

Come monitorare l'ambiente con i nematodi

Aldo Zullini

Università degli Studi Milano-Bicocca, Piazza della Scienza 2, 20126 Milano
aldo.zullini@unimib.it

Pervenuto il 25.11.2021; accettato il 28.12.2021

Riassunto

Sono passati in rassegna i principali indici ambientali basati sui nematodi, con particolare riguardo per i generi d'acqua dolce, spiegandone la logica e fornendo esempi pratici di calcolo.

PAROLE CHIAVE: Nematodi di acqua dolce / indici ambientali / indicatori / diversità / Margalef / Shannon / Maturity Index / NINJA

Summary

The main nematode-based environmental indices are reviewed, with particular emphasis on freshwater genera, explaining their rationale and providing practical examples of calculation.

KEY WORDS: Freshwater nematodes / environmental index / indicators / diversity / Margalef / Shannon / Maturity Index / NINJA

INTRODUZIONE

Il mondo, come si sa, ospita molti animali (uomo compreso) e si calcola che ben 1 su 5 sia un nematode. Essi sono infatti la maggioranza relativa del mondo animale: il loro numero è una cifra con venti zeri (van den Hoogen *et al.*, 2019). Se molti ignorano la loro esistenza è perché sono praticamente invisibili essendo solitamente lunghi circa 1 mm, molto sottili e piuttosto trasparenti. Ma proprio per questo si infilano dappertutto: anche nel terreno (mediamente con 2 milioni di individui per metro quadro) e nei sedimenti dei mari, fiumi e laghi (con centomila o più per metro quadro). Per quanto piccoli, hanno un impatto non trascurabile sull'ambiente in quanto riciclatori di azoto e protagonisti attivi nella rete alimentare del microbioma.

A loro volta, i nematodi ci dicono in quali condizioni è il substrato in cui vivono. Un ambiente può essere valutato per mezzo dei dati chimici che lo caratterizzano: sono dati precisi e facili da rilevare, ma non ci dicono, di per sé, gli effetti che ne derivano per i viventi e per l'ambiente stesso. Inoltre, specialmente nel caso delle

acque correnti, forniscono un'informazione valida solo per l'istante del campionamento. Ecco perché negli studi ambientali le analisi chimiche vengono normalmente integrate con i dati biologici.

Esistono degli ottimi sistemi di valutazione ecologica basati sulle piante e gli animali. Per esempio ci sono indici che si servono dei macroinvertebrati (insetti, crostacei, anellidi, molluschi) del suolo e delle acque dolci (vedi per es. Ghetti 1980; Stark 1998). Ma non sempre un ambiente è adatto per questo tipo di analisi, mentre i microinvertebrati (e qui parliamo di nematodi) abbondano sempre dappertutto, dai siti più intatti a quelli più inquinati o stressati. In una sola manciata di suolo o di sedimento si possono trovare centinaia o migliaia di individui.

Il manuale CISBA di identificazione dei generi di nematodi d'acqua dolce (Zullini, 2021) dovrebbe permettere a chiunque di riconoscere tali animaletti. Sapere chi è che popola un lago o un fiume che ci sta a cuore è certamente interessante, ma più importante ancora è

sapere che cosa fare dei dati raccolti e capirne il significato. Quanto segue vuol rispondere a questa esigenza.

METODI DI STUDIO

Per quanto riguarda i sedimenti delle acque dolci, bisogna innanzitutto estrarre i nematodi dal substrato. Libri e manuali propongono numerosi metodi più o meno laboriosi, ma si consiglia, per chiarezza e completezza, il manuale di van Bezooijen (2006) reperibile in rete: molte procedure ivi descritte per i nematodi del suolo valgono anche per il trattamento delle specie d'acqua dolce che vivono nei sedimenti.

Se non si hanno esigenze particolari di accuratezza, il modo più semplice e sbrigativo per raccogliere nematodi acquatici è versare il sedimento raccolto con una paletta (fanghiglia, sabbia, detriti vegetali) in un secchio pieno d'acqua, mescolare bene e attendere almeno mezzo minuto che i granelli pesanti di ghiaia e sabbia si depositino sul fondo (i nematodi ci mettono molto più tempo per sedimentare). Quindi versare lentamente l'acqua torbida su un grande filtro con maglie di 40-60 micron, fino a inizio intasamento dello stesso. L'acqua col limo e argilla ancora in sospensione attraversa il filtro, mentre buona parte dei nematodi ne viene trattenuta. Il poco detrito (contenente nematodi) rimasto sul filtro va quindi sciacquato e raccolto con la minima quantità d'acqua possibile, e salvato per le successive operazioni. È bene riempire di nuovo il secchio con acqua pulita e ripetere la procedura due o tre volte per estrarre anche gli esemplari rimasti nel campione di sedimento. Si tenga presente che, con questo metodo, circa la metà degli individui non viene raccolta e si perde.

L'osservazione al microscopio dei nematodi in una goccia d'acqua (sia pure debitamente fissati) non dà buoni risultati per il maggiore indice di rifrazione del nematode rispetto all'acqua. Pertanto è necessario includere gli esemplari in glicerina (che ha un più alto indice di rifrazione). La fissazione va fatta con formalina a 80-90°C (riscaldata in una spruzzetta a bagnomaria) diluita al 4%, magari con l'aggiunta di un po' di acido acetico (o propionico) che rende più trasparenti e meno contratti gli esemplari, badando di lavorare sotto cappa, essendo i vapori di formalina cancerogeni.

A causa della sua elevata pressione osmotica, tuttavia, l'immersione diretta in glicerina provocherebbe una rapida fuoriuscita dell'acqua dal corpo del nematode che, pertanto, si accartoccherebbe risultando irriconoscibile. Perciò gli esemplari fissati in formalina devono essere immersi in glicerina molto diluita (circa il 2% o poco più) lasciando che l'acqua, evaporando, lasci aumentare a poco a poco la concentrazione di glicerina fino a che i nematodi finiscono per trovarsi, senza distorcersi, in glicerina praticamente pura. Un metodo più perfezionato, ma più laborioso, prevede un preventivo lento passaggio degli esemplari (già fissati in formalina) in

etanolo e, solo successivamente, in glicerina.

Per velocizzare il processo di evaporazione basta in ogni caso porre il contenitore, con gli esemplari in glicerina diluita, in una stufetta a 40 °C e lasciarvelo per almeno 3 giorni. Tutte queste procedure e le successive (montaggio dei vetrini ecc.) sono descritte in van Bezooijen (2006) e in Zullini (2021).

