agricoli, ecc.),
- ✓ l'eccessivo uso del suolo e il disboscamento,
- ✓ l'alterazione dell'idromorfologia,

- ✓ la riduzione della zona riparia,
- ✓ i cambiamenti climatici,
- ✓ e le attività antropiche (es. eutrofizzazione),

che hanno contribuito a determinare una nuova situazione favorendo la comparsa di altre patologie idrodifuse causate da patogeni emergenti, riemergenti e opportunisti.

Sono definiti “patogeni emergenti”, quelli apparsi per la prima volta nella popolazione umana, come l'E. coli O157:H7 negli USA, o già esistenti che, per diversi fattori, subiscono un improvviso incremento della propria diffusione in aree geografiche dove non erano stati precedentemente segnalati come anche *Campylobacter parvum*, *Legionella* spp, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp, *Calicivirus*, comparsi nell'ultimo ventennio in USA, Canada e Europa (WHO, 1997).

Sono definiti “patogeni ri-emergenti” quei patogeni che dopo un periodo variabile di scomparsa ricompaiono con una frequenza rilevante a seguito di cambiamenti a lungo termine nella loro epidemiologia di base, come quelle patologie determinate da *Giardia duodenalis* nei paesi industrializzati (Woolhouse, 2002; Morse, 1995).

Sono definiti “patogeni opportunisti” i microrganismi commensali, saprofiti o ambientali, che possono determinare infezione in soggetti appartenenti ai sottogruppi più suscettibili della popolazione, come neonati, anziani e soggetti immunodepressi. Tra gli opportunisti si annoverano specie batteriche che hanno come habitat anche l'ambiente acquatico, come *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas stutzeri*, *Flavobacterium* spp. Molti di questi patogeni sono in realtà nuovi microrganismi originati, in primo luogo, dall'abilità di acquisire facilmente la resistenza nei confronti di uno o più antibiotici e, in secondo luogo, dalla capacità di trasferimento del patrimonio genetico responsabile della patogenicità (le cosiddette pathogenicity islands) tra diversi microrganismi (Egli et al., 2002;). L'esempio più evidente è rappresentato dal ceppo patogeno enteroemorragico di E. coli (EHEC) che si suppone abbia acquisito i geni della virulenza attraverso sistemi di trasferimento genico (lisogenia) (O'Brien et al, 1998).

Fattori associati alla comparsa di infezioni idrodifuse emergenti e riemergenti.

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

Tali fattori comprendono:

- ✓ la presenza/assenza originaria di un microrganismo in un'area,

- ✓ le sue caratteristiche intrinseche (resistenza, infettività, dose infettante, ecc.),
- ✓ e condizioni climatiche che possono favorirne la sopravvivenza ed eventualmente la moltiplicazione,
- ✓ gli eventi estremi, come le alluvioni.

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

I cambiamenti demografici verificatisi nei paesi industrializzati influiscono in modo determinante sulla diffusione delle patologie.

La tendenza all'invecchiamento delle popolazioni, che si sta verificando nei paesi industrializzati e che ha portato all'aumento del numero di soggetti suscettibili a potenziali patogeni.

L'incremento nella popolazione, legato all'aumento della speranza di vita, dell'incidenza e della prevalenza di patologie e condizioni associate a immunosoppressione (malattie ereditarie, infezione da HIV, trapianti d'organo, trattamenti immunosoppressivi per patologia cancerosa e reumatoide, ecc.) aumenta la suscettibilità ad infezioni da parte di microrganismi che non causano malattia nei soggetti immunocompetenti. Infatti i soggetti immunodepressi hanno un maggiore rischio di ammalarsi e di morire per gastroenteriti diarroiche.

I cambiamenti climatici su piccola e larga scala possono contribuire alla diffusione di nuovi microrganismi patogeni (AAVV., 2007)

Nell'ultimo secolo si è osservato un aumento della temperatura media giornaliera e, negli ultimi cinque anni, la temperatura superficiale della Terra è risultata più alta rispetto agli analoghi periodi degli ultimi 600 anni. Questo ha influenzato la nuvolosità, le precipitazioni e la frequenza di eventi piovosi di elevata intensità, fenomeni frequentemente associati ad epidemie idrodifuse causate da microrganismi a trasmissione oro-fecale (Patz et al., 2004; AAVV, 2007). A tal proposito, nel 2009 a Copenhagen, gli Stati Uniti hanno concordato un riscaldamento climatico non superiore di due gradi rispetto al periodo preindustriale, ma la necessaria riduzione della metà delle emissioni di CO₂ (anidride carbonica) non è stata approvata, quindi un trattato giuridicamente vincolante non è stato concluso.

In particolar modo, si è osservata una maggiore diffusione nell'ambiente di alcuni batteri (*Campylobacter* spp., ecc.), virus (*Calicivirus* spp. ,ecc.) e protozoi (*Cryptosporidium* spp. , *Giardia* spp.), considerati per tale ragione patogeni "emergenti" (Rose et al., 2000).

Inoltre, i cambiamenti ecologici legati allo sviluppo economico ed agricolo sui territori (disboscamento, fertirrigazione, riuso delle acque in agricoltura, ecc.) hanno comportato

continui cambiamenti a livello degli ecosistemi, andando ad influire anche sulla diffusione dei microrganismi (Patz et al., 2000).

Un altro aspetto che gioca un ruolo chiave nella diffusione di potenziali patogeni è la globalizzazione con l'intensificazione dei viaggi e del commercio internazionali. Per quanto riguarda il rischio di diffusione di patogeni associato alle attività commerciali, basta pensare che una rilevante porzione della frutta e verdura consumata nei paesi industrializzati è coltivata in paesi diversi da dove viene consumata (Louria,2000). Sviluppo di efficienti, test diagnostici rapidi per controllare il contenuto microbico dell'acqua rappresenta una strategia fondamentale di assistenza sanitaria per il controllo e la prevenzione delle malattie causate da agenti patogeni provenienti dall'acqua.

I metodi tradizionali, ad esempio, la coltivazione, la caratterizzazione biochimica ed il rilevamento microscopico, per la determinazione di agenti patogeni dall'acqua sono spesso laboriosi e richiedono tempo, mentre le tecniche molecolari hanno migliorato notevolmente la nostra capacità di identificare le specie, determinare l'espressione di geni che regolano i processi cellulari fondamentali, e di stimare il flusso genico e la distribuzione delle specie nel tempo e nello spazio (Marcheggiani et al., 2015a; 2015b).

4. Obiettivo

Obiettivo principale della Convenzione ARPAB_ISS è stato la collaborazione tra ISS e L'Agenzia per la valutazione dei risultati dello stato ecologico delle acque derivante dai dati di monitoraggio in corso, supporto tecnico scientifico durante lo studio delle diatomee, delle macrofite acquatiche e la determinazione attraverso tecniche di microbiologia di patogeni potenziali patogeni presenti nei corpi idrici superficiali. L'obiettivo è stato pienamente raggiunto.

