

JRC TECHNICAL REPORTS



Progetto di Monitoraggio Ambientale su tutto il Territorio della Regione Lombardia (Progetto Soil)

*Indagine conoscitiva della
qualità e dello stato di salute dei
suoli lombardi*

Editori: G.M. Beone, R.M. Cenci, L. Guidotti,
F. Sena e G. Umlauf

2015

Report EUR 27161 IT

European Commission

Joint Research Centre
Institute for Environment and Sustainability

Contact information:

Gunther Umlauf

Address: Joint Research Centre, via Enrico Fermi 2769, TP 120, 21027 Ispra, Italy

E-mail: gunther.umlauf@jrc.ec.europa.eu

Tel.: +39 0332 78 6040

Gian Maria Beone

Address: Università Cattolica del Sacro Cuore, via E. Parmense, 84 29122 Piacenza, Italy

E-mail: gian.beone@unicatt.it

Tel.: +39 0523 599486

JRC Science Hub

<https://ec.europa.eu/jrc>

Legal Notice

This publication is a Technical Report by the Joint Research Centre, the European Commission's in-house science service. It aims to provide evidence-based scientific support to the European policy-making process. The scientific output expressed does not imply a policy position of the European Commission. Neither the European Commission nor any person acting on behalf of the Commission is responsible for the use which might be made of this publication

All images © European Union 2015, except: *La figura in copertina tratta (dal sito <http://www.naviglilombardi.it>) rappresenta una veduta dell'Alzaia Naviglio Grande a Milano. Si ringrazia la Società Navigli Lombardi S.c.a.r.l. (via Taramelli, 26 Milano - Email info@naviglilombardi.it) per la gentile concessione.*

JRC94985

EUR 27161 IT

ISBN 978-92-79-47101-8 (print)

ISBN 978-92-79-47100-1 (PDF)

ISSN 1018-5593 (print)

ISSN 1831-9424 (online)

doi:10.2788/250

Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2015

© European Union, 2015

Reproduction is authorised provided the source is acknowledged.

Abstract

Lo scopo del progetto è valutare lo stato di salute e la qualità dei suoli della Regione Lombardia attraverso un approccio multidisciplinare. I terreni campionati provengono prevalentemente da aree dedicate ad attività agricola. Per operare tale selezione si è utilizzata una preesistente rete di punti georeferenziati nota con il nome di LUCAS e di altri database dai quali sono state ricavate informazioni territoriali che hanno permesso di costruire la mappa di campionamento.

Tutto ciò ha fornito un disegno di punti distribuiti su tutto il territorio regionale, sul quale si è lavorato al fine di ricavare una "fotografia" dello stato di salute attuale. L'ottenimento del punto zero dell'opera è il momento di partenza per successive indagini che dovranno essere effettuate negli anni a venire.

I campioni di suolo sono stati sottoposti alle caratterizzazioni chimico-fisiche e biologiche per la determinazione di numerosi parametri. Inoltre, nel progetto di monitoraggio, sono stati utilizzati i muschi quali bioindicatori per valutare le ricadute al suolo di metalli pesanti. I dati ottenuti sono stati confrontati con i limiti di legge vigenti (D.L. 152 del 2006).

Autori

Istituto di Chimica Agraria ed Ambientale - Istituto di Agronomia, Genetica botanica e Coltivazioni erbacee - Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, Piacenza:

Viviana Anelli, Gian Maria Beone, Franca Carini, Ilenia Cattani, Giuseppe Fricano, Laura Guidotti, Paolo Lodigiani, Edoardo Puglisi

AEIFORIA Srl Spin-off della Università Cattolica del Sacro Cuore di, Piacenza:

Riccardo Rossi

BIO-BIO, Besozzo:

Roberto M. Cenci

European Commission, Institute for Environment and Sustainability, Ispra:

Giulio Mariani, Helle Skejo, Gunther Umlauf

Università Milano Bicocca, Dipartimento di Scienze dell'Ambiente e del Territorio e di Scienze della Terra, Milano

Sandra Citterio, Rodolfo Gentili, Alessandra Ghiani, Tho Nguyen Van

Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Lab di Ecologia Animale e Molecolare, Università di Camerino, Camerino:

Antonietta La Terza, Daizy Bharti, Santosh Kumar, Silvia Marinsalti, Gabriela Molina, Emilio Insom

UMR EcoBio - University of Rennes1, Station biologique, Paimpont:

Denis Piron, Guenola Peres, Daniel Cluzeau

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria- Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo, Roma:

Anna Benedetti, Gianluca Renzi

Consiglio per la Ricerca e la Sperimentazione in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia Agraria- Centro di Ricerca per lo Studio delle Relazioni tra Pianta e Suolo, Gorizia:

Flavio Fornasier, Emanuela Vida

Prefazione

Da sempre la Regione Lombardia dedica particolare attenzione e rilevante importanza alla qualità dell'ambiente e della sua salute; innumerevoli sono state le iniziative portate avanti dalla Direzione Ambiente, energia e sviluppo sostenibile, tra cui il Progetto Soil che oggi vede in questo rapporto la pubblicazione dei risultati di tre anni di lavoro e ricerca applicata. L'iniziatore del progetto Soil è stato il dott. Benazzoli che ha capito l'importanza e voluto mettere il suolo in primo piano mediante una indagine olistica che coinvolgesse il comparto suolo di tutto il territorio lombardo.

In collaborazione con il Centro Comune di Ricerca della Commissione Europea sono state poste le basi di uno studio innovativo volto ad individuare la qualità, la salute e l'evoluzione dei suoli nel tempo, per una corretta gestione e un utilizzo consapevole di un patrimonio, il suolo, sempre più scarso ed impoverito da una agricoltura a volte cieca e poco sensibile.

Il progetto Soil adotta un innovativo approccio olistico, dall'orientamento multidisciplinare volto a superare l'impiego unidirezionale, anche se valido, di carattere puramente chimico, per valutare la qualità dei suoli. Tale approccio è basato esclusivamente su valori tabellari di concentrazione di sostanze inquinanti ammissibili per le specifiche destinazioni di uso dei suoli, previsto dalla vigente normativa attraverso il Decreto Legislativo 152 del 2006 che tratta la materia dei contaminanti organici e inorganici; si parla di diossine, **PCBs** (policloro bifenili), metalli pesanti e molti altri composti ed elementi.

Il progetto Soil è stato ideato dal prof. Roberto Cenci presso i laboratori del Centro Comune di Ricerca della Commissione Europea, ed è stato diretto dal prof. Gian Maria Beone dell'Università Cattolica del Sacro Cuore. Alla realizzazione del progetto hanno partecipato istituti nazionali e prestigiose Università italiane ed europee.

Il progetto Soil è servito a valutare la qualità, lo stato di salute e di compromissione del suolo agricolo, urbano e di aree ad elevata industrializzazione. Per ottenere tali informazioni si è ricorso ad un approccio olistico, unico nel suo genere, che ha preso in considerazione la chimica, la fisica e la biologia del suolo, permettendo di ottenere una visione del livello di qualità dei suoli e dei problemi indotti dalla presenza di contaminanti organici ed inorganici più vicina possibile alla realtà. Tali informazioni sono ottenibili solo unendo più tipologie di analisi.

L'elenco degli studi condotti sui campioni raccolti è lungo, meticoloso e di grande importanza poiché ha permesso di realizzare una banca dati unica, ampia e utilizzabile da molti esperti nel campo ambientale e non solo.

Come precedentemente accennato nei campioni di terreno raccolti sono state valutate le concentrazioni di metalli pesanti, metalloidi, macroelementi, radionuclidi, diossine, furani ed altri composti organici; carbonio totale e organico, pH e tessitura. Dal punto di vista biologico sono state caratterizzate le popolazioni batteriche e protozoarie, oltre all'applicazione di organismi viventi quali il trifoglio ed uno specifico batterio, in veste di biosensori in grado di rispondere alla presenza di inquinanti genotossici e metalli. Il progetto rappresenta quindi un vero ricettacolo di nuove informazioni per i suoli lombardi e non solo.

In aggiunta agli aspetti chimico-fisici e biologici sono stati utilizzati campioni di muschio per valutare le ricadute atmosferiche di contaminanti al suolo. Tale aspetto ha permesso di ottenere una stima degli apporti e degli aumenti di concentrazione dei metalli pesanti nei suoli lombardi nell'arco degli anni e di valutare nel contempo l'impatto antropico sulla qualità dell'aria.

Quali risultati sono stati ottenuti con il progetto SOIL? Come prima cosa il progetto ha permesso di scrivere il "punto zero" o punto di partenza sui suoli lombardi, ha consentito di ottenere una visione più vicina possibile alla realtà circa la salute, il livello di compromissione e di qualità dei suoli lombardi. Tali aspetti non erano mai stati analizzati e considerati prima di oggi.

Le informazioni di cui siamo in possesso verranno ulteriormente arricchite dai futuri monitoraggi. Occorre infatti sottolineare la necessità di implementare i punti di campionamento per avere una visione più accurata, allargando la lente di ingrandimento, e tornando su alcuni punti per valutare le eventuali differenze (incrementi o diminuzioni della concentrazione dei contaminanti nei suoli), per poter agire con suggerimenti e/o norme per la salvaguardia del patrimonio suolo.

