

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Salute degli ecosistemi fluviali:  
i clostridi solfito-riduttori come indicatori  
dello stato dei sedimenti**

A cura di  
Stefania Marcheggiani, Marcello Iaconelli,  
Annamaria D'Angelo e Laura Mancini  
*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**04/37**

Istituto Superiore di Sanità

**Salute degli ecosistemi fluviali: i clostridi solfito-riduttori come indicatori dello stato dei sedimenti.**

A cura di Stefania Marcheggiani, Marcello Iaconelli, Annamaria D'Angelo e Laura Mancini  
2004, 38 p. Rapporti ISTISAN 04/37

La salute degli ecosistemi fluviali è misurabile attraverso l'uso di indici e indicatori, la cui messa a punto è indispensabile per azioni di prevenzione sanitaria. In tale contesto lo scopo di questo lavoro è stato quello di individuare clostridi solfito-riduttori nei sedimenti di ecosistemi fluviali. Attualmente la ricerca di tali microrganismi è considerata dalla normativa di settore obbligatoria per le acque superficiali destinate a scopo potabile, mentre è facoltativa nella matrice sedimento. L'area di studio è compresa nel basso corso del bacino idrografico del Tevere e i siti di campionamento sono stati selezionati in modo da rappresentare un crescente gradiente di pressioni in direzione monte-valle. Per l'isolamento delle specie del genere *Clostridium* sono state utilizzate metodiche microbiologiche e biomolecolari. I risultati ottenuti evidenziano l'applicabilità di tali metodologie e forniscono informazioni sperimentali che avvalorano l'utilizzo di tali microrganismi come indicatori microbiologici dello stato dei sedimenti.

*Parole chiave:* Clostridi solfito-riduttori, *Clostridium perfringens*, Sedimenti, Salute degli ecosistemi.

Istituto Superiore di Sanità

**Health of river ecosystems: sulphite reducing clostridia as indicators of the state of sediments.**

Edited by Stefania Marcheggiani, Marcello Iaconelli, Annamaria D'Angelo and Laura Mancini  
2004, 38 p. Rapporti ISTISAN 04/37 (in Italian)

The health of river ecosystems can be assessed using indices and indicators, the study of which is oriented to detect health prevention actions. In this contest the aim of this work is to identify species of sulphite-reducing *clostridia* in river sediments. Actually the monitoring of *clostridia* is considered by Italian legislation as compulsory for drinking waters and optional for river sediments. The study area includes the lower course of the Tiber river basin and the sampling sites have been selected to represent the upstream-downstream gradient of pressure. The isolation of species of the *Clostridium* genus has been performed using microbiological and biomolecular methods that can be applied for environmental monitoring. The results of this study strengthen the reliability of these methods and the possible use of *Clostridium* as microbiological indicator of sediments state.

*Keywords:* Sulphite-reducing clostridia, *Clostridium perfringens*, Sediments, Health of ecosystems.

Autori del presente rapporto:

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

Stefania Marcheggiani  
Marcello Iaconelli  
Annamaria D'Angelo  
Elio Pierdominici  
Paolo Formichetti  
Giuseppina La Rosa  
Michele Muscillo  
Laura Mancini

*Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze*

Michele Equestre

Un particolare ringraziamento per la realizzazione del presente lavoro va rivolto a Maria Elena Beltrami, Francesca Aulicino, Giorgio Pace e Alberto Sorace.

Per informazioni su questo documento scrivere a: [lmancini@iss.it](mailto:lmancini@iss.it).

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2004

# INDICE

<b>Quadro di riferimento</b> .....	1
Evoluzione della normativa in materia di acque superficiali .....	1
Indicatori microbiologici nei sedimenti .....	2
Clostridi .....	3
Ecologia .....	4
Significato sanitario .....	4
Relazioni filogenetiche.....	5
Matrice sedimento.....	5
Frazione organica.....	6
Frazione inorganica.....	6
Classificazione del sedimento mediante parametri chimico-fisici .....	7
<b>Fase sperimentale</b> .....	9
Area di studio.....	9
Campionamento.....	11
Analisi del peso secco.....	11
Analisi granulometriche.....	11
Analisi microbiologiche della acque e dei sedimenti.....	12
Analisi biochimiche.....	13
Analisi genetiche .....	14
<b>Risultati dello studio</b> .....	18
Matrice sedimento .....	18
Microbiologia e biochimica .....	19
Analisi genetiche .....	24
<b>Discussione e conclusioni</b> .....	33
<b>Bibliografia</b> .....	35



## QUADRO DI RIFERIMENTO

La corretta valutazione della qualità ambientale implica generalmente un'adeguata pianificazione e individuazione delle priorità d'intervento e delle metodologie di controllo. Tali attività debbono avvalersi di procedure in grado di descrivere gli impatti subiti dall'ecosistema a seguito di pressioni di varia natura. Lo studio delle interazioni tra qualità della salute e qualità ecologica ha da tempo privilegiato analisi chimiche e biologiche; tali metodiche si sono andate consolidando fino a divenire lo strumento tecnico di riferimento nelle normative ambientali nazionali ed europee (Italia, 1999; Unione Europea, 2000).

Questo ha stimolato ulteriormente la ricerca nell'approntare nuove metodiche che consentano, attraverso la tutela delle risorse, la salvaguardia della salute e del benessere delle generazioni attuali e future.

Uno degli scopi di questo lavoro è quello di fornire un contributo nell'ambito del quadro conoscitivo attraverso l'identificazione di indicatori microbiologici dei sedimenti. Sono state utilizzate spore di clostridi solfito riduttori provenienti da sedimenti fluviali al fine di contribuire alla conoscenza della specie e/o dei *taxa* che abbiano le caratteristiche di indicatore microbiologico di inquinamento fecale e di rischio. L'identificazione della distribuzione delle specie nei sedimenti per le diverse stagioni contribuisce ad una prima valutazione della loro funzionalità come indicatori.

L'esigenza di incoraggiare tale approccio è chiaramente sentita a livello istituzionale e risponde alle indicazioni che vengono dalla normativa di settore relative agli obiettivi e alle azioni da interpretare per il settore delle acque e dei sedimenti. Infatti lo studio dei sedimenti fluviali e l'analisi delle caratteristiche microbiologiche, chimiche e fisiche degli stessi riveste una notevole importanza poiché essi possono fungere da ricettacolo transitorio e/o definitivo dei contaminanti. La caratterizzazione dello stato dei sedimenti attraverso l'uso di indicatori microbiologici come le spore di clostridi solfito riduttori, può essere utilizzato anche al fine di pianificare interventi risanatori sugli ecosistemi valutandone poi la loro efficacia nel tempo.

## Evoluzione della normativa in materia di acque superficiali

La prima legge in materia di tutela delle acque dall'inquinamento fu la Legge Merli (Italia, 1976) che prevedeva l'introduzione di limiti di accettabilità dei vari inquinanti nelle acque reflue e di una loro regolamentazione.

Con il DL.vo 152/1999 (Italia, 1999) è stato rivisitato il concetto di prevenzione e riduzione dell'inquinamento delle acque attraverso: il risanamento dei corpi idrici inquinati, il miglioramento dello stato delle acque, il mantenimento della capacità autodepurativa dei corpi idrici e il rispetto dei valori limite per gli scarichi anche in relazione agli obiettivi di qualità del corpo idrico recettore.

Tale decreto, sottolineando l'importanza della conservazione delle caratteristiche biologiche, chimico-fisiche e morfologiche delle acque superficiali, prevede anche l'organizzazione di piani di monitoraggio che portino all'attribuzione di classi di qualità per quei corpi idrici considerati significativi. L'individuazione di fonti di inquinamento diffuso o puntiforme e la valutazione dello stato di salute del corpo idrico utilizzano i seguenti indicatori ambientali obbligatori e supplementari:

- IBE (Indice Biotico Esteso) (Ghetti, 1997);
- O<sub>2</sub> disciolto (% sat.), NH<sub>4</sub> (N mg/L), BOD<sub>5</sub> (*Biochemical Oxygen Demand*) (O<sub>2</sub> mg/L), NO<sub>3</sub> (N mg/L), COD (*Chemical Oxygen Demand*) (O<sub>2</sub> mg/L), P<sub>tot.</sub> (P mg/L);
- per le acque superficiali *Escherichia coli*, per i sedimenti come analisi supplementare le spore di clostridi.

In Tabella 1 sono elencati i microrganismi indicatori per le diverse tipologie di acque previsti dalla normativa nazionale vigente.

Per quanto riguarda le analisi supplementari, la normativa prevede al fine del raggiungimento dello stato di qualità, l'analisi sui sedimenti per ottenere elementi conoscitivi utili a determinare le cause di degrado ambientale di un corso d'acqua. Tali elementi includono spore di clostridi solfito-riduttori, microinquinanti e sostanze pericolose mentre per le acque potabili il *C. perfringens* è tra gli indicatori richiesti.

**Tabella 1. Normativa vigente per la ricerca dei microrganismi indicatori nelle acque**

Tipologia	Indicatori
<b>DPR 470/1982</b>	
– Acque di balneazione	Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali, Salmonelle, Enterovirus
<b>DL.vo 152/1999</b>	
– Acque superficiali dolci	<i>E. coli</i>
– Acque marine	Enterococchi
– Acque superficiali destinate alla produzione di acqua potabile	Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali, Salmonelle
– Parametri degli scarichi idrici	<i>E. coli</i>
– Acque destinate alla vita dei molluschi	Coliformi fecali
<b>DL.vo 31/2001</b>	
– Acque destinate al consumo umano	<i>E. coli</i> ; <i>C. perfringens</i> (comprese le spore) solo per acque di superficie. <i>P. aeruginosa</i> , Coliformi, Enterococchi. Computo delle colonie a 22 °C e 37 °C solo in acqua venduta in bottiglia o in contenitori.

La direttiva europea 2000/60 (Unione Europea, 2000) rappresenta il quadro d'azione legislativo comunitario in materia di acque. L'obiettivo di tale direttiva prevede nel giro di 15 anni il raggiungimento dello stato di qualità buono delle acque superficiali. La normativa riporta consigliati solo indicatori biologici superiori (*periphyton*, macrofite, *benthos*, pesci). La conoscenza della qualità dei sedimenti attraverso indicatori microbiologici può contribuire a valutare lo stato di compromissione e misurare l'efficacia degli interventi risanatori volti al raggiungimento dell'obiettivo di qualità.

## Indicatori microbiologici nei sedimenti

Sono considerati come indicatori i microrganismi sporigeni appartenenti al genere *Clostridium*, poiché essi possono essere sia parte della microflora naturale sia come risultato di una deposizione a lungo termine. In particolare *C. perfringens* possiede delle caratteristiche che

lo rendono particolarmente adatto come indicatore microbiologico di inquinamento fecale (Desmarais *et al.*, 2002).

La presenza o assenza di clostridi solfito-riduttori può essere usata per valutare lo stato degli ecosistemi. Attualmente sono usati come indicatori solo per le acque potabili mentre per i sedimenti sono solo facoltativi.

Questa buona rappresentatività, come indicatori, è data anche dal loro utilizzo come indicatori paleolimnologici d'inquinamento da reflui urbani nei fiumi e negli ambienti marini litoranei bentonici, proprio per la loro persistenza nell'ambiente (Robles *et al.*, 2000).

La ricerca di forme sporigene, si è rivelata più significativa se rivolta al sedimento piuttosto che alle acque, poiché in esso coesistono due condizioni essenziali per lo sviluppo di questi microrganismi, ossia assenza di ossigeno e la presenza d'abbondante sostanza organica. Ma non solo, le acque correnti trasportano in brevi frazioni di tempo, tutto quello che vi è introdotto mentre il sedimento funziona da "trappola" perché trattiene i contaminanti nella "memoria" del sito.

I clostridi sono maggiormente presenti nel sedimento fangoso rispetto al sabbioso, quindi la loro concentrazione risulta essere in funzione anche della granulometria delle particelle sedimentarie. La maggior concentrazione si riscontra negli strati superficiali dei sedimenti proprio perché la densità batterica è condizionata dalla concentrazione della sostanza organica piuttosto che da altri fattori (Cavallo *et al.*, 1996).

Davies *et al.* (1995), hanno sperimentato che sugli strati superficiali di sedimento si è riscontrata una bassa concentrazione di *E. coli* e di Streptococchi a fronte di un'alta concentrazione di clostridi. Tali studi avvalorano la tesi che i clostridi sono estremamente resistenti agli stress ambientali. I batteri adsorbiti alle particelle di sedimento sembrano essere protetti dall'influenza di alcuni fattori come radiazioni UV, alta salinità, tossicità indotta dai metalli pesanti e attacchi da parte dei batteriofagi.

I clostridi e quindi in particolare *C. perfringens* è risultato essere particolarmente adatto come indicatore in quanto la sua concentrazione nelle feci è compresa tra  $10^2$ - $10^7$  UFC/g (Unità Formanti Colonia per grammo); inoltre la capacità di formare spore resistenti consente a tale microrganismo di sopravvivere anche in condizioni avverse. Pertanto la loro ricerca permette di stimare il grado di inquinamento di un corpo idrico anche da un punto di vista temporale.

## Clostridi

La definizione riportata oggi dal *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2 (Peter & Sneath, 1986) non è altro che una versione più estesa di quella data precedentemente da Prazmowski nel 1880.

I clostridi sono definiti come: bastoncelli, gram +, motili (peritrichi) e non motili formanti endospore ovali o sferiche che allungano il corpo della cellula. Sono privi di capsula ad eccezione di *C. perfringens* e poche altre specie. Sui terreni di coltura formano colonie di aspetto variabile e spesso producono emolisi su agar sangue. Quasi tutte le specie di clostridi compiono la fermentazione butirrica con produzione di grandi quantità di gas (principalmente CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>). Possono essere specie chemorganotrofiche o chemolitotrofiche. Producono miscele di acidi organici e alcol dai carboidrati e peptoni. Molti possono essere saccarolitici, o proteolitici, nessuno dei due od entrambe. Possono metabolizzare carboidrati, alcool, aminoacidi, purine, steroli o altri composti organici. Alcune specie fissano l'azoto atmosferico. Sono solfito-riduttori. Di solito sono catalasi negativi, sebbene tracce di catalasi potrebbero essere trovate in alcuni ceppi. La parete cellulare contiene acido meso-DAP (acido-diaminopimelico). Molte specie sono anaerobi obbligati, sebbene alcune specie tollerino

l'ossigeno, alcune specie crescono ma non sporulano in presenza di aria a pressione atmosferica. La maggior parte delle specie cresce rapidamente a pH 6,5-7 e alla temperatura tra 30 e 37 °C, l'intervallo di temperatura per l'optimum di crescita è da 15 ai 69 °C (Bergey's Manual, 1986).

## Ecologia

I clostridi sono microrganismi ubiquitari, essendo abitatori naturali dei suoli, dell'intestino degli organismi viventi. La caratteristica più saliente è la possibilità che hanno di produrre endospore che sono più resistenti delle forme vegetative al calore, alla disidratazione e ad altri agenti chimico-fisici distruttivi. Le endospore hanno la funzione di permettere al batterio di affrontare periodi più o meno lunghi in cui le condizioni ambientali sfavorevoli porterebbero a morte le forme vegetative (Bergey's Manual, 1986).

In natura le spore costituiscono una frazione della popolazione batterica quantitativamente variabile in funzione delle condizioni dell'ambiente in cui si trova la popolazione. Tale frazione sarà infatti più elevata tanto più avverse sono le condizioni ambientali (ambienti secchi, scarsa disponibilità di nutrienti anossia, ecc.) viceversa sarà scarsa se l'ambiente è favorevole allo sviluppo delle forme vegetative. Il rischio collegato alla capacità che hanno questi batteri nel formare le spore è dovuto al fatto che tali forme di resistenza sono in grado di sopravvivere all'azione del calore e all'essiccamento. La sopravvivenza anche di poche spore nell'ambiente può determinare la contaminazione massiva dello stesso, favorendo la proliferazione delle forme vegetative che dalle spore si sviluppano.

Le spore batteriche non germinano spontaneamente, ma hanno bisogno di una qualche forma di attivazione; la più frequente risulta essere, in condizioni reali, un trattamento termico a temperatura subletale (80-85 °C). Esistono tuttavia dei fattori che impediscono la germinazione delle spore, tra questi meritano rilievo l'acidità (pH <4,5-5), l'acqua libera ( $a_w < 0,94$ ) e un ambiente non strettamente anaerobio.

## Significato sanitario

Alcune specie producono esotossine e sono patogene per l'uomo; la dose infettante è nota essere  $10^8$ - $10^9$  (Bitton, 1984; Pahren, 1987).

