

Bioindicatori della qualità del suolo

Barbara Biagini, Michela Barbuto, Aldo Zullini*

Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Piazza della Scienza 2, Milano

* *Referente per la corrispondenza: aldo.zullini@unimib.it*

Pervenuto il 20.7.2006; accettato il 6.9.2006

Riassunto

Il suolo è un comparto che svolge importanti funzioni ambientali, economiche, sociali e culturali. La sua tutela e la sua gestione sono pertanto meritevoli di grande attenzione. Tuttavia a livello europeo non esiste una politica specifica per la salvaguardia del suolo; in ambito italiano l'argomento è stato trattato solo in maniera frammentaria, focalizzando l'attenzione su problemi come rischio idrogeologico, discariche, riciclo di fanghi di depurazione in agricoltura, acque superficiali e sotterranee. Per valutare la qualità del suolo si sono cercati degli strumenti adatti, focalizzando l'attenzione sulla componente biotica in quanto è considerata la più vulnerabile e responsabile dello svolgimento dei principali processi del suolo. A questo scopo sono stati proposti bioindicatori in grado di fornire indicazioni integrate di tutti i possibili fattori (ambientali o esogeni) che influiscono sul suolo. I bioindicatori si riferiscono ad organismi (batteri, funghi, piante e animali) sensibili a possibili stress capaci di dare informazioni complementari a quelle delle analisi chimico-fisiche. Il biomonitoraggio può essere effettuato a più livelli: comunità, popolazione, specie, individuo, tessuti, cellula e biomolecole.

PAROLE CHIAVE: suolo / bioindicatori / biomarker

Bioindicators of soil quality

The soil is a system fulfilling important environmental, economic, social and cultural functions. Therefore its protection and management are growing concern for human and Earth health. In Europe a specific policy for the soil protection does not exist, in Italy this matter was fragmentarily treated, focusing on problems like hydrogeologic risk, rubbish dumps, scattering sewage sludge in agriculture, superficial and ground water. In order to estimate the soil quality suited tools are searched for. In this contest the biotic component is considered most suited because of his vulnerability and his function in soil ecosystem. For this purpose, bioindicators being able to supply chemical and physical indications were proposed. Such bioindicators refer to organisms (bacteria, fungi, plants and animals) sensitive to possible exogenous and environmental factors. Biomonitoring can be carried out at more levels: community, population, species, individual, tissue, cell and biomolecule.

KEY WORDS: soil / bioindicator / biomarker

IL SUOLO E LE MATRICI AMBIENTALI

Secondo la definizione dell'International Standard Organization (ISO, 1996), con il termine "suolo" si definisce lo strato superiore della crosta terrestre, formato da particelle minerali, materia organica, acqua, aria e organismi viventi. Se si escludono questi ultimi, il suolo costituisce, pertanto, l'interfaccia tra la geosfera, di cui fa parte, l'atmosfera e l'idrosfera. Esso, inoltre, condiziona in maniera significativa la

biosfera, soprattutto gli animali e i vegetali che in essa vivono e da essa traggono sostentamento.

Tutti i comparti (o componenti) ambientali –atmosfera, idrosfera, geosfera, biosfera– sono strettamente interconnessi tramite trasferimenti di materia e di energia (Fig. 1). Tali relazioni sono riconducibili ai cicli biogeochimici degli elementi. Dal momento che l'uomo con le sue attività è in grado di influenzare forte-

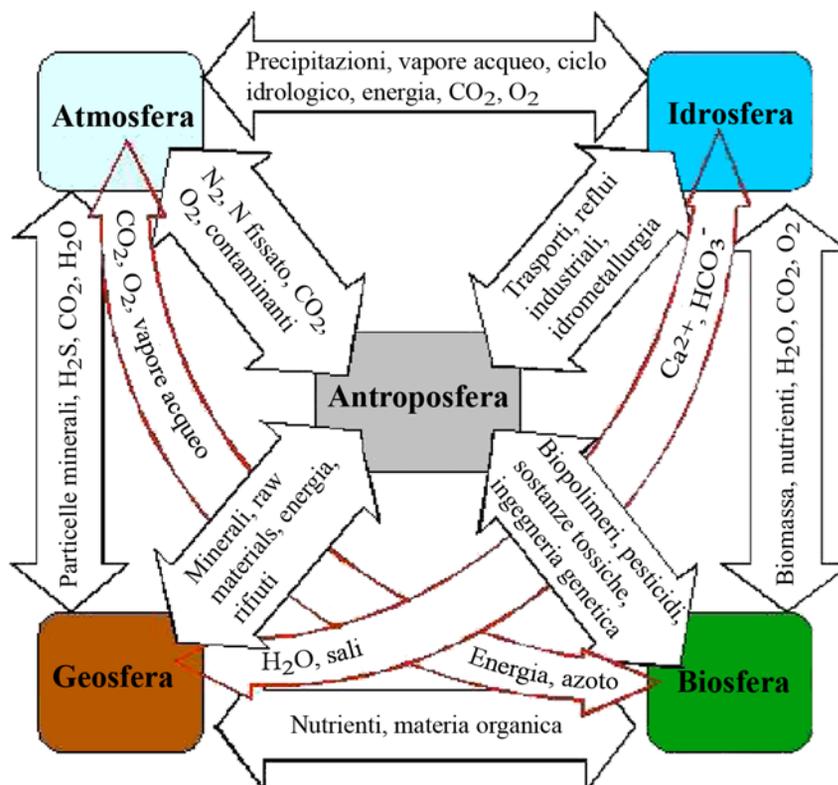


Fig. 1. Schema delle relazioni biunivoche tra le componenti ambientali (modificato da MANAHAN, 2000).

mente questi processi, MANAHAN (2000) ha rappresentato nello schema l'umanità come un ulteriore comparto ambientale.

Le influenze antropiche sull'ambiente non sempre colpiscono direttamente tutte le componenti ambientali. Infatti inizialmente può essere colpita una sola di queste e successivamente, proprio a causa delle strette relazioni tra le varie componenti, tale impatto può ripercuotersi anche sulle altre.

Se si considera il comparto geosfera e più in particolare il suolo (Fig. 2), esso influenza la quantità di acqua superficiale e sotterranea, la composizione della

troposfera, attraverso scambio di gas, la biodiversità, la produzione di biomassa e la salute umana. Un suo scorretto sfruttamento in agricoltura, mediante un eccessivo uso di pesticidi e fertilizzanti, incide negativamente, ad esempio, sulla qualità dell'acqua (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993). Le stesse pratiche agricole possono influenzare la qualità dell'aria variando la capacità del suolo di produrre o di consumare importanti gas atmosferici, quali CO_2 , CH_4 e N_2O (ROLSTON *et al.*, 1993; MOSIER, 1998). Ad esempio, l'uso di fertilizzanti può contribuire all'aumento in atmosfera di ossidi di azoto (DELMAS *et al.*, 1997) che, oltre ad essere gas serra, sono importanti regolatori della concentrazione di ozono troposferico. Inoltre, è noto che lo stato del suolo incide significativamente anche sulla componente biologica (STORK e EGGLETON, 1992; DORAN e ZEISS, 2000; VAN BRUGGEN e SEMENOV, 2000) e che un suolo contaminato può costituire un diretto pericolo per la salute umana attraverso il contatto, l'ingestione o l'inhalazione di sostanze in esso contenute (LANGLEY, 2002).

LA TUTELA DEL SUOLO

La Commissione Europea in una Comunicazione (2002) ha definito una serie di funzioni chiave dal punto di vista ambientale, economico, sociale e culturale che sono assicurate dal suolo e sono indispensabili per la vita:

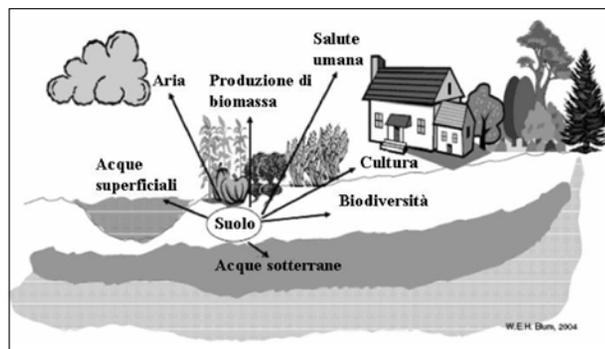


Fig. 2. Influenze esercitate dal suolo su tutte le componenti a contatto con esso (modificato da BLUM, 2004).

1. produzione alimentare e di altre biomasse;
2. immagazzinamento, filtrazione e trasformazione (tali funzioni si riferiscono principalmente all'acqua, ai minerali, alle sostanze chimiche –nutrienti e non– e alla materia organica);
3. habitat e patrimonio genetico;
4. supporto fisico per le infrastrutture e le attività umane, elemento del paesaggio e sede di testimonianze archeologiche e paleontologiche;
5. fonte di materie prime.

Dall'importanza delle funzioni esercitate deriva che il suolo è una risorsa e come tale deve essere protetto. Le cause, ufficialmente riconosciute a livello europeo, capaci di determinare un suo degrado sono: l'erosione, la perdita di materia organica, la contaminazione diffusa o puntiforme, l'impermeabilizzazione, la compattazione, la salinizzazione, la perdita di biodiversità, le inondazioni e gli smottamenti (COMMISSIONE EUROPEA, 2002). I processi di degrado possono procedere più rapidamente delle capacità rigenerative del suolo stesso, in modo da rendere tale risorsa non rinnovabile. In questa ottica risulta ancora più evidente quanto sia indispensabile la protezione del suolo.

Nel 2001 la Comunità Europea ha definito il VI Programma di azione per l'ambiente finalizzato a sottolineare il ruolo sempre maggiore delle problematiche ambientali nelle decisioni politiche. Tra i vari obiettivi c'è anche quello di proteggere il suolo dall'erosione e dall'inquinamento. La Commissione Europea ha riconosciuto che fino ad allora non esisteva un approccio comunitario generale per affrontare tale tematica. La Comunicazione del 2002 della Commissione stessa ha appunto avuto lo scopo di definire una strategia di intervento specifica per la protezione del suolo. Questa in precedenza risultava indirettamente dall'applicazione di normative in altri settori, quali acque superficiali e sotterranee oppure aria. D'ora in avanti, però, si intende gestire politiche ambientali che abbiano anche il suolo come oggetto di tutela specifica.

Le questioni riguardanti il suolo sono state da sempre affrontate a livello nazionale, regionale e locale, a causa di una forte componente locale richiesta nelle politiche di gestione. D'altra parte, ci si è resi conto che i problemi del suolo non hanno solo una componente locale, ma possono raggiungere anche un'estensione mondiale; quindi le iniziative comunitarie diventano di vitale importanza soprattutto per l'indirizzo e il coordinamento delle azioni dei singoli Stati membri.

La Commissione Europea, oltre al miglioramento dell'attuazione di normative vigenti, si pone delle scadenze per la revisione di vecchie direttive o per l'emanazione di nuove che, direttamente o indirettamente,

riguardino il suolo. Infine, è stata sottolineata l'importanza della predisposizione di un sistema di informazioni, di monitoraggio e di indicatori per determinare le condizioni prevalenti del suolo e valutare l'impatto delle diverse politiche e pratiche di intervento.

La legislazione italiana in materia di difesa del suolo ha riguardato nel passato esclusivamente la definizione e la gestione del rischio idrogeologico (L. 1989/183; D.P.C.M. 23/3/90; L. 1990/253; D.P.R. 18/7/1995; D.M. 14/2/1997, solo per citarne alcune). L'aspetto che concerne la tutela da contaminazioni è stato trattato in parte nell'ambito di normative sui rifiuti e sulle acque. Ad esempio, il Decreto Ronchi (D. Lgs. 22/1997), decreto di attuazione di diverse direttive europee in materia di gestione dei rifiuti, ha affrontato i problemi della bonifica dei siti contaminati e dello smaltimento dei rifiuti in discarica. Tali problemi sono stati disciplinati più dettagliatamente dal D.M. n.471/1999. Sebbene non venga considerata la qualità di un suolo in tutti i suoi aspetti, negli allegati sono definiti i limiti di accettabilità per diversi inquinanti organici ed inorganici a seconda della destinazione d'uso. In quest'ambito non sono stati però contemplati suoli ad uso agricolo, per i quali mancano tuttora dei limiti di accettabilità per le varie classi di inquinanti. In questo settore le uniche normative attualmente vigenti che siano indirizzate alla tutela del suolo sono il D.M. 19/04/1999 contenente, tra gli altri, riferimenti alla tutela della struttura del suolo e consigli per l'applicazione di concimi organici ed inorganici, e il D. Lgs. n. 99/1992, concernente l'utilizzo dei fanghi di depurazione in agricoltura.

La tutela del suolo, pertanto, non ha ricevuto ancora quell'attenzione alla quale sono soggetti da anni i comparti aria e acqua. La legislazione vigente, poi, affronta solo alcuni problemi che riguardano il suolo, soprattutto perché più direttamente legati alla salute e all'incolumità umana. Occorre, invece, intervenire anche per proteggere la risorsa suolo in quanto sistema vivente dotato di importanti funzioni.

QUALITÀ DEL SUOLO

Il suolo è un'entità estremamente variabile nello spazio e nel tempo, caratterizzata da una vasta gamma di proprietà fisiche, chimiche e biologiche. La definizione della sua qualità risulta quindi di difficile definizione, in quanto è necessaria la contemporanea considerazione di molti aspetti. Inoltre, i criteri e gli approcci per definire tale qualità possono essere anche molto diversi a seconda della funzione del suolo oggetto del nostro interesse (RUF *et al.*, 2003).

Fin dai tempi antichi il concetto di bontà del suolo è sempre stato legato all'agricoltura: suolo in buono stato significava suolo che poteva garantire un buon

raccolto. Questa visione risulta oggi troppo riduttiva, in quanto la produzione di cibo è solo una delle attività legata al suolo. L'uomo è diventato sempre più consapevole che il suolo ha un ruolo critico nel mantenimento della qualità ambientale (GLANZ, 1995). È a partire dagli anni Novanta che si è avvertita la necessità di caratterizzare la qualità del suolo; questa è scaturita dalla contemporanea consapevolezza della necessità di condurre uno sviluppo sostenibile. A partire da questi anni si sono, infatti, susseguite numerose conferenze internazionali che hanno avuto come oggetto soprattutto la discussione degli strumenti per stimare tale qualità (HARRIS e BEZDICEK, 1994). Sempre a questo periodo risalgono anche le prime definizioni di qualità del suolo (LARSON e PIERCE, 1991; PARR *et al.*, 1992; DORAN e PARKIN, 1994) ad ampio spettro, ossia applicabili a qualsiasi contesto e non dipendenti da una specifica sua funzione presa in quel momento in esame. La più completa e recente definizione è quella di DORAN e PARKIN (1996), adottata dalla Soil Science Society of America: la qualità è la capacità di uno specifico tipo di suolo di funzionare, nell'ambito di un ecosistema naturale o gestito, per sostenere la produttività vegetale o animale, per mantenere o migliorare la qualità dell'aria e dell'acqua e per supportare la salute umana e le abitazioni (KARLEN *et al.*, 1997).