Lo studio di oggi e i dati che si otterranno nei successivi anni consentiranno per i prossimi decenni una gestione corretta e attenta delle attività che si svolgono sopra e nel suolo, permetteranno di ottenere una maggiore qualità dei prodotti coltivati. Tutto ciò comporta un uso veramente sostenibile del suolo, ed uno sviluppo di politiche mirate alla salvaguardia della salute dei cittadini.

Capitolo IX: Struttura delle comunità dei protozoi ciliati

L'analisi della struttura delle comunità dei protozoi ciliati del suolo costituisce un sensibile strumento per valutare eventuali impatti derivanti da attività agricole e/o industriali. Nell'ambito del progetto Soil Mapping, abbiamo valutato quali-quantitativamente la struttura di comunità dei protozoi ciliati in 4 siti industriali della regione Lombardia (Il termovalorizzatore di Parona, (PV); la Viscolubedi di Pieve Fissiraga (LO); il cementificio di Broni (PV); il SIN Brescia), al fine di trarne indicazioni rispetto ai loro potenziali livelli di contaminazione. Analisi univariate e multivariate hanno mostrato che le comunità di ciliati presenti nei 4 siti sono significativamente diverse tra di loro con l'eccezione delle comunità presenti nei siti Parona e Viscolube che risultano pertanto essere molto simili per composizione tassonomica ed abbondanze. Relativamente all'Indice C/P specifico per i ciliati, che misura il rapporto tra specie a selezione r (colpoda) e specie a selezione k (polimenofora), i siti maggiormente idonei per le comunità dei ciliati risultano essere quelli di Parona ($C/P=0.38$) e Viscolube ($C/P=0.83$), mentre i siti SIN Brescia ($C/P=1$) e Italcementi ($C/P=2$) risultano essere i meno idonei. Quest'ultimi siti evidenziano una dominanza di Colpodea un taxa tollerante all'inquinamento, la cui presenza costituisce un buon indicatore di contaminazione del suolo. Le analisi di CCA e GPA mostrano la presenza di una correlazione tra la composizione in specie e le variabili ambientali. Sulla base dei risultati dell'indicatore "protozoi ciliati" è stato possibile stilare una classifica della qualità dei suoli dei 4 siti (da quelli più idonei verso quelli meno idonei): $P>V>IT \& S$

1. Introduzione

Microrganismi eucariotici come i protozoi (ciliati, flagellati ed amebe) costituiscono una essenziale, seppur ancor poco studiata, componente di tutti gli ecosistemi incluso l'ecosistema suolo (Figura 1 A) [1]. I protozoi svolgono ruoli chiave in tutte le tipologie di suolo incluse quelle influenzate dalle attività umane (aree agricole, urbane, industriali). Essi nutrendosi principalmente di batteri, contribuiscono a stimolare i processi di mineralizzazione soprattutto a livello della rizosfera determinando, in questo modo, degli effetti benefici sulla crescita delle piante. I protozoi costituiscono, infatti, un ingranaggio essenziale del cosiddetto *soil microbial loop* [2]. I protozoi ciliati per sopravvivere in un ambiente "difficile" come il suolo hanno evoluto una serie di adattamenti che includono tra gli altri, la possibilità di produrre delle "cisti" (*resting cysts*) che gli consentono di superare periodi di scarsità di cibo e/o di essiccamento (Figura 1 B). Il numero di protozoi presenti nel suolo (inteso sia come forme attive in grado di nutrirsi che come forme inattive, cioè cisti) può variare da 10.000 fino ai 100.000 ind. g^{-1} di suolo in rapporto al contenuto di C organico, N, umidità, tessitura, livello di contaminanti e disponibilità di cibo [3]. Anche le strategie riproduttive entrano in gioco al fine di favorire la sopravvivenza nel suolo. Ad es. in alcuni taxa di ciliati del suolo come nei *Colpodea*, la presenza di una cisti quadripartita determina un tasso di crescita estremamente rapido che conferisce a questo

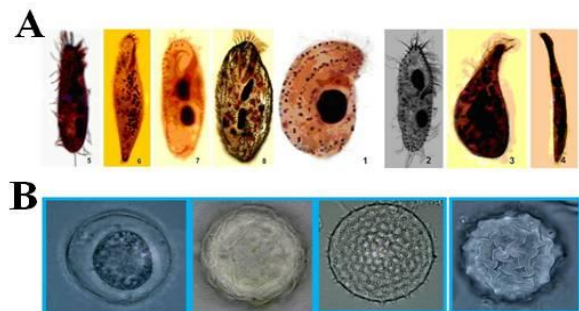


Figura 1. A: Protozoi ciliati; B: Cisti.

gruppo, un elevato vantaggio competitivo nei suoli disturbati. Ai *Colpodea* appartengono, infatti, specie a selezione r mentre le specie a selezione K , caratterizzate da tassi di crescita più lenti, appartengono per lo più al gruppo degli *Spirotrichea* e degli *Heterotrichea* generalmente identificati come polimenofora [4]. Le specie a selezione K al contrario delle specie a selezione r , sono preferenzialmente presenti nei suoli stabili, non disturbati.

La sensibilità dei ciliati ad un ampio spettro di inquinanti è stata ben documentata sia in specie modello (es. *Tetrahymena*) principalmente attraverso la messa a punto di saggi ecotossicologici di laboratorio [5-7] sia *sul campo* [8,9]. In particolare, studi volti ad analizzare la struttura delle loro comunità hanno fornito elementi preziosi per valutare e monitorare cambi nell'ambiente abiotico e biotico e a valutare gli eventuali impatti derivanti da attività agricole ed industriali [10-12].

L'obiettivo principale di questa analisi è stato quello di valutare quali-quantitativamente la struttura di comunità dei protozoi ciliati in 4 siti industriali della regione Lombardia: 1) l'impianto di trattamento e termovalorizzazione rifiuti di Parona (PV); 2) l'impianto di rigenerazione degli oli esausti Viscolube di Pieve Fissiraga (LO); 3) il cementificio di Broni (PV) e 4) il Sito di Interesse Nazionale (SIN) di Brescia, al fine di trarne indicazione rispetto ai loro potenziali livelli di contaminazione.

trattamento e termovalorizzazione rifiuti di Parona (PV), 8 punti; 2) l'impianto di rigenerazione degli oli esausti Viscolube di Pieve Fissiraga (LO), 8 punti; 3) il cementificio di Broni (PV), 6 punti e 4) il Sito di Interesse Nazionale (SIN) di Brescia, 8 punti (Figura 2). Le attività di campionamento sono state effettuate da due operatori (Dott.sse Antonietta La Terza e Silvia Marinsalti) e sono state realizzate nel mese di marzo 2013, nei giorni 20, 21 e 22. Ogni punto è stato raggiunto utilizzando un GPS Etrex 30 (Garmin) nel