Con l'eccezione di *C. botulinum* e *C. difficile*, responsabili rispettivamente del botulismo e di coliti pseudomembranose nell'uomo e negli animali, le altre specie sono associate per la maggior parte ad infezioni di ferite; tra queste le più importanti sono: *C. tetani*, responsabile del tetano; *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. bordelli*, spesso associati alla gangrena gassosa; *C. botulinum* e *C. perfringens* causa di gravi fenomeni tossinfettivi legati al consumo di alimenti da essi contaminati.

Altre specie di clostridi sono solo raramente associate ad infezioni mentre altre, come *C. bifermentans* e *C. sporogenes*, sono considerate apatogene.

I clostridi sono bacilli molto diffusi nell'ambiente e si dividono in:

– *Clostridi invasivi:*

hanno la capacità di elaborare enzimi istolitici, ad azione patogena locale, l'azione istolesiva favorisce la diffusione dei bacilli e quindi l'estendersi del processo morboso. I bacilli di questa categoria producono tossine meno potenti, e soprattutto alcuni esoenzimi tra questi, *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. chauvoei*, *C. septicum* e *C. haemolyticum*.

– *Clostridi non invasivi:*

la cui azione patogena è dovuta alla produzione di potenti esotossine e alla loro diffusione nell'organismo tra questi, *C. botulinum*.

## Relazioni filogenetiche

Il genere *Clostridium* costituisce un genere filogeneticamente incoerente. In contrasto con la tradizionale definizione di genere di *Pseudomonas* dove i membri sono di origine polifiletica, per il genere *Clostridium* ci sono *subphyla* diversi all'interno del *phylum*.

I Proteobatteri, membri di *Clostridium* possono essere considerati discendenti da un ancestrale comune che si è differenziato presto nell'evoluzione dei batteri gram +.

Con l'analisi della sequenza 16S rRNA è stato possibile costruire l'albero filogenetico (Minton & Clarke, 1989) dei clostridi classificandoli in XIX cluster; inoltre da tale analisi è emerso che 35 specie considerate patogene appartengono al genere *Clostridium* e di queste circa la metà al cluster I. Le specie di *Clostridium* presentano una diversa patogenicità e per questo vengono specificate e distinte in: patogene (P) e molto patogene (MP) come *C. botulinum*, *C. tetani* e *C. perfringens*.

La formazione di endospore sembra essere un carattere di tipo monofiletico che è espresso in alcuni generi del *subphylum* dei gram +; *Clostridium*, *Bacillus*, *Desulfotomaculum* e *Helicobacterium*, *Sarcina*, *Sporonusa* e alcuni nuovi generi che furono descritti come membri certi appartenenti al genere *Clostridium* e *Bacillus*.

La perdita di spore, formazione e cambiamenti morfologici rappresentano il filo conduttore dell'evoluzione dei fenotipi e quindi vennero chiaramente distinte le specie che formano spore da quelle che non le formano.

Successivamente, furono considerati come un nuovo *taxa*, come membri anaerobi del genere *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Ruminococcus* i quali sono imparentati con i *Clostridium*, o membri anaerobi del genere *Planococcus*, *Caryophanon*, *Kurthia*, *Filibacter* e *Staphylococcus*, i quali sono imparentati con il *Bacillus*.

L'importanza delle caratteristiche morfologiche, fisiologiche e ultrastrutturali fu accettata come base per la loro classificazione mentre i dati genetici sull'intra e interrelazione genetica.

Dall'applicazione di approcci polifasici per la classificazione, la posizione filogenetica di un isolato rappresenta il punto di inizio per la caratterizzazione fenotipica e genotipica per delineare il *taxon* dal più vicino *taxa*.

## Matrice sedimento

La matrice sulla quale è stato condotta la ricerca dei clostridi solfito-riduttori è rappresentata dal sedimento fluviale. I sedimenti giocano un ruolo importante nella valutazione dello stato di salute degli ecosistemi. In genere si possono distinguere due strati, con diversa funzionalità: lo strato superficiale (che corrisponde ad alcuni centimetri della parte superficiale) rappresenta la porzione attiva dell'ecosistema mentre gli strati più profondi sono in genere passivi e permanentemente tranquilli. Questi strati profondi sono tuttavia interessanti dal momento che costituiscono una registrazione storica dell'attività dell'ecosistema e possono rientrare nella porzione attiva dello stesso ad opera di fenomeni di piena e, più in generale, di eventi idrogeologici. Questa consapevolezza ha condotto ad incrementare in anni recenti, il monitoraggio della concentrazione dei contaminanti del sedimento da parte degli organi preposti al controllo della qualità dei corpi fluviali mentre il DL.vo 152/1999 (Italia, 1999) in materia "acque superficiali: monitoraggio e classificazione" prevede che le analisi sui sedimenti sono da considerarsi come analisi supplementari eseguite per avere elementi di conferma sul raggiungimento dello stato "Buono", o comunque per avere, se necessario elementi conoscitivi utili a determinare le cause di sofferenza di un corso d'acqua.

Nei sedimenti si registra un continuo fluire di composti organici e inorganici attraverso interfaccia acqua-sedimento e questi interscambi possono essere accelerati dall'attività biologica; in questo senso tali fenomeni manifestano un andamento stagionale.

Un altro parametro importante nelle interazioni tra sedimento e gli eventuali contaminanti presenti nonché nella loro ripartizione nel sistema acquatico, è rappresentato dalla granulometria e natura delle particelle solide presenti nelle varie stazioni di campionamento.

La frazione più interessante per la valutazione dei contaminanti è quella <90 µm costituita da limo e argille, questa frazione tende a predominare nelle aree di deposizione; sabbie grossolane medie e fini possiedono una minore area specifica e un tenore in carbonio organico inferiore e di conseguenza possono trattenere minori quantità di tossici solubili. La presenza di inquinanti organici nei sedimenti rappresentano un rischio potenziale anche per la salute umana a causa della possibilità di mobilizzare e amplificare l'effetto dei contaminanti mediante la catena alimentare. Il particolato sospeso è costituito da due frazioni una organica e una inorganica.

### **Frazione organica**

La frazione organica è composta da organismi viventi fitoplanctonici, coccoliti, batteri, da materiale detritico vegetale, succhi, secreti e pellets fecali (termine quest'ultimo che indica i prodotti fecali, principalmente di invertebrati). La maggior parte ha forma ovoidale, con dimensioni pari a 1 mm; vanno inoltre considerati come costituenti di questa frazione il detrito e composti organici provenienti dal dilavamento delle aree continentali o da immissioni accidentali e locali. La sostanza organica di solito è tessitualmente molto fine, tanto da formare patine di rivestimento sulle particelle in sospensione come ad esempio l'argilla che è caratterizzata un elevato potere adsorbente.

Le molecole e gli ioni inorganici e organici possono essere facilmente adsorbiti dal particolato in sospensione venendo di conseguenza veicolati, depositati e accumulati nell'ambiente acquatico. La sostanza organica, costituita da pochi elementi (azoto, idrogeno, ossigeno, fosforo e zolfo), è fonte di cibo per molti organismi acquatici eterotrofi. L'ossidazione biologica di una sostanza organica particellata ad opera dei microrganismi anaerobi, lascia nell'acqua una quantità insufficiente d'ossigeno disciolto per la sopravvivenza della flora e della fauna acquatiche provocandone un'elevata mortalità.

### **Frazione inorganica**

La frazione inorganica sospesa, cioè quella minerale, proviene dall'alterazione e dall'erosione della crosta continentale (per ruscellamento diffuso ed erosione in alveo o per deflazione eolica), dallo scioglimento dei ghiacciai, dall'atmosfera e in maniera esigua dall'attività vulcanica che però può essere localmente e temporaneamente molto importante. Il contributo di materiale di polveri cosmiche risulta irrisorio, anche se la presenza nei sedimenti oceanici di particelle di natura cosmogonica può fornire indicazioni molto utili per la ricostruzione d'eventi cosmici.

La composizione del particolato è estremamente variabile a seconda dell'ambiente acquatico considerato. Il maggior apporto di sedimento di provenienza continentale è veicolato in mare dai fiumi. La concentrazione di particolato sospeso non è omogenea all'interno del corpo idrico fluviale, ma varia a seconda delle caratteristiche meteo-climatiche del bacino imbrifero, dei contributi dei singoli affluenti e delle condizioni idrauliche del tratto d'asta fluviale considerato; ciò determina un tenore disomogeneo e variabile nel tempo della sostanza sospesa particellata (SPM: *Suspended Particulate Matter*). Differenti concentrazioni di particolato possono essere

misurate nell'arco di una giornata così come variazioni su scala mensile o stagionale sono registrate qualora il fiume si trovi in differenti regimi (piena, morbida o magra). Per stimare in prima approssimazione il trasporto solido di un corso fluviale, si ricerca una relazione tra la frazione solida sospesa e la portata liquida, calcolata in una sezione definita dell'alveo. Anche se questa relazione non è lineare la concentrazione di particolato sospeso è generalmente più elevata durante i periodi di piena. Non tutto il particolato sospeso è scaricato in mare; in molti casi rimane intrappolato in tratti fluviali di bassa energia, zone di deposito, laghi o nei bacini artificiali.

La struttura del particolato allo stato naturale si trova sottoforma d'aggregati chiamati flocculi, le dimensioni in situ raggiungono 1-2 mm ma in qualche caso sono stati osservati aggregati fino a 10 cm e occasionalmente anche più grandi. La flocculazione di particelle in sospensione influenza considerevolmente il trasporto del particolato e delle sostanze ad esso associate. La formazione dei flocculi dipende da un elevato numero di fattori tra i quali ricordiamo la salinità del corpo d'acqua, la concentrazione del particolato (che incrementa il numero di contatti potenziali tra le particelle), la turbolenza, i moti browniani (Hunt, 1980; McCave, 1983), la polimerizzazione e adsorbimento su granuli di sostanze organiche disciolte (particolarmente carboidrati) (Sieburth, 1965; Jannash, 1973; Gilmer, 1974; Wassmann *et al.*, 1986), mucchi ed essudati batterici e fitoplanctonici che fungono da collante e l'aggregazione di bolle d'aria o di gas.

La maggior parte delle determinazioni sulle dimensioni del particolato si effettua con il *coulter counter* (che con i più comuni capillari analizza particelle tra 1,5  $\mu\text{m}$  e 125  $\mu\text{m}$ ). L'interpretazione dei dati dimensionali può fornire informazioni significative sulla distribuzione e sulle caratteristiche delle masse d'acqua di differente origine mettendo in evidenza anche fenomeni di risospensione (Sheldon *et al.*, 1972; McCave 1983; Eisma & Kalf, 1984, Brambati *et al.*, 1983). Il trasporto di particolato in sospensione nei fiumi, è essenzialmente legato alle caratteristiche morfologiche dei corsi stessi, classificabili in base alla lunghezza dell'asta principale, all'estensione e all'erosibilità del bacino idrografico. Inoltre le concentrazioni della frazione solida sospesa dipendono dalle caratteristiche idrauliche, quale ad esempio la portata liquida del fiume e la rugosità del letto di fondo, nonché dalle condizioni meteorologiche e dalle caratteristiche climatiche dell'area drenata. Infine influisce anche l'attività antropica che insiste sia sull'alveolo del corso d'acqua che sul suo bacino idrografico. L'incremento delle condizioni energetiche nel corpo d'acqua tende a rimobilizzare dal fondo il particolato più fine piuttosto che quello grossolano, laddove il sedimento è scarsamente compattato. La velocità di sedimentazione varia in funzione della forma, della densità e del dilavamento delle particelle. Di conseguenza il diametro, la densità e la forma delle particelle, unitamente alle caratteristiche composizionali, rappresentano il fattore principale che influenza il trasporto e la successiva deposizione del particolato.

## **Classificazione del sedimento mediante parametri chimico-fisici**

La composizione granulometrica o tessitura, rappresenta il fattore che determina la struttura del sedimento. Esso rappresenta la ripartizione percentuale delle particelle disaggregate aventi una diversa densità, rilevabile con un'analisi fisico-meccanica (o granulometrica). Tale analisi consente una classificazione fisica del sedimento, fornendo informazioni sia per ciò che riguarda l'attitudine potenziale ad assumere un determinato tipo di struttura che la resistenza a conservarlo nel tempo, inoltre da informazioni sullo smaltimento di acque superficiali e sull'erosione.

Con l'analisi fisico-meccanica si effettua la ripartizione statistica delle particelle di diametro diverso. Nel 1926 l'Associazione Internazionale della Scienza del Suolo stabilì l'uso della scala convenzionale evidenziata in Tabella 2.

**Tabella 2. Scala di convenzione proposta dall'Associazione Internazionale della Scienza del Suolo**

Frazioni	Tipologie	Diametro (mm)
	<b>Terra fine</b>	
1	argilla	<0,002
2	limo	0,002-0,02
3	sabbia fine e finissima	0,02-0,2
4	sabbia media o grossa	0,2-2
	<b>Scheletro</b>	
5	ghiaia	2-20
6	ciottoli	>20

La tessitura del suolo è la distribuzione per classi dimensionali delle particelle ed è uno dei caratteri edafici più importanti poiché non varia considerevolmente con il tempo. È responsabile di molte proprietà fisiche, idrologiche e chimiche ed è uno dei caratteri su cui si fonda la divisione in famiglie e serie nella classificazione dei suoli. Le particelle minerali costituenti il suolo coprono un ampio intervallo dimensionale variando dalle pietre fino alle argille. Mentre per le particelle con diametro superiore a 2 mm la suddivisione in classi è definita in termini abbastanza specifici (pietre: particelle con diametro superiore a 100 mm, ghiaia o scheletro: particelle con diametro compreso tra 2 e 100 mm), per le particelle elementari di diametro inferiore a 2 mm non esiste un accordo generalizzato quindi la suddivisione ha limiti diversi a seconda dei sistemi a cui ci si riferisce. Esistono quattro sistemi di classificazione:

- 1) *Soil Survey Staff, United States Department of Agriculture;*
- 2) *Canada Soil Survey Committee;*
- 3) *International Soil Science Society;*
- 4) *American Society for Testing & Materials.*

Una valutazione globale della tessitura, basata sulle più varie combinazioni tra sabbia, limo e argilla, avviene tramite i cosiddetti triangoli delle tessiture di cui i più utilizzati sono quelli proposti dall'*United States Department of Agriculture* e dalla *International Soil Science Society*. In termini analitici, per quanto riguarda lo scheletro (particelle con diametro >2mm), la distribuzione in classi di grandezza avviene per setacciatura a secco del campione tramite vagli a luci diverse, mentre la suddivisione in sabbia, limo e argilla (particelle con diametro <2mm), si basa sulla sedimentazione con il metodo della pipetta o con il metodo densimetrico o dell'idrometro. Questi ultimi due metodi si basano sulla legge di Stokes, che stabilisce una relazione tra la velocità di caduta in acqua e il diametro delle particelle supposte sferiche isodiametriche.

$$v = \frac{2R^2 (d_e - d_i) g}{9\eta}$$

dove:

- $v$  = velocità di sedimentazione;
- $R$  = raggio delle particelle disperse;
- $d_e$  = densità della fase esterna;
- $d_i$  = densità della fase interna;
- $g$  = accelerazione di gravità;
- $\eta$  = viscosità della fase continua.

## FASE SPERIMENTALE

### Area di studio

I campioni analizzati provengono da tredici stazioni localizzate sul Tevere e sui suoi affluenti, Aniene, Farfa e Treja (Figura 1). Le sigle, le località, il bacino di appartenenza e la posizione geografica sono riportati in Tabella 3.

Le acque del Tevere, lungo i suoi 405 km di lunghezza, sono ampiamente sfruttate a scopo irriguo, idroelettrico, industriale e idropotabile. Tali utilizzi si sono sempre più intensificati nel corso dei decenni fino a raggiungere livelli tali da rendere impossibili i naturali fenomeni di autodepurazione e l'instaurarsi di equilibri biologici tra le varie componenti biotiche (Mancini *et al.*, 2001).

Il territorio compreso tra le stazioni di Mezzocammino e Magliana (A, B), localizzate rispettivamente a monte e a valle del complesso di depurazione di Roma sud, mantiene ancora un carattere agricolo sebbene con scarsi insediamenti antropici; la stazione successiva (D), posta subito a valle della diga di Castel Giubileo, sebbene inserita in un'area relativamente più urbanizzata, conserva ancora una certa naturalità lungo la fascia perfluviale. La stazione di Passo Corese (E), situata in un'area ad attività agricola estensiva, subisce l'impatto secondario da parte di una piccola industria per la lavorazione della ghiaia.

