



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI**

**FEDERICO II**

**Dottorato di Ricerca in Biologia Applicata**

**XXVIII Ciclo**

**Studio dei meccanismi di risposta su base microscopica e biochimica  
allo stress da metalli pesanti su macrofite acquatiche  
campionate *in vivo*.**

Candidata

Dott. ssa Marilena Insolubile

Coordinatore

Prof. Ezio Ricca

Tutor

Prof. Sergio Esposito

Anno Accademico 2015-2016

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| ABSTRACT .....  | 1  |
| <br>  |    |
| 1. ECOLOGIA FLUVIALE, IMPATTI ANTROPICI E MECCANISMI DI<br>RISPOSTA NELLE SPECIE VEGETALI ..... | 3  |
| 1.1 Introduzione .....  | 3  |
| 1.2 Il bacino imbrifero e il bacino idrografico .....   | 4  |
| 1.3 Approccio pluridimensionale all'ambiente fluviale.....                                      | 5  |
| 1.4 Il regime idrico .....  | 10 |
| 1.5 La velocità della corrente di un corso d'acqua .....  | 11 |
| 1.6 Fenomeni erosivi e granulometria del substrato .....  | 12 |
| 1.7 Caratteristiche chimiche, chimico-fisiche delle acque correnti .....                        | 14 |
| 1.7.1 I soluti nelle acque correnti.....  | 14 |
| 1.7.2 Il chimismo delle acque correnti.....   | 15 |
| 1.8 Il potere autodepurante delle acque correnti .....  | 17 |
| 1.9 La componente vegetale nei corsi d'acqua .....  | 19 |
| 1.9.1 Le macrofite acquatiche .....   | 21 |
| 1.9.2 Il ruolo delle macrofite nel monitoraggio ambientale .....                                | 25 |
| 1.10 Influenza antropica nei corpi idrici .....   | 27 |
| 1.10.1 I metalli pesanti .....  | 28 |
| 1.11 I meccanismi di accumulo dei metalli pesanti nelle piante .....                            | 30 |
| 1.12 I meccanismi di metallo-tolleranza nelle piante .....                                      | 31 |
| 1.13 Effetti tossici dei metalli sulle piante .....   | 33 |
| 1.14 Le Heat Shock Protein (HSP) .....  | 35 |
| 1.14.1 Le HSP70 .....   | 37 |
| <br>  |    |
| 2 SCOPO .....   | 40 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3     | IL FIUME IRNO .....  | 41 |
| 3.1   | Cenni di geologia, geomorfologia e idrografia .....  | 42 |
| 3.2   | Il Fiume Irno – origine del nome e cenni storici.....  | 45 |
| 3.3   | Interventi di recupero ambientale sul Fiume Irno .....   | 49 |
| 3.4   | Il Fiume Irno: corpo idrico recettore di scarichi fognari e industriali. ....  | 50 |
| 4     | ATTIVITÀ DI CAMPIONAMENTO .....  | 55 |
| 4.1   | Caratteristiche delle stazioni di campionamento .....  | 55 |
| 4.2   | Stazioni di campionamento .....  | 55 |
| 4.3   | Campionamento delle macrofite acquatiche .....   | 61 |
| 4.3.1 | Periodo di campionamento e condizioni ambientali.....  | 62 |
| 4.3.2 | Macrofite acquatiche campionate .....  | 63 |
| 4.4   | Campionamento acqua superficiale e sedimenti fluviali .....  | 69 |
| 4.4.1 | Sedimenti fluviali.....  | 69 |
| 4.4.2 | Acqua superficiale .....   | 72 |
| 4.5   | Rilievo stazionario, parametri di supporto e scheda di rilevamento .....   | 73 |
| 5     | MATERIALI E METODI.....  | 78 |
| 5.1   | Determinazione dei livelli di proteine HSP70 .....   | 79 |
| 5.1.1 | Estrazione e determinazione delle proteine solubili .....  | 79 |
| 5.1.2 | Elettroforesi in condizioni denaturante (SDS-PAGE).....  | 80 |
| 5.1.3 | Rivelazione dei livelli delle proteine HSP70 mediante tecnica del<br>Western Blotting (WB) .....                               | 82 |
| 5.2   | Analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) .....  | 85 |
| 5.3   | Determinazione dei metalli pesanti su campioni di foglie e radici delle<br>macrofite acquatiche e nei sedimenti fluviali ..... | 87 |
| 5.4   | Analisi chimiche, chimico-fisiche dei campioni di acqua superficiale .....   | 89 |
| 5.5   | Analisi microbiologiche dei campioni di acqua superficiale.....  | 90 |
| 5.5.1 | Coliformi totali e <i>Escherichia coli</i> .....   | 90 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 5.5.2 | Enterococchi.....                                      | 91  |
| 5.5.3 | Test di tossicità acuta con <i>Daphnia magna</i> ..... | 93  |
| 6     | RISULTATI .....  | 94  |
| 6.1   | Matrice acqua superficiale .....                       | 94  |
| 6.2   | Matrice sedimenti fluviali .....                       | 96  |
| 6.3   | Matrice biota - Macrofite acquatiche .....             | 98  |
| 7     | DISCUSSIONE.....                                       | 120 |
| 8     | BIBLIOGRAFIA.....                                      | 127 |
|       | RINGRAZIAMENTI .....                                   | 140 |

**Ai miei genitori  
e  
ai miei figli.**

*“Il sapere rende liberi”  
(Socrate)*

## ABSTRACT

L'inquinamento da metalli pesanti rappresenta una delle più importanti alterazioni degli ambienti naturali. Lungo l'asta fluviale dell'Irno, corpo idrico che si sviluppa in provincia di Salerno, sono sversati scarichi idrici di processo di industrie che operano sul territorio e, in funzione di tale impatto antropico, sono stati individuati siti di campionamento al fine di verificare il livello di contaminazione ambientale e i possibili danni a macrofite acquatiche quali il *Nasturtium officinale*, la *Veronica beccabunga* e l'*Apium nodiflorum*.

È stata individuata una stazione di campionamento a monte delle Fonderie Pisano & C. S.p.A, condizione ambientale "indisturbata", e una a valle dell'immissione delle acque di scarico dell'impianto industriale. Un'ulteriore stazione di controllo è stata selezionata in un punto di risorgiva fluviale. Sono state condotte analisi sulle acque superficiali e sedimenti fluviali. In particolare, i risultati denotano un accumulo di Pb nei sedimenti a valle delle fonderie.

Sono state misurate quindi le concentrazioni del Pb, Cu, Cd nelle radici e nelle foglie delle piante. Un aumento dei livelli di Heat Shock Proteins 70 (HSP70) testimonia un evidente stress delle macrofite acquatiche presenti a valle delle fonderie, confermato dai danni ultrastrutturali osservati in campioni di foglie mediante la microscopia elettronica a trasmissione (TEM). I livelli di inquinamento sono tali da indurre una serie di modificazioni ultrastrutturali e funzionali principalmente nei cloroplasti, ma anche nei mitocondri e nei sistemi di endomembrane, maggiormente significative in *Nasturtium officinale*.

Gli effetti dell'impatto antropico dovuto all'immissione di metalli pesanti nell'ecosistema fluviale è discusso alla luce dei risultati ottenuti.

## ABSTRACT

Heavy metals pollution represents one of the most important alterations of natural environments. Along the River Irno, in the Salerno Area, Southern Italy, wastes for industries there present are responsible of an anthropic impact. Different sites had been individuated in order to determine the level of polluting contamination, and the possible damage to aquatic plants living on the river shores, such as *Nasturtium officinale*, *Veronica beccabunga* and *Apium nodiflorum*.

A first sampling station was individuated before the foundries “Fonderie Pisano & C. S.p.A”, as the undisturbed site; a second site was determined soon after the wastes of this industry. A further site was determined on the springs of the river as a more negative, unpolluted control.

Analyses on flushing waters and river sediments were made. Namely the results demonstrate an accumulation of lead (Pb) in the sediments downstream the foundries.

Levels of Lead (Pb), Copper (Cu) and Cadmium (Cd) have been determined in roots and leaves of water plants. An increase in the levels of HSP70 testimonies a clear stress conditions of the plants downstream the foundries, and this is confirmed by ultrastructural damages observed in leaf samples observed by transmission electron microscopy (TEM). Pollution levels are enough to induce several ultrastructural and functional modifications, mainly in chloroplasts, and in mitochondria and endomembrane system as well, particularly in *Nasturtium officinale*.

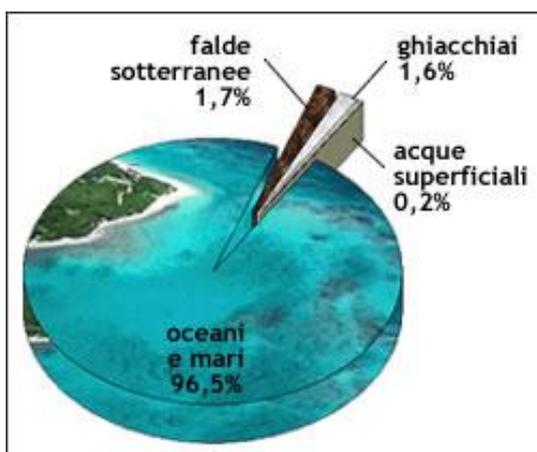
The effects of anthropic impact due to heavy metals pollution in river ecosystems is discussed under the light of the results obtained.

# 1. ECOLOGIA FLUVIALE, IMPATTI ANTROPICI E MECCANISMI DI RISPOSTA NELLE SPECIE VEGETALI

## 1.1 Introduzione

L'acqua presente sul globo terrestre costituisce l'idrosfera. L'idrosfera occupa circa i due terzi della superficie terrestre e permette, attraverso il ciclo dell'acqua, lo scambio di energia e sostanze fra gli ecosistemi. Attraverso gli apporti meteorici si distribuisce fra le acque dolci, le acque marine e le acque di transizione in differenti corpi idrici raggruppabili in alcune classi: i corsi d'acqua rappresentati da fiumi e torrenti; i laghi e gli invasi; le acque di transizione rappresentate dalle zone di foce dei fiumi, dalle lagune e dai laghi costieri, dove si verificano interazioni fra acque dolci e salate; le acque marine e le acque sotterranee.

In particolare l'idrosfera è rappresentata per circa il 98% da acqua salata mentre solo il 2% è la porzione di acqua dolce (Fig.1.1). Per la maggior parte, l'acqua dolce si trova sottoforma di ghiaccio o neve permanente (complessivamente circa il 68,7%) in prossimità dell'Artico, dell'Antartide e nelle regioni montuose. Il 29,9% esiste come acqua sotterranea, una minima parte è in forma di vapore e solo lo 0,26% si trova nei laghi, bacini e fiumi ed in questa forma è facilmente accessibile per gli scopi umani, quali quelli idropotabile, irriguo, industriale e agricolo. (R. Bettinetti, 2007).



**Fig.1.1:** Distribuzione dei volumi delle acque terrestri nei diversi ambienti. I valori sono raffigurati con cubi di volumi proporzionali, assimilabili a "serbatoi" entro i quali è distribuita l'acqua terrestre.

Tutti i corpi idrici permettono e sostengono la vita degli organismi viventi, animali e vegetali e costituiscono sistemi complessi, sedi di interscambi fra le acque, i

sedimenti, il suolo e l'aria. L'acqua costituisce anche una risorsa indispensabile per lo sviluppo ed è per questo che non può essere considerata solo una risorsa da utilizzare, ma anche un patrimonio ereditario del pianeta da tutelare. Per tale motivo le politiche attivate mirano ad evitare, per quanto possibile, il suo deterioramento a lungo termine, sia per gli aspetti quantitativi, sia per quelli qualitativi e per la disponibilità.

## 1.2 Il bacino imbrifero e il bacino idrografico

Il bacino imbrifero definisce la porzione di territorio il cui deflusso idrico superficiale viene convogliato verso una determinata sezione di un corso d'acqua, denominata sezione di chiusura del bacino (Fig 1.2).

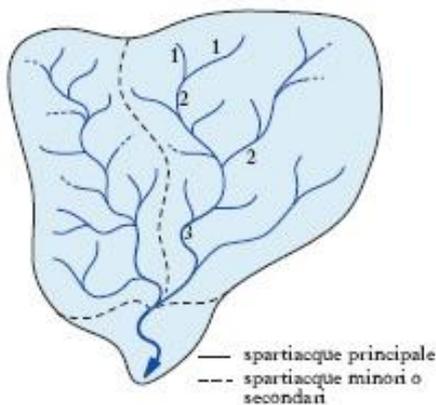


Fig 1.2. Schema di un bacino imbrifero.

A questa scala si manifestano i processi idromorfologici che danno luogo alla configurazione spaziale dei traccianti fluviali e che definiscono le proprietà fisiche degli habitat acquatici; proprietà quest'ultime che modellano la varietà delle forme biologiche presenti all'interno del corpo idrico. Gli elementi topografici di un bacino imbrifero, che condizionano il comportamento del deflusso e le caratteristiche chimiche delle acque fluenti, sono: area, forma, lunghezza, altezza, e pendenza media del bacino; elementi di tipo fisico: costituzione geologica delle rocce (in particolare la loro permeabilità), natura e uso del suolo, natura ed entità delle precipitazioni e ancora di tipo biologico come ad esempio la copertura vegetale. Tali caratteristiche definiscono il regime della portata e il trasporto solido dei corsi d'acqua presenti al suo interno, fattori chiave nel determinare l'assetto topografico e morfologico dell'alveo.

All'interno di un bacino imbrifero possono essere riconosciute tre tipologie ambientali fortemente interconnesse tra loro: i corpi idrici, la fascia riparia e i territori circostanti. La fascia riparia si presenta come elemento di connessione ecologica tra i corpi idrici e i territori circostanti e ha un ruolo importante di ambiente filtro per l'acqua in ingresso al reticolo idrico.

L'unità territoriale di base per lo studio delle acque superficiali, lotiche e lentiche, e dei processi geomorfologici ad essi legati, è il bacino idrografico.

Un bacino idrografico può essere definito come la porzione di territorio, delimitata dal confine naturale costituito dalla linea spartiacque, in cui le acque meteoriche che vi si raccolgono confluiscono tutte nel medesimo corso d'acqua, nonché il territorio che può essere allagato dalle acque del medesimo corso d'acqua, ivi compresi i suoi rami terminali con le foci in mare e il litorale marittimo prospiciente. Il perimetro del bacino è costituito dalla linea che può essere tracciata percorrendo i punti di maggiore altitudine: la cime e le creste dei monti, le cime delle colline, le sommità dei rilievi minori costieri; tale linea virtuale, dopo aver delimitato il territorio del bacino, di norma va a chiudersi in una zona molto limitata, più a valle, coincidente con la foce del corso d'acqua il cui sbocco è definito sezione di chiusura. All'interno del bacino idrografico principale, per ciascun affluente più importante si possono distinguere i relativi sottobacini. Ogni affluente, infatti, è alimentato dalle acque meteoriche che si raccolgono nel proprio sottobacino. Nella rete idrografica la serie delle acque correnti rappresenta un complesso di ambienti di dimensioni molto variabili, che hanno in comune una corrente unidirezionale e la particolarità di erodere materiale litologico vario che lungo il corso viene ridepositato.

In altre parole, quindi, il bacino idrografico è la regione drenata da un corso d'acqua e da tutti i suoi affluenti, che nel loro insieme formano un reticolo idrografico.

### **1.3 Approccio pluridimensionale all'ambiente fluviale**

Un asta fluviale va osservata in quattro dimensioni naturali che ne caratterizzano lo sviluppo. Il modello delle quattro dimensioni è stato elaborato da WARD (Ward, 1989); esso prende in esame le interazioni che si instaurano tra le tre dimensioni fisiche con cui si esprime la struttura di un corso d'acqua ed una quarta dimensione, basata sui mutamenti che si verificano con il trascorrere del tempo (Fig. 1.3): dimensione verticale, longitudinale, trasversale, temporale.

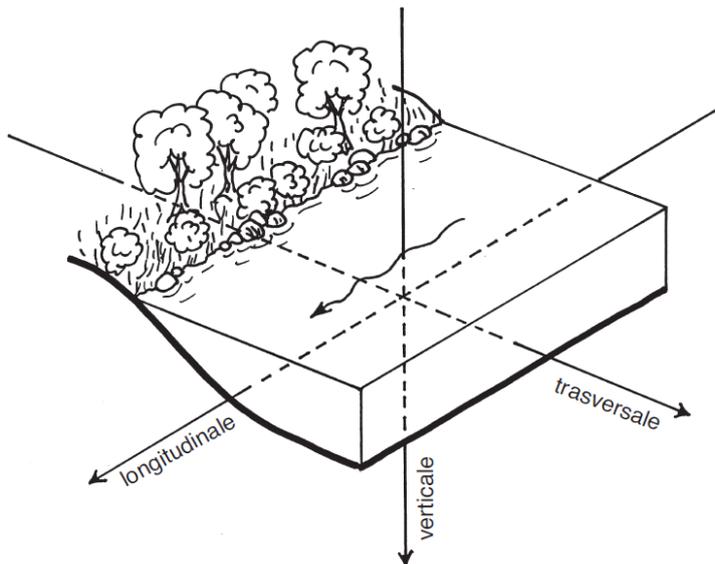


Fig. 1.3: Approccio pluridimensionale all'ambiente fluviale.

La dimensione verticale/altimetrica, intesa sia come quota (m.s.l.m) sia, per i grandi fiumi, come profondità, investe i rapporti tra l'acqua che scorre nell'alveo e la quota che si infiltra tra gli interstizi del subalveo fino a raggiungere la falda.

La dimensione longitudinale è intesa lungo il verso della corrente, sponde incluse. Il corso d'acqua viene suddividendo idealmente in tre zone: produzione, trasporto e sedimentazione in funzione del volume, della corrente, della pendenza e delle dimensioni del materiale trasportato.

Lungo il solco di scorrimento cambiano continuamente nel fiume le caratteristiche e le condizioni fisiche e chimiche dell'ambiente acquatico, accompagnato da cambiamenti importanti anche dal punto di vista biologico ed ecologico: aumenta la portata e il contenuto totale in sali disciolti, cambia la pezzatura del materiale trasportato, la natura del fondo e cambiano di tratto in tratto le modalità trofiche. Le successioni delle forme biologiche sono principalmente il risultato delle diverse strategie di adattamento alla vita in condizioni di flusso idraulico e delle diverse strategie adottate per lo sfruttamento delle risorse alimentari. In riferimento agli ecotipi, la suddivisione con diverse proprietà biologiche, prevede l'identificazione di una zona di sorgente (crenon) che alimenta il reticolo idrografico, una zona pedemontana (rhithron), corsi d'acqua con elevata pendenza ( $> 0,15\%$ ) e substrato grossolano ed infine una di fondovalle (potamon), riferendosi ai larghi fiumi di pianura che scorrono in alvei con bassa pendenza e i cui sedimenti risultano prevalentemente composti da sabbia e limo con significativo contenuto di materia

organica. In tali zone le caratteristiche cambiano, come la temperatura, l'ossigeno disciolto, la fauna e la flora acquatica.

La dimensione longitudinale è importante per il *continuum* che rappresenta, per la sua funzione di corridoio ecologico e per il processo di ciclizzazione dei nutrienti che vi avviene.

Nel 1980, da Vannote e collaboratori, è stata formulata la *teoria del River Continuum* allo scopo di pervenire ad un modello generale ed unificante dell'ecologia fluviale, utile a spiegare i cambiamenti che avvengono nei corsi d'acqua longitudinalmente (Fig 1.4).

La teoria prende in esame aspetti che correlano le acque correnti al bacino di alimentazione, al corridoio di scorrimento delle acque, alle comunità biotiche: geomorfologia, idraulica e biologia.

In particolare viene fornita, in base soprattutto alle comunità dei macroinvertebrati bentonici, una descrizione delle nicchie ecologiche occupate negli ecosistemi acquatici, in relazione alle fonti trofiche ed alle caratteristiche del fiume, procedendo dalla sorgente fino alla foce, teoria applicata solo per fiumi non solo grandi ma anche ad elevato grado di integrità e non inquinati.

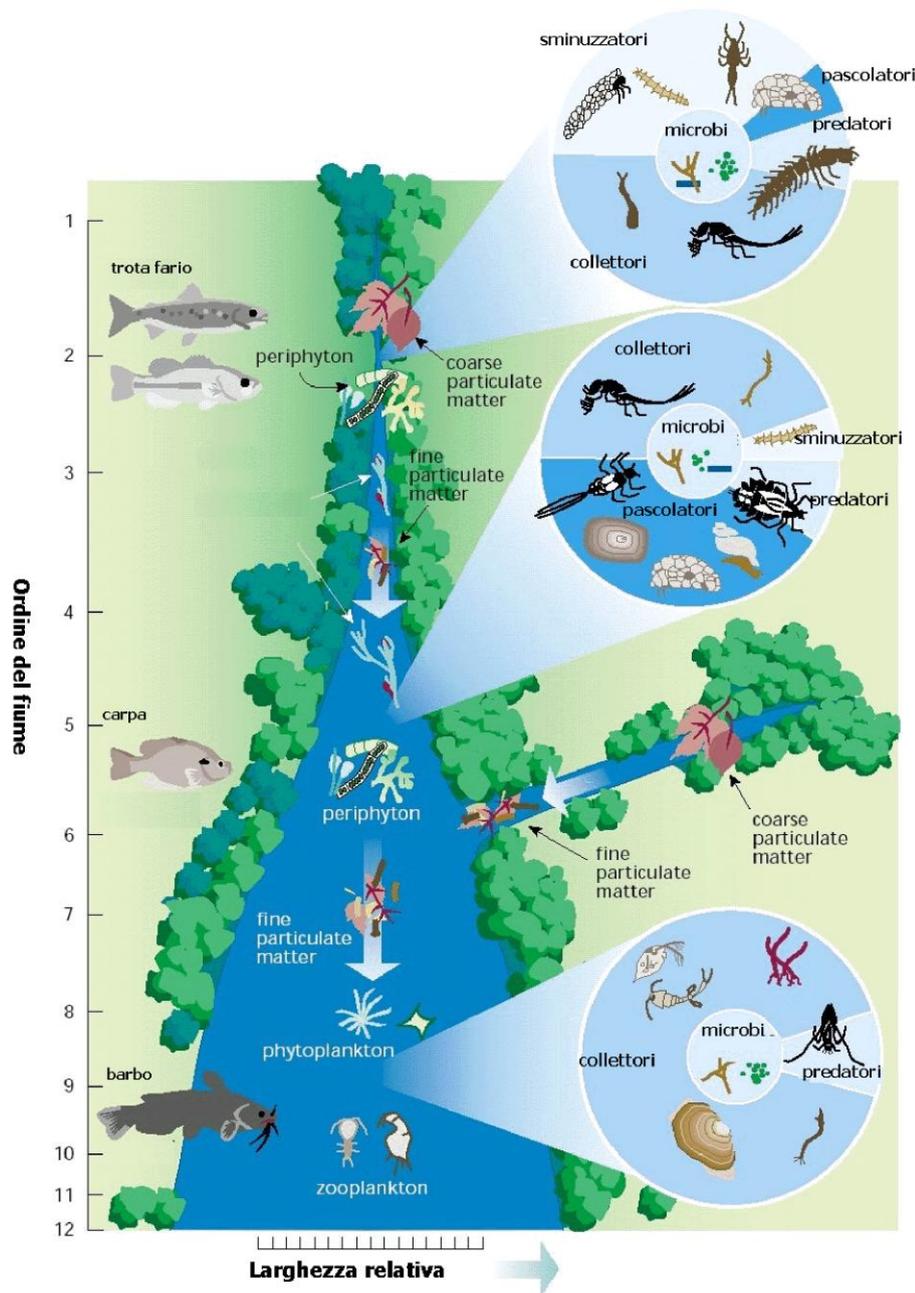


Fig. 1.4: River Continuum Concept: rappresentazione schematica.

Il criterio appena descritto ha costituito la base per lo sviluppo dei più moderni approcci di studio degli ambienti fluviali, identificando quindi nella forza idraulica e nella temperatura i principali fattori di modellamento delle forme biologiche presenti all'interno dei corsi d'acqua. In tempi successivi l'attenzione è stata risolta anche alla dimensione laterale dei corsi d'acqua, dimensione lungo la quale i processi di reciproco scambio delle acque mettono in connessione l'asta fluviale con il territorio circostante.

La dimensione laterale/trasversale si riferisce al transetto che include la sezione dell'alveo bagnato, l'alveo di piena, la fascia spondale e lo stato del suolo circostante.

La vicinanza o meno dall'acqua è l'elemento che più di ogni altro seleziona la distribuzione della vegetazione in una vallata fluviale e questo è un fatto importante da considerare per l'ecologia delle acque. La vegetazione riparia spontanea, col proprio suolo, infatti, svolge un ruolo insostituibile nella protezione dell'acqua e dell'ambiente acquatico. La dimensione laterale interessa maggiormente i tratti fluviali di pianura ed è principalmente realizzata dalle periodiche esondazioni che portano a riallacciare all'asta fluviale quegli ambienti marginali. Nei processi di piene l'acqua fuoriesce dall'alveo fluviale e si arricchisce delle sostanze presenti nel terreno che invade; pertanto tutte le caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche dei corsi d'acqua risultano in continuo cambiamento in relazione ad eventi che si presentano con diversa periodicità in funzione del ripetersi delle piene.

La dimensione temporale di un fiume, per la sua lentezza, tende a sfuggire alla considerazione dell'uomo che spesso invade l'alveo di piena con costruzioni, che posiziona strutture edilizie ed opifici nei pressi dei meandri in evoluzione erosiva e si accorge degli errori commessi di fronte ad eventi catastrofici che hanno tempi medi di frequenza di ritorno. In funzione del tempo variano il chimismo delle acque, la ciclizzazione dei nutrienti e la composizione delle comunità fluviali; profonde trasformazioni sono indotte dalle piene e dalle dinamiche dei meandri.

La metodologia di analisi secondo le quattro dimensioni è utile per individuare le caratteristiche generali comuni di macro-zone fluviali (biotipologie) che sono analoghe tra fiumi diversi, sebbene ogni fiume abbia caratteristiche di unicità e di irripetibilità per l'elevato numero di variabili relative nella natura del terreno, del clima, della copertura vegetale, delle caratteristiche del bacino e delle pressioni antropiche che ne influenzano le caratteristiche chimico-fisiche ed eco-biologiche.

La portata idrica si inserisce trasversalmente all'interno di ciascuna delle dimensioni e completa l'inquadramento e le informazioni.

## 1.4 Il regime idrico

La portata, definita come quantità d'acqua che passa in un secondo attraverso la sezione di un corso d'acqua, aumenta naturalmente dalla sorgente alla foce.

La variazione della portata durante l'anno viene definita regime; esso dipende da numerosi fattori quali il clima, l'estensione del corso d'acqua, la pendenza e la copertura vegetale delle sponde.

Nell'alveo, la porzione di territorio contenuto entro le rive incise di un corso d'acqua dove si esplicano i processi più importanti legati alla dinamica delle acque (erosione, trasporto, sedimentazione), vengono identificate quattro condizioni in funzione della portata (Fenoglio & Bo, 2009; Siligardi et al., 2007) (Fig.1.5 - 1.6):

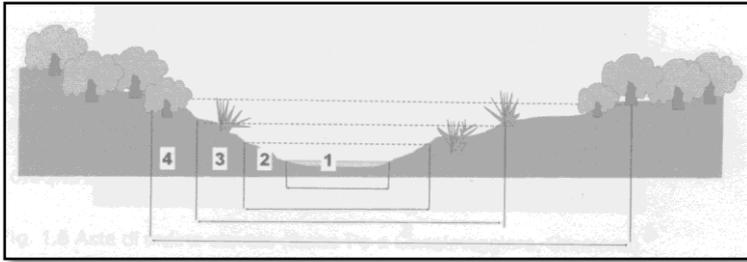
**Alveo di magra**, quando la portata è minima. Porzione dell'alveo che resta bagnata anche in condizioni di magra.

**Alveo di morbida**, quando la portata è ordinaria cioè intermedia tra gli estremi del regime idrico. Porzione dell'alveo occupata nelle condizioni di morbida, cioè nei periodi in cui nel fiume scorre abbondante acqua. La frequenza delle sommersioni, la loro durata e l'azione delle correnti di piena sulla vegetazione e sui ciottoli (abrasione, rotolamento) determinano condizioni che non permettono lo sviluppo di arbusti. Nei periodi asciutti viene colonizzato, soprattutto nella fascia più esterna, dalle erbacee pioniere di greto.

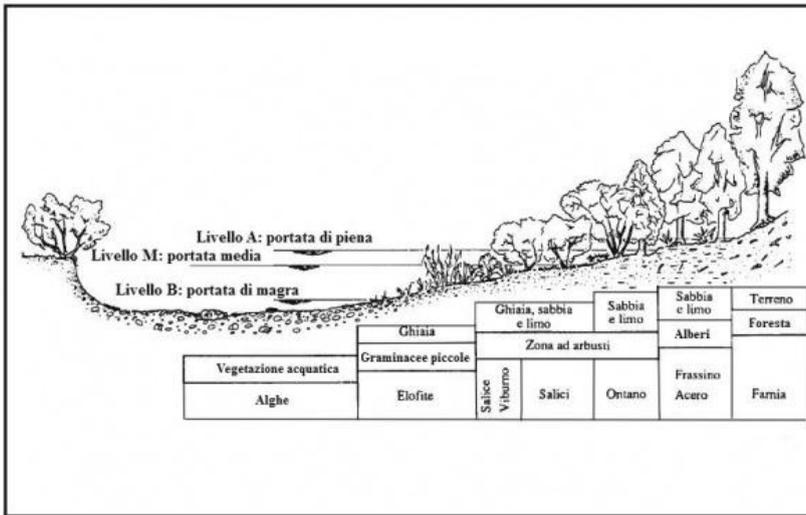
**Alveo di piena**, quando essa supera notevolmente i normali valori stagionali e ha un periodo di ritorno di circa 4 anni. Porzione del letto fluviale occupata nelle condizioni di piena straordinaria.

**Alveo di piena eccezionale**, condizione episodica, con frequenza anche centenaria, in cui l'acqua può raggiungere anche le porzioni più lontane della zona perfluviale dove si trovano formazioni arboree zonali. Porzione del letto fluviale occupata nelle condizioni idrologiche episodiche di piena catastrofica.

L'alveo bagnato è la porzione dell'alveo in cui è presente l'acqua al momento dell'osservazione.



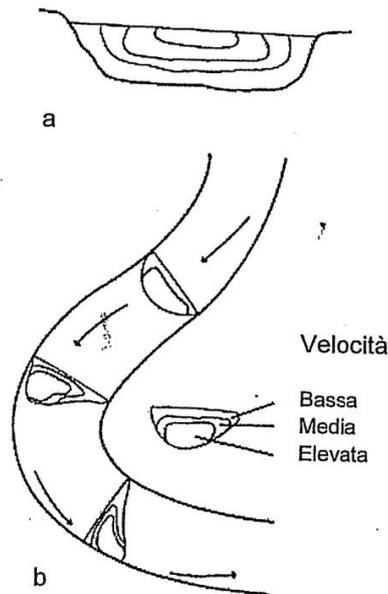
**Fig.1.5:** Alveo fluviale in condizioni di magra (1), morbida (2), piena ordinaria (3) e piena eccezionale (4) (da Fenoglio & Bo, 2009).



**Fig 1.6:** Alveo fluviale, specie vegetali e granulometria del substrato.

## 1.5 La velocità della corrente di un corso d'acqua

La velocità di corrente varia considerevolmente all'interno della sezione trasversale di un corso d'acqua, in conseguenza degli attriti che si esercitano lungo le sponde e sul fondo e in relazione alla sinuosità del suo tracciato (Fig 1.7).



**Fig 1.7:** Distribuzione della velocità della corrente in una sezione posta in un tratto rettilineo (a) e in diverse sezioni posizionate lungo un ansa fluviale (b).

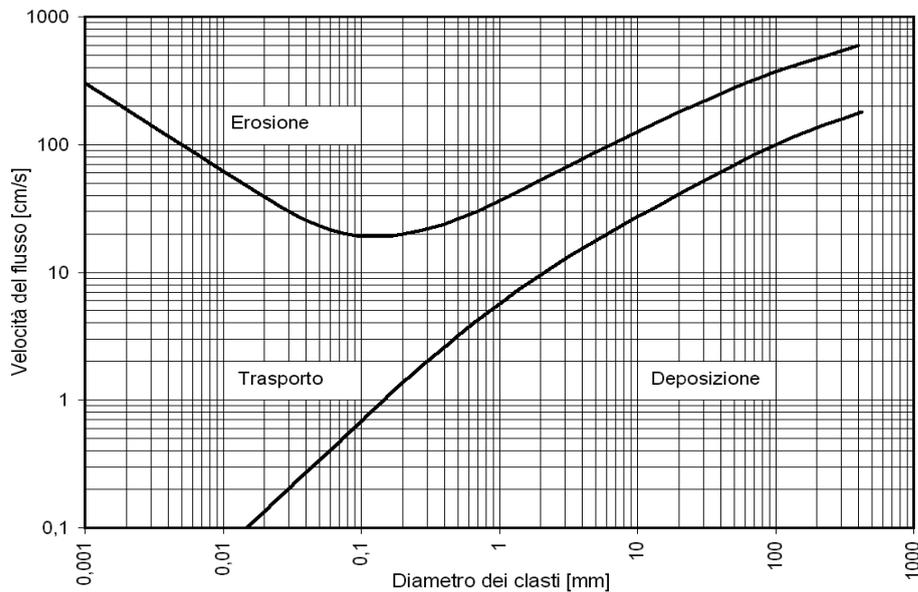
Considerando una sezione trasversale ideale posta in un tratto rettilineo, la velocità risulta massima in prossimità della superficie al centro della sezione, a causa dell'attrito che l'acqua esercita con l'atmosfera e con l'alveo. Da questo punto, andando verso il basso, la velocità diminuirà seguendo un profilo logaritmico, raggiungendo valori prossimi a zero presso il fondo dell'alveo. La linea che lungo il corso di fiume unisce i punti che presentano la massima velocità, il cosiddetto filone della corrente, non risulta necessariamente posizionata in modo equidistante tra le due rive, ma soprattutto nei tratti di pianura, si sposta ora verso una sponda ora verso l'altra seguendo l'andamento delle profondità massime, tale linea si definisce linea di Thalweg.

Questo andamento sinuoso delle velocità massime determina sulle sponde opposte fenomeni locali di erosione e deposito che nel tempo danno luogo ai meandri fluviali. Si ha una prevalenza dei processi di erosione sul lato concavo (esterno), opposti a quelli di deposito prevalenti sul lato convesso (interno.).

## 1.6 Fenomeni erosivi e granulometria del substrato

L'energia di un corso d'acqua è legata al volume d'acqua ed alla velocità della corrente, ma parte di essa viene dissipata e assorbita dall'attrito con il letto fluviale e

dal trasporto di materiale solido. Quando sono elevati i valori di portata e/o velocità si manifestano i fenomeni erosivi, mentre al loro diminuire si manifesta solo trasporto e infine solo sedimentazione. La Curva di Hjulstrom (1939) (fig.1.8) riporta le connessioni tra la velocità della corrente e la dimensione delle particelle coinvolte.



**Fig.1.8:** Curva di Hjulstrom con indicazione dei limiti di velocità richiesti per i diversi processi fluviali (da Fenoglio & Bo, 2009).

La grandezza del materiale del substrato si quantifica tramite la misura del diametro del materiale depositato ed è espressa in termini di granulometria media (Wentworth, 1922).

Nel tratto superiore, il corso d'acqua presenta un substrato costituito in prevalenza da ciottoli e grossi massi; nel tratto medio i sedimenti, trasportati a valle dalla corrente, subiscono una sorta di selezione in base alla loro granulometria: quelli con dimensioni superiori si depositano sul fondo, mentre gli altri continuano ad essere trasportati dalla corrente. Mano a mano che la pendenza decresce, diminuisce la forza della corrente e vengono portati a valle prevalentemente ghiaia, sabbia e limo (Siligardi *et al.*, 2007). In tabella 1.1 si osserva uno schema delle varie classi granulometriche.

| <b>Tipologia</b>    | <b>Dimensione (mm)</b> |
|---------------------|------------------------|
| Massi               | >256                   |
| Ciottoli grossi     | 128-256                |
| Ciottoli            | 64-128                 |
| Ghiaia grossa       | 16-64                  |
| Ghiaia media        | 8-16                   |
| Ghiaia fine         | 4-8                    |
| Ghiaia molto fine   | 2-4                    |
| Sabbia molto grossa | 1-2                    |
| Sabbia grossa       | 0,5-1                  |
| Sabbia media        | 0,25-0,5               |
| Sabbia fine         | 0,125-0,25             |
| Sabbia molto fine   | 0,0625-0,125           |
| Limo                | 0,004-0,0625           |
| Argilla             | <0,004                 |

**Tab.1.1:** Scala delle dimensioni granulometriche (da Wentworth, 1922).

## **1.7 Caratteristiche chimiche, chimico-fisiche delle acque correnti**

### **1.7.1 I soluti nelle acque correnti**

Dal punto di vista chimico un corso d'acqua può essere considerato come un flusso di una soluzione acquosa. I soluti sono soggetti a svariati processi di trasformazione da una specie chimica ad un'altra e i cambiamenti, fisici e biologici, coinvolgono il fondo dell'alveo. Tra i primi prevalgono la diluizione, l'adsorbimento e il de-adsorbimento nelle particelle minerali, le reazioni di precipitazione; fra quelli biologici l'incorporazione all'interno delle strutture viventi e il rilascio.

In natura, nelle acque correnti troviamo in soluzione principalmente composti del carbonio (con lo ione  $\text{HCO}_3^-$  nettamente dominante su tutte le altre specie chimiche), del fosforo, dell'azoto, particelle organiche idrorepellenti, metalli in tracce, detrito organico sottoforma di particolato fine, particolato minerale; all'interno di quest'ultimo sono inglobati per adsorbimento azoto e fosforo che si trovano, generalmente, in rapporto di circa 10:1.

Il trasporto dei soluti avviene anche a livello del subalveo permeabile dei fiumi e delle acque sotterranee per cui l'interscambio fra le acque superficiali correnti e quelle interstiziali possono influenzarne fortemente la concentrazione e le dinamiche.

In particolare, le dinamiche di queste “soluzioni in movimento” dipendono dalla velocità di corrente e dalla portata idrica; dai fattori chimico-fisici che influenzano le soluzioni quali temperatura e pH; dalle interazioni tra l'acqua corrente ed il letto fluviale; dalle interazioni tra l'acqua corrente e l'atmosfera; da tutti i processi di trasferimento di materia che avvengono tra il flusso idrico e l'ambiente circostante (con particolare riguardo alle rive e al territorio), e le falde.

L'esistenza e l'abbondanza di ciascun tipo di soluto nelle acque correnti è fortemente condizionata dal movimento fisico dell'acqua e, quindi, dalle caratteristiche del reticolo idrologico e del bacino idrografico, a partire dalla pendenza.

### **1.7.2 Il chimismo delle acque correnti**

Il chimismo delle acque correnti varia regionalmente, in funzione della posizione geografica e della natura del terreno.

La durezza è un valore legato alla concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  a sua volta legata al substrato litologico: rocce sedimentarie e calcaree forniscono elevate quantità di sali carbonatici (in particolare il bicarbonato di calcio) e di magnesio. Essa può influenzare direttamente e indirettamente la composizione delle comunità biologiche fluviali e può aumentare la tossicità dei metalli pesanti come cromo (Cr), rame (Cu) e zinco (Zn) (Fenoglio & Bo, 2009). Quindi il tenore in calcio varia a seconda dei terreni attraversati e può presentare un incremento progressivo lungo il corso d'acqua. La somma delle concentrazioni calciche e magnesiche nelle acque naturali viene misurata come durezza totale (espressa in mg/L di calcio).

Perdite di  $\text{CO}_2$  dall'acqua avvengono per gli scambi con l'atmosfera e per le interazioni con il carbonato di calcio delle rocce.