Accanto al termine di "qualità" è stato a volte usato quello di "salute" del suolo. In letteratura l'equivalenza dei due termini è discussa: per alcuni sono sinonimi (HARRIS e BEZDICEK, 1994), per altri presentano sfumature diverse. Anche in questo secondo caso i pareri sono discordanti. Alcuni (DORAN e ZEISS, 2000) sostengono che "qualità del suolo" faccia riferimento ad un suo specifico uso, mentre "salute del suolo" debba essere utilizzato in senso più ampio considerando il suolo come un sistema vivente e dinamico capace di sostenerne tutte le funzioni. Altri (KARLEN *et al.*, 1997; VAN BRUGGEN e SEMENOV, 2000), al contrario, considerano "qualità del suolo" un concetto più ampio di "salute del suolo", poiché il primo contempla nella definizione le proprietà chimiche, fisiche e biologiche del suolo stesso, mentre il secondo solo caratteristiche ecologiche. Da questo punto di vista la salute del suolo costituisce una parte della salute dell'ecosistema e, dato che un ecosistema in salute è caratterizzato dall'integrità dei cicli dei nutrienti e dei flussi energetici, dalla stabilità e dalla resistenza a stress e disturbi (O'NEILL *et al.*, 1986), la "salute del suolo" può essere associata a diversità biologica e a stabilità (VAN BRUGGEN e SEMENOV, 2000).

Nel presente lavoro la qualità del suolo, cui si fa riferimento, è lo stato di funzionamento dei processi che rendono il suolo un sistema vitale. Tali processi sono delle funzioni ecologiche fondamentali per l'eco-

sistema (LARSON e PIERCE, 1991):

- promozione della crescita delle piante;
- regolazione del bilancio idrico;
- riciclo dei carboidrati e dei nutrienti attraverso la mineralizzazione;
- trasferimento di energia attraverso la catena trofica;
- tampone ambientale sia dal punto di vista fisico, chimico e biologico.

La determinazione dello stato del suolo, pertanto, deve essere effettuata sulla base della componente biologica, perché condiziona direttamente o indirettamente i processi del suolo (STORK e EGGLETON, 1992). Il termine assunto con questo senso è assimilabile a quello di "salute del suolo" così com'è stato definito da van BRUGGEN e SEMENOV (2000). Questa è una visione solo parziale della qualità, ma è diventata di fondamentale importanza oggi, poiché ci si è resi conto che occorre recuperare e preservare l'ecosistema per impedire un deterioramento delle risorse stesse e, di conseguenza, garantire un futuro per l'uomo sulla Terra. Qualsiasi uso del suolo, pertanto, deve essere condotto in maniera sostenibile, così da non comprometterne la salute. La valutazione dello stato del suolo, attraverso la componente vitale, ha appunto lo scopo di valutare se il tipo di uso passato o recente oppure le condizioni dell'intera area o di tutto il pianeta abbiano avuto, o abbiano tuttora, influenze tali da compromettere la vita degli organismi. Nel corso del tempo è stato necessario, quindi, sviluppare degli strumenti per misurare la qualità secondo questo punto di vista. Per questo scopo si è arrivati alla ricerca di bioindicatori.

I BIOINDICATORI

Negli ultimi anni è sorta l'esigenza di affiancare ai comuni metodi di indagine strumentale (misurazione di parametri chimico-fisici) altre metodiche di tipo biologico che misurano le variazioni dei popolamenti animali e vegetali, senza perdere di vista che la diversità biotica, intesa come prodotto delle interazioni fra evoluzione biologica e variazione dei parametri ambientali, non dipende solo dagli inquinanti. Tale metodica va sotto il nome di "Biomonitoraggio" e si basa sull'impiego di organismi viventi "sensibili", in grado cioè di fungere da indicatori del degrado della qualità ambientale dovuto all'inquinamento. L'uso di organismi sensibili a stress ambientali si è reso necessario in quanto i dati di tipo chimico-fisico non davano una visione globale del possibile impatto ambientale, ma fornivano solamente una misura puntiforme ed istantanea di un unico parametro. Inoltre, uno strumento di misura rileva solo le sostanze per le quali è stato appositamente progettato e non è in grado di evidenziare sostanze impreviste o gli

effetti combinati di più sostanze sull'ambiente. Per contro la biovalutazione fornisce stime indirette, ma è in grado di mostrare gli effetti sinergici di più sostanze su più bioindicatori, consentendo valutazioni incrociate.

Sebbene i primi esperimenti di biomonitoraggio risalgano all'inizio del secolo scorso (KOLKWITZ e MARSSON, 1902) il suo sviluppo e perfezionamento ha subito un'accelerazione solo negli ultimi anni (PANKHURST *et al.*, 1997; VAN STRAALEN e KRIVOLUTSKY, 1996) con la ricerca di bioindicatori. Esistono numerose definizioni di bioindicatore che differiscono soprattutto per il livello di organizzazione biologica scelto per il monitoraggio. Alcuni autori infatti si riferiscono al bioindicatore intendendo un singolo organismo sia esso animale, vegetale o batterico; altri invece ritengono opportuno utilizzare il termine bioindicatore riferendosi ad una categoria tassonomica (specie, genere, famiglia e ordine) fino ad arrivare all'intero ecosistema; altri ancora applicano il termine bioindicatore anche a parti di un individuo. Noi ci atteniamo alla definizione data da ISERENTANT e DE SLOOVER (1976): "organismo o sistema biologico usato per valutare una modificazione (generalmente degenerativa) della qualità ambientale, qualunque sia il suo livello di organizzazione e l'uso che se ne fa". In questa definizione rientrano pertanto gli individui, le popolazioni, le comunità, i gruppi ecologici ma anche le parti corporee, come organi, tessuti, cellule nonché i prodotti metabolici (Fig. 3). Nel conte-

sto dei bioindicatori vengono a volte usati dei termini che individuano ambiti di indagine più ristretti e associati ad uno specifico livello. È possibile quindi distinguere:

- "biomarker" (McCARTHY e SHUGART, 1990), ossia una variazione biochimica e/o fisiologica ad una scala inferiore rispetto all'organismo e quindi all'interno di tessuti, cellule o fluidi biologici che dà evidenza di esposizione e/o effetto ad uno o più composti inquinanti;
- "bioreporter system" (AARTS *et al.*, 1993), ossia un sistema atto a rendere evidente un cambiamento genetico dovuto alla presenza di un agente inquinante. Questo è reso possibile dall'utilizzo di cellule geneticamente modificate in grado di dare un segnale misurabile, come ad esempio la bioluminescenza;
- "biosensor" (RAWSON, 1993), ovvero un congegno fisico che permette di rendere manifesta la presenza di un inquinante mediante la produzione di un segnale elettrico derivato dalla biocatalisi;
- "bioassay" (VAN STRAALEN, 1998), vale a dire un test ecotossicologico di breve durata con un protocollo standardizzato, nel quale l'attività dell'inquinante viene misurata come effetto negativo in alcune specie sentinella.

È possibile inoltre distinguere un bioindicatore passivo, qualora esso sia naturalmente presente in un'area inquinata, oppure attivo, nel caso in cui esso venga esposto artificialmente all'agente inquinante (DE KOCK

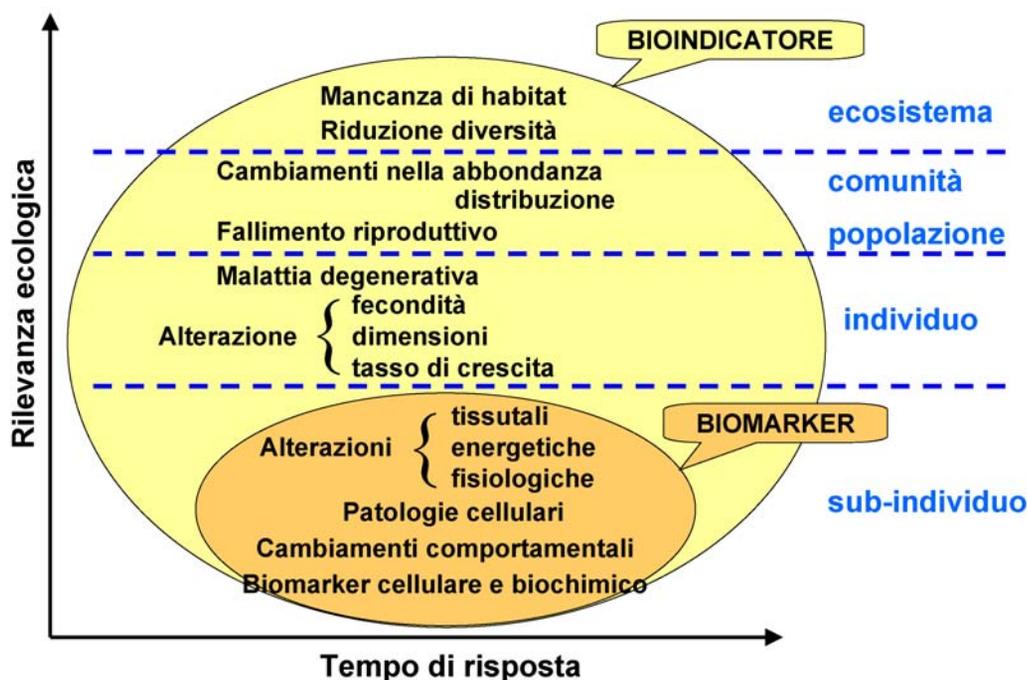


Fig. 3. Rilevanza ecologica e tempo di risposta in funzione del livello di organizzazione biologica scelto (modificato da Huo *et al.*, 2005).

e KRAMER, 1994; POWELL, 1997).

Indipendentemente dal livello di organizzazione biologica assunto come indicatore, un requisito irrinunciabile è l'accertata sensibilità nei confronti di un'azione di disturbo, chiaramente identificata, che può esprimersi con un'ampia gamma di risposte: alterazione biochimica e fisiologica, disturbo dei bioritmi, modificazione anatomico-morfologica, variazione della composizione delle biocenosi in seguito alla morte di individui o di specie molto sensibili (SARTORI, 1998). Il tipo di risposta del bioindicatore varia in relazione al livello di organizzazione biologica, al tempo di esposizione e alla causa che provoca lo stress (sia essa chimica, fisica o biologica). È evidente che tanto più il livello di organizzazione biologica diventa complesso (passando ad esempio dalla cellula all'organismo o dal singolo organismo alla popolazione, alla specie e alla comunità), tanto più aumenta la rilevanza ecologica ed il livello di integrazione dei fattori ambientali (Fig. 4). Tuttavia, parallelamente, diminuisce la sensibilità nella risposta e la comprensione dei meccanismi che ne determinano gli effetti (Fig. 5). È quindi fondamentale per una buona indagine ambientale avere a disposizione una serie di misure a diversi livelli di organizzazione. Questo è importante anche per il fatto che un contaminante produce dapprima un effetto ad un livello basso dell'organizzazione gerarchica e poi progressivamente, una volta annullati i rispettivi meccanismi omeostatici, a livelli sempre superiori.

Un buon bioindicatore della qualità ambientale deve soddisfare una serie di requisiti tali che le informazioni ricavabili possano essere integrate positivamente con le caratteristiche chimiche, fisiche e biologiche dell'ecosistema. In linea generale un bioindicatore deve possedere i seguenti requisiti:

- 1) sensibilità alle variazioni nell'ecosistema. Per essere utile esso deve essere sufficientemente sensibile all'influenza data dalle pratiche agricole e dai cambiamenti climatici a lungo termine, tuttavia non deve essere troppo influenzato dai cambiamenti climatici a breve termine (DORAN e PARKIN, 1996);
- 2) stretta connessione con le condizioni naturali di un ecosistema (EDWARDS *et al.*, 1995);
- 3) buona correlazione con le funzioni del suolo, quali lo stoccaggio ed il rilascio dell'acqua, la decomposizione dei residui vegetali ed animali, la trasformazione ed il riciclo dei nutrienti, il sequestro e la detossificazione dei composti organici e la promozione della crescita delle piante (COSTANZA *et al.*, 1997);
- 4) accessibilità, facile comprensione e applicazione anche da parte dei non esperti (SCHILLER *et al.*, 2001);
- 5) ruolo chiave all'interno dell'ecosistema (EDWARDS

et al., 1995);

- 6) optimum ecologico ed ampia distribuzione nell'area di studio (EDWARDS *et al.*, 1995);
- 7) caratteristiche anatomiche, fisiologiche ed ecologiche ben conosciute (NIEMI e McDONALD, 2004);
- 8) uniformità genetica (HOPKIN, 1993);
- 9) ciclo vitale sufficientemente lungo (HOPKIN, 1993);
- 10) scarsa mobilità (HOPKIN, 1993).

Riassumendo, i bioindicatori hanno una serie di vantaggi che ne favoriscono e ne promuovono l'utiliz-

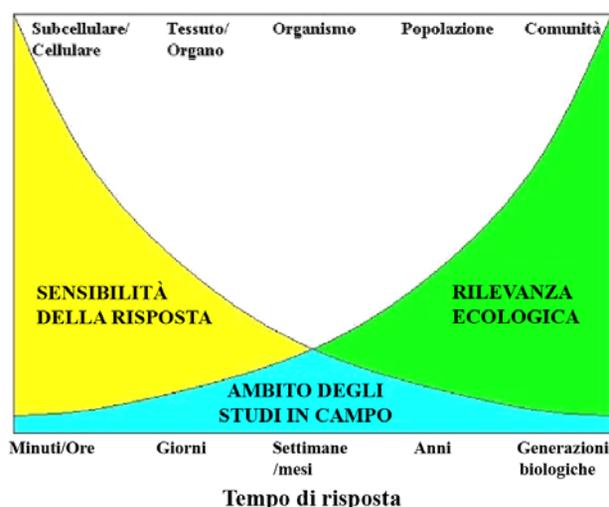


Fig. 4. Rilevanza ecologica e sensibilità della risposta in funzione del tempo di risposta e del livello di organizzazione biologica scelto (modificato da McCARTY e MUNKITTRICK, 1996).

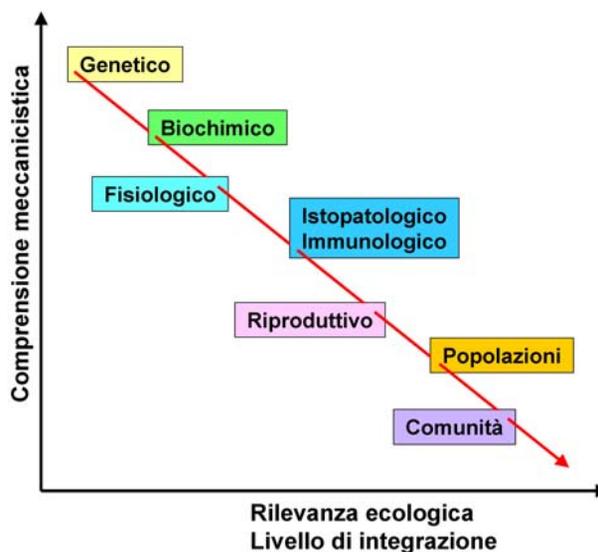


Fig. 5. Integrazione della rilevanza ecologica e comprensione del meccanismo d'azione in funzione del livello di organizzazione biologica scelto (modificato da McCARTY e MUNKITTRICK, 1996).

zo per rilevare cambiamenti, imputabili a fenomeni di contaminazione nell'ambiente naturale, permettendo in questo modo di valutare l'eventuale effetto e di quantificare le soglie di resistenza specifiche per un determinato sito. Essi esprimono, infatti, una risposta integrata di tutti gli stimoli che subiscono dall'ambiente in cui vivono; pertanto possono rilevare anche effetti sinergici od antagonisti di miscele di inquinanti. Da un punto di vista prettamente pratico, inoltre, l'uso dei bioindicatori comporta un costo notevolmente inferiore rispetto ai metodi tradizionali, basati sulla misurazione di parametri chimico-fisici. Tuttavia, il loro utilizzo presenta anche delle limitazioni tra cui il grado di specificità, il tipo di risposta che possono fornire e la reale applicabilità a condizioni naturali quali quelle di campo (SARTORI, 1998). Le variazioni dei parametri biochimici e fisiologici, ad esempio, risultano tanto meno specifiche quanto più coinvolgono processi fondamentali legati a funzioni fisiologiche importanti (omeostasi, respirazione, fotosintesi, ecc). Tali funzioni possono essere modificate da più di un fattore: possono infatti essere modificabili da stress esterni (quali la contaminazione da agenti inquinanti), ma anche da fattori interni (quali gli ormoni) (SARTORI, 1998).

