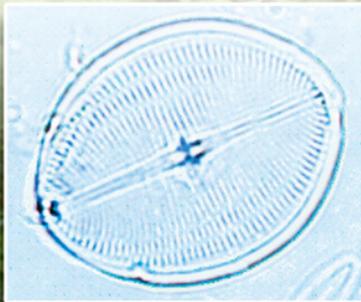


## Metodi Biologici per le acque superficiali interne

Delibera del Consiglio Federale delle Agenzie  
Ambientali. Seduta del 27 novembre 2013  
Doc. n. 38/13CF





# **Metodi Biologici per le acque superficiali interne**

---

**Delibera del Consiglio Federale delle Agenzie  
Ambientali. Seduta del 27 novembre 2013  
Doc. n. 38/13CF**

---

## **Informazioni legali**

Il Consiglio Federale, istituito presso l'ISPRA con il compito di promuovere lo sviluppo coordinato del Sistema Agenziale (ISPRA/ARPA/APPA) nonché per garantire omogeneità nello svolgimento dei compiti istituzionali delle agenzie e di ISPRA stessa, ha deciso con la Delibera del 29 maggio 2012, di contraddistinguere i prodotti editoriali e le iniziative frutto delle attività congiunte a carattere nazionale dell'ISPRA e delle Agenzie ambientali, con la denominazione Sistema Nazionale per la Protezione dell'Ambiente e un nuovo logo rappresentativo.

L'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA), le Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA), le Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA) e le persone che agiscono per loro conto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

**ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale**  
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma  
[www.isprambiente.gov.it](http://www.isprambiente.gov.it)

ISPRA, Manuali e Linee Guida 111/2014  
ISBN 978-88-448-0651

Riproduzione autorizzata citando la fonte

## **Elaborazione grafica**

ISPRA

*Grafica di copertina:* Franco Iozzoli

*Foto di copertina:* Cristina Martone, Paolo Orlandi

## **Coordinamento editoriale:**

Daria Mazzella

**ISPRA** – Settore Editoria

*Luglio 2014*

---

## Autori

Questo manuale nasce come revisione ed aggiornamento del manuale 'Metodi Biologici per le acque. Parte I. ISPRA, 2007.

L'attività di revisione ed aggiornamento è stata effettuata dal **Gruppo di Lavoro 'Metodi Biologici'** coordinato da ISPRA, Linea di Attività n. A6, Area di Attività A – Armonizzazione dei metodi di analisi, campionamento e misura.

L'elaborazione dei diversi protocolli è frutto di sottogruppi di lavoro specifici per ogni elemento biologico. Si ringraziano vivamente i singoli esperti e i diversi Organismi ed Istituzioni che hanno collaborato per la realizzazione di questo volume.

L'impostazione, il coordinamento e la stesura finale dei diversi protocolli sono stati curati da **Stefania Balzamo e Cristina Martone** del **Servizio Metrologia Ambientale** - Dipartimento Stato dell'Ambiente e Metrologia Ambientale di ISPRA.

### Componenti del gruppo di lavoro 'Metodi Biologici'

<b>AREA ATTIVITA' A</b>	
<b>ARMONIZZAZIONE METODI DI ANALISI, CAMPIONAMENTO E MISURA</b>	
	<b>Partecipanti</b>
Metodi biologici – Direttiva 2000/60 acque superficiali interne articolato in 2 sottogruppi:  a- Fiumi b- Laghi	<b>Sottogruppo Fiumi:</b> Stefania BALZAMO (ISPRA), Cristina MARTONE (ISPRA), Maurizio SALVATORI (ARTA ABRUZZO), Alberta Stenico (APPA Bolzano), Costantino Crupi e Francesca Pedullà (ARPA Calabria), Daniela Lucchini (ARPA Emilia Romagna), Elena ARNAUD (ARPA LOMBARDIA), Pietro GENONI (ARPA LOMBARDIA), Concetta TAMBURRO (ARPA Molise), Rosaria Petruzzelli (ARPA Puglia), Marco Bodon (ARPA Liguria), Elisabetta Ciccarelli (ARPA Umbria), Paola AIELLO e Marta FINOCCHIARO (ARPA SICILIA), Catia Monauni e Chiara Defrancesco (APPA Trento), Daniela Gerbaz (ARPA Valle d'Aosta), Claudia Orlandi (ARPA Friuli Venezia Giulia), Antonietta Fiorenza (ARPA Piemonte), Gioia BENEDETTINI (ARPA TOSCANA), Cristiano GRAMEGNA (ARPA Campania), Silvia MENEGON e Manuela CASON (ARPA VENETO)
	<b>Sottogruppo Laghi:</b> Maurizio SALVATORI (ARTA ABRUZZO), Alberta STENICO (APPA BOLZANO), Daniela LUCCHINI (ARPA EMILIA ROMAGNA), Fabio BUZZI (ARPA LOMBARDIA), Concetta TAMBURRO (ARPA MOLISE), Rosaria PETRUZZELLI (ARPA PUGLIA), Annamaria MAURO (ARPA SICILIA), Sabrina POZZI (APPA TRENTO), Margherita DI BRIZIO (ARPA UMBRIA), Claudia ORLANDI (ARPA FRIULI VENEZIA GIULIA), Antonietta FIORENZA (ARPA PIEMONTE), Gioia BENEDETTINI (ARPA TOSCANA), Stefania BALZAMO (ISPRA), Cristina Martone (ISPRA)