L'ossigeno gassoso disciolto (OD) in acqua è vitale per l'esistenza della maggior parte degli organismi acquatici. L'ossigeno è un elemento basilare per la respirazione cellulare sia per la vita acquatica che per quella terrestre. Taluni organismi, come il salmone e la trota, richiedono alte concentrazioni di ossigeno disciolto. Altri organismi, come il pesce gatto e la carpa, possono sopravvivere in ambienti con una più bassa concentrazione di ossigeno disciolto. La diversità degli organismi è

maggiore tanto più è alta la concentrazione di OD. L'ossigeno allo stato gassoso viene disciolto in acqua a causa di una varietà di processi: diffusione tra l'atmosfera e la superficie dell'acqua, aerazione dovuta all'infrangersi della corrente su rocce e detriti, agitazione dell'acqua per le onde o il vento, fotosintesi delle piante acquatiche. I fattori che influenzano la concentrazione dell'ossigeno disciolto in un ambiente acquatico includono: temperatura, corrente, pressione atmosferica, piante acquatiche, decomposizione di materiali organici e attività dell'uomo. Per la presenza di organismi vegetali, il livello di OD fluttua durante il giorno, crescendo durante le ore mattutine e raggiungendo un picco nel pomeriggio. Di notte la fotosintesi cessa, ma piante e animali continuano a respirare, causando un decremento del livello di OD.

I composti disciolti nelle acque fluviali provengono dai suoli e dalle rocce presenti nel bacino idrografico, dai processi metabolici e dall'atmosfera tramite le precipitazioni umide e secche. Un ruolo fondamentale nella regolazione della composizione ionica delle acque di dilavamento in ingresso ai corsi d'acqua è svolto dalla fascia riparia. Questa infatti agisce come filtro biologico selettivo trattenendo nella biomassa vegetale terrestre nutrienti come il fosforo e l'azoto, oppure come filtro meccanico, riducendo l'ingresso del materiale particellato. Anche i processi biologici che si svolgono all'interno dei corsi d'acqua contribuiscono a determinare la composizione del materiale disciolto, soprattutto nelle zone a bassa velocità di corrente dove il tempo di permanenza delle acque consentono il completamento delle reazioni biochimiche.

Gli ioni maggiormente presenti nelle acque sono  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  e  $\text{HCO}_3^-$ . Legata alla concentrazione ionica è la conduttività elettrica specifica, misurata in  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , cioè la capacità dell'acqua di condurre elettricità. Essa è strettamente influenzata dalla litologia della regione, in quanto deriva dalla solubilizzazione del comparto roccioso ed è, quindi, più elevata in presenza di substrati carbonatici, facilmente solubili, rispetto a substrati silicei. Nell'ambito di un corso d'acqua essa aumenta da monte a valle. Gli scarichi civili e industriali emettono numerose sostanze, tra cui grandi quantità di anioni (cloruri, solfati e nitrati) a cui consegue un aumento dei valori di conducibilità (Fenoglio & Bo, 2009). Tra i nutrienti: N, P, sono i principali, oltre a Si e i gas ( $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$ ).

Il pH oscilla intorno a valori di neutralità e vira verso l'acidità in acque che scorrono su terreni paludosi o umici e verso l'alcalinità se le rocce sono sedimentarie e ricche di carbonati solubilizzabili. Il pH è fortemente influenzato dalla composizione chimica delle acque meteoriche e dalla successiva interazione di queste con rocce e suoli del bacino idrografico; carbonati e bicarbonati possono, infatti, tamponare la

presenza di ioni idrogeno. L'abbassamento del pH può essere dovuto a cause naturali, come in ambienti di torbiera, dove si formano acidi umici, ma anche all'azione antropica, che può portare ad emissione di acidi solforici e nitrici. Variazioni del pH di un corso d'acqua possono provocare cambiamenti nella struttura e nelle caratteristiche funzionali dell'intero sistema ecologico con la scomparsa di numerosi taxa (Hirst *et al.*, 2004) e con l'alterazione della capacità metabolica del fiume (Thompson & Bärlocher, 1989).

L'alcalinità dell'acqua costituisce una misura della capacità del campione di acqua di neutralizzare gli acidi. Le piogge acide possono avere effetti trascurabili sul pH se in quella regione c'è abbondanza di minerali con elevato valore di alcalinità. Alte concentrazioni di ioni carbonato, bicarbonato e idrossido nel fondo di laghi e fiumi possono fungere da tampone capace di neutralizzare molti degli ioni H<sup>+</sup> presenti, derivanti ad esempio dalle piogge acide. In funzione del pH e quindi dell'alcalinità di un corso d'acqua si rendono più o meno disponibili i metalli pesanti. Se, infatti, l'acqua è molto acida i metalli pesanti vengono rilasciati in essa accumulandosi nelle branchie dei pesci.

Il regime termico di un corso d'acqua è legato ad una serie di fattori tra cui spiccano il clima, la dimensione dell'alveo, la velocità della corrente, la copertura arborea, l'altitudine e la latitudine, il grado di ombreggiatura naturale (vegetazione riparia, gole, canyons), le rocce (incluso il colore di queste, dal momento che quelle scure si scaldano di più), gli apporti di acqua fresca dalle falde, la morfologia del letto (rapporto superficie esposta all'aria/volume). In particolare, tende ad aumentare dalla sorgente alla foce. Nelle regioni temperate, come l'Italia, si registra una marcata variazione annuale e giornaliera. La temperatura esercita una profonda influenza sui corsi d'acqua condizionando i cicli biogeochimici e la struttura e composizione delle comunità biologiche. Dal momento che la maggior parte degli organismi che vivono nei corsi d'acqua sono pecilotermi, le variazioni di temperatura esercitano direttamente una profonda influenza sullo sviluppo delle uova, sul tasso di crescita, sui cicli vitali e sulla produttività di gran parte di essi (Nunn *et al.*, 2003). I suoi effetti indiretti sul comparto biotico sono dovuti soprattutto alle modificazioni della quantità di ossigeno che passa in soluzione.

## **1.8 Il potere autodepurante delle acque correnti**

Un corso d'acqua viene costantemente raggiunto da materia organica prodotta altrove che si aggiunge a quella derivante dai vegetali che lo popolano. La gravità, la forza

eolica e quella dell'acqua di dilavamento trasporta con sé anche materia organica particolata (POM) e sostanze più o meno eutrofizzanti. Ancora, l'acqua che penetra nel suolo e che in diversi modi raggiunge il flusso idrico fluviale, può trasportare ingenti quantità di sostanza organica disciolta (DOM). Questi apporti di sostanza organica, non solo di origine naturale ma anche di origine antropica (es. scarichi fognari), costituiscono materiale da demolire e su cui si insediano una miriade di microscopiche forme di vita, la cosiddetta "catena del detrito" che, in maniera organizzata, sfrutta la disponibilità di sostanza organica per lo svolgimento delle proprie funzioni vitali.

In particolare, l'insieme delle caratteristiche geomorfologiche del corso d'acqua e l'azione degli organismi concorrono a determinare quello che viene definito "potere autodepurante"; con questo termine si indica l'abbattimento del carico organico del sistema fluviale dovuto ai processi di demolizione delle sostanze biodegradabili, arrivando alla mineralizzazione in anidride carbonica, acqua e sali minerali, che vengono riciclati dai vegetali (microalghe, idrofite). Maggiore è la complessità delle reti trofiche, maggiore è tale potere e, per questo motivo, comunità vegetali e animali ben strutturate e ricche di specie sono garanzia del buon funzionamento dei processi autodepurativi; per lo stesso motivo, i danni apportati agli ecosistemi fluviali possono derivare non soltanto dall'immissione diretta di sostanze inquinanti, ma anche da modificazioni nella struttura e nell'assetto dell'alveo stesso. I prodotti della mineralizzazione vengono poi riutilizzati dalla componente autotrofa, costituita nei corsi d'acqua da microalghe bentoniche e macrofite acquatiche. Inoltre, molto efficace è il ruolo della vegetazione acquatica nell'azione di ciclizzazione dei nutrienti. La vegetazione ripariale, oltre a fornire cibo ed habitat agli organismi microscopici, ai macroinvertebrati e ai vertebrati, svolge una duplice funzione depurante, agendo da filtro meccanico e da filtro biologico: intercetta le acque di dilavamento dei versanti e ne rallenta la velocità inducendo la sedimentazione del carico solido e degli inquinanti ad esso legati. A questa azione di chiarificazione delle acque si accompagna un ruolo protettivo nei confronti dell'eutrofizzazione fluviale per la rimozione del fosforo (legato alle particelle argillose sedimentate) e dell'azoto (assorbito dalle piante e denitrificato dai batteri associati allo strato radicale).

Quando gli apporti inquinanti non sono di natura prettamente organica, come nel caso di scarichi industriali, si aggiunge un carico inquinante che dipende dal tipo di processo industriale e può essere costituito da metalli pesanti e sostanze di sintesi (idrocarburi policiclici aromatici, fenoli ed altri xenobiotici). Tali molecole oltre ad essere metabolizzate poco o niente dalla comunità microbica, a causa delle loro tossicità, ne riducono l'efficienza e quindi le funzionalità.

Il superamento della soglia limite relativa alle capacità autodepurative di un corso d'acqua ha delle gravi conseguenze per l'intera comunità animale, *in primis* la fauna ittica. Carichi organici eccessivi comportano la perdita di specie ittiche pregiate che richiedono condizioni di buona ossigenazione delle acque a vantaggio di altre più resistenti. Oltre a questa perdita qualitativa delle risorse ittiche si osserva, in particolari condizioni, accumulo di sostanze tossiche negli organi e nei tessuti dei pesci che ne pregiudicano l'uso alimentare.

### **1.9 La componente vegetale nei corsi d'acqua**

La funzionalità e la struttura di un corso d'acqua dipendono da un complesso insieme di fattori biotici e abiotici, strettamente interconnessi ed in continuo equilibrio.

Le comunità biotiche del sistema fluviale sono rappresentate da microorganismi, da macroinvertebrati (crostacei, molluschi, larve d'insetti), da vertebrati (anfibi, pesci, rettili e mammiferi) e dalla componente vegetale (acquatica, ripariale e retroripariale). Le varie comunità vegetali presenti negli ecosistemi fluviali sono continuamente condizionate da molteplici fattori limitanti, determinati dal dinamismo spaziale e temporale dell'idrosistema. I fattori che influiscono la distribuzione e la struttura della vegetazione sono rappresentati dalla dimensione del corso d'acqua, dalla frequenza e dalla durata dei periodi di sommersione, dai livelli di falda freatica, dalla granulometria del substrato, dall'uso del suolo, dalla continua variazione delle caratteristiche idrometriche e dai cambiamenti morfologici, che definiscono condizioni ambientali ed ecologiche molto diverse.

Schematicamente le formazioni vegetali di un corso d'acqua possono essere classificate in vegetazione retroripariale, vegetazione ripariale, vegetazione dell'alveo.

**La vegetazione retroripariale;** è rappresentata da formazioni forestali delle pianure alluvionali, che si sviluppa in zone in cui la falda freatica è elevata e l'alveo è soggetto a inondazioni non regolari; si tratta di un ecosistema più complesso, in cui le aree boscate si alternano ad aree a prato, paludose, lanche morte.

**La vegetazione ripariale;** è l'associazione vegetale di formazioni arboree, arbustive o erbacee che si sviluppa sulle rive dei corsi d'acqua, a partire dall'alveo di magra. In particolare, l'ecotono ripariale è la zona di transizione tra l'ambiente prettamente acquatico e gli ecosistemi terrestri. La vegetazione ripariale è costituita da specie

igrofite il cui sviluppo è influenzato dalla vicinanza degli apparati radicali all'acqua, ed è strutturata in una serie di formazioni che s'insediano in successione dal limite esterno dell'alveo di morbida. Questa zona è influenzata dai fenomeni periodici di piena e dalle oscillazioni della falda freatica fluviale; sono in grado di tamponarli, salvaguardando gli ambienti circostanti e limitando i processi erosivi delle rive. La vegetazione ripariale, infatti, contribuisce ad aumentare la scabrezza della superficie del suolo, rallentando i flussi superficiali ricchi di sedimenti, come filtri naturali, favorendo l'infiltrazione e la permanenza dell'acqua nel terreno e captando i diversi inquinanti presenti nelle acque di ruscellamento e nei deflussi sub superficiali, da cui la definizione di "fasce tampone" e rimuovendo i nutrienti (azoto e fosforo), provenienti dai suoli agricoli e presenti nelle acque sotterranee e di ruscellamento tramite processi metabolici. L'input di materiale che le fasce riparie forniscono al corpo idrico sottoforma di porzioni vegetali, foglie, tronchi, etc. è una fondamentale fonte di nutrimento, e rappresenta una possibilità di rifugio per gli organismi che in questi ecosistemi trascorrono tutto o parte del ciclo vitale. Per tali motivi, le formazioni vegetali riparie hanno un ruolo fondamentale nella costituzione e caratterizzazione degli ecosistemi fluviali e contribuiscono in maniera sostanziale a determinarne la funzionalità ecologica.

**La vegetazione d'alveo** comprende la vegetazione sommersa e la vegetazione che s'insedia nell'alveo bagnato. La vegetazione d'alveo include, quindi, le piante radicate sommerse, le radicate emergenti, le radicate flottanti e le non radicate flottanti. Mentre le radicate sommerse e le radicate flottanti s'insediano nella parte centrale dell'alveo o verso la riva, le piante radicate emergenti si localizzano nella zona d'alveo di morbida, soggette a continua fluttuazione del livello idrico.

Per quanto riguarda i vegetali in alveo lo scorrere dell'acqua, le variazioni di portata, le variazioni della velocità della corrente nonché la frequenza con cui tali variazioni si succedono, la temperatura dell'aria e dell'acqua, la quantità di luce che raggiunge le piante direttamente o indirettamente possono condizionare fortemente la distribuzione, l'estensione e la composizione dei popolamenti. La litologia del substrato, su cui si imposta il bacino, è un altro fondamentale fattore nel determinare le caratteristiche del popolamento vegetale; essa influenza sia la morfologia del bacino, sia le caratteristiche del fondo dell'alveo e dei suoli circostanti. Il regime idrologico e i conseguenti fenomeni ciclici temporali e spaziali di erosione e deposito influenzano significativamente i popolamenti vegetali; in particolare l'asportazione del suolo e la deposizione di sedimenti determinano le variazioni nell'estensione delle aree disponibili per l'insediamento delle formazioni riparie. La dimensione del corso

d'acqua è un altro fattore che influisce sul popolamento vegetale; in particolare, per la vegetazione in alveo, la profondità è il fattore di controllo più importante. Anche le attività antropiche, determinando l'uso del suolo nel bacino e alterando lo stato trofico, i cicli dei nutrienti e le caratteristiche chimico-fisiche dell'acqua, influenzano fortemente le caratteristiche dei popolamenti vegetali.

### **1.9.1 Le macrofite acquatiche**

Una schematica suddivisione dei popolamenti vegetali presenti nei sistemi lotici consente di individuare tre gruppi funzionali: il fitoplancton (limitatamente alle zone con basso o nullo flusso idrico), il periphyton (la pellicola di alghe, protozoi, poriferi, briozoi e altri animali che ricoprono i substrati immersi nei corpi idrici) e le macrofite acquatiche.

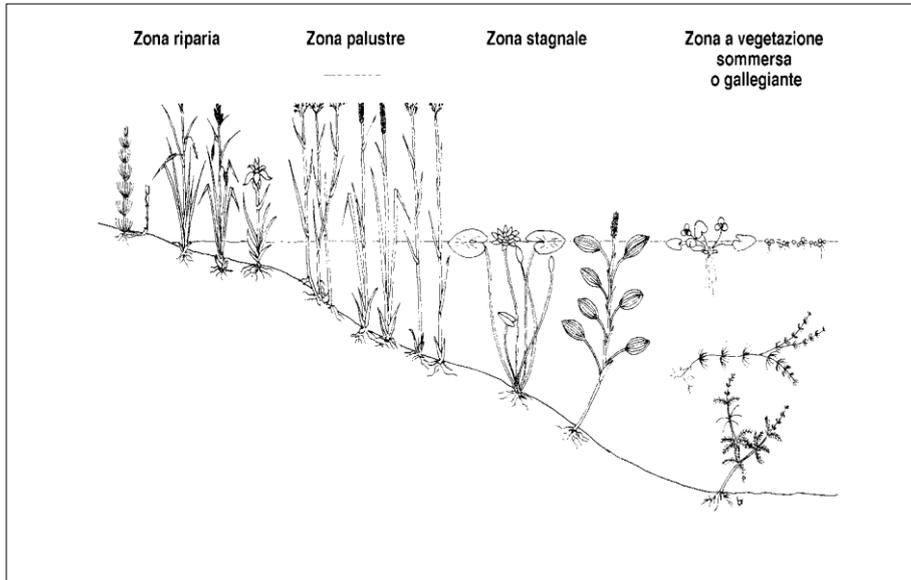
Le macrofite acquatiche comprendono numerosi taxa vegetali macroscopicamente visibili negli ambienti acquatici (riconoscibili senza l'aiuto di un microscopio ad alta definizione), rinvenibili sia in prossimità sia all'interno di acque dolci superficiali (lotiche e lentiche), rappresentandone una componente importante di tali ecosistemi, il cui ciclo vitale avviene interamente, o quasi, in acqua. Questo raggruppamento che non ha valore tassonomico, è piuttosto eterogeneo, ed è composto da Angiosperme, Pteridofite, Briofite, e da Alghe filamentose visibili (Bielli *et al.*, 1999; AFNOR, 2003; CEN, 2003; Minciardi *et al.*, 2003; APAT, 2007).

Le macrofite acquatiche hanno evoluto adattamenti morfologici, fisiologici ed anatomici, con tendenza a sviluppare delle formazioni a fasce parallele rispetto alla riva. Tra i principali adattamenti all'ambiente acquatico vi è la modifica dell'apparato fogliare, la riduzione dell'apparato radicale e la presenza di un abbondante parenchima aerifero per favorire gli scambi gassosi e permettere il galleggiamento (Sburlino *et al.*, 2008).

All'interno dell'ecosistema fluviale, le macrofite sono rinvenibili nell'alveo di morbida e nei sistemi acquatici laterali, dove si presentano condizioni adeguate alla loro crescita.

Le macrofite sono classificabili in base alla forma biologica (Raunkiaer, 1934), ossia alla categoria morfo-funzionale in funzione delle risposte all'ambiente circostante, in particolare alle condizioni climatiche e microclimatiche.

La forma biologica determina la capacità delle specie di colonizzare i differenti mesohabitat presenti all'interno dell'ambiente acquatico e ripario, influenzando la conseguente loro disposizione nella sezione trasversale del sistema lotico (Fig 1.9).



**Fig 1.9:** Distribuzione delle macrofite lungo un gradiente di profondità dell'acqua.

Le piante sono classificate anche in riferimento ai vari adattamenti ad ambienti con diverse disponibilità di acqua (Den Hartog e Segal, 1964; Müller, 1992; Tomaselli et al., 2006); di seguito si descrivo le **elofite**, le **idorfite (pleustofite e rizofite)** e le **anfifite** (Fig 1.10).

Le **elofite (El)** o macrofite emergenti (piante palustri o piante anfibie) comprendono tutte le specie vegetali emergenti, radicate che colonizzano i contesti ripari dei corpi idrici; posseggono, infatti, unicamente la porzione inferiore dei culmi (< 30%), parte basale, perennemente o per periodi più o meno prolungati, sommersa (le radici e la parte inferiore della struttura vegetativa); il resto del corpo vegetativo e riproduttivo si trova al di fuori dell'acqua e non dipendono da essa per la riproduzione (*Carex* sp.pl., *Phragmites australis*, *Typha* sp.pl., *Juncus* sp.pl., ecc.). Si riscontrano inoltre di frequente lungo le rive di corsi d'acqua a lento deflusso, come canali, meandri e delta fluviali. In prevalenza colonizzano acque dolci da oligo-mesotrofiche ad eutrofiche, spesso ricche di carbonati; dal punto di vista dinamico esse rappresentano il primo stadio dell'interramento dei corpi d'acqua e preludono alla formazione delle boscaglie a salici.

Le **Idrofite** sono piante strettamente legate all'acqua, in quanto sviluppano la totalità del loro apparato vegetativo nell'acqua o alla sua superficie. Sono caratterizzate da un complesso di adattamenti morfologici, anatomici e fisiologici all'ambiente acquatico che prende il nome di idromorfismo. Tali adattamenti permettono alle piante acquatiche di assorbire direttamente dall'acqua anidride carbonica, ossigeno e sostanze nutritive attraverso la mancanza di stomi nelle foglie sommerse e sulla pagina inferiore di quelle galleggianti (sono presenti solo sulla pagina superiore); l'epidermide con pareti delle cellule sottili, prive di peli con delicata cuticola; le radici assai scarse o assenti e talora prive di peli assorbenti; lo sviluppo di tessuti ricchi di canali, lacune, camere e spazi intercellulari (gli aerenchimi che rendono gli organismi spugnosi, leggeri e quindi atti al galleggiamento, assicurando contemporaneamente il movimento dei gas verso le parti profonde); la presenza, in molte specie, sullo stesso individuo di foglie di diversa struttura e morfologia (eterofillia) in dipendenza della loro posizione: foglie sommerse nastriformi o lanceolate per evitare lesioni dovute alla turbolenza delle acque con le caratteristiche di idromorfismo sopracitate; foglie galleggianti o emerse di forma diversa con la stessa struttura anatomica delle foglie delle piante terrestri.

Le **Idrofite pleustofite** sono piante non ancorate al substrato, liberamente flottanti in superficie o appena al di sotto di essa, galleggianti sulla superficie dell'acqua (*Lemna minor*, *Wolffia arrhiza*, *Azolla caroliniana* o *Hydrocharis morsus-ranae*), i cui organi assimilatori possono risultare sommersi o galleggiare alla superficie. In quest'ultimo caso la pagina fogliare superiore è provvista di stomi come adattamento alla vita subaerea. Le pleustofite sono tipiche delle acque ferme, stagnante o a lento deflusso. In ogni caso esse traggono il loro nutrimento, tramite foglie e radici, direttamente dall'acqua.

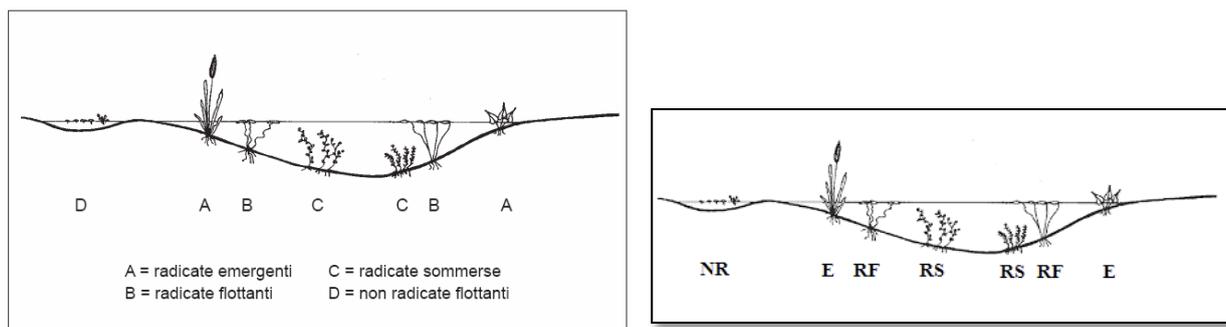
Le **Idrofite rizofite (Rz)** (*Nymphaea alba*) sono piante vascolari con radici che penetrano nel fondale; vivono totalmente sommerse o emergono solo con alcuni organi. Sono reperibili in natura solo in acque sufficientemente profonde. Per lo più incapaci di sopravvivere a lungo all'asciutto, si insediano in bacini temporanei solo con forme annuali, che decadono cioè con il prosciugamento, perpetuandosi fino alla piena successiva sotto forma di semi o stadi di resistenza. Esse traggono gran parte delle sostanze nutritive dall'acqua, soprattutto attraverso le foglie. L'apparato fogliare può essere totalmente sommerso o adagiarsi in superficie con steli molto lunghi; in tal caso l'assorbimento delle sostanze nutritive e dei minerali disciolti in acqua avviene tramite la pagina inferiore delle foglie. In alcuni generi le radici hanno

essenzialmente funzioni di ancoraggio sul fondo o ad oggetti sommersi, rivestendo in tal modo un ruolo del tutto marginale nel nutrimento delle piante; in altri vi è invece un apparato radicale ben sviluppato che contribuisce in maniera rilevante all'alimentazione della rizofita. Anche il fiore può emergere dall'acqua o essere sommerso. Nel primo caso, al pari delle piante anfibe l'impollinazione è perciò di regola entomofila o anemofila, cioè affidata agli insetti o al vento e i frutti affondano in acqua dopo aver raggiunto la maturazione. Nel secondo caso l'impollinazione è idrofila e la fruttificazione si svolge sott'acqua.

Le **Anfite (An)** tipica degli ambienti marginali fluviali sono specie che presentano sia forme acquatiche sia forme terrestri, diverse morfologicamente, e in grado di colonizzare substrati soggetti a forti escursioni del livello della falda e quindi normalmente disseccati, almeno in superficie, durante il periodo estivo (*Alisma*, *Polygonum amphibium*, *Juncus* sp.pl.). Sono le macrofite che pur potendo vivere completamente immerse possono colonizzare substrati soggetti a periodica emersione; presentano spesso importante dimorfismo in funzione della profondità dell'acqua presente nel sito colonizzato.

Le macrofite sono in grado di influenzare le caratteristiche dell'ecosistema fluviale: oltre a collocarsi alla base delle catene alimentari, aumentano la complessità strutturale del corpo idrico, fungendo da habitat per numerose specie di macroinvertebrati e di fauna vertebrata, aumentando così la diversità biologica dell'ecosistema.

Partecipando alla ciclizzazione dei nutrienti, le macrofite ne controllano di fatto la disponibilità. Le macrofite che fanno parte della vegetazione riparia e d'alveo intercettano le acque di dilavamento provenienti dai versanti e inducono la sedimentazione del carico solido e degli inquinanti ad esso associato. Inoltre ospitano comunità di decompositori e di organismi denitrificanti nei pressi delle radici, i quali hanno un ruolo chiave nel processo di metabolizzazione.



**Fig 1.10:** Disposizione delle piante acquatiche lungo la sezione trasversale di un corso d'acqua (da Siligardi et al., 2000, modif).

**Legenda:**

E = elofita

RF = idrofito radicante flottante

RS = idrofito radicante sommersa

NR = idrofito non radicante

Considerando la sezione trasversale di un alveo fluviale (Fig.1.10), nella zona più profonda si rilevano le idrofite radicanti, con le flottanti presenti nelle zone a minor velocità di corrente, verso le sponde si osserva prima la fascia delle elofite, seguita dalla vegetazione di greto con specie pioniere annue (*Carex* sp. pl., *Lythrum salicaria*).

### 1.9.2 Il ruolo delle macrofite nel monitoraggio ambientale

Le macrofite sono impiegate nel monitoraggio delle acque interne; per monitoraggio ambientale si intende un processo di raccolta sistematica di dati qualitativi e quantitativi attraverso procedure standardizzate, in un periodo di tempo necessario a raccogliere i dati previsti.

Il monitoraggio dell'inquinamento ambientale mediante l'uso degli organismi viventi, il bio-monitoraggio, si basa sul principio che una sostanza tossica è rilevata negli organismi viventi a essa esposti e attivano una precisa risposta; essi sono chiamati bioindicatori. Un bioindicatore ottimale è quello per il quale è possibile stabilire una precisa correlazione tra le modificazioni biologiche (sintomi) e i livelli di un dato inquinante, tanto da permettere una analisi quantitativa oltre che qualitativa del tasso di inquinamento. Il bioindicatore è scelto in funzione alla risposta che è in grado di esprimere, con il tipo e la durata dell'alterazione ambientale che si intende rilevare. I bioindicatori registrano l'effetto dei numerosi inquinanti cui sono esposti nel corso del tempo, che determinano una modificazione, generalmente degenerativa, della qualità dell'ambiente.

Quindi, un parametro irrinunciabile è l'accertata sensibilità nei confronti dell'azione perturbatrice, chiaramente identificata rispetto a tutta una serie di stress ai quali l'indicatore è costantemente sottoposto; sensibilità che può esprimersi con un'ampia gamma di risposte: alterazione biochimica e fisiologica, disturbo dei bioritmi, modificazione anatomico-morfologica, variazione della composizione della biocenosi per la morte degli individui e delle specie sensibili.

Le macrofite sono ritenute ottimi bioindicatori in quanto sensibili ad alcuni tipi di inquinanti, come i biocidi, l'inquinamento organico, l'inquinamento da nutrienti, presentano una relativa facilità di identificazione, una mobilità limitata, che consente l'identificazione specifica per quel sito e infine una durata del ciclo vitale, annuale o pluriennale, che permette di esprimere un effetto cumulativo rispetto all'azione nel tempo dei vari fattori di stress.

L'utilizzo delle macrofite nel monitoraggio ambientale è richiesto da numerose norme europee e nazionali: Direttiva sul Trattamento delle acque di scarico urbane 91/271/EEC, Direttiva Nitrati 91/676/EEC) a livello dei vari Stati Membri, Direttiva Quadro sulle Acque, Direttiva 2000/60/CE, Regolamento REACH (CE) n. 1907/2006.

Tali normative comunitarie si inseriscono in un contesto avviato già dagli anni 90, quando la comunità internazionale sembrava essersi resa conto della necessità sempre più urgente di avviare una strategia globale per raggiungere un vero modello di sviluppo sostenibile, garantendo la salvaguardia dell'ambiente e contrastando lo sfruttamento generalizzato delle risorse ambientali che hanno innescato un grave processo di degradazione ambientale.

In particolare la Direttiva quadro sulle Acque, recepita a livello nazionale dal D Lgs. 152/06 "Norme in materia ambientale" e ss.mm.ii, istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di tutela quali-quantitativa delle acque per l'attuazione di una politica sostenibile a lungo termine di uso e di protezione per tutte le acque interne (superficiali e sotterranee), per le acque di transizione e per le acque marine costiere. Il D Lgs. 152/06 è conosciuto anche come testo unico ambientale (TUA).

Di fatto si obbliga il mantenimento o il raggiungimento dell'obiettivo di qualità ambientale corrispondente allo stato di "**buono**" per i corpi idrici significativi superficiali e sotterranei.

A tal fine si richiede alle autorità competenti di attuare programmi di monitoraggio per stabilire lo stato di qualità ambientale dei corpi idrici e valutare il raggiungimento o meno di un buono stato ambientale, adottando conseguentemente le azioni e le misure necessarie al raggiungimento dell'obiettivo posto.

Le attività di monitoraggio dei corpi idrici, che il D.Lgs. 152/06 pone in capo alle Regioni, rappresentano un efficace strumento per la conoscenza dello stato della risorsa idrica ed un valido supporto alla pianificazione territoriale ai fini del suo risanamento, permettendo di verificare nel tempo l'efficacia delle misure adottate per raggiungere gli obiettivi ambientali. Quale Ente tecnico di supporto all'azione della Regione, alle ARPA/APPA (Agenzie Regionali e Provinciali per la Protezione Ambientale) è affidato lo svolgimento delle attività di monitoraggio sullo stato della qualità ambientale dei corpi idrici. Tali output, insieme alle attività di controllo, costituiscono il patrimonio informativo, sullo stato e sugli impatti, determinati dalle pressioni e dai drivers al fine di predisporre le risposte, rappresentate da prescrizioni, leggi, piani e programmi, nonché interventi strutturali, quali strumenti di tutela della risorsa idrica, costituiti dai Piani di gestione di bacino distrettuale e dai Piani regionali di tutela delle acque .

La Direttiva Quadro sulle acque ha di fatto introdotto un approccio innovativo nella valutazione dello stato di qualità dei corpi idrici, integrando aspetti chimici e quelli biologici.

La classificazione infatti è effettuata sulla base della valutazione degli Elementi di Qualità Biologica (EQB), degli elementi fisicochimici, chimici (inquinanti specifici) e idromorfologici. Gli elementi di qualità biologica sono rappresentati da macroinvertebrati bentonici, diatomee, macrofite e fauna ittica.

Di fatto, la Direttiva Quadro sulle acque ha sancito il ruolo di bioindicatore ecosistemico della comunità delle macrofite, uno degli elementi di qualità biologica, necessario per valutare lo stato di qualità dei fiumi e dei laghi.

### **1.10 Influenza antropica nei corpi idrici**

Tutte le attività umane in genere producono impatti ambientali che, se non adeguatamente gestiti, compromettono lo stato naturale dell'ambiente, determinando un inquinamento.

L' inquinamento dell'acqua è uno dei problemi ecologici che desta maggiore preoccupazione, in quanto l'acqua è una risorsa indispensabile per la vita la cui disponibilità è sempre più ridotta.

Gli ambienti fluviali oltre che fornire acqua e cibo, assolvono al compito di autodepurazione del territorio, smaltendo i residui delle attività umane. Oggi, tuttavia, la crescente antropizzazione e l'intensificarsi dei processi di trasformazione della

materia hanno aumentato considerevolmente il carico e la qualità dei scarichi che giungono nei corsi d'acqua, compromettendone spesso gli stessi processi autodepurativi.

Gli scarichi possono essere classificati in scarichi civili (quelli delle città), agricoli, di allevamento, biodegradabili, quando l'acqua si riversa con o senza alcun trattamento di depurazione nei fiumi o nel mare; e scarichi industriali, riferibili a sostanze diverse che dipendono dalla produzione industriale, soprattutto non biodegradabili.

Gli scarichi industriali contengono una grande quantità di inquinanti e la loro composizione varia a secondo del tipo di processo produttivo. Il loro impatto sull'ambiente è complesso: spesso le sostanze tossiche contenute in questi scarichi rinforzano reciprocamente i propri effetti dannosi e quindi il danno complessivo risulta maggiore della somma dei singoli effetti.

Secondo il D. Lgs. 152/2006 per inquinamento si intende l'“*introduzione diretta o indiretta, a seguito di attività umana, di sostanze o di calore nell'aria, nell'acqua o nel terreno che possono nuocere alla salute umana o alla qualità degli ecosistemi acquatici o degli ecosistemi terrestri che dipendono direttamente da ecosistemi acquatici, perturbando, deturpando o deteriorando i valori ricreativi o altri legittimi usi dell'ambiente*” (art 74).

L'acqua che viene utilizzata dalle piante, dagli animali e dall'uomo arriva principalmente dai fiumi; se inquinati, anche la vita dell'uomo risulta compromessa. Il flusso stesso delle acque può trasportare lontano le contaminazioni che sorgono in una parte del fiume, mettendo in crisi in ogni caso altri ecosistemi spesso molto lontani, per esempio le coste e il mare.

### **1.10.1 I metalli pesanti**

Da un punto di vista chimico, il termine “metallo pesante” si riferisce a quegli elementi metallici che presentano densità superiore a  $5 \text{ g/cm}^3$  (Holleman and Wiberg, 1985). I circa 40 elementi che rientrano in questa categoria si comportano usualmente come cationi e sono caratterizzati da diversi stati di ossidazione (elementi metallici di transizione), da bassa solubilità dei loro ossidi, da grande attitudine a formare complessi e da grande affinità per i solfuri (Riffardi and Levi-Minzi, 1989). Sono solidi a temperatura ambiente, ad eccezione del mercurio, sono duttili, malleabili e buoni conduttori di elettricità e calore, sono detti pesanti proprio perché la loro densità supera i  $5 \text{ g/cm}^3$ .

I metalli pesanti entrano facilmente nella catena alimentare essendo largamente distribuiti nell'ambiente in seguito a processi naturali (eruzioni vulcaniche, erosione delle rocce ecc.); attività minerarie; processi di combustione (centrali termoelettriche, inceneritori, traffico automobilistico, impianti di riscaldamento); attività industriali (industria metallurgica, industria chimica); abrasione di materiali (manufatti di metallo, pneumatici, vernici ecc.); attività agricole (uso di composti del rame, dello stagno ecc.).

I processi che avvengono ad alta temperatura immettono nell'atmosfera metalli in fase gassosa o sottoforma di particolato. I metalli immessi nell'atmosfera (principalmente As, Cd, Cu, Hg, Pb, Sn e Zn), prima di essere depositati al suolo e in mare, sono trasportati dai venti in funzione della loro forma fisico-chimica. La maggior parte del particolato più grossolano è depositato in una fascia di 10 Km dalla fonte di emissione. Per i metalli in fase gassosa, la deposizione può avvenire a distanze molto superiori, fino a 10.000 Km dalle fonti di emissione. I metalli in traccia immessi nell'ambiente, depositati sulla terra, nelle acque e nei sedimenti, sono soggetti a cicli geochimici globali che ne determinano una continua circolazione tra i vari comparti ambientali (Zenk, 1996).

Sono considerati sostanze inquinanti altamente pericolose perchè non possono essere degradati, diventano pertanto rischiose per la salute dell'uomo e per la sopravvivenza di numerose specie viventi.

I metalli pesanti (giunti al suolo direttamente con le particelle aerotrasportate e depositate in forma umida o secca, oppure indirettamente, tramite le acque meteoriche che dilavano gli inquinanti depositati sulla vegetazione) possono subire diversi processi quali adsorbimento, complessazione e precipitazione in funzione delle caratteristiche chimico-fisiche del suolo (Aromolo et al., 1999). L'analisi di diverse specie vegetali sia terrestri che acquatiche ha mostrato che esse bioaccumulano efficacemente metalli pesanti, in condizioni di inquinamento. È da precisare che alcuni metalli pesanti come piombo (Pb) e il cadmio (Cd), non sono essenziali per il metabolismo delle specie vegetali e pertanto determinano fenomeni di tossicità anche a bassissima concentrazione intracellulare. Altri elementi pesanti quali il rame (Cu) e lo zinco (Zn) sono micronutrienti essenziali per il metabolismo (ad esempio come attivatori o regolatori enzimatici) e sono pertanto tollerati a livelli bassi; tuttavia il loro apporto eccessivo risulta estremamente tossico (Siedlecka, 1995; Bargagli, 1998a), riducendo la crescita della pianta e danneggiando lo stesso metabolismo.

La concentrazione dei metalli nei tessuti vegetali riflette la loro disponibilità ambientale. Molte piante, tra cui briofite, alghe e piante superiori, hanno evoluto la

capacità di accumulare elementi in traccia a livelli superiori di quelli presenti nel suolo o nelle acque o anche rispetto a specie che crescono nella stessa area; essi possono biomagnificarsi nella catena trofica ed avere effetti drammatici sul metabolismo degli organismi acquatici (Canesi *et al.*, 1999).

### **1.11 I meccanismi di accumulo dei metalli pesanti nelle piante**

Il meccanismo di accumulo dei metalli pesanti nelle piante può essere suddiviso in tre fasi essenziali: assorbimento a livello radicale, trasporto dei metalli all'interno della pianta, meccanismi di detossificazione (Salt *et al.*, 1995a).

Spesso la maggior parte dei metalli nel suolo è legata ai suoi costituenti, per cui, affinché le piante possano accumularli, è necessario che questi elementi vengano resi solubili. I metalli possono trovarsi in diverse forme chimiche, quali ioni semplici e complessati in soluzione, ioni scambiabili legati alla sostanza organica, ioni precipitati od occlusi con ossidi a basso ordine cristallino o carbonati, o ancora, come ioni inclusi nei reticoli cristallini dei minerali primari; nelle prime tre forme chimiche sono considerati i più disponibili per la nutrizione vegetale.

La mobilitazione dei metalli legati al suolo può avvenire in diverso modo: molte piante rilasciano, attraverso le radici, delle specifiche molecole (fitosiderofori) che hanno la capacità di chelare e solubilizzare i metalli pesanti (come l'acido avenico delle graminacee). Altre piante sono in grado di ridurre e conseguentemente mobilizzare gli ioni metallici, grazie all'intervento di specifici riducenti metallici legati alla membrana plasmatica delle cellule radicali.