Per una completa caratterizzazione di un campione di suolo o di sedimento è necessario identificare non meno di 200 individui. Un numero minore fornirebbe infatti percentuali poco significative dal punto di vista statistico. Per comodità di studio e per evitare errori di conteggio, ogni vetrino non dovrà contenere più di una ventina di esemplari. Per le valutazioni ambientali l'identificazione fino alla specie non è necessaria (oltrè quasi sempre impossibile, se non si è specialisti). Infatti, poiché raramente una specie differisce molto, dal punto di vista ecologico, da un'altra congenere, è sufficiente fermarsi all'identificazione (molto più facile) del genere o anche solo della famiglia.

Si aggiunga che mentre i generi e le famiglie sono solitamente più o meno ben caratterizzati quanto a preferenze alimentari e di habitat, quasi sempre si ignorano le sottili differenze ecologiche tra le diverse specie di uno stesso genere.

In ogni caso si dovrà cominciare con l'esame degli esemplari adulti e meglio conservati. Gli esemplari giovanili, non ancora maturi sessualmente, sono difficili o impossibili da identificare se non sono accompagnati da adulti dello stesso genere o specie.

Dopo un attento esame al microscopio, usando quasi sempre anche il massimo ingrandimento con l'obiettivo 100X a immersione (per 1000 ingrandimenti totali), si sarà finalmente compilata una lista di nomi di taxa col rispettivo numero di esemplari trovati da cui partire per l'elaborazione dei dati che darà un senso al lavoro fatto.

RICCHEZZA IN SPECIE E BIODIVERSITÀ

Per *biodiversità* s'intende il numero di specie viventi in un certo habitat (o nel mondo). Sebbene alcuni indici trattati di seguito siano stati concepiti per elaborare i dati delle specie, è possibile calcolarli anche utilizzando taxa sovra specifici (pur con qualche, contenuta, perdita di informazione). Nel caso dei nematodi, i taxa che utilizzeremo sono i generi o le famiglie.

È chiaro che un ambiente ricco di taxa è ecologicamente migliore di uno povero. Ma il numero di taxa conosciuto per un ambiente (ruscello, lago, stagno, prato, foresta, acqua di scarico ecc.) dipende soprattutto dallo sforzo di campionamento. Un conto, infatti, è trovare 10 taxa in un ambiente avendo esaminato 50 esemplari, altra cosa è trovarne 10 dopo aver esaminato 1000 esemplari in un altro sito. Si ha ragione di pensare che quest'ultimo abbia una biodiversità molto minore del primo.

Dato che nel primo dei due ambienti è bastato l'esame

di 50 esemplari presi a caso per trovare 10 taxa, ci si può chiedere: quanti taxa si sarebbero trovati esaminando 100 esemplari? La risposta è: di sicuro molto meno del doppio di 10. Il perché è ovvio ed è dovuto anche al fatto che in natura esistono sempre molte specie rare e poche specie comuni. Sia che si tratti di alberi, di farfalle, di pesci o di nematodi.

Lungo tutto il corso del fiume Lambro, a nord e a sud di Milano, sono stati campionati nematodi da molti sedimenti, e il risultato complessivo è illustrato in figura 1.

Si tratta di 89 specie, ma solamente 6 di esse sono state raccolte in più di 500 esemplari. Le tre specie più abbondanti sono: *Paroigolaimella bernensis*, *Plectus aquatilis*, *Propanagrolaimus hygrophilus* (Zullini, 1988). Le specie rare non sono da trascurare, ma è evidente che il significato (e l'impatto) ecologico maggiore è dato dalle specie più comuni.

Quanto detto è indispensabile per poter ora affrontare il tema della diversità e della sua misurazione. Ricordiamo che il testo più chiaro, e ricco di esempi pratici, per approfondire tale argomento è quello di Magurran (2013).

Dalla figura 1 risulta evidente che il rapporto tra numero di esemplari e il numero di specie non è lineare, ma semmai logaritmico. Ecco perché l'ecologo catalano Margalef ha rapportato il numero delle specie (S) non già col numero degli individui (N) campionati, ma col logaritmo di tale numero, cioè $S/\ln N$.

Se in un campione si trovasse una sola specie (S=1), ciò significherebbe un'uniformità massima e quindi una biodiversità nulla, cioè pari a zero. Ma $1/\ln N$ non potrà mai dare zero, pertanto è necessaria una correzione al numeratore, in modo da ottenere diversità zero nel caso che ci sia una sola specie (per es. in una monocoltura). Ed così che ha preso forma l'indice di Margalef (1958):

$$I = \frac{S - 1}{\ln N}$$

Questo non è, rigorosamente parlando, un indice di

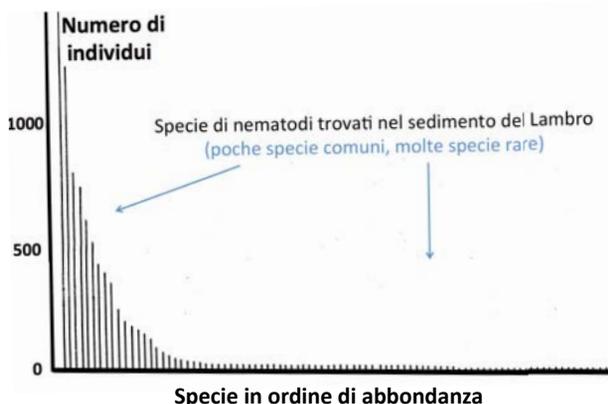


Fig. 1. Grafico relativo alla comunità dei nematodi raccolti con vari campionamenti nel fondale del fiume Lambro. Gran parte delle specie è rappresentata da pochi esemplari (specie rare), mentre poche specie sono abbondanti.

diversità, ma di un indice di *ricchezza in specie*. Tale indice, infatti, considera il numero delle specie, ma non le loro proporzioni.

La *diversità* (si veda il box: “Da dove viene la formula di Shannon?”) è infatti altra cosa rispetto alla *ricchezza in specie*. Supponiamo di avere la situazione seguente:

Primo caso:

sp. 1 con 34 individui

sp. 2 con 33 individui

sp. 3 con 33 individui

Avremo quindi 3 specie (S=3) avendo campionato 100 individui (N=100). Applicando la formula di Margalef si ottiene 0,43. Se invece ci fosse stata una netta prevalenza di una specie e i dati rilevati fossero stati i seguenti:

Secondo caso:

sp. 1 con 90 individui

sp. 2 con 5 individui

sp. 3 con 5 individui

avremmo anche qui S=3 ed N=100 e quindi l'indice di ricchezza in specie non sarebbe diverso. Eppure nel secondo caso c'è una più grande uniformità ambientale, dato che la sp. 1 è assolutamente dominante (al 90%). In altre parole: la diversità ecologica è molto più bassa che nel primo esempio. L'indice di Margalef, molto utile in certi contesti, in questo caso non discrimina le due situazioni.