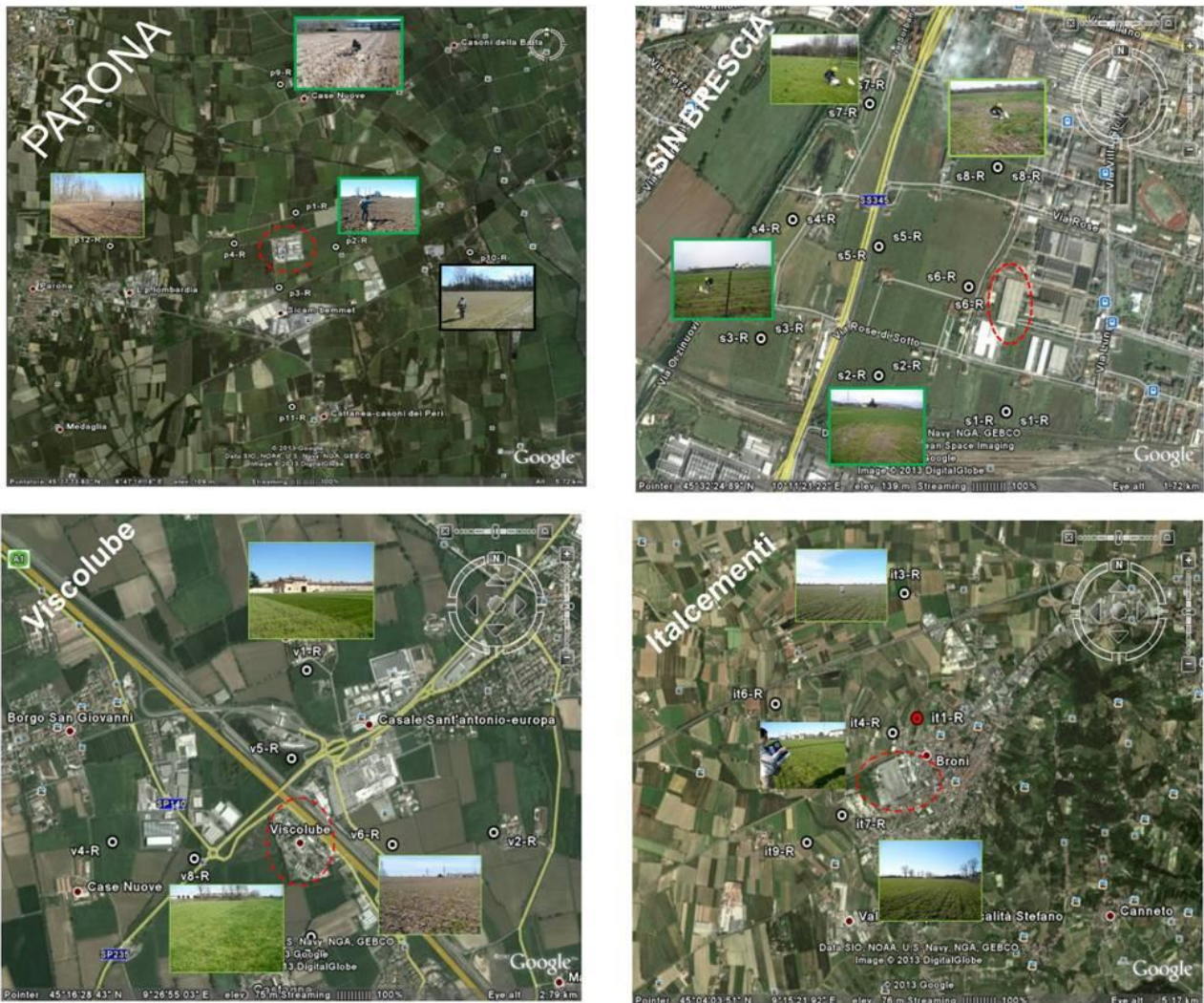


Figura 2. Campionamenti

2. Materiali e Metodi

2.1 Siti di studio e campionamento

I siti interessati alle analisi della struttura delle comunità dei protozoi ciliati del suolo sono stati 4 per un prelievo totale di 30 campioni di suolo: 1) l'impianto di

quale erano state precedentemente inserite le coordinate geografiche di ciascun punto in esame. Il campionamento del suolo (0-10 cm di profondità) è stato effettuato con il metodo del "parallel leaping" [13] con l'utilizzo di una trivella pedologica. Questo metodo di campionamento prevede la raccolta di una decina di campioni di suolo in maniera *random* da un'area di circa 100 m². I campioni sono stati posti in buste di plastica sterile e rapidamente miscelati in modo da ottenere un campione composito, trasferiti in una borsa

termica per essere trasportati in laboratorio. Durante il campionamento sono state effettuati rilievi fotografici per ciascun punto, compilate le schede di rilevamento e misurati i principali parametri ambientali come temperatura (dell'aria e del suolo) e umidità del suolo (Figura 3 e 4).



Figura 3. Prelievo del suolo mediante trivella pedologica.



Figura 4. Misura parametri ambientali.

2.2 Analisi quali-quantitativa dei protozoi ciliati

Per quanto riguarda la successiva analisi di laboratorio volta ad analizzare quali-quantitativamente la comunità dei protozoi ciliati del suolo, si è utilizzato il protocollo, noto come *non-flooded Petri dish method* [13]. Brevemente il metodo prevede che il campione di suolo dopo un periodo di essiccazione (variabile da una settimana ad un mese in rapporto alla percentuale di umidità del campione) necessario al fine di favorire l'ottimale formazione/maturazione delle cisti dei ciliati presenti nel campione, sia posto in una capsula petri del diametro di 20 cm e saturato con un volume di acqua

tale da non "inondarlo" (*non-flooded*), ma solo di consentire di raccogliere un eluato di circa 5 mL per le successive analisi. Il metodo del "*non-flooded Petri dish*" viene realizzato nell'arco di 7 giorni con prelievi dell'eluato al 3°, 5° e 7° giorno. Dopo ogni prelievo il liquido mancante viene ripristinato. Una volta prelevato l'eluato, esso viene osservato allo stereoscopio per una preliminare stima *in vivo* quali-quantitativa della fauna ciliata presente nel campione e poi fissato nella soluzione di Bouin per una successiva preparazione di vetrini e colorazione con protargolo [14]. I vetrini così ottenuti sono poi utilizzati sia per la valutazione qualitativa (riconoscimento, quando possibile, a livello di genere/specie) che per quella quantitativa tramite conteggio diretto su vetrino delle specie/genere precedentemente identificati. Per ogni campione di suolo sono stati preparati 6 vetrini per un totale di 180 vetrini per tutti e 30 i punti esaminati con le metodologie sopracitate. Le identificazione sono state principalmente condotte secondo Lynn e Small (2002) [15] e Lynn (2008) [16].

2.3 Indici di Biodiversità ed analisi statistiche

Al fine di ottenere in ciascun sito/punto di monitoraggio, una panoramica della struttura dei protozoi ciliati del suolo e della loro variazione spaziale in risposta ad eventuali cambiamenti dei parametri ambientali, i dati biotici quali-quantitativi (n° specie e loro abbondanze assolute) e quelli abiotici relativi ai parametri chimico-fisici ed ai contaminanti, sono stati analizzati mediante tecniche univariate e multivariate. Per le analisi sono stati usati i seguenti software: PAST 2.17c package (Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo) and Infostat v.2014 (<http://www.infostat.com.ar/>).

2.3.1 INDICI DI DIVERSITÀ

Sono stati calcolati i principali indici di biodiversità : la diversità di Shannon-Wiener (H'), la ricchezza di Margalef (d), l'indice di equipartizione (*evenness*) di Pielou (J), secondo le seguenti formule:

Shannon-Wiener index: $H' = - \sum p_i \ln p_i$

È un indice che considera, sia il numero delle specie (S), sia la loro frequenza (abbondanza relativa) p_i all'interno della comunità. Questo Indice può variare da 0 per comunità costituite da un'unica specie (assenza di diversità) ad un massimo che dipende dal numero di specie riscontrate e dal loro grado d'equipartizione. In generale, l'indice è compreso tra 1,5 e 3,5 e raramente supera il valore di 4,5 [17].

Margalef's richness index: $d = (S-1) / \ln(n)$

È un indice che dipende dalla numerosità dei taxa presenti nella comunità ed aumenta all'aumentare della ricchezza in taxa, dove S è il numero totale delle specie; n il numero totale degli individui.

Pielou's evenness index: $J = H'/H'_{\max}$

Il valore massimo di questo indice è pari ad 1 quando tutte le specie del campione sono equamente rappresentate dallo stesso numero di individui, quindi comunità ben equipartite corrispondenti a valori di H' vicini alla diversità massima teorica (H'_{\max}) per un dato numero di specie.

È stato, inoltre, calcolato anche un indice specifico per i protozoi ciliati noto come il "C/P index" che misura il rapporto tra specie a selezione r (colpoda) e specie a selezione K (polimenofora). Il rapporto fornisce un'indicazione sulla idoneità dell'habitat suolo per i protozoi ciliati. Valori uguali o superiori ad 1 indicano habitat meno idonei (condizioni variabili) alla sopravvivenza della comunità dei ciliati (e dominanza dei colpoda) mentre valori inferiori ad 1 indicano, generalmente, ambienti maggiormente idonei (condizioni stabili). Con il termine specie intermedie si vuole indicare altre specie diverse da colpoda e polimenofora (4). Per ognuno dei 4 siti monitorati è stato calcolato un C/P index complessivo sulla base delle specie dominanti (identificate mediante analisi della similarità percentuale SIMPER, vedi paragrafo successivo Materiali e Metodi) presenti in ciascun sito.

2.3.2 ANALISI STATISTICHE

La matrice delle abbondanze è stata utilizzata per le analisi statistiche univariate e multivariate. Le analisi multivariate (ANOSIM, SIMPER, PCA, CCA e GPA) sono state effettuate sulle base delle matrici di distanze Euclidee dei singoli campioni, ottenuta a partire dai dati di abbondanze preventivamente trasformate con radice quadrata [18]. L'analisi SIMPER (SIMilarity PERcentage) consente di calcolare la dissimilarità media di campioni (siti/punti) appartenenti a gruppi diversi che sono definiti *a priori* e nel contempo, di estrapolare il contributo dato da ciascun taxon. Questo test pertanto è utile al fine di mettere in evidenza quei taxa che sono maggiormente responsabili delle differenze evidenziate tra due o più gruppi di (siti/punti). Il test ANOSIM (ANalysis Of SIMilarities) è una tecnica non-parametrica che consente di verificare se le differenze fra due o più gruppi di osservazioni multivariate sono significative o meno [19]. La PCA (Principal Component Analysis) costituisce una tecnica di ordinamento molto usata in ecologia, che consente di rappresentare un insieme di dati in un numero ridotto di dimensioni (Principal Component, PC) attraverso una rotazione degli assi dello spazio multidimensionale in modo da orientarli coerentemente con i *pattern* di

dispersione dei dati stessi [20]. La CCA (Canonical Correspondence Analysis) è una tecnica multivariata che consente di evidenziare le relazioni tra le comunità biotiche ed il loro ambiente [21]. La GPA (Generalized Procrustes Analysis) è una tecnica che consente mediante delle trasformazioni (es. rotazioni, traslazioni, dimensionamenti) di identificare la configurazione di consenso tra due (o più) matrici di dati [22]. È una tecnica alquanto potente per identificare eventuali associazioni tra matrici diverse in particolare quando il numero delle osservazioni è elevato [23].