Un'ulteriore modalità di solubilizzazione dei metalli pesanti può essere dovuta all'acidificazione del terreno grazie al rilascio di protoni dalle radici: un basso pH rilascia in soluzione gli ioni metallici. Altri fattori ambientali che influenzano l'assimilazione dei metalli presenti nel terreno sono l'attività biologica, la quantità e la qualità della sostanza organica, la quantità e il tipo di argilla, la capacità di scambio cationico (Logan e Chaney, 1983; Forstner, 1995; Krebs *et al.*, 1998) e le basse temperature.

Una volta solubilizzati, questi ioni possono entrare nelle radici o per via apoplastica (extracellulare) o per via simplastica (intracellulare); molti metalli entrano nelle cellule vegetali grazie ad un trasporto attivo mediato da carriers o canali specifici. Dalle radici gli ioni metallici possono passare al germoglio mediante i vasi xilematici e, successivamente, essere distribuiti al resto della pianta per mezzo del floema. Per

poter giungere allo xilema tali ioni devono necessariamente attraversare l'endoderme che grazie alla banda del Caspary consente il trasporto simplastico, essendo la via apoplastica bloccata. Le piante che accumulano metalli pesanti resistono ai loro effetti tossici; ciò si realizza o limitando l'assorbimento dei metalli a livello cellulare o detossificando il metallo entrato oppure sviluppando un meccanismo biochimico che sia in grado di renderle resistenti.

### **1.12 I meccanismi di metallo-tolleranza nelle piante**

In condizioni di stress, in presenza degli stessi elementi e nelle stesse condizioni ambientali, le piante possono mostrare tre differenti tipi di comportamento, per cui possono essere classificate in:

- 1) “*excluders*”, piante che hanno sviluppato il meccanismo di “avoidance” (controllo dello stress), che consiste nel prevenire l'assorbimento e la traslocazione degli ioni metallici;
- 2) “*indicators*”, che assorbono ed accumulano metalli tramite meccanismi come la chelazione, localizzazione ed inattivazione chimica, che ne riducono l'effetto tossico; esse sono utili per il biomonitoraggio in quanto la concentrazione dei metalli nei tessuti riflette la loro disponibilità ambientale;
- 3) “*accumulators*”, che tollerano e possono accumulare elevate concentrazioni di metalli nei propri tessuti, spesso indipendentemente dal significato fisiologico o dal livello ambientale di tali metalli (Bargagli, 1998b).

La risposta delle piante allo stress causato dalla tossicità dei metalli risulta molto diversificata, dipendendo, in parte, anche dalla variabilità individuale. I meccanismi di resistenza delle piante alla tossicità dei metalli, dunque, sono riconducibili a due tipi essenziali di strategia che consistono nel tollerare (*indicators* e *accumulators*) o nell'evitare lo stress (*excluders*), (Marchionni, 1999).

Il concetto di metallo-esclusione ed i meccanismi di protezione contro l'assorbimento e la traslocazione dei metalli non sono ancora ben chiari; si ritiene che la maggior parte delle piante “*excluders*” prevenga l'assorbimento e la traslocazione degli inquinanti presenti nel suolo immobilizzandoli nella membrana plasmatica delle radici o nelle micorrize. Tali piante riescono, così, a mantenere piuttosto costante la composizione elementare dei loro tessuti interni ed a prevenire eventuali effetti tossici degli inquinanti. (Bargagli, 1998a; Arduini et al., 1996). La relazione

simbolica stabilità con i funghi micorrizici rappresenta un valido meccanismo di difesa di tali specie (Marchionni, 1999).

Nelle piante “tolleranti”, sono stati sviluppati, a livello cellulare, diversi meccanismi di metallo-resistenza, tra cui il sequestro a livello della parete cellulare, la presenza di membrane metallo tolleranti e di pompe che trasportano attivamente i metalli all'esterno della cellula, la detossificazione enzimatica, fosfatasi acida, la compartimentalizzazione, la riduzione della sensibilità dei target cellulari degli ioni metallici (Bruins, 2000).

La protezione della pianta contro gli effetti tossici dei metalli è assicurata, in primo luogo, dal controllo dell'assorbimento radicale e del trasporto a lunga distanza dei metalli (Briat and Lebrun, 1999). Le radici agiscono come una barriera che limita la traslocazione dei metalli verso il germoglio; la sua capacità di accumulo, tuttavia, varia a seconda della specie. Per esempio, rispetto al cadmio le piante di pomodoro risultano più tolleranti delle piante di fagiolo, in quanto il loro sistema radicale è più efficiente nell'accumulare il cadmio (Leita et al., 1991; Chung et al., 1992; Obata and Umebayashi, 1993; Salt et al., 1995b); in tal modo, nel sistema radicale si accumula la maggior quantità di metalli, mentre fusto, foglie, frutti e semi ne contengono quantità progressivamente minori. Tuttavia, l'assorbimento di metalli attraverso le foglie può diventare notevole nel caso di inquinanti atmosferici che le raggiungono direttamente attraverso le deposizioni atmosferiche (Bargagli, 1998a).

Una delle ragioni dell'elevata metallo-tolleranza di alcune specie è data dalla capacità di accumulare metalli, soprattutto a livello cellulare, senza permettere ai metalli di penetrare all'interno del protoplasto, che è maggiormente sensibile all'azione tossica dei metalli. Le cellule radicali a diretto contatto con le soluzioni circolanti nel suolo, sono esposte agli ioni tossici che possono danneggiare la membrana cellulare causando la perdita di potassio dalla cellula, o l'inibizione dell'attività degli enzimi superficiali (Carballeira et al., 1999). In questo caso, un efficiente meccanismo di resistenza contro i metalli ad attività redox è rappresentato da modificazioni strutturali nella membrana plasmatica tali da renderla meno vulnerabile alla perdita di nutrienti o all'inibizione enzimatica (Wainwright and Woolhouse, 1975). A livello intracellulare, le piante metallo tolleranti possono adottare varie strategie per limitare l'azione tossica di quei metalli che, superando l'ostacolo della parete e della membrana cellulare, riescono a penetrare all'interno della cellula. La metallodetossificazione all'interno delle cellule si può realizzare anche attraverso il legame con specifici ligandi organici, in questo modo si ha la formazione di complessi metallici non dannosi per la cellula. Ad esempio, sia nelle specie sensibili,

sia in quelle metallo-tolleranti, il maggior apporto di alcuni metalli, il cadmio in particolare, può indurre la produzione di peptidi metallo-chelanti, generalmente definiti fitochelatine (PC). Molti ricercatori hanno ipotizzato che le PCs sono direttamente coinvolte nel controllo omeostatico degli ioni metallici all'interno della cellula vegetale. Le fitochelatine sono peptidi la cui massa molecolare si aggira intorno ai 2-3 KDa, costituiti da cisteina, acido glutammico, glicina o alanina. La loro sintesi è indotta nel momento in cui la pianta è esposta all'azione dei metalli pesanti. Tale induzione non si esercita a livello genetico come nel caso delle metallotioneine, ma a livello metabolico: gli ioni dei metalli pesanti attivano l'enzima PC-sintetasi, promuovendo un processo di polimerizzazione che porta alla formazione di molecole di PC che possono comprendere da 2 a 11 unità glutamilmcisteiniche (Zenk, 1996).

Nel momento in cui la pianta si trova a contatto con i metalli pesanti, le fitochelatine, che legano il metallo, si accumulano nel vacuolo (che inizia a svolgere anche una funzione di difesa), rimuovendoli dal citoplasma (Alpi et al., 2000).

Un ulteriore meccanismo di metallo-resistenza è rappresentato dall'accumulo preferenziale dei metalli in organi senescenti, per esempio le foglie, in modo che, con l'abscissione di tali organi, si ottenga anche la rimozione dell'eccesso di metalli dalla pianta (Bargagli, 1998a).

La metallo-tolleranza può essere una proprietà costitutiva (determinata geneticamente), indotta (in seguito all'esposizione preventiva a metalli pesanti), oppure di natura mista, in quanto risulta determinata geneticamente, ma il suo grado di espressione dipende dalle condizioni ambientali. La metallo-tolleranza costitutiva è stabile e non influenzabile dalle condizioni ambientali, mentre la metallo-tolleranza indotta, essendo una forma di acclimatazione all'ambiente (Okland et al., 1997), persiste finché sussistono gli specifici fattori di stress che ne hanno determinato l'insorgenza (Shaw, 1990; Godbolb and Kettner, 1991; Subhadra and Panda, 1994; Rout et al., 2000).

### **1.13 Effetti tossici dei metalli sulle piante**

Ad alta concentrazione intracellulare sia i metalli essenziali, sia quelli non essenziali risultano tossici per gli organismi viventi, in quanto possono danneggiare la membrana cellulare, alterare la specificità enzimatica, disorganizzare le funzioni cellulari e danneggiare la struttura del DNA con effetti genotossici per la cellula.

Gli effetti tossici dei metalli insorgono a causa delle interazioni che essi stabiliscono con componenti cellulari essenziali tramite legami ionici e/o covalenti, con conseguente alterazione delle attività metaboliche cellulari (Bruins et al., 2000). Studi condotti in laboratorio su numerose specie vegetali esposte in vitro ai metalli hanno evidenziato che questi elementi colpiscono molti processi essenziali per la vita della cellula vegetale.

In particolare, i metalli possono determinare:

- Inibizione della crescita radicale: lo sviluppo delle radici è molto sensibile all'azione dei metalli e, per tale ragione, la riduzione della crescita radicale è spesso usata come parametro per stimare la tossicità dei metalli (Arduini et al., 1996; Bargagli, 1998a; Goldbold and Kettner, 1991; Sorrentino et al., 1997; Vàsquez et al., 1987; Wierzbicka, 1988). E' stato dimostrato che i metalli pesanti influenzano lo sviluppo radicale danneggiando l'integrità della membrana cellulare delle cellule meristematiche (Arduini et al., 1996).
- Riduzione della crescita del germoglio: la riduzione della crescita del germoglio rappresenta, nella maggior parte dei casi, una conseguenza secondaria degli effetti tossici causati direttamente dai metalli. Essa può essere conseguenza di danni a livello radicale, di un ridotto apporto di elementi nutritivi ed acqua a causa della compartimentazione tra essi ed i metalli per l'assorbimento e la traslocazione (Moral et al., 1994; Ouzounidou, 1994; Siedlecka, 1995). La riduzione dello sviluppo del germoglio può essere addebitata anche alla inibizione da parte dei metalli della sintesi e/o traslocazione delle citochine.
- Diminuzione dell'attività fotosintetica: in alcune specie, il trattamento con metalli pesanti determina un rallentamento nel trasferimento degli elettroni a livello del PSII (Ouzounidou, 1994).
- Diminuzione del contenuto di clorofilla: diversi metalli come rame o mercurio hanno elevata affinità per i gruppi sulfidrilici e possono causare l'inibizione della biosintesi della clorofilla (Brune et al., 1995; Bargagli, 1998a).
- Riduzione dell'apporto e della traslocazione di elementi nutritivi ed acqua: l'assorbimento e la traslocazione dei metalli tossici all'interno delle piante risulta spesso in competizione con quella degli elementi chimici essenziali, per cui si determina una notevole alterazione della nutrizione minerale delle piante (Ouzounidou, 1994; Moral et al., 1994; Siedlecka, 1995).
- Alterazione degli organelli cellulari e della parete: in *Chara vulgaris* (alga verde macrofita), l'esposizione in vitro a piombo (in forma organica ed inorganica), cadmio e mercurio provoca diverse conseguenze a livello cellulare, tra cui la disorganizzazione delle microfibrille di parete con la formazione di protuberanze), la dilatazione del RER e l'incremento dei grana plastidiali

(mercurio), nonché l'alterazione del sistema di membrane tilacoidali (piombo organico), (Heumann, 1987). I danni ultrastrutturali prodotti da metalli pesanti spesso inducono una prematura senescenza degli organi colpiti (Ouzounidou et al., 1997).

- Modificazione delle funzioni della membrana plasmatica: gli elementi metallici che hanno elevata affinità per i gruppi carbossilici e sulfidrilici possono indurre un decremento dell'attività dell'ATPasi plasmatica che funge da pompa protonica e che, quindi, è coinvolta nel mantenimento del potenziale di membrana (Bargagli, 1998a).
- Effetti genotossici come alterazione della mitosi, effetti clastogenesi: i metalli di transizione sono genotossici in quanto sono capaci di legarsi al nucleo cellulare causando danni promutagenici, che includono modificazione delle basi azotate del DNA, rottura della doppia elica del DNA, riarrangiamenti e depurinazione. Questi danni sono conseguenza dell'azione ossidante sul DNA esercitata dall'ossigeno attivo ed altri radicali liberi prodotti in reazioni redox catalizzate dai metalli (Kasprzak, 1995).
- Formazione di radicali liberi: diversi componenti cellulari possono essere danneggiati dai radicali liberi ad azione antiossidante, che si originano in reazioni redox catalizzate da metalli (Hiramoto et al., 1996; Fry, 1998). Le cellule vegetali sono dotate di specifici meccanismi per la rimozione dei radicali liberi che coinvolgono sistemi antiossidanti enzimatici.

In presenza di concentrazioni elevate di metalli pesanti, è stata inoltre dimostrata una overespressione delle Heat Shock Proteine (HSP) nei diversi compartimenti della cellula vegetale.

### **1.14 Le Heat Shock Protein (HSP)**

Le Heat Shock Proteins (HSP) sono proteine espresse costitutivamente nelle cellule eucariotiche e procariotiche, sono localizzate in quasi tutti i compartimenti della cellula: nel citoplasma, nel nucleo, nei mitocondri, nei cloroplasti e nel reticolo endoplasmatico (RE).

Le HSP sono classificate in funzione del peso molecolare in cinque sottofamiglie:

1. HSP100;
2. HSP90;
3. HSP70;

4. HSP60;
5. Small heat shock proteins (sHSP).

Le HSP100 sono chaperoni deputati al controllo degli aggregati proteici derivati da misfolding dei polipetidi, quindi sono impegnati nell'unfolding e disaggregazione di tali complessi.

Le HSP90 non assistono il folding proteico, al contrario assistono le proteine quando si trovano allo stato nativo o seminativo.

Le HSP70 aiutano il ripiegamento di proteine neo-sintetizzate, hanno una funzione di trasporto delle proteine attraverso la membrana, aiutano nel refolding delle proteine misfoldate ed infine operano un controllo dell'attività di altre proteine.

Le chaperonine invece appartengono alla classe denominata HSP60 e sono omologhi al sistema GroEL/GroES di E.coli e dei batteri. Queste chaperonine sono divise in due gruppi; il gruppo che si trova in cloroplasti, mitocondri e batteri, ovvero quelli di origine procariotica e il gruppo CCT, che si trova negli Archaea e nel citosol degli eucarioti. La loro funzione è di assistere il folding e refoldig delle proteine.

Le Small heat shock proteins (sHSPs) presentano un peso molecolare inferiore rispetto alle restanti classi, e sono la prima linea d'intervento nel folding proteico, sorvegliando le proteine neosintetizzate dal ribosoma.

Le HSP non si legano in modo covalente ai loro target e non fanno parte del prodotto finale dei processi in cui intervengono. Esse sono direttamente coinvolte nella biosintesi di proteine dalla fase di sintesi come catena nascente fino all'assemblaggio di complessi multimerici (Georgopoulos e Welch, 1993). Le Heat Shock Proteins sono responsabili del folding, dell'assemblaggio, della traslocazione e della degradazione delle proteine presenti nelle cellule. Inoltre le HSP stabilizzano le proteine di membrana, intervengono nell'omeostasi cellulare, assistono al refolding delle proteine in condizioni di stress.

Per tali funzioni, le HSP sono necessarie sia nel meccanismo fisiologico e basale in una cellula e sia indotte in situazioni di stress (Fig. 1.11).

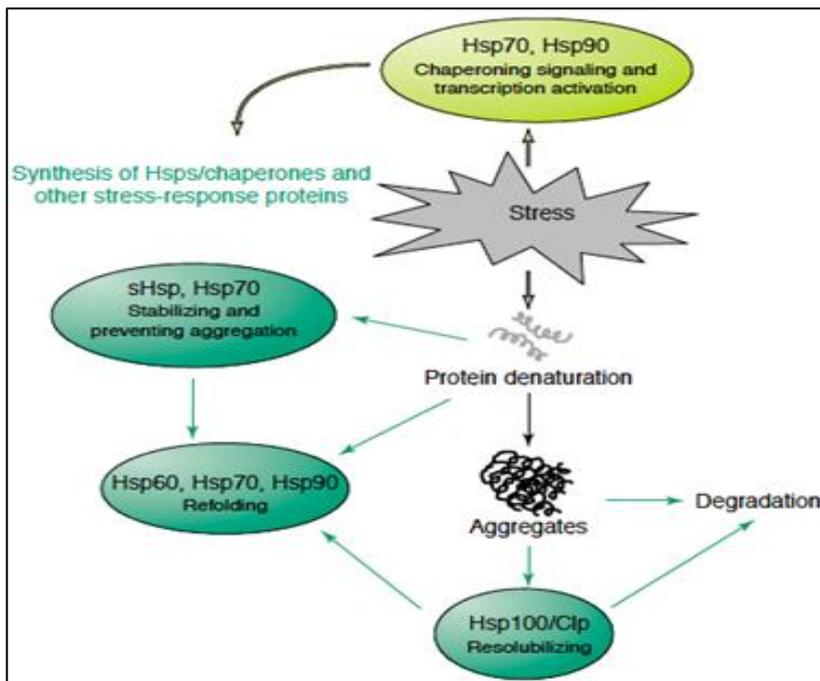


Fig 1.11: Classi Heat Shock Protein e loro ruoli.

Le HSP vengono overespresso quando le cellule sono esposte ad elevate temperature oppure ad una varietà di stimoli stressanti la cellula stessa, quali un danno ossidativo, deficienze nutrizionali, contaminazioni da metalli e infezioni virali e batteriche (Lindquist, 1980; Fayet et al., 1989; Lindquist e Craig, 1988; Pelham, 1988; Vierling, 1991; Lewis et al., 1999).

In seguito a trattamenti con diverse concentrazioni di metalli (Wollgiehn e Neumann, 1999), tali proteine sono state ritrovate nel nucleo, nel citoplasma e nella membrana plasmatica; ciò suggerisce un loro coinvolgimento nella protezione della membrana cellulare dai danni causati dal metallo (Neumann et al., 1994).

### 1.14.1 Le HSP70

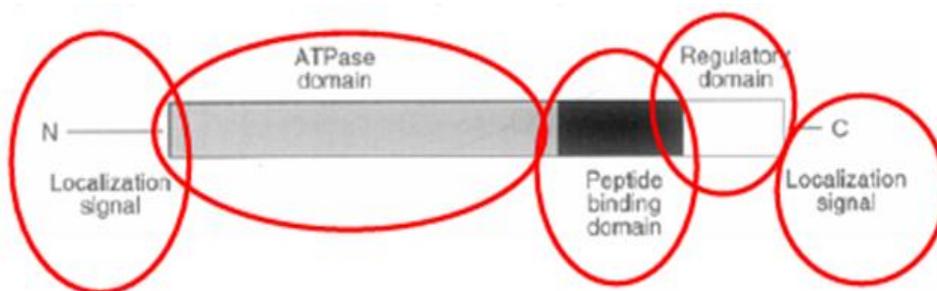
Le HSP70 rappresentano la classe di chaperoni molecolari più numerosa e studiata nelle cellule; è presente un livello basale e sotto stress la loro concentrazione aumenta nella cellula.

Le principali funzioni delle HSP70 sono: assistere il folding delle proteine non native in condizioni normali e in condizioni di stress; intervenire nell'importare e traslocare le proteine in vari processi; facilitare la degradazione proteolitica di proteine non stabili presentandole ai proteosomi e ai lisosomi.

Le HSP70 sono considerate gli chaperoni maggiormente conservati, si è visto che circa il 50% di residui risultano essere identici tra l'omologo DnaK di *E. coli*, e le HSP70 dei mammiferi. Il loro peso varia dai 68 ai 73 kDa e per poter funzionare correttamente hanno bisogno di co-chaperoni (HSP40).

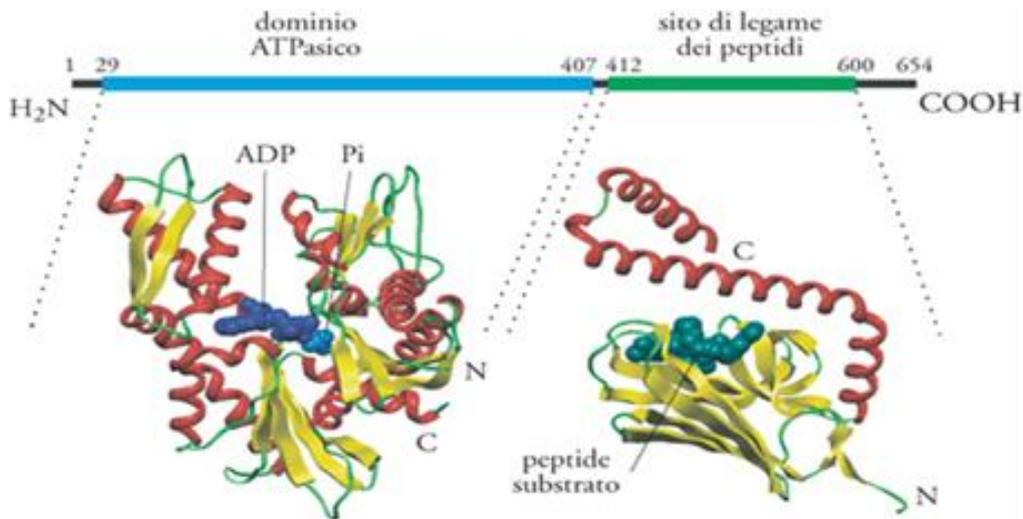
Le HSP70 consistono di:

- Un dominio N-terminale, altamente conservato di circa 44-45 aa, nel quale è presente il dominio ATP-asi, in cui grazie all'energia generata acquisisce la capacità di ripiegare le proteine, ed il primo dominio di localizzazione.
- Un segnale binding protein che lega le proteine target (EEVD).
- Un dominio di regolazione che ne permette il legame con il co-chaperone HSP40.
- Un dominio C-terminale (25 kDa), invece, a cui si legano i polipeptidi ed un secondo dominio di localizzazione (Fig. 1.12).

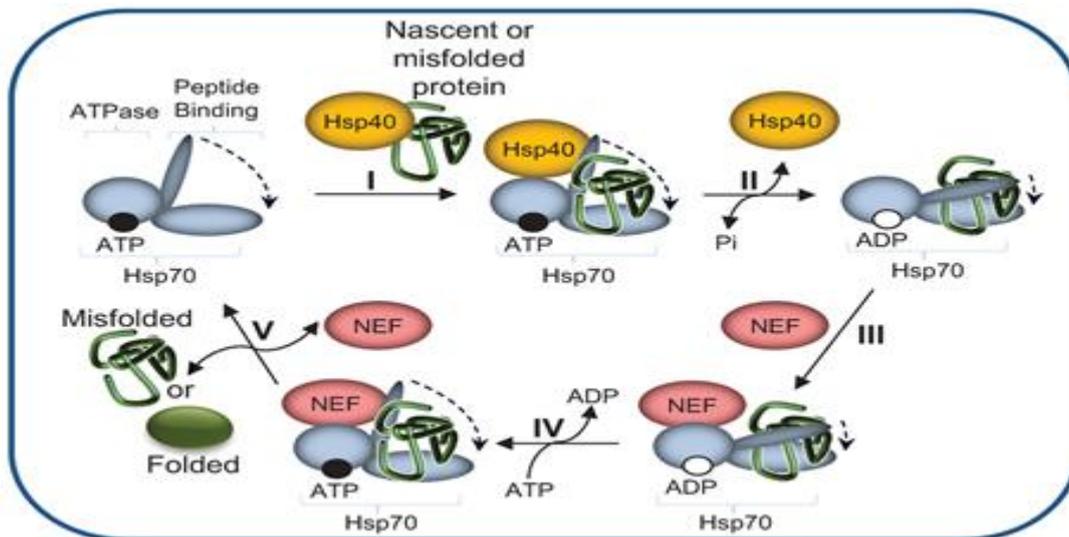


**Fig 1.12:** Struttura HSP70

Per quanto riguarda il loro meccanismo di funzionamento, è possibile dire che una proteina appena sintetizzata interagisce dapprima con il co-chaperone HSP40 e dopodichè con l'HSP70 legata all'ATP. Questa interazione stimola l'attività ATPasica producendo ADP; in questa conformazione l'HSP70 determina il corretto folding della proteina o comunque fa in modo che la proteina assumi una conformazione funzionale. Avvenuto ciò, l'azione di un fattore di scambio determina il rilascio di ADP, il legame con una nuova molecola di ATP e il conseguente rilascio della proteina correttamente ripiegata che può continuare il suo percorso (Fig. 1.13a e 1.13b).



**Fig 1.13a:** Heat Shock Protein 70



**Fig1.13b:** Hsp70 Cycle

## 2 SCOPO

L'obiettivo della presente ricerca è stato quello di misurare i livelli di inquinamento da metalli pesanti nelle acque superficiali e nei sedimenti fluviali lungo un corso d'acqua della regione Campania, interessato da un processo di inquinamento industriale, e gli effetti di tale inquinamento su macrofite acquatiche.

In particolare, saranno osservati i danni ultrastrutturali in macrofite acquatiche prelevate lungo l'asta fluviale a monte e a valle di un impianto industriale ad impatto antropico e verranno possibilmente messi in relazione con la presenza ed eventuale variazione delle Heat Shock Protein 70 (HSP70).

In seguito ad una attenta analisi dei corpi idrici che caratterizzano il territorio campano, è stato individuato il Fiume Irno, provincia di Salerno, oggetto di sversamenti di scarichi industriali inquinanti, in un contesto territoriale che nel tempo ha subito forti antropizzazioni.

Il valore ridotto dei suoli, la possibilità di disporre delle acque del fiume anche per allontanare con rapidità i propri reflui e la presenza dei collegamenti con Salerno e l'entroterra, ha facilitato l'allocazione nella fascia valliva, e proprio in prossimità del fiume, di una serie di installazioni industriali, spesso piccole e talvolta di grandi dimensioni, insieme a strutture abitative insediate nelle vicinanze.

Tra le macrofite presenti lungo il fiume, sono stati osservati il *Nasturtium officinale*, la *Veronica beccabunga* e l'*Apium nodiflorum*, e verificate le risposte biochimiche e microscopiche all'inquinamento da piombo (Pb), rame (Cu) e cadmio (Cd) nelle stesse, nelle acque superficiali e nei sedimenti fluviali.

Gli effetti sulla vegetazione saranno discussi al fine di definire i danni subiti in seguito all'accumulo di metalli pesanti, e verificare le conseguenze di tale inquinamento sull'ecosistema fluviale.

### 3 IL FIUME IRNO

Il Fiume Irno nasce alle pendici del Monte Stella e percorre 11 km prima di sfociare nel mar Tirreno, nel Golfo di Salerno, dopo aver attraversato i territori comunali di Baronissi, Pellezzano e Salerno, con andamento nord-sud (Fig 3.1).



Fig 3.1: Inquadramento territoriale del fiume Irno.

Il suo bacino idrografico ricade nel distretto idrografico dell'Appennino meridionale, secondo la ripartizione del territorio nazionale in distretti idrografici, come previsto dall'art.64 del D. Lgs. 3 aprile 2006 n.152, che appunto suddivide il territorio italiano in otto distretti idrografici e ne elenca i bacini ad essi afferenti (Fig 3.2).

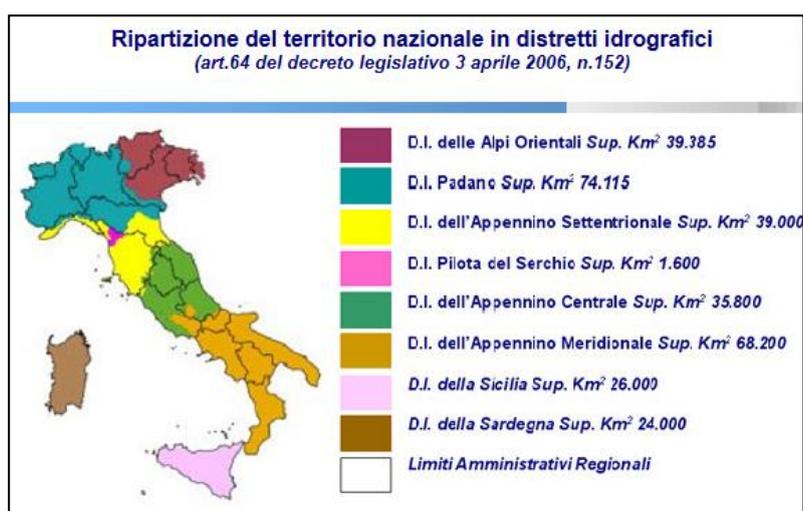


Fig 3.2: Ripartizione del territorio nazionale in distretti idrografici tratta dal sito del distretto idrografico dell'Appennino meridionale.



Il suo bacino idrografico presenta una morfologia articolata che rispecchia la variabilità dei litotipi affioranti e la complessità dell'evoluzione tettonica e geomorfologica dell'area.

In particolare nel territorio appartenente ai comuni di Baronissi e Pellezzano si registra una elevata escursione altimetrica (da 200 m s.l.m. fino a circa 1.000 m s.l.m.) e un'energia del rilievo molto variabile. Si passa, infatti, da superfici quasi orizzontali nei fondo valle a pendii che raggiungono i 35° di inclinazione; localmente si incontrano tratti di pareti con pendenze superiori a 50°, fino a sub-verticali. Inoltre, soprattutto nella parte a monte della frazione di Fratte, la struttura carbonatica spesso ricoperta da coltri di piroclastiti, ha favorito significativi fenomeni di erosione areale e di frane, con prevalenza di colate detritiche, in corrispondenza degli affioramenti del substrato litoide e di colate rapide di fango in presenza di coperture piroclastiche (Autorità di Bacino regionale Campania sud, Piano Stralcio Assetto Idrogeologico, 2011).

Il suo bacino idrografico (Fog 3.4) è di forma leggermente asimmetrica, è esteso per circa 49 kmq ed è contornato, a oriente e ad occidente, da una serie di rilievi (a est e a nord-est i monti Mai del gruppo dei Picentini, a ovest e sud-ovest i monti Diecimari e l'ultima propaggine settentrionale dei monti Lattari) diffusamente calcarei ma non privi di sedimentazioni conglomeratiche, piroclastiche (banchi di tufo grigio) e argillose, con vette che superano i 600 m s.l.m., culminanti nel Monte Stella, che raggiunge i 1131 m. s. m..



**Fig 3.4:** Reticolo e bacino idrografico del fiume Irno, tratto da Carta dei bacini idrografici, PAI Regione Campania, marzo 2011 (I\_BI\_3408), rielaborato.

La geometria della vallata dell' Irno è strettamente legata alla tettonica che l'ha generata, alle rocce carbonatiche che ne costituiscono il substrato profondo e allo stesso strato di depositi detritici e piroclastici che la ricoprono. Lo strato sedimentario è in genere molto permeabile ed i calcari dolomitici fortemente litoclasati per cui il reticolo idrografico del bacino è scarsamente gerarchizzato, assumendo differente connotazione in relazione ai litotipi affioranti e alle discontinuità strutturali presenti. Conseguentemente la rete drenante superficiale è caratterizzata da una configurazione geometrica piuttosto semplice, con aste drenanti sub-rettilinee, a decorso breve e ripido, confluenti nella medio-alta valle dell' Irno.

Il Fiume Irno è stato interessato da diversi fenomeni alluvionali e, nell'autunno del 1996, straripò e danneggiò gravemente una parte delle fabbriche che successivamente furono abbattute e ricostruite. Per tale motivo il corso del fiume Irno è stato oggetto, negli anni 2004/2005, di un vasto

programma di opere di sistemazione idrogeologica ed interventi di ingegneria naturalistica al fine della riqualificazione ambientale: risultato di tali lavori è stata la realizzazione, nella zona a monte di Fratte, di diversi specchi lacuali disposti a grappolo con funzione di bacini di espansione fluviale. Gli interventi hanno anche previsto una sistemazione di tipo naturalistico con la piantumazione di vegetazione igrofila (salici, pioppi) e la creazione di una rete di sentieri attrezzati per favorire la fruizione pubblica delle sponde del fiume; inoltre, sono state rifatte le sponde in cemento della parte di fiume che attraversa la città di Salerno, già sistemate negli anni cinquanta. Tutto ciò ha modificato l'alveo, l'assetto delle aree perifluviali e, quindi, le modalità di diffusione delle piene, cambiandone completamente il comportamento idraulico.

### **3.2 Il Fiume Irno – origine del nome e cenni storici**

Secondo alcuni studiosi in origine il nome del fiume era Irnthi, infatti sono state rinvenute in Campania omonime monete bronzee, pensando che essa corrisponda al centro etrusco-campano rinvenuto a Fratte di Salerno lungo il corso dell'Irno.

Altri, invece, sostengono che l'Irno una volta si chiamasse Leirionos (fiume dei gigli) e che, per successive modifiche, fosse divenuto Lirino, Lirno e, quindi, Irno.

Pare che da questo nome sarebbe derivato all'epoca dei romani il nome di Salerno, cioè Salernum (da salum e Irnum, ossia "il luogo situato tra il mare e l'Irno").

#### La valle dell'Irno e il suo sviluppo territoriale nei secoli: dall'arte della lana all'impianto degli opifici svizzeri.

L'area in questione (popolata dalla più remota antichità) ha conosciuto sin dall'alto Medioevo lo sviluppo di attività manifatturiere e mercantili, grazie a una posizione geografica favorevole per i collegamenti nord-sud e ovest-est (è infatti «l'unica valle trasversale dell'Appennino campano tra il mare di Salerno e il retroterra irpino e sannitico).

In particolare, la lavorazione e il commercio della lana (sostenuti da angioini e aragonesi) svolgevano un importante ruolo per l'economia locale, costituendo, pur con tutti i limiti derivanti da un'ossatura primitiva d'impresa di fabbrica familiare e dall'assenza di una mentalità imprenditoriale, il presupposto per la straordinaria evoluzione del territorio vallivo durante il XIX secolo.

Il punto di svolta, a riguardo, fu costituito dall'arrivo di alcuni imprenditori elvetici che, con nuove modalità organizzative e produttive, avviarono la nascita, il consolidamento e lo sviluppo della grande impresa tessile della valle dell'Irno, divenuta importante per l'intero Mezzogiorno d'Italia.

Dopo il Blocco Continentale napoleonico, la crisi delle importazioni europee di cotone americano spinse alcuni imprenditori svizzeri a trasferirsi nel Regno di Napoli (governato dai francesi dal 1806 al 1815). Tra questi Davide Vonwiller che, dopo uno dei suoi periodici soggiorni a Salerno (in occasione dello svolgimento della celebre fiera), decise di installare una filanda nella valle dell'Irno. In quei tempi risalgono i primi interventi antropici volti a modificare l'asta fluviale.

Il fiume, alimentato da ricche sorgenti e copiosi affluenti, conteneva sempre una certa quantità d'acqua, anche durante i periodi di siccità, mentre la valle offriva manodopera abile, disponibile e poco costosa.

Si era notato infatti che l'Irno assicurava un flusso di acqua anche nelle estati più siccitose, quindi se ne poteva sfruttare senza problemi la forza motrice per azionare le macchine. Grazie a questa floridezza industriale paragonabile solo all'Inghilterra, talvolta Salerno era denominata "la Manchester delle Due Sicilie".

Il progetto fu attuato nel 1824 (in società con Federico Zueblin e i fratelli napoletani Martino e Raffaele Cilento), dopo l'adozione in tutto il Regno delle Due Sicilie di una tariffa doganale volta a proteggere la produzione industriale interna. La neo-ditta così costituita, nel corso degli anni, si ampliò – Schlaepfer Wenner & C. (1835); Vonwiller & Aselmeyer (1867) – fino a divenire Aselmeyer Pfister & C. (1883), una delle più prestigiose rappresentanti dell'industria cotoniera italiana.

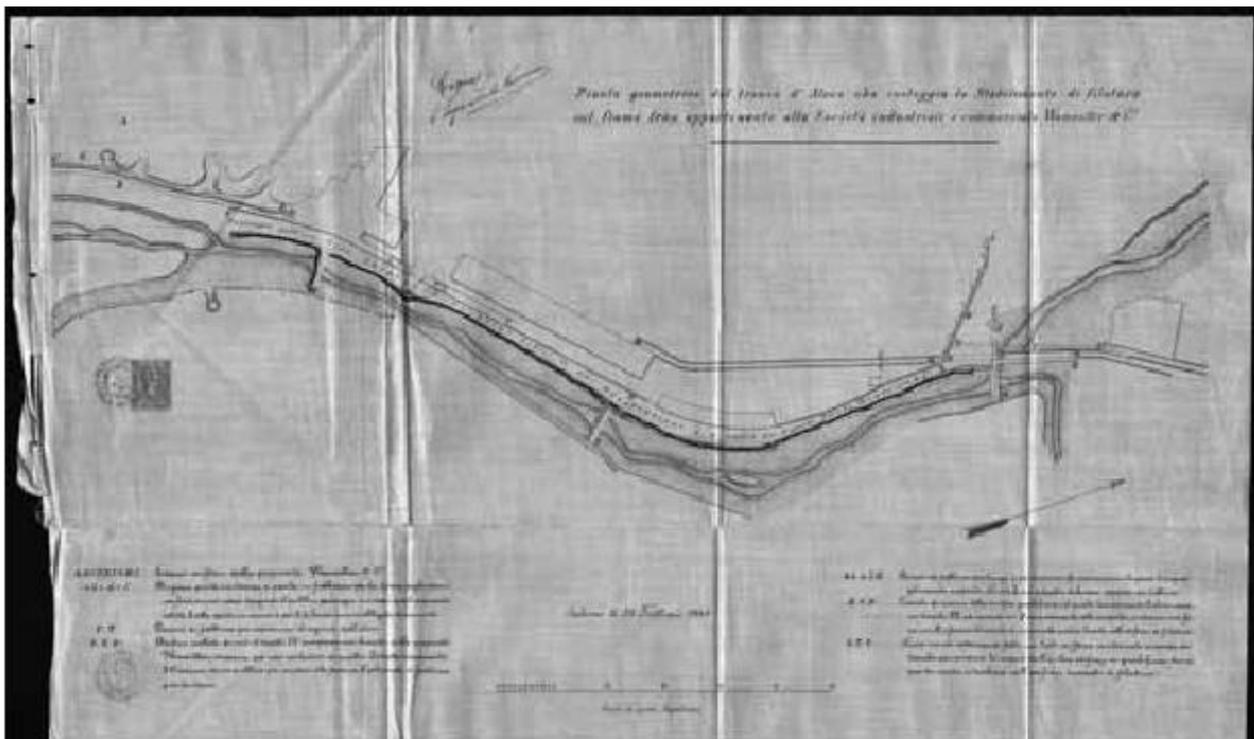
Proprio l'Aselmeyer Pfister & C. (già Vonwiller), tra il 1893 e il 1896, entrò in conflitto con il Municipio di Pellezzano (uno dei comuni della valle dell'Irno). La questione, esposta in un'accurata relazione accompagnata da due disegni tecnici, era iniziata nel 1893.

Ad oriente della città di Salerno corre il Torrente Irno, le cui acque sono destinate ad animare molti opifici industriali e ad irrigare le campagne circostanti la città. Nel Novembre del 1893, per le piogge autunnali, e per il cattivo impianto dei ponti diversi, si verificarono dei danni alle proprietà riverane.