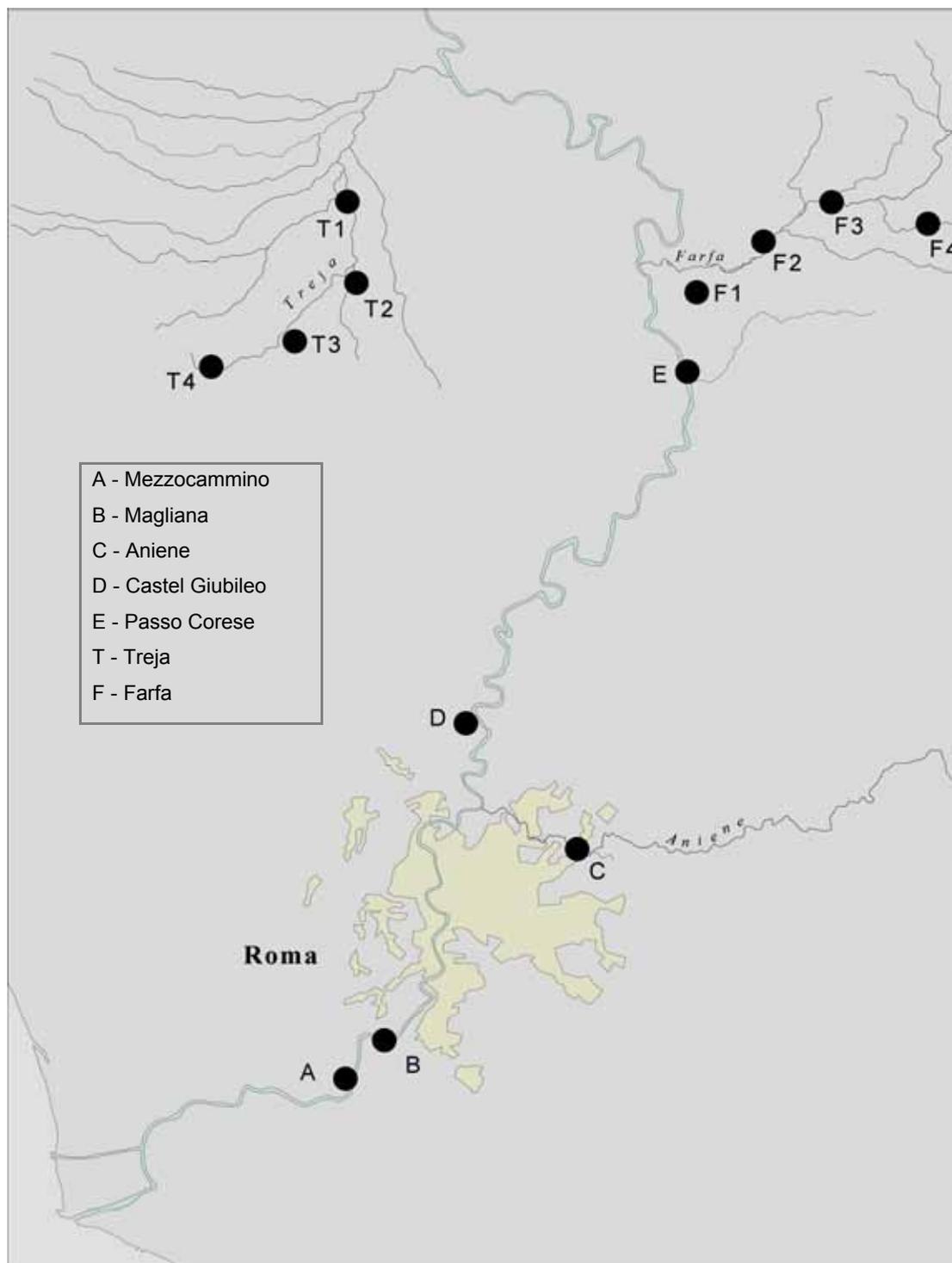
Lungo l'asta del fiume Aniene è stata selezionata una stazione (C) localizzata nella città di Roma (zona Ponte Mammolo). Lungo il suo corso il fiume è soggetto ad una forte pressione antropica dovuta principalmente alla estesa urbanizzazione e ai numerosi insediamenti industriali, particolarmente concentrati lungo il suo corso inferiore.

Le stazioni di campionamento individuate lungo il torrente Treja (T1-T4) sono comprese tra i territori di Monte Gelato, all'interno della riserva naturale omonima, e di Civita Castellana. Lungo il suo tratto superiore il fiume risente dell'impatto inquinante da reflui urbani e industriali derivati soprattutto da impianti per la lavorazione di ceramiche.

Il fiume Farfa subisce una forte alterazione sia sotto il profilo morfologico sia idrologico in quanto deviato, mediante una traversa, in un canale artificiale che convoglia le acque verso una centrale idroelettrica e quindi nel Tevere. Lungo il fiume sono state scelte quattro stazioni di campionamento (F1-F4).

**Tabella 3. Elenco delle località di prelievo lungo l'asta fluviale del Tevere**

Riferimento	Località	Corpo idrico	Latitudine	Longitudine
A	Mezzocammino	Tevere	41°48'44"N	12°25'11"E
B	Magliana	Tevere	41°49'41"N	12°25'16"E
C	Aniene	Aniene	41°55'36"N	12°34'09"E
D	Castel Giubileo	Tevere	41°59'22"N	12°30'57"E
E	Passo Corese	Tevere	42°09'02"N	12°38'27"E
F1	Farfa 1	Farfa	42°13'98"N	12°48'36"E
F2	Farfa 2	Farfa	42°13'09"N	12°46'06"E
F3	Farfa 3	Farfa	42°14'07"N	12°42'05"E
F4	Farfa 4	Farfa	42°12'09"N	12°41'27"E
T1	Treja 1	Treja	42°11'04"N	12°22'77"E
T2	Treja 2	Treja	42°12'51"N	12°24'91"E
T3	Treja 3	Treja	42°16'77"N	12°25'21"E
T4	Treja 4	Treja	42°18'09"N	12°26'68"E



**Figura 1. Localizzazione geografica delle stazioni di campionamento lungo il bacino inferiore del fiume Tevere**

## Campionamento

I campioni dei sedimenti vengono di norma prelevati utilizzando strumenti idonei quali benne o carotatori a seconda della tipologia dei substrati. In questo studio è stata utilizzata una benna Van Veen collegata ad un verricello. La benna preleva una porzione superficiale del sedimento arrecando un disturbo comparabile in funzione del volume dello strumento e delle caratteristiche granulometriche del campione. Con questo tipo di campionamento del sedimento, non è possibile apprezzare variazioni verticali delle caratteristiche fisiche del materiale recuperato né di campionare porzioni a livelli profondi. Tale strumento consente, tuttavia, di apprezzare la granulometria ossia lo scheletro e la composizione fine del sedimento. Di conseguenza tale metodo è molto efficace per le finalità del nostro studio, poiché la ricerca dei microrganismi è rivolta proprio alla porzione fine e recente costituita da limo, argilla e sabbia.

I campioni, vengono quindi omogeneizzati con una spatola sterile e trasferiti in tubi Falcon da 50 mL, etichettate e mantenuti a +4 °C fino al momento dell'analisi che andrebbe eseguita entro 24 h dal campionamento (Nonnis, 2001); analisi comparative su campioni di 24 ore e di 8 giorni non hanno tuttavia evidenziato differenze apprezzabili nei risultati.

I campioni di acqua destinati ad analisi fisico-chimiche sono stati prelevati manualmente in superficie e aliquotati in bottiglie in vetro da 1 L mentre quelli destinati alle analisi microbiologiche venivano aliquotate in tre tubi falcon sterili da 50 mL e conservati a +4 °C fino al momento dell'analisi.

## Analisi del peso secco

La prima procedura che si effettua sul campione di sedimento è l'analisi analitica del contenuto d'acqua; in tal modo si riesce a calcolare la porzione reale di sedimento nella quale sono contenuti i batteri. Il procedimento per tale analisi consiste nel pesare 5 g di sedimento (peso umido) su carta stagnola, ogni campione è seccato in stufa a 40 °C per 12 ore. Al termine di questo periodo il campione viene fatto raffreddare in un cristallizzatore contenente gel di silice sotto vuoto e messo nuovamente in stufa per 8 ore; dopo il raffreddamento. Tali procedure vengono ripetute fin quando il peso del campione non rimane stabile. Nel corso di questa ricerca sono state effettuate mediamente tre pesate per ottenere un valore stabile (peso secco). La percentuale d'acqua contenuta nel sedimento si ricava dal rapporto fra il peso umido e quello secco, moltiplicato per 100.

## Analisi granulometriche

Esistono diversi tipi di classificazione delle frazioni granulometriche, presentano diverse classi. L'analisi della distribuzione dimensionale delle particelle di sedimento è stata effettuata secondo le procedure standard (Genevini *et al.*, 1994). Il metodo delle pipette rappresenta un'analisi semplice, rapida largamente utilizzata, poiché fornisce risultati sufficientemente precisi, per effettuare l'analisi meccanica del sedimento fine; esso si basa sulla differenza nella velocità di sedimentazione di particelle di diverse dimensioni (Indorante *et al.*, 1990; Moshrefi, 1993).

In un cilindro graduato è trasferita una parte del campione, portando a volume con acqua distillata e si mescolano le due frazioni. Tempi di caduta e profondità raggiunta dalle particelle sono determinati applicando la legge di Stokes, secondo la quale ogni frazione sedimenta ad una

velocità di caduta direttamente proporzionale al raggio della particella. Una volta omogeneizzato il campione, si preleva mediante una pipetta un'aliquota nota di soluzione corrispondente al tempo ( $t_0$ ), dell'inizio della sedimentazione e un'altezza nota. Tale volume prelevato, si porta a secco e si pesa il residuo. Questa prima frazione, corrisponde ad argilla perché limo e sabbia hanno una velocità di caduta maggiore. Si ripete lo stesso procedimento per le altre due frazioni (limo e sabbia). Per determinare le quantità totali delle tre diverse frazioni si faranno gli opportuni calcoli riferiti al volume totale preso in considerazione. Tale analisi meccanica consente di eseguire in un giorno anche molti campioni in serie.

Le percentuali delle tre componenti ottenute con il metodo sopra indicato sono utilizzate per caratterizzare il sedimento usando il diagramma di Shepard (1954). Trattasi di un esempio di diagramma ternario ossia un dispositivo per graficare un sistema a tre componenti la cui somma è pari al 100%. Le componenti sono le percentuali di sabbia, limo e argilla che formano il campione. Ogni campione è plottato all'interno o lungo gli assi del diagramma, in funzione della specifica composizione granulometrica. Un campione che consiste esclusivamente di un'unica componente, ad esempio 100% sabbia, prende lo stesso nome dell'apice.

La classificazione dei campioni di sedimento, divide un diagramma ternario in dieci classi. Ogni classe è rappresentativa della variabilità delle tre percentuali di componenti limo, argilla e sabbia. Una volta determinate le percentuali sabbia, limo e argilla presenti si procede all'analisi microbiologica.

## Analisi microbiologiche della acque e dei sedimenti

Le analisi microbiologiche sono state eseguite su campioni di acqua e di sedimento al fine di confrontare le unità formanti colonie del *Clostridium* sui sedimenti con quelle di *E. coli* sulle acque.

*E. coli* è stato isolato con metodiche standard di microbiologia classica (Greenberg, 1998).

Le prove colturali, per il conteggio diretto dei clostridi solfito riduttori si basano sulla tecnica di semina per inclusione che consente di calcolare la concentrazione di spore dei microrganismi anaerobi presenti in un peso noto di campione. La metodica di isolamento prevede i seguenti punti: 5 grammi di sedimento sono stati trasferiti in una beuta precedentemente sterilizzata in autoclave a 121 °C per 15 minuti; venivano quindi preparate tre aliquote aggiungendo un diluente composto da acqua fisiologica tamponata sterile ( $K_2HPO_4$  3g/L,  $KH_2PO_4$  1g/L, NaCl 8,5 g/L; pH 7,2±0,2) +0,1% Tween 80, in misura pari a 45 mL. Successivamente i campioni sono stati sottoposti ad omogeneizzazione meccanica su piastra magnetica per 30 minuti. Seguiva un trattamento termico a 80-85 °C per 10 minuti al fine di inattivare tutte le forme vegetative e favorire la sporulazione; si procede effettuando uno shock termico ponendo i campioni sotto acqua corrente, prima di sottoporli all'analisi.

A questo punto il campione era costituito da due fasi (solida-liquida); la fase liquida è ciò che si analizza perché è qui che troviamo le spore in sospensione. Si opera in condizioni di sterilità (Cappa a flusso laminare, Biohazard AURA B3) sia per evitare eventuale contaminazione ma anche per lavorare in condizioni di sicurezza poiché tali microrganismi appartengono ad una classe di rischio 2 come citato nell'elenco degli agenti biologici classificati nell'allegato XI della Legge 626 (Italia, 1994).

Si prepara d'ogni campione una diluizione  $10^{-1}$  mettendo 4,5 mL d'acqua fisiologica tamponata sterile 0,1% Tween 80, in contenitori sterili (Falcon da 10 mL) più 0,5 mL di campione. Contemporaneamente si prepara il terreno selettivo SPS (*Sulphite Polymixium Sulphadiazine Agar*, OXOID lotto 0E2303 scad. 5/03), seguendo le istruzioni della ditta produttrice e lo si mantiene allo stato liquido a 45-50 °C in bagnomaria.

Ogni campione, quindi ognuna delle tre separate repliche, viene seminato in doppio, tal quale e  $10^{-1}$ . A questo punto, si procede alla semina per inclusione in piastre Petri (Falcon sterili 6 mL) aggiungendo all'inoculo 8 mL di terreno selettivo liquido SPS, evitando la formazione di bolle. Ogni piastra preparata è ulteriormente agitata per consentire una migliore distribuzione del campione nel terreno di crescita, si lascia solidificare il terreno e si procede all'incubazione.

L'incubazione avviene in anaerobiosi, ponendo le piastre in apposita giara (OXOID) in cui è stato posto un generatore di  $CO_2$  (busta Anaerogen, OXOID lotto 2D02-25-14 scad. 2003/12).

Le giare vengono messe ad incubare in una stufa termostata (Intercontinental) a  $36 \pm 1$  °C per 24 h. Questa temperatura, selezionata dopo diverse prove, si è dimostrata essere quella per la crescita dei clostridi.

Dopo il periodo di incubazione, si effettua la conta diretta delle colonie caratterizzata da una colorazione nera-nerastra, di dimensioni 3-5 mm di diametro. Le colonie crescono immerse nello spessore di agar e la caratteristica colorazione è dovuta alla riduzione del solfito in solfuro, tipica di tali microrganismi.

Le colonie sono isolate e trasferite, mediante anse sterili (Sterile Hard 1UL, Copan Innovation), su terreno TSA (Tryprone Soya Agar, OXOID lotto 107 scad. 11/03) e incubate come sopra, ricreando le condizioni anaerobiosi (giara+busta). Una colonia ben isolata su piastra di TSA, viene trasferita in soluzione fisiologica sterile. Tale sospensione batterica viene utilizzata per il test di identificazione biochimica.

Per il test di identificazione molecolare, dalla stessa piastra di TSA, si preleva un'altra colonia ben isolata e la si sospende in brodo TSB (Tryptone Soya Broth, OXOID Lotto B60373 scad. 10/03) preparato secondo le istruzioni della ditta produttrice e distribuito in condizioni sterili in provette da 2mL (Corning, 430659).

La brodocoltura è posta ad incubare in giara, a  $36 \pm 1$  °C per 24h in condizioni di anaerobiosi.

L'identificazione dei ceppi è effettuata con le due tecniche descritte successivamente e quindi accertati come microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* sono conservati in microbank (Pro-Lab Diagnostic) congelati alla temperatura di -20 °C.

Di ogni campione è effettuato il controllo di qualità positivo e negativo:

– *controllo positivo:*

in una beuta sterile si pesano 5 g di sedimento da analizzare sterilizzato a 121 °C per 15 minuti in autoclave. Si aggiungono 45 mL di diluente, acqua fisiologica sterile tamponata +0,1% Tween 80 e si effettua un'infezione sperimentale aggiungendo il ceppo di riferimento ATCC 12918 di *C. perfringens*. A questo punto si procede alla semina per inclusione nel terreno selettivo SPS, incubazione in anaerobiosi secondo il protocollo sopra indicato. Dopo l'incubazione si osserva la crescita delle colonie con la caratteristica colorazione nera prova certa di microrganismi appartenenti al genere *Clostridium*;

– *controllo negativo:*

si sterilizzano in una beuta 5 g di sedimento e si procede come sopra, diluizione, semina e incubazione in anaerobiosi saltando, chiaramente, il passaggio dell'infezione sperimentale. A questo punto se si è proceduto in modo corretto non si avrà alcuna crescita microbica dopo incubazione.