Altri fattori da tenere in conto nell'interpretazione delle risposte sono la variabilità individuale e l'adattamento nel caso in cui si utilizzino degli individui già sottoposti, nell'ambiente naturale, ad una certa concentrazione di inquinante (ERNST e PETERSON, 1994). Questo adattamento può essere dovuto ad una recente esposizione degli organismi ad elevate concentrazioni di una sostanza già presente in natura a concentrazioni minori (nel caso ad esempio di metalli pesanti), oppure può essere il risultato di una risposta a sostanze introdotte dall'uomo solo recentemente (è il caso degli erbicidi), infine potrebbe essere imputabile ad un'esposizione prolungata. Un altro problema potrebbe insorgere nel caso in cui parametri ambientali, quali ad esempio temperatura, umidità ed altitudine, possano andare ad alterare la risposta di un bioindicatore mascherando l'eventuale presenza di un inquinante (STORK e EGGLETON, 1992).

Indipendentemente dal tipo di bioindicatore scelto, attivo o passivo, il suo utilizzo necessita della non semplice individuazione di una situazione di "controllo", vale a dire un ambiente presumibilmente sano e con caratteristiche molto simili a quelle dell'ambiente in degrado. Fino ad ora, infatti, i bioindicatori sono stati in grado di fornire solo misure relative; la risposta ottenuta necessita, quindi, di essere interpretata sulla base di un confronto.

Ciascun bioindicatore non è universalmente applicabile; pertanto, nella fase di progettazione di un biomonitoraggio, occorre selezionare i bioindicatori più adatti

alla luce del contesto in cui si opera, della scala spaziale e temporale, e, soprattutto, degli obiettivi dell'indagine. A questo scopo è necessario avere ben chiari fin dall'inizio i limiti di applicabilità di ogni bioindicatore. Inoltre, tali indicatori vengono sviluppati da scienziati specialisti e sono focalizzati su alcuni aspetti degli ecosistemi, ritenuti importanti per stimare la loro condizione. Le risposte però sono spesso di difficile lettura per i non esperti. Questo aspetto contrasta infatti con l'esigenza dei legislatori e dei gestori ambientali di avere a disposizione degli indicatori che siano comprensibili da parte del pubblico (SCHILLER *et al.*, 2001). Questa discrepanza è emersa soprattutto negli ultimi decenni ed è tuttora soggetta a discussione. In questo contesto NOSS (1990) e CAIRNS *et al.* (1993) hanno proposto delle classificazioni di alcuni bioindicatori secondo la rilevanza scientifica e politica e il livello di accettazione del pubblico.

ORGANISMI NEL BIOMONITORAGGIO

Come già precedentemente accennato, il suolo è non solo a contatto ma anche in stretta relazione con gli altri comparti ambientali, con i quali ha regolari scambi di sostanze e di energia, nonché di organismi viventi. All'attività chimica complessiva del suolo prende parte l'insieme degli organismi viventi che lo popolano: essa non è la pura somma delle loro singole azioni, ma deriva dall'interazione tra le forme viventi, a partire da quelle più semplici ed intimamente legate alla sua struttura (i microrganismi), sino alle forme più complesse (micro e macroinvertebrati, piante). Gli organismi comunemente utilizzati come bioindicatori appartengono ad un'ampia gamma di forme viventi: microrganismi (batteri, funghi ed alghe), microinvertebrati (nematodi, acari, collemboli, diplopodi, enchitreidi), macroinvertebrati (isopodi, lumbricidi, termiti, coleotteri, ditteri, formiche e molluschi) e piante.

A) Microrganismi

I microrganismi sono la componente biologica prevalente di tutti i suoli. Col termine microrganismi si indicano forme generalmente unicellulari che comprendono batteri, funghi, protozoi ed alghe.

I fattori naturali e quelli esogeni possono influenzare sia la presenza che l'attività dei microrganismi di un suolo. È proprio attraverso lo studio di taluni parametri, caratteristici delle comunità microbiche, e delle loro variazioni che si può da un lato descrivere la struttura della comunità in una data situazione ambientale e la risposta della stessa alle variazioni naturali dell'ambiente, dall'altro individuare le possibili ripercussioni di uno stress esogeno ed, eventualmente, giudicarne la gravità e la possibilità di recupero dell'ecosistema.

Nel caso del suolo due sono i possibili approcci utilizzati per il biomonitoraggio con comunità microbiche:

- sperimentazione in campo utilizzando parcelle di terreno naturale e trattato con inquinanti. Tale tecnica ha il vantaggio della massima aderenza alla realtà, ma lo svantaggio di essere realizzato in condizioni ambientali, seppur controllate, non stabili e prefissate;
- incubazione di quantitativi limitati di terreno, trattato e non, in laboratorio in appositi contenitori. Ciò ha l'evidente vantaggio della realizzazione in condizioni perfettamente programmabili e costanti; tuttavia la sua vicinanza alle condizioni reali dipende dal piano sperimentale.

BATTERI e FUNGHI

I batteri eterotrofi sono organismi unicellulari che ottengono il nutrimento da materia organica viva o morta. Essi sono in grado di ottenere energia anche mediante l'ossidazione di differenti sostanze, quali composti contenenti azoto, ferro e zolfo. Anche i funghi svolgono un ruolo chiave nel riciclo degli elementi a partire da sostanza organica morta. Nel suolo essi possono essere in associazione con batteri ed altri organismi, animali (protozoi, nematodi e insetti) e vegetali (micorrize).

La risposta della comunità microbica (batterica e fungina) agli stress può essere valutata e misurata con una serie di tecniche sia quantitative sia qualitative (FERRARI *et al.*, 1998). Nel primo caso si determina il valore di alcuni parametri che esprimono diversi aspetti della comunità microbica, riguardanti la presenza e l'attività microbica. Più in particolare i parametri più comunemente utilizzati sono:

- carica microbica (numero di cellule batteriche/funghine in 1 g di suolo secco), rilevabile mediante conte dirette al microscopio oppure mediante la crescita in terreni di coltura inoculati con quantità scalari di suolo;
- biomassa, misurata mediante la determinazione del carbonio o dell'azoto microbico. Nel primo caso si misura il carbonio microbico sulla base della differenza tra il carbonio estratto con K_2SO_4 (0,5 M) dal suolo esposto a fumigazione con cloroformio e il carbonio estratto dal suolo non trattato (VAN CE *et al.*, 1987). Per quanto riguarda la determinazione dell'azoto microbico si procede ad un'estrazione e filtrazione con KCl, quindi si fa reagire l'estratto con ninidrina e si determina la concentrazione del complesso formatosi allo spettrofotometro (ÖHLINGER, 1996);
- mineralizzazione dell'azoto, che esprime il rilascio di azoto inorganico (NO_3^- e di NH_4^+) da parte della sostanza organica. La misura è la somma di NH_4^+ ,

- NO_2 e NO_3^- estratti con KCl 2,0 M, il primo direttamente e gli altri due dopo riduzione a NH_4^+ con cloruro di titanio (KEENEY e NELSON, 1982);
- tasso di decomposizione della sostanza organica. Ad esempio, può essere misurato il tasso di decomposizione della cellulosa (PANKURST *et al.*, 1995);
- respirazione basale microbica (BR). Un possibile metodo di determinazione prevede l'incubazione per 4 ore in contenitori chiusi a 22°C di un sottocampione di suolo, portato al 90% della sua capacità di campo. Nell'intervallo tra 1 e 4 ore viene prelevato un piccolo volume di aria dal contenitore e, con un analizzatore di gas a raggi infrarossi, viene determinata la CO_2 prodotta (WARDLE e YEATES, 1993; WILLIAMSON *et al.*, 2005);
- attività deidrogenasica (DHA). Il metodo descritto da ZHU (1996) consiste nella determinazione colorimetrica mediante spettrofotometro ($\lambda=492$ nm) del 2,3,5-triphenyl formazan (TF) prodotto dalla riduzione del cloruro 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC).

Tutti questi metodi, tuttavia, hanno diverse limitazioni tra cui il fatto che sono poco sensibili a minimi cambiamenti nella comunità microbica. Inoltre, non bisogna dimenticare che solo una piccola porzione dei microrganismi può essere isolata dal suolo (VAN BRUGGEN e SEMENOV, 2000). Tutte le tecniche sopraccitate non considerano alcuni importanti gruppi microbici, quali gli oligotrofi (HU e VAN BRUGGEN, 1998). Tali metodiche non riescono pertanto ad evidenziare il passaggio da condizioni eutrofiche ad oligotrofiche, caratteristica fondamentale per valutare la salute di un suolo. VAN BRUGGEN e SEMENOV (2000) suggeriscono di utilizzare, al fine di valutare l'effetto di uno stress esogeno, le successioni batteriche e più in particolare di determinare il rapporto di CFU (unità formanti colonie) rispetto al numero totale di batteri contati al microscopio, il rapporto di CFU copiotrofiche rispetto a quelle oligotrofiche, oppure il rapporto tra respirazione e biomassa batterica. Tali rapporti in presenza di una qualsiasi situazione inquinante aumentano di valore rispetto ad una situazione controllo.

Queste metodiche sono, tuttavia, di più difficile applicazione alle successioni fungine, in quanto le CFU, ottenute per diluizione da piastre, danno un'indicazione della sporulazione piuttosto che dell'avvenuta crescita fungina. Inoltre, molti funghi presentano caratteristiche sia oligo che copiotrofiche. Nel caso dei funghi risulta quindi più semplice utilizzare le più classiche tecniche di valutazione quantitativa.

Riguardo alle tecniche qualitative si opera studiando la variazione della comunità mediante:

- identificazione delle specie batteriche/funghine presenti sia operando con il classico metodo di alleva-

mento in un mezzo colturale (HOLT *et al.*, 1994) oppure con metodiche avanzate che prevedono, ad esempio, l'utilizzo di sonde di acidi nucleici (VAN DER GUCHT *et al.*, 2001) ed il sequenziamento del gene 16S rRNA;

- metodo degli acidi grassi fosfolipidici (PLFA), descritto da BARDGETT *et al.* (1996). Lo scopo è quello di estrarre gli PLFA dagli organismi della comunità e di quantificarli distinguendo quelli di derivazione batterica da quelli di derivazione fungina sulla base di informazioni presenti in banca-dati. Esistono, infatti, delle categorie di PLFA che sono proprie per ciascuno dei due gruppi di organismi. Per entrambi i PLFA sono espressi in nmoli/g di suolo secco. Attraverso questa determinazione è poi possibile fare un rapporto tra popolazione batterica e fungina;
- profili di utilizzazione del substrato (SUPs), metodo descritto da DEGENS (1998) e in seguito modificato da WARDLE *et al.* (2003). A sottocampioni dei suoli da esaminare, tenuti ad una precisa umidità, vengono aggiunti diversi substrati, come L-asparagina, L-cisteina, acido-L-glutammico, DL-istidina, L-serina, L-glutammina, N-metilglucammina, acido citrico, acido malonico, acido urocanico, acido α -chetoglutamico, acido α -chetobutirrico, in modo da apportare la stessa quantità di C per g di suolo secco. Dopo un periodo di incubazione di 1 e 4 ore si misura la concentrazione di CO₂. Il parametro valuta la composizione microbica sulla base della diversa capacità catabolica mostrata nell'utilizzazione dei substrati.

Tali tecniche tuttavia presentano degli svantaggi, legati principalmente all'efficienza di estrazione sia dei fosfolipidi sia del DNA, dipendenti dal tipo di suolo e dalla comunità microbica (ZHOU *et al.*, 1996).

PROTOZOI

I protozoi rappresentano una tra le maggiori componenti degli ecosistemi di acque dolci e salate e di suoli. Sono organismi unicellulari, prevalentemente batteriofagi, ma esistono alcuni esempi di protozoi fungivori e predatori. All'interno dell'ecosistema hanno un ruolo fondamentale nel riciclo dei nutrienti a vantaggio di altri microrganismi, di piante e di animali. Si è stimato infatti che i protozoi sono i responsabili di circa il 70% della respirazione animale, del 14-66% della mineralizzazione del carbonio e del 20-40% della mineralizzazione dell'azoto (FOISSNER, 1987; EKELUND e RØNN, 1994; GRIFFITHS, 1994). Essi inoltre svolgono un ruolo chiave nella nutrizione dei lombrichi (BONKOWSKI e SCHAEFER, 1996). I protozoi sono stati più volte utilizzati come bioindicatori delle acque (CURDS, 1992; FOISSNER *et al.*, 1994), ma più raramente per saggiare la salute del suolo, sebbene siano presenti in

letteratura numerosi lavori che li indicano come buoni indicatori ambientali (FOISSNER, 1987, 1994, 1997).

I parametri che vengono presi in considerazione per valutare la qualità/salute del suolo sono: il numero di individui, la biomassa, il numero di generazioni, la percentuale di mortalità e la suddivisione in gruppi trofici. Due sono le possibili tecniche che permettono di valutare tali parametri:

- diluizione della coltura, per cui viene considerata solo una parte del campione e vengono fatte delle stime indirette sul campione in toto (SINGH, 1946);
- conta diretta, ossia i protozoi vengono direttamente contati nel campione (LÜFTENEGGER *et al.*, 1988).

Il primo metodo risulta tuttavia poco preciso, in quanto è stato più volte dimostrato che le diluizioni e la successiva valutazione sull'intero campione sono soggetti ad una serie di errori tecnici, senza contare che i protozoi mobili e le cisti non vengono opportunamente diluite (BERTHOLD e PALZENBERGER, 1995; FOISSNER, 1999). La conta diretta del campione al contrario è utile soprattutto nel caso in cui i protozoi siano attivi ed in movimento; tuttavia non può essere applicata alle amebe nude e ai flagellati, che sono di piccole dimensioni e aderiscono alle particelle di terreno, risultando visibili solo agli occhi più esperti (FOISSNER, 1999).

Da tutto quanto detto risulta chiaro che, allo stato attuale, solamente i ciliati e le amebe tectate sono utilizzate nel biomonitoraggio per valutare la mancanza di ossigeno (FOISSNER *et al.*, 1992), per differenziare il tipo di humus (SCHÖNBORN, 1973) o per evidenziare la presenza di pesticidi (PETZ e FOISSNER, 1989).