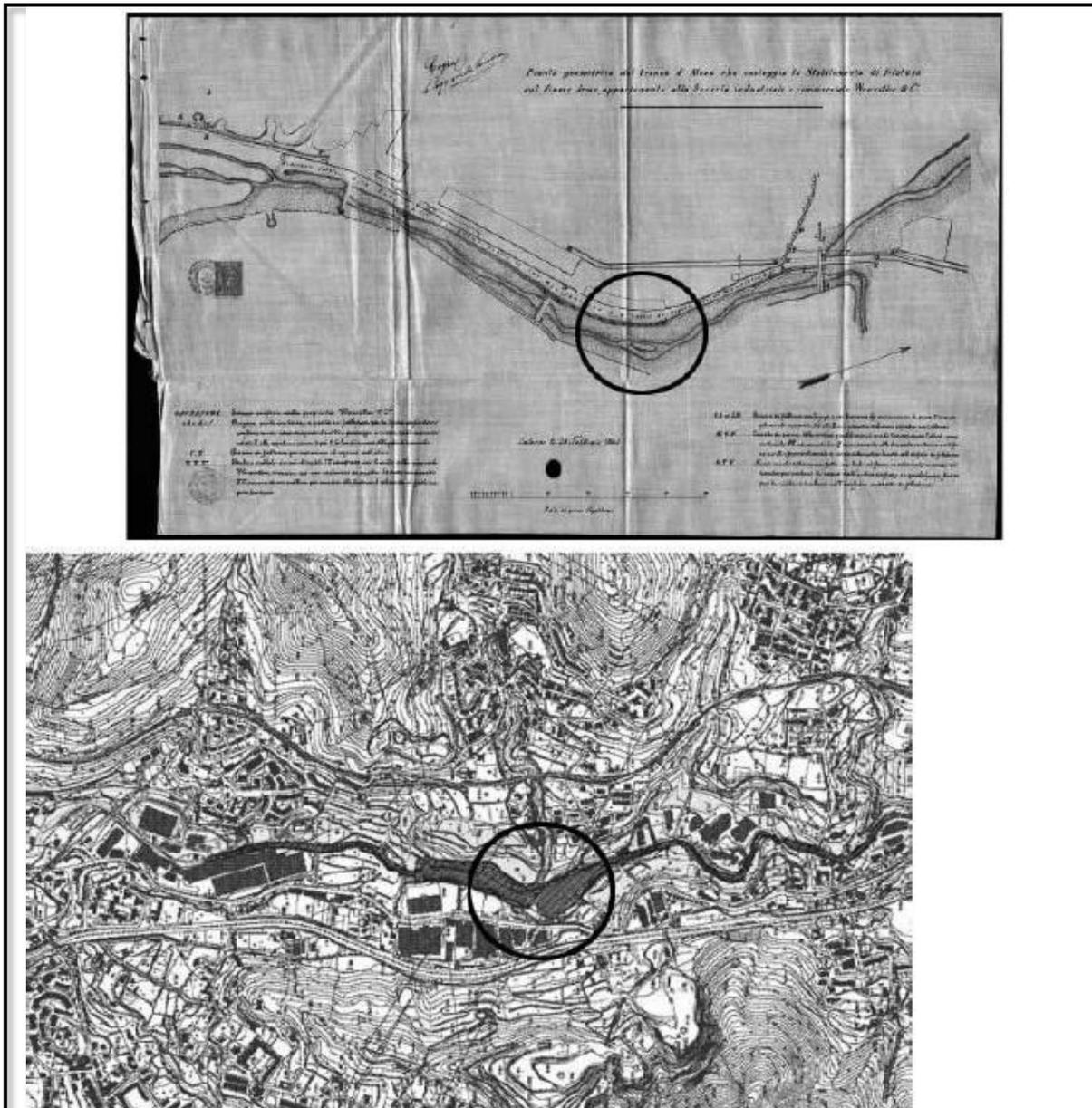
La Ditta Aselmeyer/Pfister & C., credendo garantire i suoi stabilimenti da possibili danni, praticò allora alcune opere di sterro, a protezione dei propri stabilimenti dalle esondazioni del fiume, in una zona di terreno che il Comune di Pellezzano afferma essere di sua proprietà, occupando un suolo del demanio comunale, la destra dell'Irno.

Da queste opere il Municipio di Pellezzano, opinando esser lesi i suoi diritti di proprietario, ottenne la sospensione temporanea dei lavori, fino a quando il giudice di merito non avesse definitivamente pronunciato in proposito.

A seguito di una attenta perizia basatasi su sopralluoghi e sullo studio di una pianta topografica datata 1845, a firma di G. Rosalba (Fig 3.5), furono chiariti i termini originari della relazione giuridica ed effettiva tra la ditta svizzera e il Municipio di Pellezzano; attraverso lo studio della cartografia disponibile si verificò la legittimità delle opere di sterro praticate dalla stessa ditta. Si dimostrò che il suolo contestato corrispondeva di fatto a una zona del demanio comunale pellezzanese, come pure che la Ditta svizzera, nel 1845, aveva già ottenuto una sanatoria per opere abusive realizzate in quella stessa zona, senza essere stata autorizzata a compierne di ulteriori.



**Fig 3.5.** Pianta geometrica del tronco d'Alveo che costeggia lo Stabilimento di filatura sul fiume Irno appartenente alla Società industriale e commerciale Wonviller [sic!] & C. i (A.S.Sa, Tribunale Civile di Salerno, Perizie, B. 107, f. 19, carta n. 139. Riproduzione digitale: Enzo Di Somma). Si tratta della copia di un originale disegnato da G. Rosalba nel 1845, riprodotto dall'Ing. Verrusio come riferimento per la sua perizia (1896): le lettere maiuscole A, B, C, D, E, F, G, H, I della carta delimitano i confini della proprietà della ditta svizzera nel 1845, mentre le lettere minuscole a, b, c, d, e, f indicano l'«Argine parte in terra e parte in fabbrica per la difesa degli stessi/confini [qui marcato in nero], su cui vedesi disegnato il pubblico passaggio, con carri, quale mancando/nel sito X dalla opportuna misura di pal:[mi] 12 la Società rimane obbligata di ridurvelo»(come si legge nella didascalia in basso a sinistra della pianta).



**Fig 3.6.** Comparazione tra la pianta di Rosalba (copia di Verrusio) e un'attuale carta topografica dell'area interessata (orientata conformemente alla pianta di Rosalba). Entrambe rappresentano lo stesso tratto dell'asta fluviale dell'Irno (qui evidenziato con un cerchio nero) lungo il quale operavano i cotonifici svizzeri (ben visibili nella carta odierna su entrambe le sponde fluviali), divenuti, durante la Grande Guerra, Manifatture Cotoniere Meridionali (M.C.M.), oggi dismesse e votate a una prossima destinazione commerciale.

Ciò fu dimostrato ricorrendo a quello che oggi si otterrebbe con un G.I.S.: disegno della planimetria in una scala dettagliata e sovrapposizione della pianta topografica, notando la presenza di un terrapieno stradale non più esistente (Fig 3.6).

In definitiva, attraverso lo studio comparato della carta di Rosalba, si ritennero comprovate tre conclusioni: (1) che la ditta Aselmeyer & C. avesse illegalmente sterrato l'argine originario del fiume Irno, provocando l'aumento del materiale di trasporto della corrente e, dunque, il pericolo di esondazioni; (2) che l'origine

principale dei danni subiti dalla ditta durante la piena del 1893, oltre all'aumento del volume d'acqua dell'Irno, fosse stato il ponte d'accesso che essa stessa aveva fatto (mal)costruire nel 1849; (3) che in alcun modo la ditta potesse affermare che il terrapieno distrutto fosse di proprietà statale e non comunale (Siniscalchi S., 2010. Problemi di gestione delle acque in provincia di Salerno: l'esempio di un'area-campione "sensibile", attraverso carte e documenti d'archivio del secondo Ottocento. Semestrale di studi e ricerche di geografia, Roma - XXII, Fascicolo 2, luglio-dicembre 2010).

### **3.3 Interventi di recupero ambientale sul Fiume Irno**

Secondo le leggi vigenti, le modifiche degli argini fluviali del demanio comunale e lo sversamento di materiali di risulta nelle acque sono reati perseguibili dal punto di vista penale e non solo amministrativo, quali violazioni della normativa sull'edilizia urbanistica (di cui al D.P.R. 6 giugno 2001 n. 380) e ambientale (Decreto Legislativo n. 152 del 3 aprile 2006). Il caso giudiziario dell'Aselmeyer, quindi, rientrerebbe oggi nel novero dei numerosi illeciti penali commessi contro il territorio di Pellezzano.

Il degrado paesaggistico, urbanistico e ambientale di quest'ultimo, oltre che all'abusivismo edilizio e al dissesto idrogeologico, è legato proprio all'inquinamento del Fiume Irno, la cui foce è seriamente compromessa, così come quella di molti fiumi campani.

Emergono così alcuni dei problemi tuttora ricorrenti nel territorio in esame, al centro di recenti progetti volti a una complessiva riqualificazione del bacino.

In particolare, sono stati attivati di recente progetti miranti a proteggere il territorio vallivo e le sue "matrici fondative" dal punto di vista ambientale, paesaggistico e storico-insediativo. Di qui l'istituzione del "Parco Fluviale del Fiume Irno" (Deliberaz. nn. 1873 e 1874 del 26/11/2008 della Giunta Reg. della Campania, sulla base della L.R. n. 17 del 07/10/2003 e della L. Quadro sulle aree protette n. 394 del 06 /12/1991) e la sottoscrizione del Protocollo d'Intesa per l'avvio delle azioni funzionali alla definizione del Contratto di Fiume del Fiume Irno, sostenuto da diversi soggetti istituzionali (tra cui la Regione Campania, la Provincia di Salerno e i Comuni di Pellezzano e Baronissi).

Ma mentre da un lato si assiste alla volontà di salvaguardare le risorse ambientali, dall'altro è in corso un'urbanizzazione del territorio che vede insediarsi diverse realtà imprenditoriali. Ci si riferisce alla dislocazione dell'Università degli Studi di Salerno

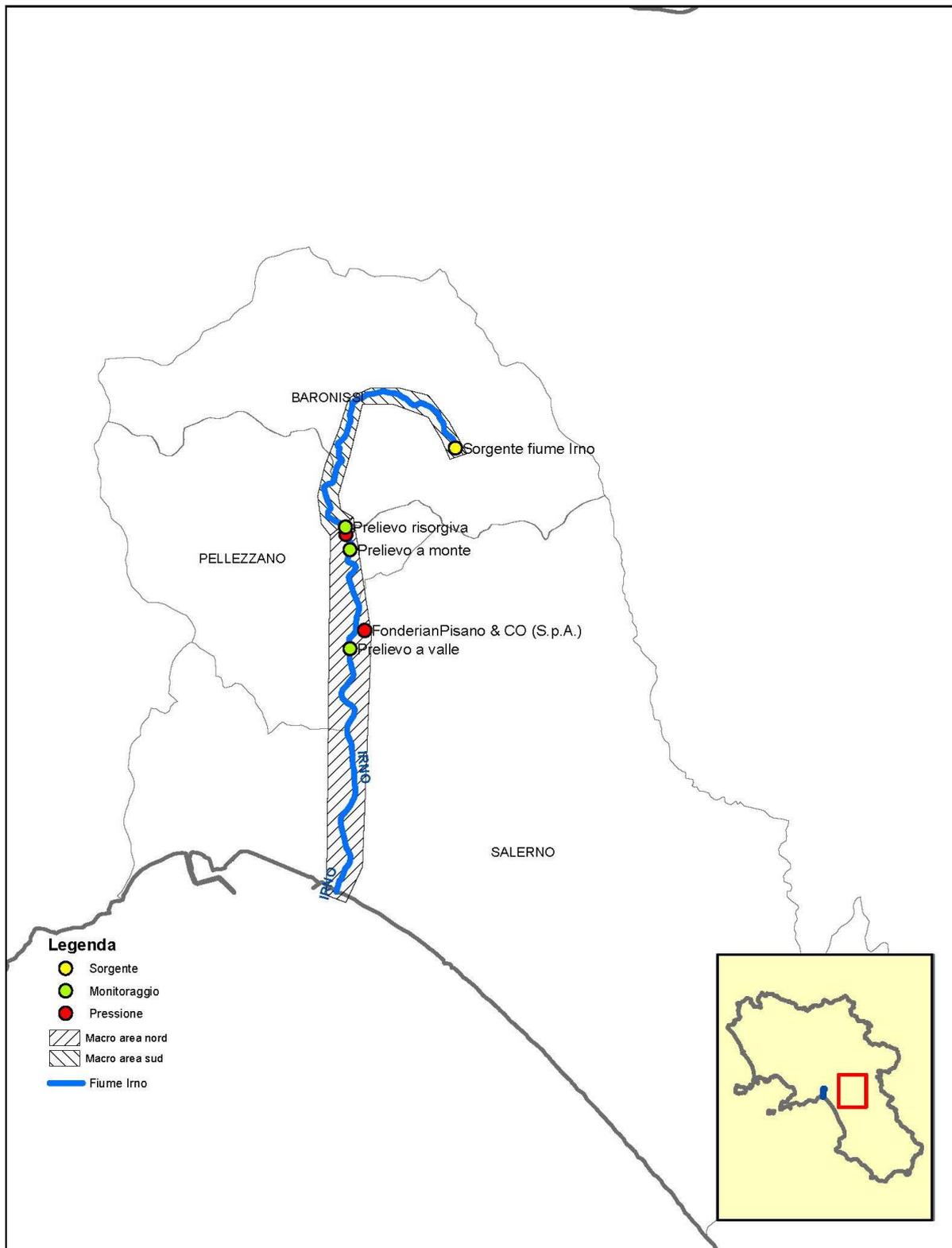
a Baronissi e Fisciano, alla recente apertura del centro IKEA nel comune di Baronissi e alla costruzione di un centro commerciale polifunzionale di 45.000 mq (“Le Cotoniere”) nell’area industriale della frazione Fratte (comune di Salerno), al posto degli stabilimenti dismessi delle storiche Manifatture Cotoniere Meridionali (“Il Mattino” del 03/09/10, sez. Salerno, p. 37).

### **3.4 Il Fiume Irno: corpo idrico recettore di scarichi fognari e industriali.**

Nell’ambito dello “Studio generale del bacino del Fiume Irno e censimento degli scarichi esistenti” (Gentile. A., et al. 2011, Associazione Southland Onlus di Giffoni Valle Piana) è stato effettuato un censimento degli scarichi che ha riguardato l’intero tratto fluviale, dall’abitato di Baronissi fino alla foce nel comune di Salerno. Gli scarichi sono stati fotografati e sono state rilevate le coordinate geografiche con l’ausilio di un GPS.

I rilevamenti *de visu* hanno consentito anche di stimare, nella maggior parte dei casi, la tipologia di scarico ipotizzandone la natura e la provenienza. A tal proposito è stato suddiviso il tratto fluviale indagato in due macroaree: la prima compresa tra l’abitato di Baronissi e l’ultimo dei laghetti di Pellezzano, sito in località Capezzano e la seconda da questo punto fino alla foce (Fig 3.7).

Questa distinzione dipende dalle diverse caratteristiche ambientali e geomorfologiche generali rilevate, nonché dalla natura e dalla quantità degli scarichi immessi nel corpo idrico recettore.



**Fig 3.7:** Identificazione di due macroaree lungo l'asta fluviale dell'Irno in funzione della tipologia degli scarichi.

Nella prima macroarea predominano scarichi civili costituiti da acque di prima pioggia e scarichi fognari. Questi in genere non sono continui, ma costituiti per lo più dai cosiddetti “troppo pieni” cioè quegli scarichi che, in caso di elevata portata,

sversano i propri reflui direttamente nel corso d'acqua. Da rilevare anche lo stato di degrado della rete fognaria in alcuni punti che attraversano Baronissi, dove i reflui fuoriescono dalle condotte prima di riversarsi nel fiume. In questa prima macroarea occorre sottolineare che la portata idrica del fiume è molto esigua e di conseguenza gli scarichi provocano effetti devastanti sull'intero ecosistema, a causa della scarsa diluizione degli inquinanti. Tali effetti sono mitigati in parte dall'azione depurante dei laghetti situati più a valle e in parte dall'apporto in più punti di acqua proveniente da numerose sorgenti naturali.

La situazione della seconda macroarea è più grave perché il numero degli scarichi aumenta e si aggiungono alcuni scarichi industriali ed un ambiente ripariale fortemente antropizzato e artificializzato.

Immediatamente a valle dell'ultimo laghetto è possibile verificare la presenza di uno scarico industriale presumibilmente derivante da vicine fonderie a causa del colore molto scuro e dei residui lasciati sul terreno circostante. Man mano che si procede verso valle le sponde risultano sempre più cementificate e rettificata con molti tratti in cui l'alveo è stato completamente pavimentato. Tale banalizzazione dell'ecosistema fluviale produce significativi impatti sul livello di funzionalità fluviale ed in particolare sulla capacità delle acque di auto depurarsi, che arrivano in mare conservando buona parte del loro potere inquinante.

Lungo l'intero tratto sono stati censiti n° 115 scarichi, di cui oltre 30 riconducibili sicuramente ad acque reflue urbane (fognature o troppo pieni fognari), alcuni scarichi domestici, almeno 3 scarichi industriali, innumerevoli scarichi di acque di piazzale (Fig 3.8). A questi scarichi vanno aggiunti anche quelli eventuali che recapitano nei piccoli affluenti dell'Irno, i quali non sono stati oggetto di indagine dello studio menzionato.

Nell'ambito delle realtà industriali che operano in tale territorio occorre menzionare le "Fonderie Pisano" (Fonderie Pisano & C. S.p.A.), collocate a Nord del Comune di Salerno, in località Fratte, che producono ghisa di seconda fusione, in un stabilimento di 180 mila mq di cui 30 mila mq coperti.

Nelle vicinanze dello stabilimento si rinvengono centri urbani consolidati, quali Pellezzano, Baronissi e Salerno (località Matierno), distanti rispettivamente 498 mt, 3,80 km e 987 mt, e degli agglomerati urbani sparsi: l'abitazione più vicina alla sorgente inquinante dista solamente 44 mt da essa.

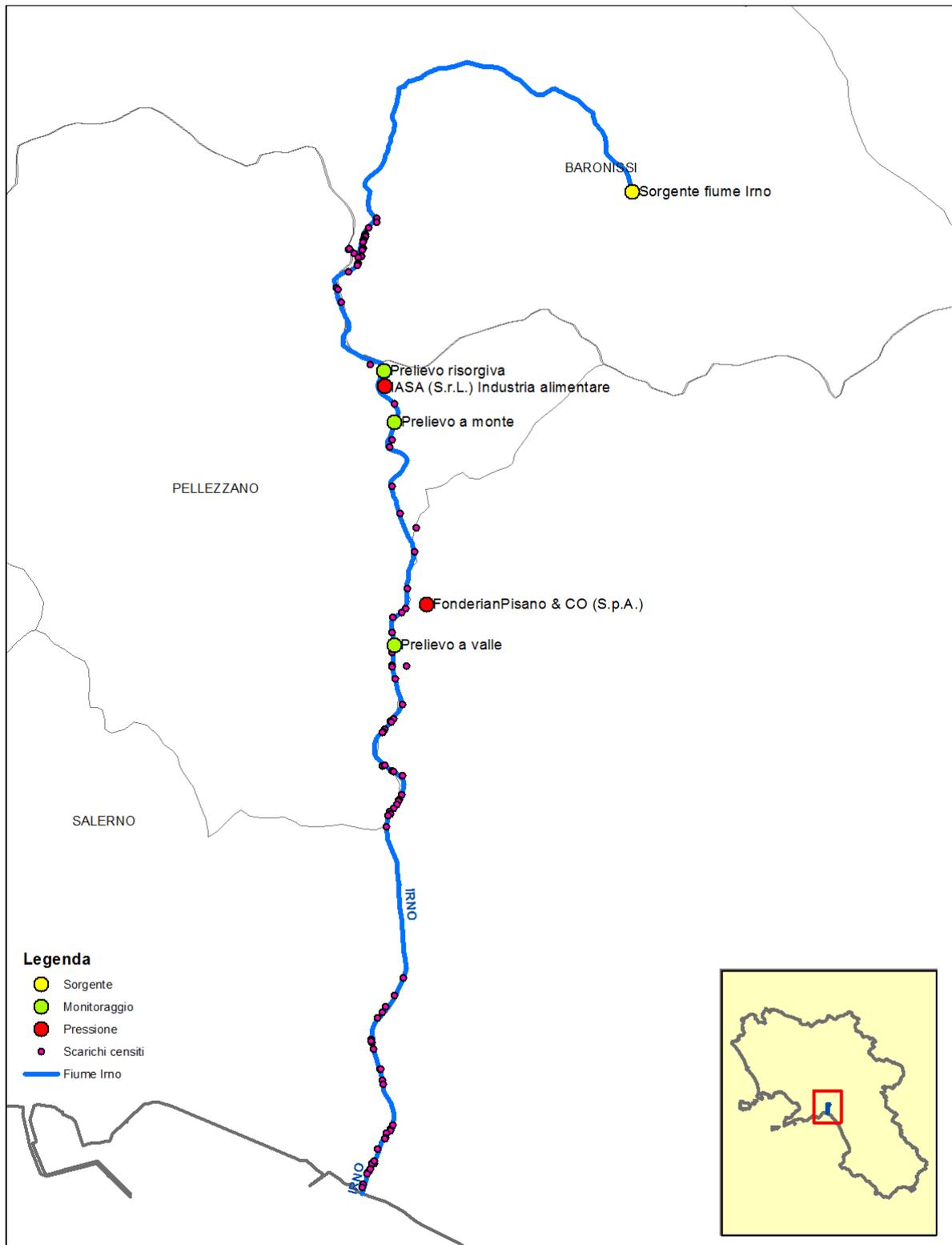
Nel marzo 2007 il Tribunale di Salerno con la sentenza N.415/2007 condanna le Fonderie Pisano & C. S.p.A: per:

- l'abbandono di rifiuti speciali pericolosi;
- lo scarico di acque industriali nel fiume Irno e senza essere in possesso dell'autorizzazione;
- il superamento dei limiti soglia per piombo, rame e zinco;
- lo scarico sul suolo di acque meteoriche miste alle polveri derivanti dall'attività prodotta;
- la realizzazioni di impianti produttori di fumi in atmosfera senza essere in possesso dell'autorizzazione prevista;
- l'emissioni di gas e polveri atti a molestare le persone presenti in zona.

Tuttavia ancora non si è provveduto alla delocalizzazione delle fonderie, così come era stato stabilito.

I risultati analitici derivanti da attività straordinarie, integrative del monitoraggio ambientale dell'anno 2014 sul Fiume Irno, condotta da ARPA Campania, Ente tecnico strumentale e di supporto alla Regione Campania, hanno evidenziato un inquinamento ambientale dei sedimenti fluviali e delle acque superficiali a valle dello scarico delle fonderie.

In particolare sono stati registrati superamenti delle concentrazioni soglia di contaminazione (rif D. Lgs 152/06, parte IV, titolo V, allegato 5,. Tabella 1) per siti ad uso verde e commerciale di metalli pesanti (cadmio, piombo, rame, stagno, zinco), idrocarburi pesanti e IPA (idrocarburi policiclici aromatici) per la matrice sedimenti fluviali e un superamento del valore di *Escherichia coli* (indicatore fecale) nelle acque superficiali (rif D.M. 185/2003, Valutazione della qualità delle acque a destinazione irrigua).



**Fig 3.8:** Rappresentazione degli scarichi lungo l'asta fluviale dell'Irno

A seguito degli studi di cui ai paragrafi precedenti, riferibili in particolare alla contaminazione da metalli pesanti, il Fiume Irno è stato scelto come corpo idrico sul quale effettuare i campionamenti di acque superficiali, dei sedimenti fluviali e delle macrofite acquatiche e studiarne le risposte a tale impatto.

## 4 ATTIVITÀ DI CAMPIONAMENTO

### 4.1 Caratteristiche delle stazioni di campionamento

La presenza delle macrofite acquatiche lungo i corsi d'acqua è comune, anche se la morfologia degli stessi ne condiziona fortemente la diffusione e la consistenza delle comunità.

Per qualsiasi obiettivo sia effettuato il monitoraggio della comunità macrofita è importante tenere presente che le indicazioni che essa fornisce dipendono in maniera sostanziale da una corretta scelta della stazione di campionamento. Tale scelta è, inoltre, funzione delle finalità dell'indagine che si vuole attuare. Nel caso si abbia l'obiettivo di monitorare una pressione, occorre scegliere la localizzazione della stazione in posizione adeguata per la registrazione dell'impatto potenziale e tale da risentire il meno possibile da altre pressioni.

È importante precisare che la comunità macrofita è diffusa ma non ubiquitaria nei corsi d'acqua.

### 4.2 Stazioni di campionamento

I punti di campionamento (stazioni) sono stati scelti a seguito di un attento esame preliminare della cartografia e di immagini satellitari e aeree; tali fonti, unitamente ad altre informazioni, hanno consentito di individuare una prima selezione di siti potenzialmente idonei; successivamente, anche sulla scorta di informazioni logistiche, supportate dall'esame della cartografia e dalle immagini, è stata effettuata a piedi un'ispezione dei tratti fluviale ritenuti idonei, allo scopo di verificare sia la congruità delle stazioni per le finalità prefissate, sia l'accessibilità delle stesse in condizioni di sicurezza.

In particolare, le stazioni di campionamento sono state scelte in funzione dell'impatto antropico derivante dalle attività della Fonderia Pisano & C. S.p.A. e della disponibilità delle stessa specie di macrofite da analizzare in situazione di ambiente "indisturbato"/"disturbato": stazione di campionamento "**monte**"/stazione di campionamento "**valle**". È stata aggiunta una ulteriore stazione di campionamento in un punto di "**risorgiva**", ancora più a monte, in qualità di controllo.

Tali stazioni nel testo saranno identificate come: **campionamento monte**, **campionamento valle**, **campionamento risorgiva**.

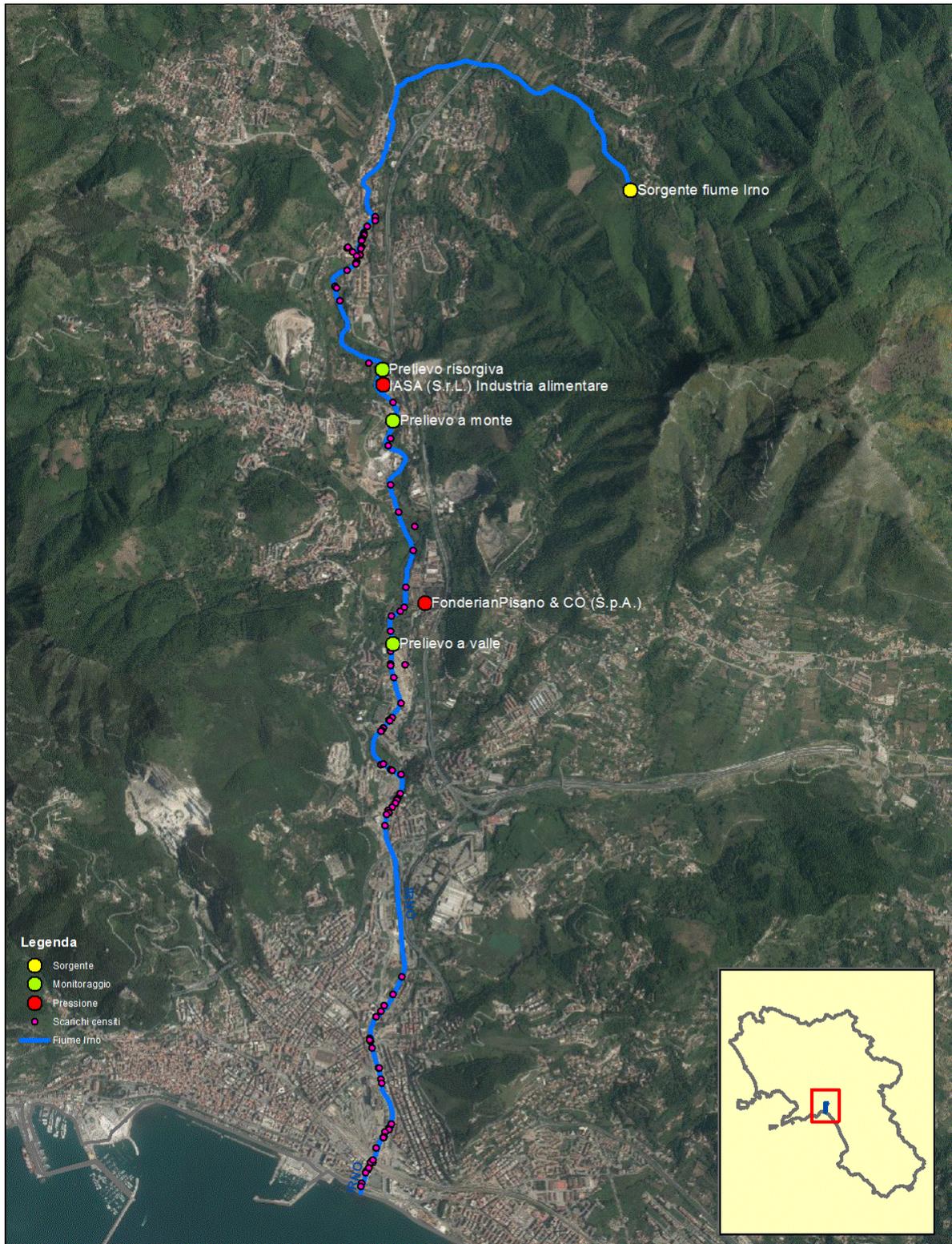
Contestualmente sono stati prelevati campioni di acqua superficiale e sedimenti fluviali.

Pertanto per la presente ricerca, a seguito di una attenta analisi di cui sopra, è stato deciso di campionare nei punti le cui coordinate, rappresentate con proiezione Fuso 32 - WGS 84 – Emisfero Nord, sono di seguito riportate.

- **Stazione di campionamento risorgiva** (Comune di Pellezzano).  
Coordinate: 480990 long; 4507976 lat.
- **Stazione di campionamento monte** dell’impatto antropico (Comune di Pellezzano).  
Coordinate: 481061 long ; 45 07631 lat.
- **Stazione di campionamento valle** dell’impatto antropico (Comune di Pellezzano).  
Coordinate: 481062 long; 4506121 lat.

L’esatta localizzazione geografica della stazione è stata effettuata attraverso l’uso del GPS.

Segue una immagine satellitare nella quale sono identificate le stazioni di campionamento lungo l’asta fluviale, le pressioni e gli scarichi censiti (Fig 4.1).



**Fig 4.1:** Stazioni di campionamento (punto di risorgiva, monte, valle) lungo l'asta fluviale dell'Irno, pressioni e scarichi censiti.

Di seguito si riportano immagini satellitari (google earth), fotografie delle stazioni in cui è stato effettuato il campionamento e aspetti particolari ritenuti importanti (Fig 4.2 – 4.3 – 4.4 – 4.5).



**Fig 4.2:** Stazione di campionamento tratto monte lungo l'asta fluviale dell'Irno.

### Stazione valle



**Fig 4.3:** Stazione di campionamento tratto valle lungo l'asta fluviale dell'Irno.

Il campionamento programmato per il mese di giugno è stato rinviato a luglio a causa delle condizioni idrologiche avverse; di seguito si riportano alcune immagini (Fig 4.4).

Come si evince, il tratto fluviale era totalmente non guadabile a causa di forti fenomeni temporaleschi, che sempre più caratterizzano il nostro clima, responsabili dell'alterazione della portata.

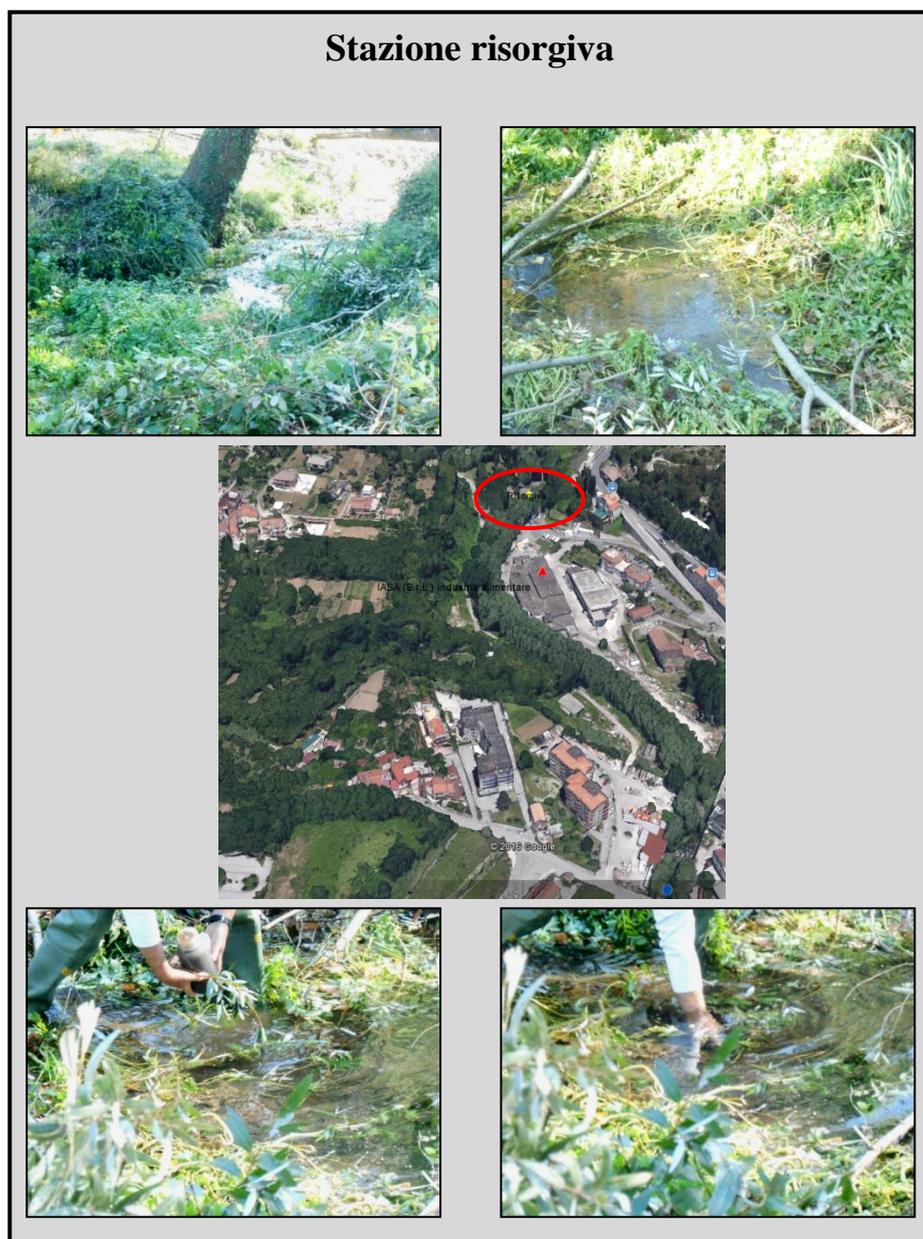


**Fig 4.4:** Stazione di campionamento tratto monte lungo l’asta fluviale dell’Irno, giugno 2015.

In generale, nella scelta dei siti di campionamento si preferisce individuare tratti fluviali morfologicamente più diversificati e caratterizzati da buona naturalità nei quali si insediano comunità macrofite con maggior potere bioindicatore. Tuttavia, per la presente ricerca, i siti individuati sono risultati artificializzati per la presenza di opere in cemento armato che sostituiscono l’argine naturale del fiume: presenza di edifici a ridosso dell’alveo lungo la stazione monte e presenza di sbarramenti artificiali lungo la stazione valle.

La stazione di campionamento monte caratterizza lo stato in condizioni di “controllo”, che non risente cioè dell’impatto antropico derivante dallo sversamento delle acque di processo e di dilavamento dei piazzali delle Fonderie Pisano & C. S.p.A.

Ancora come controllo è stata aggiunta una ulteriore stazione di campionamento, ancora più a monte, individuata **stazione risorgiva**, in cui, per l’appunto, le acque del fiume ricevono il contributo di una risorgiva. Di seguito si riportano alcune fotografie eseguite durante il campionamento (Fig 4.5).



**Fig 4.5:** Stazione di campionamento, punto di risorgiva, lungo l'asta fluviale dell'Irno.

### **4.3 Campionamento delle macrofite acquatiche**

Le attività di campionamento sono state eseguite secondo il metodo standard per il rilievo e il campionamento della comunità macrofita nei corsi d'acqua guadabili a carattere naturale o artificiale, definito nel documento “*Metodi biologici per le acque superficiali interne*” (Manuali e linee guida ISPRA-SNPA, 111/2014).

### **4.3.1 Periodo di campionamento e condizioni ambientali**

La scelta del periodo più adeguato per il campionamento deve essere opportunamente modulata in funzione degli obiettivi del campionamento stesso, della tipologia fluviale oggetto di monitoraggio, delle caratteristiche climatiche ed idrologiche dei territori e dei corsi d'acqua indagati, tenendo conto della necessità di rinvenimento della comunità oltre che della sua rappresentatività.

In particolare, il campionamento delle macrofite deve essere eseguito in corrispondenza del massimo sviluppo della vegetazione acquatica, indicato tra la tarda primavera e l'inizio della stagione autunnale, approssimativamente da aprile a ottobre, in funzione delle differenze climatiche locali e del regime idrologico dei corsi d'acqua indagati. Esso inoltre deve essere effettuato nel periodo compreso tra una morbida e una magra o in magra e realizzato a distanza di diversi giorni (una settimana) da una morbida, se abbondante o sostenuta e di diversi giorni da una piena (2-3 settimane). Rispettando tali tempistiche si ha la garanzia che la comunità sia strutturalmente integra e, nel contempo, che il livello dell'acqua sia ragionevolmente basso e che la torbidità si sia ridotta, consentendo un'adeguata visibilità nel tratto da indagare.

Nelle attività di monitoraggio ambientale il campionamento viene eseguito 2 volte durante la stagione vegetativa, per garantire la rappresentatività del rilievo; il primo campionamento tra aprile e giugno e il secondo tra luglio e ottobre, facendo attenzione che trascorranò almeno 7 settimane tra i due eventi.

Nell'ambito della presente ricerca, le attività di campionamento sono state eseguite nei mesi di luglio, agosto, ottobre, novembre 2014 e 2015.

Come già accennato, l'individuazione dei punti di campionamento ha risentito non solo della necessità di monitorare lo scarico della fonderia, ma anche dell'esigenza di ritrovare identiche specie di macrofite; ciò al fine di verificare la risposta a uno specifico impatto antropico, attraverso il confronto con un ambiente a monte rispetto all'impatto.

In accordo alle linee guida sopra citate, in riferimento al numero di operatori che eseguono il campionamento, lo stesso è stato eseguito con il supporto dei tecnici ARPAC qualificati.

Il campionamento è stato realizzato in modo tale da raccogliere campioni quanto più possibile completi delle parti vegetative e riproduttive per consentire una dettagliata analisi delle stesse in età matura.

Una volta eseguito il campionamento, le macrofite acquatiche sono state conservate in bottiglie di plastica con acqua di fiume (Fig 4.6) e trasportate in contenitori refrigerati a 4°C fino al laboratorio, per le successive analisi.



Fig 4.6: Campionamento macrofite acquatiche.

#### 4.3.2 Macrofite acquatiche campionate

La comunità macrofita presa in considerazione è quella acquatica, ovvero quella costituita da organismi insediati in ambienti stabilmente sommersi, nell'ambito della stazione di campionamento.

In particolare, nelle stazioni individuate, sono state campionate le macrofite acquatiche:

- *Nasturtium officinale*.
- *Veronica beccabunga*.
- *Apium nodiflorum*.

Per *Veronica beccabunga*, in considerazione della peculiarità della pianta stessa, sono state campionate sia le foglie a pelo d'acqua, sia le foglie che crescono in modalità subaerea.

Di seguito si riporta una sintetica descrizione delle macrofite campionate (rif Guida fotografica alle piante acquatiche, ARPA LAZIO Manuali/Acqua 2012\_01).

- *Nasturtium officinale* (crescione d'acqua) Fig 4.7.