5 . Attività svolta

L'attività è stata organizzata per i seguenti temi:

Diatomee:

Collaborazione tra tecnici ARPA Basilicata e tecnici ISS per l'analisi delle diatomee campionate nel corso del periodo di durata dell'accordo, presso ISS e valutazione degli indici ambientali correlati.

Supporto all'Agenzia per la risoluzione di eventuali criticità riscontrate durante le attività di monitoraggio.

Macrofite:

Realizzazione di incontri tecnici dedicati alla messa a punto dei metodi di campionamento e analisi.

Collaborazione tra tecnici ARPA Basilicata e tecnici ISS per l'analisi delle macrofite nel corso del periodo di durata dell'accordo sia presso i siti di monitoraggio che in laboratorio e, relativa stima degli indici ambientali correlati.

Collaborazione con l'Agenzia per l'individuazione di possibili siti di riferimento ai sensi della normativa.

Supporto all'Agenzia per la risoluzione di eventuali criticità riscontrate durante le attività di monitoraggio.

Microorganismi patogeni e potenzialmente patogeni Virus e Batteri:

Collaborazione con l’Agenzia per il trasferimento della metodologia per il campionamento di acqua, concentrazione e successiva filtrazione seriale, per la ricerca di microrganismi patogeni e potenzialmente patogeni, Virus e Batteri.

Supporto e trasferimento delle tecniche di microbiologia per la determinazione di microrganismi patogeni e potenzialmente patogeni, Virus e Batteri ai tecnici dell’Agenzia.

Supporto tecnico scientifico per la risoluzione di eventuali criticità riscontrate durante le attività di monitoraggio nel corso del periodo di durata dell’accordo.

Supporto tecnico nella stesura dei giudizi finali dello stato ambientale dei corpi idrici

Le attività si sono svolte secondo le seguenti linee di attività:

- ✓ **Attività di formazione sul campo.**
- ✓ **Attività di formazione in sede**
- ✓ **Supporto Tecnico-scientifico per via telematica**
- ✓ **Indagine ambientale sullo stato di qualità ambientale del lago di Pietra del Pertusillo**

5.1 Attività di campo.

I tecnici dell'ARPA sono stati affiancati dal personale ISS nelle attività di campionamento e trattamento del campione. Sono state effettuate due uscite il 12 Giugno del 2014 e ed il 12/05/2015.

Sono state illustrate le metodiche di campionamento delle comunità diatomiche e macrofitiche, secondo quanto riportato dalle normative standard (ISPRA 2014) sono state individuate due stazioni una in prossimità della riva del lago ed una sul fiume Agri; quest'ultima scelta appositamente per l'analisi delle macrofitiche.

Le macrofite sono state identificate in campo per evitare il più possibile l'alterazione del sito (Fig.1) . 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.

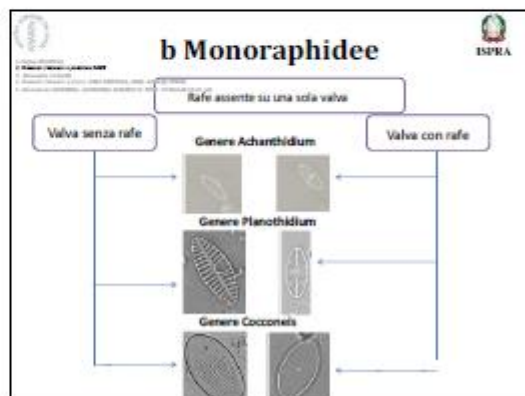
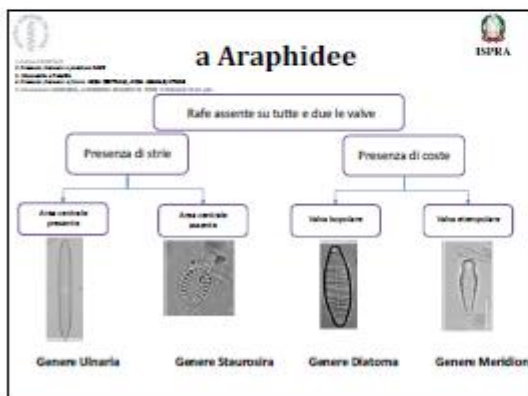
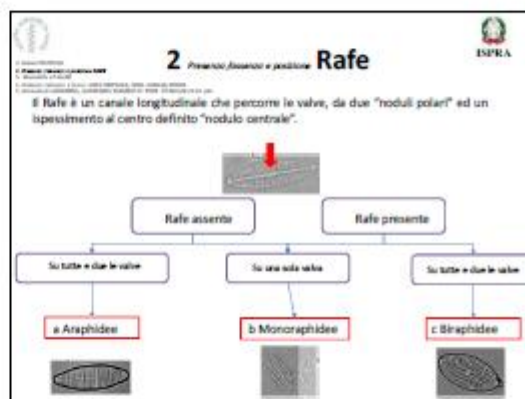
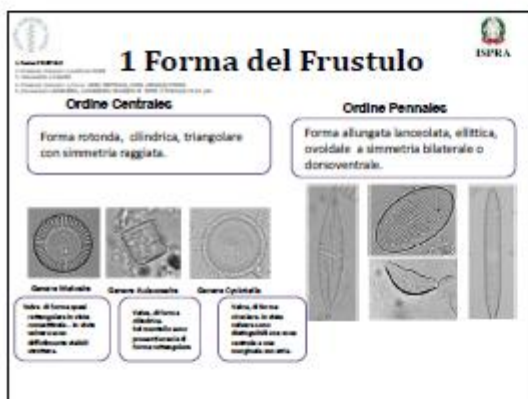
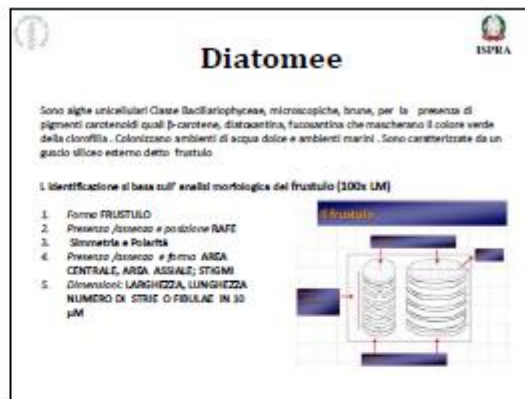
A queste uscite erano presenti del personale ARPAB: I Dott. T. Trabace, S. Longo e A. Marraudino, M Casamassima.