ALGHE

Le alghe costituiscono circa il 27% della biomassa microbica (McCANN e CULLIMORE, 1979) con un'abbondanza stimata tra i 150-500 kg per ettaro di terreno (SHTINA, 1974). In generale le alghe sono coinvolte nel mantenimento della fertilità del suolo, nella produzione di ossigeno (BOLD e WYNNE, 1978), nell'incorporazione di carbonio organico e nella fissazione dell'azoto atmosferico (ad opera dei cianobatteri). Esse inoltre hanno un'influenza sulla struttura del suolo stesso e sull'attività biologica (METTING, 1981; THIND e ROWELL, 1999). Le alghe (specialmente le diatomee) sono comunemente utilizzate nel biomonitoraggio delle acque, ma fino ad oggi sono ancora poche le applicazioni in ambito terrestre (MEGHARAJ *et al.*, 1998, 2000a, 2000b).

Per valutare la salute/qualità di un suolo utilizzando le alghe, i parametri comunemente utilizzati riguardano:

- l'abbondanza algale; il numero di alghe viene valutato con il metodo del *most probable number* (MPN) (FISCHER, 1922);

- la composizione della comunità algale (MEGHARAJ *et al.*, 1998);
- la crescita algale (MEGHARAJ *et al.*, 1991);
- la misurazione di attività fisiologiche, quali la fotosintesi, la respirazione (VALCUVIA PASSADORE *et al.*, 1998);
- l'attività di particolari enzimi, quali deidrogenasi, ureasi e nitrato reductasi (TREVORS, 1984; MEGHARAJ *et al.*, 2000a).

B) Invertebrati

Nel suolo gli invertebrati possono essere distinti in tre categorie dimensionali (ANDERSON, 1988):

- *microinvertebrati* le cui dimensioni sono inferiori al millimetro. A questa categoria appartengono organismi quali nematodi, rotiferi, tardigradi. I nematodi (Fig. 6D), ad esempio, vivono associati al film d'acqua che riveste le particelle di suolo. Tali organismi hanno un ruolo chiave nella decomposizione della sostanza organica e possono influire sulla crescita batterica (PRADHAN *et al.*, 1988; YEATES e COLEMAN, 1982; FRECKMAN, 1988);
- *mesoinvertebrati* le cui dimensioni sono comprese tra 0,5 e 3 mm. Essi includono acari, collemboli,

anelleidi enchitreidi e diplopodi. I collemboli (Fig. 6B) ad esempio hanno un ruolo fondamentale nella decomposizione dei residui vegetali (KISS e JAGER, 1987; TAKEDA, 1988). Quelli di dimensioni superiori aumentano la mineralizzazione della sostanza organica nutrendosi di funghi, mentre le specie più piccole sono coinvolte nell'umificazione del suolo grazie alla loro opera di scavo e di rimescolamento della particelle minerali. Gli acari (Fig. 6C) nel suolo svolgono un ruolo chiave nella mineralizzazione dei nutrienti, nella frammentazione della lettiera, nella dispersione delle spore microbiche e nella stimolazione dell'attività della microflora (ARNOLD e POTTER, 1987);

- *macroinvertebrati* le cui dimensioni sono superiori ai 10 mm. I taxa più importanti sono isopodi, diplopodi, termiti, coleotteri, ditteri, formiche, molluschi e anellidi lumbricidi. Le formiche (Fig. 6A) ad esempio svolgono un ruolo ecologico essenziale nella catena alimentare, operando un'instancabile azione di triturazione, trasporto e quindi "rimescolamento" della sostanza organica depositatasi sul suolo: sono cioè organismi detritivori, che favoriscono l'azione successiva dei decompositori. I lombrichi (Fig. 6E),

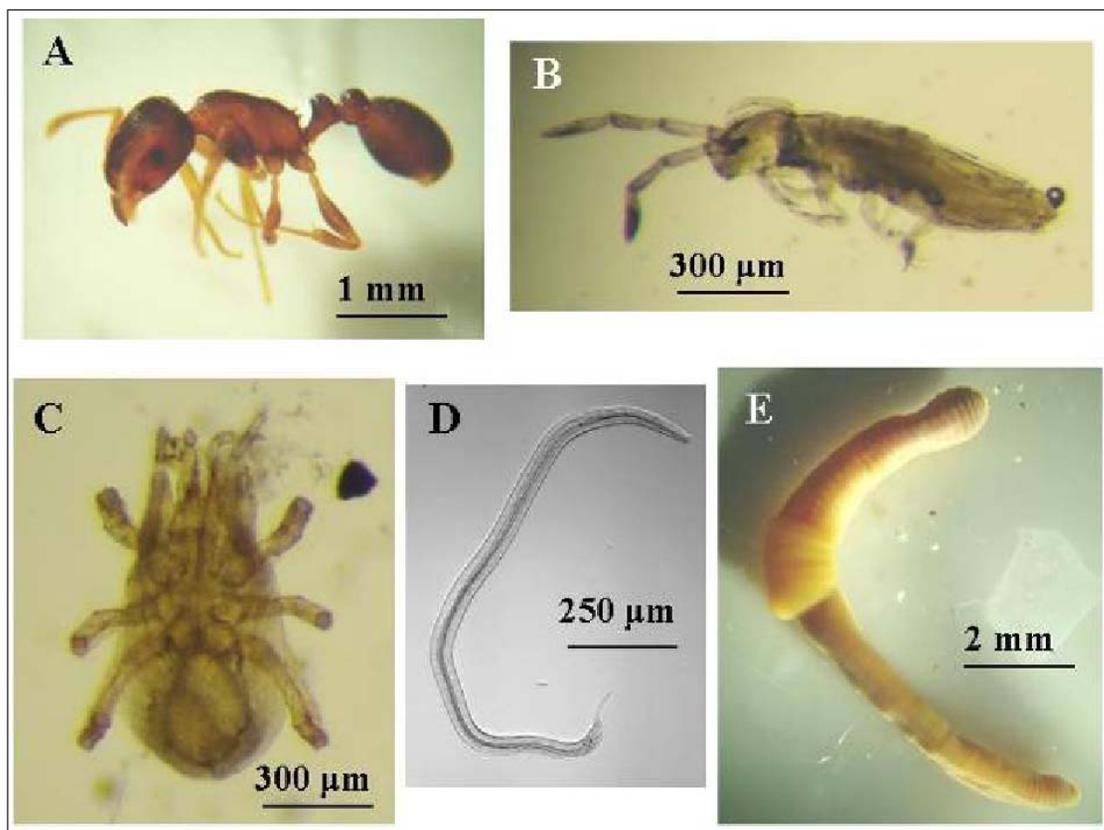


Fig. 6. Alcuni esempi di invertebrati: A) formica; B) collembolo; C) acaro; D) nematode; E) lombrico (immagini originali).

invece, grazie alla loro capacità di scavo riescono a muovere le particelle di terreno consentendo una maggiore aerazione dello stesso e una maggiore capacità assorbente. La loro presenza è inoltre fondamentale per il riciclo dei nutrienti quali il fosforo e l'azoto (SVENSSON *et al.*, 1986).

Il biomonitoraggio applicato sugli invertebrati può essere distinto in due tipologie a seconda che si utilizzi una singola specie o una comunità.

Singola specie

Nella prima categoria di bioindicatori rientrano tutte quelle analisi, sia di laboratorio sia di campo, applicate su organismi appartenenti alla stessa specie. Le specie impiegate nei test ecotossicologici devono rispettare alcuni requisiti, tra i quali: dar luogo a popolazioni numerose e dominanti, essere mantenuti e testati in condizioni sia naturali sia di laboratorio, e richiedere metodi efficienti e poco laboriosi di estrazione dal suolo e di analisi delle popolazioni (EDWARDS *et al.*, 1995).

I test di laboratorio hanno lo scopo di prevedere gli effetti prodotti sugli organismi dall'eventuale dispersione di un determinato xenobiotico, di definirne i livelli critici di esposizione e, infine, di stimare il rischio ambientale. L'utilizzo di test di laboratorio su singola specie è stato tuttavia più volte criticato a causa della poca applicabilità ad una situazione reale (VAN VORIS *et al.*, 1985). Nelle condizioni di campo, ad esempio, un contaminante può esercitare un'azione diretta causando effetti tossici sugli organismi, oppure indiretta alterando le interazioni tra le specie, distruggendo le catene trofiche ed interferendo in ultimo con i processi del suolo, quali ad esempio i flussi e i cicli del carbonio e dei nutrienti (PARMELEE *et al.*, 1993; EDWARDS and BOHLEN, 1992). Inoltre un contaminante introdotto nell'ambiente può essere meno biodisponibile rispetto alle condizioni di laboratorio (SMIT e VAN GESTEL, 1996) e può essere degradato o trasformato in altre forme più o meno attive rispetto a quella di partenza (SINCLAIR e BOXALL, 2003). Tutti questi aspetti non vengono considerati quando si osservano le risposte di una specie test in esperimenti di laboratorio, poiché essa non è inserita in un ecosistema. Queste sono le ragioni per cui alcuni gruppi di ricerca hanno sviluppato test ecotossicologici su microcosmi ricostruiti in laboratorio, piuttosto che su specie singole (BOGOMOLOV *et al.*, 1996). Questi test hanno anche il vantaggio di combinare le risposte di organismi appartenenti a diversi livelli trofici con la misura dei processi dell'ecosistema (EDWARDS *et al.*, 1994).

Per superare il problema della variazione nella biodisponibilità di un contaminante e per stabilire le soglie di

tossicità di una sostanza, alcuni ricercatori hanno proposto il concetto di *letal body concentration* (LBC), ossia quella concentrazione interna letale per l'organismo, in sostituzione della comune LC_{50} , ossia quella concentrazione ambientale letale per la metà della popolazione (VAN STRAALLEN, 1998).

Nei test su singola specie ulteriori problemi sorgono quando gli organismi usati non sono comunemente presenti nel suolo. Questo è il caso dell'anellide *Eisenia fetida*, la cui distribuzione in natura è ristretta ai cumuli di concime e di compost (BOGOMOLOV *et al.*, 1996).

Nonostante tutti questi limiti, i test su singola specie hanno dei vantaggi, come quello di minimizzare la variabilità nelle risposte dovuta alle differenze tra gli individui, di essere riproducibili, di operare in condizioni controllate e di non avere costi esorbitanti (EDWARDS 1989, 1992).

I test di laboratorio su singola specie vengono più frequentemente utilizzati per valutare la qualità delle acque, oppure per testare sostanze chimiche note da tempo o di neosintesi, al fine di stimare il loro rischio ambientale. Nel contesto della valutazione dello stato di un suolo si opera generalmente in due modi: esponendo gli organismi ad una soluzione ottenuta dal lavaggio del suolo con acqua distillata, come nel caso del test con il nematode *Panagrellus redivivus* (SAMOILOFF, 1987), oppure trasferendoli direttamente nel terreno prelevato dal sito indagato, come per il test con *Eisenia fetida* (OECD, 1984) (Fig. 7).

Con questi test viene valutata sia la tossicità acuta, stimando la letalità, sia quella cronica, osservando le variazioni di biomassa, le alterazioni nello sviluppo e/o nella fecondità. In questa seconda tipologia di indagini possono essere presi in esame anche alcuni biomarker. Si tratta in genere di misure che si riferiscono all'espressione di proteine inducibili (quali le *heat shock protein*, le esterasi, le metallotioneine e altre proteine che si legano ai metalli), alla manifestazione di alterazioni istologiche o ultrastrutturali oppure all'inattivazione del sistema lisosomiale (KAMMENG *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda le indagini in campo si possono sia utilizzare i biomarker visti precedentemente sia effettuare misure di bioaccumulazione di inquinanti, quali ad esempio i metalli pesanti, e di biomassa (VAN DECASTEELE *et al.*, 2004).

L'uso di un'unica specie come strumento di monitoraggio in campo potrebbe essere ragionevole, qualora si conoscesse la specificità nella risposta, tuttavia risente dell'inevitabile fluttuazione della densità di popolazione (BEHAN-PELLETIER, 1999). Per superare questo limite, l'abbondanza della specie può essere messa in rapporto a quella della comunità cui appartiene (HOGERVORST *et al.*, 1993). Una singola specie, inoltre,

può essere legata ad un particolare ambiente, quindi potrebbe essere necessario scegliere specie diverse al variare del contesto (PAOLETTI, 1999b).

Tipicamente il concetto di specie indicatrice è impiegato per la macroflora (piante vascolari) e la macrofauna, ed è stato meno utilizzato per biomonitoraggio sul suolo (VAN STRAALLEN, 1998; NIEMI e McDONALD, 2004).

Comunità

Un livello più articolato di indagine è quello che si riferisce alla comunità. In genere, in questo tipo di studi non si contemplano tutti gli organismi che vivono nel suolo della specifica area da monitorare, ma solo una parte di essi, come ad esempio i microartropodi, i nematodi o gli oligocheti. Gli artropodi, a loro volta, possono essere considerati nel loro complesso, oppure in singoli gruppi tassonomici. Quelli più comunemente studiati sono gli Acari, i Collemboli, i Coleotteri, gli Isopodi e le formiche.

Nello studio di comunità si può procedere con approcci diversi tra loro, alcuni dei quali sono intimamente legati:

1. stima della densità;
2. identificazione dei taxa che compongono la comunità;
3. applicazione di indici ecologici;
4. suddivisione in gruppi funzionali;
5. applicazione di analisi multivariate.

1. Stima della densità

Questo parametro da solo è poco significativo, poiché il numero di individui può variare considerevolmente nello spazio e nel tempo. Questa stima serve a definire le frequenze relative dei generi e/o delle specie, oltre a quelle di raggruppamenti fondati su abitudini alimentari, piuttosto che su altre caratteristiche funzionali.

2. Identificazione dei taxa che compongono la comunità

Il livello tassonomico raggiunto nell'identificazione dipende dai bioindicatori scelti. In genere, se si studiano gli artropodi, si definiscono al massimo gli ordini. Se si considerano taxa con una minore diversità, come quello dei Nematodi o dei Collemboli, si arriva alla specie o al genere. Questo lavoro richiede una vasta esperienza e conoscenza del gruppo di animali presi in esame, inoltre richiede spesso anche una grande disponibilità di tempo.

I taxa identificati possono essere riportati in una lista (DIEHL *et al.*, 2004), oppure possono essere indicate le relative frequenze. Quest'ultima tipologia è quella più usata, poiché la prima consente solo degli studi qualitativi riferiti alla presenza/assenza di specie chiave.



Fig. 7. Esempari di *Panagrellus redivivus* e *Eisenia fetida* (immagini originali).

In quanto alla possibilità di impiegare la biodiversità di un ecosistema, intesa come ricchezza specifica, come strumento di valutazione del livello di funzionamento di un ecosistema, esiste un dibattito che al momento non sembra trovare una conclusione (BORVALL, 2006). Questa valutazione viene complicata anche dal fatto che le specie all'interno della comunità non hanno tutte lo stesso ruolo: alcune sono connesse, più o meno direttamente, con importanti processi dell'ecosistema; nel momento in cui vengono a mancare si deduce che è avvenuto un cambiamento significativo (JONES e BRADFORD, 2001; GRIFFITHS, 1997).