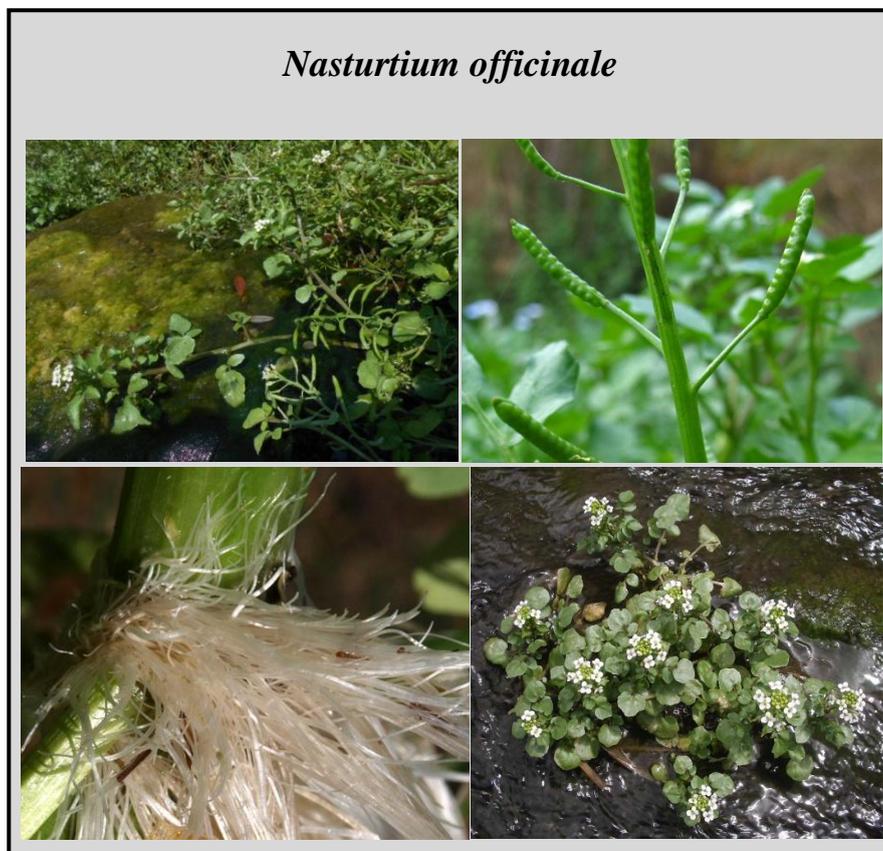


Fig 4.7: *Nasturtium officinale*.

**Forma Biologica:** Emicriptofita scapose, idrofita radicata. Piante perennanti per mezzo di gemme poste a livello del terreno e con asse fiorale allungato, spesso privo di foglie.

**Descrizione:** Pianta erbacea perenne, di dimensioni 30-40 cm. Fusto ascendente, parzialmente immerso in acque poco profonde, glabro, ramoso in alto. Foglie leggermente carnose, pennate, basali con picciolo di 3-5 cm, 2-3 paia di segmenti laterali e segmento terminale reniforme più grande. Foglie cauline con picciolo più breve e segmento terminale subrotondo oppure ovale. Fiori bianchi piccoli, con antere giallastre, in inflorescenze a racemi. Fioritura maggio - luglio.

**Distribuzione:** comune in tutta Italia

**Habitat:** Acque ferme e correnti, sponde. Normalmente dal piano fino a 1500 m, ma trovata anche oltre, fin quasi ai 2500 m.

**Etimologia:** Il nome del genere deriverebbe dal latino “nasi tortium” = naso torto a causa dell’odore penetrante della pianta.

### Tassonomia filogenetica

|                  |                         |
|------------------|-------------------------|
| <b>Divisione</b> | <b>Angiosperma</b>      |
|                  | Magnoliophyta           |
|                  | Eudicotiledoni          |
|                  | Rosidi                  |
| <b>Ordine</b>    | Brassicales<br>Bromhead |
| <b>Famiglia</b>  | Brassicaceae<br>Burnett |
| <b>Tribù</b>     | Nasturtieae             |
| <b>Genere</b>    | Nasturtium L.           |

- *Apium nodiflorum* (sedano d'acqua) Fig 4.8

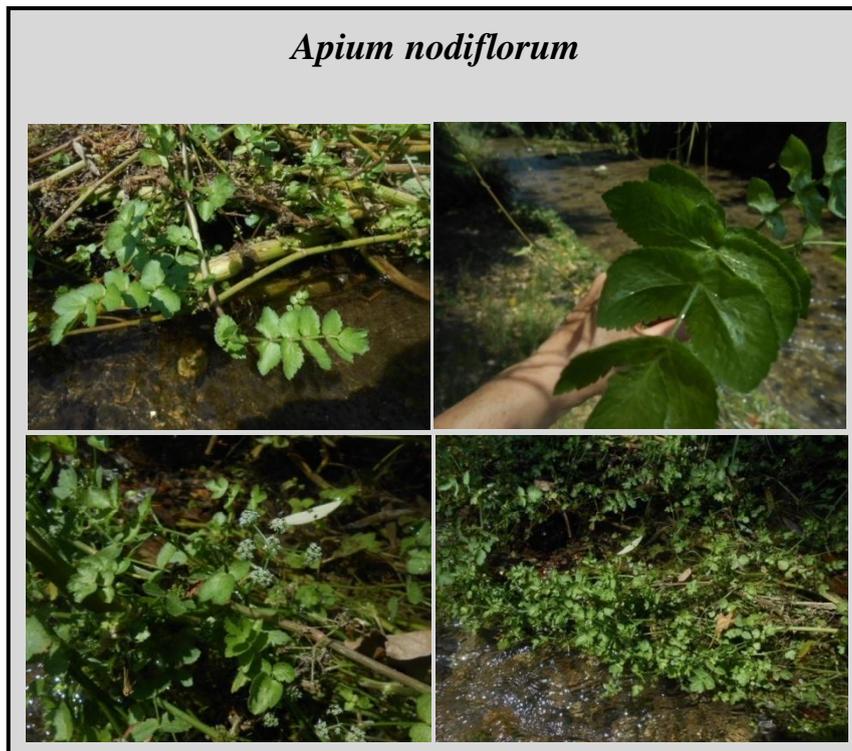


Fig 4.8: *Apium nodiflorum*.

**Forma Biologica:** Emicriptofite scapose, idrofita radicata.

**Descrizione:** Pianta erbacea di dimensioni 30-100 cm. Fusto cavo e striato. Foglie lanceolate, imparipennate, con margine dentato. Fiori bianco-verdastri in ombrelle, formate da 3-12 raggi, sessili o con peduncolo di lunghezza inferiore ai raggi. Fioritura maggio-luglio.

**Distribuzione:** comune in tutta Italia, meno comune al Settentrione. Altitudine da 0 a 1200 m.

**Habitat:** fiumi e stagni, sia in acqua, sia sulle rive.

**Etimologia:** *Apium* è il nome latino della pianta, dal celtico apon = acqua ad indicare la tendenza della pianta a crescere in luoghi umidi.

## Tassonomia filogenetica

|                  |                    |
|------------------|--------------------|
| <b>Divisione</b> | <b>Angiosperma</b> |
|                  | Magnoliophyta      |
|                  | Eudicotiledoni     |
|                  | Asteridi           |
| <b>Ordine</b>    | Apiales Nakai      |
| <b>Famiglia</b>  | Apiaceae Lindl.    |
| <b>Tribù</b>     |                    |
| <b>Genere</b>    | Apium n.           |

- *Veronica beccabunga* (Erba grassa) Fig 4.9.

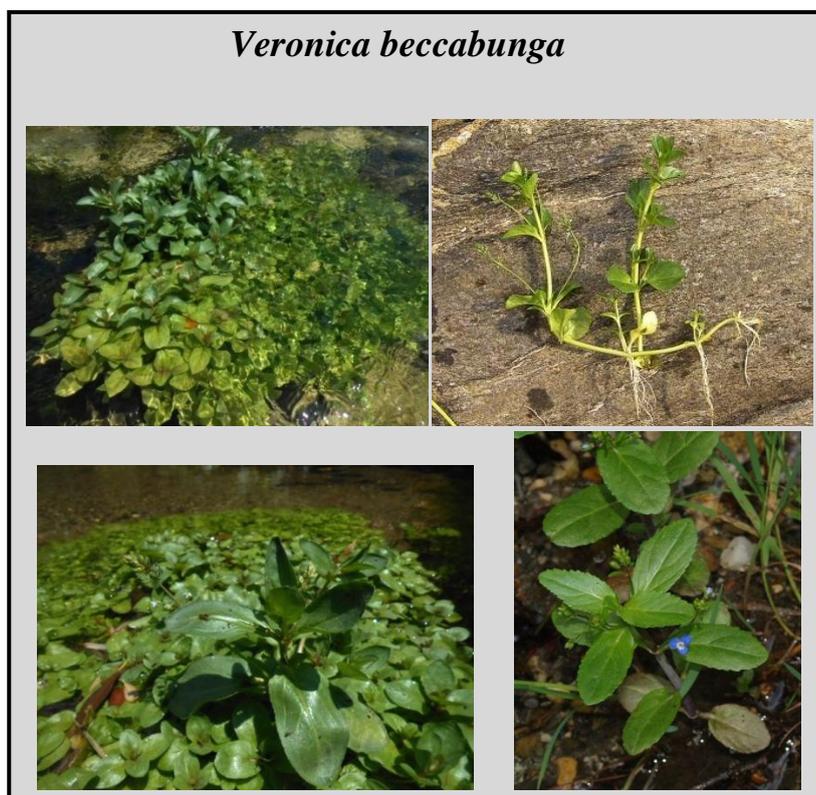


Fig 4.9: *Veronica beccabunga*.

**Forma Biologica:** Emicriptofite reptanti, idrofita radicata. Piante perennanti per mezzo di gemme poste a livello del terreno e con fusti striscianti.

**Descrizione:** Pianta erbacea perenne, ermafrodita, completamente glabra di dimensioni di 20-60 cm. Fiori blu in racemi brevi formati da 10-20 fiori. Fusti molto ramificati, fistolosi, carnosi, in genere con la parte basale prostrata e strisciante che radifica negli internodi e può emettere diversi fusti fioriferi ascendenti, cilindrici, arrossati alti 10-20 cm. Le Foglie di 1-2 x 2-4 cm, carnose, opposte, di colore verde scuro lucente, brevemente picciolate con lamina ovata o oblunga, tutte con picciolo di 2-9 mm. Le infiorescenze di 10-20 fiori in brevi e semplici racemi ascellari, opposti. I fiori hanno un peduncolo filiforme; corolla rotata, larga 5-8 mm, con 4 petali di colore celeste o blu intenso, bianchi alla fauce e leggermente striati, ovato arrotondati, ineguali, l'inferiore più piccolo degli altri tre; 2 stami e 1 stilo lungo al massimo 2 mm e mai più lungo della capsula; ovario supero con due carpelli. Fioritura aprile-settembre.

**Distribuzione:** comune in tutte le regioni

**Habitat:** Luoghi umidi, fossi con acqua corrente, sorgenti, sponde, terreni umidi per infiltrazioni o sorgive e ben soleggiati dal piano fino a 2.500 m di altitudine.

### Tassonomia filogenetica

|                  |                         |
|------------------|-------------------------|
| <b>Divisione</b> | <b>Angiosperma</b>      |
|                  | Magnoliophyta           |
|                  | Eudicotiledoni          |
|                  | Asteridi                |
| <b>Ordine</b>    | Lamiales<br>Bromhead    |
| <b>Famiglia</b>  | Plantaginaceae<br>Juss. |
| <b>Tribù</b>     | Veroniceae              |
| <b>Genere</b>    | Veronica L.             |

## 4.4 Campionamento acqua superficiale e sedimenti fluviali

Nelle stesse stazioni individuate si è proceduto, oltre al campionamento delle macrofite acquatiche, al campionamento dei sedimenti fluviali e dell'acqua superficiale, secondo i protocolli di seguito riportati.

### 4.4.1 Sedimenti fluviali

Nel documento “Proposta per la valutazione dello stato qualitativo dei sedimenti fluviali nel sito di interesse nazionale Fiumi Saline ed Alento” (ISPRA, giugno 2009) viene definita la matrice sedimento come “la frazione media e fine (minore di 2 mm) di materiale organico ed inorganico depositato al fondo di bacini acquatici”.

Il problema più critico per la raccolta di campioni rappresentativi è costituito dalla variabilità spaziale dei sedimenti che alternano zone di deposizione preferenziale a zone di attiva erosione.

I sedimenti presentano anche una significativa variabilità verticale. Gli strati superficiali (fino a parecchi centimetri nei sedimenti fluviali) sono infatti

generalmente più attivi dal punto di vista geochimico e biologico rispetto ai sedimenti sottostanti; il prelievo degli strati superficiali è dunque sempre da preferire nell'ambito di studi per la valutazione del sedimento. Rispetto ad una sorgente di inquinamento puntiforme, un campione puntuale consiste in un unico prelievo effettuato in una zona di deposizione a valle della sorgente. I corsi d'acqua di piccole dimensioni e i canali possono essere efficacemente campionati manualmente dalle rive (argine).

Seguono alcune immagini relative al campionamento dei sedimenti fluviali (Fig 4.10 – 4.11 – 4.12) nelle diverse stazioni di monitoraggio.



**Fig 4.10:** Campionamento monte – sedimenti.

### Campionamento valle – sedimenti



Fig 4.11: Campionamento valle sedimenti.

### Campionamento *Apium n.*, sedimenti fluviali, acqua superficiale – risorgiva



Fig 4.12: Campionamento tratto di risorgiva - *Apium nodiflorum*, sedimenti fluviali e acqua superficiale.

#### 4.4.2 Acqua superficiale

Il campionamento dell'acqua superficiale è stato effettuato in riferimento al “Protocollo per il campionamento dei parametri fisico-chimici a sostegno degli elementi biologici nei corsi d'acqua superficiali” (Manuali e linee guida, APAT, 2007).

Il campionamento è stato eseguito tenendo conto che nei tratti rettilinei la velocità dell'acqua al centro del corpo idrico è massima e va diminuendo mano a mano che ci si avvicina alle sponde. Ciò comporta che se in un tratto rettilineo viene prelevato un campione al centro, questo avrà probabilmente caratteristiche fisico-chimiche differenti, in quanto ai lati del corso d'acqua sarà maggiore la sedimentazione.

In particolare, il campione “medio” a monte e a valle, lungo un tratto rettilineo, è stato ottenuto da due prelievi, uno effettuato al centro e l'altro effettuato tra il centro e la sponda (Fig 4.13)

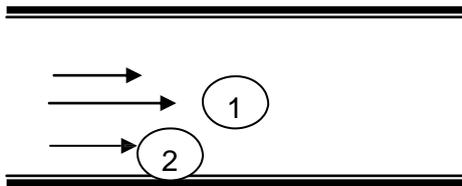


Fig.4.13: Campionamento acqua superficiale fluviale.

Per le analisi microbiologiche sono stati utilizzati contenitori sterili con tiosolfato; per le analisi di metalli pesanti sono state utilizzate bottiglie di vetro, per le rimanenti analisi contenitori di plastica.

Seguono immagini relative al campionamento acqua superficiale (Fig 4.14).



**Fig 4.14:** Campionamento acqua superficiale fluviale.

#### **4.5 Rilievo stazionale, parametri di supporto e scheda di rilevamento**

Le osservazioni compiute durante il rilievo hanno contribuito, unitamente all'analisi territoriale effettuata in fase di pianificazione delle attività di monitoraggio, ad un'efficace caratterizzazione del territorio circostante il corridoio fluviale, fondamentali per una corretta interpretazione dei risultati ottenuti. Ciò ha consentito, tra l'altro, di poter mettere in relazione la comunità vegetale rilevata con le caratteristiche stazionali, anche per una giusta valutazione delle pressioni che interessano la comunità stessa.

Tali informazioni sono state annotate in una "Scheda di Rilevamento". Di seguito si riporta la scheda compilata relativa al campionamento eseguito nel mese di luglio 2015.

In particolare, sono stati annotati i valori di alcuni parametri chimici e chimico-fisici dell'acqua superficiale condizionanti la distribuzione e la composizione delle comunità macrofittiche, tra questi: temperatura, conducibilità, ossigeno disciolto.

È da considerare che l'ampiezza dell'alveo bagnato non è continuamente stabile negli intervalli temporali in cui sono stati effettuati i campionamenti (in magra-morbida e in morbida) ed alcune piccole porzioni delle comunità sono risultate emerse o sommerse a seconda della fase idrologica.

| <b>SCHEDA DI RILEVAMENTO</b>   |   |  |
|--|---|--|
| <b>Codice/Nome stazione</b>  | <b>IRNO MONTE</b>   | <b>IRNO VALLE</b>  |
|  |  |  |
| <b>Data</b>  | 06/07/2015, ore 10.00   | 06/07/2015, ore 12.00  |
| <b>Località</b>  | Pellezzano, Cologna   | Pellezzano, Capezzano inferiore  |
| <b>Corso d'acqua</b>   | Fiume Irno  | Fiume Irno   |
| <b>Coordianate</b><br>UTM 32 – WGS 84  | 481061 long ; 45 07631 lat  | 481062long; 4506121 lat  |
| <b>Bacino idrografico</b>  | Irno  | Irno   |
| <b>Idroecoregione</b>  | 18  | 18   |
| <b>Tipo fluviale</b><br>(D. Lgs 152/06 e smi)                                  | 18ss1   | 18ss2  |
| <b>MATRICE CAMPIONATA</b>  |   |  |
| <b>Macrofite acquatiche</b>  | X   | X  |
| <b>Acqua superficiale</b>  | X   | X  |
| <b>Sedimento fluviale</b>  | X   | X  |
| <b>PARAMETRI DIMENSIONALI</b>  |   |  |
| <b>Ampiezza media alveo di magra (m)</b>                                       | -   | -  |
| <b>Ampiezza media alveo bagnato al rilievo (m)</b>                             | Coincide con l'alveo di morbida   | Coincide con l'alveo di morbida  |
| <b>Ampiezza media alveo di morbida (m)</b>                                     | 8 m   | 4 m  |
| <b>Ampiezza media alveo di piena (m)</b>                                       | 18 m  | 8 m  |
| <b>Morfologia dell'alveo</b>   |   |  |
| <b>Confinato</b>   | X   | X  |
| <b>Non confinato</b>   |   |  |
| <b>Semiconfinato</b>   |   |  |
| <b>Condizioni idrologiche</b>  |   |  |
| <b>Morbida/magra</b>   | X   | X  |
| <b>Magra</b>   |   |  |
| <b>Andamento della portata</b><br>(rispetto al periodo antecedente il rilievo) |   |  |
| <b>In aumento</b>  |   |  |
| <b>Stabile</b>   |   |  |
| <b>In diminuzione</b>  | X   | X  |
| <b>Velocità della corrente</b>   |   |  |
| <b>Lenta</b>   |   |  |
| <b>Media</b>   | X   | X  |
| <b>Elevata</b>   |   |  |
| <b>Molto elevata</b>   |   |  |

| <b>SCHEDA DI RILEVAMENTO</b>   |  |   |
|--|--|---|
|  | <b>IRNO MONTE</b>  | <b>IRNO VALLE</b>   |
| <b>Turbolenza</b>  |  |   |
| Assente  |  |   |
| Limitata   | X  | X   |
| Da media a forte   |  |   |
| <b>Ombreggiamento</b>  |  |   |
| Nulla  | X  |   |
| Parziale   |  | 30 %  |
| Totale   |  |   |
| <b>Trasparenza dell'acqua</b>  |  |   |
| Nulla  |  |   |
| Parziale*  |  |   |
| * rispondere: leggermente opalescente, opalescente, leggermente torbida                                  |  |   |
| Totale   | X  | X   |
| <b>Struttura del substrato dell'alveo bagnato</b>  |  |   |
| Diversificato e stabile  |  |   |
| Movibile a tratti  | X  | X   |
| Facilmente mobile  |  |   |
| Uniformemente compatto   |  |   |
| Compatto per artificializzazione   |  |   |
| <b>Granulometria (% abbondanza delle classi granulometriche):</b>  |  |   |
| Roccia   |  |   |
| Massi  | 40   |   |
| Ciottoli   | 40   | 10  |
| Ghiaia   | 20   | 30  |
| Sabbia   |  | 30  |
| Limo   |  | 30  |
| Substrato artificiale  |  |   |
| <b>Fenomeni erosivi: assenti o molto limitati (1); localizzati (2); diffusi (3) ; molto evidenti (4)</b> |  |   |
| riva sx<br>riva dx   | 3 (non evidenti ma argini sostituiti da opere artificiali)<br>3                                    | 3 (non evidenti ma argini sostituiti da opere artificiali)<br>3                               |
| <b>Integrità idromorfologica:</b>  |  |   |
| Presenza di dighe a monte  | NO   | NO  |
| Presenza di dighe a valle  | NO   | NO  |
| Presenza di <i>hydropeaking</i>  | NO   | NO  |
| Integrità della sezione trasversale  | NO<br>(argini sostituiti da manufatti in cemento armato. Presenza di edifici a ridosso dell'alveo) | NO<br>(argini sostituiti da manufatti in cemento armato. Presenza di sbarramenti artificiali) |
| Integrità della sezione longitudinale (in pianta)  | NO<br>(presenza di soglie a valle della stazione di campionamento)                                 | SI  |

| <b>SCHEDA DI RILEVAMENTO</b>  |   |                         |
|---|---|-------------------------|
|   | <b>IRNO MONTE</b>   | <b>IRNO VALLE</b>       |
| <b>Opere di artificializzazione nella stazione e nel suo intorno:</b>   |   |                         |
| riva sx   | SI  | SI                      |
| riva dx   | SI  | SI                      |
| alveo   | SI  | NO                      |
| <b>Uso del suolo nel territorio circostante il corridoio fluviale:</b><br>(estensione % in una fascia perifluviale di ampiezza 500 m; per fiumi grandi e molto grandi: 1 km)  |   |                         |
| Aree naturali   |   |                         |
| Aree seminaturali   |   |                         |
| Agricoltura estensiva   |   |                         |
| Agricoltura intensiva   |   |                         |
| Aree urbanizzate, industriali, strade ed infrastrutture   | X<br>riva sx e riva dx                                    | X<br>riva sx e riva dx  |
| <b>Attività recenti di disturbo antropico nel corridoio fluviale</b><br>(valutare estensione ed intensità: 1 lieve, 2 medio, 3 elevato)<br>(considerare sino a 100 m di ampiezza, in funzione delle dimensioni del corso d'acqua) |   |                         |
| Manutenzione della vegetazione acquatica  | X<br>riva dx<br>(aglio della vegetazione arborea riparia) |                         |
| Calpestamento umano e/o animale   |   | X<br>riva dx            |
| Sfalcio   |   |                         |
| Diserbo   |   |                         |
| Presenza di terreno di riporto/rimaneggiamento  |   |                         |
| Presenza di rifiuti   |   |                         |
| Incendio  |   |                         |
| <b>PARAMETRI FISICO CHIMICI</b>   |   |                         |
| Conducibilità ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )   | 599,5   | 591                     |
| Temperatura acqua ( $^{\circ}\text{C}$ )  | 14,5 $^{\circ}\text{C}$                                   | 17 $^{\circ}\text{C}$   |
| Temperature aria  | 27,5 $^{\circ}\text{C}$                                   | 28,5 $^{\circ}\text{C}$ |
| Ossigeno disciolto (mg/L)   | 5,95  | 5,97                    |
| pH  | 7,83  | 8,21                    |

## 5 MATERIALI E METODI

Le attività analitiche sono state eseguite su campioni di *Nasturtium officinale*, *Veronica beccabunga*, *Apium nodiflorum*, sui sedimenti fluviali e acqua superficiale, campionate nelle stazioni monte e valle e in un punto di risorgiva, lungo l'asta fluviale dell'Irno.

5.1 Determinazione dei livelli di proteine HSP70, presso il Dipartimento di Biologia, Università Federico II di Napoli:

5.1.1 Estrazione e determinazione delle proteine solubili tramite saggio di Bradford.

5.1.2 Elettroforesi in condizioni denaturante (SDS-PAGE).

5.1.3 Rivelazione dei livelli di proteine HSP70 mediante tecnica del Western Blotting utilizzando anticorpi specifici anti-HSP70.

5.2 Analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), presso CESMA, Centro dei Servizi Metrologici Avanzata, Sezione di microscopia, Università Federico II di Napoli.

5.3 Determinazione dei metalli pesanti su campioni di foglie e radici delle macrofite acquatiche e nei sedimenti fluviali, attraverso spettrometria ad assorbimento atomico (Spectra AA220 FS, Varian), presso il Dipartimento di Biologia, Università Federico II di Napoli.

5.4 Analisi chimiche e chimico-fisiche dei campioni di acqua superficiale, presso il Dipartimento di Chimica, Università Federico II di Napoli.

5.5 Analisi microbiologiche dei campioni di acqua superficiale, presso il Dipartimento di Biologia, Università Federico II di Napoli.

Seguono immagini dei campioni di foglie e radici (Fig 5.1) e dei sedimenti fluviali (Fig 5.2) oggetto delle determinazioni analitiche.



**Fig: 5.1:** Campioni di foglie e radici di *Veronica beccabunga*.



**Fig: 5.2:** Campioni di sedimenti fluviali prelevati nelle stazioni monte e valle dell'impatto antropico.

## 5.1 Determinazione dei livelli di proteine HSP70

### 5.1.1 Estrazione e determinazione delle proteine solubili

I campioni di foglie e radici delle macrofite acquatiche sono stati lavati con acqua distillata e asciugati con carta assorbente. Per la preparazione degli estratti, le foglie e le radici sono stati polverizzati con azoto liquido con l'ausilio di mortaio e pestello; 300 mg di campione polverizzato è stato successivamente omogenizzato con il tampone di estrazione (32 mM Tris HCL, pH 8.0; 10 mM EDTA; 1 mM  $\beta$ -mercaptoetanol; 0.5% di Triton X-100; 2 mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) ) in un rapporto di 1:2 tra peso fresco del campione e volume di tampone d'estrazione, mediante l'utilizzo di un omogeneizzatore automatico TissueLyser con due sfere di acciaio per ciascun campione (Stainless Steel Beads;  $\varnothing$  5 mm).

L'omogenato è stato centrifugato a 4°C per 20 min a 13000 rpm in una centrifuga Thermo Scientific SL16R; il surnatante contenente le proteine solubili è stato nuovamente centrifugato per 10 min. Il surnatante è stato utilizzato per le determinazioni successive.

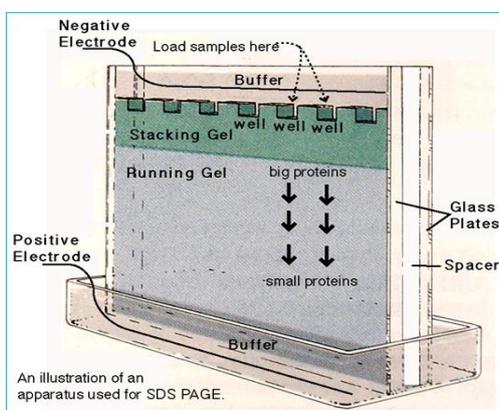
La concentrazione delle proteine è stata determinata mediante il saggio del Blue-Coomassie R-250 (Bradford, 1976), misurando l'assorbanza a 595 nm allo spettrofotometro (Agilent Technologies, Cary 60 UV-Vis). Aliquote di estratto (2-4  $\mu$ l) è stato saggiato mediante il reattivo di Bradford Protein Assay (Bio-Rad) secondo le istruzioni fornite dal fabbricante. I valori misurati sono stati confrontati e calcolati utilizzando una retta di taratura ottenuta a concentrazioni note di BSA (albumina di siero bovina).

### 5.1.2 Elettroforesi in condizioni denaturante (SDS-PAGE)

L'elettroforesi SDS PAGE è una tecnica che permette la separazione delle proteine in relazione al loro peso molecolare, mediante l'uso di un particolare tipo di gel di poliacrilammide.

I gel sono polimerizzati in supporti verticali che permettono di ottenere gel di dimensioni 8,5 cm x 6,5 cm con spessore di 1 mm.

Il gel è costituito da due parti: una parte superiore ed una inferiore. La parte superiore, definita *stacking*, è caratterizzata da una percentuale di acrilammide pari al 4% (p/v) e da un valore di pH pari a 6.8. La sua funzione è quella di rendere uniforme il punto di partenza della corsa elettroforetica per tutte le proteine presenti nel campione. La parte inferiore, più ampia, è definita "*running*" o "*resolving*" ed è caratterizzata da un valore di pH pari a 8,8 ed una concentrazione di acrilammide pari al 10% (p/v). Essa ha il compito di rendere possibile la separazione delle proteine in funzione del peso molecolare (Fig. 5.3).



**Fig 5.3:** Illustrazione schematica di un supporto per SDS PAGE.

- **Running gel.** E' una soluzione di poliacrilammide al 10% utilizzata per la realizzazione della porzione di gel deputata alla separazione delle proteine in base al loro peso molecolare.

Per polimerizzare 5 mL di *running* sono stati aggiunti 5 $\mu$ l di TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiammina, catalizzatore della reazione di polimerizzazione) e 50 $\mu$ l di ammonio persolfato 10 mg/mL (APS, iniziatore radicalico). La polimerizzazione del gel procede attraverso una reazione a catena e del tipo testa-coda. Il TEMED (tetrametil-etilen-diammina, catalizzatore) innesca la reazione in presenza di APS (Ammonio-Persolfato, iniziatore) che si decompone rilasciando radicali liberi, e avviando il processo per la formazione di legami crociati che determinano le dimensioni dei pori del gel. Tale polimerizzazione è un esempio di catalisi radicalica, in cui i radicali liberi a causa della presenza di un elettrone spaiato, si appaiono con un altro elettrone per stabilizzare la molecola, reagendo quindi con un monomero di acrilammide.

| <b>Running 10%</b>     |             |
|------------------------|-------------|
| H <sub>2</sub> O       | 4,010 ml    |
| Tris HCl 1,5mM, Ph 8.8 | 2,500 ml    |
| Acrilammide 30%        | 3,340 ml    |
| SDS 10%                | 100 $\mu$ l |
| APS 10%                | 50 $\mu$ l  |
| TEMED                  | 5 $\mu$ l   |

- **Stacking gel.** È una soluzione caratterizzata da una più bassa percentuale di acrilammide (4%) rispetto al running gel; ciò determina la formazione di maglie più larghe che servono solo a posizionare i campioni proteici su una stessa linea di partenza e a creare lo spazio in cui caricarli.

Per far polimerizzare lo stacking (2.5 mL) sono stati aggiunti 5 $\mu$ l di TEMED e 18,5 $\mu$ l di APS 10 mg/mL.

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| <b>Stacking 4%</b>    |          |
| H <sub>2</sub> O      | 2,258 ml |
| Tris HCl 0,5mM Ph 6.8 | 945 µl   |
| Acrilammide 30%       | 501 µl   |
| SDS 10%               | 37,5 µl  |
| APS 10%               | 18,5 µl  |
| TEMED                 | 5 µl     |

Tampone di corsa:

|                  |          |
|------------------|----------|
| TRIS             | 6,056 gr |
| GLICINA          | 28,82 gr |
| SDS              | 2 gr     |
| H <sub>2</sub> O | 1 L      |

Prima di procedere al caricamento degli estratti di ciascun campione, gli stessi sono stati denaturati al calore in presenza di SDS e  $\beta$ -mercaptoetanololo (100°C per 10 min).

Grazie alle caratteristiche del gel, le proteine denaturate vengono separate in base al peso molecolare.

Per verificare l'esatto peso molecolare delle proteine, un pozzetto è stato caricato con una soluzione di marker a pesi molecolari noti (2-5µl).

Gli estratti sono stati caricati nel gel di poliacrilammide al 10% alla medesima concentrazione di proteine (21µg/µl), in condizioni denaturante, e sottoposti a un campo elettrico di 180 V e 40 mA 10 W per circa 40 minuti in una cella per elettroforesi BIO-RAD Mini-Protean Tetra System, riempita con un opportuno tampone di corsa, sopra riportato.

### **5.1.3 Rivelazione dei livelli delle proteine HSP70 mediante tecnica del Western**

#### **Blotting (WB)**

Con la tecnica del WB è possibile trasferire le proteine, separate durante l'elettroforesi, dal gel di poliacrilammide ad una membrana di nitrocellulosa, al fine di poter identificare la proteina di interesse grazie alla reazione con un anticorpo

specifico. Il trasferimento delle proteine sul supporto di nitrocellulosa avviene applicando una corrente elettrica in un ambiente a pH basico (comunemente pH 8.5).

Il WB consta di 4 fasi sequenziali:

- allestimento Sandwich;
- trasferimento;
- sviluppo;
- rivelazione.



**Fig 5.4:** Supporto Western blotting

Si costruisce la cosiddetta struttura a sandwich, utilizzando un apposito supporto. Partendo dal lato nero del supporto e, quindi dal basso verso l'alto, si definisce la seguente stratificazione (Fig. 5.4- 5.5):

- Spugna
- Carta assorbente
- Gel SDS PAGE
- Membrana di nitrocellulosa
- Carta assorbente
- Spugna.

Una volta chiuso a sandwich, il supporto è stato posto in un'apposita cella (BIO-RAD Mini-Protean Tetra System), ricoperto di tampone di trasferimento e sottoposto ad un campo elettrico di 9V/25V, 300 mA a 4°C (2 ore oppure overnight).

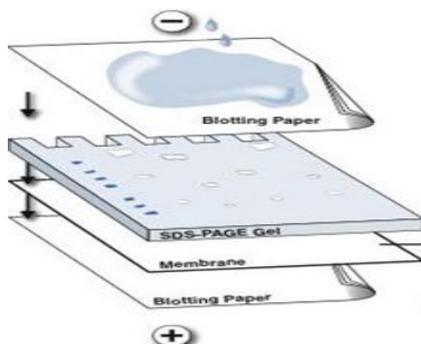


Fig 5.5: Allestimento sandwich

Al termine della procedura si controlla l'avvenuto trasferimento osservando il corretto posizionamento dei markers colorati sulla membrana di nitrocellulosa e colorando il filtro con rosso Ponceau, così da visualizzare le proteine trasferite sulla membrana stessa. Il filtro è quindi rapidamente decolorato sotto acqua corrente.

Si procede a incubare il filtro con una soluzione di tampone fosfato (TBS) contenente il detergente Tween-20 allo 0.1% (*TBS-Tween*) ed albumina da siero bovino (BSA) all' 1% per 1 ora a temperatura ambiente, al fine di saturare i siti di legame aspecifici.

In seguito, il filtro è incubato per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo primario anti HSP70 diluito in *TBS-Tween* contenente BSA all'1%. Dopo 3 lavaggi per 10' con *TBS-Tween*, si continua a incubare il filtro con l'anticorpo secondario anti-rabbit IgG (peroxidase conjugate-Sigma) diluito 1:16000 in *TBS-Tween*.

L'anticorpo secondario riconosce specificamente l'anticorpo primario ed è generalmente coniugato con composti che ne permettono l'evidenza (di solito la perossidasi di rafano HRP). La perossidasi di rafano in presenza di perossido d'idrogeno ossida il suo substrato, il luminolo, con concomitante emissione di luce. Al termine dell'incubazione con l'anticorpo secondario vengono effettuati lavaggi in *TBS-Tween* (3x10').

La rivelazione della presenza delle proteine avviene mediante chemiluminescenza, (ECL). Perossido di idrogeno e luminolo sono contenuti nel kit ECL (Western Bright™ Quantum, ADVANSTA) che, dopo esser stato emulsionato, è pipettato sulla membrana. Quest'ultima è poi posta in un rilevatore fornito di telecamera e software ChemiDoc (BIO-RAD XRS) (Fig 5.6).



Fig: 5.6: ChemiDoc (BIO-RAD XRS).

## 5.2 Analisi al microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

La preparazione dei campioni per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è stata articolata nelle seguenti fasi (Dykstra, 1992):

- fissazione,
- disidratazione,
- inclusione in resina,
- ultramicrotomia,
- colorazione.

I campioni, precedentemente selezionati (Fig 5.7), sono stati fissati in soluzione di glutaraldeide al 3% (Agar Scientific, U.K.) in tampone fosfato (0,065M;pH 7,2-7,4) per 1,5 ore a temperatura ambiente e post-fissati in soluzione di osmio all'1% (Agar Scientific, U.K.) in tampone fosfato (0,065 M; pH 7,2-7,4) per 1,5 ore a temperatura ambiente.

La disidratazione è stata eseguita con concentrazioni crescenti di alcol etilico (serie crescente degli alcoli) fino all'alcol etilico assoluto.

Il campione, dopo passaggio per 20 minuti in ossido di propilene assoluto (Merck, Germany), è stato poi sottoposto ad inclusione tramite passaggi in soluzioni di ossido di propilene a concentrazioni crescenti di resina epossidica Spurr (Agar Scientific, U.K.) fino alla resina assoluta.

Dopo polimerizzazione in stufa a 70°C per 24 ore, i blocchetti di resina contenenti il campione sono stati sottoposti ad ultramicrotomia, ottenendo sezioni ultrasottili di 70-80 nm (Fig 5.8).

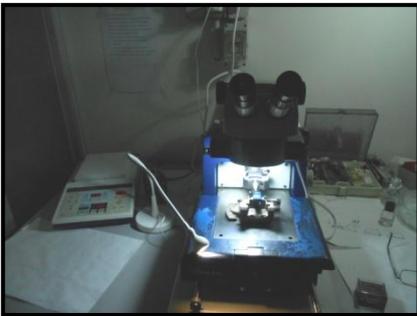
Queste ultime, raccolte su retini di rame (Fig 5.9), sono state colorate con soluzioni di acetato di uranile e citrato di piombo.

Le osservazioni ultrastrutturali sono state eseguite al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) FEI EM 208S, con una tensione di accelerazione di 80 KV (Fig 5.10).

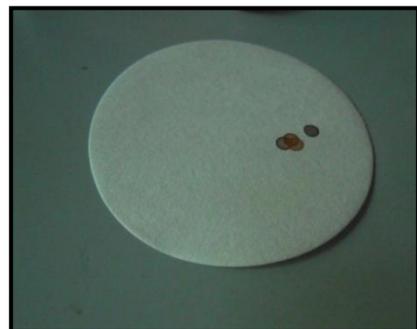
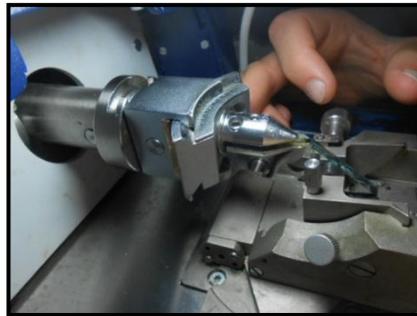
Le osservazioni sono state eseguite su 3 campioni diversi di ciascuna piantina.



**Fig 5.7:** Fase preparatoria del campione.



**Fig 5.8:** Ultramicrotomo.



**Fig 5.9:** Retini di rame



**Fig 5.10:** Microscopio elettronico a trasmissione (TEM) FEI EM 208S

### **5.3 Determinazione dei metalli pesanti su campioni di foglie e radici delle macrofite acquatiche e nei sedimenti fluviali**

Per determinare la concentrazione dei metalli in osservazione (Pb, Cu, Cd), i campioni di foglie e radici delle macrofite acquatiche e sedimenti fluviali sono stati essiccati in stufa a 105 °C e polverizzati tramite polverizzatore a biglie di agata.

In particolare, 250 mg di campione, pesati in tubi di digestione in teflon, sono stati sottoposti ad attacco acido (Fig 5.11), aggiungendo 4 ml di HNO<sub>3</sub> (65%) e 2 ml di HF (50%). Per il bianco sono state utilizzate le stesse quantità dei due acidi senza l'aggiunta di campione.

Il protocollo sperimentale utilizzato consente un'efficace mineralizzazione chimica; i tubi sono stati chiusi ermeticamente con appositi tappi a pressione e posti in un fornello a microonde Milestone (Digester/Dryng Module mls 1200) con i seguenti programmi per la digestione:

#### Campioni sedimenti fluviali:

1. 250 watt per 5 minuti;
2. 400 watt per 5 minuti;
3. 0 watt per 2 minuti;
4. 500 watt per 5 minuti;
5. 0 watt per 2 minuti;
6. 400 watt per 5 minuti;

7. 0 watt per 2 minuti;
8. 400 watt per 5 minuti;
9. 0 watt per 2 minuti;
10. 400 watt per 5 minuti.