Esistono tuttavia numerosi indici di diversità capaci di distinguere i nostri due casi. Il più usato è quello proposto dall'informatico statunitense Shannon (1948) per la probabilità statistica (legata alla misura del disordine o entropia):

$$H' = - \sum p_i \cdot \log_2 p_i$$

dove p_i è la probabilità (o la percentuale) di presenza della specie i -esima. Tale percentuale, moltiplicata per il proprio logaritmo, va sommata con gli analoghi risultati delle altre specie i -esime. Il segno meno davanti al simbolo di sommatoria è dovuto al fatto che le singole percentuali (ponendo 100% = 1), iniziando con zero, danno logaritmi negativi, ed è ovviamente poco pratico avere un indice di diversità con segno negativo.

H' primo caso =

$$-(0,34 \log_2 0,34 + 0,33 \log_2 0,33 + 0,33 \log_2 0,33) = \mathbf{1,58}$$

H' secondo caso =

$$-(0,90 \log_2 0,90 + 0,05 \log_2 0,05 + 0,05 \log_2 0,05) = \mathbf{0,57}$$

È logico che H' sia maggiore dove ciascuna delle tre specie è ben rappresentata e quindi l'ambiente (dal punto di vista di queste specie) è più vario.

L'indice H' non ha un limite superiore, ma negli ecosistemi naturali (calcolato in base 2) raramente supera il 4. Valori inferiori a 2 sono considerati indicatori di

ambienti a bassa diversità. Questo indice, insomma, risponde a due fattori: numero delle specie e rappresentatività di ciascuna specie. Se il numero di specie in un sito è S , il valore massimo che l'indice di Shannon può assumere è

$$H'_{\max} = \log_2 S$$

Ciò si verifica, ma solo in teoria, quando tutte le specie sono ugualmente abbondanti. Nel nostro caso (con $S=3$) il valore massimo possibile dell'indice è quasi 1,59.

I *calculator* (gratuiti) in rete forniscono di solito il

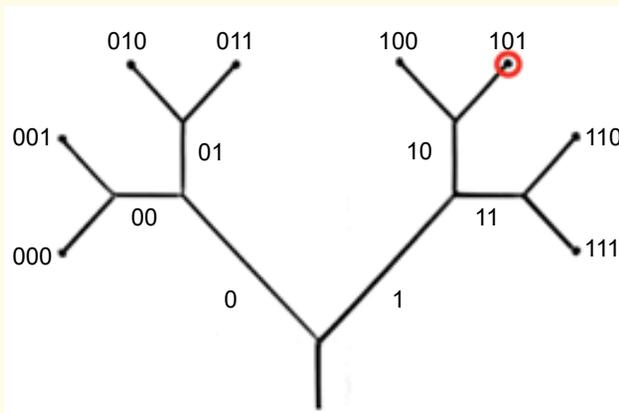
risultato dell'indice di Shannon calcolato col logaritmo naturale (\ln), anch'esso valido. Se invece si vuole ottenere il valore calcolato col logaritmo in base 2 (seguendo la logica informatica che si esprime in *bit*), basta moltiplicare il risultato (in logaritmo naturale) per 1,443^(*).

(*) Per trovare il *calculator* che qui interessa basta digitare in rete: *omni calculator shannon*

Da dove viene la formula di Shannon?

L'unità di informazione (dal latino *in-formare*, formare dentro la mente), è il *bit* (*binary digit*) che può essere così definito: *1 bit è la quantità di informazione necessaria per dimezzare la precedente incertezza.*

In una logica binaria, infatti, ogni domanda ha solo due risposte (sì/no; presente/assente; destra/sinistra; acceso/spento, ecc.) espresse con le due cifre [1/0].



Nella figura è rappresentato un albero dicotomico che termina con 8 punti diversi. Ogni punto può rappresentare una località, una specie vivente, un oggetto, una teoria, o una risposta a particolari domande. Supponiamo che il punto cerchiato in rosso sia una certa località che si vuole raggiungere.

Per fare ciò non è necessario esaminare (percorrere) tutti gli 8 punti, bastano 3 sole informazioni. Infatti poniamo che [1] significhi *vai a destra*, e [0] significhi *vai a sinistra*. Partendo dal basso per arrivare al punto voluto, le decisioni da prendere a ogni bivio saranno queste tre: *dx, sin, dx*, cioè 1, poi 0, poi 1. Si noti che la base (binaria) 2 elevata a 3 (decisioni) fa 8, ovvero $2^3 = 8$. In altre parole, 3 bit di informazione bastano per individuare uno degli 8 esiti.

Ricordando che il logaritmo è l'esponente di una base, diremo allora che (una volta fissata la base) la quantità d'informazione è espressa da un logaritmo.

Riprendiamo un esempio tratto da Richard Dawkins (2004). Quando a un padre, in attesa presso la sala parto, arriva l'annuncio dell'infermiera: "Femmina!", vede dimezzata l'incertezza precedente (che era $p=0,5$ che fosse maschio, e $p=0,5$ che fosse femmina, essendo i due esiti equiprobabili). Il neopadre ha ricevuto dall'infermiera 1 bit di informazione dal momento che

$$-\log_2(0,5) = 1 \text{ bit}$$

Supponiamo che invece fosse stato l'amico medico a dirgli: "Congratulazioni, vecchio mio, ti annuncio che oggi ti è nata una figlia" (12 parole invece di 1): in tal caso avrebbe ricevuto più informazioni? No, l'informazione è la stessa, ciò che cambia è solo la *ridondanza*. Il concetto di ridondanza di un messaggio (con quello di *rumore*) è molto importante nella teoria dell'informazione.

Ma non tutti gli eventi hanno la stessa probabilità di accadere. Se un evento è certo con una probabilità del 100% (cioè $p=1$), la sua quantità di informazione è $-\log_2(1) = 0$ bit. Se per esempio dico: "Tu sai che oggi è martedì. Ebbene, ti comunico che domani sarà mercoledì", non fornisco informazione, perché non riduco nessuna incertezza. Viceversa, se un evento è poco probabile, affermare che accadrà significa fornire un'informazione (vera o falsa che sia) di un certo peso.

Supponiamo che in un ambiente vivano soltanto due specie (di un certo gruppo zoologico o botanico): una specie comune (probabilità di incontrarla 90%) e l'altra meno comune (probabilità 10%). Da quanto appena detto, trovare un individuo della specie comune porta con sé pochi bit di informazione (infatti è un reperto piuttosto prevedibile)

$$-\log_2(0,90) = 0,15 \text{ bit}$$

Un individuo della specie poco comune fornisce invece molta più informazione (uno non se lo aspetta)

$$-\log_2(0,10) = 3,32 \text{ bit}$$

Ma a noi interessano tutti gli individui delle varie specie. Per questo basterà moltiplicare l'informazione fornita dal singolo individuo per la percentuale di presenza degli individui della sua specie.