---

## **1020. Protocollo di campionamento ed analisi degli elementi di qualità fisico-chimica in ambiente lacustre.**

Buraschi Elisa (CNR-IRSA), Tartari Gianni (CNR-IRSA), Copetti Diego (CNR-IRSA) Morabito Giuseppe (CNR-ISE), Oggioni Alessandro (CNR-ISE), Aldo Marchetto (CNR-ISE), Buzzi Fabio (ARPA Lombardia), Pozzi Sabrina (APPA Trento), Garibaldi Letizia (Univ. Bicocca di Milano), Lugliè Antonella (Univ. degli Studi di Sassari), Salmaso Nico (IASMA).

## **2010. Protocollo di campionamento e analisi dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d'acqua guadabili**

Andrea Buffagni (CNR-IRSA), Stefania Erba (CNR-IRSA), Pietro Genoni (ARPA Lombardia), Daniela Lucchini (ARPA Emilia-Romagna), Claudia Orlandi (ARPA Friuli Venezia-Giulia).

Hanno partecipato alla discussione sul metodo:

Carlo Belfiore (Uni Tuscia), Marcello Cazzola (CNR-IRSA), Maurizio Salvatori (ARTA ABRUZZO), Alberta Stenico (APPA Bolzano), Elena Arnaud (ARPA LOMBARDIA), Concetta Tamburro (ARPA Molise), Rosaria Petruzzelli (ARPA Puglia), Marco Bodon (ARPA Liguria), Elisabetta Ciccarelli (ARPA Umbria), Paola Aiello e Marta Finocchiaro (ARPA SICILIA), Catia Monauni (APPA Trento), Daniela Gerbaz (ARPA Valle d'Aosta), Antonietta Fiorenza (Piemonte), Gioia Benedettini (ARPA TOSCANA), Stefania Balzamo (ISPRA), Cristina Martone (ISPRA).

## **2020. Protocollo di campionamento ed analisi delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua**

Laura Mancini (ISS), Camilla Puccinelli (ISS), Stefania Marcheggiani (ISS), Cristina Martone (ISPRA), Stefania Balzamo (ISPRA).

Hanno partecipato alla discussione sul metodo:

Maurizio Battagazzore (ARPA Piemonte), Renate Alber (APPA Bolzano), Rosalba Padula (ARPA Umbria), Daniela Dinelli (ARPA Toscana), Francesca Ciutti (San Michele all'Adige).

## **2030. Protocollo di campionamento e analisi delle macrofite dei corsi d'acqua guadabili**

Maria Rita Minciardi (ENEA), Daniela Spada (ENEA), Silverio Abati (UNI-Roma 3), Simone Ciadamidaro (ENEA), Antonietta Fiorenza (ARPA Piemonte).

Hanno partecipato alla discussione del metodo:

Sara Bisceglie (ENEA), Laura Olivieri (ENEA), Marco Bodon (ARPA Liguria), Elisabetta Ciccarelli (ARPA Umbria), Paola Aiello e Marta Finocchiaro (ARPA Sicilia), Maurizio Salvatori (ARTA Abruzzo), Alberta Stenico (APPA Bolzano), Elena Arnaud e Pietro Genoni (ARPA Lombardia), Daniela Gerbaz (ARPA Valle d'Aosta), Claudia Orlandi (ARPA Friuli Venezia Giulia), Manuela Cason e Silvia Menegon (ARPA Veneto), Concetta Tamburro (ARPA Molise), Rosaria Petruzzelli (ARPA Puglia), Catia Monauni (APPA Trento), Gioia Bendettini (ARPA Toscana), Daniela Lucchini (ARPA Emilia Romagna), Stefania Balzamo (ISPRA), Cristina Martone (ISPRA).