Figura 1. Uscita sul campo e identificazione di una specie macrofitica

5.2 Supporto in sede da parte degli Esperti ISS

L'incontro formativo svoltosi il 22 Maggio 2015, presso la sede Arpa di Metaponto: sono state illustrate le procedure di trattamento del campione diatomico, la preparazione dei vetrini permanenti, l'identificazione delle specie diatomiche (di seguito la presentazione con la chiave dicotomica illustrata) e la valutazione dello stato ecologico.



c Biraphidee

Rafe presente su tutte e due le valve

Rafe visibile sulla superficie della valve, in posizione più o meno centrale

Rafe sovrapposto da strutture dette efbule a formare il sistema rafe-fibule

C1 Biraphidee

C2 Biraphidee

3 Simmetria delle valve C1 Biraphidee

Bilaterale

Dorsoventrale

1 rafe fibulare in posizione centrale

1 rafe fibulare da sovrapporre

1 rafe fibulare

1 rafe fibulare all'estremità degli apici delle valve

1 rafe nella zona dorsale della valve

1 rafe fibulare, equidistante alla zona ventrale

Generi: Navicula e/o Gomphonema?

Generi: Diploxeis

Generi: Pinnularia

Generi: Cymbella

Generi: Ectyonema

Generi: Amphora

Generi: Gyrosigma

3 Polarità delle valve C1 Biraphidee

Isopolare

Eteropolare

1 rafe centrale, 1 rafe laterale alla

1 rafe centrale, 1 rafe con presenza di un'origine

1 rafe centrale, 1 rafe a spirale

1 rafe centrale, 1 rafe laterale alla regione della rafe

1 rafe di sovrapposizione e fibulare alla rafe

1 rafe di sovrapposizione e fibulare alla rafe

Generi: Navicula

Generi: Laticula

Generi: Craticula

Generi: Eolimna

Generi: Gomphonema

Generi: Rhokosphenia

Sistema rafe-fibule in posizione C2 Biraphidee

più o meno centrale

marginale

circonda tutta la valve

Generi: Bacillaria

Generi: Nitzschia

Generi: Tryblionella

Generi: Cymatopleura

Generi: Surtirella

dimensioni larghezza, lunghezza numero di strie specie

5.3 Supporto Tecnico-scientifico per via telematica

Durante tutto il periodo dell'accordo è stato fornito supporto da parte degli esperti ISS al personale ARPA attraverso scambio telematico d'immagini, nell'identificazione delle specie fitoplanctoniche (Fig 2).

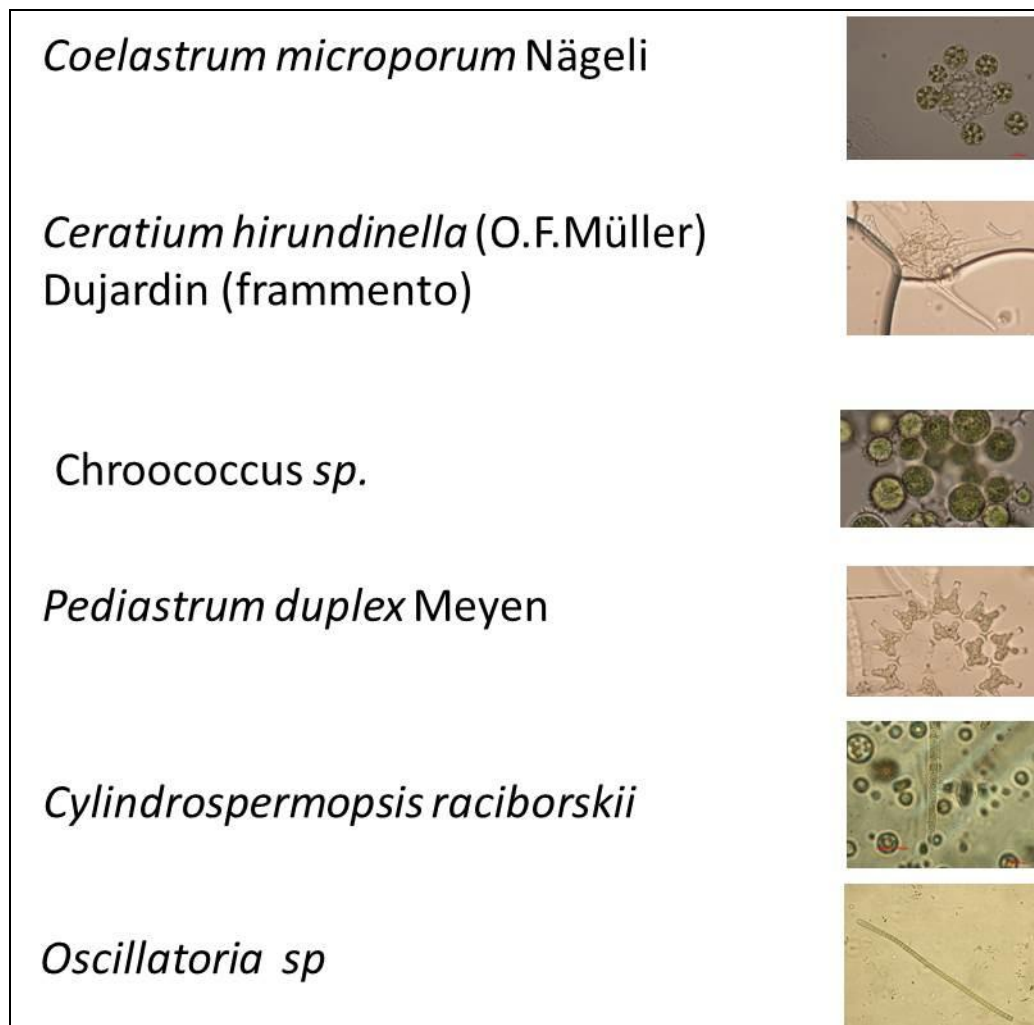


Figura 2. Esempio di file inviato con l'identificazione di specie fitoplanctoniche

5.4 Indagini biologiche sullo stato di qualità

Le attività per la valutazione della Qualità Ambientale del Lago di Pietra del Pertusillo 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.

6. Qualità Ambientale lago di Pietra del Pertusillo

6.1 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. 3 e 4).

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.