3. Applicazione di indici ecologici

In letteratura esistono molti indici che hanno una lunga storia di impiego; i più noti sono gli indici di

ricchezza di MARGALEF (1958), di dominanza di SIMPSON (1949), di diversità di SHANNON-WIENER (1949) e quello di equiripartizione o *evenness* di PIELOU (1966). Tali indici vengono calcolati sulla base della struttura tassonomica della comunità; ognuno però sottolinea particolari aspetti. Il primo mette in relazione il numero di taxa con il numero totale di individui. L'indice di dominanza misura la prevalenza di pochi taxa; quello di diversità, al contrario, assume valori tanto più alti quanto più numerosi sono i taxa e quanto più abbondanti sono quelli rari. Infine, l'ultimo indice esprime il livello di equidistribuzione degli individui tra i taxa.

Gli indici ecologici hanno il vantaggio di produrre un unico numero che descriva la comunità e sulla base del quale possano essere effettuati dei confronti tra siti diversi senza riferirsi agli specifici taxa presenti. In queste analisi però occorre essere consapevoli che diversi ambienti, anche incontaminati, possono supportare comunità diverse tra loro. Ciò può dipendere dalla modalità di distribuzione delle risorse, dalla presenza di microhabitat e dal manifestarsi o meno dei fenomeni di competizione (ETTEMA e WARDLE, 2002). Se da una parte è vero che una comunità poco diversificata è indice dell'azione di qualche stress, dall'altra è noto anche che in un ecosistema stabile raramente si raggiunge la massima diversità (MARGALEF, 1963).

Gli indici appena descritti non distinguono le specie esotiche da quelle native; al loro posto per confrontare le comunità possono essere impiegati indici di similarità, come quello di JACCARD (1908) e di SØRENSEN (1948).

Esistono poi altri indici applicabili solo ai microartropodi, come il rapporto tra il numero di Acari e quello dei Collemboli (BACHELIER, 1986) e l'indice di Qualità Biologica dei Suoli (QBS - PARISI, 2001). Di quest'ultimo esistono due versioni: quella relativa a tutti i

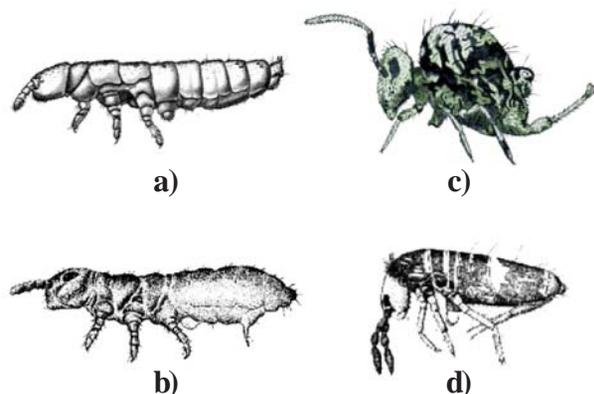


Fig. 8. Esempio di forme biologiche nei collemboli: a) eudafica, di specie che vivono tra le particelle di suolo; b) emiedafica, di specie che vivono negli strati profondi della lettiera; c) e d) epiedafica, di specie che vivono più superficialmente.

microartropodi e quella specifica per i collemboli. Entrambi si riferiscono solo alle forme biologiche (Fig. 8), ossia a raggruppamenti ecomorfologicamente omogenei, presenti nella comunità. Nel calcolo dell'indice si parte dall'individuazione dei gruppi tassonomici presenti e, successivamente, si definisce, attraverso l'osservazione dei caratteri morfologici, il livello di adattamento alla vita nel suolo, quindi la forma biologica, espresso in ciascuno di essi. A ciascuna delle forme è attribuito un punteggio (EMI) variabile tra 1 e 20 (Tab. I). I valori più bassi sono tipici delle forme epiedafiche, che vivono in superficie, quindi con un minore adattamento, e quelli più alti di quelle euedafiche, che vivono in profondità, quindi con un maggiore adattamento. Infine, valori intermedi sono attribuiti alle forme emiedafiche, parzialmente adattate alla vita tra le particelle di suolo. Il valore finale dell'indice è la somma degli EMI attribuiti a ciascun gruppo tassonomico individuato nella comunità. Se per un taxon sono presenti più forme biologiche, il punteggio considerato è quello più alto.

4. Suddivisione in gruppi funzionali

Sulla base del ruolo svolto all'interno della comunità è possibile suddividere gli organismi in gruppi funzionali, ossia con relazioni ecologiche simili.

Nella definizione di gruppo funzionale si può far riferimento a caratteristiche morfologiche, fisiologiche, comportamentali, oppure alle risposte ambientali o al tipo di alimentazione (DAVIC, 2003).

La suddivisione in gruppi funzionali viene applicata

Tab. I. Indici ecomorfologici (EMI) per diversi taxa di artropodi (da PARISI, 2001).

Insetti: Gruppo	EMI	Altri microartropodi: Gruppo	EMI
Proturi	20	Pseudoscorpioni	20
Dipluri	20	Palpigradi	20
Collemboli	1-20	Opilioni	10
Microcoryphia	10	Araneidi	1-5
Zygentomata	10	Acari	20
Dermatteri	1	Isopodi	10
Ortotteri	1-20	Diplopodi	10-20
Embiotteri	10	Pauropodi	20
Blattari	5	Sinfili	20
Psocotteri	1	Chilopodi	10-20
Emitteri	1-10		
Tisanotteri	1		
Coleotteri	1-20		
Imenotteri	1-5		
Ditteri (larve)	10		
Altri olometaboli (larve)	10		
(adulti)	1		

più frequentemente alle comunità dei lombrichi, dei nematodi, degli Acari Oribatidi e Gamasina, ed infine delle formiche.

Nel caso dei lombrichi sono state definite cinque categorie (Tab. II) basate sull'abilità nello scavare gallerie, sulle preferenze alimentari, sul colore del corpo, sulla forma e sulla dimensione (PAOLETTI, 1999a; LEE, 1985). Nelle indagini ambientali sono presi in considerazione solo le prime tre. Le specie appartenenti a ciascuna di esse si distinguono inoltre per una diversa capacità riproduttiva; questa aumenta andando dalle specie endogee a quelle epigee. Pertanto le endogee sono le prime specie a scomparire in ambienti disturbati (PAOLETTI, 1999a).

Per quanto riguarda i nematodi essi possono essere suddivisi tenendo conto delle loro abitudini alimentari (YEATES *et al.*, 1993) e delle loro strategie di vita (BONGERS, 1990). Nel primo caso si considerano otto gruppi trofici, di cui cinque (batteriofagi, micofagi, fitofagi, onnivori e predatori) sono frequenti nei suoli. La struttura trofica della comunità può fornire utili indicazioni sulla presenza di un disturbo (WASILEWSKA, 1997). Il secondo tipo di suddivisione si riferisce a caratteristiche legate prevalentemente al ciclo vitale, come il tasso riproduttivo, la durata di vita, le dimensioni e la capacità di colonizzazione. Sono stati distinti cinque gruppi, chiamati *classi c-p*, ordinati secondo una scala che va dai colonizzatori (o *colonizer*) agli specialisti (o *persister*), passando attraverso quelli di caratteristiche intermedie. Un'altra tipologia di analisi consiste nella combinazione delle informazioni derivanti dalle suddivisioni precedenti che porta alla definizione di gilde (BONGERS e BONGERS, 1998).

A partire dalla composizione in classi c-p e da quella in gilde sono stati formulati diversi indici: il Maturity Index, comunemente applicato in tre diverse forme a seconda che si considerino tutti i nematodi della comunità (Σ MI - YEATES, 1994) o solo quelli a vita libera (MI - BONGERS, 1990; 1999) o, tra questi ultimi, quelli non dipendenti dall'eutrofizzazione (MI2-5 - BONGERS

e KORTHALS, 1994), lo Structure Index (SI) e l'Enrichment Index (EI) (FERRIS *et al.*, 2001). Il MI era stato originariamente formulato per valutare lo stato di una comunità in riferimento alle successioni ecologiche, quindi il recupero da un disturbo (trattamento con nematocida, trattamenti chimici e termici contro i fitoparassiti, elevato input di sostanza organica) (BONGERS, 1990). Successivamente ha trovato impiego in qualsiasi altra valutazione dello stato del suolo (NEHER, 2001).

Una suddivisione in classi basata sulla strategia di vita, condotta sullo stesso principio di quella dei nematodi, è stata applicata agli Acari dell'ordine Gamasina (RUF, 1998). A partire dalla struttura della comunità secondo le classi individuate può essere poi calcolato anche in questo caso un Maturity Index. Per gli Acari Oribatida è comunemente accettata una suddivisione su base trofica, poiché questo gruppo di animali presenta un'ampia gamma di preferenze alimentari (BEHAN-PELLETIER, 1999). I gruppi definiti sono i seguenti:

- *Macrofitofagi*, che si nutrono di piante superiori e che possono essere suddivisi a loro volta in:
 - xilofagi: si cibano di legno
 - fillofagi: si cibano di tessuto non vascolare
- *Microfitofagi*, che si nutrono di microflora e che possono essere suddivisi a loro volta in:
 - micofagi: si cibano di funghi
 - fitofagi: si cibano di funghi
 - batteriofagi
- *Panfitofagi*, che si cibano sia di piante superiori che di microflora.

L'ultimo esempio di suddivisione in gruppi funzionali può essere quello riguardante le formiche (ANDERSEN, 1995), ampiamente utilizzate in Australia come bioindicatori. I raggruppamenti sono sette e sono stati ideati sulla base delle risposte delle specie allo stress, inteso come qualsiasi fattore che limita la produttività (GRIME *et al.*, 1997), e al disturbo, inteso come qualsiasi fattore che riduce la biomassa (GRIME *et al.*,

Tab. II. Classificazione ecologica dei lombrichi (basato su PAOLETTI, 1999a).

Categoria	Capacità di scavo	Tipo di scavo	Comportamento	Alimento	Dimensione
Epigei	poca o nulla	-	vivono in superficie	lettiera	Ø da 1 a 2,5 mm
Anecici	molto buona	scavi verticali e semi-permanenti	vivono in profondità, ma di notte salgono in superficie	lettiera	Ø da 4 a 8 mm
Endogei	molto buona	scavi profondi sub-orizzontali, ramificati e temporanei	vivono in profondità	particelle minerali e humus	Ø da 2 a 4,5 mm
Coprofagi	-	-	vivono solo nel concime	sostanza organica fresca	
Arboricoli	-	-	vivono in suoli sospesi nelle foreste tropicali	sostanza organica fresca	

1997). All'interno della comunità i vari gruppi sono in rapporto tra loro secondo delle gerarchie di dominanza. Le specie dominanti sono quelle che hanno le popolazioni più numerose nelle condizioni di elevata produttività del sistema, condizioni che si riferiscono prevalentemente alle piante. Gli altri gruppi racchiudono o specie tipiche di precise condizioni climatiche, oppure specie altamente competitive, ma non in grado di raggiungere densità di popolazione elevate, oppure specie opportuniste, che predominano solo quando c'è un elevato stress o disturbo. Alcuni gruppi funzionali esprimono delle risposte allo stress e al disturbo ambientale parallele a quelle delle piante (ANDERSEN, 1995; MAJER *et al.*, 2004):

- Dolichoderinae dominanti, sono paragonabili alle piante ad alto fusto, sono altamente competitive e predominano in ambienti con bassi livelli di stress e disturbo;
- Myrmicinae generaliste, paragonabili ai cespugli, sono subdominanti, hanno una minore biomassa e una minore competitività rispetto alle precedenti e si trovano in un ampio spettro di ambienti;
- Opportunisti, paragonabili all'erba, sono tipici degli stadi primitivi nella successione ecologica e sono abbondanti in ambienti soggetti ad un elevato livello di stress o disturbo.

Sulla base delle abbondanze relative di questi tre gruppi è possibile classificare la comunità nello stesso modo in cui può essere fatta una classificazione della vegetazione sulla base dell'importanza relativa degli alberi, dei cespugli e dell'erba. Usando questo approccio, i tipi strutturali della comunità possono essere inseriti in un grafico (C-R-S habitat templet) secondo l'importanza relativa dello stress, del disturbo o della competizione (Fig. 9) (MAJER *et al.*, 2004). In funzione del posizionamento all'interno del grafico si può dedurre l'intensità dei rispettivi fattori.

5. Applicazione di analisi multivariate

Queste analisi possono essere suddivise in tre categorie:

- Classificazioni che hanno lo scopo di raggruppare i siti campionati secondo la somiglianza, definita o soltanto sulla presenza/assenza dei taxa della comunità o anche sulla loro abbondanza o frequenza. Tramite quest'analisi si possono ottenere informazioni anche sui taxa che caratterizzano ciascun raggruppamento o *cluster*. Esistono metodi non gerarchici, per mezzo dei quali si ottiene solo un certo numero di cluster descritti da un elenco di siti o di specie che li caratterizzano, e metodi gerarchici, che danno come risultato un dendrogramma che esprime le relazioni di somiglianza;
- Ordinazioni che hanno lo scopo di trasporre un'in-

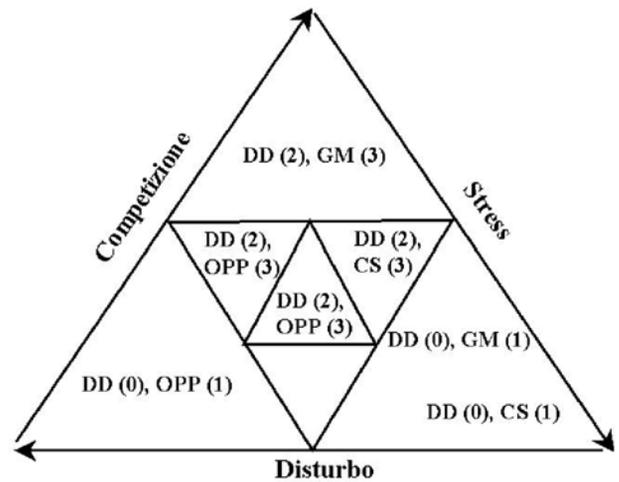


Fig. 9. C-R-S habitat templet che riporta i prevalenti tipi strutturali delle comunità di formiche individuati in Australia. I codici dei gruppi funzionali sono: DD = Dolichoderinae dominanti; GM= Myrmicinae generaliste; OPP=Opportunisti; CS=Specialisti di particolari climi. I numeri in parentesi indicano la classe di abbondanza: 0=<10%; 1=11-20%; 2=21-30%; 3>30%.

formazione multidimensionale (il numero di dimensioni corrisponde al numero di parametri usati per descrivere la comunità) in un grafico bi o tridimensionale. Nei grafici generati sono rappresentati dei punti, ciascuno relativo ad una comunità, dispersi a seconda delle loro reciproche relazioni. Gli assi del grafico sono quelli che nello spazio multidimensionale rappresentano la maggior parte della variabilità delle comunità. La dispersione può essere poi correlata in modo indiretto alle variabili ambientali a disposizione. Esistono molte analisi che hanno differenti algoritmi di base; le più comuni sono la *Principal Component Analysis* (PCA), la *Canonical Correspondence Analysis* (CCA), la *Multidimensional Scaling* (MDS) e la *Discriminant Analysis* (DA);

- Regressioni che sono analisi di gradiente diretto, attraverso le quali si cercano delle relazioni matematiche tra le risposte di una singola specie e più fattori ambientali. Un esempio è il *General Linear Model* (GLM).