Ritornando all'esempio, per la specie più comune (90%) avremo $0,15 \cdot 0,90 = 0,14$ e per la specie più rara (10%) avremo $3,32 \cdot 0,10 = 0,33$. L'informazione complessiva per tutte le (due) specie del sito studiato sarà la somma di tali prodotti (0,47).

Eccoci arrivati: questo non è altro che l'indice di Shannon.

INDICI BASATI SUI NEMATODI

Gli indici sopra menzionati sono universali dato che sono applicabili a qualunque gruppo di viventi: orchidee, funghi, nematodi, uccelli o mammiferi. Ma nei nematodi d'acqua dolce, come in tutti i viventi, vi sono specie e generi molto diversi per dimensioni, per tipo di alimentazione e di habitat. Si pensi che, tra le 120 specie strettamente d'acqua dolce considerate da Zullini e Semprucci (2020), la lunghezza del nematode più lungo (6,05 mm) è quasi 20 volte maggiore della specie più corta (0,31 mm). E la specie più voluminosa (90 µg) è 1800 volte più pesante della specie più piccola (0,05 µg). Non parliamo poi delle differenze alimentari, di metabolismo, ciclo vitale ecc. che fanno dei nematodi acquatici un gruppo tutt'altro che omogeneo. Ecco perché sono stati proposti indici specifici basati su questi animali. La loro presenza/assenza fornisce preziosi indizi sulle condizioni ecologiche dell'ambiente studiato.

Indice di inquinamento

Un primo indice basato sui nematodi (Zullini, 1976) è stato proposto in seguito all'osservazione che nei sedimenti delle acque molto inquinate da scarichi fognari, o da residui organici industriali, è sempre presente una grande carica batterica che alimenta numerosi protozoi. Tutti questi microrganismi a loro volta costituiscono un

eccellente *pabulum* per rotiferi, gastrotrichi, nematodi e altri piccoli animali pluricellulari. Le comunità di nematodi sono però particolari: consistono in maggioranza di specie appartenenti ai Secernentea (oggi diremmo: ordine Rhabditida), cosa non usuale in acque normali non inquinate. Pertanto un primo indice, valido ancor oggi, è dato semplicemente dalla percentuale dei Rhabditida (nematodi facili da riconoscere):

$$\text{Indice di inquinamento} = \frac{100 * Rhabditida}{nematodi\ totali}$$

Tale indice, che teoricamente va da 0 a 100, è strettamente correlato col livello di inquinamento delle acque. Se l'indice risulta basso, significa che l'ambiente acquatico in questione si trova in una condizione naturale senza problemi di inquinamento. Se il valore supera il 20% allora c'è motivo di preoccupazione; se poi si avvicina al 100% vuol dire che l'ambiente è simile a una fogna a cielo aperto.

Va precisato che dai Rhabditida devono essere esclusi (e non calcolati nel conteggio totale) i Tylenchomorpha (essendo per lo più parassiti di piante e non veramente acquatici), nonché le specie *Fictor fictor* e *Pareudiplogaster pararmatus* che, cibandosi di diatomee e di altre alghe unicellulari, sono tipici di acque pulite (Zullini 1976; Niemann *et al.*, 1996; Bongers e Bongers, 1998).

Strategie riproduttive

Un indice più sofisticato (Maturity Index) si basa sul gradiente riproduttivo r-K. Spieghiamolo con un esempio. Se collochiamo un organismo (per es. microbo, verme, cavalletta, coniglio) in un ambiente ottimale, senza limiti di spazio o cibo e senza predatori e parassiti, allora da uno o pochi individui (N) iniziali si può assistere a un aumento demografico esponenziale del tipo 2, 4, 8, 16... nel corso delle generazioni. La velocità con cui ciò avviene è sempre proporzionale al numero di individui presenti (curva blu di figura 2).

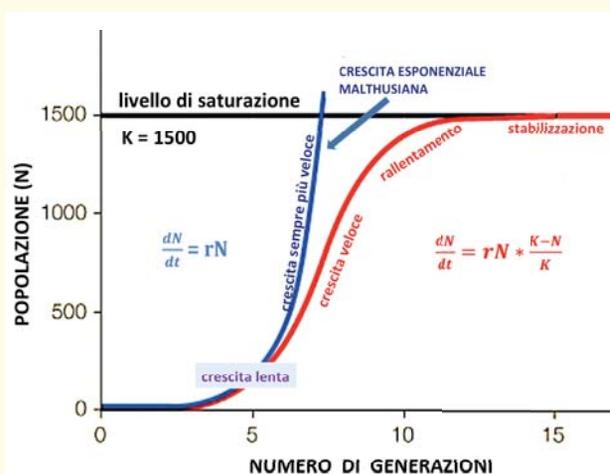


Fig. 2. Due tipi di accrescimento demografico: quello malthusiano (in blu) e quello a curva logistica o curva sigmoide (in rosso).

L'incremento (differenza) del numero di individui (dN) dopo un certo intervallo di tempo (dt), ovvero dN/dt , non è altro che la *velocità di crescita* della popolazione in quell'intervallo. L'aumento di una popolazione è cioè proporzionale alla popolazione stessa. In altre parole: tanto più la popolazione è numerosa, tanto più velocemente si accresce. Per esempio, l'aumento da 8 a 16 individui, è più grande che nella generazione iniziale (meno numerosa) dove da 2 individui si arrivava a 4. La popolazione, da una generazione all'altra, cresce sempre più in fretta. Per calcolare il tasso di crescita, il numero di individui (N) di una generazione va in ogni caso moltiplicato per una costante riproduttiva (r), da cui la formula $dN/dt = rN$.

Gli organismi che tendono a riprodursi in questo modo sono chiamati a *strategia riproduttiva r* (oppure *r-strateghi*), perché il loro unico limite alla velocità di espansione è il proprio tasso riproduttivo (r). Quando le risorse alimentari finiscono (per es. le cavallette non hanno più foglie da mangiare, o certi nematodi non possono più alimentarsi nello sterco ormai secco in cui prosperavano), la popolazione cessa di crescere perché praticamente tutti gli individui smettono di riprodursi o muoiono di fame.

Tuttavia esistono altri organismi che, anche in condizioni ottimali, non “esagerano” con la riproduzione e, col diminuire delle opportunità alimentari, rallentano il proprio ritmo riproduttivo ben prima di esaurire le risorse ambientali (curva rossa di figura 2).

Ogni ambiente, infatti, può ospitare una popolazione (N) di organismi solo entro un certo limite massimo, detto livello di saturazione o capacità portante (*carrying capacity*), chiamato K. Quindi K coincide col numero (N) massimo possibile per una popolazione che possa rimanere stabile nel tempo.