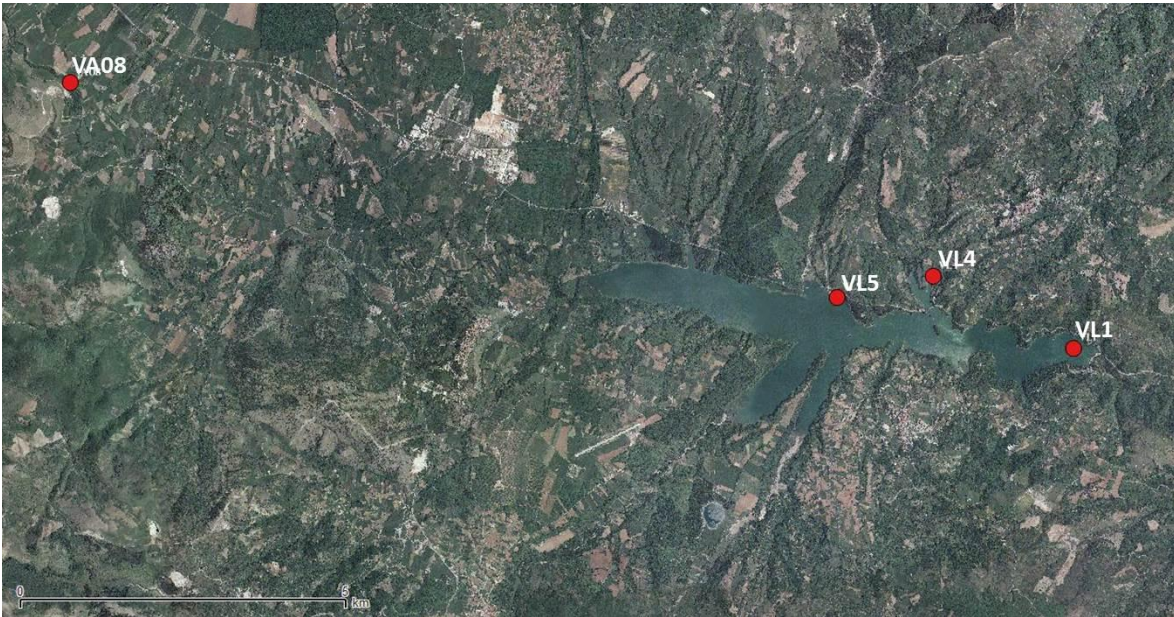


Figura 3. Localizzazione delle stazioni di campionamento lago di Pietra del Pertusillo



Figura 4. Visione d'insieme del lago di Pietra del Pertusillo

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 in prossimità del depuratore di Montemurro (VL4), 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.

Codice stazione	Stazione	Corpo idrico	Latitudine	Longitudine
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
VL4	Depuratore	Lago	40°17'19.88"N	15°58'26.93"E

6.2 Materiali e Metodi

I campionamenti degli elementi biologici, dei campioni d'acqua per analisi microbiologiche e virologiche sono stati effettuati, nella stagione primaverile, a Giugno 2014 e Maggio 2015.

Nel primo campionamento (Giugno 2014) sono state prelevati campioni dalle stazioni, VL1, VL5 VA08, nel secondo invece sono state investigate le stazioni, VL1, VL5, VL4.

6.2.1 Analisi delle comunità macrofite

Campionamento, analisi del campione ed identificazione

Il campionamento delle macrofite, nelle tre stazioni selezionate, 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.

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. E' stato stabilito il numero di transetti da analizzare in base alla copertura macrofita e, per la scarsa copertura macrofita 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.

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 macrofita 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.

6.2.2 Analisi delle comunità diatomiche

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 cm².

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 (H₂O₂ 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 (stazione VA08). 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).

6.2.3 Analisi dei parametri chimico-fisici

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

6.2.4 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 avvindate 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.

6.2.4.1 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).

6.2.4.2 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_2 (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 1UL, 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.

3.2.4.3 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 inoculati 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.

6.2.5 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, Norovirus GI e GII, Rotavirus A, Mammalian Orthoreovirus, Enterovirus umani (Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus).

6.3 Risultati

6.3.1 Analisi delle componenti biologiche

Le comunità Macrofite

Nella stazione VL1 (centro lago) non sono state rilevate macrofite a causa dell'elevata profondità del Lago mentre nella stazione VL5 è stata osservata una con una copertura uniforme di *Paspalum distichum* della fascia riparia fino a circa 1m di profondità, nel primo campionamento è stato ritrovato pure un esemplare di *Scirpus holoschoenus* (Tab 2)

Tabella 2. Macrofite nella fascia riparia della stazione VL5

Campionamento	Specie	Abbondanza
Primavera 2014	<i>Paspalum distichum</i> L.	Presente uniformemente sulla fascia riparia
	<i>Scirpus holoschoenus</i> L.	1 esemplare
Primavera 2015	<i>Paspalum distichum</i> L.	Presente uniformemente sulla fascia riparia

Nella stazione VA08 (fiume Agri) è stata rilevata un'elevata copertura macrofite 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 macrofittica presente nella stazione VA08 (p= copertura inferiore al 5%)

Copertura macrofittica totale = 75%	
Specie	Percentuale di copertura relativa (%)
<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

Le comunità diatomiche

Le diatomee campionate nella stazione VL1 hanno mostrato una comunità composta da 10 con la 10 specie e una dominanza di *Cyclotella bodanica* e *Cyclotella ocellata* nel primo campionamento, e solo di *C. ocellata* nel secondo (Tab. 4).

Tabella 4. Comunità diatomica nella stazione di campionamento VL1.

Specie diatomiche	Primavera 2014	Primavera 2015
	Abbondanza	Abbondanza
<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	2	2
<i>Cyclotella bodanica</i> Eulenstein ex Grunow	114	192
<i>Cyclotella ocellata</i> Pantocsek	-	197
<i>Cymbella excisa</i> Kützing	1	-
<i>Encyonema caespitosum</i> Kützing	1	-
<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D.G.Mann	1	-
<i>Fragilaria mesolepta</i> Rabenhorst	-	4
<i>Gomphonema parvulum</i> (Kützing) Kützing	1	0
<i>Melosira varians</i> C.Agardh	1	5
<i>Navicula hofmanniae</i> Lange-Bertalot	1	-
<i>Nitzschia fonticola</i> (Grunow) Grunow	1	-
<i>Nitzschia hantzschiana</i> Rabenhorst	1	-
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) P. Compère	-	0

Nella stazione VL5 ,nel primo campionato la comunità diatomica è stata prelevata da macrofite (*Paspalum distichum* L.) a causa del substrato limoso che ricopriva uniformemente i ciottoli presenti. Nel secondo campionamento è stato possibile raccogliere le diatomee direttamente dai ciottoli: le differenze nella struttura delle comunità sono dovute al diverso substrato campionato.

Tabella 5. Comunità diatomica nella stazione di campionamento VL5.