VAN STRAALLEN (1997) revisionò i metodi di analisi delle comunità degli artropodi presenti in letteratura e valutò i vari sistemi usando i due criteri di specificità e di risoluzione, le cui definizioni sono riportate in tabella III. Nella pubblicazione del 1998 dello stesso autore è riportata una classificazione dei metodi di analisi secondo questi due criteri.

Queste considerazioni, fatte esclusivamente sulle comunità di artropodi, potrebbero essere estese a tutti gli invertebrati, sui quali peraltro vengono applicati gli

Tab. III. Criteri per valutare e caratterizzare i bioindicatori (modificato da VAN STRAALEN, 1997).

Criteriono	Tipo di risposta	Terminologia
<i>Specificità</i>		
Bassa	Risposta a molti stress	Indicatori di stress generico
Alta	Risposta ad un singolo fattore	Indicatori specifici
<i>Risoluzione</i>		
Bassa	Reagiscono ad ampi cambiamenti	Indicatori di effetto serio
Alta	Reagiscono a piccole deviazioni	Indicatori sensibili

stessi metodi di analisi. VAN STRAALEN (1998) conclude che l'approccio di analisi ottimale sarebbe quello che combina le analisi multivariate, altamente risolutive, con la classificazione ecofisiologica, altamente specifica (Tab. IV). Riguardo quest'ultimo tipo di classificazione però non esistono ancora esempi riguardanti gli organismi del suolo.

C) Piante

Le piante superiori sono dei sistemi complessi, relazionati strettamente con tutte le componenti ambientali (aria, acqua, suolo e componente biotica). Esse sono pertanto fortemente influenzate da numerosi parametri ambientali e, di conseguenza, non è facile distinguere ciò che può apparire una risposta ad una situazione generale di inquinamento da una risposta a più tipi di stress ambientali, antropici e non.

Per valutare l'eventuale presenza di xenobiotici nel suolo possono essere prese in esame solo alcune parti della pianta:

- le radici, insieme a fusto e foglie, costituiscono il corpo vegetativo. Esse rappresentano l'organo destinato ad approfondirsi nel terreno dove svolgono una serie di funzioni fondamentali per l'intera pianta, quali la captazione dell'acqua e delle sostanze minerali, la

fissazione e l'ancoraggio della pianta al suolo, nonché l'accumulo di sostanze di riserva.

In merito all'impiego delle radici come bioindicatori si possono considerare sia l'organo intero, tenendo conto delle caratteristiche morfo-anatomiche, della produttività intesa come massa radicale prodotta, dell'estensione laterale e verticale delle radici e del rapporto estensione radice/fusto (KUTSCHERA-MITTER, 1984); sia i tessuti, le cellule ed i processi fisiologici, considerando in particolare i meccanismi di accumulo e di rilascio delle sostanze chimiche, di metalli e di composti organici (VALCUIVIA PASSADORE *et al.*, 1998);

- i semi di alcune specie vegetali, quali *Raphanus sativus*, *Triticum aestivum*, *Lactuca sativa*, *Brassica oleracea*, *Brassica rapa* e *Panicum miliaceum*. I semi vengono fatti germinare in laboratorio in capsule petri contenenti terreni contaminati. Tale metodo (denominato anche test di fitotossicità) permette di valutare la sensibilità delle suddette specie nei confronti di alcuni metalli. Le specie che si dimostrano sensibili possono essere utilizzate per testare la tossicità di sostanze disperse nell'ambiente (CARLSON *et al.*, 1991);
- gli anelli di accrescimento, su cui viene applicata la dendrochimica per ricostruire i cambiamenti chimici avvenuti nell'ambiente circostante l'albero. Questo tipo di approccio, utilizzato più frequentemente per ricostruire i cambiamenti meteorologici (fattori idrologici, neve, vento, fuoco), risulta estremamente utile nell'evidenziare effetti diretti di fitotossicità (SMITH e SHORTLE, 1996).

Nella valutazione dei livelli di contaminazione del suolo da metalli pesanti possono essere impiegate piante in grado di accumulare i contaminanti senza mostrare sintomi di tossicità. A seconda dello scopo del monitoraggio le analisi dei contaminanti accumulati possono riguardare solo alcune parti della pianta. In genere, le radici e i rizomi sono adatti per determinare le sostanze che si originano dal suolo stesso o quei metalli con alta affinità per i componenti della parete cellulare, ad esempio Cr e Pb. Le foglie sono preferite

Tab. IV. Valutazione di alcuni approcci per l'analisi di comunità di artropodi secondo i due criteri di specificità e risoluzione (- = basso; + = alto; ++ = molto alto) (modificato da VAN STRAALEN, 1998).

Pricipio di classificazione	Specificità	Risoluzione
Singola specie indicatrice	-	-
Rapporto tra le specie	-	-
Indici di diversità delle specie	-	-
Struttura della dominanza	-	+
Analisi multivariata	-	++
Strategie di vita	-	+
Gruppi trofici	++	+
Gruppi funzionali	++	+
Tipi ecofisiologici	++	+

quando è noto il contributo dovuto alle deposizioni atmosferiche, quando si vogliono studiare metalli facilmente traslocabili dalle radici ai fusti (come Cu e Zn), o quando si vuole considerare l'effetto di un contaminante sulla catena trofica. La bioaccumulazione nelle piante è utile per valutare la biodisponibilità di un contaminante e la sua mobilità nel suolo (ANDRÉN, 2004).

Negli ecosistemi naturali o seminaturali è possibile poi condurre delle indagini basate sulla biodiversità della flora, le quali hanno come oggetto la composizione delle comunità, o le associazioni di piante, o la presenza/assenza di particolari specie o ecotipi (PANKHURST *et al.*, 1997).

Nell'ambito delle piante, un caso particolare è rappresentato dalle micorrize, esempio di simbiosi mutualistica tra radici delle piante e funghi. Esse hanno un ruolo fondamentale nel miglioramento della nutrizione minerale e dell'assorbimento dell'acqua, nonché nella protezione delle piante e dell'integrità del suolo (SMITH e READ, 1997). Negli ultimi anni diversi studi hanno cercato di verificare se i funghi simbiotici possano essere utilizzati come bioindicatori di situazioni di stress, quali eccessi e mancanze di nutrienti, presenza di metalli pesanti, ecc (COLPAERT e VAN TICHELEN, 1994). Le ricerche fino ad ora effettuate non hanno ancora fornito un quadro definito, in quanto in alcuni casi si sono registrate dirette relazioni tra lo sviluppo di micorrize e la presenza di xenobiotici, mentre altre analisi non hanno rilevato variazioni significative.

Biomarker

Da quanto detto precedentemente, i biomarker possono essere considerati un sottogruppo di bioindicatori che si riferiscono ai livelli di organizzazione che vanno dall'individuo alle molecole biologiche. Differenti tipi di biomarker sono già stati accennati discutendo l'approccio d'indagine su singola specie per gli invertebrati. I biomarker tuttavia non sono specifici per questi animali, ma possono avere un'applicazione generale e non solo nel campo animale (GIL e PLA, 2001).

I biomarker sono stati suddivisi (PEAKALL e SHUGART, 1993) in tre gruppi:

- Biomarker di esposizione, che rilevano una risposta senza che necessariamente si sia manifestato un danno. La relazione tra il parametro misurato e l'esposizione è fortemente condizionata da fattori legati all'individuo, come metabolismo, meccanismi di assorbimento, detossificazione ed eliminazione (SCHULTE e WATERS, 1999);
- Biomarker di effetto, che sono definiti come qualsiasi cambiamento qualitativamente o quantitativamente predittivo di un deterioramento della salute o di un

possibile danno risultante dall'esposizione (NRC, 1989). Alcuni di questi parametri sono relazionati con meccanismi omeostatici dell'organismo, indicando in questo modo un effetto senza che si sia manifestato il danno;

- Biomarker di suscettibilità, che esprimono la capacità di un individuo di rispondere all'esposizione ad un contaminante.

La distinzione tra i biomarker di esposizione e di effetto è talvolta più concettuale che pratica; può capitare infatti che un parametro misurato possa rientrare nel primo piuttosto che nel secondo gruppo.

Alcuni ricercatori non sono concordi con le precedenti definizioni (McCARTY e MUNKITTRICK, 1996; ENGEL e VAUGHAN, 1996) e preferiscono intendere i biomarker come dei cambiamenti biochimici subletali che si manifestano per un'esposizione a xenobiotici.

Un approccio più semplice che potrebbe essere adottato nella descrizione di alcuni dei biomarker più conosciuti è quello basato sui livelli di organizzazione cui il parametro misurato fa riferimento:

1. individuo;
2. tessuti o apparati;
3. componenti cellulari;
4. molecole biologiche.

1. I parametri misurati considerando l'organismo in toto possono riferirsi al metabolismo, alla fecondità, allo sviluppo, alla durata di vita e al comportamento. I più comuni sono quelli che esprimono lo stato di benessere dell'individuo e il suo contributo al mantenimento della popolazione, quindi la biomassa corporea, l'accumulo di contaminanti nei tessuti, la velocità dello sviluppo, la capacità di deporre uova e di dare luogo ad una prole vitale.

2. Nel corpo di un organismo, un contaminante può accumularsi in particolari tessuti. In molte specie di invertebrati del suolo, si è osservata, ad esempio, la presenza di granuli contenenti metalli nelle cellule dell'apparato digerente ed escretore in seguito all'esposizione a questi contaminanti (HOPKIN, 1989). Altre valutazioni hanno lo scopo di rilevare alterazioni morfologiche, strutturali e fisiologiche. Un esempio di studio in questo ambito può essere rappresentato dalle variazioni osservate nella struttura dei tubuli digestivi e nell'attività escretoria delle cellule digestive delle lumache (MARIGOMEZ, *et al.* 1990). Gli studi istopatologici sugli invertebrati terrestri, sebbene promettenti, sono ancora scarsi (KAMMENG *et al.*, 2000).

Alcuni gruppi di organismi si prestano anche a studi sulle variazioni delle risposte del sistema immunitario (GOVEN *et al.*, 1988, GOVEN *et al.*, 1994).

3. All'interno delle singole cellule alcuni organuli sem-

brano essere più suscettibili all'azione di uno xenobiotico rispetto ad altri. Le eventuali modificazioni strutturali e funzionali manifestate costituiscono dei biomarker. Il parametro più utilizzato in questo ambito è la misura della stabilità della membrana lisosomiale (WEEKS e SVENDSEN, 1996).

4. I biomarker molecolari hanno trovato nel tempo un'ampia applicazione. Tra questi l'espressione di proteine inducibili (come citocromo P450, glutazione S-tranferasi, metallotioneine, fitochelatine, heat shock protein) legate alle attività di detossificazione o di risposta a stress è stata da sempre considerata un "campanello d'allarme", poiché indicativo dell'avvenuta esposizione ad un più o meno specifico contaminante ambientale. Altri biomarker misurano l'inattivazione di particolari enzimi, come le colinesterasi (JENSEN *et al.* 1997), oppure la comparsa di diversi isoenzimi (McCLUSKEY *et al.*, 1993).

A livello molecolare possono essere condotte anche valutazioni sulle alterazioni del DNA, che possono riguardare la presenza di addotti, un malfunzionamento del sistema di riparazione del DNA (DNA repair), la comparsa di mutazioni o la rottura della molecola.

CONSIDERAZIONI FINALI

Quando si opera un biomonitoraggio sarebbe consigliabile utilizzare più bioindicatori che contemplino da una parte più livelli di organizzazione biologica e dall'altra differenti organismi. Il primo aspetto di indagine permetterebbe di cercare risposte ad eventuali situazioni di degrado legate a differenti scale temporali. In questo modo si avrebbero a disposizione contemporaneamente strumenti capaci di rilevare segnali precoci di allarme, ma dotati di una bassa rilevanza ecologica, e strumenti con un'elevata rilevanza ecologica ma con lunghi tempi di risposta.

Se si considerassero poi più taxa, si amplierebbe l'indagine tenendo in considerazione anche la diversa modalità di esposizione a possibili xenobiotici; basti pensare alle differenze tra organismi idrobionti, che vivono nella pellicola d'acqua che circonda le particelle del suolo, e gli aerobionti che occupano gli spazi aerati. Dato che nell'ambiente in genere sono presenti miscele di contaminanti con diverse caratteristiche chimiche e, quindi, con diverse modalità di distribuzione, sarebbe utile scegliere per il biomonitoraggio organismi con differenti ruoli e caratteristiche ecologiche.

BIBLIOGRAFIA

- AARTS J.M.M.J.G., DENISON M.S., DE HAAN L.H.J., SCHALK J.A.C., COX M.A., BROUWER A., 1993. Ah receptor-mediated luciferase expression: a tool for monitoring dioxin-like toxicity. In: Fiedler H., Frank H., Hutzinger O., Parzefall W., Riss A., Safe S. (eds), *Organohalogen Compounds*. Riegelink, Vienna, pp. 361-364.
- ANDERSEN A.N., 1995. A classification of Australian ant communities, based on functional groups which parallel plant life-forms in relation to stress and disturbance. *Journal of Biogeography*, **22**: 15-29.
- ANDERSON J.M., 1988. Spatiotemporal effects of invertebrates on soil processes. *Biology and Fertility of Soils*, **6**: 189-203.
- ANDRÉN O., BARITZ R., BRANDAO C., BREURE T., FEIX I., FRANKO U., GRONLUND A., LEIFELD J., MALY S., 2004. *Working Group on Organic Matter and Biodiversity*. Task Group 3 on Soil Biodiversity, Final Report, European Commission, Directorate-General Environment, 76 pp.
- ARNOLD T.B., POTTER D.A., 1987. Impact of a high-maintenance lawn care program on non-target invertebrates in Kentucky bluegrass turf. *Environmental Entomology*, **16**: 100-105.
- BACHELIER G., 1986. *La vie animale dans le sol*. O.R.S.T.O.M., Paris, pp. 171-196.
- BARDGETT R.D., HOBBS P.J., FROSTEGARD A., 1996. Soil fungal: bacterial ratio following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biology and Fertility of Soils*, **22**: 261-264.
- BEHAN-PELLETIER V.M., 1999. Oribatid mite biodiversity in agroecosystems: role for bioindication. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **74**: 411-423.
- BERTHOLD A., PALZENBERGER M., 1995. Comparison between direct counts of active soil ciliates (Protozoa) and most probable number estimates obtained by Sigh's dilution culture method. *Biology and fertility of soils*, **19**: 348-356.
- BLUM W.E.H., BÜSING J., MONTANARELLA L., 2004. Research needs in support of the European thematic strategy for soil protection. *Trends in Analytical Chemistry*, **23**: 680-685.
- BOGOMOLOV D.M., CHEN S.K., PARMELEE R.W., SUBLER S., EDWARDS C.A., 1996. An ecosystem approach to soil toxicity testing: a study of copper contamination in laboratory soil microcosms. *Applied Soil Ecology*, **4**: 95-105.
- BOLD H.C., WYNNE M.J., 1978. *Introduction to the algae: structure and reproduction*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 573 pp.
- BONGERS T., 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematode species compo-