## Analisi biochimiche

La ricerca biochimica per l'identificazione a livello di specie dei microrganismi isolati appartenenti al genere *Clostridium*, si esegue mediante utilizzo di kit miniaturizzati disponibili

in commercio. La galleria API 20A (BioMerieux) è costituita da 20 microprovette contenenti substrati disidratati. Queste vengono inoculate con la sospensione batterica, preparata prelevando le colonie con un tampone sterile e inoculata in una fiala Medium (fornita insieme al kit) fino ad ottenere un'opacità superiore od uguale a quella del punto 3 dell'indice di McFarland, in tal modo i substrati sono ricostituiti. L'utilizzo delle gallerie dipende dal metodo scelto per creare l'anaerobiosi. Per quanto riguarda questo lavoro, il metodo scelto è quello descritto in seguito. Si prepara la vaschetta di incubazione distribuendo 5mL di acqua distillata sul fondo, si estrae una galleria API 20 A dalla confezione e si sistema nella vaschetta di incubazione. Con una pipetta sterile si inoculano tutte le gallerie con la sospensione API 20 A Medium, precedentemente preparata, evitando la formazione di bolle. Sono riempite solo le provette per i test IND e ricoperte di paraffina mentre per i test GEL sono riempite sia provette sia cupole a formare un menisco. Si richiude la vaschetta d'incubazione e si mette in una scatola con un generatore di CO<sub>2</sub> e la scatola viene a sua volta chiusa in una busta di plastica e incubata per 24 ore a 36±1 °C.

Dopo l'incubazione si aggiungono i reattivi alle rispettive gallerie secondo lo schema riportato dalla ditta produttrice. D'ogni campione è registrata la risposta colorimetrica indicata con i simboli + e - e registrata su strisce cartacee.

La sequenza di simboli relativi a triplette di substrati corrisponde ad un valore numerico. Dalla conversione numerica dell'intera striscia si ricava una sequenza numerica di 8 cifre

Tale sequenza numerica, mediante utilizzo del programma API Lab Plus consente di risalire al nome della specie. Nel nostro studio, si è giunti raramente all'identificazione a livello di specie, i dati ottenuti con tali analisi ci hanno condotto nella maggior parte dei casi all'identificazione di genere.

La prova della catalasi permette di differenziare i batteri anaerobi (catalasi-negativi, genere *Clostridium*) da quelli aerobi (catalasi-positivi come il genere *Bacillus*). Questo test si esegue aggiungendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in una delle gallerie del test API 20 A il cui substrato è uno zucchero. L'assenza della formazione di bolle è indice di catalasi negativa. I batteri aerobi sono catalasi positivi, in quanto utilizzano tale enzima per degradare l'acqua ossigenata che si forma in seguito alla reazione tra l'ossigeno prodotto con il ciclo di Krebs e l'acqua intracellulare. Tale molecola risultando molto tossica per la cellula, si ha la necessità di liberarsene rapidamente e la catalasi è appunto l'enzima deputato a tale degradazione. Nei batteri anaerobi tale enzima non è necessario poiché metabolizzano gli zuccheri in condizioni diverse.

Dall'analisi biochimica si ricavano anche ulteriori informazioni quali prove sulla mobilità, idrolisi della gelatina e della fermentazione del glucosio e del lattosio.

## Analisi genetiche

Il DNA genomico è stato estratto da campioni, precedentemente isolati da colture ripassate in TSB (Tryptone Soya Broth), secondo le metodiche descritte nei Current Protocols (Ausubel *et al.*, 1987) e quindi conservate a -20 °C.

L'estrazione è eseguita a partire da un volume di 1,5 mL di sospensione batterica successivamente centrifugata per 5' a 3000 rpm (*round per minute*).

Il pellet recuperato è risospeso in un volume di 567 µL di tampone TE (Tris 0,01M, pH 8; EDTA 0,001M, pH 8). Si aggiungono 30 µL di una soluzione di SDS (sodiododecilsolfato) al 10% e 3 µL di proteinasi K (20mg/mL) per una concentrazione finale di 100 µg/mL di enzima in 0,5% di SDS. Segue una fase di incubazione a 36±1 °C per un'ora.

Si aggiungono 100  $\mu\text{L}$  di una soluzione di NaCl 5M e 80  $\mu\text{L}$  di una soluzione CTAB (Tris HCl 0,1 M, pH 8; NaCl 1,4 M; EDTA 0,02 M; CTAB 2%; 2-mercaptoetanolo 0,1%); i campioni sono agitati manualmente e incubati per 10' a  $64\pm 1$  °C.

Al termine della fase di incubazione viene aggiunto un volume equivalente di cloroformio:alcol isoamilico (24:1) e agitati manualmente seguito da una centrifugazione a 13000 rpm per 5'. Il supernatante è trasferito in nuove microprovette e aggiunto 1 volume equivalente di fenolo: cloroformio:alcol isoamilico (25:24:1); dopo leggera agitazione manuale i campioni vengono centrifugati per (15' a 13000 rpm); un ulteriore passaggio in etanolo al 70% permetteva di allontanare i sali residui.

Gli acidi nucleici contenuti nella fase acquosa sono poi trasferiti in nuove microprovette e fatti precipitare a -20 °C con due volumi equivalenti di etanolo assoluto freddo e centrifugati (15' a 13000 rpm); un ulteriore passaggio in etanolo al 70% permetteva di allontanare i sali residui. Il pellet così ottenuto è fatto asciugare e risospeso in 100  $\mu\text{L}$  di TE (Tris 10 mM e EDTA 1 mM, pH 8).

Il DNA gnomico estratto dai batteri viene amplificato e quindi sequenziato eseguendo la serie di procedure elencate di seguito. Il DNA estratto è stato sottoposto ad una reazione a catena della DNA polimerasi (Saiki *et al.*, 1988). Tale reazione permette di ottenere, a partire da una soluzione molto eterogenea di acidi nucleici, un elevato numero di copie di una specifica porzione di DNA. In questo studio è stata amplificata una regione codificante per un frammento di 706bp per l'rRNA ribosomale 16S individuato dai primers specifici 728 (5'- GGG GAA TAT TGC ACA ATG G-3') e 729 (5'-GGG ACT TAA CCC AAC ATC TCA-3') disegnati con l'ausilio del *software* Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000), a partire dalla comparazione di sequenze omologhe di specie differenti di Clostridi pubblicate nella banca dati dell'NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

Per ogni campione da amplificare è stata fatta una miscela di reazione di 47  $\mu\text{L}$  totali contenente i quantitativi di reagenti (Tabella 4).

**Tabella 4. Preparazione dei campioni per la PCR (*Polymerase Chain Reaction*)**

	Vol ( $\mu\text{L}$ )	Concentrazione iniziale	Concentrazione finale
H <sub>2</sub> O	33,5		
Buffer	5	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	5	25 mM	2 $\mu\text{M}$
Primers	1+1	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$
dNTP mix	1	10 $\mu\text{M}$	0,2 $\mu\text{M}$
Taq	0,5	5 U/ $\mu\text{L}$	1 U/ $\mu\text{L}$

La reazione della PCR è avvenuta utilizzando i *thermal cyclers* GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer) e T4 (Biometra) secondo i parametri riportati in Tabella 5.

**Tabella 5. Parametri per la reazione di PCR**

Pre PCR	35 CICLI			Estensione finale
	Denaturazione	Annealing	Estensione	
94 °C 2 min	94 °C 30 sec	57 °C 45 sec	72 °C 1 min	72 °C 10 min

Dopo ogni reazione di PCR, il prodotto di reazione è stato controllato sottoponendone 5  $\mu$ L a migrazione elettroforetica su gel d'agarosio al 1% in TBE (0,045 M Tris-Borato; 0,001 M EDTA, pH 8) contenente 0,01% di bromuro di etidio.

Nei pozzetti del gel sono stati caricati 5  $\mu$ L di amplificato e 1  $\mu$ L di colorante (*loading buffer*), per risalire alla grandezza della banda ottenuta nel primo pozzetto del gel è stato caricato un *marker* molecolare (1K ladder). Il gel è stato fatto correre per circa 40 minuti a 90V e il risultato della corsa elettroforetica è visualizzato mediante transilluminatore UV.

I prodotti di PCR sono sottoposti a purificazione diretta mediante il kit di purificazione Wizard SW Gel and PCR Clean-up System (Promega) al fine di eliminare residui di peso inferiore; il purificato veniva quindi eluito in un volume finale di 35  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O. L'eliminazione dei residui e la quantificazione del purificato è verificati mediante una corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1% utilizzando 5  $\mu$ L di purificato.

Successivamente i campioni purificati sono sottoposti ad una reazione di PCR per la marcatura finalizzata all'aggiunta di una terminazione fluorescente ai frammenti destinati ad essere sequenziati.

Si preparavano due serie di provette (una per ciascun primer) e aggiunta una quantità variabile di DNA purificato, valutata secondo una verifica quantitativa spettrofotometrica; 4  $\mu$ L della miscela di reazione Big Dye versione 3.0 (*Applied Biosystems*) composta da Taq polimerasi, una miscela dei dNTP marcati con fluorocromi e un *buffer* specifico; a ciascuna serie si aggiunge 1  $\mu$ L di uno dei primers di PCR diluito alla concentrazione di 4,5  $\mu$ M; infine si addiziona H<sub>2</sub>O per raggiungere il volume finale di 20  $\mu$ L.

La reazione di marcatura veniva eseguita sui medesimi *thermal cyclers* utilizzando il programma di reazione in tabella (Tabella 6).

**Tabella 6. Parametri per la reazione di marcatura**

Pre PCR	30 CICLI			Estensione finale
	Denaturazione	Annealing	Estensione	
96 °C 2 min	96 °C 20 sec	50 °C 20 sec	60 °C 4 min	72 °C 10 min

I prodotti marcati sono trasferiti in nuovi tubi e precipitati aggiungendo 80  $\mu$ L di una soluzione di etanolo acetato di sodio:H<sub>2</sub>O secondo le indicazioni fornite dal protocollo Big Dye (*Applied Biosystems*). La miscela è stata brevemente agitata mediante vortex, lasciata a riposo a temperatura ambiente per 15' e infine centrifugata a 14000 rpm per 20'.

Dopo l'eliminazione della fase liquida, segue un passaggio di lavaggio in etanolo al 70% per eliminare i sali residui. Il pellet è fatto asciugare in termo-block a 40 °C e risospeso in 20  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O.

Il sequenziamento è stato effettuato mediante un sequenziatore automatico a singolo capillare Perkin Elmer, modello ABI Prism 310. Venivano trasferiti nei tubi di reazione 5  $\mu$ L di prodotto marcato, a cui erano stati precedentemente aggiunti 15  $\mu$ L di soluzione denaturante TSR (*Applied Biosystems*). Per ogni ceppo sono stati sequenziati entrambi i filamenti, in modo da effettuare un accurato controllo della lettura della sequenza mediante la procedura dell'allineamento e del controllo reciproco e al fine di ottenere un frame di lettura più completo.

Le sequenze sono state analizzate e corrette con il programma Chromas versione 2.23 (Technelysium Pty Ltd) e allineate con il programma ClustalX versione 1.81 (Thompson *et al.*, 1997; Jeanmougin *et al.*, 1998). Il numero di trasversioni e transizioni, il numero di siti polimorfici, la composizione nucleotidica e la costruzione dei dendrogrammi è stata eseguita

mediante l'utilizzo del *software* PAUP\* versione 4.0 (Swofford, 1999). I dendrogrammi sono stati elaborati con il metodo del *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) a partire da una matrice di distanze calcolata secondo il modello di Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa, *et al.*, 1985) corretto per la distribuzione gamma (HKY-G) che tiene conto delle differenze nel tasso di sostituzione nucleotidica assumendo che le frequenze dei quattro nucleotidi siano ineguali. La valutazione di 56 possibili modelli statistici evolutivi, è stata effettuata mediante il *software* MODELTEST 3.0 (Posada & Crandall, 1998) in combinazione con PAUP\* versione 4.0.

Prima di operare l'analisi filogenetica con il modello appena descritto, i dati delle sequenze sono stati trattati con la procedura del *bootstrap*. Tale metodo risponde all'esigenza di ridurre l'errore di campionamento presente nel data set di sequenze, in modo da svincolare il più possibile la stima dal caso particolare dei dati a disposizione.

Il metodo del *bootstrap* crea delle "pseudorepliche" del campione di sequenze iniziale, in modo da ottenere un set di dati multipli e quindi comparare le stime ottenute dai diversi campioni. Partendo da un data set multiplo, la procedura per l'analisi filogenetica ha dato come risultato una serie di alberi; attraverso il metodo del consenso è stato poi ottenuto un solo albero, in cui è stata riportata la frequenza di ogni nodo che fosse presente in almeno la metà degli alberi del *bootstrap*.

Le distanze genetiche sono state inoltre elaborate mediante il *software* di analisi statistica Systat 9.0 applicando il metodo *MultiDimensional Scaling ordination* (MDS), che fornisce un ordinamento non metrico di una matrice di similarità o di dissimilarità fra n oggetti o variabili mediante n punti in uno spazio a due o più (k) dimensioni. In questo studio è stato utilizzato il criterio di Kruskal (Kruskal, 1964 a,b) applicato a 3 dimensioni; le distanze tra gli n punti nello spazio multidimensionale corrispondono per un'alta percentuale alle distanze osservate nella matrice.

Molto frequentemente informazioni sulle relazioni genomiche e la determinazione della posizione filogenetica di un ceppo è spesso un metodo molto rapido per la determinazione delle proprietà fenotipiche. Tutto ciò risulta vantaggioso in quelle situazioni in cui l'assegnazione filogenetica di una specie ad un diverso genere non è immediatamente supportata dalla presenza di proprietà fenotipiche caratteristiche di quel genere.

Nel collocare una nuova specie non classificata, si devono investigare le proprietà fenotipiche, per supportare unicità di questo *taxon* e quelle genotipiche, quindi ci si deve avvalere di un approccio polifasico alla classificazione. Le proprietà fenotipiche di un isolato sono di solito determinate solo in comparazione con quelle di altri membri del genere al quale l'isolato si pensa più vicino. Negli ultimi venti anni, gli studiosi filogenetici di tassonomia stanno ancora dibattendo su controversie tassonomiche.

## RISULTATI DELLO STUDIO

### Matrice sedimento

I risultati ottenuti sono riassumibili nei seguenti punti:

#### 1) *Campionamento*

La modalità di campionamento dei sedimenti è di fondamentale importanza al fine di ridurre al minimo le alterazioni della struttura e delle caratteristiche chimico-fisiche del campione indotte dal processo di rimozione che può essere di per sé distruttivo (Burton, 1992).

Per la tipologia delle nostre stazioni, caratterizzate da sedimenti meno compatti o limosi, lo strumento più idoneo è risultato essere la benna Van Veen.

Questa esperienza può quindi essere estendibile per tutte quelle biotipologie simili riconducibili ai tratti potamali dei grandi fiumi mediterranei.

#### 2) *Conservazione*

Al fine di mantenere inalterate le proprietà del campione è importante che esso venga preservato a 4 °C (Burton *et al.*, 1987; Niederlehner *et al.*, 1990; Findlay, 1981; Reynoldson, 1987).

Infatti, da studi condotti sulla tossicità dei campioni di sedimento è emerso che la cattiva conservazione può alterare significativamente i risultati analitici sia a livello chimico (Wiederholn & Dave, 1989; Stemmer *et al.*, 1990) che biologico (Landrum, 1989).

Un ulteriore aspetto è quello microbiologico che richiederebbe un trattamento delle matrici entro le 24 ore.

I dati sperimentali hanno dimostrato che i campioni, conservati a 4 °C fino a due settimane sono ancora in grado di fornire risultati analitici significativi e comparabili con quelli analizzati entro le 24 ore.

E questo da un punto di vista applicativo semplifica le attività di ricerca nel momento in cui dovrebbero diventare estendibili nelle azioni di monitoraggio.

#### 3) *Analisi Granulometrica*

Questa metodica non ha evidenziato sostanziali differenze nella composizione della matrice nelle varie stazioni, dove le frazioni fini sono risultate essere dominanti sia pure in percentuale diversa.

Tali frazioni pur essendo più superficiali e quindi instabili sono ritenute più funzionali per la proprietà di trattenere gli inquinanti.

La significatività dei sedimenti fini superficiali nel tratto terminale di in un corso d'acqua come il Tevere è altissima poiché, essendo il regime fluviale regolato, non è soggetto a piene repentine e a conseguenti fenomeni di asportazione (Tabella 7).