Dalla formula riportata in figura si vede subito che quando $N=0$, cioè quando la popolazione iniziale è ancora zero o prossima allo zero, la formula a destra (in rosso) diventa uguale a quella di sinistra (in blu). All'inizio, dunque, l'accrescimento in un nuovo ambiente è sempre di tipo esponenziale. Una volta arrivati alla stabilizzazione (curva rossa), si avrà $N=K$ e quindi $K-N=0$. Di conseguenza anche $dN/dt = 0$ il che significa che la variazione di N nel tempo, cioè la velocità di crescita, si azzerava. La popolazione non aumenta più avendo raggiunto la capacità portante dell'ambiente in cui vive. Gli organismi che seguono questo andamento (curva logistica di Verhulst) sono detti *a strategia riproduttiva K* (oppure *K-strategie*).

Per fare un esempio riguardante due animali ben noti (ambedue mammiferi dell'ordine Roditori) diremo che il topo domestico, le cui femmine possono partorire fino a 50 figli all'anno, è una specie r-stratega. Invece la marmotta, le cui femmine partoriscono solo 3-4 figli all'anno, è una specie K-stratega.

Va da sé che un neonato di topo ha una bassa probabilità di vivere a lungo e di riprodursi (per questo una madre fa tanti figli). Invece la strategia della marmotta, che punta sulla qualità (cure materne, tana accogliente) piuttosto che sulla quantità, fa sì che un neonato abbia un'alta probabilità di diventare adulto e di riprodursi. Ecco spiegato il minor numero di figli. Ambedue le strategie funzionano bene in natura, ma per specie e per contesti ecologici differenti.

Specie colonizzatrici r-strategie

Esistono nematodi (rhabditidi, diplogastridi, panagrolaimidi) con una cuticola che difende bene il corpo dall'entrata di sostanze inquinanti e nocive. Si tratta di specie che maturano sessualmente molto in fretta (anche 2-3 giorni dopo la nascita) e sono dotate di un grosso apparato riproduttore capace di fornire numerose piccole uova. Presentano un alto tasso riproduttivo (r) e, purché un ambiente sia ricco di batteri, da uno o pochi individui si può sviluppare una popolazione numerosissima dopo poche generazioni.

Questi nematodi si nutrono infatti dei numerosi batteri che proliferano su sostanze organiche in decomposizione quali sterco, animali morti, oppure frutti e legni marcescenti. Dato che si sviluppano approfittando di ambienti eutrofici (cioè ricchi di sostanza organica) sovente temporanei, sono definiti *enrichment opportunists*.

Questi nematodi, dovendo sfruttare substrati spesso effimeri, devono arrivare e moltiplicarsi al più presto sul posto, prima che il substrato venga interamente decomposto e mineralizzato. Per questo molti si lasciano trasportare (*foresi*) da chioccioline o insetti che amano frequentare materiali marcescenti.

Bisogna infatti sapere che quando questi nematodi da giovani (secondo stadio larvale L2) si trovano in difficoltà per scarsità di cibo (batteri), per troppo affollamento o per temperature troppo calde o fredde, diventano *dauer larvae* (= larve durature, resistenti), che sono uno stadio dormiente corrispondente alla diapausa. In questa condizione, che può durare molto più a lungo (alcuni mesi) della vita normale, l'intestino si fa scuro per l'accumulo di sostanze grasse di riserva, e l'individuo smette praticamente di muoversi e di crescere riducendo il metabolismo quasi a zero. Spesso si pone in verticale appoggiandosi al terreno con l'estremità posteriore, in attesa di attaccarsi a qualche insetto di passaggio. Si spiega così il fatto che molti coleotteri stercorari ospitano sul corpo, o sotto le elitre, nematodi che poi cadono sullo sterco da colonizzare. Queste stesse specie, oltre che nel suolo, possono trovarsi in quantità anche nei sedimenti di laghi, stagni e fiumi ricchi di batteri, in condizioni di elevato inquinamento organico.

Il metabolismo di questi nematodi, se non sono in fase *dauer*, è molto alto e infatti non cessano mai di muoversi e di nutrirsi. Il loro esofago, che lavora come una pompa aspirante, è continuamente in attività anche se intorno non ci sono batteri da ingerire. Ciò significa che l'assunzione del cibo è poco efficiente ed è per questo che, quando i batteri scarseggiano, sopravvivono solo gli individui che passano allo stadio di *dauer larva*.

Tutte queste caratteristiche fanno di questi nematodi dei perfetti colonizzatori. Il nematologo olandese Bongers (1990) li ha definiti *colonizers*, inserendoli nella categoria dei colonizzatori estremi *c-p 1*.

Specie opportuniste generali

Esiste anche un'altra categoria di nematodi colonizzatori, simili per ecologia a quelli appena descritti, ma con tassi riproduttivi (r) un po' meno elevati e senza stadi di *dauer larva*. La loro alimentazione è efficiente (l'esofago pulsa solo se c'è qualcosa da aspirare), quindi hanno un metabolismo un po' meno elevato e possono vivere anche dove il cibo (batteri, funghi) è poco abbondante. Al pari della categoria *c-p 1*, tollerano bene stress e inquinamenti ma, non dipendendo in modo esclusivo dai fattori eutrofizzanti (alte concentrazioni di sostanze organiche ricche di batteri), sono definiti *general opportunists*. Ad essi è stata assegnata la categoria *c-p 2*.

Specie persistenti (K-strategie)

In tutto sono state definite 5 categorie ecologiche per i nematodi del suolo, acqua dolce e marina come illustrato in figura 3. L'ultima, la *c-p 5*, comprende le specie maggiormente K strategie, dato che producono poche uova, ma relativamente grandi essendo ricche di sostanze nutritive per il buon sviluppo dell'embrione. Si tratta di specie dalla cuticola poco atta a difendere il corpo da sostanze nocive o inquinanti.

Molti tra questi nematodi sono di grandi dimensioni (> 2 mm), hanno un basso metabolismo e si muovono lentamente. Si nutrono di piccoli animali (rotiferi, nematodi, tardigradi), di eucarioti unicellulari (protozoi, alghe unicellulari, spore fungine) o assumono clorofilla da dove capita. Alcuni sono considerati predatori (carnivori), altri onnivori (Yeates *et al.*, 1993). I primi sono muniti di denti boccali anche potenti, mentre gli onnivori hanno uno stiletto boccale protrusibile e succhiante.

Si tratta di nematodi indicatori di ambienti non inquinati né stressati, ecologicamente stabili e maturi, con reti alimentari complesse. Per questo tali nematodi hanno caratteristiche opposte a quelle dei *colonizers*, e infatti sono definiti *persisters*, cioè stabili e persistenti nel proprio ambiente.