3. Risultati e Discussione

3.1 Composizione tassonomica e C/P Index

3.1.1 L'IMPIANTO DI TRATTAMENTO E

TERMOVALORIZZAZIONE DEI RIFIUTI DI PARONA (PV)

L'analisi relativa allo studio della composizione tassonomica del sito di Parona (P) ha consentito di identificare per gli 8 punti campionati, un totale di **58** specie di protozoi ciliati, rappresentanti **29** generi e **12** ordini (*Stichotrichida*, *Euplotida*, *Sporadotrichida*, *Urostylida*, *Heterotrichida*, *Armophorida*, *Haptorida*, *Sessilida*, *Colpodida*, *Cyrtolophosidida*, *Microthoracida*, *Chlamyodontida*) (vedi Figura 14 per un riassunto della composizione tassonomica di ciascun sito). L'analisi SIMPER ha messo in evidenza le 17 specie che forniscono un contributo cumulativo pari a circa il 72% alle comunità di ciliati presenti nel sito di Parona e che per tale motivo sono state definite come "dominanti" ed utilizzate per le successive analisi multivariate (Figura 5). Nel *rank* delle 17 specie dominanti sono presenti 3 sole specie a selezione r : *Colpoda sp.*, *C. inflata* e *C. cucullus* rispettivamente in 3°, 4° e 10° posizione e con un contributo totale pari a circa il **14,5 %**. Le altre 14 posizioni sono occupate da specie a strategia K oltreché da specie con strategie intermedie. Sulla base della lista delle specie dominanti è stato calcolato un C/P index complessivo del sito di Parona pari a 0,37. Da segnalare che la 1° posizione della classifica (*rank*) è occupata dal ciliato oligotrico *Halteria sp1*, un ciliato comune in ambienti acquatici e importante consumatore di batteri, con un contributo elevato pari al 15%. Inoltre, tra le specie dominanti del sito di Parona compaiono anche 2 specie di *Metopus spp* con un contributo complessivo del 6,4%. Quest'ultimo ciliato essendo un anaerobio obbligato (manca di mitocondri), è da considerarsi come un indicatore di condizioni di anossia del terreno. La presenza consistente di entrambe le specie è da mettere in relazione con il tipo di coltura dominante del sito di Parona: la risicoltura. Questo tipo di coltura necessita, infatti, di terreni con un elevato tenore di umidità e che in rapporto alle varie fasi culturali, sono periodicamente allagati.

Taxon	Contrib. %	Cumulative %	Rank
Halteria_sp1	15	15	1
Spathidium_sp7	9.32	24.32	2
Colpoda_sp*	5.89	30.21	3
Colpoda_inflata*	5.646	35.85	4
Metopus_sp2	4.27	40.12	5
Dileptus_sp	4.012	44.13	6
Spathidium_sp2	3.492	47.63	7
Oxytricha_sp1	2.982	50.61	8
Perisincirra_sp1	2.963	53.57	9
Colpoda_cucullus*	2.937	56.51	10
Sterkiella_tricirrata	2.856	59.37	11
Spathidium_sp5	2.643	62.01	12
Metopus_sp1	2.105	64.11	13
Oxytricha_sp4	1.945	66.06	14
Blepharisma_sp1	1.913	67.97	15
Oxytricha_balladyna	1.864	69.84	16
Spathidium_sp3	1.803	71.64	17

Figura 5. Le 17 specie dominanti del sito di Parona.

3.1.2 IL SITO DI INTERESSE NAZIONALE (SIN) BRESCIA

L'analisi relativa allo studio della composizione tassonomica del sito di Interesse Nazionale (SIN) Brescia (S) ha consentito di identificare per gli 8 punti campionati, un totale di **46** specie di protozoi ciliati, rappresentanti **20** generi e **10** ordini (*Stichotrichida*, *Sporadotrichida*, *Urostylida*, *Heterotrichida*, *Armophorida*, *Haptorida*, *Colpodida*, *Cyrtolophosidida*, *Microthoracida*, *Chlamyodontida*) (vedi Figura 14 per un riassunto della composizione tassonomica di ciascun sito). L'analisi SIMPER ha messo in evidenza le 12 specie che forniscono un contributo cumulativo pari a circa il 73% alle comunità di ciliati presenti nel sito SIN Brescia e che per tale motivo sono state definite come "dominanti" ed utilizzate per le successive analisi multivariate (Figura 6). È, inoltre, da mettere in evidenza che nel *rank* delle 12 specie dominanti le prime 5 posizioni sono occupate da specie a selezione *r* con un contributo totale pari a circa il **51 %**. Sulla base della lista delle specie dominanti è stato calcolato un *C/P index* complessivo del sito SIN Brescia pari a 1.

3.1.3 L'IMPIANTO DI RIGENERAZIONE DEGLI OLI ESAUSTI "VISCOLUBE" DI PIEVE FISSIRAGA (LO)

L'analisi relativa allo studio della composizione tassonomica del sito di Pieve Fissiraga (V) ha consentito di identificare per gli 8 punti campionati, un totale di **49** specie di protozoi ciliati, rappresentanti **23** generi e **12** ordini (*Stichotrichida*, *Euplotida*, *Sporadotrichida*, *Urostylida*, *Heterotrichida*, *Armophorida*, *Haptorida*, *Sessilida*, *Colpodida*, *Cyrtolophosidida*, *Microthoracida*, *Chlamyodontida*) (vedi Figura 14 per un riassunto della composizione tassonomica di ciascun sito). L'analisi SIMPER ha messo in evidenza le 11 specie che forniscono un contributo cumulativo pari a circa il 67% alle comunità di ciliati presenti nel sito di Pieve Fissiraga e che per tale motivo sono state definite come "dominanti" ed

utilizzate per le successive analisi multivariate (Figura 7). Nel *rank* delle 11 specie dominanti sono presenti 5 specie a selezione *r*: *Bresslauides* sp., *Colpoda inflata*, *Colpoda* sp., *C. cucullus* e *C. steinii* rispettivamente in 3°, 4°, 7°, 9° e 11° posizione e con un contributo totale pari a circa il **19,2 %**. Sulla base della lista delle specie dominanti è stato calcolato un *C/P index* complessivo del sito Viscolube pari a 0,83. Le prime due posizioni del *rank* sono occupate da due specie di *Halteria*, con un contributo cumulativo pari al 34,67%. Inoltre, anche nel sito Viscolube oltre che in quello di Parona, è da segnalare la presenza di *Metopus* sp. indicante condizioni di anossia del terreno.

Taxon	Contrib. %	Cumulative %	Rank
Colpoda_inflata*	18.9	18.9	1
Colpoda_cucullus*	10.43	29.33	2
Colpoda_sp*	10.09	39.42	3
Colpoda_steinii*	6.187	45.6	4
Bresslauides_sp*	5.314	50.92	5
Cyrtohymena_quadriucleata	5.126	56.04	6
Gonostomum_affine	4.671	60.72	7
Bakuella_granulifera	2.929	63.64	8
Notohymena_sp	2.464	66.11	9
Spathidium_sp5	2.259	68.37	19
Cyrtohymena_sp	2.167	70.53	11
Sterkiella_tricirrata	2.162	72.7	12

Figura 6. Le 12 specie dominanti del sito Sin Brescia.

Taxon	Contrib. %	Cumulative %	Rank
Halteria_sp1	27.46	27.46	1
Halteria_sp2	7.21	34.67	2
Bresslauides_sp*	6.503	41.17	3
Colpoda_inflata*	4.807	45.98	4
Blepharisma_sp1	4.677	50.66	5
Metopus_sp1	3.09	53.75	6
Colpoda_sp*	2.863	56.61	7
Euplotes_sp	2.66	59.27	8
Colpoda_cucullus*	2.581	61.85	9
Oxytricha_sp3	2.405	64.26	10
Colpoda_steinii*	2.319	66.58	11

Figura 7. Le 11 specie dominanti del sito Viscolube.

3.1.4 IL CEMENTIFIO DI BRONI (PV)

L'analisi relativa allo studio della composizione tassonomica del sito di Broni (IT) ha consentito di identificare per i 6 punti campionati, un totale di **41** specie di protozoi ciliati, rappresentanti **18** generi e **9** ordini (*Stichotrichida*, *Euplotida*, *Sporadotrichida*, *Urostylida*, *Armophorida*, *Haptorida*, *Colpodida*, *Cyrtolophosidida*, *Chlamyodontida*) (vedi Figura 14 per un riassunto della composizione tassonomica di ciascun sito). L'analisi SIMPER ha messo in evidenza le 10 specie che forniscono un contributo cumulativo pari a circa il 72% alle comunità di ciliati presenti nel

sito Italcementi e che per tale motivo sono state definite come “dominanti” ed utilizzate per le successive analisi multivariate (Figura 8).