**Tabella 7. Analisi granulometriche effettuate nelle cinque stazioni di campionamento lungo l'asta terminale del fiume Tevere**

Data prelievo e località	Granulometria	Note
febbraio 2002		
Passo Corese	sandy clay	25% sand; 75% clay
Castel Giubileo	sandy clay	25% sand; 75% clay
Aniene	silty clay	25% silt; 75% clay
Magliana	clay	100%
Mezzocammino	sandy clay	25% sand; clay
marzo 2002		
Passo Corese	silty clay	30% silty; 70% clay
Castel Giubileo	silty clay	30% silty; 70% clay
Aniene	clay	20% silt; 80% clay
Magliana	clay silt	50% silt; 50% clay
Mezzocammino	sand	100%
aprile 2002		
Passo Corese	clayey silt	30% clay; 70% silt
Castel Giubileo	clayey silt	30% clay; 70% silt
Aniene	silty clay	40% silt; 60% clay
Magliana	clayey silt	30% clay; 70% silt
Mezzocammino	non pervenuto	100%
maggio 2002		
Passo Corese	clay	10% silt; 90% clay
Castel Giubileo	clayey silt	40% clay; 60% silt
Aniene	silt	20% clay; 80% silt
Magliana	clayey silt	50% clay; 50% silt
Mezzocammino	silty sand	30% silt; 70% sand
ottobre 2002		
Castel Giubileo	sandy silt	30% sand; 70% silt
Aniene	clay	10% sand
Magliana	clay	100%
Mezzocammino	silty clay	30% silt; 70% clay
giugno 2003		
Passo Corese	clay	20% silt; 80% clay
Castel Giubileo	silty sand	50% silt; 50% sand
Aniene	silty clay	30% silt; 70% clay
Magliana	clay	100%

sand = sabbia, sandy = sabbioso, clay = argilla, clayey = argilloso, silt = limo, silty = limoso

## Microbiologia e biochimica

Nell'isolamento microbiologico di batteri anaerobi ci siamo trovati a dover risolvere diverse difficoltà al fine di ottenere la crescita ottimale delle colonie essenzialmente riconducibili a:

– *Aliquota da seminare*

Dopo la preparazione della sospensione del campione secondo quanto indicato nei protocolli, si è proceduto alla semina di diverse aliquote. Quella che ha dato risultati riproducibili è stata di 0,1 mL.

– *Tecnica di semina*

I pochi protocolli riportati in letteratura, per la ricerca di tali forme batteriche nel

comparto acqua e sedimenti, si riferiscono a metodiche come MPN (*Most Probable Number*) e MF (*Membrane Filtration*) in doppio strato, che si sono rivelate inefficaci nel nostro campo di applicazione. Nelle prove preliminari, applicando le metodiche di semina sopra citate, ci si trovava di fronte alla crescita di colonie atipiche che inibivano la crescita delle forme sporigene. Il metodo di semina attraverso il quale abbiamo ottenuto delle colture batteriche con crescita ottimale e prive di forme contaminanti è quello della semina per inclusione. Tale metodo consente, mediante la conta diretta, di calcolare la concentrazione delle spore dei microrganismi anaerobi presenti in una massa nota di campione.

– *Condizioni di anaerobiosi*

La non corretta riproducibilità delle condizioni di anaerobiosi può compromettere l'esito dell'intero procedimento. Per i nostri campioni le condizioni di anaerobiosi sono state ricreate introducendo nella giara un generatore di CO<sub>2</sub>.

– *Isolamento delle colonie*

Con la semina per inclusione le colonie crescono immerse nello spessore di agar. L'isolamento richiede una certa abilità dell'operatore poiché bisogna rompere lo strato di agar che circonda la colonia evitando fenomeni di contaminazione o rottura della medesima. Altre difficoltà possono insorgere nell'isolamento di colonie di piccole dimensioni poiché il recupero di una piccolissima frazione non necessariamente può essere sufficiente per il ripasso sul terreno nutritivo TSA (*Tryptone Soya Agar*), necessario per ottenere ceppi puri per la caratterizzazione biochimica e molecolare. Anche la consistenza delle colonie può indurre dei problemi per il ripasso su terreno nutritivo. Alcune volte le colonie sono risultate molto compatte, quasi cristallizzate e nel momento in cui venivano spatolate potevano provocare la rottura del terreno.

Durante la fase di lavorazione dei ceppi si deve operare in condizioni di sterilità sotto cappa a flusso laminare con mascherina e guanti monouso, in quanto molti ceppi di clostridi solfito-riduttori, quale ad esempio *C. perfringens*, sono patogeni (classe di rischio 2, secondo la Legge 626) anche perché da campioni ambientali non si ha mai la certezza delle specie batteriche che si stanno isolando.

I dati microbiologici, espressi in UFC/g<sub>ss</sub> (UFC per grammo di sostanza secca) sono riportati in Tabella 8 mentre in Tabella 9 sono riportati i valori medi della sostanza secca.

Tutti i nodi della sperimentazione sono stati da noi superati con la messa a punto di un protocollo operativo, descritto secondo le norme UNI-ISO 7667.

Il confronto tra le concentrazioni di *E. coli* nell'acqua e dei clostridi solfito-riduttori nei sedimenti è indicato nella Tabella 10 e illustrato in Figura 2.

Per quanto riguarda *E. coli*, i valori più elevati di concentrazione si osservano generalmente in corrispondenza della stagione calda per tutte le stazioni studiate con valori massimi compresi tra  $12,5 \times 10^3$  e  $>30 \times 10^3$  UFC/mL. Una maggiore omogeneità è stata peraltro osservata per le stazioni D ed E dove i livelli di concentrazione di *E. coli* si mantengono sempre inferiori a  $5 \times 10^3$  UFC/mL. La valutazione dei microrganismi solfito-riduttori ha espresso valori disomogenei esclusivamente per le stazioni B e C; B mostrava un picco ( $48 \times 10^3$  UFC/g<sub>ss</sub>) solo in corrispondenza del periodo autunnale, mentre l'andamento della concentrazione della comunità degli anaerobi solfito-riduttori subiva sensibili fluttuazioni stagionali in C, oscillando tra  $1,9 \times 10^3$  UFC/g<sub>ss</sub> e  $4,9 \times 10^3$  UFC/g<sub>ss</sub>. I valori registrati per le rimanenti stazioni (D, E) non subivano oscillazioni stagionali di rilievo e i valori ottenuti risultano avere lo stesso andamento e lo stesso ordine di grandezza, mentre in altre, quelle considerate maggiormente soggette a pressione antropica, i valori dei clostridi risultano essere quantitativamente molto più elevati rispetto ai valori di *E. coli* delle acque.

**Tabella 8. Risultati microbiologici ottenuti nell'analisi dei campioni di sedimenti del bacino inferiore del fiume Tevere**

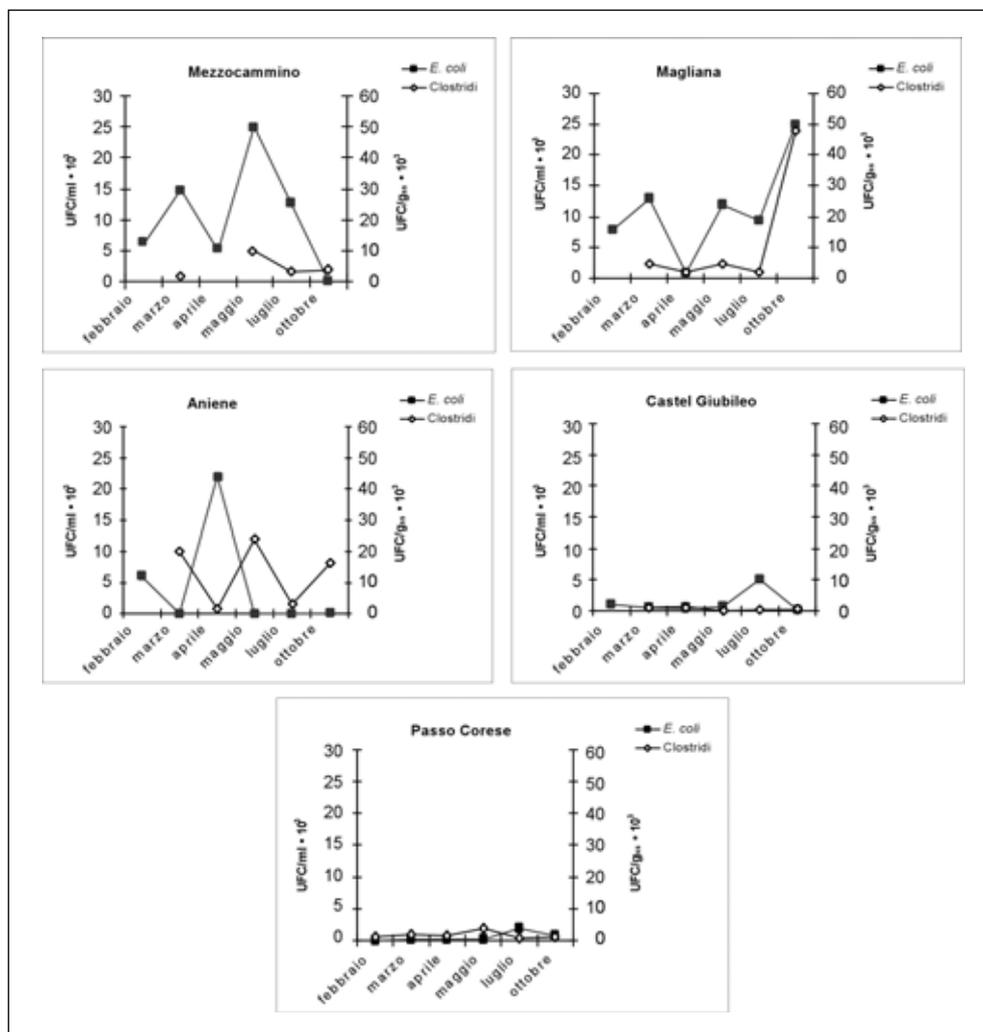
Data prelievo e località	UFC/g secco ( $10^3$ )		
	c1	c2	c3
febbraio 2002			
Passo Corese	3,0	1,0	2,0
Castel Giubileo	1,0	0,9	1,0
Aniene	28,0	21,0	18,0
Mezzocamino	2,0	1,0	1,8
Magliana	2,0	1,7	2,1
marzo 2002			
Passo Corese	1,0	1,0	2,5
Castel Giubileo	3,0	3,0	3,0
Aniene	25,0	23,0	12,0
Mezzocamino	2,8	2,0	5,7
Magliana	56,0	29,0	60,0
aprile 2002			
Passo Corese	4,8	4,0	4,5
Castel Giubileo	0,4	0,4	0,4
Aniene	0,1	0,1	0,1
Mezzocamino	2,3	2,0	2,5
Magliana	2,5	1,6	3,2
maggio 2002			
Passo Corese	3,0	4,6	4,6
Castel Giubileo	0,1	0,2	0,1
Aniene	24,0	21,0	2,6
Mezzocamino	10,0	10,0	8,6
Magliana	6,3	3,6	4,7
luglio 2002			
Passo Corese	1,4	0,5	0,7
Castel Giubileo	0,1	0,4	0,1
Aniene	2,1	2,1	4,2
Mezzocamino	3,2	1,1	4,0
Magliana	1,9	2,5	3,9
ottobre 2002			
Passo Corese	0,9	0,7	0,8
Castel Giubileo	0,8	1,5	0,5
Aniene	20,0	17,0	12,0
Mezzocamino	3,0	5,6	3,6
Magliana	6,6	3,5	3,0
giugno 2003			
Passo Corese	0,1	0,5	0,2
Castel Giubileo	0,3	0,5	0,2
Aniene	2,0	2,0	1,0
Mezzocamino	38,0	30,0	32,0
Magliana	5,6	3,7	3,0
luglio 2003			
Treja 1	2,0	0,5	2,0
Treja 2	0,9	0,5	0,41
Treja 3	0,7	0,3	0,5
Treja 4	1,6	0,9	1,5
Farfa 1	0,5	0,6	0,5
Farfa 2	1,3	0,6	0,6
Farfa 3	0,1	0,8	2,6
Farfa 4	0,9	0,1	0,1

Tabella 9. Peso secco misurato delle tre repliche per ogni campione

Data prelievo e località	Repliche		
	1	2	3
febbraio 2002			
Mezzocammino	5,6	4,4	4,4
Magliana	6,0	5,3	5,3
Aniene	5,9	4,5	4,5
Castel Giubileo	5,7	3,4	3,4
Passo Corese	5,7	3,4	3,4
marzo 2002			
Mezzocammino	5,5	4,2	4,2
Magliana	5,7	5,0	5,0
Aniene	5,9	4,5	4,5
Castel Giubileo	5,5	3,9	3,9
Passo Corese	5,9	2,9	2,9
aprile 2002			
Mezzocammino	5,4	3,4	3,4
Magliana	5,6	4,8	4,8
Aniene	5,8	4,6	4,6
Castel Giubileo	5,8	4,4	4,4
Passo Corese	5,8	3,6	3,6
maggio 2002			
Mezzocammino	5,7	3,4	3,4
Magliana	5,7	4,5	4,5
Aniene	5,6	3,6	3,6
Castel Giubileo	5,8	4,2	4,2
Passo Corese	5,9	3,3	3,3
luglio 2002			
Mezzocammino	5,7	3,9	3,9
Magliana	5,8	5,5	5,5
Aniene	5,8	4,3	4,3
Castel Giubileo	5,5	3,9	3,9
Passo Corese	5,9	3,3	3,3
ottobre 2002			
Mezzocammino	5,5	3,9	3,9
Magliana	5,7	3,9	3,9
Aniene	5,5	3,9	3,9
Castel Giubileo	5,7	4,5	4,5
Passo Corese	5,7	4,1	4,1
giugno 2003			
Mezzocammino	5,8	3,9	3,9
Magliana	5,7	3,3	3,3
Aniene	5,5	3,6	3,6
Castel Giubileo	5,6	4,0	4,0
Passo Corese	6,1	4,6	4,6
luglio 2003			
Treja 1	6,0	4,7	4,7
Treja 2	5,9	3,9	3,9
Treja 3	6,2	4,3	4,3
Treja 4	5,9	4,2	4,2
Farfa 1	6,0	4,7	4,7
Farfa 2	5,9	3,9	3,9
Farfa 3	6,2	4,3	4,3
Farfa 4	5,9	4,2	4,2

**Tabella 10. Valori di concentrazione di *E. coli* (UFC/mLx10<sup>3</sup>) e dei Clostridi (UFC/g<sub>ss</sub>x10<sup>3</sup>) registrati nei cinque stazioni di rilevamento del bacino del Tevere nel corso del periodo 2002-2003**

Data prelievo	Mezzocammino		Magliana		Aniene		Castel Giubileo		Passo Corese	
	<i>E. coli</i>	Clostridi	<i>E. coli</i>	Clostridi	<i>E. coli</i>	Clostridi	<i>E. coli</i>	Clostridi	<i>E. coli</i>	Clostridi
2002										
febbraio	6	-	8	-	6	-	1	-	0,0	1
marzo	15	2,1	13	4,8	>30	20	0,5	1	0,14	2
aprile	5	-	0,85	1,9	22	1,5	0,3	1,3	0,1	1,6
maggio	25	10	12	4,7	>30	24	0,7	0,14	0,2	4
luglio	12,5	3	9,5	2	>30	3	5	0,28	2	0,9
ottobre	>30	3,7	25	48	>30	16	0,2	0,5	0,8	0,97
2003										
giugno	3	0,14	9	0,27	1	15	1	28	0,15	4,8



**Figura 2. Rappresentazione grafica dell'andamento stagionale delle concentrazioni di *E. coli* nell'acqua e dei clostridi solfito-riduttori nei sedimenti per le cinque stazioni di campionamento del fiume Tevere**

## Analisi genetiche

Dal prodotto di PCR è stato sequenziato un frammento di 706 paia di basi codificante per l'rRNA 16S su un totale di 83 campioni ambientali di ceppi batterici sporigeni.

Sono stati osservati 38 aplotipi diversi, per un totale di 202 siti variabili di cui 180 filogeneticamente informativi e 22 presenti in un solo aplotipo.

Il frammento sequenziato presentava un rapporto medio tra nucleotidi pari a: 21,1% di T, il 21,6% di C, il 26,1% di A e il 31,2% di G, da cui si evince una netta preponderanza di G come generalmente osservato nel DNA genomico di batteri sporigeni (Rood *et al.*, 1997). Sono state osservate 26 transizioni e 23 transversioni e un rapporto R transizioni/transversioni pari ad 1,1. I dendrogrammi costruiti con il metodo *neighbor-joining* (Saitou & Nei, 1987) sulla base delle distanze genetiche di Hasegawa, Kishino e Yano (HKY) (Hasegawa *et al.*, 1985) e Massima Parsimonia (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) basati sulle medesime distanze, sono rispettivamente rappresentati nelle Figure 3 e 4. Le figure mostrano le affinità genetiche tra gli aplotipi osservati in ceppi batterici sporigeni isolati in sedimenti del bacino inferiore del fiume Tevere.