Specie diatomiche	Primavera 2014	Primavera 2015
	Abbondanza	Abbondanza
<i>Achnantheidium minutissimum</i> (Kützing) Czarnecki	6	89
<i>Amphora copulata</i> (Kützing) Schoeman & R.E.M.Archibald	1	\
<i>Craticula molestiformis</i> (Hustedt) Lange-Bertalot	-	1
<i>Cyclotella bodanica</i> Eulenstein ex Grunow	52	30
<i>Cyclotella meneghiniana</i> Kützing	3	-
<i>Cyclotella ocellata</i> Pantocsek	22	-
<i>Cymbella affinis</i> Kützing	-	4
<i>Cymbella excisa</i> Kützing	1	2
<i>Cymbella parva</i> (W.Smith) Kirchner	0	-
<i>Diatoma vulgare</i> Bory	1	-
<i>Encyonema caespitosum</i> Kützing	0	1
<i>Encyonema silesiacum</i> (Bleisch) D.G.Mann	-	3
<i>Encyonema ventricosum</i> (C.Agardh) Grunow	3	-
<i>Fragilaria perminuta</i> (Grunow) Lange-Bertalot	0	-
<i>Fragilaria vaucheriae</i> (Kützing) J.B.Petersen	236	-
<i>Gomphonema italicum</i> (Kützing)	2	-
<i>Gomphonema olivaceum</i> (Hornemann) Brébisson	7	-
<i>Gomphonema subclavatum</i> (Grunow) Grunow	-	1
<i>Gomphonema supertergestinum</i> E.Reichardt	1	-
<i>Hantzschia abundans</i> Lange-Bertalot	0	-
<i>Melosira varians</i> C.Agardh	-	3
<i>Meridion circulare</i> (Greville) C.Agardh	0	-
<i>Navicula capitatoradiata</i> H.Germain	2	-
<i>Navicula capitatoradiata</i> Germain	-	8
<i>Navicula cryptocephala</i> Kützing	-	8
<i>Navicula cryptotenella</i> Lange-Bertalot	0	2
<i>Navicula veneta</i> Kützing	1	-
<i>Nitzschia dissipata</i> (Kützing) Rabenhorst	-	3
<i>Nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow	-	1
<i>nitzschia frustulum</i> (Kützing) Grunow	0	-
<i>Nitzschia paleacea</i> Grunow	-	1
<i>Rhoichosphenia abbreviata</i> (C.Agardh) Lange-Bertalot	1	-
<i>Stephanodiscus neoastrea</i> Håkansson & Hickel	61	-
<i>Surirella angusta</i> Kützing	0	-
<i>Surirella brebissoni</i> Krammer & Lange-Bertalot	0	-
<i>Ulnaria acus</i> (Kützing) Aboal	2	-
<i>Ulnaria ulna</i> (Nitzsch) P. Compère	4	-

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 campionamento VA08.

Specie diatomiche	Primavera 2014
	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	0
<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	0
<i>Gyrosigma obtusatum</i> (Sullivant & WormLey) C.S.Boyer	0
<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	0
<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	0
<i>Planothidium lanceolatum</i> (Brébisson ex Kützing) Bukhtiyarova	0
<i>Reimeria sinuata</i> (Gregory) Kociolek & Stoermer	0
<i>Rhoicosphenia abbreviata</i> (C.Agardh) Lange-Bertalot	6

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

Vengono di seguito riportati i risultati ottenuti dal calcolo dell'IBMR (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).

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

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

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	Data	RQE_EPI-L	Stato ecologico
VL5	2014	0,50	Sufficiente
	2015	0,52	Sufficiente

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

Stazione	RQE_ICMi	Stato ecologico
VA08	0,75	Buono

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

3.3.2 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. $\mu\text{S/cm}$	O ₂ mg/l	pH
VL1	23,14	553	10,50	7,37
VL5	24,86	554	10,51	7,41
VA08	15,51	570	7,72	7,17

6.3.3 Analisi microbiologiche

I Batteri

I risultati delle analisi microbiologiche del lago di Pietra del Pertusillo sono riportati nelle tabelle sotto riportate. (Tab 11-12-13).

Nella stazione VL1 le analisi batteriologiche effettuate su campioni d'acqua tal quali e su campioni d'acqua concentrata hanno mostrato assenza di *Enterococchi* e *Salmonella*, nel campionamento del 2014.

Tabella 11. Risultati microbiologici ottenuti nelle analisi su campioni di sedimento della stazione VL1.

Stazione	Data	<i>E.coli</i>		<i>Enterococchi</i>		<i>Salmonella</i>	<i>Clostridi</i>
		<u>UFC/100mL acqua</u>	<u>UFC/10mL Acqua concentrata</u>	<u>UFC/100mL acqua</u>	<u>UFC/10mL Acqua concentrata</u>	<u>Presenza-assenza/L</u>	<u>UFC/100mL acqua</u>
VL1	Primavera 2014	0	0	0	0	Assente	1
	Primavera 2015	6	0	0	0	Assente	3
Controllo positivo		<i>E.coli</i> : ATCC25922 +		<i>E. faecalis</i> : ATCC19433 +		<i>S.typhimurium</i> : ATCC 14028 +	<i>C. perfringens</i> : ATCC12918 +
Controllo negativo		<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. Un aumento della carica batterica è stato riscontrato dal primo al secondo campionamento. 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.

Stazione	Data	<i>E.coli</i>		<i>Enterococchi</i>		<i>Salmonella</i>	Clostridi	
		<u><i>UFC/100mL acqua</i></u>	<u><i>UFC/10mL Acqua schiuma</i></u>	<u><i>UFC/100mL acqua</i></u>	<u><i>UFC/10mL Acqua - schiuma</i></u>	<u><i>Presenza-assenza/L</i></u>	<u><i>UFC/100mL acqua</i></u>	<u><i>UFC/gr</i></u>
VL5	Primavera 2014	1	8	5	X	X	3	0
	Primavera 2015	30	X	86	X	Assente	28	0
Controllo positivo		<i>E.coli</i> : ATCC25922		<i>E. faecalis</i> :ATCC19433		<i>S.typhimurium</i> :ATCC14028	<i>C. perfringens</i> : ATCC12918	
		+		+		+	+	
Controllo negativo		<i>E. faecalis</i> : ATCC19433		<i>E.coli</i> : ATCC25922		<i>E.coli</i> : ATCC25922	No inoculo	
		-		-		-	-	

Nella stazione VL4, sita in prossimità del depuratore, sono state riscontrate significative concentrazioni, di *E.coli* ed Enterococchi

Tabella 13. Risultati microbiologici ottenuti nelle analisi su campioni di sedimento della stazione VL4

Stazione	Data	<i>E.coli</i>	<i>Enterococchi</i>
		<u><i>UFC/100mL acqua</i></u>	<u><i>UFC/100mL acqua</i></u>
VL5	Primavera 2014	30	86
Controllo positivo		<i>E.coli</i> : ATCC25922	<i>E. faecalis</i> :ATCC19433
		+	+
Controllo negativo		<i>E. faecalis</i> : ATCC19433	<i>E.coli</i> : ATCC25922
		-	-

6.3.4 I Virus

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

L'analisi quantitativa (q-PCR) di genomi equivalenti (g.e.), corrispondenti ad Adenovirus a replicazione gastroenterica, appartenenti alla specie ADV F, ha prodotto risultati negativi nel campione ottenuto da Pertusillo VL1. La stima per litro di genomi equivalenti ADV41 è di 0 g.e./L.(Fig.2) (centro lago, Fig.3).