Campioni di foglie e radici di macrofite acquatiche:

1. 250 W per 2 minuti;
2. 0 W per 2 minuti;
3. 250 W per 5 minuti;
4. 0 W per 2 minuti;
5. 500 W per 5 minuti.

Dopo il raffreddamento in un bagnetto d'acqua a temperatura ambiente per 10 minuti, i tubi sono stati aperti e le soluzioni ottenute dalla digestione sono portate al volume di 50 ml con acqua deionizzata in matracci di plastica.

I campioni sono stati analizzati attraverso spettrometria ad assorbimento atomico (Spectra AA220 FS, Varian).

I valori di Pb, Cu, Cd, espressi in  $\mu\text{g g}^{-1}$  p.s., sono stati ricavati in base alla curva di taratura costruita dallo strumento che effettua diluizioni per gradiente a partire da una soluzione a concentrazione nota fornita dall'operatore. I risultati sono successivamente riferiti alle unità di peso dei campioni essiccati.

Le analisi sono state condotte in triplice replica per ciascun campione.



**Fig 5.11:** Attacchi acidi

## 5.4 Analisi chimiche, chimico-fisiche dei campioni di acqua superficiale

(APAT-IRSA-CNR- Metodi Analitici per le acque)

### Determinazione di anioni e cationi

Anioni quali nitriti, nitrati e solfati e cationi quali il calcio sono stati determinati attraverso la cromatografia ionica, una forma di cromatografia liquida che grazie a resine di scambio ionico, separa gli ioni sfruttando le diverse caratteristiche di reazione degli analiti cercati.

L'analisi di scambio ionico produce un cromatogramma che ci permette di identificare i componenti della miscela e le loro quantità.

In tale cromatogramma sono visibili i picchi, uno per ciascuna specie ionica. Dall'integrazione delle aree dei singoli picchi cromatografici si ricavano le concentrazioni dei cationi/anioni mediante confronto con curve di calibrazione ottenute iniettando, nelle medesime condizioni sperimentali adottate per i campioni, soluzioni a concentrazioni note (comprese nel campo di indagine analitica).

### Determinazione della conducibilità.

Per la misurazione è stato utilizzato un misuratore universale: si è collegato al *Multi 340i/SET WTW* l'elettrodo *TetraCon325* dotato di sonda termometrica. Prima dei prelievi dei campioni lo strumento viene calibrato utilizzando soluzioni standard di conducibilità nota.

La misura viene riferita ad elettrodi con superficie di  $1 \text{ cm}^2$  posti alla distanza di 1 cm. La resistenza, infatti, varia in maniera direttamente proporzionale con la lunghezza e inversamente proporzionale con la sezione. Il valore della conducibilità viene generalmente espresso in micro-Siemens per centimetro ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) e in Siemens per centimetro ( $\text{S}/\text{cm}$ ).

### Determinazione potenziometrica dell'alcalinità

Il campione è stato titolato direttamente aggiungendo volumi noti di soluzione di riferimento di HCl e annotando, dopo ogni aggiunta, il valore del pH misurato con il pHmetro.

### Determinazione della durezza

La durezza totale è stata calcolata mediante la determinazione degli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  presenti nel campione d'acqua per cromatografia a scambio ionico.

Era poi convertita la somma delle concentrazioni molari di  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  per il peso molecolare del  $\text{CaCO}_3$ .

### Determinazione del pH.

Per la misura è stato utilizzato un misuratore portatile, *Multi 340i/SET WTW*, al quale si collega il pH-metro electrode Sen Tix 41. Lo strumento prima del prelievo dei campioni, viene calibrato con due standard uno a pH 4 e l'altro a pH 7.

### Determinazione dei metalli pesanti (Pb, Cu, Cd)

Per la determinazione del Pb, Cu, Cd è stato utilizzato l'ICP-MS (spettrometria di massa accoppiata induttivamente al plasma), con il metodo EPA6020.

## **5.5 Analisi microbiologiche dei campioni di acqua superficiale**

(APAT-IRSA-CNR- Metodi Analitici per le acque)

### **5.5.1 Coliformi totali e *Escherichia coli***

I coliformi totali sono un gruppo di batteri a forma di bastoncello, gram negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, capaci di fermentare il lattosio a 37°C. Nel gruppo sono presenti specie riscontrabili nel materiale fecale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, sia specie in grado di colonizzare acque, suolo e vegetazione e suoli contaminati.

*Escherichia coli* è un microrganismo a forma di bastoncello gram-negativo, aerobio ed anaerobio facoltativo, fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, inserito nel gruppo dei coliformi totali. Produttori di indolo in terreni al triptofano, fermenta il lattosio sia a 37°C che 44°C. In rapporto esclusivo con il tratto gastrointestinale dell'uomo e dei mammiferi, rappresenta l'indicatore primario di inquinamento di origine fecale.

## Metodi di analisi

I metodi per la determinazione dei Coliformi totali e *Escherichia coli*, consistono di una prova normalizzata basata sulla norma ISO 9308-1:2014 che prevede: filtrazione di 100 ml di campione su membrane sterili di nitrocellulosa con porosità nominale di 0,45µm e 47 mm di diametro e successiva incubazione della stessa sul terreno selettivo cromogeno (Chromogenic coliform agar, Biolife) a 36°C ± 2 °C per (21 ± 3) h. Le colonie caratteristiche, sviluppatasi sulla membrana, vengono sottoposte a prove di conferma per stabilire l'appartenenza al gruppo dei coliformi. Dopo incubazione si esaminano le membrane e si contano le colonie di colore dal rosa al rosso (positive alla β-D-galattosidasi) come presuntivi batteri coliformi e tutte le colonie dal blu scuro al viola (positive alla β-D-galattosidasi e alla β-D-glucuronidasi come *E.coli*). Per confermare i presuntivi batteri coliformi, si esegue il test dell'ossidasi. Al test si sottopongono tutte o dieci colonie dal rosa al rosso, subcolturate precedentemente su terreno massimo ed incubate a 36°C ± 2 °C

Le colonie caratteristiche che danno la reazione ossidasi negativa sono contate come Coliformi totali.

La concentrazione di Coliformi totali è stata calcolata in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, considerando l'eventuale diluizione e riportando il valore come numero per 100 mL di campione.

### **5.5.2 Enterococchi**

Microrganismi gram-positivi e catalasi-negativi di forma tondeggianti; si presentano isolati, doppi o più frequentemente a catena e sono provvisti dell'antigene D, quindi non emolitici. Sono organismi anaerobi facoltativi (preferiscono consumare ossigeno, ma possono comunque sopravvivere anche in assenza di esso) e sopportano un ampio intervallo di temperature. Sono in grado di ridurre il 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro a formazano e di idrolizzare l'esculina a 44 °C.

Sebbene storicamente si consideravano i termini streptococchi fecali, enterococchi, enterococchi intestinali e gruppo *Enterococcus* come sinonimi nel caso delle specie rilevabili nell'ambiente, recentemente sulla base di tecniche di ibridizzazione del DNA, sono stati individuati due generi diversi *Enterococcus* e *Streptococcus* comprendenti specie intestinali o di sicura origine fecale. Nel genere *Streptococcus* si individuano gli streptococchi orali, poco adattabili alla sopravvivenza nell'intestino e gli streptococchi di prevalente derivazione animale con habitat intestinale

(streptococchi intestinali). La presenza di s. intestinali è comunque sempre prevalente rispetto alla loro concentrazione nelle feci umane. La presenza di enterococchi nelle acque destinate al consumo umano è da mettere in relazione a sicura contaminazione di origine fecale.

### Metodi di analisi

È stata filtrata un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità nominale di 0,45µm e 47 mm di diametro; è stata posta la membrana sulla superficie del terreno di Slanetz e Bartley (Oxoid) e si è proceduto all'incubazione a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  per  $44\pm 4$  ore, secondo la norma ISO 7899-2:2000.

Dopo l'incubazione sono state contate le colonie cresciute entro le 44 ore che mostrano lo sviluppo di una colorazione dal rosa al rosso scuro e marrone (al centro o su tutta la colonia) come Enterococchi presuntivi.

Per la conferma dell'appartenenza al genere Enterococchi di colonie ritenute Enterococchi presuntivi è stata effettuata la verifica della presenza degli stessi attraverso la capacità di idrolizzare l'esculina. In particolare, la prova sfrutta la capacità degli Enterococchi di idrolizzare l'esculina, glucoside di origine vegetale, presente nel mezzo di crescita, alla temperatura di  $44 \pm 1^{\circ}\text{C}$  in 2 ore.

In presenza di colonie tipiche, la membrana è stata trasferita sul terreno all'Esculina bile azide agar (Oxoid) pre-riscaldato a  $44^{\circ}\text{C}$ , incubata a  $44\pm 1^{\circ}\text{C}$  per 2 ore. Gli enterococchi idrolizzano l'esculina a esculetina e glucosio. L'esculetina reagisce con un sale ferrico, il citrato di ammonio ferrico, formando un complesso di colore marrone scuro o nero.

Dopo incubazione sono state confermate le colonie in corrispondenza delle quali, sul retro della membrana, sul terreno all'esculina, è comparso un alone nero-marrone.

La concentrazione di enterococchi è stata calcolata in base al numero di colonie contate e sottoposte a conferma, considerando l'eventuale diluizione e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 ml di campione (UFC/100 ml).

Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati della prova di conferma, è stato calcolato il numero di microrganismi presenti in 100 ml del campione.

### 5.5.3 Test di tossicità acuta con *Daphnia magna*

L'organismo utilizzato per il saggio è il crostaceo cladocero della specie *Daphnia magna Straus*. Il metodo consente nel determinare l'inibizione della mobilità della *Daphnia magna Straus*.

È stata valutata la concentrazione del campione che immobilizza il 50% degli organismi testati dopo 24 h.

I saggi sono stati eseguiti in bicchieri di vetro borosilicato per evitare processi di adsorbimento o rilascio di sostanze che possano interferire col saggio. Tali recipienti, aventi un volume utile di 50mL, sono stati posti in una camera termostata, alla temperatura di 20±2°C in assenza di illuminazione.

La preparazione delle soluzioni e le diluizioni sono state effettuate con acqua con pH 7,5-8,5; alcalinità 110-120 mg CaCO<sub>3</sub>/L e durezza 140-160 mg CaCO<sub>3</sub>/L.

Le soluzioni sono state aerata per 24 ore prima del suo impiego, alla temperatura di 20°C, con aria compressa priva di contaminanti.

Per i saggi sono utilizzati i neonati di *D. magna* di età inferiore alle 24 ore. Sono da scartare i piccoli provenienti da colture in riproduzione sessuata, con elevata mortalità, bassa natalità o con altri sintomi evidenti di condizioni colturali non adeguate.

La prova è stata eseguita con quattro repliche sul campione non diluito su successive diluizioni scalari.

In ogni contenitore sono trasferiti 50 mL del campione in esame. In ciascuno dei recipienti sono trasferiti 5 neonati di *Daphnia*. L'operazione è condotta riducendo al minimo il volume d'acqua aspirato con le daphniae al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Durante il test, agli animali non viene somministrata alcuna alimentazione. Al termine del saggio sono stati contati gli organismi immobili, cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore. Con i dati raccolti nella prova a 24 ore è stata calcolata la % di immobilizzazione.

Per percentuali di immobilizzazione inferiore al 50% il campione si ritiene non tossico.

## 6 RISULTATI

### 6.1 Matrice acqua superficiale

Analisi chimiche e chimico-fisiche. I risultati analitici dei campioni prelevati nelle stazioni identificate come risorgiva, monte e valle (prelievi negli anni 2014-2015) sono indicati nella Tabella 6.1.1.

Bisogna sottolineare che in assenza di limiti normativi applicabili ai corpi idrici superficiali, si illustrano i valori di riferimento riportati in letteratura.

|                       | pH  | Alcalinità/<br>bicarbonati<br>(mg/l) | Durezza<br>(°f)  | Conducibilità<br>(µS/cm)  |
|-----------------------|---|--------------------------------------|--|---|
| Valori di riferimento | 6,5-8<br>7,5-8,5<br>aree ricche di minerali | bassa < 100 mg/L                     | da 0 a 7 dolcissime<br>da 7 a 15 dolci<br>da 15 a 22 dure<br>da 22 a 35 molto dure<br>> 35 durissime | tra 15 e 50 - corsi di montagna<br>tra 150 e 450 - acque dolci<br>800 e oltre - corsi di acqua di pianura |
| RISORGIVA             | 6,6   | 517                                  | -  | 623   |
| MONTE                 | 7,83 ± 0,16                                 | 376,5 ± 5,5                          | 29,6   | 599,5 ± 6,45  |
| VALLE                 | 8,21 ± 0,01                                 | 313 ± 63                             | 33,1   | 591 ± 7   |

**Tab 6.1.1:** Risultati analitici dei principali parametri chimici e chimico-fisici analizzati in campioni di acqua superficiale.

I parametri analizzati sembrerebbero confermare l'influenza sulle acque del Fiume Irno della litologia calcarea, in cui risulta impostato lo stesso bacino idrografico, in particolare in riferimento alla durezza, che evidenzia importanti concentrazioni di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ .

I valori di pH nei campioni "monte" e "valle" sono tamponati dall'alcalinità e indicano condizioni ottimali di vita per la maggior parte degli organismi, così come il pH del campione stazione "risorgiva".

Analisi chimiche - metalli pesanti (Pb, Cd, Cu). I risultati analitici dei campioni prelevati nelle stazioni identificate come risorgiva, monte e valle (prelievi negli anni

2014-2015) sono al di sotto dei limiti di determinazione della strumentazione utilizzata (Tabella 6.1.2).

Sono comunque riportati i limiti del Pb, Cd, Cu in riferimento al D. Lgs 172/2005 (Attuazione della Direttiva 2013/39/UE, che modifica le direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque- Tab 1/A “Standard di Qualità Ambientale nella colonna d’acqua e nel biota per le sostanze dell’elenco di priorità”), al DM 185/2003 (Valutazione della qualità delle acque a destinazione irrigua) e al D. Lgs 31/2001 (Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano) (Tabella 6.1.3).

| Risorgiva (mg/l) |          |        | Monte (mg/l) |          |        | Valle (mg/l) |          |        |
|------------------|----------|--------|--------------|----------|--------|--------------|----------|--------|
| Pb               | Cd       | Cu     | Pb           | Cd       | Cu     | Pb           | Cd       | Cu     |
| < 0,001          | < 0,0005 | < 0,01 | < 0,001      | < 0,0005 | < 0,01 | < 0,001      | < 0,0005 | < 0,01 |

**Tab 6.1.2:** Risultati analitici del Pb, Cd, Cu analizzati in campioni di acqua superficiale.

|    | D. Lgs. 172/2015<br>Sostanze prioritarie nel settore<br>della politica delle acque | DM 185/2003<br>Valutazione della<br>qualità delle acqua a<br>destinazione irrigua | D Lgs 31/2001<br>Attuazione della direttiva<br>98/83/CE relativa alla qualità<br>delle acque destinate al<br>consumo umano. |
|----|--|---|---|
| Pb | 1,2 µg/l (SQA-MA)<br>14 µg/l (SQA-CMA)   | 0,1 mg/l  | 10 µg/l   |
| Cd | 0,25 µg/l (SQA-MA)<br>1,5 µg/l (SQA-CMA)   | 0,005 mg/l  | 5,0 µg/l  |
| Cu | -  | 1 mg/l  | 1,0 mg/l  |

**Tab 6.1.3:** Limiti del Pb, Cd, Cu in riferimento al D. Lgs 172/2005, al DM 185/2003 e al D.Lgs 31/2001.

Analisi microbiologiche. I risultati analitici dei campioni prelevati nelle stazioni identificate come risorgiva, monte e valle (prelievi negli anni 2014-2015) sono indicati nella Tabella 6.1.4.

In riferimento ai campioni prelevati nelle stazioni monte e valle dell'impatto antropico è emersa una lieve contaminazione di origine fecale con partecipazione animale e umana, individuata nei parametri *E. coli* ed Enterococchi.

Il D.M. 185/2003 definisce il valore limite in riferimento a *E. coli* (10 UFC per l'80% dei campioni e 100 UFC valore puntuale massimo); il D. Lgs. 31/2001 presuppone chiaramente l'assenza sia di *E. Coli* sia di Enterococchi; mentre il D Lgs 152/2006 e ss.mm.ii non definisce un limite di accettabilità, ma colloca il parametro nell'ambito dei dati facoltativi, a supporto delle diverse componenti biologiche (EQB).

|                  | PARAMETRI               | RISULTATO | U.M                    |
|------------------|-------------------------|-----------|------------------------|
| <b>RISORGIVA</b> | Coliformi tot           | <1        | UFC/100 ml             |
|                  | <i>Escherichia coli</i> | <1        | UFC/100 ml             |
|                  | Enterococchi            | 5         | UFC/100 ml             |
| <b>MONTE</b>     | Coliformi tot           | 100       | UFC/100 ml             |
|                  | <i>Escherichia coli</i> | 55        | UFC/100 ml             |
|                  | Enterococchi            | 73        | UFC/100 ml             |
|                  | <i>Daphnia magna</i>    | 10        | (% organismi immobili) |
| <b>VALLE</b>     | Coliformi tot           | 138       | UFC/100 ml             |
|                  | <i>Escherichia coli</i> | 75        | UFC/100 ml             |
|                  | Enterococchi            | 92        | UFC/100 ml             |
|                  | <i>Daphnia magna</i>    | 10        | (% organismi immobili) |

**Tab 6.1.4:** Risultati analitici dei parametri microbiologici in campioni di acqua superficiale.

## 6.2 Matrice sedimenti fluviali

I risultati analitici dei parametri Cd, Pb, Cu relativi ai campioni fluviali prelevati nelle stazioni identificate come monte e valle, anni 2014 e 2015 (media), con i riferimenti legislativi, sono indicati nella Tabella 6.2.1 e nella Tabella 6.2.2.

| Anno 2014<br>Campionamento monte/valle | Parametri              | Risultati<br>(media in µg/g) |                     | D.Lgs 172/2015<br>Sedimenti<br>marino-costieri<br>e di transizione<br>Tab 3/A CMA<br>(mg/Kg s.s.) | D. Lgs 152/2006<br>Tab 1 all 5 titolo V Parte IV                         |   |
|--|------------------------|------------------------------|---------------------|---|--|---|
|  |                        | Monte                        | Valle               |   | Siti ad uso verde<br>pubblico, privato<br>e residenziale<br>(mg/Kg s.s.) | Siti ad uso<br>commerciale e<br>industriale<br>(mg/Kg s.s.) |
|  | <b>Cadmio<br/>(Cd)</b> | 0,08±0,018                   | 0,10±0,027          | 0,3   | 2  | 15  |
|  | <b>Piombo<br/>(Pb)</b> | 11,07±3, 2                   | <b>169,925±36,8</b> | 30  | 100  | 1000  |
| <b>Rame<br/>(Cu)</b>                   | 6,9±1,78               | 19,98±2,8                    | -                   | 120   | 600  |   |

**Tab 6.2.1:** Risultati analitici del Cd, Pb, Cu in campioni di sedimenti fluviali e riferimenti legislativi. Anno 2014.

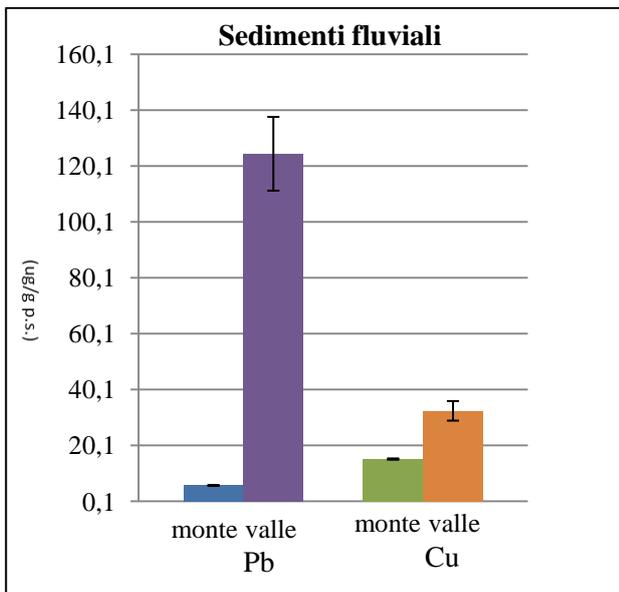
| Anno 2015<br>Campionamento monte/valle | Parametri              | Risultati<br>(media in µg/g) |                     | D. Lgs 172/2015<br>Sedimenti<br>marino-costieri<br>e di transizione<br>Tab 3/A CMA<br>(mg/Kg s.s.) | D. Lgs 152/2006<br>Tab 1 all 5 titolo V Parte IV<br>Gestione rifiuti e bonifica siti<br>inquinati |   |
|--|------------------------|------------------------------|---------------------|--|---|---|
|  |                        | Monte                        | Valle               |  | Siti ad uso verde<br>pubblico, privato<br>e residenziale<br>(mg/Kg s.s.)                          | Siti ad uso<br>commerciale e<br>industriale<br>(mg/Kg s.s.) |
|  | <b>Cadmio<br/>(Cd)</b> | 0,035±0,002                  | 0,11±0,038          | 0,3  | 2   | 15  |
|  | <b>Piombo<br/>(Pb)</b> | 5,80±0,18                    | <b>124,49±13,20</b> | 30   | 100   | 1000  |
| <b>Rame<br/>(Cu)</b>                   | 15,24±0,23             | 32,49±3,5                    | -                   | 120  | 600   |   |

**Tab 6.2.2:** Risultati analitici del Cd, Pb, Cu in campioni di sedimenti fluviali e riferimenti legislativi. Anno 2015.

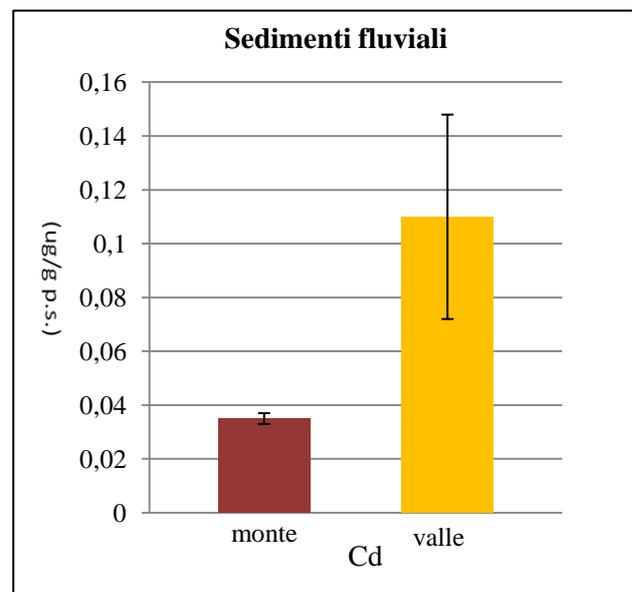
La concentrazione del Pb e del Cu nei sedimenti fluviali, espressa in ug/g p.s, risulta maggiore nella stazione di campionamento valle rispetto alla stazione monte, mentre le concentrazioni del Cd sono alquanto irrilevanti. Per maggiore chiarezza si riporta una comparazione dei risultati nelle Figure 6.2.1 e 6.2.2.

La concentrazione del Pb del campione prelevato a valle supera i limiti definiti dal D. Lgs. 172/2015.

## Concentrazione di Pb, Cu, Cd nei sedimenti (ug/g p.s.) di campioni prelevati a monte e valle dell'impatto antropico, anno 2015.



**Fig 6.2.1:** Concentrazione di Pb e Cu nei sedimenti fluviali in campioni prelevati a monte e valle dell'impatto antropico, anno 2015

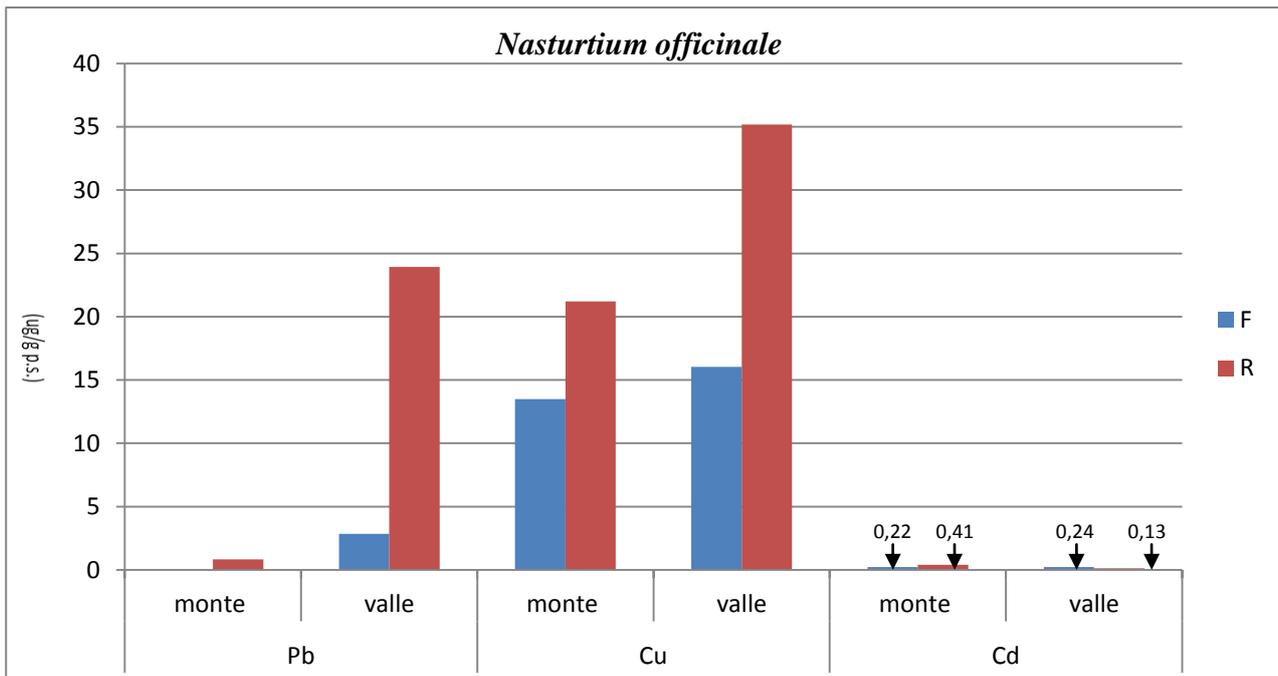


**Fig 6.2.2:** Concentrazione di Cd nei sedimenti fluviali in campioni prelevati a monte e valle dell'impatto antropico, anno 2015.

### 6.3 Matrice biota - Macrofite acquatiche

#### Determinazione di Pb, Cu, Cd

Le concentrazioni dei metalli pesanti (Pb, Cu, Cd) nelle radici e nelle foglie delle macrofite acquatiche campionate nelle stazioni monte e valle sono indicate nelle figure 6.3.1 – 6.3.2 – 6.3.3.

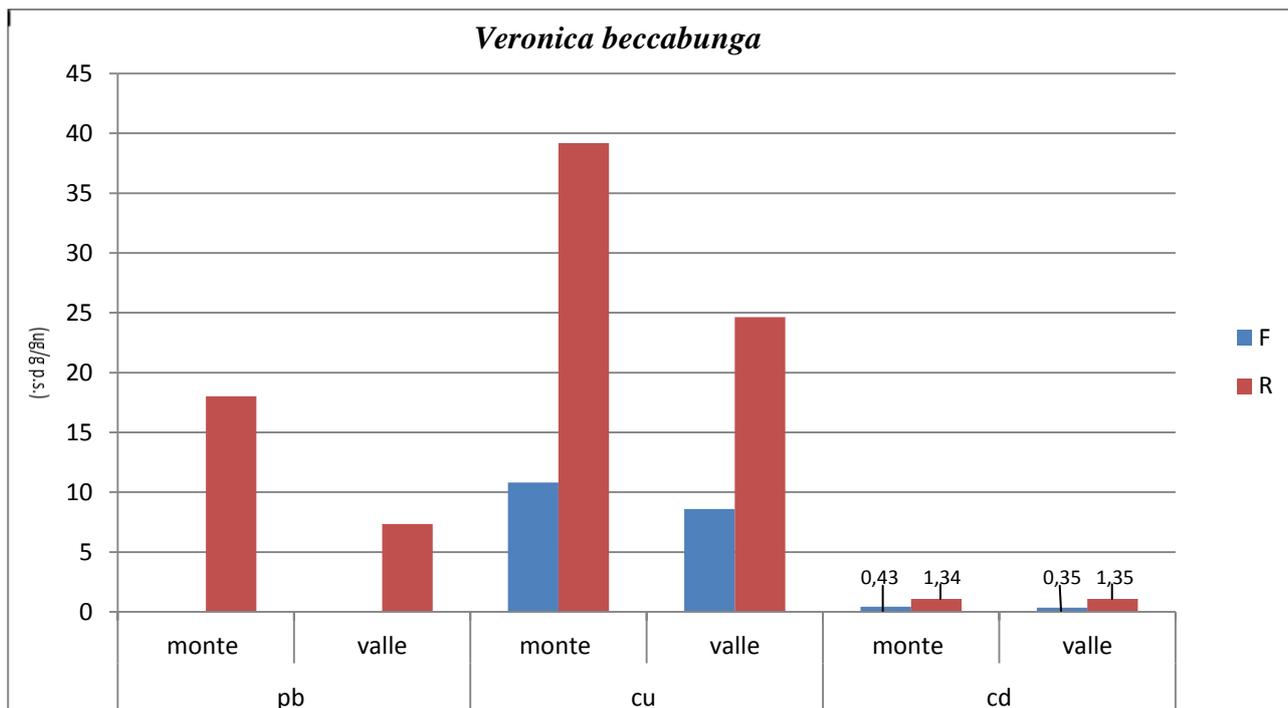


**Fig 6.3.1:** *Nasturtium officinale* - Concentrazione di Pb, Cu, Cd ( $\mu\text{g/g p.s.}$ ) stazioni monte e valle.

**Legenda:** F- foglie; R – radici

La concentrazione del Pb e del Cu in *Nasturtium officinale* è più alta nei campioni riferibili al campionamento eseguito nella stazione valle, rispetto alla stazione monte e nelle radici rispetto alle foglie in entrambe le stazioni di campionamento monte, valle (Fig 6.3.1).

La concentrazione del Cd è alquanto trascurabile sia a monte sia a valle.

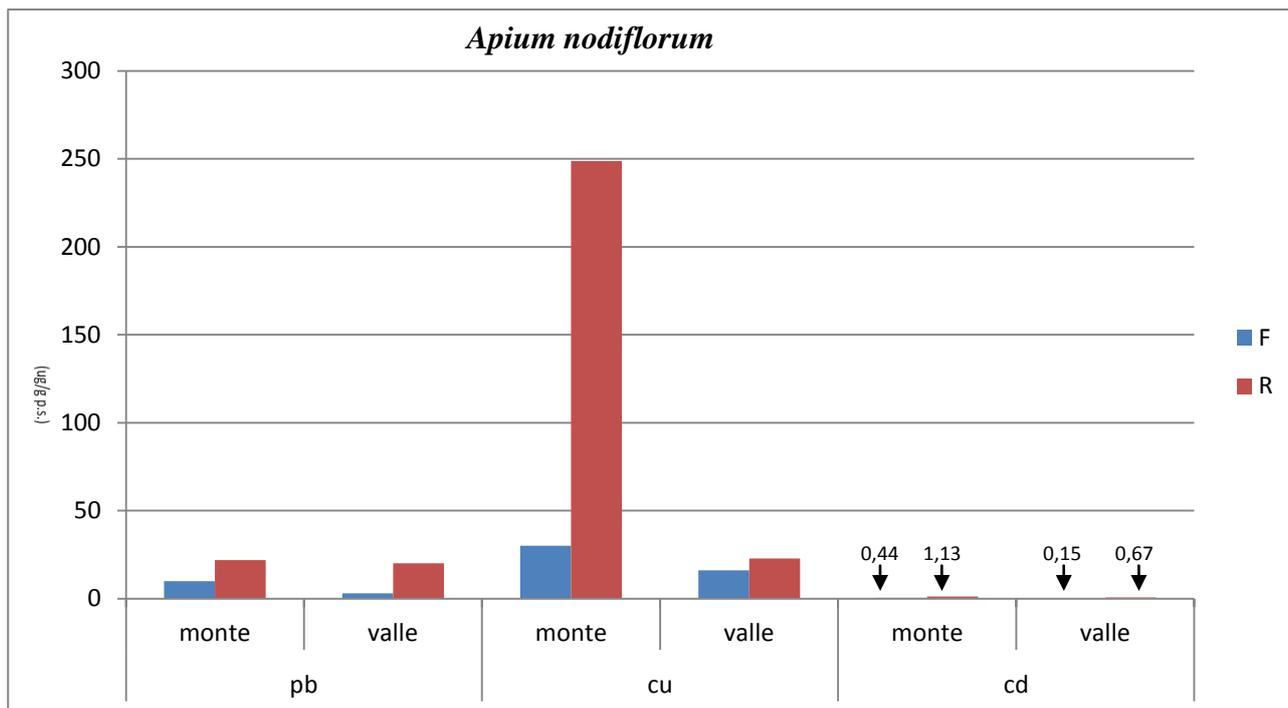


**Fig 6.3.2:** *Veronica beccabunga* - Concentrazione di Pb, Cu, Cd ( $\mu\text{g/g p.s.}$ ) stazioni monte – valle.

**Legenda:** F- foglie; R – radici

La concentrazione del Pb nelle radici e del Cu nelle radici e nelle foglie dei campioni prelevati a monte di *Veronica beccabunga* è più alta rispetto a quanto riscontrato nei campioni relativi alla stazione valle.

La concentrazione del Cd risulta trascurabile, sia nelle radici sia nelle foglie in entrambe le stazioni di campionamento (Fig 6.3.2).

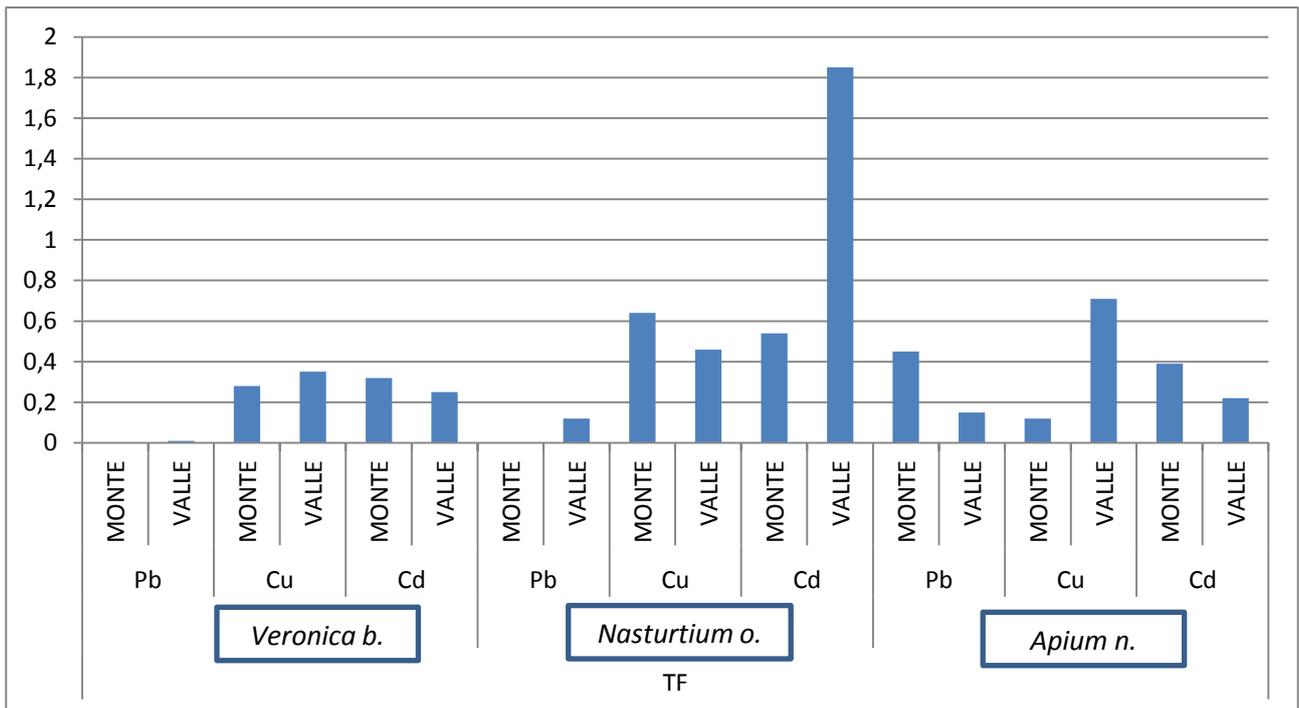


6.3.3: *Apium nodiflorum* Concentrazione di Pb, Cu, Cd (ug/g p.s.) stazioni monte – valle.

**Legenda:** F- foglie; R – radici

Nelle foglie e nelle radici dei campioni di *Apium nodiflorum* la concentrazione del Pb a monte e a valle risulta paragonabile; è stata registrata una elevata concentrazione di Cu nelle radici dei campioni della stazione monte, mentre la concentrazione del Cd continua ad essere trascurabile, sia nelle radici sia nelle foglie in entrambe le stazioni di campionamento (Fig 6.3.3).

Il fattore di traslocazione (TF), cioè la capacità di una specie vegetale di trasferire il contenuto dei metalli pesanti dalle radici alla parte aerea, è stato derivato dalla concentrazione dei metalli pesanti riscontrata nelle radici e nelle foglie. In riferimento al Pb, Cu, Cd nelle tre specie campionate nelle stazioni monte e valle è emerso un basso TF, con valori < 1 (Figura 6.3.4).

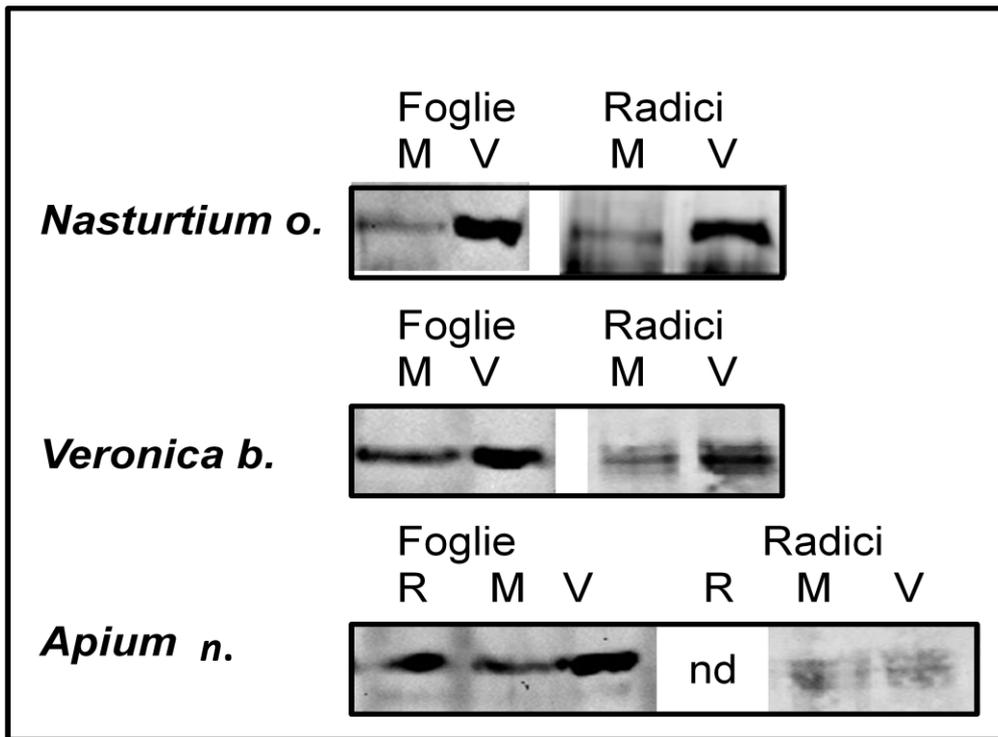


**Fig 6.3.4:** Fattore di traslocazione (TF) di Pb, Cu, Cd, relativo alle macrofite acquatiche campionate.

### Variatione dei livelli delle HSP70

L'analisi mediante elettroforesi denaturante (SDS-PAGE) e successivo Western blotting, per la determinazione dei livelli delle Heat Shock Proteins 70 (HSP70), è stata effettuata nei campioni di foglie e radici di macrofite acquatiche prelevati a monte e a valle dell'impatto antropico e nel tratto di risorgiva (Fig 6.3.5).