Taxon	Contrib. %	Cumulative %	Rank
Colpoda_inflata*	25.97	25.97	1
Oxytricha_sp1	10.91	36.88	2
Colpoda_cucullus*	5.471	42.35	3
Colpoda_sp*	5.425	47.78	4
Halteria_sp1	5.052	52.83	5
Platyophyra_sp*	5.017	57.84	6
Colpoda_steinii*	4.165	62.01	7
Bressluides_sp*	3.893	65.9	8
Gonostomum_sp2	3.758	69.66	9
Spathidium_sp1	2.323	71.98	10

Figura 8. Le 10 specie dominanti del sito Italcementi.

Nel rank delle 10 specie dominanti sono presenti 6 specie a selezione r che occupano la 1°, 3°, 4°, 6°, 7° e 8° posizione con un contributo totale pari al 49,9%. Sulla base della lista delle specie dominanti è stato calcolato un C/P index complessivo del sito Italcementi pari a 2, il più elevato tra i C/P index rilevati nei 4 siti lombardi.

3.2 Variazione spaziale del numero delle specie, abbondanze e Indici di Biodiversità

3.2.1 L' IMPIANTO DI TRATTAMENTO E TERMOVALORIZZAZIONE DEI RIFIUTI DI PARONA (PV)

Nel sito di Parona sono state identificate 58 specie la cui distribuzione e abbondanza per ciascuno degli 8 punti di campionamento (P1-P4; P9-P12), è indicata in Figura 9. Inoltre, sono anche riportate le indicazioni relative all'uso del suolo, le distanze e l'orientamento dei singoli punti di campionamento rispetto alla centrale di Parona (Figura 2). All'epoca del campionamento, la maggior parte delle coltivazioni del sito di Parona presentavano a riso (5), seguite da coltivazioni di soia (2) e da un'unica coltivazione a mais. Il maggior numero di specie ($S=35$) è stato rinvenuto nel sito P4 mentre i numeri più bassi ($S=16$) sono stati riscontrati nei siti P9 e P10. Le abbondanze più elevate superiori ai 5000 ind. mL⁻¹ di percolato di suolo, sono state riscontrate nei punti P4 e P10, mentre quelle meno elevate nel sito P9 ($n=580$). Il grafico di Figura 10 mostra la distribuzione spaziale relativa alla diversità (H'), ricchezza (d) ed equipartizione (J) delle comunità dei protozoi ciliati nel sito di Parona, oltrechè degli altri siti. I valori più elevati di H' , d e J sono riscontrabili rispettivamente nei punti P11, P4 e P9. Il punto P12 coltivato a mais presenta i valori più bassi di H' e di J .

	P1	P2	P3	P4	P9	P10	P11	P12
Species number S	26	30	23	35	16	16	28	17
Ind. mL ⁻¹ soil percolate	1048	4574	2030	5535	580	5651	1778	2272
Shannon H'	2.594	2.392	2.672	2.96	2.62	2.375	2.983	1.779
Margalef d	4.7	4.252	3.663	4.852	3.15	2.133	4.257	2.614
evenness J	0.7962	0.7032	0.8523	0.8326	0.945	0.8567	0.8953	0.6279
Land use	rice	rice	soy	rice	rice	soy	rice	mais
Direction	North	East	South	West	North	East	South	West
Distance (m)	500	500	500	500	2000	2000	2000	2000

Figura 9. Ricchezza in specie, abbondanze e Indici di diversità del sito di Parona.

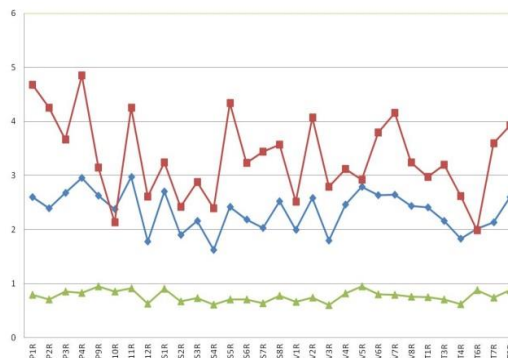


Figura 10. Distribuzione spaziale degli Indici di diversità nei 30 punti di campionamento.

3.2.2 IL SITO DI INTERESSE NAZIONALE (SIN) BRESCIA

Nel sito SIN Brescia sono state identificate 46 specie la cui distribuzione e abbondanza per ciascuno degli 8 punti di campionamento (S1-S8), è indicata nella Figura 11.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8
Species number S	20	17	19	14	31	22	24	26
Ind. mL ⁻¹ soil percolate	1760	3735	2584	1134	5016	3323	4000	5524
Shannon H'	2.707	1.899	2.16	1.625	2.413	2.18	2.044	2.529
Margalef d	3.24	2.418	2.881	2.396	4.34	3.23	3.443	3.568
evenness J	0.9037	0.6704	0.7336	0.6158	0.7026	0.7054	0.6433	0.7763
Land use	Uncultivated	Uncultivated	Uncultivated	Uncultivated	Uncultivated	Uncultivated	Urban lawn	Uncultivated
Direction	South	South	South-East	West	West	West	North-West	North

Figura 11. Ricchezza in specie, abbondanze e Indici di diversità del sito SIN Brescia.

Inoltre, sono anche riportate le indicazioni relative all'uso del suolo e l'orientamento dei singoli punti di campionamento rispetto ad un capannone industriale indicato (cerchiato in rosso) in Figura 2. Tutti e 8 i punti di prelievo dei campioni di suolo ricadono all'interno della perimetrazione dell'area del SIN (Sito di Interesse Nazionale) “Brescia-Caffaro, matrice suolo” entro la quale vige il divieto di coltivazione, scavo, pascolo ed attività similari. Pertanto, tutti i punti di prelievo con la sola eccezione del punto S7 che è classificato come prato urbano, sono classificati come non-coltivati (Figura 11). Il maggior numero di specie ($S=31$) è stato rinvenuto nel sito S5 che insieme al sito S8 registra anche le abbondanze maggiori (>5000 ind. mL⁻¹ di percolato di suolo). Il sito S4, al contrario, registra il minor numero di specie ($S=14$) e la minore

abbondanza. Il grafico di Figura 10 mostra la distribuzione spaziale relativa alla diversità (H'), ricchezza (d) ed equipartizione (J) delle comunità dei protozoi ciliati nel sito SIN Brescia, oltreché degli altri siti. Il punto S1 presenta i valori più elevati di H' e J ed il punto S5 il valore maggiore di ricchezza di specie d . Il punto S4 presenta i valori più bassi di H' , d e J .

3.2.3 L'IMPIANTO DI RIGENERAZIONE DEGLI OLI ESAUSTI "VISCOLUBE" DI PIEVE FISSIRAGA (LO)

Nel sito di Pieve Fissiraga "Viscolube" sono state identificate 49 specie le cui distribuzioni ed abbondanze per ciascuno degli 8 punti di campionamento (V1-V8), sono indicate nella Figura 12.

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8
Number of species	20	33	20	20	19	27	28	25
Ind. ml ⁻¹ soil percolate	9440	12960	4528	2220	2368	4698	3292	8154
Shannon H'	1.997	2.589	1.806	2.457	2.798	2.626	2.639	2.434
Margalef d	2.519	4.071	2.791	3.117	2.921	3.797	4.161	3.244
evenness J	0.6665	0.7403	0.6027	0.8202	0.9503	0.7968	0.792	0.7561
Land use	Permanent pasture	permanent pasture	mais	permanent pasture	wheat	mais	permanent pasture	permanent pasture
Distance (m)	1000	1000	1000	1000	500	500	500	500
Direction	North	East	South	West	North	East	South	West

Figura 12. Ricchezza in specie, abbondanze e Indici di diversità del sito Viscolube.

Inoltre, sono anche riportate le indicazioni relative all'uso del suolo, le distanze e l'orientamento dei singoli punti di campionamento rispetto all'impianto di rigenerazione degli oli esausti Viscolube (Figura 2). La maggior parte delle coltivazioni del sito Viscolube sono medicai (5), seguite da coltivazioni di mais (2) ed un'unica coltivazione a grano. Il maggior numero di specie ($S=33$) è stato rinvenuto nel punto V2 che registra anche le abbondanze maggiori (>12.000 ind. mL⁻¹ di percolato di suolo). I punti V4 e V5 oltre a presentare i numeri minori di specie (V4, $S=20$ e V5, $S=19$) presentano anche le abbondanze più basse (circa 2000 ind. mL⁻¹ di percolato di suolo). Il grafico di Figura 10 mostra la distribuzione spaziale relativa alla diversità (H'), ricchezza (d) ed equipartizione (J) delle comunità dei protozoi ciliati nel sito Viscolube, oltreché degli altri siti. Il punto V5 presenta i valori più elevati di H' e J ed il punto V2 il valore maggiore di ricchezza di specie d . Il punto V1 presenta i valori più bassi di d e J .

3.2.4 IL CEMENTIFIO DI BRONI (PV)

Nel sito di Broni Italcementi sono state identificate 41 specie le cui distribuzioni ed abbondanze per ciascuno dei 6 punti di campionamento (IT1; IT3-4; IT6-7; IT9), sono indicate nella Figura 13.