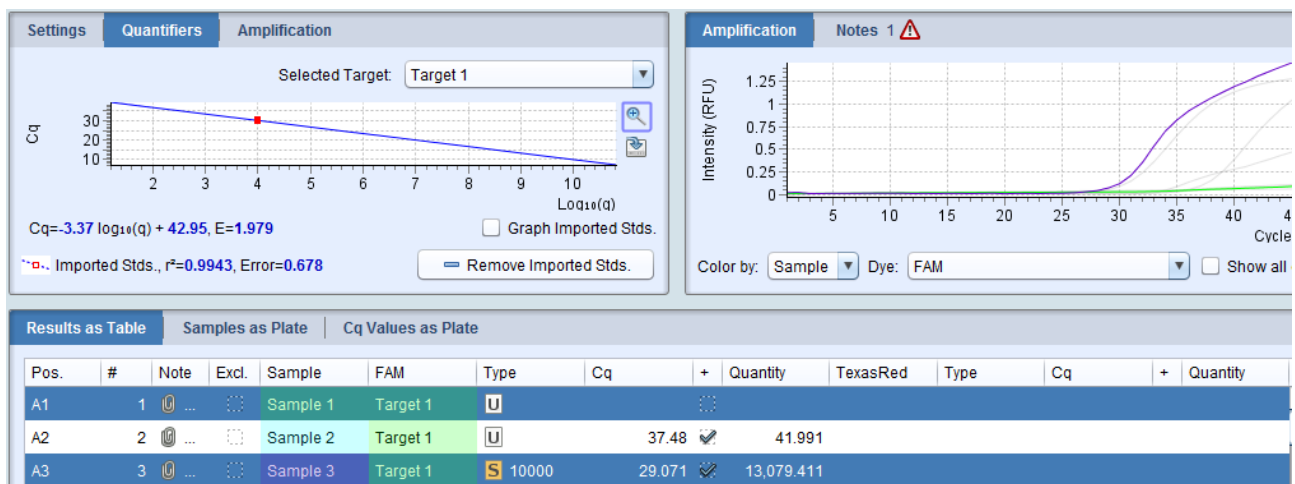


Figura 5. Risultati q-PCR ADV41 Pertusillo Centro Lago (VL1). In viola controllo positivo curva standard, in verde campione (VL1).

L'analisi quantitativa (q-PCR) di genomi equivalenti (g.e.), corrispondenti ad Adenovirus a replicazione gastroenterica, appartenenti alla specie ADV F, ha prodotto risultati positivi nel campione ottenuto da Pertusillo Monte Murro (VL4). La stima per litro di genomi equivalenti ADV41 è di 1500 g.e./L (Fig.5).

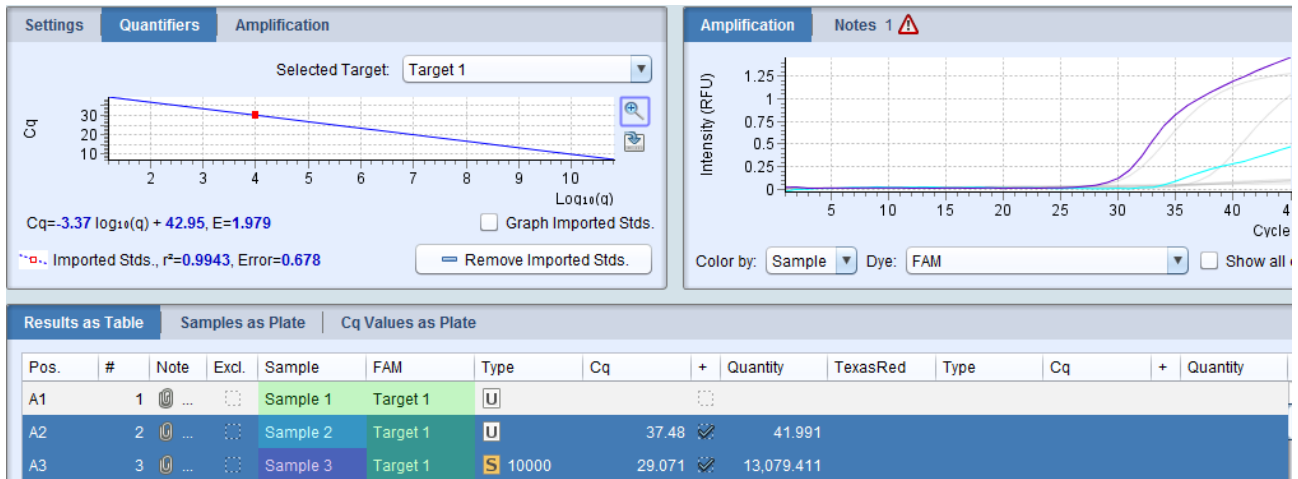


Figura 6. Risultati q-PCR ADV41 Pertusillo Monte Murro (M.M.) prossimità depuratore . In viola controllo positivo curva standard, in azzurro campione (M.M.).

7. Considerazioni conclusive

Gli obiettivi sono stati raggiunti ciò è stato reso possibile grazie alla formazione di un gruppo tecnico composto dal personale ISS e dal personale ARPAB che hanno continuamente collaborato durante tutta la durata della convenzione.

Lo svolgimento delle attività sia in campo che in remoto sono state un ottimo sistema di affiancamento che ha consentito il trasferimento di competenze tecniche operative e scientifiche in generale tanto da rendere pienamente autonomo il personale dell'agenzia per il monitoraggio della componente diatomica e macrofitica e per la valutazione dei risultati dello stato ecologico delle acque .

8. Bibliografia

Ahem M., Kovats R.S., Wilkinson P., Few R., Matthies F., 2005. Global health impacts of floods: epidemiologic evidence. *Epidemiol. Rev.*, 27: 36-46.

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

AAVV., 2007. Environment and health risks from climate change and variability in Italy. Edited by Bettina Menne and Tanja Wolf. World Health Organization (OMS) Europe -APAT.

AWWA American Water Works Association, 1999. Committee Report. Emerging pathogens viruses, protozoa, and algal toxins. *JAWWA* 1999;91(9):110-21.

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

Carraro, E., Bonetta, S., Palumbo, F., Gilli, G., 2004. Rischio microbiologico associato al consumo di acqua potabile nei paesi industrializzati. *Ann. Ist. Super. Sanità*; 40(1):117-140.

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.

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>

Egli T., Koster W., Meile L., 2002. Pathogenic microbes in water and food: changes and challenges. *FEMS Microbiol Rev*, 26:111-2.

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*. Bestimmungsflora Kieselalgen 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.

Lee SH., Levy DA., Craun GF., Beach MJ., Calderon RL., 2002. Surveillance for waterborne-disease outbreak - United States, 1999-2000. *MMWR* 51(SS-8):1-47.