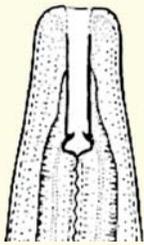
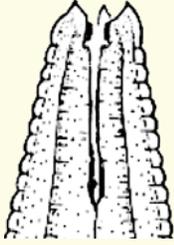
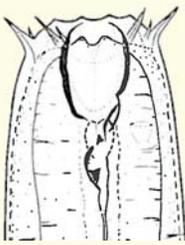
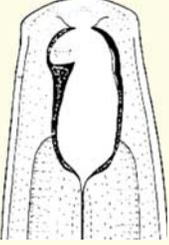
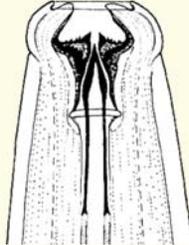
	c-p 1	c-p 2	c-p 3	c-p 4	c-p 5
Ciclo vitale	giorni o settimane	settimane	settimane	settimane, mesi	anche molti mesi
Tasso riproduttivo	molto elevato	elevato	medio	medio o lento	lento
Gonadi	grandi	grandi	medie	piuttosto piccole	piccole
Uova	numerose, piccole	numerose, piccole	poche; medie o grandi	poche; medie o grandi	poche, grandi
Alimentazione	batteri	batteri, funghi, piccoli animali	batteri, funghi, piccoli animali	grandi carnivori, piccoli onnivori, alcuni batteriofagi	carnivori, onnivori
Metabolismo	elevato se cibo abbondante	elevato; attivi anche con cibo scarso	medio	molto mobili se carnivori; lenti i non-carnivori	basso; movimenti veloci solo nei carnivori
Tolleranza	all'inquinamento organico	a tutti i tipi di inquinamento	scarsa all'inquinamento	quasi zero	zero
Dauer larva	sì	no	no	no	no
Esempi	Rhabditidae, Diplogastridae, Panagrolaimidae	Cephalobidae, Monhysteridae, Plectidae	Tobrilidae, Teratocephalidae, Chromadoridae	Mononchidae, Dorylaimidae, Alaimidae	grandi e piccoli dorilaimi, grandi carnivori
Esempio grafico					

Fig. 3. Le cinque categorie di c-p usate per il calcolo del Maturity Index. Il valore di c-p è attribuito alle famiglie, pertanto non è necessario (per il calcolo di MI) arrivare all'identificazione del genere o della specie.

MATURITY INDEX

Questo indice è basato sui concetti esposti nel Box "Strategie riproduttive".

La collocazione dei generi di nematodi nel gradiente *c-p* (*colonizers-persisters*) permette di calcolare, partendo dalla composizione di una comunità nematologica, un indice che riflette la situazione media complessiva del biotopo studiato. Tale indice (Bongers, 1990), detto Indice di maturità (ambientale) o *Maturity Index* (MI), si calcola con la formula seguente:

$$MI = \sum v_i p_i$$

dove v_i è il valore di *c-p* della famiglia *i*-esima, mentre p_i è la percentuale della stessa *i*-esima famiglia entro la comunità di nematodi studiata. La somma dei valori di ciascuna famiglia, pesati per la loro rappresentanza percentuale, fornisce l'indice sintetico MI di qualità ambientale. Tale indice può teoricamente andare da 1 (solo generi di *colonizers* estremi) a 5 (solo generi di *persisters* estremi). Quando MI ha un valore basso, significa che il suolo o il sedimento è inquinato o comunque diverso da una condizione naturale. Se MI ha un valore alto vuol dire che l'ambiente in questione è in una situazione naturale ed ecologicamente matura. Aspetti molto interessanti su questo indice sono discussi in Bongers e Ferris (1999).

Supponiamo di esaminare un sedimento fluviale contenente solamente 4 generi trovati nelle seguenti proporzioni:

<i>Diplogaster</i>	(<i>c-p 1</i>)	20%
<i>Nygolaimus</i>	(<i>c-p 5</i>)	10%
<i>Plectus</i>	(<i>c-p 2</i>)	60%
<i>Tobrilus</i>	(<i>c-p 3</i>)	10%

Applicando la formula avremo:

$$MI = 1 \cdot 0,20 + 5 \cdot 0,10 + 2 \cdot 0,60 + 3 \cdot 0,10 = 2,20$$

MI 2-5

L'inquinamento delle acque, e non solo, ha due facce: *inquinamento organico* (da reflui fognari, scarti agricoli e da macellazione, da cartiere, ecc.) e *inquinamento inorganico* (metalli pesanti, sali di vario tipo, scarti chimici industriali, acidi, ecc.). L'analisi nematologica è in grado di distinguere i due tipi di inquinamento?

Sappiamo che i nematodi *c-p 1* dipendono strettamente dalla concentrazione batterica e quindi dalle sostanze organiche in decomposizione presenti nell'ambiente. Invece le specie e i generi *c-p 2* sopravvivono bene anche se i batteri e il materiale organico sono poco abbondanti. Ambedue le categorie resistono alle alterazioni e agli stress ambientali anche grazie alla loro cuticola poco permeabile alle sostanze nocive.

Se il valore del Maturity Index di un certo ambiente risulta basso, ciò potrebbe essere dovuto o agli inquinanti organici oppure a quelli inorganici (o a tutti e due). Però se si eliminano dal calcolo i nematodi *c-p 1* (i più dipendenti dalle sostanze organiche), allora

ciò che resta dipende maggiormente dagli altri tipi di stress (in pratica: sostanze inorganiche). Sta di fatto che ambienti variamente inquinati da metalli pesanti sono meglio correlati col Maturity Index privo del gruppo *c-p 1* (perciò chiamato MI 2-5) che col Maturity Index completo (MI 1-5).

In conclusione, ambedue gli indici sono utili: il MI 1-5 (o semplicemente MI) serve a fornire un quadro ecologico complessivo, inquinamento organico compreso; mentre l'indice MI 2-5 fornisce una valutazione che tiene conto, in particolare, dell'inquinamento inorganico, o comunque di tipi di stress non dovuti a materia organica.

IL TRIANGOLO ARRICCHIMENTO-STRESS-STABILITÀ

Una volta calcolato l'indice MI, spesso è utile "guardarvi dentro", cioè puntare l'attenzione sulle sue tre componenti più significative, ovvero la percentuale dei *c-p 1* (*enrichment opportunists*, indicatori di inquinamento organico), dei *c-p 2* (*general opportunists*, indicatori generici di stress) e dei *c-p 3-5* (indicatori di situazioni discrete, buone e molto buone).