	IT1	IT3	IT4	IT6	IT7	IT9
Species number S	25	21	19	10	18	19
Ind. ml ⁻¹ soil percolate	3175	518	964	92	113	98
Shannon H'	2.412	2.16	1.835	2.017	2.138	2.598
Margalef d	2.977	3.2	2.62	1.99	3.596	3.926
evenness J	0.7493	0.7094	0.6231	0.8761	0.7397	0.8824
Land use	permanent pasture	permanent pasture	wheat	permanent pasture	permanent pasture	permanent pasture
Distance (m)	500	1500	500	1500	500	1500
Direction	North-East	North	North	North-West	South-West	South-West

Figura 13. Ricchezza in specie, abbondanze e Indici di diversità del sito Italcementi.

Inoltre, sono riportate anche le indicazioni relative all'uso del suolo, le distanze e l'orientamento dei singoli punti di campionamento rispetto al cimitero (Figura 2). All'epoca del campionamento, la maggior parte delle coltivazioni del sito Italcementi si presentavano come medicai (5), fatta eccezione per il punto IT4 coltivato a grano (IT4). Il maggior numero di specie ($S=25$) è stato rinvenuto nel punto IT1 che registra anche le abbondanze maggiori (>3000 ind. mL⁻¹ di percolato di suolo). Il punto IT6 presenta il numero minore di specie ($S=10$) oltreché l'abbondanza più bassa (circa 90 ind. mL⁻¹ di percolato di suolo). Il grafico di Figura 10 mostra la distribuzione spaziale relativa alla diversità (H'), ricchezza (d) ed equipartizione (J) delle comunità dei protozoi ciliati nel sito Italcementi, oltreché degli altri siti. Il punto IT9 presenta i valori più elevati di H' , d e J . Il punto IT4 presenta i valori più bassi di H' e J mentre il punto IT6 il valori più basso di d .

3.3 Confronto tra i 4 siti di campionamento: composizione tassonomica, diversità, indice C/P e loro variazione spaziale

La Figura 14 riassume la composizione tassonomica dei 4 siti monitorati (Parona, Viscolube, SIN Brescia e Italcementi).

Sampling sites	Species	Genus	Family	Order	Class
P (termovalorizzatore)	58	29	19	12	7
V (viscolube)	49	23	17	12	7
IT (italcementi)	41	18	13	9	5
S (SIN Brescia)	46	20	15	10	5
*****	*****	*****	*****	*****	*****
Total	66	30	19	12	7

Figura 14. Composizione tassonomica nei 4 siti.

In totale sono state identificate 66 specie appartenenti a 30 generi, 12 ordini e 7 classi e non sono riportate le specie non identificate ($n=6$) e quelle "nuove" per la scienza ($n=7$) cioè mai descritte prima e identificate per lo più nel sito di Parona. Il maggior numero di specie ($S=58$) sono state identificate nel sito di Parona, il numero più basso ($S=41$) nel sito Italcementi. L'analisi SIMPER, applicata alla matrice totale delle abbondanze per i 4 siti, evidenzia 15 specie dominanti (Figura 15).

Taxon	Contrib. Cumulative		Rank
	%	%	
Halteria_sp1	14.76	14.76	1
Colpoda_inflata*	13.88	28.64	2
Colpoda_cucullus*	5.365	34	3
Colpoda_sp*	5.066	39.07	4
Bresslauides_sp*	4.081	43.15	5
Oxytricha_sp1	3.875	47.02	6
Colpoda_steinii*	2.839	49.86	7
Spathidium_sp7	2.415	52.28	8
Halteria_sp2	2.369	54.65	9
Blepharisma_sp1	2.267	56.91	10
Platyophyra_sp*	2.019	58.93	11
Gonostomum_affine	2.001	60.93	12
Dileptus_sp	1.877	62.81	13
Metopus_sp1	1.864	64.67	14
Spathidium_sp2	1.574	66.25	15

Figura 15. Le 15 specie dominanti dei 4 siti.

Tra le specie dominanti sono presenti *Halteria spp* con un contributo cumulativo pari a circa il 17% (*Halteria sp1* occupa la 1° posizione della classifica) e *Metopus sp1* (14° posizione). Le specie a selezione *r* sono 6 in totale con un contributo cumulativo pari al **33,25%**. La Figura 10 mostra la distribuzione spaziale degli indici di diversità (H'), di ricchezza (d) e di equipartizione (J) relativi alle comunità dei protozoi ciliati per ciascuno dei 30 punti totali analizzati tra i 4 siti. Questi indici sono comunemente usati per analisi a livello di comunità e, in generale, più sono elevati migliore è la qualità ambientale (Magurran, 1991). Nella nostra analisi, il sito di Parona (ad eccezione dei siti P10 e P12), presenta valori medi di diversità ($H'= 2,55$), ricchezza ($d= 3,7$) ed equipartizione ($J= 0,82$) più elevati rispetto ai corrispondenti valori medi dei siti Viscolube ($H'= 2,4$, $J= 0,77$, $d= 3,3$), SIN Brescia ($H'= 2,2$, $J= 0,72$, $d= 3,2$) e Italcementi ($H'= 2,2$, $J= 0,76$, $d= 3,05$). La significatività delle differenze spaziali nell'andamento degli Indici H' , d e J intesi come parametri strutturali delle comunità, è stata verificata mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis per l'ANOVA. Da queste analisi non sono emerse, tuttavia, differenze statisticamente significative (Kruskal-Wallis $p > 0,05$) anche se è possibile evidenziare un andamento costante (una classifica) per i 4 siti: **P>V>IT & S** (Figura 16). Questa classifica è anche sostenuta dall'Indice C/P specifico per i ciliati, che con valori inferiori a 1 per Parona ($C/P= 0,38$) e per Viscolube ($C/P= 0,83$) evidenzia come questi siti costituiscano ambienti più idonei per le comunità dei ciliati rispetto a quelli dei siti SIN Brescia ($C/P= 1$) e Italcementi ($C/P= 2$) (Figura 16).

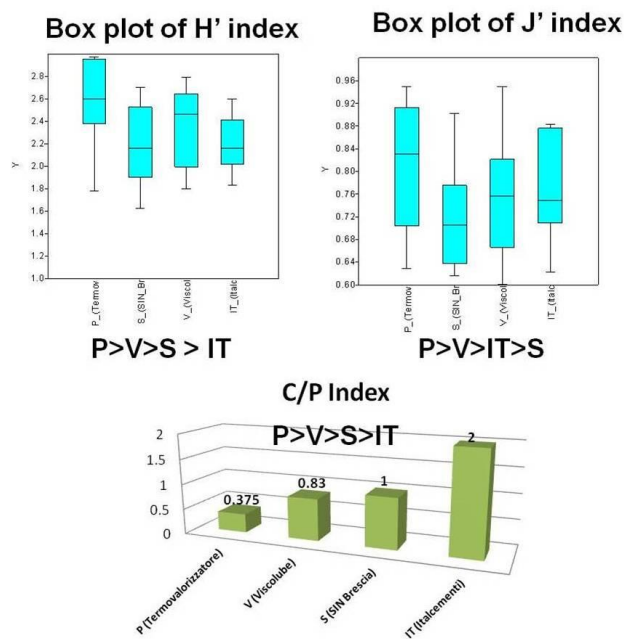


Figura 16. Un confronto tra i siti: Indici di diversità e C/P index.

Un inquadramento di sintesi della struttura delle comunità di ciliati e della loro variazione spaziale nei 30 punti totali campionati nei 4 siti è stato ottenuto mediante un'Analisi delle Componenti Principali (PCA) come mostrato in Figura 17.

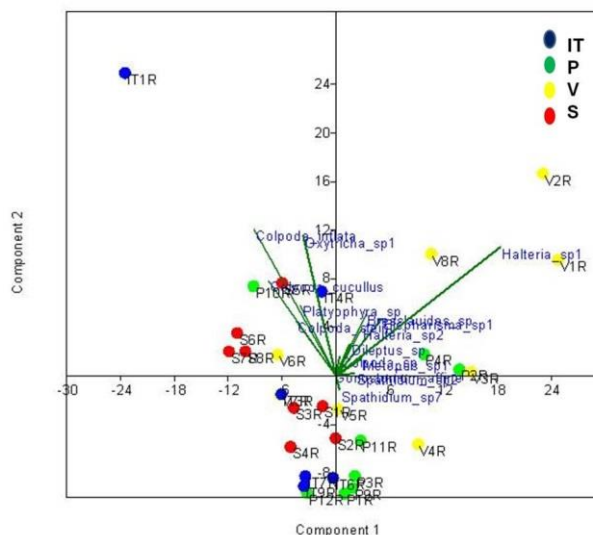


Figura 17. PCA, biplot di ordinamento relativo alla distribuzione spaziale dei ciliati nei 4 siti.