Louria DB., 2000. Emerging and re-emerging infections: the social determinants. *Futures*; 32:581-94.

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).

Marcheggiani S, D'Ugo E, Puccinelli C, Giuseppetti R, D'Angelo AM, Gualerzi CO, Spurio R, Medlin LK, Guillebault D, Weigel W, Helmi K, Mancini L., 2015a. Detection of emerging and re-emerging pathogens in surface waters close to an urban area. *International journal of environmental research and public health* 2015;12(5):5505-5527.

Marcheggiani S, Spurio R, Cimarelli L, Duarte T, Mancini L., 2015b. Editorial Scientific Symposium "Small solution for big water- related problems: innovative microarrays and small sensors to cope with water quality and food security". *International journal of environmental research and public health* 2015;12(12): 15400-15408.

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.

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.

Morse, SS., 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.*, 1(1):7-15.

Noji, E.K., 1997. *The Public Health Consequences of Disaster*. New York, Oxford University Press.

O'Brien AD., Kaper JB., 1998. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: yesterday, today and tomorrow. In: Kaper JB, O'Brien AD (Ed.). *Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E. coli strains*. Washington: DC:ASM Press; p. 1-11.

Patz J.A., Epstein P.R., Burke T.A., Balbus JM., 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic disease. *Int. J.Parasitol* 30:1395-405.

Patz, J. A., Daszak P, Tabor G.M., Alonso Aguirre A., Pearl M., Jon Epstein, Wolfe N.D., Marm Kilpatrick A., Foufopoulos J., Molyneux D., Bradley D. J., and Members of the Working Group on Land Use Change Disease Emergence, 2004. Unhealthy landscapes: policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environ. Health. Persp.*, 112 (10): 1092-1098.

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

Rose JB., Daeschner S., Easterling DR., Curriero FC., Lele S., Patz J., 2000. Climate and waterborne disease outbreaks. *JAWWA*; 92(9):77-87).

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 autökologische 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.

Tauxe, R.V., 1997. Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge. *Emerg. Infect. Dis.* 3,4: 425-434.

UNEP - United Nations Environment Programme, 1997. *Global Environment Outlook*, 1st ed. New York and Oxford, Oxford University Press.

UNEP - United Nations Environment Programme, 1998. *Human Development Report*. Oxford University Press, New York.

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

WHO- World Health Organization (2002). *Surveillance for Waterborne-Disease Outbreaks Associated with Drinking Water --- United States, 2001—2002* October 22, 2004 / 53(SS08);23-45.

WHO- World Health Organization, (1997). *Division of emerging and communicable diseases surveillance and control annual report – 1996*. Geneva, World Health Organization, 1997.

Woolhouse MEJ., (2002). Population biology of emerging and re-emerging pathogens. *Trends in Microbiol.* 10, No. 10 (Suppl.): S3–S7.

9. Ringraziamenti

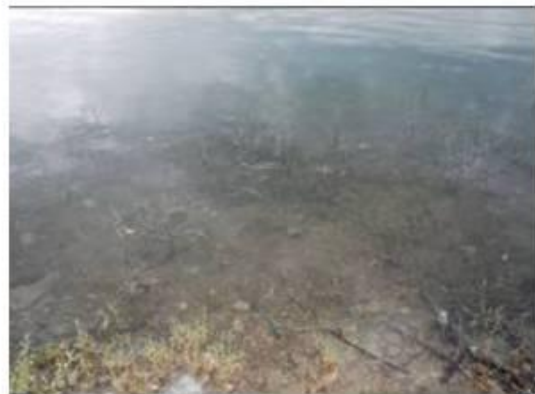
Ringraziamenti a tutti i componenti del gruppo di lavoro e in particolare al Dr Achille Palma e alla Dr.ssa Teresa Trabace per la costruttiva collaborazione e la piena disponibilità tecnica.

Allegato A-Schede descrittive delle stazioni

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



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



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



Allegato B-Schede di campionamento elementi biologici

STAZIONE VL1

Scheda campionamento diatomee lacustri

Lago (toponimo)	Stazione (toponimo o sigla)	Coordinate geografiche della stazione (UTM32-WGS84)	
PIETRA DEL PERTUSILLO	VL1	Nord	40°16'38,92"N
		Est	15°59'53,88"E
Data:	12.06.2016	Ora:	11.10
Meteo:	SOLEGGIATO	Disco di Secchi:	5 m
Operatore:		Strumento prelievo:	PETINO

Profondità (m)	Temperatura (°C)	PAR ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
0	23,06	Valore corrispondente al 100 %
1	22,09	
2		Valore corrispondente al 1%
3		
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 CRUSCI)
 Tipologia di substrato campionato: MACROFITE
 Sito di campionamento: LAGO PERTUSILLO
 Punto di campionamento: VLS
 Contenitore: PROVETTA 50ml Quantità prelevata: 25ml
 Parametri rilevati su campo:
CIMICO 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	CAOTTONI : 60% LIMO : 55% MACROFITE : 5%
Ombreggiatura	60%

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

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°	Coordinate (UTM32-WGS84) dei margini del sito				
	1	Inizio (riva)	N	60°17'13,26"N	E
	Fine	N	60°17'13,26"N	E	15°57'23,77"E

Caratteristiche della zona di costa a ridosso del sito			
Vegetazione	Linea di costa	Uso del suolo	Linea di costa
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	STRADA		<input type="checkbox"/>

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

Inizio (riva)	N	<u>40°17'13.24"N</u>	E	<u>15°57'23.77"E</u>
Fine	N	<u>40°17'13.24"N</u>	E	<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>Agru</i>	SITO: <i>VA08</i>
DATA: <i>17.06.2016</i>	OPERATORE

INFORMAZIONI SUL SITO

Bacino idrografico di appartenenza	<i>AGRA</i>	
Sito di riferimento a livello nazionale	si/no	<i>NO</i>
Tipologia fluviale	Idroecoregione (Her)	<i>18</i>
Macrotipo fluviale	Alpino/Centrale/Mediterraneo	<i>Mh</i>
Latitudine	<i>40°19'28.46" N</i>	
Longitudine	<i>15°49'19.27 E</i>	
Altitudine	s.l.m. [m]	<i>535</i>
Area del bacino idrografico	[km ²]	<i>1770</i>
Distanza dalla sorgente	[km]	
Geologia	siliceo, calcareo o misto	
Substrato	% 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>
Ombreggiatura	[%]	<i>10%</i>

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



SCHEDA DI CAMPIONAMENTO MACROFITE

Cod. Stazione: VA08	Coordinate: 40°19'28.46"N; 15°29'19.47"E
Estensione Stazione m.: 100	Operatore:
Uso del suolo a ridosso del sito: NATURALE/AGRICOLA	Data: 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

O₂ (mg/l): 7,72

Allegato C- Abstract e Poster

Di seguito vengono riportati l'abstract ed il poster presentati al **Scientific Symposium** "Small solutions for big water-related problems: Innovative microarrays and small sensors to cope with water quality and food security" svoltosi a Roma presso l'Istituto Superiore di Sanità il 26-28 Ottobre 2014.