L'elaborazione di 56 possibili modelli statistici evolutivi eseguita con il *software* MODELTEST (Posada & Crandall, 1998) ha permesso di selezionare tale metodo come il più adatto al set di dati del presente studio.

L'analisi dei dati ottenuti ha portato alla identificazione di otto unità sistematiche di cui sette ascrivibili al genere *Clostridium* e una al genere *Bacillus*, formanti tre cluster principali significativamente omogenei.

Il cluster più differenziato è riferibile a *B. cereus*; i due ceppi ambientali identificati in questo studio (B1 e B2) presentano una omologia pari al 99% rispetto ai ceppi di riferimento più affini ottenuti dell'NCBI e sono caratterizzati dalla presenza di una inserzione di 26 bp a livello della posizione nucleotidica 77. L'appartenenza di *B. cereus* alla famiglia dei bacilli pseudocarbonchiosi ha inoltre imposto la diagnosi differenziale dei suddetti ceppi per *B. anthracis*, microrganismo appartenente ad una elevata classe di rischio.

È stato pertanto eseguito un test PCR con primers specifici per geni di virulenza situati nei plasmidi pX01 e pX02. Entrambi i plasmidi sono infatti essenziali per la virulenza di *B. anthracis* (Adone *et al.*, 2002).

Il test sui ceppi è risultato negativo mentre il DNA di controllo (un vaccino vivo attenuato pX01+/2+) esaminato parallelamente dava reazione positiva. I rapporti genetici tra i ceppi del presente studio e i ceppi depositati in banca dati sono riportati in Figura 5. La figura mostra le affinità genetiche tra aplotipi osservati in ceppi batterici sporigeni appartenenti al genere *Clostridium* isolati da campioni di sedimenti del bacino del Tevere. Ciascun cluster comprende almeno un ceppo di riferimento depositato nella banca dati NCBI.

Il secondo cluster ha mostrato una maggiore eterogeneità; sono stati infatti identificati al suo interno tre gruppi geneticamente piuttosto omogenei riferibili alle unità sistematiche *C. bifermentans*, *C. ghoni* e *C. glycolicum*, con livelli di omologia compresi tra il 99% e 98% rispetto a quanto pubblicato nella banca dati dell'NCBI.

La specie più frequente che caratterizza il terzo cluster è risultata essere *C. perfringens*; il cluster, più eterogeneo rispetto ai precedenti, comprende inoltre tre gruppi relativamente omogenei ascrivibili a *C. barati*, *C. butyricum* e *C. thiosulforeducens*.

Nessuna delle unità sistematiche identificate da questo studio mostrava completa omologia con i ceppi di riferimento della banca dati informatica; i valori di omologia con i ceppi più affini erano infatti compresi tra 0,95 e 0,99. Le relazioni di affinità genetica tra le unità sistematiche sono meglio evidenziate dalla rappresentazione in Figura 6, che mostra le coordinate a tre dimensioni di un'analisi MDS con il metodo Kruskal (1964 a,b), basato sulle distanze genetiche

di HKY-G. Il grafico identifica due gruppi omogenei riconducibili ai *taxa B. cereus*, *C. bifermentans*, e un terzo raggruppamento più eterogeneo riconducibile a *C. perfringens*.

Le frequenze relative delle specie osservate nei tredici punti di campionamento viene illustrata in Figura 7. I punti di campionamento situati lungo le aste fluviali del Treja (T1-T4) e del Farfa (F1-F4) presentano mediamente un numero inferiore di unità sistematiche.

*C. perfringens* è stato identificato in tutte le stazioni di campionamento come specie preponderante, con frequenze comprese tra 0,33 (stazione T1) e 1 (stazioni F3 e F4; stazioni T3 e T4).

Una presenza significativa di *C. bifermentans* è stata osservata lungo l'intera asta fluviale del Tevere e nei tratti inferiori dei suoi affluenti con frequenze comprese tra 0,1 (stazione D) e 0,5 (stazioni F1 e F2). Le restanti unità sistematiche presentavano distribuzioni più localizzate sebbene relativamente omogenee.

*C. barati* è stato identificato esclusivamente nelle stazioni E (Passo Corese, frequenza 0,13) e F2 (Farfa, frequenza 0,5).

*C. ghoni* è stato osservato nelle stazioni A (Mezzocammino) ed E (Passo Corese) con frequenze variabili tra 0,06 e 0,36 nel sito D (Castel Giubileo), mentre *C. glycolicum* è stato individuato esclusivamente nel sito C (frequenza 0,22). Analogamente *C. butyricum* è esclusivo del sito T1 (Treja) dove è presente con una frequenza pari a 0,33. *C. thiosulforeducens* presenta una distribuzione piuttosto disgiunta, essendo stato individuato nelle stazioni B (Magliana) e D con frequenze modeste e nella stazione T2 con frequenza pari a 0,33.

Le unità sistematiche riferibili a *B. cereus* sono state individuate esclusivamente nelle stazioni D ed E con frequenze rispettivamente di 0,1 e 0,07.

L'incidenza relativa delle specie osservate nel presente studio sembra variare con la stagionalità: le analisi effettuate su campioni prelevati nelle stagioni fredde (novembre-aprile) hanno evidenziato, nelle cinque stazioni (A-E) di cui sono stati ottenuti dati comparabili, una prevalenza sostanziale delle unità sistematiche *C. perfringens* e *C. bifermentans*, oltre ad una presenza significativa di *C. ghoni* unicamente nella stazione B (Figura 8).

Una maggiore biodiversità è stata invece osservata sui campioni raccolti durante i periodi caldi (maggio-ottobre) (Figura 9); nell'ambito del cluster 1 sono stati identificati, oltre a *C. perfringens*, ceppi riferibili alle unità sistematiche, *C. barati*, *C. butyricum* e *C. thiosulforeducens*; quest'ultimo è risultato essere l'unità più differenziata del cluster, con una distanza genetica media di HKY-G pari a 0,084.

Il raggruppamento riferibile a *C. glycolicum*, nettamente differenziato ( $D_m=0,038$ ), si aggiunge a *C. bifermentans* e *C. ghoni* all'interno del cluster 2 che mostra un valore di distanza genetica media di  $D_m=0,139$  rispetto al cluster 1. Il cluster 3, rappresentato esclusivamente dalle unità sistematiche riferibili a *B. cereus*, mostra valori di distanza media rispetto ai cluster 1 e 2 pari a  $D_m=0,185$  e  $D_m=0,173$  rispettivamente.

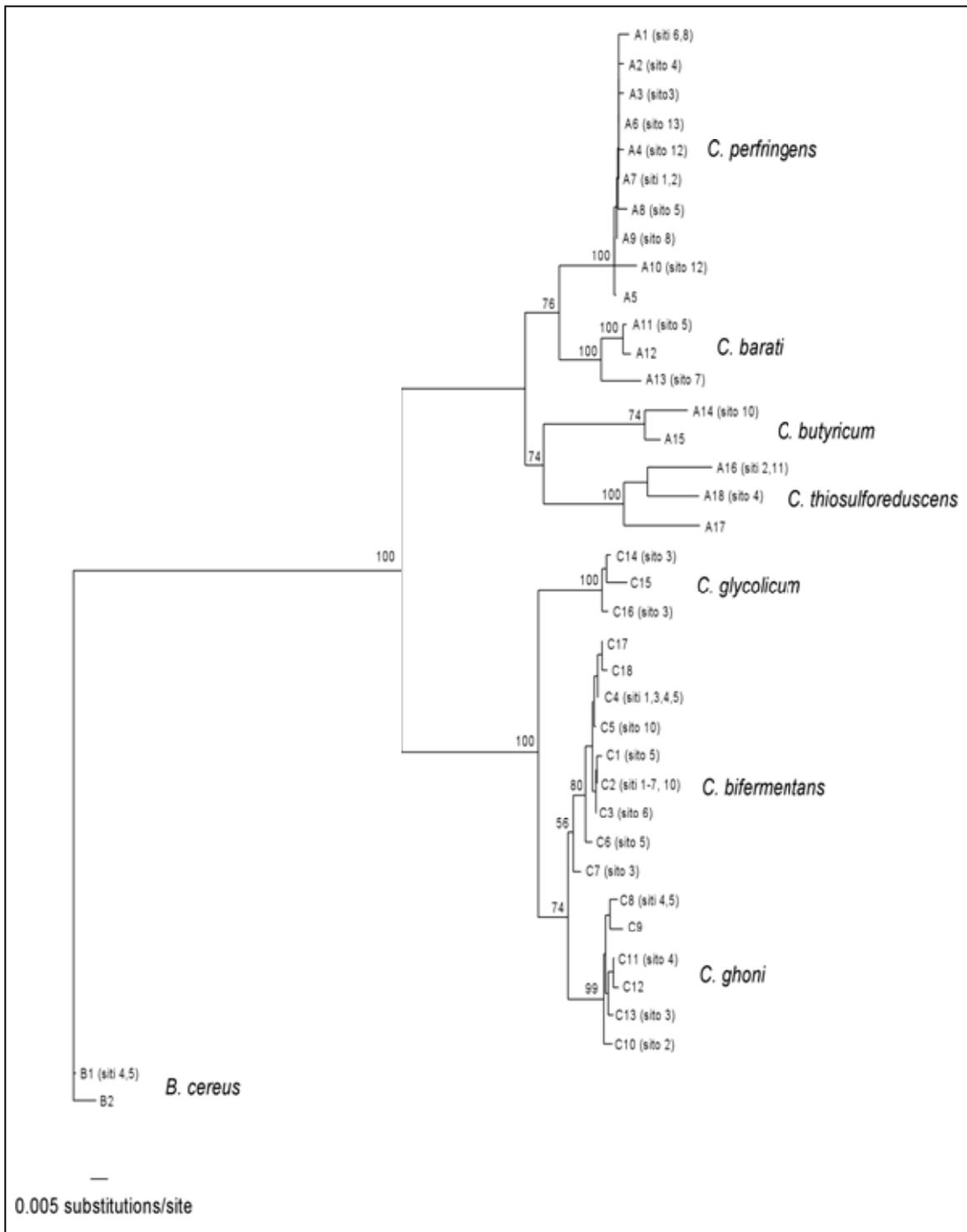


Figura 3. Dendrogramma costruito con il metodo HKY per una regione di 706 bp di DNA codificante per l'RNA 16S. Sopra i nodi sono indicati i valori di *bootstrap* superiori al 50%

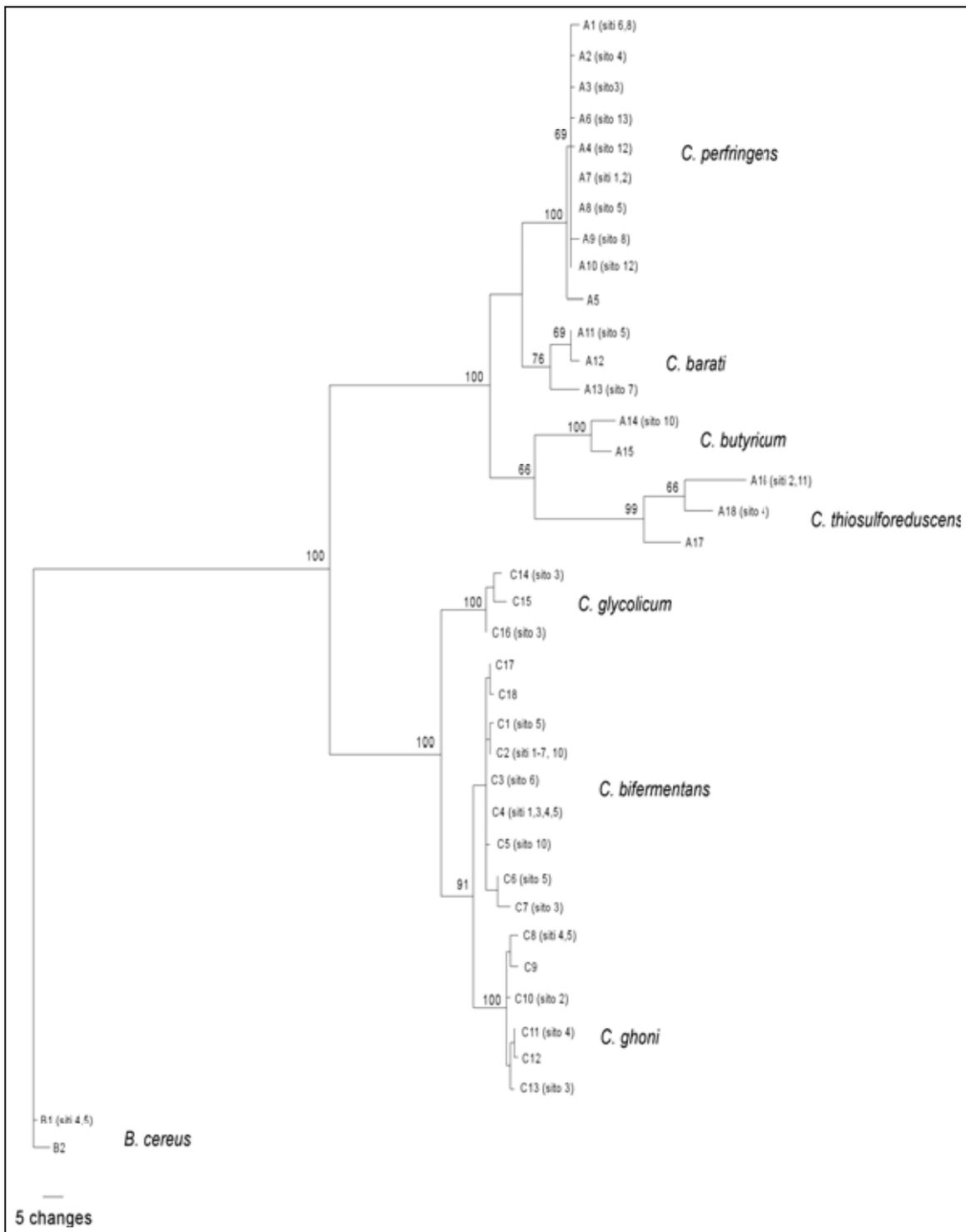


Figura 4. Dendrogramma costruito con il metodo della Massima Parsimonia per una regione di 706 bp di DNA codificante per l'RNA 16S. Sopra i nodi sono indicati i valori di *bootstrap* superiori al 50%.