- sition. *Oecologia*, **83**: 14-19.
- BONGERS T., 1999. The Maturity Index, the evolution of nematode life history traits, adaptive radiation and c-p scaling. *Plant and Soil*, **212**: 13-22.
- BONGERS T., BONGERS M., 1998. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology*, **10**: 239-251.
- BONGERS T., KORTHALS G.W., 1994. The behaviour of Maturity Index and Plant Parasite Index under enriched conditions. Proc. 22nd Int. Nematology Symp. Gent, Belgium, 39.
- BONKOWSKI M., SCHAEFER M., 1996. Trophische Interaktionen von Regenwürmern und Protozoa. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie*, **26**: 283-286.
- BORVALL C., 2006 *Biodiversity and Species Extinctions in Model Food Webs*. Linköping Studies in Science and Technology. Dissertations. No. 1015, Linköping University, 37 pp.
- CAIRNS J. JR., MCCORMICK P.V., NIEDERLEHNER B.R., 1993. A proposed framework for developing indicators of ecosystem health. *Hydrobiologia*, **263**: 1-44.
- CARLSON C.L., ADRIANO D.C., SAJWAN K.S., ABELS S.L., THOMA D.P., DRIVER J.T., 1991. Effects of selected trace metals on germinating seeds of six plant species. *Water, Air and Soil Pollution*, **59**: 231-240.
- COLPAERT J.V., VAN TICHELEN K.K., 1994. Mycorrhizas and environmental stress. In: Frankland J.C., Magan N., Gadd G.M.(eds.) *Fungi and Environmental Change*. Cambridge University Press, pp. 109-128.
- COMMISSIONE EUROPEA, 2001. Comunicazione al Consiglio, al Parlamento europeo, al Comitato economico e sociale e al Comitato delle regioni sul Sesto programma di azione per l'ambiente della Comunità europea, n. 31: *Ambiente 2010: il nostro futuro, la nostra scelta*. COM/2001/31.
- COMMISSIONE EUROPEA, 2002. Comunicazione al Consiglio e al Parlamento europeo, al Comitato economico e sociale e al Comitato delle Regioni, n. 179. *Verso una strategia tematica per la protezione del suolo*. COM/2002/0179.
- COSTANZA R., D'ARGE R., DE GROOT R., FARBER S., GRASSO M., HANNON B., LIMBURG K., NAEEM S., O'NEILL R.V., PARUELO J., RASKIN R.G., SUTTON P., VAN DEN BELT M., 1997. The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, **387**: 253-259.
- CURDS C.R., 1992. *Protozoa in the water industry*, Cambridge University Press, Cambridge, 122 pp.
- DAVIC R.D., 2003. Linking keystone species and functional groups: a new operational definition of the keystone species concept. *Conservation Ecology*, **7**: r11.
- DE KOCK W.C., KRAMER K.L.M., 1994 Active biomonitoring (ABM) by translocation of bivalve molluscs. In: Kramer KJM (eds.), *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*. CRC Press, Boca Raton. pp. 51-84.
- DECRETO DEL PRESIDENTE DEL CONSIGLIO DEI MINISTRI 23 marzo 1990. *Atto di indirizzo e coordinamento ai fini dell'elaborazione e della adozione degli schemi previsionali e programmatici di cui all'art. 31 della legge 18 maggio 1989 n. 183, recante norme per il riassetto organizzativo e funzionale della difesa del suolo*. Gazzetta Ufficiale n. 79 del 4 aprile 1990.
- DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA 18 luglio 1995. *Approvazione dell'atto di indirizzo e coordinamento concernente i criteri per la redazione dei piani di bacino*. Gazzetta Ufficiale n. 7 del 10 gennaio 1996.
- DECRETO LEGISLATIVO (Decreto Ronchi) n. 22, 5 febbraio 1997. *Attuazione delle direttive 91/156/CEE sui rifiuti, 91/689/CEE sui rifiuti pericolosi e 94/62/CE sugli imballaggi e sui rifiuti di imballaggio*. Testo coordinato (aggiornato, da ultimo, alla Legge 15 dicembre 2004, pubblicata su GU n. 302 del 27 dicembre 2004). Gazzetta Ufficiale n. 38 del 15 febbraio 1997, Supplemento Ordinario n. 33.
- DECRETO LEGISLATIVO n. 99, 27 gennaio 1992. *Attuazione della direttiva 86/278/CEE concernente la protezione dell'ambiente, in particolare del suolo, nell'utilizzazione dei fanghi di depurazione in agricoltura*. Gazzetta Ufficiale n. 38 del 15 febbraio 1992.
- DECRETO MINISTERIALE 14 febbraio 1997. *Direttive tecniche per l'individuazione e la perimetrazione, da parte delle regioni, delle aree a rischio idrogeologico*. Gazzetta Ufficiale n. 54 del 6 marzo 1997.
- DECRETO MINISTERIALE 19 aprile 1999. *Approvazione del codice di buona pratica agricola*. Gazzetta Ufficiale n. 102 del 4 maggio 1999, Supplemento Ordinario n. 86.
- DECRETO MINISTERIALE n. 471, 25 ottobre 1999. *Regolamento recante criteri, procedure e modalità per la messa in sicurezza, la bonifica e il ripristino ambientale dei siti inquinati, ai sensi dell'articolo 17 del decreto legislativo 5 febbraio 1997, n. 22, e successive modificazioni ed integrazioni*. Gazzetta Ufficiale n. 293 del 15 dicembre 1999.
- DEGENS B.P., 1998. Microbial functional diversity can be influenced by the addition of simple organic substrates to soil. *Soil Biology & Biochemistry*, **30**: 1981-1988.
- DELMAS R., SERCA D., JAMBERT C., 1997. Global inventory of NOx sources. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, **48**(1/2): 51-60.
- DIEHL E., SANHUDO C.E.D., DIEHL-FLEIG Ed., 2004. Ground-dwelling ant fauna of sites with high levels of copper. *Brazilian Journal of Biology*, **64**: 33-39.
- DORAN J.W., PARKIN T.B., 1994. Defining soil quality. In: Doran J.W., Coleman D.C., Bezdicek D.F., Stewart B.A. (eds) *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Science Society of America, Special Publication 35, Madison, WI, USA, pp. 3-21.
- DORAN J.W., PARKIN, T.B., 1996. Quantitative indicators of soil quality: a minimum data set. In Doran J.W., Jones A.J. (eds). *Methods for assessing soil quality*. Soil Science Society of America, Special Publication 49, Madison, WI, pp. 25-37.
- DORAN J.W., ZEISS M.R., 2000. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, **15**: 3-11.
- EDWARDS C.A., 1989. The assessment of the ecological effects of soil pollution by chemicals. Bioindicatori deteriorisationis regionis, Czechoslovakia. *Proceedings Vth International Conference*, pp. 93-104.
- EDWARDS C.A., 1992. The impact of pesticides of environment. In: Pimentel D. (ed). *The pesticide question: Environment, economics and ethics*. Chapman & Hall, London & New York, pp. 13-46.
- EDWARDS C.A., BOHLEN P.J., 1992. The assessment of the effects of toxic chemicals upon earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, **125**: 23-99.
- EDWARDS C.A., SUBLER S., CHEN S.K., 1994. A microcosm system

- for evaluating the effects of pesticides on dynamic soil processes and soil organisms. Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference - Pest and Diseases, pp. 1301-1306.
- EDWARDS C.A., SUBLER S., CHEN S.K., AND BOGOMOLOV D.M., 1995. Essential criteria for selecting bioindicator species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems. In VAN STRAALEN N.M., KRIVOLUTSKII D.A. (eds). *New Approaches to the Development of Bioindicator Systems for Soil Pollution*, Amsterdam, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 67-84.
- EKELUND F., RÖNN R., 1994. Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. *FEMS Microbiology Reviews*, **15**: 321-353.
- ENGEL D.W., VAUGHAN D.S., 1996. Biomarkers, natural variability and risk assessment: Can they co-exist? *Human and Ecological Risk Assessment*, **2**: 257-262.
- ERNST W. H. O., PETERSON P. J., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (4). Terrestrial plants. *Ecotoxicology*, **3**: 180-192.
- ETTEMA C.H., WARDLE D.A., 2002. Spatial soil ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**: 177-183.
- FERRARI A., ALLIEVI L., GIGLIOTTI C., FONTANA A., 1998. I microrganismi del suolo come bioindicatori. In: Sartori F. (eds). *Bioindicatori ambientali*. Fondazione Lombardia per l'ambiente, Milano, pp.65-86.
- FERRIS H., BONGERS T., DE GOEDE R.G.M., 2001. A framework for soil food web diagnostics: extension of the nematode faunal analysis concept. *Applied Soil Ecology*, **18**: 13-29.
- FISCHER R.A., 1922. On the mathematical foundations of theoretical statistics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **222**: 309-368.
- FOISSNER W., 1987. Soil protozoa: fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bioindicators, and guide to the literature. *Progress in Protistology*, **2**: 69-212.
- FOISSNER W., 1994. Soil protozoa as bioindicators in ecosystems under human influence. In: Darbyshire J.F. (eds) *Soil Protozoa*, CAB, Oxford, pp. 147-193.
- FOISSNER W., 1997. Protozoa as bioindicators in agroecosystems, with emphasis on farming practices, biocides, and biodiversity. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **62**: 93-103.
- FOISSNER W., 1999. Soil protozoa as bioindicators: pros and cons, methods, diversity, representative examples. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **74**: 95-112.
- FOISSNER W., BERGER H., KOHMANN F., 1992. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien systems. Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida. Informationssberichte des Bayer. *Landesamtes für Wasserwirtschaft*, **5**: 1-502.
- FOISSNER W., BERGER H., KOHMANN, F., 1994. Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobien systems. Band III: Hymenostomata, Prostomatida, Nassulida. Informationssberichte des Bayer. *Landesamtes für Wasserwirtschaft*, **1**: 1-548.
- FRECKMAN D.W., 1988. Bacterivorous nematodes and organic-matter decomposition. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **24**: 195-217.
- GIL F., PLA A., 2001. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal of Applied Toxicology*, **21**: 245-255.
- GLANZ J.T., 1995. *Saving our soil: solutions for sustaining earth's vital resource*. Johnson Book, Boulder, CO, USA, 192 pp.
- GOVEN A.J., VENABLES B.J., FITZPATRICK L.C., COOPER E.L., 1988. An invertebrate model for analyzing effects of environmental xenobiotics on immunity. *Clinical Ecology*, **5**: 150-4.
- GOVEN A.J., FITZPATRICK L.C., VENABLES B.J., 1994. Chemical toxicity and host-defense in earthworms - an invertebrate model. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **712**: 280-300.
- GRIFFITHS B.S., 1994. Soil nutrient flow. In: Darbyshire J.F. (eds) *Soil Protozoa*, CAB, Oxford, pp. 65-91.
- GRIFFITHS B.S., 1997. Theoretical background: Definitions, hypotheses, models. In: Wolters V. *Functional Implications of Biodiversity in Soil*, European Commission, Brussels, pp. 13-16.
- GRIME J.P., THOMPSON K., HUNT R., HODGSON J.G., CORNELISSEN J.H.C., RORISON I.H., HENDRY G.A.F., ASHENDEN T.W., ASKEW A.P., BAND S.R., BOOTH R.E., BOSSARD C.C., CAMPBELL B.D., COOPER J.E.L., DAVISON A.W., GUPTA P.I., HALL W., HAND D.W., HANNAH M.A., HILLIER S.H., HODKINSON D.J., JALILI A., LIU Z., MACKEY J.M.L., MATTHEWS N., MOWFORTH M.A., NEAL A.M., READER R.J., REILING K., ROSS-FRASER W., SPENCER R.E. SUTTON F., TASKER D.E., THORPE P.C., WHITEHOUSE J., 1997. Integrated screening validates primary axes of specialization in plants. *Oikos* **79**: 259-281.
- HARRIS R.F., BEZDICEK D.F., 1994. Descriptive aspects of soil quality/health. In: Doran J.W., Coleman D.C., Bezdick D.F., Stewart B.A. (eds). *Defining soil quality for a sustainable environment*. Special Publication Number 35, Soil Society of America, Madison, USA, pp. 23-35.
- HOGERVORST R.F., VERHOEF H.A., VAN STRAALEN N.M., 1993. Five-year trends in soil arthropod densities in pine forests with various levels of vitality. *Biology and Fertility of Soils*, **15**: 189-195.
- HOLT J. G., KRIEG N. R., SNEATH P. H. A., STALEY J. T., WILLIAMS S. T., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, USA, 532 pp.
- HOPKIN S.P., 1989. *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*. Elsevier Applied Science, New York and London, 366 pp.
- HOPKIN S.P., 1993. In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. In: Calow P. (eds) *Handbook of ecotoxicology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 397-427.
- HU S., VAN BRUGGEN A.H.C., 1998. Efficiencies of chloroform fumigation in soil: effects of physiological states of bacteria. *Soil Biology & Biochemistry*, **30**: 1841-1844.
- HUO C.L., HAN G.C., WANG J.Y., GUAN D.M., 2005. *EROD as bioindicator for monitoring of marine contaminants along the Dalian coast*. PICES XIV Annual Meeting, Vladivostok, Russia.
- INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION, 1996. *Soil quality. Vocabulary. Part 1: Terms and definitions relating to the protection and pollution of the soil*, 22 pp.
- ISERENTANT R.E., DE SLOOVER J., 1976. Le concept de bioindicateur.