Il biplot dei dati relativi alle abbondanze delle specie dominanti è stato ottenuto mediante trasformazione con radice quadrata dei dati ed usando una matrice di distanze Euclidee. La PCA spiega il 58% della varianza

totale, di cui il 35% è spiegata dalla prima componente (PC1) ed il 23% dalla seconda (PC2). La PCA conferma le differenze evidenziate nelle precedenti analisi univariate mostrando una separazione (discriminando) tra i 4 siti in relazione alla loro composizione tassonomica ed abbondanze. In particolare, da questo ordinamento si osserva come la maggior parte dei punti di campionamento relativi ai siti di Parona (verde) e Viscolube (giallo) risultino separati dai punti di campionamento relativi ai siti di Italcementi (blu) e SIN Brescia (rosso). Le specie che caratterizzano i siti sono *Halteria sp1* per Parona e Viscolube e *Colpoda cucullus* e *C. inflata* per Italcementi e SIN Brescia. L'analisi di similarità (ANOSIM) applicata con l'intento di verificare la consistenza delle differenze emerse tra i 4 siti rivela come esse siano statisticamente significative (Global test $R= 0,2$; $p= 0,002$). Inoltre, i relativi confronti multipli evidenziano differenze significative per ogni coppia ($p < 0,05$) con la sola eccezione della coppia Parona vs Viscolube ($p= 0,22$) che risultano, pertanto, essere dei siti molto simili per composizione tassonomica ed abbondanze.

3.4 Interazione tra le comunità dei protozoi ciliati e i parametri abiotici

Nell'ambito del progetto *Soil mapping Lombardia* grazie all'attività dell'Unità Operativa dell'Università Cattolica del Sacro Cuore (UNICATT), sono stati misurati un numero elevato di parametri abiotici, suddivisibili per comodità di trattazione in chimico-fisici (tessitura, C/N, SO ecc) e contaminanti (metalli pesanti come Hg, Cd ed altri inorganici). Al fine di caratterizzare i suoli dei 4 siti (P, V, SIN e IT) sulla base sia delle loro caratteristiche chimico-fisiche che in relazione alla presenza/contenuto di contaminanti si è applicata la PCA. I *biplot* dei dati relativi alle caratteristiche chimico-fisiche e dei contaminanti sono stati ottenuti mediante trasformazione logaritmica e normalizzazione usando matrici di distanze Euclidee. La PCA di Figura 18 evidenzia come i 4 siti sono ben discriminati principalmente sulla base della loro tessitura: Parona e Viscolube presentano suoli a tessitura sabbiosa e franco-sabbiosa; Italcementi e SIN Brescia suoli a tessitura franco-limoso-argillosa e franca. La PCA spiega il 68% della varianza totale, di cui il 51% è spiegata dalla prima componente (PC1) ed il 17% dalla seconda (PC2). L'analisi di similarità (ANOSIM) rivela differenze statisticamente significative tra i siti (Global test $R= 0,85$; $p= 0,0001$) e per ogni coppia di siti ($p < 0,05$). La PCA di Figura 19 mostra come, anche sulla base della composizione/contenuto dei contaminanti, sia possibile discriminare i 4 siti e con un pattern simile a quello identificato in precedenza per i parametri chimico-fisici.

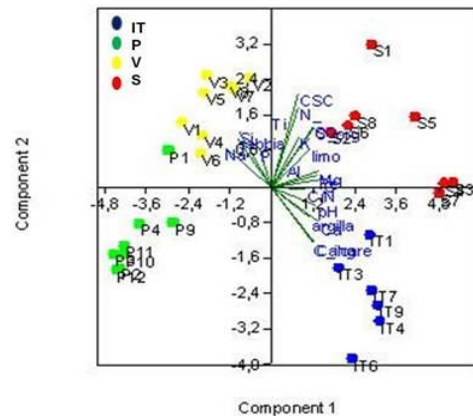


Figura 18. PCA, *biplot* di ordinamento dei parametri chimico-fisici nei 4 siti

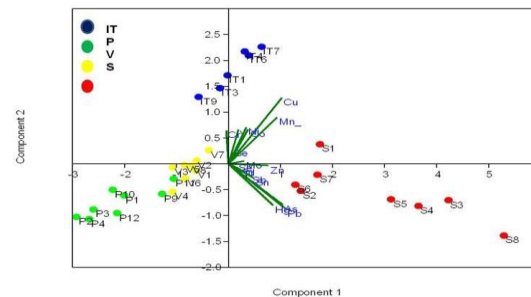


Figura 19. PCA, *biplot* di ordinamento dei contaminanti nei 4 siti

Il *biplot* dei contaminanti in Figura 19 mette in evidenza come i relativi vettori siano diretti principalmente verso i siti SIN Brescia. La PCA spiega l'89% della varianza totale, di cui il 71% è spiegata dalla prima componente (PC1) ed il 18% dalla seconda (PC2). L'analisi di similarità (ANOSIM) rivela differenze statisticamente significative tra i siti (Global test $R= 0,95$; $p= 0,0001$) e per ogni coppia di siti ($p < 0,05$).

Al fine di identificare eventuali parametri abiotici maggiormente coinvolti nella strutturazione delle comunità di protozoi ciliati fino ad ora identificate, è stata applicata un'Analisi delle Corrispondenze Canoniche (CCA). Per l'analisi sono state utilizzate le matrici dei dati biotici relative alle abbondanze delle specie previa trasformazione con radice quadrata e quelle relative ai parametri abiotici (chimico-fisici e contaminanti) previa trasformazione logaritmica e normalizzazione. La Figura 20 mostra il *biplot* di ordinamento per i 30 punti campionati nei 4 siti. L'ordinamento della CCA, rispetto alla distribuzione dei punti di campionamento e delle specie, è simile a quello della PCA di Figura 17 ottenuta con i soli dati

biotici ed è, inoltre, sovrapponibile con le PCA riferite ai parametri chimico-fisici e dei contaminanti. In particolare, nel diagramma di ordinamento della CCA, tutte le specie caratterizzanti i siti di Parona e Viscolube appartengono a specie a selezione *K* o intermedia mentre, le specie caratterizzanti i siti di Italcementi e SIN Brescia, sono principalmente specie opportuniste a selezione *r*.

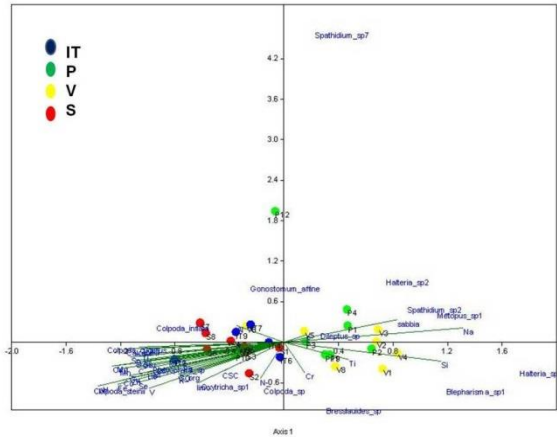


Figura 20. CCA, *biplot* di ordinamento relativo alle relazioni tra le specie dei ciliati e i parametri abiotici (chimico-fisici e contaminanti nei 4 siti).

L'analisi di CCA riconferma, pertanto, la minore idoneità di quest'ultimi 2 siti per le comunità dei ciliati denotando maggiori condizioni di instabilità almeno per il bioindicatore usato, i protozoi ciliati. Un'ulteriore analisi, la "Generalized Procrustes Analysis" (GPA) è stata successivamente effettuata per valutare il grado di accordo (consenso) tra le tre matrici di dati (biotici: abbondanze ciliati; abiotici: parametri chimico-fisici e contaminanti) e per identificare, inoltre, quale componente abiotica (parametri chimico-fisici, contaminanti) potesse, eventualmente, contribuire maggiormente (o egualmente partecipare) alla strutturazione delle comunità di protozoi ciliati nei 4 siti oggetto del monitoraggio. L'*output* finale della GPA è una configurazione di consenso che viene ottenuta mediante un processo di trasformazione (es. rotazioni, traslazioni, ridimensionamenti) a partire dalle matrici di dati originali. La Figura 21 mostra la figura di consenso ottenuta dalla sovrapposizione delle tre matrici biotiche ed abiotiche. Il consenso totale per la configurazione è eccellente (0,917) ed anche i valori delle contribuzioni di ciascuna matrice (Ciliati: 0,956; Chimico-fisici: 0,948; Contaminanti: 0,838) al consenso totale. La GPA indica che entrambe le componenti abiotiche (chimico-fisiche e contaminanti) contribuiscono in maniera sostanzialmente egualitaria alla strutturazione delle comunità dei protozoi ciliati nei diversi siti. In sintesi, le variazioni rilevate nella composizione quali-quantitativa delle comunità dei

ciliati sono correlate con entrambe le componenti abiotiche: parametri chimico-fisici (in particolare la tessitura) ed i contaminanti.

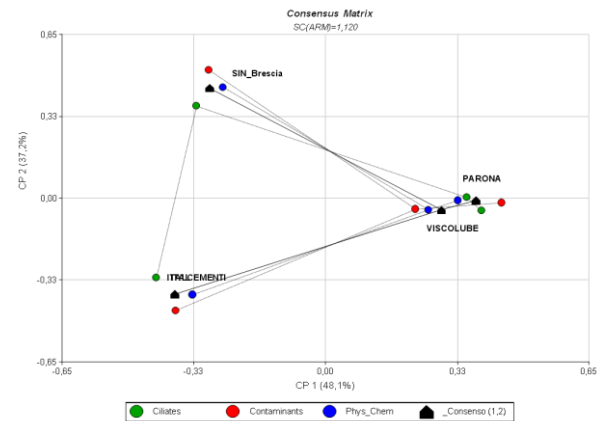


Figura 21. GPA, figura di consenso relativa alla sovrapposizione delle matrici abiotiche (ciliati) e abiotiche (parametri chimico-fisici e contaminanti).