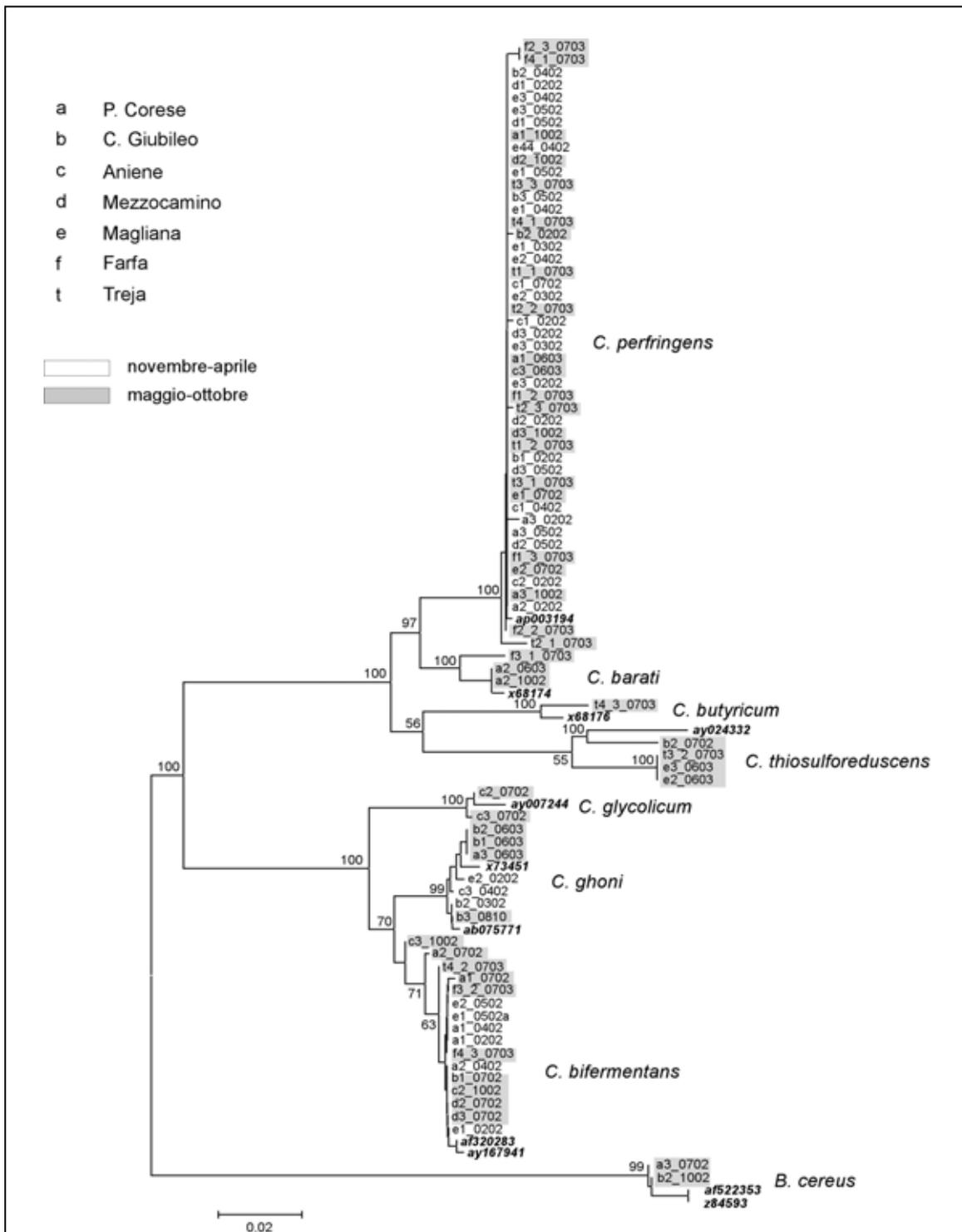


Figura 5. Dendrogramma costruito con il metodo *neighbor-joining* sulla base delle distanze genetiche di HKY corretto per il fattore gamma per una regione di 706bp di DNA codificante per l'RNA 16S. Sopra i nodi sono indicati i valori di *bootstrap* superiori al 50% dopo 100 repliche

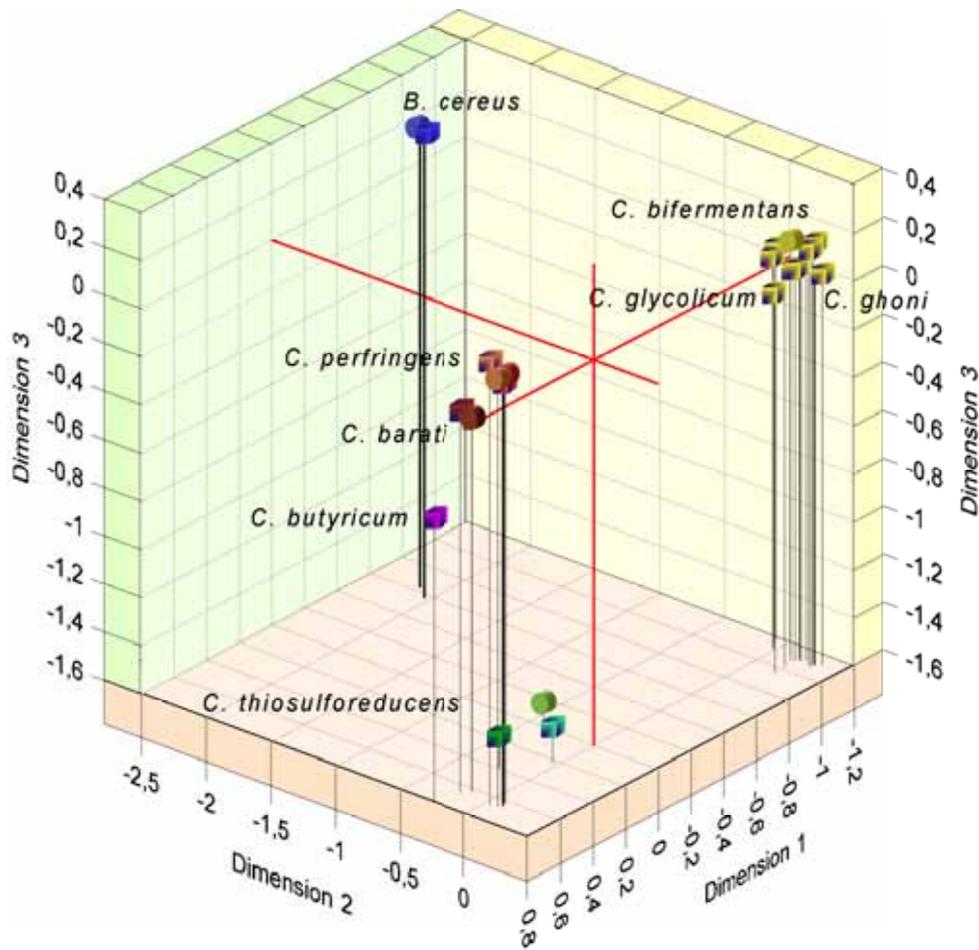


Figura 6. MDS a tre dimensioni costruito con il metodo Kruskal sulla base delle distanze genetiche di HKY osservate tra ceppi batterici sporigeni provenienti dal bacino inferiore del fiume Tevere. I cilindri rappresentano i ceppi di riferimento depositati nella banca dati dell'NCBI mentre i cubi si riferiscono ai campioni del presente studio

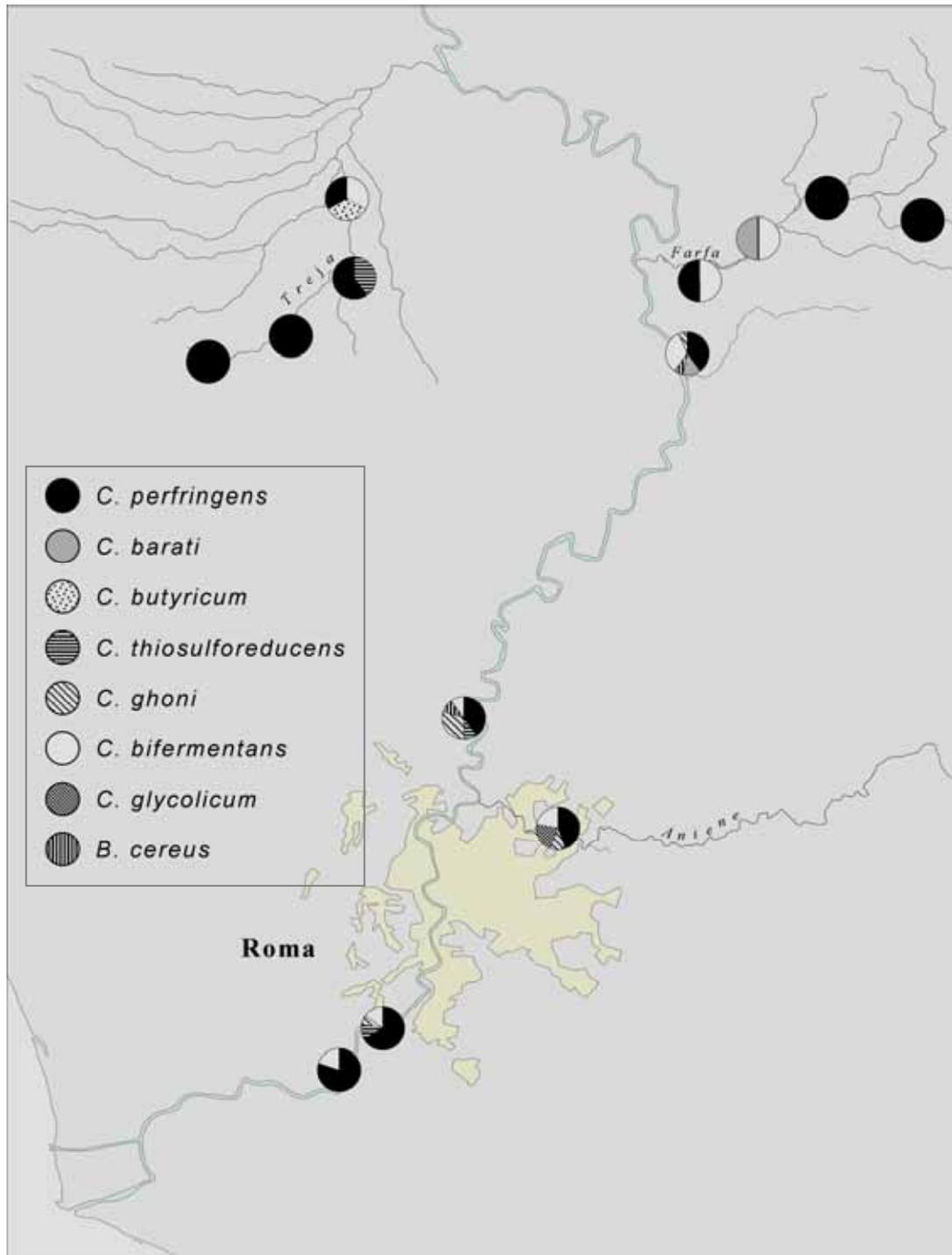


Figura 7. Frequenze relative delle otto unità sistematiche osservate nelle tredici stazioni di campionamento del bacino inferiore del fiume Tevere

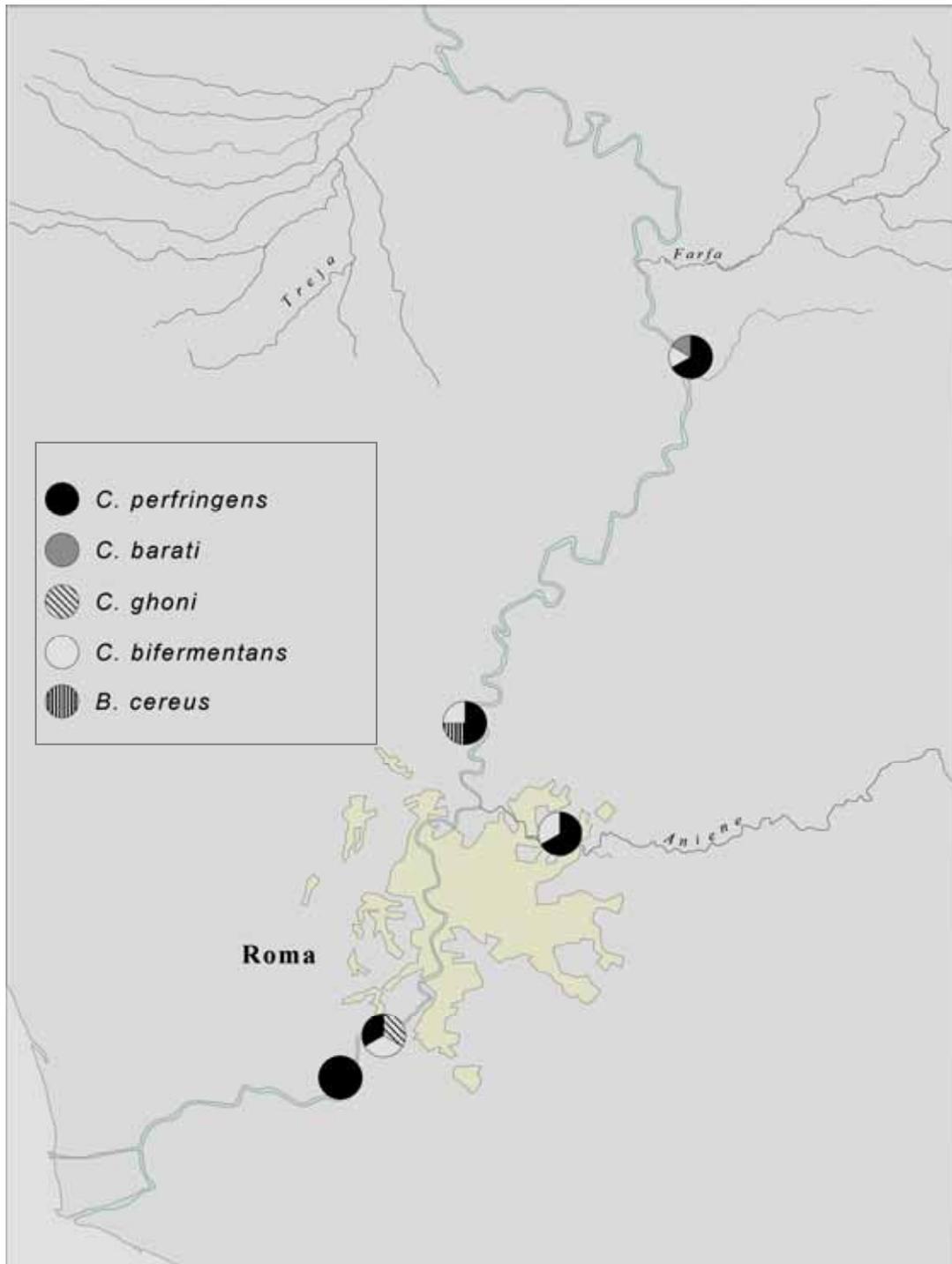


Figura 8. Frequenza relativa degli aptotipi osservati in campioni autunnali e invernali in cinque stazioni di campionamento lungo il bacino del fiume Tevere

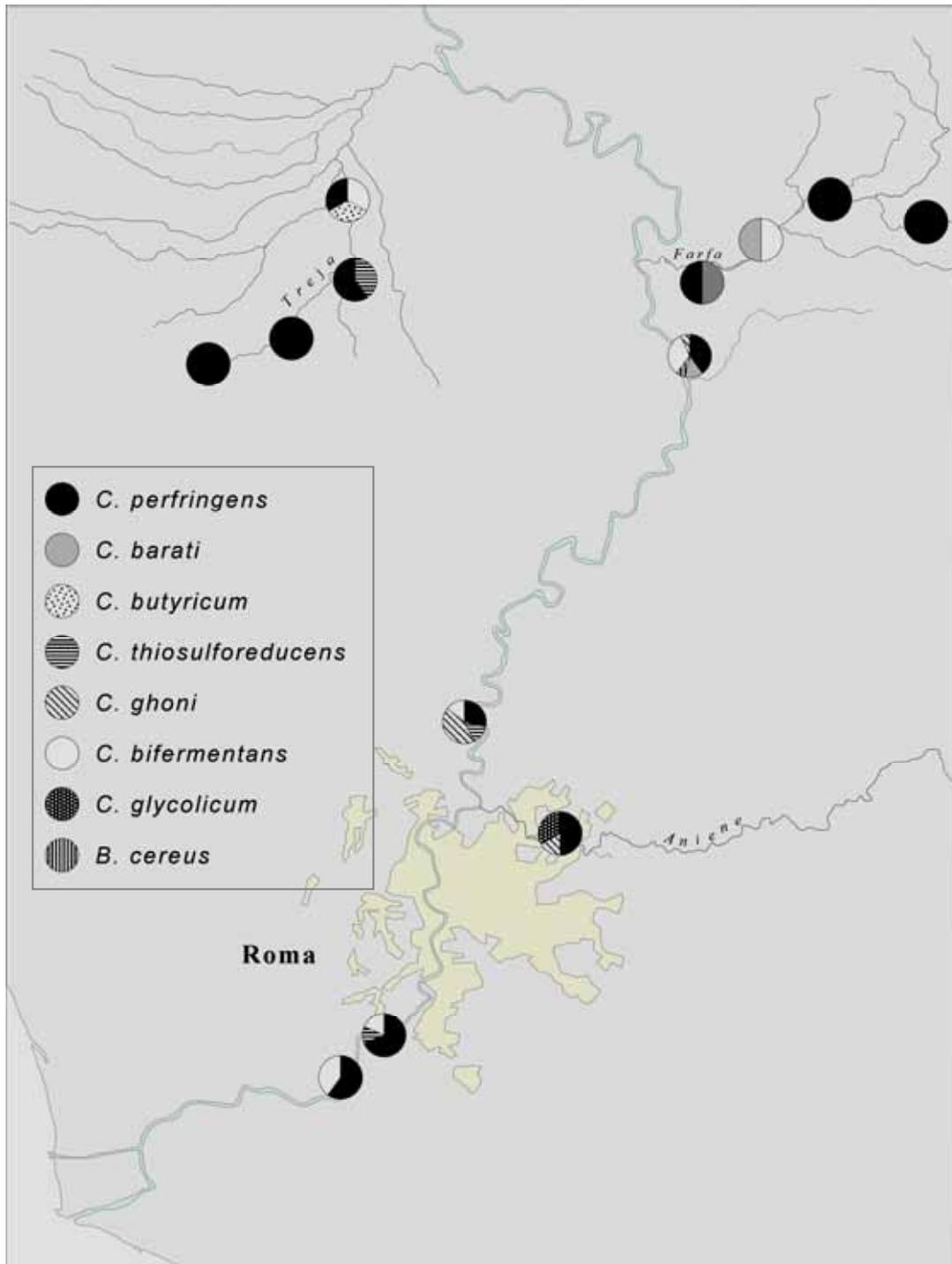


Figura 9. Frequenza relativa degli aplotipi osservati in campioni primaverili ed estivi nelle tredici stazioni di campionamento lungo il bacino inferiore del fiume Tevere

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati di questa ricerca hanno evidenziato molte difficoltà tecnico-operative e trovato anche soluzioni che hanno consentito di raggiungere gli obiettivi dello studio. Primo tra tutti è l'uso dei clostridi solfito-riduttori come indicatori dello stato dei sedimenti. In questo senso è stato quindi necessario svolgere molto lavoro tecnico preliminare.