## **2040. Protocollo di campionamento e analisi della fauna ittica dei sistemi lotici guadabili.**

Stefano Macchio (ISPRA), Gian Luigi Rossi (ENEA).

Hanno partecipato alla discussione del metodo:

Renate Alber (APPA Bolzano), Stefania Balzamo (ISPRA) Ivano Bassani (Provincia della Spezia), Floriana Clemente (Regione Piemonte), Stefano Forneris, Pietro Genoni (ARPA Lombardia), Eleonora Landini (Provincia della Spezia), Daniele Magni (Regione Lombardia), Andrea Mammoliti Mochet (ARPA Valle d'Aosta), Cristina Martone (ISPRA), Nicola Merlo (Provincia di Bolzano), Davide Pini (Provincia della

---

---

Spezia), Sabrina Pozzi (APPA Trento), Cesare Puzzi (G.R.A.I.A. s.r.l.), Simone Rossi (FLA), Italo Saccardo (ARPA Veneto), Maurizio Salvatori (ARTA Abruzzo), Daniele Stellin (ARPA Valle d'Aosta), Marco Zanetti (Bioprogramm s.c.r.l.).

**3010. Protocollo di campionamento ed analisi dei macroinvertebrati negli ambienti lacustri.**

Boggero Angela (CNR-ISE), Zaupa Silvia (CNR-ISE), Rossaro Bruno (Università degli Studi di Milano), Lencioni Valeria (Museo Tridentino di Scienze Naturali), Marziali Laura (CNR-IRSA), Buzzi Fabio (ARPA Lombardia), Fiorenza Antonietta (ARPA Piemonte), Cason Manuela (ARPA Veneto), Giacomazzi Federica (ARPA Veneto), Pozzi Sabrina (APPA Trento).

**3020. Protocollo per il campionamento di fitoplancton in ambiente lacustre.**

Buraschi Elisa (CNR-IRSA), Buzzi Fabio (ARPA Lombardia), Garibaldi Letizia (Univ. Bicocca di Milano), Lugliè Antonella (Univ. degli Studi di Sassari), Legnani Elena (CNR-IRSA), Morabito Giuseppe (CNR-ISE), Oggioni Alessandro (CNR-ISE), Pozzi Sabrina (APPA Trento), Salmaso Nico (IASMA), Tartari Gianni (CNR-IRSA).

**3030. Protocollo di campionamento della fauna ittica dei laghi italiani.**

Pietro Volta (CNR-ISE)

Hanno partecipato alla discussione del metodo: Paolo Sala, Barbara Campi, Igorio Cerutti. ARPA Lombardia, ARPA Piemonte, APPA Bolzano, ARPAT Toscana, Regione Umbria, Ufficio Pesca Provincia di Como, Ufficio Pesca Provincia di Bolzano, Ufficio Pesca Provincia di Lecco, ENAS Ente Acque Sardegna

**3040. Protocollo di campionamento di macrofite acquatiche in ambiente lacustre.**

Buzzi Fabio (ARPA Lombardia), Oggioni Alessandro (CNR-ISE).

**3050. Protocollo di campionamento ed analisi delle diatomee bentoniche dei laghi e degli invasi.**

Fabio Buzzi (ARPA Lombardia), Laura Mancini (ISS), Claudia Vendetti (MATTM), Camilla Puccinelli (ISS), Stefania Marcheggiani (ISS), Aldo Marchetto (CNR-ISE).