In *Nasturtium officinale* e in *Veronica beccabunga* è evidente una banda riferibile alle HSP70 nei campioni di foglie e radici prelevati a valle. In *Apium nodiflorum* le HSP70 sembrano ugualmente espresse nelle foglie prelevate nel tratto di risorgiva, monte e valle, mentre nelle radici i livelli di tali proteine sembrano diminuire, sia a monte sia a valle.



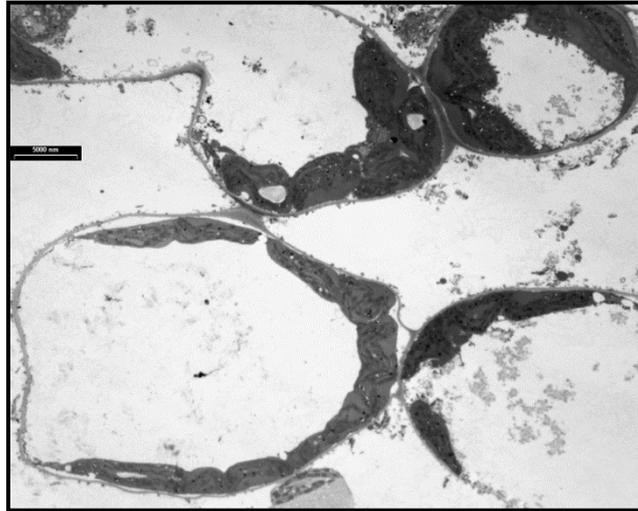
**Fig 6.3.5:** Identificazione delle bande riferibili alle HSP70 relative alle macrofite acquatiche campionate.

### Osservazioni ultrastrutturali con il microscopio elettronico a trasmissione (TEM)

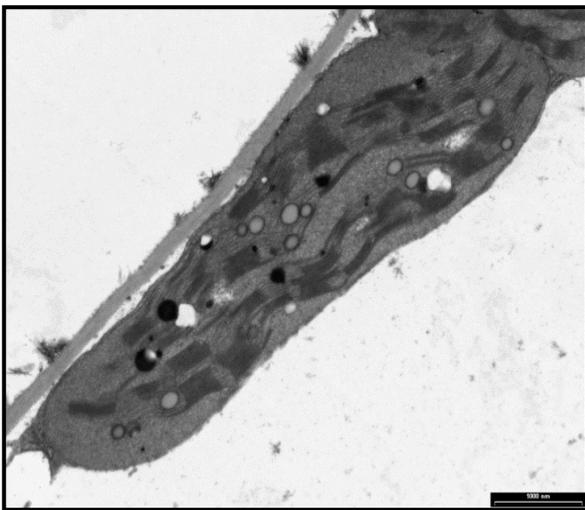
Le immagini ottenute mediante la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) delle cellule vegetali delle foglie delle macrofite acquatiche campionate a monte, a valle e in un punto di risorgiva hanno permesso di determinare le alterazioni ultrastrutturali dovute alla presenza di metalli pesanti.

*Nasturtium officinale* - foglie

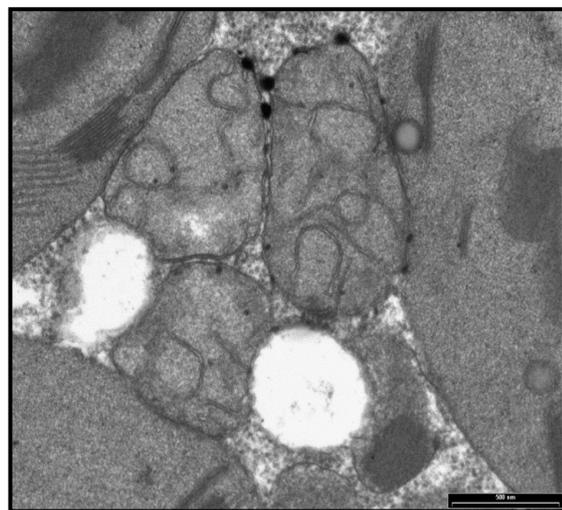
Campionamento tratto monte



**Fig 6.3.6a:** Cellule del mesofillo della foglia di *Nasturtium officinale* prelevato a monte.



**Fig 6.3.6b:** Cloroplasto di una cellula del mesofillo di *Nasturtium officinale* prelevato a monte.



**Fig 6.3.6c:** Mitocondri di una cellula del mesofillo di *Nasturtium officinale* prelevato a monte.

Le cellule del mesofillo delle foglie del campione di *Nasturtium officinale* prelevato a monte, delimitate da una sottile parete cellulare, appaiono occupate, per la maggior parte del volume, da un grosso vacuolo centrale chiaro.

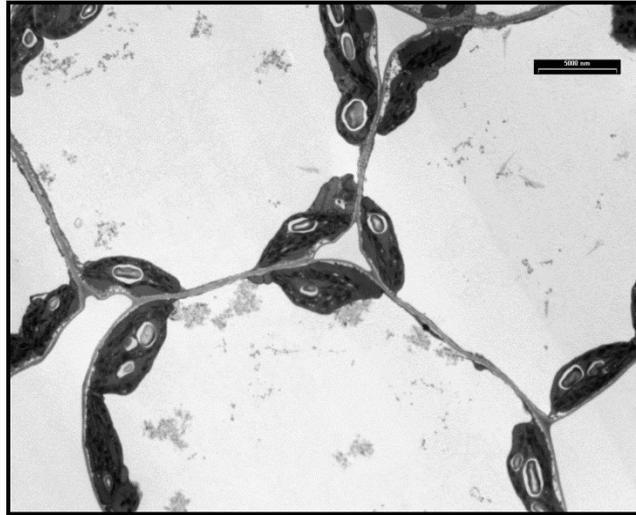
Il citoplasma, sotto forma di un sottile strato al di sotto della parete cellulare, contiene numerosi cloroplasti, disposti in file sotto la parete cellulare (Fig 6.3.6a).

I cloroplasti mostrano un sistema tilacoidale ben sviluppato, organizzato in grana e tilacoidi intergrana ed immerso nello stroma, alcuni plastoglobuli e qualche granulo di amido. Le membrane tilacoidali sono distese secondo l'asse longitudinale del cloroplasto (Fig 6.3.6b).

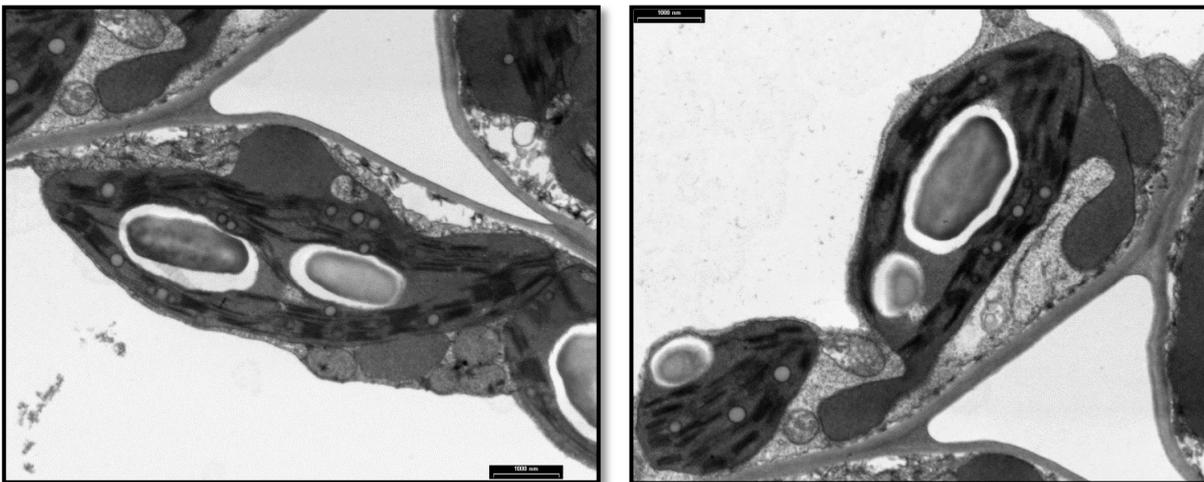
I mitocondri, delimitati da una evidente doppia membrana, contengono sottili creste immerse nella matrice (Fig 6.3.6c).

*Nasturtium officinale* - foglie

Campionamento tratto valle



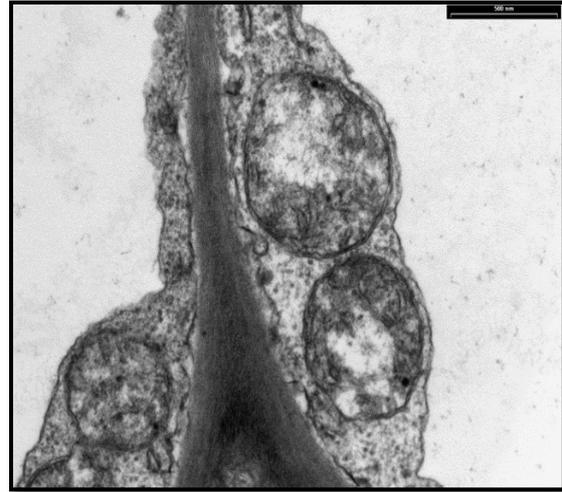
**Fig 6.3.6d:** Cellule del mesofillo della foglia di *Nasturtium officinale* prelevato a valle.



**Fig 6.3.6e:** Cloroplasti di una cellula del mesofillo di *Nasturtium officinale* prelevato a valle, con evidenti bozze, plastoglobuli e ampi granuli di amido.



**Fig 6.3.6f:** Cloroplasti di una cellula del mesofillo di *Nasturtium officinale* prelevato a valle, con evidenti bozze, plastoglobuli, ampi granuli di amido e briglie citoplasmatiche.



**Fig 6.3.6g:** Mitocondri di una cellula del mesofillo di *Nasturtium officinale* prelevato a valle, con evidenti zone chiare nella matrice.

Le cellule del mesofillo delle foglie del campione di *Nasturtium officinale*, prelevato a valle, appaiono ancora delimitate da una parete cellulare sottile e sono occupate da un grosso vacuolo centrale chiaro. Il citoplasma, disposto in uno strato sottile sotto la parete cellulare, contiene numerosi cloroplasti (Fig 6.3.6d).

I cloroplasti, rispetto a quelli dei campioni prelevati a monte, risultano deformati con evidenti bozze (Fig 6.3.6e-f). Inoltre nello stroma sono spesso presenti briglie citoplasmatiche (Fig 6.3.6f), plastoglobuli e ampi granuli di amido.

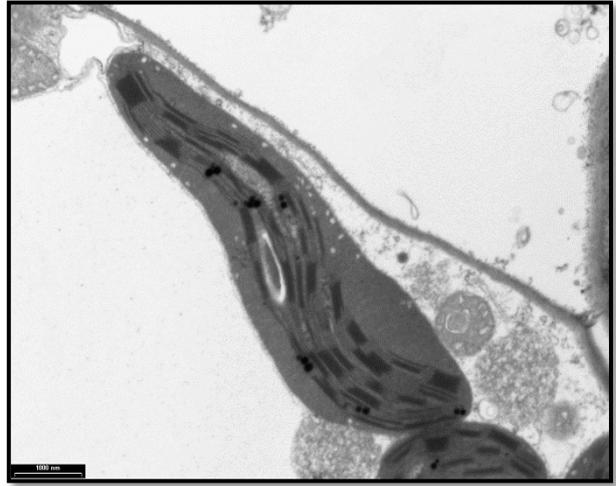
I mitocondri appaiono spesso alterati con ampie zone interne chiare e senza creste (Fig 6.3.6g).

*Veronica beccabunga* - foglie sub aeree

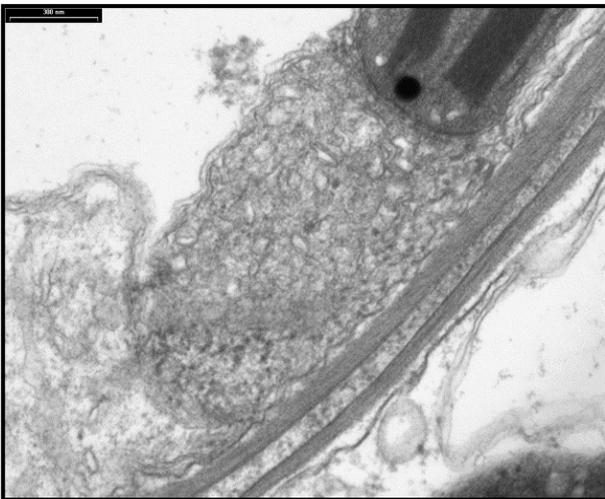
Campionamento tratto monte



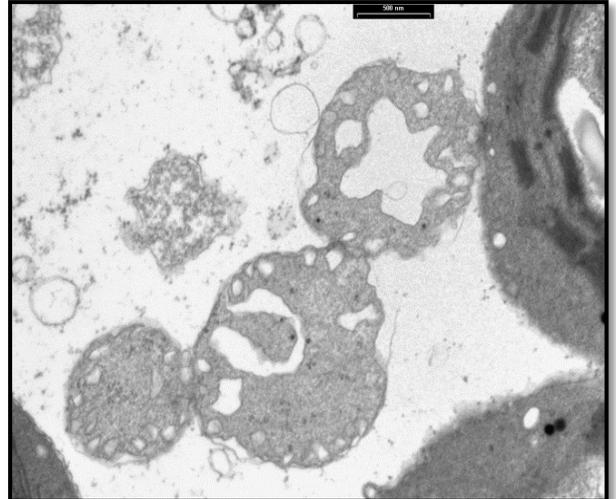
**Fig 6.3.7a:** Cellule del mesofillo della foglia sub aerea di *Veronica beccabunga* prelevata a monte.



**Fig 6.3.7b:** Cloroplasto con plastoglobuli e granuli di amido di una cellula del mesofillo della foglia sub aerea di *Veronica beccabunga* prelevata a monte.



**Fig 6.3.7c:** Mitocondri di una cellula del mesofillo della foglia sub aerea di *Veronica beccabunga* prelevata a monte.



**Fig 6.3.7d:** Mitocondri con creste slargate di una cellula del mesofillo della foglia sub aerea di *Veronica beccabunga* prelevata a monte.

Le foglie subaeree del campione di *Veronica beccabunga*, prelevato a monte, mostrano sempre la tipica organizzazione delle cellule del mesofillo fogliare, con sottile parete cellulare delimitante un grosso vacuolo centrale chiaro e citoplasma sottoparietale occupato da numerosi cloroplasti (Fig 6.3.7a).

I cloroplasti mostrano un sistema tilacoidale, organizzato in grana e tilacoidi intergrana, immerso in abbondante stroma, alcuni plastoglobuli ed evidente granulo di amido. Le membrane tilacoidali sono distese lungo l'asse longitudinale del cloroplasto (Fig 6.3.7b).

I mitocondri di questi campioni, pur avendo generalmente un aspetto ultrastrutturale tipico (Fig 6.3.7c), talvolta mostrano slargamento delle creste (Fig 6.3.7d).

*Veronica beccabunga* - foglie a pelo d'acqua

Campionamento tratto monte



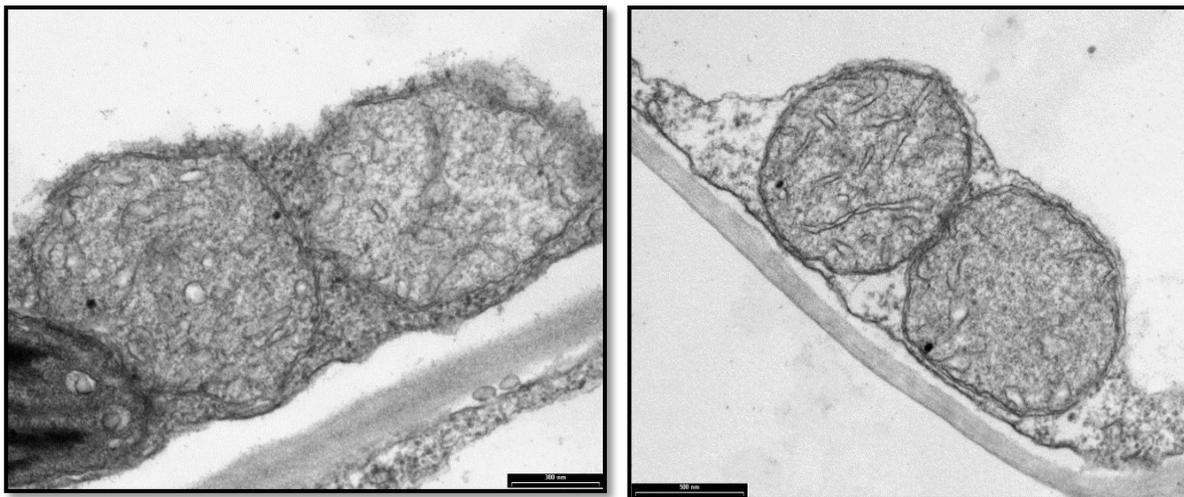
**Fig 6.3.8a:** Cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a monte: cloroplasti con molti plastoglobuli.



**Fig 6.3.8b:** Cloroplasto con plastoglobuli di una cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a monte.



**Fig 6.3.8c:** Cloroplasto con ponti citoplasmatici di una cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a monte.



**Fig 6.3.8d:** Mitocondri di una cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a monte.

Le foglie a pelo d'acqua del campione di *Veronica beccabunga*, prelevato a monte, hanno sempre la tipica organizzazione ultrastrutturale delle cellule del mesofillo, con parete cellulare esterna sottile, grosso vacuolo centrale chiaro e cloroplasti sottoparietali (Fig 6.3.8a).

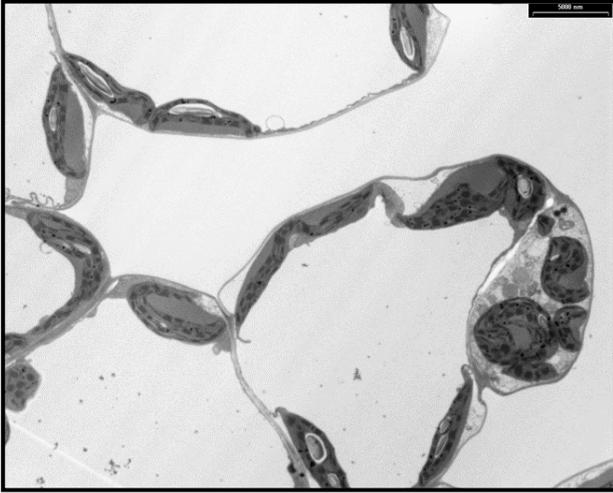
I cloroplasti hanno un sistema tilacoidale ben sviluppato, disteso lungo l'asse longitudinale dell'organello e numerosi plastoglobuli (Fig 6.3.8b). Si osservano anche ponti citoplasmatici che attraversano lo stroma dei cloroplasti (Fig 6.3.8c).

I mitocondri hanno un aspetto ultrastrutturale regolare (Fig 6.3.8d).

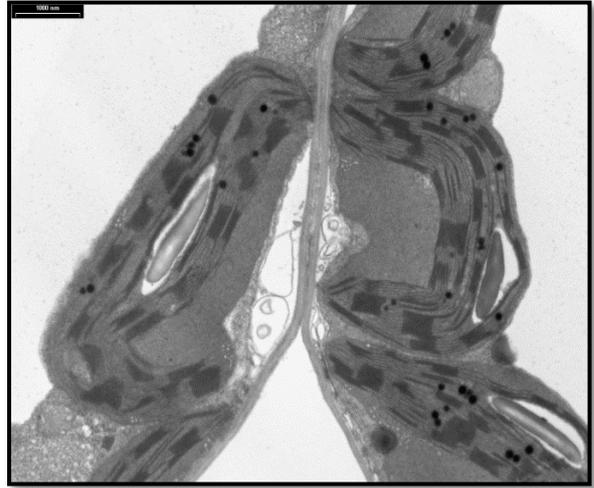
Rispetto alle foglie subaeree i plastoglobuli appaiono più abbondanti.

*Veronica beccabunga* - foglie subaeree

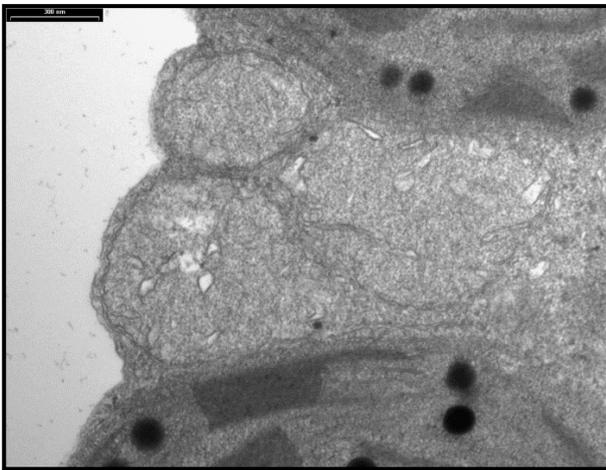
Campionamento tratto valle



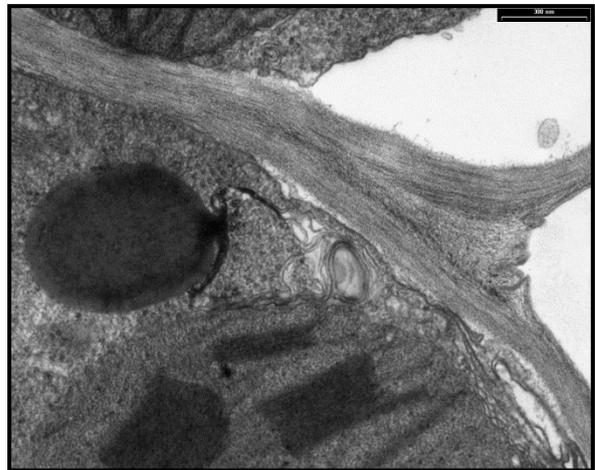
**Fig 6.3.9a:** Cellule del mesofillo della foglia subaerea di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.



**Fig 6.3.9b:** Cloroplasti con plastoglobuli e granuli di amido di cellule del mesofillo della foglia sub aerea di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.



**Fig 6.3.9c:** Mitocondri di una cellula del mesofillo della foglia sub aerea di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.



**Fig 6.3.9d:** Corpi multivescicolari nel citoplasma della cellula del mesofillo della foglia sub aerea di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.

Le foglie subaerea del campione di *Veronica beccabunga*, prelevato a valle, non mostra sostanziali differenze con l'aspetto osservato nel campione prelevato a monte (Fig 6.3.9a).

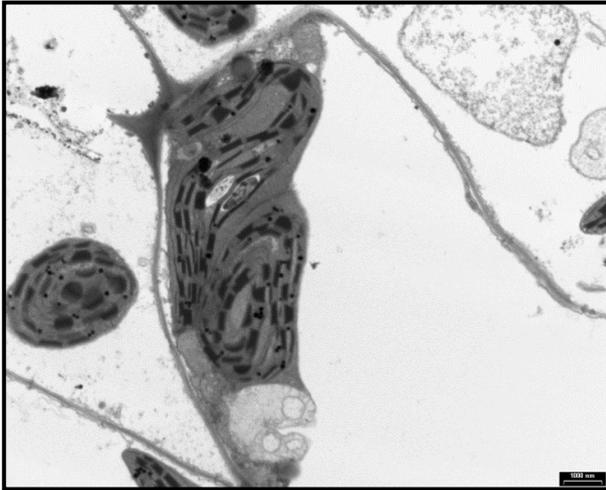
I cloroplasti mostrano un sistema tilacoidale, organizzato in grana e membrane intergrana, immerso in uno stroma abbondante, alcuni plastoglobuli ed evidente granulo di amido (Fig 6.3.9b).

I mitocondri di questi campioni hanno l'aspetto ultrastrutturale tipico con doppia membrana esterna delimitante e creste nella matrice (Fig 6.3.9c).

Sono presenti corpi multivescicolari nel citoplasma della cellula (Fig 6.3.9d).

*Veronica beccabunga* - foglie a pelo d'acqua

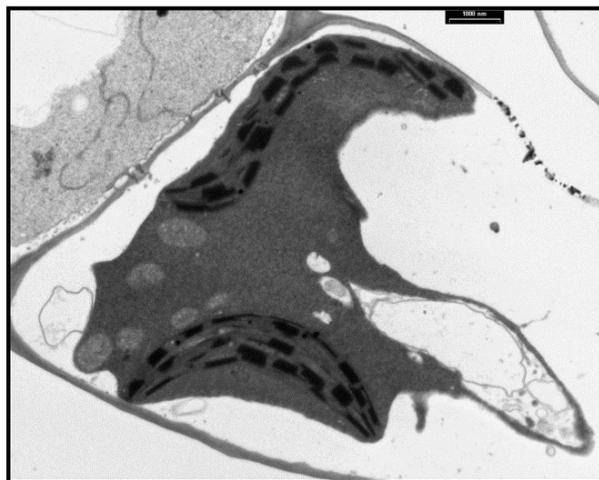
Campionamento tratto valle



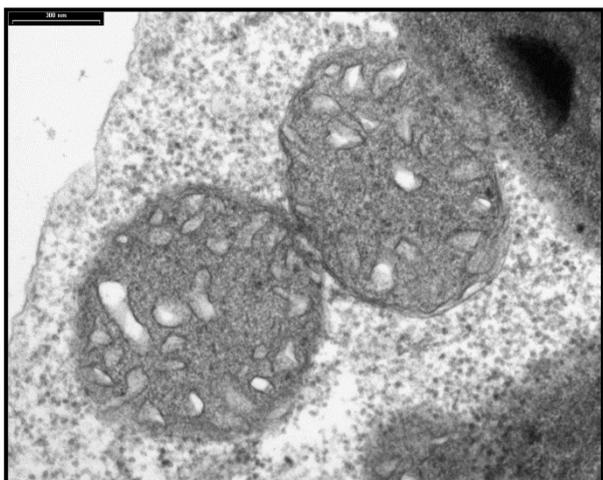
**Fig 6.3.10a:** Cloroplasti e mitocondrio di una cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.



**Fig 6.3.10b:** Cloroplasto con abbondante stroma e plastoglobuli di cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.



**Fig 6.3.10c:** Apparente fusione di cloroplasti di cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.



**Fig 6.3.10d:** Mitocondri di una cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.



**Fig 6.3.10e:** Struttura alterata di un mitocondrio di una cellula del mesofillo della foglia a pelo d'acqua di *Veronica beccabunga* prelevata a valle.

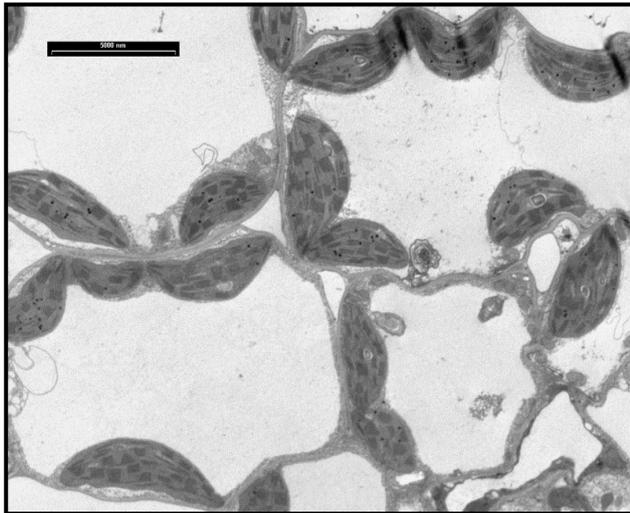
Le cellule del mesofillo delle foglie a pelo d'acqua del campione di *Veronica beccabunga*, prelevato a valle, presentano la stessa organizzazione ultrastrutturale generale osservata a monte.

I cloroplasti hanno un sistema tilacoidale ben sviluppato, immerso in abbondante stroma (Fig 6.3.10b), si notano invece abbondanti plastoglobuli (6.3.10a). Si osservano anche casi di apparente fusione di cloroplasti (Fig 6.3.10c).

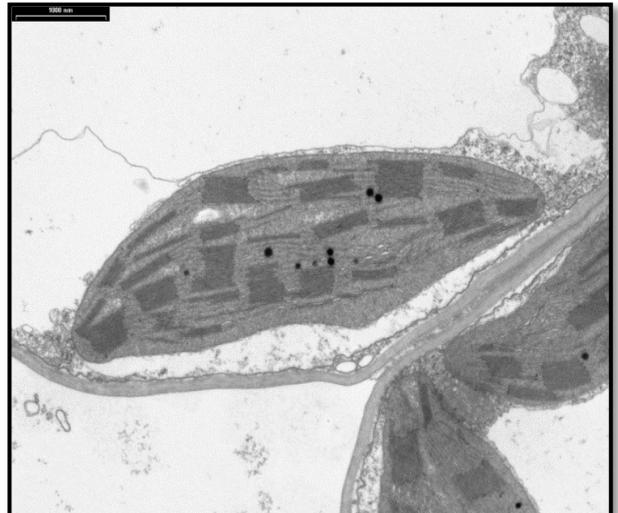
I mitocondri mostrano accanto ad una ultrastruttura normalmente organizzata (Fig 6.3.10d), una struttura alterata. (Fig 6.3.10e).

## *Apium nodiflorum*– foglie

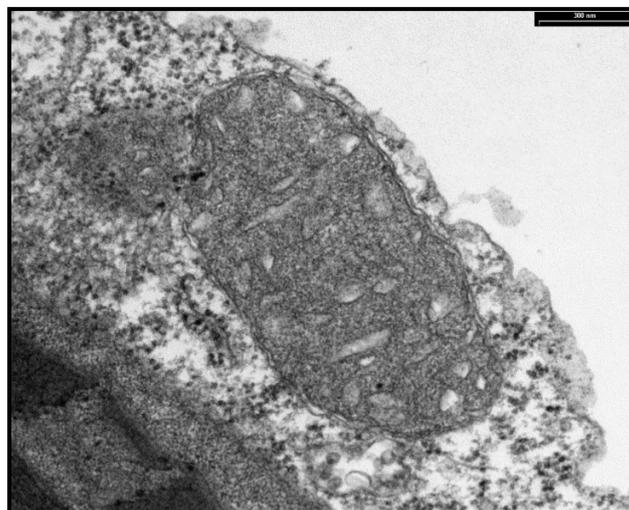
### Campionamento tratto risorgiva



**Fig 6.3.11a:** Cellule del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata in un tratto di risorgiva.



**Fig 6.3.11b:** Cloroplasti di cellule del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata in un tratto di risorgiva.



**Fig 6.3.11c:** Mitocondri di cellule del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata in un tratto di risorgiva.

I campioni prelevati nel sito di risorgiva mostrano, come atteso, una perfetta organizzazione cellulare.

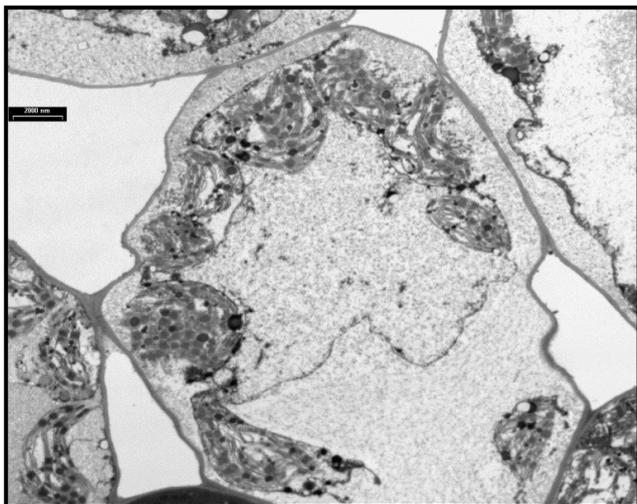
Le cellule del mesofillo delle foglie del campione di *Apium nodiflorum*, prelevato nel tratto di risorgiva, delimitate da una sottile parete cellulare, sono occupate, per la maggior parte, da un grosso vacuolo centrale chiaro. Il citoplasma, sotto forma di un sottile strato al di sotto della parete cellulare, contiene numerosi cloroplasti, disposti in file sotto la parete cellulare (Fig 6.3.11a).

I cloroplasti mostrano un sistema tilacoidale ben sviluppato, organizzato in grana e tilacoidi intergrana ed immerso nello stroma, alcuni plastoglobuli e qualche granulo di amido. Le membrane tilacoidali sono distese secondo l'asse longitudinale del cloroplasto (Fig 6.3.11b).

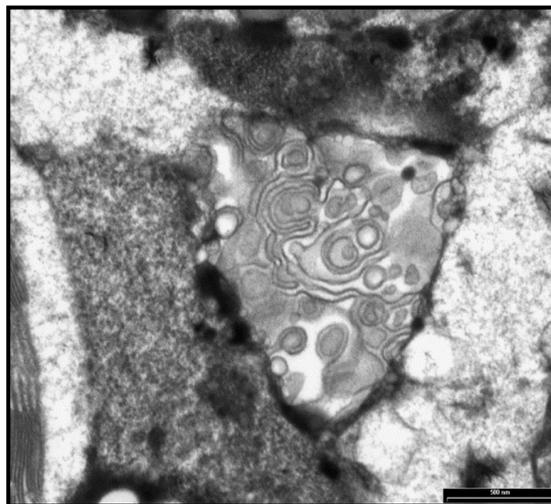
I mitocondri di questi campioni hanno un aspetto tipico, con doppia membrana esterna ed evidenti creste immerse nella matrice (Fig 6.3.11c).

## *Apium nodiflorum* – foglie

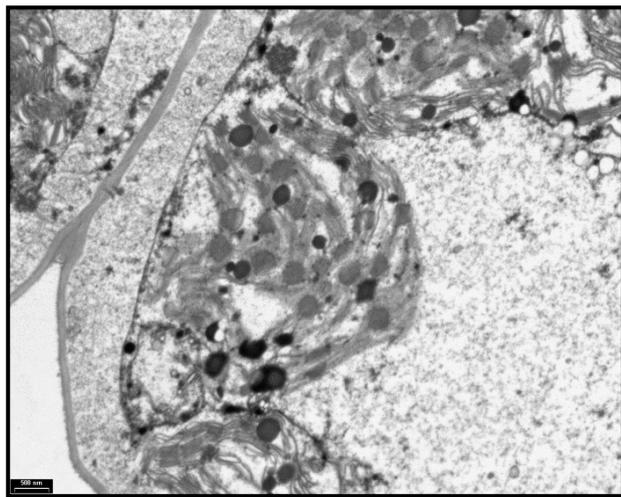
Campionamento tratto monte



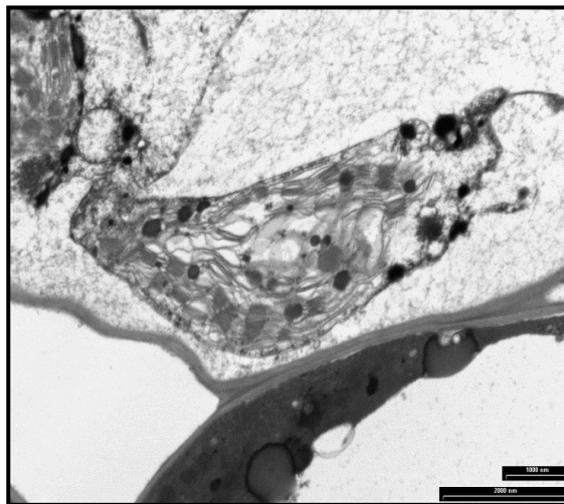
**Fig 6.3.12a:** Cellule del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata a monte.



**Fig 6.3.12b:** Corpi multivescicolari nel citoplasma della cellula del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata a monte.



**Fig 6.3.12c:** Cloroplasti di cellule del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata a monte con stroma elettron-denso e gossi plastoglobuli.

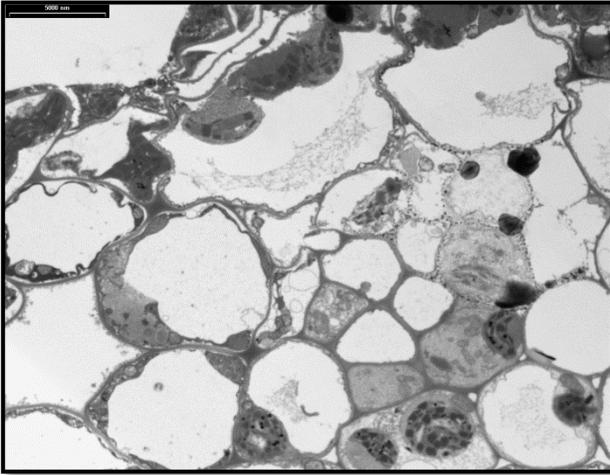


Le cellule del mesofillo delle foglie del campione di *Apium nodiflorum*, prelevato a monte, appaiono alterate rispetto ai campioni prelevati nel tratto di risorgiva. Infatti, sebbene l'organizzazione generale della cellula sia mantenuta (Fig 6.3.12a), i cloroplasti appaiono rigonfi o comunque alterati nella forma, pieni di grossi plastoglobuli e con stroma elettron-chiaro (Fig 6.3.12c).

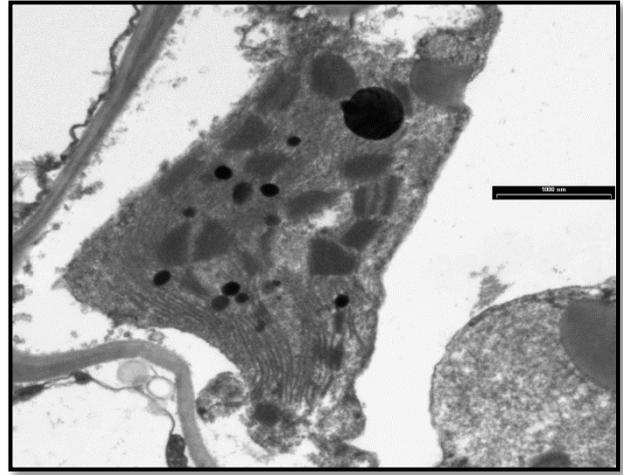
Il citoplasma presenta dei corpi multivescicolari (Fig 6.3.12b).

*Apium nodiflorum* – foglie

Campionamento tratto valle



**Fig 6.3.13a:** Cellule del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata a valle.



**Fig 6.3.13b:** Cloroplasto con grossi plastoglobuli di cellula del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata a valle.



**Fig 6.3.13c:** Corpi multi vescicolari nel citoplasma della cellula del mesofillo della foglia di *Apium nodiflorum* prelevata a valle.

Anche nei campioni prelevati a valle, sebbene si riconosca ancora l'organizzazione generale della cellula del mesofillo, i cloroplasti appaiono molto meno abbondanti (Fig 6.3.13a). Tali organelli, sebbene siano visibili ancora tilacoidi organizzati in grana ed intergrana, risultano molto alterati nella forma e contengono grossi plastoglobuli (Fig 6.3.13b). Nel citoplasma sono evidenti corpi multivescicolari (Fig 6.3.13c).

## 7 DISCUSSIONE

Le piante acquatiche presentano un'alta tolleranza ai metalli pesanti e sono in grado di accumulare tali elementi nell'ambiente, derivanti, in particolare, da attività industriali e agricole (Outridge and Noller, 1991; Ali and Soltan, 1999).

Recenti studi hanno documentato la capacità delle macrofite di accumulare metalli pesanti per lungo tempo, tanto da confermarne un ruolo centrale nel monitoraggio ambientale (Vardanyan, et al., 2007). Pertanto tali piante risultano efficaci nell'ambito della fitodepurazione (Baker and Brooks 1989; Salt et. Al. 1998; McCutcheon and Schnoor 2003), intesa come rimozione delle sostanze indesiderate e non biodegradabili, proprio come i metalli pesanti, dai reflui convogliati poi nei corpi idrici recettori (Qian, et a., 1999).