La difficoltà di ottenere la crescita selettiva delle colonie era dovuta a limitazioni riguardanti l'applicabilità delle metodiche attualmente disponibili (Greenberg *et al.*, 1998); pur rispettando le indicazioni fornite da tali protocolli, si ottenevano livelli di crescita scarsi e fenomeni di contaminazione secondaria. Lo sviluppo di un metodo basato sulla crescita selettiva per inclusione ha consentito di ottenere la crescita di un numero più rappresentativo di colonie batteriche. Questo ci ha consentito di ottenere un metodica di isolamento facilmente trasferibile.

L'andamento disomogeneo delle concentrazioni relative dei clostridi nei sedimenti e degli indicatori classici nell'acqua, particolarmente evidente nella stazione Aniene (C), sarebbe associabile alla dinamica di accumulo più rallentata della matrice sedimento rispetto a quella dell'acqua. I picchi di accumulo appaiono essere associati a fenomeni transitori e regolari di pressione sul corpo idrico. I picchi di concentrazione per gli indicatori classici registrati nelle stazioni Mezzocammino (A) e Magliana (B), sembrano essere correlati alla presenza del sistema di depurazione di Roma sud. Nelle stazioni a monte i valori inferiori della concentrazione degli anaerobi potrebbero essere associati al maggior effetto diluente legato alla ridotta ricezione di acque reflue.

L'analisi genetica della regione del 16S ha permesso di discriminare i ceppi isolati a livello di specie. Il recente sviluppo di metodi diagnostici biomolecolari per l'identificazione di specie particolarmente virulente come ad esempio *Bacillus anthracis* (Cato & Stackebrandt, 1989; Adone *et al.*, 2002), ha inoltre permesso di escludere l'appartenenza di alcuni dei ceppi isolati nel presente studio a tali specie; infatti sono risultati essere appartenenti al *Bacillus cereus*.

La topologia dell'albero filogenetico costruito sulla base dell'analisi delle sequenze ha confermato l'eterogeneità genetica già descritta in letteratura per il genere *Clostridium* (Cato & Stackebrandt, 1989; Collins *et al.*, 1994; Johnson & Francis, 1975), con due raggruppamenti principali:

- Gruppo 1  
comprendente i ceppi affini a *C. perfringens*, *C. barati*, *C. butyricum*  
e *C. thiosulforeducens*;
- Gruppo 2  
comprendente i ceppi affini a *C. bifermentans*, *C. ghoni* e *C. glycolicum*.

A tali gruppi si aggiunge il cluster più differenziato rappresentato da quello affine a *B. cereus*.

Un altro aspetto innovativo di questo studio è che nessuno dei ceppi sequenziati presentava identità completa con i rispettivi omologhi depositati nella banca dati dell'NCBI, ma erano tutti caratterizzati da un aplotipo distintivo. L'unicità di queste forme è probabilmente dovuta alla appartenenza ad una particolare regione biogeografica, caratterizzata dalla presenza di un proprio aplotipo ma anche alla scarsità di studi condotti su campioni di provenienza ambientale. Ulteriori studi andrebbero pertanto effettuati anche in diverse biotipologie ricche per valutare se l'identità genetica osservata sia esclusiva del bacino idrografico del Tevere oppure sia più estesa.

La maggiore varietà di specie microbiche osservata nelle stagioni calde sarebbe correlabile a differenze nel regime idrico oltre che alla fluttuazione delle temperature medie dell'acqua nelle differenti stagioni. L'utilizzo più intenso delle risorse idriche nei mesi caldi, sia per scopi civili

che agricoli, comporta generalmente immissioni maggiori di acque reflue con elevati carichi organici che, associate alla diminuzione di portata e alla maggiore stabilità del sedimento, tendono a favorire lo sviluppo di uno spettro più ampio di specie sia aerobie che anaerobie.

La patogenicità di specie, quali ad esempio *C. perfringens*, rinvenuto in numerose stazioni di prelievo, e anche in aree a scarso impatto antropico, rafforza l'esigenza di considerare la matrice sedimento nella valutazione della qualità ambientale dei corpi idrici al fine della valutazione del rischio. Rispetto all'acqua tale matrice presenta caratteristiche peculiari legate soprattutto alle sue proprietà biocumulative e di microhabitat, favorevoli alla crescita di specie anaerobie, in grado di "registrare" inquinamenti pregressi.

Lavori precedenti hanno evidenziato come le spore di *C. perfringens* siano tra i più validi indicatori di inquinamento fecale (Desmarais *et al.*, 2002); secondo gli autori esse possono essere utilizzate per valutare l'evoluzione di tale parametro lungo un arco temporale più esteso a causa della loro elevata resistenza nell'ambiente.

La potenziale patogenicità di molte specie anaerobie come *C. perfringens*, *C. botulinum*, *B. anthracis*, *B. cereus*, ecc., suggerirebbe la messa a punto di metodi diagnostici efficaci, come ad esempio lo screening molecolare diretto al fine di poter attuare adeguate azioni di intervento in tempi rapidi. In questo contesto l'approccio molecolare rappresenta oggi un metodo accurato e competitivo rispetto a quelli tradizionali, basati sull'utilizzo di test biochimici. Questa limitazione è rappresentata dal fatto che i kit biochimici, attualmente in commercio, sono costruiti a partire da sequenze depositate in banca dati che molto frequentemente si riferiscono a campioni clinici. Da qui la necessità di incrementare la caratterizzazione molecolare di specie ambientali.

Tale metodica non può tuttavia prescindere dalla determinazione classica, non essendo informativa dal punto di vista quantitativo e poiché i campioni sarebbero necessariamente numerosi comportando un costo eccessivo e tempi di realizzazione lunghi.

Questo lavoro ha evidenziato il valore e l'utilità dell'utilizzo di *C. perfringens* come indicatore di contaminazione fecale dei sedimenti fluviali anche se si rende necessario un ulteriore approfondimento della ricerca al fine di ottenere delle informazioni di tipo quantitativo. I risultati hanno dimostrato la presenza di una marcata biodiversità di ceppi microbici anaerobi nell'ambito del bacino del fiume Tevere, di cui *C. perfringens* rappresenta la componente dominante. L'analisi della regione codificante per l'rRNA 16S, pur confermando le relazioni filogenetiche tra le specie in lavori descritti in letteratura, ha evidenziato che i ceppi isolati nel presente studio mostrano un pattern aplotipico distintivo.

L'identificazione con tecniche molecolari è stata di grande utilità non solo nell'avvalorare l'utilizzo di *C. perfringens* come possibile indicatore microbiologico, ma anche per la sua efficacia nell'identificazione di specie affini e il loro grado di patogenicità.

A fronte di quanto appena detto, pur considerando necessarie ulteriori ricerche per confermare i risultati ottenuti nel presente studio, si può concludere che questo microrganismo potrebbe fornire utili informazioni relative ad una corretta gestione finalizzata al risanamento degli ambienti fluviali, come ad esempio, valutare il tasso di contaminazione antropica e di rischio sanitario oppure verificare l'evoluzione temporale di eventuali azioni di naturalizzazione dei corpi idrici. È pertanto auspicabile che l'analisi della componente anaerobia della matrice di sedimento possa essere inserita nella normativa di settore, al fine di ottenere un quadro sinoptico sulla diversità microbica dei sedimenti fluviali.

## BIBLIOGRAFIA

Adone R, Pasquali P, La Rosa G, Marianelli C, Muscillo M, Fasanella A, Francia M, Ciuchini F. Sequence analysis of the genes encoding for the major virulence factors of *Bacillus anthracis* vaccine strain "Carbosap". *J Appl Microbiol* 2002;93(1):117-21.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman GJ, Smith JA, Struhl K (Ed.). *Current protocols in molecular biology*. New York: Green Publishing Associates and Wiley-Interscience; 1987.

Bitton G, Gerba CP. *Groundwater Pollution Microbiology*. New York: John Wiley and Sons; 1984.

Brambati A, Fanzutti GP, Marocco R. Suspended matter trasport in the lagoons: the Grado Lagoon. *Boll Oceanol Teor Appl* 1983;1:5-18.

Burton GA jr. Sediment collection and processing: factors affecting realism. In: Burton GA. (Ed.) *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publishers. Boca Raton (FL); 1992. p. 37-54.

Burton GA jr, Lazorchak JM, Waller WT, Lanza GR. Arsenic toxicity changes in the presence of sediment. *Bull Environ Contam Toxicol* 1987;38:491.

Cato EP, Stackebrandt E. Taxonomy and Phylogeny. In: Minton NP, Clarke DJ (Ed.). *Clostridia-Biotechnology handbooks; III series*. New York and London: Plenum Press; 1989.

Cavalli-Sforza LL, Edwards WF. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution* 1967;21:550-70.

Cavallo RA, Latorre F, Acquaviva MI, Montagna MT, Mele MS. Indicatori microbiologici di inquinamento: corrispondenza acqua-sedimenti del Mar Piccolo di Taranto. *Ricerca, Inquinamento* 1996;3:54-7.

Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hipe H, Farrow JAE. The phylogeny of the gneeus Clostridium: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* 1994;44:812-26.

Davies CM, Julian A, Long H, Donald M, Ashbolt NJ. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol* 1995;61(5):1888-96.

Desmarais TJ, Solo-Gabriele HM, Palmer CJ. Influence of Soil on Fecal Indicator Organisms in a Tidally Influenced Subtropical Environment. *Appl Environ Microbiol* 2002;Mar:1165-72.

Eisma D, Kalf J. Dispersal of Zaire River suspended matter in the estuary of Angola basin. *Neth Journ Sea Res* 1984;17:385-411.

Findlay SE. Small-scale spatial distribution of meiofauna on a mud and sandflat. *Estuarine Coastal Shelf Sci* 1981;12:471-84.

Genevini PL, Manstretta M, Mecella G. In: *Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo*. Roma: Osservatorio Nazionale Pedologico e per la qualità del suolo, Ministero delle Risorse Agricole, Agricole e Forestali; 1994.

Ghetti PF. *Indice Biotico Esteso (IBE). I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti. Manuale di applicazione*. Trento: Provincia Autonoma di Trento, Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente (APPA); 1997.

Gilmer RW. Some aspects of feeding in the comanous pteropod molluscs. *J Exp Mar Biol* 1974;15:127-44.

- Greenberg A, Clescerl L, Eaton A (Ed.) *Standard methods for the examination of Water and Waste-water*. Washington (DC): APHA, AWWA, WPCF; 1998.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 1985;32:443-5.
- Hunt JR. Prediction of ocean particle size distributions from coagulation and sedimentation mechanism. *Am Chem Soc Washington Adv Chem Ser* 1980;189:243-57.
- Indorante SJ, Follmer LR, Hammer RD, Koenig PG. Particle-size analysis by a modified pipette procedure *Soil Sci Soc Am J* 1990;54: 560-3.
- Jannasch HW. Bacteria content of particulate matter in offshore surface waters. *Limn and Ocean* 1973;25:653-61.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins, DG, Gibson, TJ. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends in Biochemical Sciences* 1998;23:403-5.
- Johnson JL, Francis BS. Taxonomy of the clostridia: Ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. *J Gen Microbiol* 1975;88:219-24.
- Kruskal JB. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika* 1964a;29:1-27.
- Kruskal JB. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika* 1964b;29:115-29.
- Landrum PF. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environmental Science and Technology* 1989;23(5):588-95.
- Mancini L, Baiocco F, Munafò M, Di Domenicantonio A, Pelillo R, Terranova I, Tancioni L. *Il bacino del fiume Tevere. Rapporto SINAnet sulle acque*. Roma: ANPA, Serie Stato dell'Ambiente Parte B; 2001.
- McCave IN. Particulate size spectra, behaviour and origin of nepheloid layers over the Nova Scotian Continental Rise. *J Geophysical Res* 1983;88(C12):7647-66.
- Minton N, Clarke DJ. *Clostridia-Biotechnology handbooks; III series*. New York and London: Plenum Press; 1989.
- Moshrefi N. A new method of sampling soil suspension for particle-size analysis. *Soil Sci* 1993;155:245-8.
- Niederlehner BR, Pontasch KW, Pratt JR, Cairns J jr. Field evaluation of prediction of environmental effects from a multispecies-microcosm toxicity test. *Arch Environ Contam Toxicol* 1990;19:62.
- Nonnis O, Maggi C. Scheda 1 – Campionamento. In: Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Servizio Difesa Mare (Ed.) *Metodologie analitiche di riferimento*. Roma: Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare (ICRAM); 2001.
- Paher HR. Microorganisms in municipal Solid Waste and public health implications. *CRC Critical Rev Environ Control* 1987;17:187-8.
- Peter H, Sneath A. (Ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. Baltimore, USA: Williams & Wilkins; 1986.
- Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 1998;14:817-8.
- Reynoldson TB. Interactions between sediment contaminants and Benthic organisms. *Hydrobiologia* 1987;149:53-66.
- Robles S, Rodriguez JM, Granados I, Guerrero MC. Sulfite-reducing clostridia in the sediment of high mountain lake (Laguna Grande, Gredos, Spain) as indicators of fecal pollution. *Int Microbiol* 2000;3:187-91.

Rood JI, McClane BA, Songer JG and Tithall RW. *The clostridia: molecular biology and pathogenesis*. San Diego (CA): AP press; 1997.

Rozen S, Skaletsky H J. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (Ed). *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Human Press, 2000. p. 365-86.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scarf SJ, Higuchi R, Horn GP, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed enzymatic amplification of Dann polymerase. *Science* 1988;239:487-91.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 1987;4:406-25.

Sheldon RW, Prakash A, Sutcliffe WM jr. The size distribution of particles in the ocean. *Limn and Oceanogr* 1972;XVII(3):327-40.

Shepard FP. Nomenclature based on sand, silt, clay rations. *Journal of Sedimentary Petrology* 1954;24:151.

Sieburth J. Organic aggregation in seawater by alkaline precipitation of inorganic nuclei during the formation of ammonia by bacteria. *Journ Gen Microbiol* 1965;41: 20.

Stemmer BL Burton GA jr, Sasson-Brickson G. Effect of sediment spatial variance and collection method on cladoceran toxicity and indigenous microbial activity determinations. *Environ Toxicol Chem* 1990;9: 1035.

Swofford, DL. *PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates; 2001.

Thompson JD, Gibson, TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 1997;24:4876-82.

Wassmann P, Naas KE, Johannessen PJ. Anual supply and loss of particulate organic carbon in Nordasvannet, a eutrophic, land-locked fjord in Western Norway. *Rapp P. Réun Cs Int Explor Mer* 1986;186:423-31.

Wiederhol T, Dave G. Toxicity of metal polluted sediments to *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. *Hydrobiologia* 1989;77:411.

## Normativa citata

Italia. Legge 10 maggio 1976, n. 319. Norme per la tutela delle acque dall'inquinamento. *Gazzetta Ufficiale* n. 141, 29 maggio 1976.

Italia. Decreto del Presidente della Repubblica 8 giugno 1982, n. 470. Attuazione della direttiva 76/160/CEE relativa alla qualità delle acque di balneazione. *Gazzetta Ufficiale* n. 203, 26 luglio 1982.

Italia. Decreto legislativo 19 settembre 1994, n. 626. Attuazione della direttiva 89/391/CEE, della direttiva 89/654/CEE, della direttiva 89/655/CEE, della direttiva 89/656/CEE, della direttiva 90/269/CEE, della direttiva 90/270/CEE, della direttiva 90/394/CEE, della direttiva 90/679/CEE, della direttiva 93/88/CEE, della direttiva 95/63/CE, della direttiva 97/42/CE, della direttiva 98/24/CE, della direttiva 99/38/CE e della direttiva 99/92/CE riguardanti il miglioramento della sicurezza e della salute dei lavoratori durante il lavoro. *Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario* n. 265, 12 novembre 1994.

Italia. Decreto legislativo 11 maggio 1999, n. 152. Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della

direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 124, 29 maggio 1999.

Italia. Decreto legislativo 2 febbraio 2001, n. 31. Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 52, 3 marzo 2001.

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

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Ditta Grafiche Chicca & C. snc  
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

*Roma, dicembre 2004 (n. 4) 17° Suppl.*