Trabace T., Palma A., Marraudino A., Longo S., Marcheggiani S., Chiudioni F., D'Ugo E., D'Angelo A.M., Giuseppetti R., Tancioni L., Bernabei S., Mancini L. 2014. Environmental monitoring: the case study of pietra del pertusillo lake (Italy). In: Marcheggiani S, Spurio R, D'Ugo E, Mancini L (Ed.). *Scientific Symposium. Small solutions for big water-related problems: Innovative microarrays and small sensors to cope with water quality and food security*. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 26-28 October 2014. Abstract book. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2014; ISTISAN Congressi 14/C6: 66.

ENVIRONMENTAL MONITORING: THE CASE STUDY OF PIETRA DEL PERTUSILLO LAKE (ITALY)

Teresa Trabace (a), Achille Palma (a), Annunziata Marraudino (a), Salvatore Longo (a), Stefania Marcheggiani (b), Filippo Chiudioni (b), Emilio D'Ugo (b), Anna Maria D'Angelo (b), Roberto Giuseppetti (b), Lorenzo Tancioni (c), Serena Bernabei (d), Laura Mancini (b)
(a) Regional Environmental Protection Agency, ARPA Basilicata, Metaponto, Matera, Italy
(b) Department of Environment and Primary Prevention, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

(c) Laboratory of Experimental Ecology and Aquaculture, Department of Biology, Università degli Studi Tor Vergata, Rome, Italy

(d) ISPRA, Rome, Italy

The Pietra del Pertusillo lake, located in Basilicate Region (Italy), is an artificial lake derived from the barrage of the Agri river. The lake covers an area of 75 km² and provides a multiple use of water resources such as hydroelectric power, irrigation and is one of the starting points of the Apulian aqueduct. The study of the presence of fecal origin microbiological species in this lake is therefore an important tool for the protection of human health of the population directly or indirectly using this water reserve. Viruses as well others pathogenic microorganisms often occur in relatively low concentrations in environmental waters and the development of effective methods for water concentration and identification of pathogenic organisms represent valuable tools for prevent its spread. The purpose of this work was to determine the microbiological quality of Pietra del Pertusillo lake through the detection of fecal bio-indicators as Enterococci, E. coli and enteric viruses in large volume of water. 50 liters of water were sampling in the center of lake. The concentration of 50l was performed by filtration, in which the microorganisms adhere to a filter, and an elution, in which the microorganisms are resuspended through a process of reverse elution "back flushing". Through this system, 50l of water sample are eluted in 1 liter of "back flush" solution according to the methodology developed in the "μAQUA" project. Detection of E. coli and enterococci was performed on aliquots of back flush solution using the membrane filter (MF) technique, after which the membrane is transferred to the surface of a selective agar plate. For virological analysis, the back flush solution was subjected to extraction of viral nucleic acids using guanidine. RNA and DNA were quantified and used to perform real time PCR. Negative results, no growth, were obtained both E.coli and enterococci. Similar results was obtained for virological data. The detection of Human adenovirus 40 and 41, Hepatitis A, Hepatitis E, Noroviruses, Rotaviruses, Mammalian Orthoreovirus, Human enterovirus (Polioviruses, Echoviruses, Coxsakieviruses) has produced negative results in all examined samples. This work represents a first application of techniques for the concentration of large volumes of water, to research microorganisms, in environmental monitoring according to the Regional Environmental Protection Agency.

Environmental monitoring: the case study of Pietra del Pertusillo lake (Italy)

Teresa Trabace (a), Achille Palma (a), Annunziata Marmirolo (a), Salvatore Longo (a), Stefania Marcheggiani (b), Filippo Chiodini (b), Emilio D'Ugo (b), Anna Maria D'Angelo (b), Roberto Giuseppetti (b), Lorenzo Tencioni (c), Serena Bernabei(d), Laura Mancini (b)

(a) Regional Environmental Protection Agency, ARPA Basilicata, Metaponto, Matera, Italy
 (b) Department of Environment and Primary Prevention, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy
 (c) Laboratory of Experimental Ecology and Aquaculture, Department of Biology, Università degli Studi Tor Vergata, Rome, Italy
 (d) ISPRA, Rome, Italy

INTRODUCTION

The study of presence by fecal origin microbiological species in the lakes is therefore an important tool for the protection of human health of the population directly or indirectly using these water reserve. Viruses as well others pathogenic microorganisms often occur in relatively low concentrations in environmental waters and the development of effective methods for water concentration and identification of pathogenic organisms represent valuable tools to prevent its spread.

The purpose of this work was to determine the microbiological quality of Pietra del Pertusillo lake through the detection of fecal bio-indicators as Enterococci, E. coli and enteric viruses in large volume of water.



STUDY AREA

The Pietra del Pertusillo lake, located in Basilicate Region (Italy), is an artificial lake derived from the barrage of the Agri river. The lake covers an area of 75 km² and provides a multiple use of water resources such as hydroelectric power, irrigation and is one of the starting points of the Apulian aqueduct.

MATERIAL AND METHODS

50 liters of water were sampled in the center of lake. The concentration of 50l was performed by filtration, in which the microorganisms adhere to a filter, and an elution, in which the microorganisms are resuspended through a process of reverse elution "back flushing". Through this system, 50l of water sample are eluted in 1 liter of "back flush" solution according to the methodology developed in the "μAQUA" project.

Detection of E. coli and enterococci was performed on aliquots of back flush solution using the membrane filter (MF) technique, after which the membrane is transferred to the surface of a selective agar plate. For virological analysis, the back flush solution was subjected to extraction of viral nucleic acids using guanidine. RNA and DNA were quantified and used to perform real time PCR.



RESULTS

Negative results, no growth, were obtained both E.coli and enterococci. Similar results was obtained for virological data. The detection of Human adenovirus 40 and 41, Hepatitis A, Hepatitis E, Noroviruses, Rotaviruses, Mammalian Orthoreovirus, Human enterovirus (Polioviruses, Echoviruses, Coxsackieviruses) has produced negative results in all examined samples.

CONCLUSION

This work represents a first application of techniques for the concentration of large volumes of water, to research microorganisms, in environmental monitoring according to the Regional Environmental Protection Agency.

Reference

APHA, (1996). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, Washington D.C.
 APHA, AWWA, and WPCF (2005). Standard methods for examination of water and wastewater, 21st ed. American Public Health Association, Washington, DC.
 APHA, AWWA, WPCF, (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. American Public Health Association, Washington D.C.
 Costafreda M, Bosch A, Pletsch RB, (2008). Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. Appl. Environ. Microbiol. 74(5): 3640-55.