Negli ultimi anni è aumentato l'interesse in riferimento all'accumulo dei metalli nelle radici delle piante acquatiche, come il *Nasturtium officinale*, confermandone un ruolo strategico in tale processo, (Kara, et al.2003), in modo da sottrarre le sostanze dalla catena trofica alimentare (Matagi 1998). Ulteriori studi sono stati condotti sul *Nasturtium officinale*, al fine di verificare le risposte fisiologiche in riferimento ad un accumulo di Cu, Zn, Ni. È stato dimostrato che l'accumulo dei metalli pesanti è funzione del tempo di esposizione, ed è accompagnato da diversi cambiamenti della struttura e funzione cellulare, in particolare alla variazione della concentrazione dei pigmenti fotosintetici (Kara, 2005).

Numerosi studi sono stati condotti sul Fiume Sarno, in riferimento allo stato altamente inquinato delle sue acque (De Pippo, et al., 2006) e dei sedimenti fluviali (Albanese, et al., 2012). In particolare, è stata dimostrata una relazione tra gli aspetti idromorfologici del territorio e la diffusione degli inquinanti di origine antropica, derivanti da aree economicamente sviluppate (industrie agricole e conserviera nella piana del Fiume Sarno e conceria nel torrente Solofrana, alto Sarno) e densamente popolate (De Pippo, et al., 2006), tali da ritenere una probabile connessione tra contaminazione ambientale e stato di salute umana. (Albanese, et al., 2012).

Studi sugli effetti dell'inquinamento delle acque superficiali del Fiume Sarno su piante acquatiche, come *Lemna minor*, hanno dimostrato che, esponendo "bags" contenenti *Lemna minor* in tre siti diversi lungo il percorso del fiume, si evidenzia un aumento dei livelli delle proteine HSP70, nonché alterazioni nella forma e nell'organizzazione dei cloroplasti e dei vacuoli (Basile et al., 2015; Appenroth et al., 2010). Le alterazioni ultrastrutturali sono paragonabili a quelle riscontrate in

campioni coltivati *in vitro* alle stesse concentrazioni dei metalli pesanti riscontrate *in vivo*, nonché le risposte fisiologiche volte a valutare le HSP70 sugli stessi sistemi vegetali sono risultate comparabili.

Dal punto di vista ultrastrutturale è stata osservata la degradazione e l'alterazione nella forma dei cloroplasti e dei mitocondri, la presenza di corpi multivescicolari, plastoglobuli e plasmolisi.

I danni morfologici registrati sono stati associati all'induzione delle HSP70s; pertanto le stesse sono state ritenute utili marcatori di inquinamento da metalli pesanti (Basile et al.,2015).

In questo progetto è stato individuato un corpo idrico diverso dal punto di vista idromorfologico, ecologico e dello stato di qualità delle acque e dei sedimenti fluviali, il Fiume Irno, in provincia di Salerno, al fine di verificare l'eventuale congruenza tra le risposte microscopiche e biochimiche delle macrofite acquatiche a un impatto ambientale moderato e i risultati emersi da precedenti ricerche su fiumi altamente inquinati, come il Sarno.

Il territorio nel quale si sviluppa il Fiume Irno è stato interessato da uno intenso processo di industrializzazione già dalla seconda metà del 1800, che determinò modifiche dell'argine originario del fiume, attraverso opere di sterro, a protezione degli stabilimenti esistenti all'epoca dalle esondazioni del fiume. In riferimento alla natura litologica, soprattutto nella parte a monte della frazione di Fratte, la struttura carbonatica, spesso ricoperta da coltri di piroclastiti, ha favorito significativi fenomeni di erosione areale e di frane, con prevalenza di colate detritiche, in corrispondenza degli affioramenti del substrato litoide e di colate rapide di fango in presenza di coperture piroclastiche.

Il territorio continua ad essere sede di realtà industriali che compromettono lo stato naturale delle acque dell'Irno; sono stati infatti censiti gli scarichi industriali, ma anche civili che in esso vengono riversati.

In particolare, lungo l'asta fluviale dell'Irno sono sversate acque di processo industriale e meteorica di dilavamento dei piazzali che, associata a decadimento delle polveri derivanti da emissioni di fumi in atmosfera, determinano un'alterazione ambientale (Relazione ARPAC, 2014).

Nella presente ricerca sono state analizzate le risposte microscopiche e biochimiche di macrofite acquatiche all'impatto ambientale derivante dalle attività delle Fonderie Pisano & C S.p.A., lungo la valle dell'Irno, che producono ghisa in seconda fusione.

È stata identificata una stazione di campionamento a monte dell'impatto antropico, ritenuta condizione ambientale "indisturbata" e una stazione di campionamento a valle dell'immissione delle acque di scarico derivanti dalle Fonderie Pisano, nonché una stazione di campionamento ancora più a monte, in un punto di risorgiva, come ulteriore controllo, e sono state campionate macrofite acquatiche, acqua superficiale e sedimenti fluviali.

Inizialmente è stato valutato l'eventuale stato di inquinamento delle acque superficiali e dei sedimenti fluviali lungo tali stazioni.

Una contaminazione di Pb è stata osservata nei sedimenti fluviali, evidente nella stazione di campionamento a valle dell'impatto antropico rispetto alla stazione posizionata a monte. Non è stata registrata una contaminazione delle acque superficiali del fiume, chiaramente spiegabile con il fatto che le stesse acque fluviali ricevono scarichi discontinui. È possibile che la concentrazione dei metalli pesanti riscontrata nei sedimenti derivi principalmente da emissioni di fumi in atmosfera sotto forma di polveri in decadimento e bioaccumulate. Anche gli altri parametri chimici, chimico-fisici e microbiologici non hanno evidenziato particolari alterazioni ambientali, se non una lieve contaminazione di origine fecale.

Oltre alla loro posizione rispetto all'impatto ambientale, le stazioni di campionamento sono state scelte in funzione della presenza delle stesse specie di macrofite acquatiche. Sebbene non ci sia una elevata differenza ecologica, l'asta fluviale dell'Arno risulta condizionata dall'intervento antropico di sfalcio periodico che altera l'insediamento naturale delle stesse macrofite. In particolare, è stato campionato il *Nasturtium officinale*, la *Veronica beccabunga* e l'*Apium nodiflorum*, presenti sia nella stazione monte, sia nella stazione valle. Nel tratto di risorgiva è stata invece riscontrata esclusivamente l'*Apium nodiflorum*.

È stata determinata la concentrazione di Pb, Cu e Cd nei campioni di macrofite acquatiche prelevati; in particolare è stato osservato che le concentrazioni del Cd nei campioni di foglie e radici sono risultate paragonabili a quelle riscontrate nei sedimenti, pur trattandosi di piccole quantità.

Valori bassi relativi al fattore di traslocazione ( $< 1$ ) evidenziano che gli elementi considerati vengono chelati nelle radici e solo una piccola quantità è veicolata nelle foglie (Basile et al. 2001; Carginale et al. 2004; Rau et al. 2007). Sebbene a livello

ridotto, a tale concentrazione sono stati riscontrati danni ultrastrutturali nelle cellule delle foglie e overespressione delle proteine HSP70 nelle macrofite acquatiche campionate.

Nei campioni di foglie e radici *Nasturtium officinale* prelevati a valle è stata rilevata una concentrazione del Pb e del Cu più alta; corrispondentemente, è stata osservata una maggiore presenza delle proteine HSP70; dal punto di vista microscopico i cloroplasti nei campioni di foglie sono deformati con evidenti bozze, nello stroma degli stessi sono stati osservati ponti citoplasmatici, aumento di plastoglobuli, presenza di granuli di amido (forma insolubile del glucosio polimerizzato) di dimensioni maggiori e i mitocondri sono apparsi alterati con ampie zone interne chiare e senza creste o con creste slargate.

Tuttavia, accanto ad un aumento del plastoglobuli, granuli di amido e deformazioni dei cloroplasti, resta la struttura tilacoidale, organizzata in grana e tilacoidi intergrana, dei mitocondri, sebbene con creste ridotte, e della parete cellulare, mostrando una situazione di stress ancora gestibile dalle specie vegetali esaminate, come dimostrano i dati di controllo ambientale sui sedimenti fluviali e acqua superficiale.

Le osservazioni dei campioni di foglie di *Nasturtium officinale* prelevati a monte non hanno evidenziato le stesse anomalie.

Le irregolarità descritte sono sintomo di senescenza cellulare, in riferimento, ad esempio, all'abbondanza dei plastoglobuli (Ghosh et al., 2001); essi sono stati considerati come accumuli di lipidi derivanti dalla degenerazione delle membrane tilacoidali (Dalla Vecchia et al., 2005). L'incremento delle goccioline lipidiche può essere spiegata con alterazioni metaboliche, che portano all'accumulo di metaboliti intermedi e materiali di riserva.

In particolare, in precedenti ricerche è stato dimostrato che i cloroplasti sono gli organelli più alterati dall'accumulo di metalli e sviluppano particolari caratteristiche ultrastrutturali corrispondenti al grado di inquinamento (Appenroth et al., 2010). Sono inoltre stati messi in relazione i danni ai cloroplasti in specie vegetali (*Elodea canadensis* e *Triticum aestivum*) trattate con metalli pesanti e la perdita di attività fotosintetica (Dalla Vecchia et al., 2005; Ouzounidou et al., 1997).

Nei campioni di foglie e radici di *Veronica beccabunga* e di *Apium nodiflorum* è stata misurata un'alta concentrazione di Cu rispetto alla concentrazione riscontrata nei sedimenti fluviali; di fatto, il rame è un elemento fisiologicamente adsorbito, dato il suo ruolo essenziale come co-fattore di enzimi e proteine come la plastocianina (Ghosh et al., 2001); questo provoca un accumulo nel tempo di tale elemento a livelli molto elevati all'interno della cellula e induce specifiche risposte, ad esempio attraverso la sintesi di HSP70 per contrastare i possibili effetti tossici di accumulo di Cu.

In *Veronica beccabunga* e *Apium nodiflorum* la concentrazione di Cu nei campioni prelevati a monte è più alta rispetto a quella riscontrata a valle, dove le HSP70 risultano più abbondanti, probabilmente per effetto della presenza di altri inquinanti non misurati in questo studio. In precedenti ricerche su altre specie vegetali è stato dimostrato che campioni di *Lemna minor*, esposta a differenti livelli di singoli HMs (tra  $10^{-6}$  a  $10^{-4}$  M fino a 7 giorni allo stesso metallo pesante), manifestava una risposta più evidente delle HSP70 al Cu, e meno evidente al Pb e Cd (Basile et al., 2015).

Bisogna sottolineare che è estremamente difficile stabilire correlazioni univoche tra inquinante e risposte fisiologiche in specie vegetali campionate *in situ*, in condizioni di elevata variabilità ecologica e antropica; occorrerebbe, *in primis*, procedere a un controllo anche su altre sostanze inquinanti, come per esempio sulla concentrazione degli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) o fitofarmaci nei sedimenti fluviali e nelle acque superficiali.

La risposta allo stress nelle foglie dei campioni di *Veronica beccabunga* e *Apium nodiflorum* è stata confermata dai danni ultrastrutturali osservati, e dall'aumento dei livelli delle HSP70. Oltre a modifiche nella forma dei cloroplasti e alterazioni nei mitocondri con zone elettroniare nella matrice e slargamento delle creste, sono stati evidenziati visibili corpi multivescicolari nel citoplasma, probabilmente derivanti da attività di plasmolisi, perdita di permeabilità selettiva della membrana (Schwartzman e Cidlowski, 1993) e accumulo di membrane non digerite per endocitosi. Simili strutture sono state osservate e descritte nelle piante in presenza di fenomeni autofagici ed endocitici (Thompson e Vierstra, 2005; Todeschini et al, 2011) e descritti in Briofite esposte a sostanze inquinanti (Basile et al, 2012b, 2013;. Esposito et al 2012); è stata dimostrata la presenza di corpi multilamellari concentrici anche in campioni di Lemna (Basile et al., 2015).

In situazioni di crescita con elevate concentrazioni di metalli pesanti sono apparse alterazioni lungo la parete cellulare (Basile et al., 2015), anomalia non riscontrata

nella presente ricerca, imputabile probabilmente a un effetto contenuto dell'impatto ambientale da metalli pesanti.

In campioni di foglie di *Veronica beccabunga*, in particolare nelle foglie a pelo d'acqua, e di *Apium nodiflorum* prelevati nella stazione valle, si osserva una maggiore presenza di plastoglobuli e granuli di amido rispetto ai campioni monte.

Sebbene la concentrazione dei metalli pesanti riscontrata nelle foglie di *Veronica beccabunga* e di *Apium nodiflorum* sia ridotta, si potrebbe immaginare una correlazione tra i danni evidenziati e la presenza di ulteriori diversi inquinanti ambientali, come è emerso anche in precedenti ricerche (Basile et. al., 2015), nonché situazioni di bioaccumulo che perdurano nel tempo.

Un diverso accumulo delle HSP70 in funzione del tempo di esposizione ai metalli pesanti è stato evidenziato in precedenti ricerche: una overespressione come risposta a breve periodo (alcune ore) e un secondo incremento come risposta di lunga durata (giorni-settimane); una overespressione è stata inoltre registrata in funzione della concentrazione crescente degli stessi metalli pesanti, in particolare in riferimento al Pb (Bierkens, 2000).

La normativa attualmente in vigore relativa alle acque superficiali, (D. Lgs 172/2015) definisce i limiti da non superare per il biota, gli Standard di Qualità Ambientale (SQA), in riferimento ad alcune sostanze prioritarie e pericolose prioritarie (difenileteri, DDDT, esaclorobenzene, esaclorobutadiene, mercurio, fluorantene, IPA, diossine e diossine simili), da ricercare nei pesci, crostacei e molluschi.

Interessanti informazioni, nell'ambito del monitoraggio ambientale, potrebbero emergere nel monitorare tali sostanze anche nelle macrofite acquatiche, estendendo il concetto di biota, delle quali, come evidenziato, è ormai chiaro il ruolo di bioaccumulatore e bioindicatore.

Un accumulo dei metalli pesanti nelle piante acquatiche, in particolare nelle radici, potrebbe sottrarre tali inquinanti dalla catena trofica alimentare (Vardanyan, et. al., 2007). I produttori autotrofi forniscono sostanza organica ai consumatori primari, nell'ambito della piramide alimentare che interessa l'uomo. L'indisponibilità di sostanze tossiche, perché chelate nell'ambito dell'apparato radicale, riduce la biodisponibilità lungo i livelli trofici (Matagi, 1998) e quindi anche la biomagnificazione, intesa come tendenza di sostanze chimiche a diventare sempre più concentrate man mano che si sale di livello nella piramide alimentare.

I dati di questo studio eseguito su *Nasturtium officinale*, *Veronica beccabunga* e *Apium nodiflorum* confermano i risultati di precedenti ricerche, in riferimento alle risposte allo stress ambientale dal punto di vista biochimico e microscopico; infatti, il danno più frequente e visibile che è stato osservato in briofite (Basile et al, 2012b ; 2013), licheni (Paoli et al, 2014), gimnosperme (Kukkola et al, 2000) e angiosperme (Ouzounidou et al, 1997; Esposito et al, 2007; Zhang et al, 2014), sottoposte a contaminazione di metalli pesanti, ha riguardato alcune variazioni nei plastidi. In particolare sono stati osservati seri danni ai campioni esposti a Cu. La degradazione dei cloroplasti e dei mitocondri è stata considerata come marker di senescenza indotta avanzata (Michaeli e Galili 2014).

I risultati ottenuti e discussi nella presente ricerca, in particolare riferiti a *Nasturtium officinale* prelevato in un contesto territoriale moderatamente inquinato, sono risultati in accordo rispetto a studi condotti su altre specie vegetali, con un organizzazione più semplice e campionate in realtà ambientali altamente inquinate. È stato quindi confermato il ruolo centrale, in particolare di alcune specie di macrofite acquatiche (*Nasturtium officinale*), come bioindicatore: tali specie rispondono in maniera specifica all'impatto ambientale da metalli pesanti attraverso modifiche ultrastrutturali, in particolare nei cloroplasti e nei mitocondri, e dal punto di vista biochimico con overespressione di HSP70.

Ulteriori studi sono necessari per determinare i danni sulla vegetazione dovuti alla presenza di altri inquinanti (es. IPA) nei corsi d'acqua interessati da un impatto antropico moderato, al fine di verificare le relazioni tra inquinamento di origine industriale e modifiche agli ecosistemi fluviali.

## 8 BIBLIOGRAFIA

- AFNOR -2003- Norme NF T 90-395, Octobre 2003. Qualité de l'eau: détermination de l'Indice Biologique Macrophytique en Rivière (IBMR). Association Française de Normalisation (AFNOR): 28 pp.
- Albanese S., Iavazzo P., Adamo P., Lima A., DE Vivo B. (2012). Assessment of the environmental conditions of the Sarno river basin (south Italy): a stream sediment approach. *Environ Geochem Health* (2013) 35:283–297 DOI 10.1007/s10653-012-9483-x
- Ali, M. and M. E. Soltan, Heavy metals in aquatic macrophytes, water and hydro soils from the river Nile. *Egypt. J. Uni. Arabi Biol. Cairo*, **9**: 99-115, 1999
- Alpi A., Pupillo P., Rigano C. 2000 - *Fisiologia delle piante*. Ed. EdiSES 35-37.
- Appenroth, K.-J., Krech, K., Keresztes, Á., Fischer, W., Koloczek, H., 2010. Effects of nickel on the chloroplasts of the duck weeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. *Chemosphere* 78, 216–223.
- APAT -2007- Protocollo di campionamento e analisi per le macrofite delle acque correnti. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, APAT, ISS, ENEA, ARPA Piemonte, Università La Sapienza-Roma, APPA Trento, ARPA Toscana: 20 pp
- APAT – IRSA – CNR - *Metodi Analitici per le acque*, Vol. 1, Sezione 2000 – Parametri fisici, chimici e chimico fisici
- APAT – IRSA – CNR - *Metodi Analitici per le acque*, Vol. 1, Sezione 3000 – Metalli e specie metalliche.
- APAT – IRSA – CNR - *Metodi Analitici per le acque*, Vol. 2, Sezione 4000 – Costituenti inorganici non metallici.

- APAT – IRSA – CNR- Metodi Analitici per le acque, Vol. 3, Sezione 8000 – Metodi eco tossicologici
- APAT – IRSA – CNR- Metodi Analitici per le acque, Vol. 3, Sezione 9000 – Indicatori biologici.
- APAT, 2007, Manuali e linee guida. “Metodi biologici per le acque parte I”. Protocollo per il campionamento dei parametri fisico-chimici a sostegno degli elementi biologici nei corsi d’acqua superficiali” (ISPRA).
- Arduini I., Douglas L., Onnis G. and A. 1996 – Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. *Physiologia Plantarum*, 97: 111-117.
- Aromolo R., Benedetti A., Fiorelli F., Francaviglia R., Gataleta R., Marchionni M., Morselli L. 1999 – Approccio metodologico allo studio integrato dei metalli pesanti nell’ambiente. Conferenza Organizzativa: inquinamento del suolo da metalli pesanti. Sassari 6-7 Maggio.
- ARPAC, Piano di Monitoraggio dei fiumi della Campania, ai sensi del D. Lgs 152/2006, 2013-2014.
- ARPAC, Relazione su “Dati ambientali sul fiume Irno e della zona Fratte di Salerno” del 20/05/2014.
- Autorità di Bacino regionale Campania sud, Piano Stralcio Assetto Idrogeologico, 2011.
- Baker, A.J.M. and Brooks, R.R 1989. Terrestrial higher plants which accumulate metallic elements - review of their distribution, ecology, and phytochemistry. *Biorecovery* 1: 81 – 126

- Bargagli R. 1998a - Chemical elements and plants life. In: Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery 1-21.
- Bargagli R. 1998b - Mosses as passive and active biomonitors of trace elements. In: Trace elements in terrestrial plants: an ecophysiological approach to biomonitoring and biorecovery 207-236.
- Basile A, Cogoni AE, Bassi P, Fabrizi E, Sorbo S, Giordano S, Castaldo-Cobianchi R. 2001. Accumulation of Pb and Zn in gametophytes and sporophytes of the moss *Funaria hygrometrica* (Funariales). *Ann Bot* 87:537–543
- Basile A, Esposito S., Sorbo S., Napolitano E., Conte B., Salvatori E, Manes F. Ultrastructural alterations induced by tropospheric ozone: comparison between resistant and sensitive clones of *Trifolium repens* L. *CV Regal. International Journal of Environment and Health* 4: (2/3), 260-277 (2010)
- Basile A, Sorbo S, Conte B, Golia B, Montanari S, Castaldo Cobianchi R, Esposito S. (2011) Antioxidant activity in extracts from *Leptodictium riparium* (Bryophyta), stressed by heavy metals, heat shock, salinity. *Plant Biosystems* 175: 77-80
- Basile, A., Sorbo, S., Pisani, T., Paoli, L., Munzi, S., Loppi, S., 2012b. Bioaccumulation and ultrastructural effects of Cd, Cu, Pb and Zn in the moss *Scorpiurum circinatum* (Brid.) Fleisch.&Loeske. *Environ. Pollut.* 166, 208–211. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.03.018>
- Basile A, Sorbo S, Conte B, Cardi M, Esposito S (2013) Ultrastructural changes and Heat Shock Proteins 70 induction upon urban pollution are similar to the effects observed under in vitro heavy metals stress in *Conocephalum conicum* (Marchantiales - Bryophyta). *Environ Pollut.* 2013; 182: 209-216. DOI 10.1016/j.envpol.2013.07.014.
- Basile A, Sorbo S, Cardi M, Lentini M, Castiglia D, Cianciullo P, Conte B, Loppi S, Esposito S (2015) Effects of heavy metals on ultrastructure and HSP70

induction in *Lemna minor* L. exposed to water along the Sarno River, Italy. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 114: 93-101 DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.01.009

- Bettinetti R., Crosa G., Galassi S. (2007). *Ecologia delle acque interne*.
- Bielli E., Buffagni A., Cotta Ramusino., Crosa G., Galli P., Guzzi L., Guzzella L., Minciardi M.R., Spaggiari R., Zoppini A. -1999- Linee guida per la classificazione biologica delle acque correnti superficiali. *Manuale UNICHIM* 191: 59 pp.
- Bierkens, J.G.E.A., 2000. Applications and pitfalls of stress proteins in biomonitoring. *Toxicology* 153, 61–72. [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00304-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00304-8). Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.
- Briat J. F. and Lebrun M. 1999 - Plant responses to metal toxicity. *C. R. Academy Science III* 322: 43-54.
- Brune A., Urbach W., Dietz K. J. 1995 – Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: a comparison of Cd-, Mo-, Ni-, and Zn-stress. *New Phytology* 129: 403-409.
- Bruins M. R., Kapil S., Oehme F. W. 2000 – Microbial resistance to metals in environment. *Ecotoxicology Environmental Safety* 45: 198-207.
- Canesi, L., Viarengo, A., Leonzio, C., Filippelli, M., Gallo, G., 1999. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. *Aquat. Toxicol.* 46, 67-76
- Carballeira A, Reigosa MJ (1999) Effects of natural leachates of *Acacia dealbata* Link in Galicia (NW Spain). *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 40, 87–92.

- Carginale V., Sorbo S., Capasso C., Trinchella F., Cafiero G., Basile A. 2004. Accumulation, localisation, and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Protoplasma* 223:53–61.
- CEN -2003- Water quality. Guidance standard for the surveying of aquatic macrophytes in running water. EN 14184: 14 pp
- Chung L. K., Gupta V. K., Sawhney S. K. 1992 - Effect of cadmium on enzymes of nitrogen metabolism in pea seedlings. *Phytochemistry* 31: 395-400
- Dalla Vecchia, F., LaRocca, N., Moro, I., DeFaveri, S., Andreoli, C., Rascio, N. 2005. Morphogenetic, ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. *Plant Sci.* 168, 329–338. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.025>
- Den Hartog C. & Segal S., 1964. A new classification of the water-plant communities. *Acta Bot. Neerl.* 13: 367-393
- De Pippo T., Donadio C., Guida M., Petrosino C. (2006). The Case of Sarno River (Southern Italy) Effects of geomorphology on the environmental impacts. *ESPR – Environ Sci & Pollut Res* 13 (3) 2006
- Direttiva 91/271/CEE del Consiglio, del 21 maggio 1991, concernente il trattamento delle acque reflue urbane *Gazzetta ufficiale n. L 135 del 30/05/1991*
- Direttiva CEE 91/671 DEL CONSIGLIO del 12 dicembre 1991 relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole, *Gazzetta ufficiale n. L 375 del 31/12/1991*.
- 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.

- D. Lgs 172/2015 “Attuazione della direttiva 2013/39/UE, che modifica le direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque” (GU del 27 ottobre 2015 n.250)
- D. Lgs. 3 aprile 2006 n.152 “Norme in materia ambientale”. Gazzetta Ufficiale n. 88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n. 96.
- D.M. 12 giugno 2003, n. 185 “Regolamento recante norme tecniche per il riutilizzo delle acque reflue”.
- D.P.R. 6 giugno 2001 n. 380 “Testo unico in materia edilizia”.
- Esposito S., Castaldo Cobianchi R, Sorbo S, Conte B, Basile A (2007) Ultrastructural alterations and HSP 70 induction in *Elodea canadensis* Michx. exposed to heavy metals. *Caryologia* 60: 115-120 .
- Esposito S, Sorbo S, Conte B, Basile A. (2012) Effects of heavy metals on ultrastructure and HSP70s induction in the aquatic moss *Leptodictyum riparium* Hedw. *International Journal of Phytoremediation*, 14:443–455 *Doi: 10.1080/15226514.2011.620904*
- Fenoglio S., BO T. -2009- Lineamenti di ecologia fluviale. CittàStudi Edizioni, Torino: 252 pp.
- Fry J. C. 1998 - Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemistry Journal* 332: 507-515.
- Gentile Alberto, Cammarota Silvestre, 2011 “Studio generale del bacino del fiume Irno e censimento degli scarichi esistenti”, Associazione Southland Onlus di Giffoni Valle Piana.
- Ghosh, S., Mahoney,S.R., Penterman, J.N., Peirson, D., Dumbroff, E.B.,2001. Ultrastructural and biochemical changes in chloroplasts during *Brassic napus*

senescence. *PlantPhysiol.Biochem.*39,777–784. [http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428\(01\)01296-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0981-9428(01)01296-7).

- Godbold D. L. and Kettern C. 1991 - Use of root elongation studies to determine aluminium and lead toxicity in *Picea abies* seedlings. *Journal Plant Physiology* 138: 231-235.
- Hiramoto K., Ojima N., Sako K., Kikugava K. 1996 - Effects of plant phenolics on the formation of the spinadduct of hydroxyl radical and the DNA strand breaking by hydroxyl radical. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 19: 558-563.
- Holleman A. F. and Wiberg E. 1985 - *Lehrbuch der anorganischen chemie*. Walter De Gruyter, Berlin p.868.
- Hirst H., Chaud F., Delabie, Jüttner I., Ormerod S. J. -2004- Assessing the Short-Term Response of Stream Diatoms to Acidity Using Inter-Basin Transplantations and Chemical Diffusing Substrates. *Freshwater Biology*, 49: 1072-88.
- Kasparzak K. S. 1995 - Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Investigation* 13: 411-430.
- Kara, Y., Basaran D., Kara I., Zeytunluoglu A., Genc H., Bioaccumulation of nickel by aquatic macrophyta *Lemna minor* (duckweed). *Int. J. Agr. Biol.*, **5** (3): 281-283, 2003
- Kara. Bioaccumulation of Cu, Zn, and Ni from the wastewater by treated *Nasturtium officinale*.2005
- Krebs R., S.K. Gupta, G. Furrer, and R. Schulin, 1998: *Environ Qual*, 27: 18-23.
- Salt D. E., Prince R. C., Pickering I. J., Raskin I. 1995b - Mechanism of cadmium mobility and accumulation in indian mustard. *Plant Physiology* 10: 1427-1433.
- Kukkola,E.,Rautio,P.,Huttunen,S.,2000.Stress indications in copper and nickel exposed Scots pine seedlings. *Environ.Exp.Bot.*43,197–210. [http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472\(99\)00057-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0098-8472(99)00057-X).

- ISPRA, Manuali e linee guida 111,2014, ISBN:978-88-448-0651. Manuale e linea guida del Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente (SNPA): "Metodi biologici per le acque superficiali interne.
- ISPRA, giugno 2009. "Proposta per la valutazione dello stato qualitativo dei sedimenti fluviali nel sito di interesse nazionale Fiumi Saline ed Alento".
- ISO 7899-2:2000 - Water quality -- Detection and enumeration of intestinal enterococci -- Part 2: Membrane filtration method.
- Le Foche M., Notargiacomo T., Casino N., Pace G. "Guida fotografica alle piante acquatiche", Apra Lazio Manuali/Acqua 2012\_01.
- Legge 18 maggio 1989, n.183 "Norme per il riassetto organizzativo e funzionale della difesa del suolo" e s.m.i
- Leita L., Contin M., Maggioni A. 1991 - Distribution of cadmium and induced cd-binding proteins in root, stem, leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Science* 77: 139-147.
- Logan T.J., and R.L. Chaney, 1983: Utilization of municipal wastewater and sludge on land riverside. *Proc. Worksh. Univo California*, pp. 235-323.
- Marchionni M. 1999 - Inquinamento del suolo da metalli pesanti: effetti sulle piante. Conferenza Organizzativa: inquinamento del suolo da metalli pesanti. Sassari 6-7 Maggio.
- Matagi, S.V., Swai, D. and Mugabe, R. 1998. A review of heavy metal removal mechanisms in wetlands, *African Journal of Tropical Hydrobiology and Fisheries*, 8: 23-35

- McCutcheon S.C. and Schnoor, L.L. (Eds.) 2003. Phytoremediation: Transformation and control of contaminants. Wiley-Interscience, Inc. Hoboken, New Jersey.
- Metodo EPA6020 Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry, 1994.
- Michaeli, S., Galili, G., 2014. Degradation of organelle-specific organelle components via selective autophagy in plant cells. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 7624–7638. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms15057624>.
- Minciardi M.R., Rossi G.L., Azzollini R., Betta G. -2003- Linee guida per il biomonitoraggio di corsi d'acqua in ambiente alpino. ENEA, Provincia di Torino, Torino: 64 pp.
- Moral R., Gomez I., Navarro Pedreno J., Maitax J. 1994 - Effects of cadmium on nutrient distribution, yield, and growth of tomato grown in soilless culture. *Journal Plant Nutrition* 17: 953-962.
- Müller Th., 1992. Verband: *Ranunculus fluitantis* Neuhäusl 59. In Oberdorfer E. (Ed.) *Süddeutsche Pflanzengesellschaften. I. Fels- und Mauergesellschaften, alpine Fluren, Wasser-, Verlandungs- und Moorgesellschaften*: 89-99. III Ed.. G. Fischer, Jena, Stuttgart, New York.
- Nunn D., Cowx I.G., Frear P.A., Harvey J.P. -2003- Is Water Temperature an Adequate Predictor of Recruitment Success in Cyprinid Fish Populations in Lowland Rivers?. *Freshwater Biology*, 48: 233-35.
- Obata H. and Umebayashi M. 1993 - Production of SH compounds in higher plants of different tolerance to Cd. *Plant soil* 155/156: 533-536.
- Okland R. H., Steinnes E., Okland T. 1997 – Element concentration in the boreal forest moss *Hylocomium splendens*: variation due to segment size, branching pattern and pigmentation. *Journal of Bryology* 19: 671- 684. Forstner U., 1995: Metal speciation and contamination of soil. Boca Raton CRC, pp. 1-3.

- Outridge , P. M., Noller B.N., Accumulation of toxic trace elements by freshwater vascular plants. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **121**: 2-63, 1991
- Ouzoinidou G. 1994 - Copper-induced changes on growth, metal content and photosynthetic function of *Alyssum montanum* L. plants. *Environmental and Experimental Botany* 34: 154-160.
- Ouzounidou, G., Moustakas, M., Eleftheriou, E.P., 1997. Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L) leaves. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32, 154–160. <http://dx.doi.org/10.1007/s002449900168>.
- Paoli, L., Fiorini, E., Munzi, S., Sorbo, S., Basile, A., Loppi, S., 2014. Uptake and acute toxicity of cerium in the lichen *Xanthoria parietina*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 379–385. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.02.028>
- Qian, J. H., Zayed A., Zhu Y.L., Yu M., Terry N., Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants III. Uptake and accumulation of trace elements by twelve plant species. *J. Environ. Qual.*, 28 (5): 1448-1455, 1999
- Rau S, Miersch J, Neumann D, Weber E, Krauss GJ. 2007. Biochemical responses of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* to Cd, Cu, Pb and Zn determined by chlorophyll fluorescence and protein levels. *Environ Exp Bot* 59:299–306.
- Raunkiær, C. (1934) *The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography*, being the collected papers of C. Raunkiær.
- Regolamento (CE) N. 1907/2006 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 18 dicembre 2006 concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche (REACH), che istituisce un'agenzia europea per le sostanze chimiche, che modifica la direttiva 1999/45/CE e che abroga il regolamento (CEE) n. 793/93 del Consiglio e il regolamento (CE) n. 1488/94 della Commissione, nonché la direttiva 76/769/CEE del Consiglio e le direttive della Commissione 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE e 2000/21/CE

- Riffardi R. and Levi-Minzi R. 1989 - Il controllo degli inquinanti in agricoltura. Gli inquinanti organici. Chimica del suolo, Patron Editore.
- Rout G. R., Samantary S., Das P. 2000 - Effects of chromium and nickel on germination and growth in tolerant and no tolerant population of *Echinochloa* (L.) Linch. *Chemosphere* 40: 855-859.
- Salt, D.E. Smith, R.D. and Raskin, I. 1998. Phytoremediation. *Annual Rev. Plant Phys. Plant Mol. Bio* 49: 643-668
- Salt D. E., Rauser W. E., 1995: MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiol.*, 107: 1293-1301.
- Sburlino G., Tomasella M., Oriolo G., Poldini L., Bracco F. -2008- La vegetazione acquatica e palustre dell'Italia nord-orientale. 2-La classe *Potametea Klika* in Klika et V. Novák 1941. *Fitosociologia*, 45(2): 3-40.
- Schwartzman, R.A., Cidlowsky, J.A., 1993. Apoptosis – the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.* 14, 133–151. <http://dx.doi.org/10.1210/edrv-14-2-133>.
- Shaw A. J. 1990 - Metal tolerance and cotolerance in the moss *Funaria hygrometrica*. *Can. Journal of Botany* 68: 2275-2282.
- Siedlecka A. 1995 - Some aspects of interaction between heavy metals and plant mineral nutrients. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 64:265-272.
- Siligardi M., Cappelletti C., Chierici M., Ciutti F., Egaddi F., Maiolini B., Mancini L., Monauni K., Minciardi M. R., Rossi G. L., Sansoni G., Spaggiari R., Zanetti M. - 2001 - *Indice di Funzionalità Fluviale I.F.F. Manuale di applicazione* - ANPA, 221 pp.
- Siligardi M., Bernabei S., Cappelletti C., Chierici E., Ciutti F., Egaddi F., Franceschini A., Maiolini B., Mancini L., Minciardi M.R., Monauni C., Rossi

G.L., Sansoni G., SPAGGIARI R., Zanetti M. -2007- I.F.F. Indice di Funzionalità Fluviale. APAT, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, APPA Trento, Lineagrafica Bertelli Editori snc, Trento: 223 pp

- Siniscalchi S., 2010. Problemi di gestione delle acque in provincia di Salerno: l'esempio di un'area-campione "sensibile", attraverso carte e documenti d'archivio del secondo Ottocento. Semestrale di studi e ricerche di geografia, Roma - XXII, Fascicolo 2, luglio-dicembre 2010. *ISSN 1125-5218*.
- Sorrentino C., Basile A., Del Piano L., Cafiero G., Abet M., Giordano S., Castaldo Cobianchi R. 1997 - Morphogenetic effects and tissue localization of lead in *Nicotiana tabacum* L. e *Nicotiana rustica* L. Atti Accademia Fisiocritici Siena Serie XV.
- Subhadra A. V. and Panda B. B. 1994 - Metal-induced genotoxic adaptation in barley (*Hordeum vulgare* L.) to maleic hydrazide and methyl mercuric chloride. *Mutation Research* 321: 93-102.
- Thompson, A.R., Vierstra, R.D., 2005. Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 165–173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2005.01.013>
- Thompson P. L., Bärlocher F. -1989- Effect of pH on Leaf Breakdown in Streams and in Laboratory. *Journal of the North American Benthological Society*, 8: 203-210.
- Todeschini, V., Lingua, G., D'Agostino, G., Carniato, F., Roccotiello, E., Berta, G., 2011. Effects of high zinc concentration on poplar leaves: a morphological and biochemical study. *Environ. Exp. Bot.* 71, 50–56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.018>.
- Tomaselli M. & Bernardo L., 2006. La vegetazione degli ambienti umidi nei massicci del Sirino-Papa e del Pollino (Italia meridionale). *Arch. Geobot.* 9 (1-2) (2003): 1-18.

- Tribunale di Salerno, Sentenza N.415/2007 R G Tribunale di Salerno.
- Vardanyan L., Schmieder K., Sayadyan H., Heege T, Heblinski J., Agyemang T., De J., Breuet J. Heavy metal accumulation by certain aquatic macrophytes from Lake Sevan (Armenia). 2007
- Vázquez M. D., Poschenrieder C. H., Barcelo J. 1987 - Chromium VI induced structural and ultrastructural changes in bush bean plants. British Ecological Society Symposium 15: 231-258.
- Wainwright S. J. and Woolhouse H. W. 1975 - Physiological mechanism of heavy metals tolerance in plants. British Ecological Society Symposium 15: 231-258.
- Ward J.V., 1989, The four-dimensional nature of lotic ecosystems, "Journal of the North American Benthological Society", 8, pp 2-8
- Wentworth C. K. -1922- A scale of grade and class terms for clastic sediments. Journal of Geology, 30: 377-392.
- Wierzbicka M. 1988 - Mitotic disturbance induced by low doses of inorganic lead. Caryologia 41: 143-160.
- Zenk M. H. 1996 - Heavy metal detoxification in higher plants. Gene 179: 21-30.
- Zhang, X., Gao, B., Xia, H., 2014. Effect of cadmium on growth, photosynthesis, mineral nutrition and metal accumulation of banagrass and vetivergrass. Ecotoxicol. Environ. Saf. 106, 102–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.025>.

## **RINGRAZIAMENTI**

Si ringrazia

Il Prof Sergio Esposito per l'indispensabile guida, indirizzo e sostegno all'attività di ricerca.

La Prof.ssa Adriana Basile, il Prof Marco Guida, la Prof.ssa Giulia Maisto, il Prof Marco Trifuoggi, per la disponibilità in riferimento alle attività analitiche.

Il Dott. Renato Gesuele, il Dott. Marco Lentini, la Dott.ssa Valeria Memoli, il Dott. Sergio Sorbo, la Dott.ssa Maria Toscanesi, per il supporto analitico.

La Dott.ssa Rosaria D'Arienzo (ARPAC, Dipartimento di Salerno), l'Ing Gianluca D'Onofrio, (Autorità di Bacino Regionale Campania Sud), la Dott.ssa Marina Esposito (ARPAC, Dipartimento di Salerno), il Dott. Alberto Gentile, per le preziose informazioni sui dati ambientali.

Gli amici e colleghi, Massimo Peleggi, Anna Laura Saso e Monica Serra, per il confronto e l'arricchimento della ricerca.

Un particolare ringraziamento all'amico e collega Cristiano Gramegna, senza il quale sarebbe stato impossibile portare a termine tale esperienza.

Paolo Insolubile, Maria Fagnola, Giovanni Vincenti, per il sostegno morale.

Mauro Vincenti, esempio di motivazione professionale, per l'incoraggiamento e l'amore dimostratomi.