4. Conclusioni

L'obiettivo primario dell'attività svolta dall'Unità Operativa dell'Università di Camerino (UNICAM) è stato quello di caratterizzare (qualitativamente e quantitativamente) la struttura di comunità dei protozoi ciliati in 4 siti industriali della regione Lombardia (il termovalorizzatore di Parona, Viscolube, SIN Brescia e Italcementi), al fine di trarne indicazione rispetto ai loro potenziali livelli di contaminazione. I risultati delle elaborazioni mediante tecniche univariate e multivariate, dei dati biotici quali-quantitativi (ciliati) e di quelli abiotici (parametri chimico-fisici e contaminanti), sono riassunti di seguito:

- L'analisi qualitativa ha consentito di identificare un totale di 73 specie appartenenti a 30 generi, 12 generi e 7 classi, incluse 12 "nuove" specie per la scienza, cioè mai descritte prima e identificate per lo più nel sito di Parona. A questo riguardo, la descrizione di una di queste nuove specie (*Gonostomum paronense*) è stata recentemente pubblicata mentre le altre sono ancora in corso di descrizione e saranno anch'esse dedicate alla regione Lombardia[24].
- Il sito di Parona presenta valori medi di diversità ($H' = 2,55$), ricchezza ($d = 3,7$) ed equipartizione ($J = 0,82$) più elevati rispetto ai corrispondenti valori medi dei siti Viscolube ($H' = 2,4$, $J = 0,77$, $d = 3,3$), SIN Brescia ($H' = 2,2$, $J = 0,72$, $d = 3,2$) e Italcementi ($H' = 2,2$, $J = 0,76$, $d = 3,05$).
- Relativamente all'Indice *C/P*, specifico per i ciliati e che misura il rapporto tra specie a selezione *r* (colpoda) e specie a selezione *K*

- (polimenofora), i siti maggiormente idonei per le comunità dei ciliati risultano essere quelli di Parona ($C/P= 0,38$) e Viscolube ($C/P= 0,83$), mentre i siti SIN Brescia ($C/P= 1$) e Italcementi ($C/P= 2$) risultano essere i meno idonei.
- La classe *Colpodea* domina le comunità dei ciliati nei siti SIN Brescia (contributo cumulativo pari al 51%) e Italcementi (49,9%) mentre il suo contributo è nettamente inferiore nei siti di Parona (14,5%) e Viscolube (19,2%). Questa classe di protozoi ciliati essenzialmente legati ad habitat terrestri, comprende specie opportunistiche a selezione *r* che si sono dimostrate essere più tolleranti all'inquinamento rispetto alle specie a selezione *K* e che, pertanto, possono essere considerati come buoni indicatori della presenza di contaminazione/disturbo al suolo [9].
 - Nel loro insieme le analisi multivariate (PCA, CCA e GPA) che hanno valutato anche il contributo dei parametri ambientali nello strutturare le comunità dei protozoi ciliati nei siti, confermano e rafforzano le conclusioni delle analisi univariate e mettono in evidenza il potenziale bioindicativo delle comunità dei ciliati nell'individuare condizioni di contaminazione e disturbo dei suoli.
- In conclusione sulla base dei risultati dell'indicatore "protozoi ciliati" è possibile stilare una classifica dei 4 siti (da quelli più idonei verso quelli meno idonei):
P>V>IT & S
- Nel proseguo di questa attività, l'interfacciamento e condivisione dei dati biotici ed abiotici con le altre UO del progetto *Soil Mapping Lombardia*, contribuiranno a meglio descrivere la qualità/salute dei suoli della regione Lombardia.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Finlay BJ: *Protozoa. Encyclopedia of Biodiversity* 4: 901–915., 2001.
- [2] Clarholm M: Interactions of bacteria, protozoa and plants leading to mineralization of soil nitrogen. “*Soil Biology and Biochemistry*”, 1985, n.17, p.181–187.
- [3] Clarholm M, Bonkowski M e Griffiths B: Protozoa and Other Protista in Soil. In *Modern Soil Microbiology*. CRC Press, USA, 2006.
- [4] Luftenegger G, Foissner W e Adam H: r- and k-selection in soil ciliates: a field and experimental approach. “*Oecologia*” 1985, n. 66, p. 574–579.
- [5] Sauvant MP, Pepin ND e Piccinni E: *Tetrahymena piriformis*. A tool for toxicological studies. A review. “*Chemosphere*” 1999, n. 38, p.1631-1669.
- [6] La Terza A, Barchetta S, Buonanno F, Ballarini P, Miceli C: Development and application of whole cell biosensors based on recombinant cell lines of ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila* for ecotoxicity screening. In: Cenci RM e Sena F: *BIO-BIO project – Biodiversity-Bioindication to evaluate soil health*.2006.
- [7] La Terza A, Barchetta S, Buonanno F, Ballarini P, Miceli C: The protozoan ciliate *Tetrahymena thermophila* as biosensor of sublethal levels of toxicants in the soil.” *Fresenius Environmental Bulletin*” 2008, n.8b, p.1144-1150.
- [8] Petz W e Foissner W: The effects of mancozeb and lindane on the soil microfauna of a spruce forest: a field study using a completely randomized block design. “*Biology and Fertility of Soils*” 1989, n.7, p. 225-231.
- [9] Lara E, Berney C, Harms H, Chatzinotas A: Cultivation-independent analysis reveals a shift in ciliate 18S rRNA gene diversity in a polycyclic aromatic hydrocarbon-polluted soil. “*FEMS Microbiology Ecology*” 2007, n.62, p. 365-373.
- [10] Foissner W: Soil protozoa as bioindicators in agroecosystems, with emphasis on farming practices, biocides and biodiversity. “*Agriculture, Ecosystem and Environment*” 1997, n.62, p. 93-103.
- [11] Foissner W: Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. “*Agriculture Ecosystems & Environment*” 1999, n.74, p. 95-112.
- [12] Ekelund F, Olsson S e Johansen A: Changes in the succession and diversity of protozoan and microbial populations in soils spiked with a range of copper concentration. ” *Soil Biology and Biochemistry*”, 2003, p. 1507-1516.
- [13] Foissner W: Estimating the species richness of soil protozoa using the “non-flooded Petri dish method”. In JJ Lee, AT Soldo, eds. “*Protocols in protozoology*”. Lawrence, KS: Allen Press, pp. B-10.1-10.2, 1992.
- [14] Kamra K e Sapra GR: Partial retention of parental ciliature during morphogenesis of the ciliate *Coniculostomum monilata* (Dragesco and Njiné 1971) Njiné 1978 (Oxytrichidae, Hypotrichida). “*European Journal of Protistology*”, 1990, n. 25, 264–278.
- [15] Lynn DH. e EB Small: Phylum Ciliophora. In JJ Lee, PC Bradbury, GF Leedale, eds.: *An illustrated guide to the protozoa*. Lawrence, KS: Society of Protozoologists, p. 371-656, 2002.
- [16] Lynn DH: *The ciliated protozoa, characterization, classification, and guide to the literature*. 3rd ed. London: Springer, 2008.
- [17] Margalef R: Homage to Evelyn Hutchinson, or why is there an upper limit to diversity.”*Trans. Connect. Acad. Arts Sci.*” 1972, n. 44, p. 211-235.
- [18] Clarke KR e Warwick RM: *Change in marine communities: an approach to statistical analysis and interpretation*, 2nd ed. PRIMER-E, Plymouth, 2001.
- [19] Clarke KR: Non-parametric multivariate analysis of changes in community structure. “*Australian Journal of Ecology*” 1993, n. 18, p. 117-143.
- [20] Scardi M: Tecniche di analisi dei dati in ecologia. Dipartimento di Biologia, Università di Roma Tor Vergata. (www.mare-net.com/mscardi), 2009.
- [21] Braak CJF e Verdonshot PFM: Canonical correspondence analysis and related multivariate methods in aquatic ecology. “*Aquatic Sciences*” , 1995, n.5, p. 255-289.
- [22] Gower JC: Statistical methods of comparing different multivariate analyses on the same data. In: Hodson FR, Kendall DG, Tautu P, eds. “*Mathematics in the archeological and historical sciences*”, Edinburgh University Press, Edinburgh. 138–14, 1971.
- [23] Peres-Neto PR e Jackson DA: How well do multivariate data sets match? The advantages of a Procrustean superimposition approach over the Mantel test “. *Oecologia*” , 2001, n. 129, 169–178.
- [24] Bharti D., Kumara S. e La Terza A.: Two Gonostomatid Ciliates from the Soil of Lombardia, Italy; including Note on the Soil Mapping Project. “. *Journal of Eukaryotic Microbiology*” , 2015, n. 0, 1–11.

JRC Mission

As the Commission's in-house science service, the Joint Research Centre's mission is to provide EU policies with independent, evidence-based scientific and technical support throughout the whole policy cycle.

Working in close cooperation with policy Directorates-General, the JRC addresses key societal challenges while stimulating innovation through developing new methods, tools and standards, and sharing its know-how with the Member States, the scientific community and international partners.

Serving society
Stimulating innovation
Supporting legislation