- Mémoires de la Société Royale de Botanique de Belgique*, **7**: 15-24.
- JACCARD P., 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, **44**: 223-270.
- JENSEN C.S., GARS DAL L., BAATRUP E., 1997. Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**: 1727-32.
- JONES T.H., BRADFORD M.A., 2001. Assessing the functional implications of soil biodiversity in ecosystems. *Ecological Research*, **16**: 845-858
- KAMMENG A. J.E., DALLINGER R., DONKER M.H., KOHLER H.R., SIMONSEN V., TRIEBSKORN R., WEEKS J.M., 2000. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, **164**: 93-147.
- KARLEN D.L., MAUSBACH M.J., DORAN J.W., CLINE R.G., HARRIS R.F., SCHUMAN G.E., 1997. Soil quality: a concept, definition, and framework for evaluation. *Soil Science Society American Journal* **61**: 4-10.
- KEENEY D.R., NELSON D.W., 1982. Nitrogen-inorganic forms. In: Page A.L., Miller R.H., Keeney D.R. (eds) *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*, 2nd edn. Soil Science Society of America, Madison, Wis., pp. 643-698.
- KISS I., JAGER P., 1987. Investigation on the role of the soil-mesofauna with litter-bag method under arable land conditions. *Bulletin of the University of Agriculture, Sciences, Godollo*, **1**: 99-104.
- KOLKWITZ R., MARSSON M., 1902. Grundsätze für die biologische Beurteilung des Wassers nach seiner Flora und Fauna. *Mitteilungen aus der Königlichen Prüfungsanstalt für Wasserversorgung und Abwasserbeseitigung zu Berlin*, **1**: 33-72.
- KUTSCHERA-MITTER L., 1984. Untersuchung der Wurzeln und der unterirdischen Teile von Spross-Systemen. In: Knapp R. (eds) *Sampling methods and taxon analysis in vegetation science. Handbook of vegetation science*. Dr W.Junk Publishers, 370 pp.
- LANGLEY A.J., 2002. The soiled environment: bubble, bubble, soil in trouble. *Medical Journal of Australia*, **177**: 599-603.
- LARSON W.E., PIERCE F.J., 1991. Conservation and enhancement of soil quality. In: *Evaluation for sustainable land management in the developing world*. Vol. 2. Tech Pap, Bangkok, International Board for Soil Research and Management, IB-SRAM Proceedings n. 12, pp. 175-203.
- LEE K.E., 1985. *Earthworms. Their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, Sydney, 412 pp.
- LEGGE n. 183, 18 maggio 1989. *Norme per il riassetto organizzativo e funzionale della difesa del suolo*.
- LEGGE n. 253, 7 agosto 1990. *Disposizioni integrative alla Legge 18 maggio 1989 n. 183 recante norme per il riassetto organizzativo e funzionale della difesa del suolo*.
- LÜFTENEGGER G., PETZ W., FOISSNER W., ADAM H., 1988. The efficiency of a direct counting method in estimating the numbers of microscopic soil organisms. *Pedobiologia*, **31**: 95-101.
- MAJER J.D., SHATTUCK S.O., ANDERSEN A.N., BEATTIE A.J., 2004. Australian ant research: fabulous fauna, functional groups, pharmaceuticals, and the Fatherhood. *Australian Journal of Entomology*, **43**: 235-247.
- MANAHAN S.E., 2000. *Fundamentals of Environmental Chemistry. 2nd Edition*, Lewis publishers, U.S., 1024 pp.
- MARGALEF R., 1958. Information theory in ecology. *General Systematics*, **3**: 36-71.
- MARGALEF R., 1963. On certain unifying principles in ecology. *Advancing Frontiers in Plant Science*, **2**: 137. *The American Naturalist*, **97**: 357.
- MARIGÓMEZ J.A., CAJARAVILLE M.P., ANGULO E., MOJA J., 1990. Ultrastructural alterations in the renal epithelium of cadmium-treated *Littorina littorea* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **19**, 863-81.
- MCCANN AE, CULLIMORE DR., 1979. Influence of pesticides on the soil algal flora. *Residue Revue*, **72**: 1-31.
- MCCARTY L.S., MUNKITTRICK K.R., 1996. Environmental biomarkers in aquatic toxicology: fiction, fantasy, or functional? *Human and Ecological Risk Assessment*, **2**: 268-274.
- MCCARTHY J.F., SHUGART L.R., 1990. *Biomarkers of environmental contamination*. Lewis Pub, Boca Raton, 457 pp.
- MCCCLUSKEY S., MATHER P.B., HUGHES J.M., 1993. The relationship between behavioural responses to temperature and genotype at a PGI locus in the terrestrial isopod *Porcellio laevis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **21**: 171-9.
- MEGHARAJ M., PEARSON H.W., VENKATESWARLU K., 1991. Toxicity of *p*-aminophenol and *p*-nitrophenol to *Chlorella vulgaris* and two species of *Nostoc* isolated from soil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **40**: 266-273.
- MEGHARAJ M., SINGLETON I., MCCLURE N.C., 1998. Effect of pentachlorophenol pollution towards microalgae and microbial activities in soil from a former timber processing facility. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **61**: 108-115.
- MEGHARAJ M., SINGLETON I., MCCLURE N.C., NAIDU R., 2000a. Influence of petroleum hydrocarbon contamination on microalgae and microbial activities in a long-term contaminated soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **38**: 439-445.
- MEGHARAJ M., KANTACHOTE D., SINGLETON I., NAIDU R., 2000b. Effects of long-term contamination of DDT on soil microflora with special reference to soil algae and algal transformation of DDT. *Environmental Pollution*, **109**: 35-42.
- METTING B., 1981. The systematic and ecology of soil algae. *Botanical Review*, **47**: 195-312.
- MOSIER A.R., 1998. Soil processes and global change. *Biology and Fertility of Soils*, **27**: 221-229.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1989. *Biologic Markers in Reproductive Toxicology*. Washington, DC: National Academy Press, 420 pp.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993. Soil and water quality: An agenda for agriculture. *Committee on long-range soil and water conservation, Board of Agriculture, National Research Council*. National Academy Press, Washington, DC, 542 pp.
- NEHER D.A., 2001. Role of nematodes in soil health and their use as indicators. *Journal of Nematology*, **33**: 161-168.
- NIEMI G.J., McDONALD M.E., 2004. Application of ecological indicators. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systema-*

- tics*, **35**: 89-111.
- NOSS R.F., 1990. Indicators for monitoring biodiversity: a hierarchical approach. *Conservation Biology*, **4**: 355-364.
- O'NEILL R.V., DEANGELES D.L., WAIDE J.B., ALLEN T.F.H., 1986. *A hierarchical concept of ecosystems*. Princeton University Press, Princeton, NJ, 262 pp.
- ÖHLINGER R., 1996. Ninhydrin-active N by fumigation extraction technique. In: Schinner F., Öhlinger R., Kandeler R., Margesin E. (eds.) *Methods in soil biology*. Springer Verlag, Berlin, pp. 60-62.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984. *Guidelines for the testing of chemicals, n. 207. Earthworm acute toxicity tests*, pp. 1-9.
- PANKHURST C.E., HAWKE, B.G., McDONALD H.J., KIRKBY C.A., BUCKERFIELD J.C., MICHELSEN P., O'BRIEN K.A., GUPTA V.V.S.R., DOUBE B.M., 1995. Evaluation of soil biological properties as potential bioindicators of soil health. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, **35**: 1015-1028.
- PANKURST C.E., DOUBE B.M., GUPTA V.V.S.R., 1997. *Biological indicators of soil health*. CAB International, Wallingford, 464 pp.
- PAOLETTI M.G., 1999a. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **74**: 137-155.
- PAOLETTI M.G., 1999b. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, **74**: 1-18.
- PARISI V., 2001. La qualità biologica del suolo. Un metodo basato sui microartropodi. *L'Ateneo Parmense - Acta Naturalia*, **37**: 105-114.
- PARMELEE R.W., WENTSEL R.S., PHILLIPS C.T., SIMINI M., CHECKAI R.T., 1993. Soil microcosm for testing the effects of chemical pollutants on soil fauna communities and trophic structure. *Environment Toxicology and Chemistry*, **12**: 1477-1486.
- PARR J.F., PAPENDICK R.I., HORNICK S.B., MEYER M.E., 1992. Soil quality: Attributes and relationship to alternative and sustainable agriculture. *American Journal of Alternative Agriculture* **7**: 5-11.
- PEAKALL D.B., SHUGART L.R., 1993. *Biomarkers: Research and Application in the Assessment of Environmental Health*. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 114 pp.
- PETZ W., FOISSNER W., 1989. The effects of mancozeb and lindane on the soil microfauna of a spruce forest: a field study using a completely randomized block design. *Biology and Fertility of Soils*, **7**: 225-231.
- PIELOU E. C., 1966. Shannon's formula as a measure of specific diversity: its use and misuse. / *The American Naturalist*, **100**: 463-465.
- POWELL R.L., 1997. The use of vascular plants as field biomonitors. In: Wang W., Gorsuch J.W., Hughes J.S. (eds) *Plants for environmental studies*, CRC Press LLC, pp. 335-365.
- PRADHAN G.B., SENAPATI B.K., DASH M.C., 1988. Relationship of soil nematode populations to carbon. Nitrogen in tropical habitats and their role in the laboratory decomposition of litter amendments. *Revue d'Ecologie e de Biologie du Sol*, **25**: 59-76.
- RAWSON D.M., 1993. Bioprobes and biosensors. In: Calow P. (eds) *Handbook of ecotoxicology*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 428-437.
- ROLSTON D.E., HARPER L.A., MOSIER A.R., DUXBURY J.M., 1993. *Agricultural Ecosystem Effects on Trace Gases and Global Climate Change*. American Society of Agronomy, Special Publication 55, Madison, WI, USA, 206 pp.
- RUF A., 1998. A maturity index for predatory soil mites (Mesostigmata: Gamasina) as an indicator of environmental impacts of pollution on forest soils. *Applied Soil Ecology*, **9**: 447-452.
- RUF A., BECK L., DREHER P., HUND-RINKE K., RÖMBE J., SPELDA J., 2003. A biological classification concept for the assessment of soil quality: "biological soil classification scheme" (BBSK). *Agriculture, Ecosystems and Environment* **98**: 263-271.
- SAMOILOFF M.R., 1987. Nematodes as indicators of toxic environmental contaminants. In: Veech J.A. and Dickson D.W., (eds) *Vistas on nematology: A commemoration of the 25th annual meeting of the Society of Nematologists*. Hyattsville, MD: Society of Nematologists, pp. 433-439.
- SARTORI F. 1998. Indicatori biologici, biovalutazione e biomonitoraggio: un'introduzione. In: Sartori (eds) *Bioindicatori ambientali*. Fondazione Lombardia per l'ambiente, Milano, pp. 23-31.
- SCHILLER A., HUNSAKER C.T., KANE M.A., WOLFE A.K., DALE V.H., 2001. Communicating ecological indicators to decision makers and the public. *Conservation Ecology*, **5**: 19.
- SCHÖNBORN W., 1973. Humusform und Testaceen-Besatz. *Pedobiologia*, **13**: 353-360.
- SCHULTE P.A., WATERS M., 1999. Using molecular epidemiology in assessing exposure for risk assessment. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **895**: 101-111.
- SHANNON C.E., WIENER W., 1949. *The mathematical theory of communication*. Urbana IL: University of Illinois Press, 116 pp.
- SHTINA E.A., 1974. The principal directions of experimental investigations in soil algology with emphasis on the U.S.S.R. *Geoderma*: **12**, 151-156.
- SIMPSON E. H., 1949. Measurement of species diversity. *Nature*: **163**: 688.
- SINCLAIR C.J., BOXALL A.B.A., 2003. Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products. *Environmental Science and Technology*, **37**: 4617-4625.
- SINGH B.N., 1946. A method of estimating the numbers of soil protozoa, especially amoebae, based on their differential feeding on bacteria. *Annals of Applied Biology*, **33**: 112-120.
- SMIT C.E., VAN GESTEL C.A.M., 1996. Comparison of the toxicity of zinc for the springtails *Folsomia candida* in artificially contaminated and polluted field soils. *Applied Soil Ecology*, **3**: 127-136.
- SMITH K. T., SHORTLE W., 1996. Tree biology and dendrochemistry. In: Dean J.S., Meko D.M., Swetnam T.W., (eds) *Tree-Rings, Environment, and Humanity: Proceedings of the 1994 International Conference*. Tucson, Arizona, Radiocarbon, pp. 629-635.
- SMITH S., READ D.J., 1997. *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London, 605 pp.
- SØRENSEN T., 1948. A method of establishing groups of equal amplitude in plant society based on similarity of species contents. *K. Danske Vidensk Selsk*, **5**: 1-34.

- SVENSSON B.H., BOSTROM U., KLEMEDTSON L., 1986. Potential for higher rates of denitrification in earthworm casts than the surrounding soil. *Biology and Fertility of Soils*, **2**: 147-149.
- STORK N.E., EGGLETON P., 1992. Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. *American Journal of Alternative Agriculture*, **7**: 38-47.
- TAKEDA H., 1988. A 5 year study of pine needle litter decomposition in relation to mass loss and faunal abundance. *Pedobiologia*, **32**: 221-226.
- THIND H.S., ROWELL D.L., 1999. The fate of algal nitrogen in a flooded soil system. Nutrient cycling in agroecosystems. *Biology and Fertility of Soils*, **55**: 89-94.
- TREVORS J.T., 1984. Dehydrogenase activity in soil. A comparison between INT and TTC assay. *Soil Biology and Biochemistry*, **16**: 673-674.
- VALCUIA PASSADORE M., ALEFFI M., ASSINI S., NOLA P., BUSSOTTI F., COZZI A., FERRETTI M., PUPPI BRANZI G., BELLI G., VIOLINI G., 1998. Bioindicatori a livello di organismi vegetali. In: Sartori F. (eds). *Bioindicatori ambientali*. Fondazione Lombardia per l'ambiente, Milano, pp. 87-168.
- VAN BRUGGEN A.H.C., SEMENOV A.M., 2000. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. *Applied Soil Ecology*, **15**: 13-24.
- VAN DER GUCHT K., SABBE K., DE MEESTER L., VLOEMANS N., ZWART G., GILLIS M., VYVERMAN W., 2001. Contrasting bacterioplankton community composition and seasonal dynamics in two neighbouring hypertrophic freshwater lakes. *Environmental Microbiology*, **3**: 680-690.
- VAN STRAALLEN N.M., 1997. Community structure of soil arthropods as a bioindicator of soil health. In: Pankurst C.E., Doube B.M., Gupta V.V.S.R., (eds). *Biological indicators of soil health*. CAB International, Wallingford, pp. 235-264.
- VAN STRAALLEN N.M., 1998. Evaluation of bioindicator systems derived from soil arthropod communities. *Applied Soil Ecology*, **9**: 429-437.
- VAN STRAALLEN N.M., KRIVOLUTSKY D.A., 1996. *Bioindicator system for soil pollution*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 272 pp.
- VAN VORIS P., TOLLE D.A., ARTHUR M.F., CHESSON J., 1985. Terrestrial microcosms: applications, validation and cost-benefit analysis. In: CAIRNS J. JR. (ed). *Multispecies toxicity testing*. Pergamon Press, New York, pp. 117-142.
- VANCE E.D., BROOKES P.C., JENKINSON D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, **19**: 703-707.
- VANDECASTEELE B., SAMYN J., QUATAERT P., MUYS B., TACK F.M.G., 2004. Earthworm biomass as additional information for risk assessment of heavy metal biomagnification: a case study for dredged sediment-derived soils and polluted floodplain soils. *Environmental Pollution*, **129**: 363-375.
- WARDLE D.A., YEATES G.W., 1993. The dual importance of competition and predation as regulatory forces in terrestrial ecosystems: evidence from decomposer food-webs. *Oecologia*, **93**: 303-306.
- WARDLE D.A., YEATES G.W., WILLIAMSON W., BONNER K.R., 2003. The response of a three trophic level soil food web to the identity and diversity of plant species and functional groups. *Oikos*, **102**: 45-56.
- WASILEWSKA L., 1997. Soil invertebrates as bioindicators, with special reference to soil-inhabiting nematodes. *Russian Journal of Nematology*, **5**: 113-126.
- WEEKS J.M., SVENDSEN C., 1996. Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: A simple biomarker of exposure to soil copper. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **15**: 1801-5.
- WILLIAMSON W.M., WARDLE D.A., YEATES G.W., 2005. Changes in soil microbial and nematode communities during ecosystem decline across a long-term chronosequence. *Soil Biology and Biochemistry*, **37**: 1289-1301.
- YEATES G.W., 1994. Modification and qualification of nematode Maturity Index. *Pedobiologia*, **38**: 97-101.
- YEATES G.W., BONGERS T., DE GOEDE R.G.M., FRECKMAN D.W. AND GEORGIEVA S.S., 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera – An outline for soil ecologists. *Journal of Nematology*, **25**: 315-331.
- YEATES G.W., COLEMAN D.C., 1982. Role of nematodes in decomposition. In: Freckman D. (eds). *Nematodes in soil ecosystems*. University of Texas Press, Austin, pp. 55-80.
- ZHOU J., BRUNS M.A., TIEDJE J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 316-322.
- ZHU N.W., 1996. The effect methamidophos the activities of phosphatase and dehydrogenase in soil. *Rural Eco-Environment*, **13**: 22-24.