Riprendiamo l'esempio dei quattro generi di sedimento fluviale considerando questa volta le loro tre componenti di MI in percentuale:

<i>c-p 1</i>	→	20% (rosso)
<i>c-p 2</i>	→	60% (blu)
<i>c-p 3-5</i>	→	20% (verde)

La loro collocazione in un diagramma a triangolo è mostrata nella figura 4.

La posizione del punto nel triangolo fornisce l'immagine immediata dell'importanza delle tre componenti (*c-p 1*, *c-p 2*, *c-p 3-5*) nell'ambiente considerato (e del loro peso nel determinare il Maturity Index complessivo). Nel nostro caso vediamo che la comunità nema-

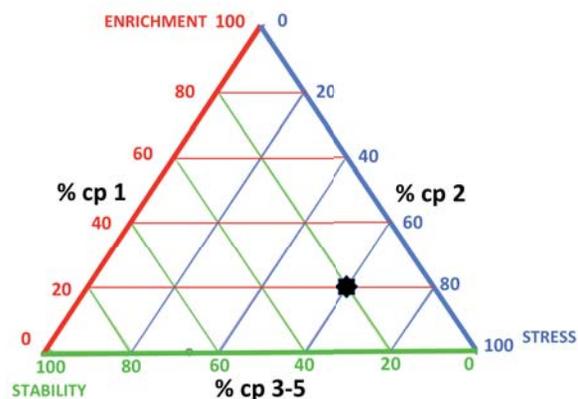


Fig. 4. Anche per poter confrontare due o più comunità di nematodi, è utile non limitarsi a riportare il valore del Maturity Index (nel nostro esempio MI = 2,20), ma collocare il risultato delle sue componenti nel triangolo Arricchimento-Stress-Stabilità, come indicato in figura.

tologica dell'esempio rivela che l'ambiente è piuttosto stressato al 60% (lato blu), è dotato di scarsa stabilità (lato verde), e tuttavia non è eccessivamente inquinato da sostanze organiche (lato rosso). Per l'interpretazione di questo ed altri aspetti, si vedano Ferris e Bongers (2009), Höss e Traunspurger (2021).

ANALISI DELLA RETE ALIMENTARE

Analisi ancor più dettagliate delle comunità nematologiche forniscono ulteriori informazioni di qualità ambientale, ma le tralasciamo perché, oltre ad essere molto complesse, sono pensate e validate specificatamente per il suolo e non per le acque dolci (Ferris *et al.*, 2001). Diremo soltanto che in tale articolo vengono incrociati, per i diversi nematodi, i loro dati *c-p* con quelli delle rispettive abitudini alimentari, ricavandone nuove informazioni e parametri quali l'indice di arricchimento (di sostanze organiche), chiamato *Enrichment Index*, e l'indice di struttura (della rete alimentare), chiamato *Structure Index*.

Un programma computerizzato (NINJA) dà per i 4 generi dell'esempio riportato nel paragrafo Maturity Index, il seguente risultato:

$$\text{Enrichment Index} = 57,1$$

$$\text{Structure Index} = 58,6$$

Ciò può essere rappresentato con un istogramma a colonne oppure con un diagramma cartesiano come in figura 5 dal quale si vede che il punto risultante, collocato nel quadrato in alto a destra (ma in posizione non estrema), illustra una situazione coerente con quanto esplicitato dal triangolo di figura 4.

Esiste un ottimo programma informatico (Sieriebriennikov *et al.*, 2014) che ci può aiutare in tutti questi calcoli. Si chiama NINJA ed è reperibile (gratis) in: <https://shiny.wur.nl/ninja/>. Dapprima va preparato un foglio Excel che, nel caso del nostro esempio, va scritto seguendo lo schema della figura 6.

È essenziale che i nomi dei generi siano in ordine alfabetico e che inizino con la colonna C. Potrebbe succedere di non essere sicuri dell'identificazione, per esempio, del genere *Diplogaster*, ma che non si abbiano dubbi sul fatto che quegli esemplari appartengano alla famiglia Diplogastridae avendo l'esofago apparentemente sdoppiato (diplo). In tal caso si può scrivere il nome della famiglia invece del genere: funziona lo stesso. In alcuni casi ciò potrebbe portare a un risultato finale leggermente diverso, ma sempre accettabile.

Inserendo il foglio Excel nel citato programma e cliccando poi, in alto, su *Summary, Feeding types*, ecc., si ricaverà il valore di MI, di MI 2-5 e di tanti altri parametri più o meno utili per la nostra analisi ambientale.

A titolo esemplificativo ecco l'elaborazione finale dei dati nematologici relativi a quattro punti del torrente Seveso (a nord di Milano). Le quattro stazioni di

prelievo distano dalla sorgente da 1-2 km (staz. 1) fino a 41 km (staz. 4), cioè fin quasi al termine del corso d'acqua (Zullini, 1976). Vi si nota un crescente aumento dell'inquinamento, soprattutto organico (Fig. 7).

CONCLUSIONI

Ogni analisi ambientale, chimica o biologica che sia, richiede tempo e tecniche specifiche. L'analisi basata sui nematodi, anche se poco comune, non è più difficile o gravosa di qualsiasi altra. I suoi vantaggi consistono nel poter essere condotta anche se si hanno a disposizione soltanto pochi centimetri cubi di sedimento. Ed è vantaggiosa anche dove, per qualche motivo, i macroinvertebrati acquatici sono introvabili. Inoltre, dato il ciclo biologico relativamente breve dei nematodi, la loro risposta ai cambiamenti ambientali è più veloce di quella dei macroinvertebrati acquatici e quindi fornisce un'informazione di un più ristretto, e recente, arco temporale. Questo è un pregio se si è interessati alla situazione ecologica esistente negli ultimi giorni o nelle ultime settimane. Se però si è interessati a un quadro temporale più ampio (mesi) è meglio ricorrere all'analisi dei macroinvertebrati. Gli indici basati sui nematodi e sui macroinvertebrati sono infatti complementari.

Non importa se l'elenco dei nematodi che ne risulta deriva da manuali di identificazione tradizionali oppure dal DNA ambientale (*environmental DNA*, noto come eDNA). L'importante è saper leggere e interpretare l'e-

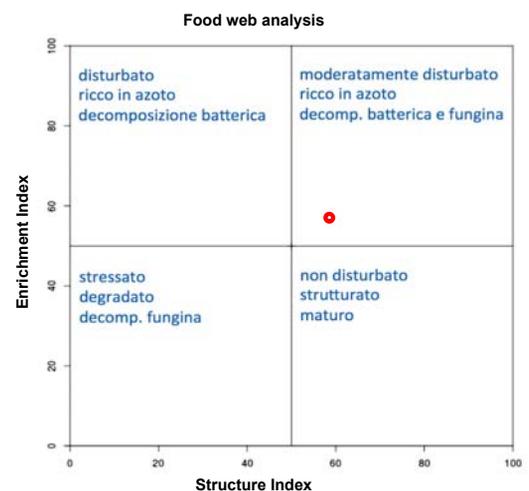


Fig. 5. L'analisi della rete alimentare colloca l'ipotetica comunità del nostro esempio nel quadrato in alto a destra (cerchietto rosso).

	A	B	C	D	E	F
1			Diplogaster	Nygolaimus	Plectus	Tobrilus
2	AZ	prova	20	10	60	10
3						
4						

Fig. 6. Disposizione dei taxa e dei valori numerici per il programma NINJA.

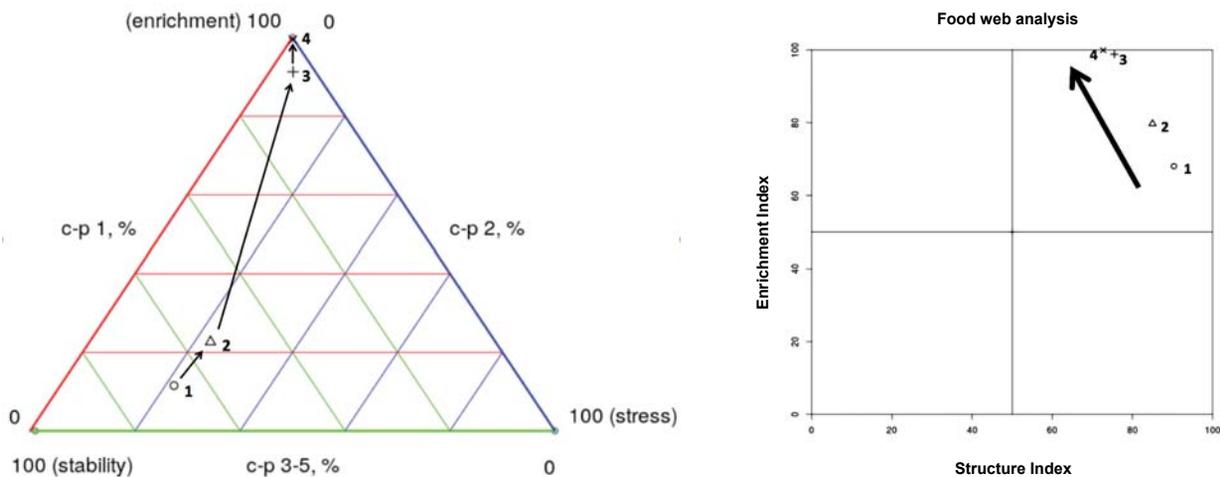


Fig. 7. Elaborazione dei dati (programma NINJA) di 4 comunità di nematodi lungo il torrente Seveso. Dal triangolo si vede che la situazione ambientale della stazione 1 (vicina alla sorgente) è, in base alla comunità nematologica, abbastanza stabile (quasi il 70% dell'asse *stability*), poco stressata (solo circa il 20% dell'asse *stress*), e poco soggetta all'inquinamento organico (poco più del 10% dell'asse *enrichment*). Lungo il percorso la qualità ambientale del torrente peggiora fino al termine (stazione 4) dove l'inquinamento soprattutto organico raggiunge valori estremi dato che il suo *enrichment* (segnato da una ×) resenta il 100%. Anche il successivo diagramma quadrato conferma tale andamento, ma in modo diverso dato che contempla anche il tipo di alimentazione dei nematodi coinvolti.

lenco delle famiglie, dei generi o delle specie in modo corretto e significativo, per una giusta valutazione della qualità ambientale.

Ringraziamenti

Ringrazio due anonimi revisori per i suggerimenti che hanno migliorato il testo.

BIBLIOGRAFIA

- van Bezooijen J., 2006. *Methods and techniques for nematology*. Wageningen, 112 pp.
- Bongers T., Bongers M., 1988. Functional diversity of nematodes. *Applied Soil Ecology*, **10**: 239-251.
- Bongers T., 1990. The maturity index: an ecological measure of environmental disturbance based on nematodes species composition, *Oecologia*, **83**: 14-19.
- Bongers T., Ferris H., 1999. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. *TREE*, **14**: 224-228.
- Dawkins R., 2004. *Il cappellano del diavolo*. Cortina, 348 pp.
- 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.
- Ferris H., Bongers T., 2009. Indices developed specifically for analysis of nematode assemblages. In: Wilson M.J., Kakouli-Duarte T., (eds.), *Nematodes as environmental indicators*, CAB International, Wallingford, 124-145.
- Ghetti P.F., 1980. Biological indicators of the quality of running waters. *Boll. Zool. (Italian Journal of Zoology)*, **47**: 381-390.
- Höss S., Traunspurger W., 2021. Freshwater nematodes as bioindicators in field studies – The NemaSPEAR[%]-index. In: Traunspurger W. (ed.), *Ecology of freshwater nematodes*, CAB International, Wallingford, 323-340.
- van den Hoogen J. *et al.*, 2019. Soil nematode abundance and functional group composition at a global scale. *Nature*. <https://www.nature.com/articles/s41586-019-1418-6>
- Magurran A.E., 2013. *Measuring biological diversity*. Wiley-Blackwell, 266 pp.
- Margalef D.R., 1958. Information Theory in Ecology. *General Systematics*, **3**: 36-71.
- Niemann R., Arens R., Koczwara K., Sturhan D., 1996. Untersuchungen über die Eignung von Nematoden zur Gütebewertung von Fließgewässern. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem*, **317**: 195-208.
- Sieriebriennikov B., Ferris H., de Goede R.G.M., 2014. NINJA: an automated calculation system for nematode-based biological monitoring. *European Journal of Soil Biology*, **61**: 90-93.
- Shannon C.E., 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal*, **27**: 379-423 and 623-656.
- Stark J.D., 1998. SQMCI: a biotic index for freshwater macroinvertebrate coded-abundance data. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **32**: 55-66.
- Yeates G.W., Bongers T., de Goede R.G.M., Freckman D.W., Georgieva S.S., 1993. Feeding habits in soil nematode families and genera – An outline for soil ecologists. *Journal of Nematology*, **25**: 315-331.
- Zullini A., 1976. Nematodes as indicators of river pollution. *Nematologia mediterranea*, **4**: 13-22.
- Zullini A., 1988. The ecology of the Lambro River. *Rivista di Idrobiologia*, **27**: 39-58.
- Zullini A., Semprucci F., 2020. Morphological differences between free-living soil and freshwater nematodes in relation to their environments. *Nematology*, **22**: 125-132.
- Zullini A., 2021. Nematodi d'acqua dolce. Manuale di identificazione al genere e metodi di raccolta. *Biologia Ambientale*, **35** (2021, 2° suppl.), 250 pp.