---

---

---

---

## INDICE

<b>PREMESSA .....</b>	<b>I</b>
<b>TERMINI E DEFINIZIONI (GENERALE).....</b>	<b>II</b>
<b>1000. METODICHE DI RIFERIMENTO PER IL CAMPIONAMENTO DEGLI ELEMENTI DI QUALITÀ FISICO-CHIMICA.....</b>	<b>III</b>
1020. PROTOCOLLO PER IL CAMPIONAMENTO DEGLI ELEMENTI DI QUALITÀ FISICO-CHIMICA IN AMBIENTE LACUSTRE	
<b>2000. METODICHE DI RIFERIMENTO PER IL CAMPIONAMENTO DEGLI ELEMENTI DI QUALITÀ BIOLOGICA NEI FIUMI .....</b>	<b>IV</b>
2010. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI DEI MACROINVERTEBRATI BENTONICI DEI CORSI D'ACQUA GUADABILI	
2020. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI DELLE DIATOMEE BENTONICHE DEI CORSI D'ACQUA	
2030. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI DELLE MACROFITE DEI CORSI D'ACQUA GUADABILI	
2040. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI DELLA FAUNA ITTICA DEI SISTEMI LOTICI GUADABILI	
<b>3000. METODICHE DI RIFERIMENTO PER IL CAMPIONAMENTO DEGLI ELEMENTI DI QUALITÀ BIOLOGICA NEI LAGHI.....</b>	<b>V</b>
3010. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO DEI MACROINVERTEBRATI NEGLI AMBIENTI LACUSTRI	
3020. PROTOCOLLO PER IL CAMPIONAMENTO DI FITOPLANCTON IN AMBIENTE LACUSTRE	
3030. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO DELLA FAUNA ITTICA NEI LAGHI ITALIANI	
3040. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI DI MACROFITE ACQUATICHE IN AMBIENTE LACUSTRE	
3050. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI DELLE DIATOMEE BENTONICHE DEI LAGHI E DEGLI INVASI	

---

## PREMESSA

La Direttiva Europea 2000/60/CE ha definito un sistema per la protezione delle acque superficiali e sotterranee con lo scopo di mantenere e migliorare l'ambiente acquatico all'interno della Comunità Europea. Pur avendo raggruppato in sé molta della precedente legislazione europea in materia di acque, essa rappresenta attualmente l'atto legislativo più importante ed innovativo realizzato per la tutela degli ecosistemi acquatici. La direttiva ha adottato infatti un approccio ecologico per la protezione delle acque, integrato tra il monitoraggio chimico e biologico.

A livello nazionale l'iter legislativo che ha portato al recepimento della direttiva ha visto, ad oggi, l'emanazione dei seguenti decreti da parte del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM):

- D.Lgs. 152/2006 recante “Norme in materia ambientale”,
- DM 131/2008 “Criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici”,
- DM 56/2009 “Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento”,
- DM 17 luglio 2009 “Individuazione delle informazioni territoriali e modalità per la raccolta, lo scambio e l'utilizzazione dei dati necessari alla predisposizione dei rapporti conoscitivi sullo stato di attuazione degli obblighi comunitari e nazionali in materia di acque”,
- DM 260/2010 “Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali”
- DM 156/2013 “Regolamento recante i criteri tecnici per l'identificazione dei corpi idrici artificiali e fortemente modificati per le acque fluviali e lacustri”.

Con il D. Lgs. 152/2006, ed i suoi regolamenti e decreti attuativi, si applica in Italia l'approccio ecologico orientato ad uno sviluppo sostenibile e ad una gestione integrata delle risorse idriche. Gli elementi biologici richiesti per il monitoraggio delle acque dolci superficiali rappresentano i differenti livelli trofici dell'ecosistema: i produttori primari (fitobenthos, fitoplancton, macrofite) e i diversi livelli di consumatori (macroinvertebrati e fauna ittica); e a supporto delle analisi di queste comunità vengono studiati gli elementi chimico-fisici e idromorfologici. Nell'ambito delle attività di implementazione e recepimento della Direttiva 60/2000/CE è stato avviato a livello nazionale un programma di lavoro finalizzato all'adeguamento dei metodi per la classificazione biologica dei corpi idrici in conformità al nuovo quadro legislativo. A seguito dell'attivazione da parte di ISPRA dei gruppi di lavoro per la standardizzazione e l'armonizzazione dei metodi biologici, in collaborazione il MATTM, le Agenzie Regionali di Protezione dell'Ambiente (ARPA/APPA) e le altre istituzioni di ricerca (ENEA, ISS, CNR-IRSA e CNR-ISE) sono stati realizzati e raggruppati in un unico manuale i protocolli per il campionamento e l'analisi dei diversi gruppi di organismi che colonizzano le differenti tipologie di ambienti acquatici: diatomee, macrofite, macroinvertebrati bentonici e fauna ittica per le acque correnti, e fitoplancton, macrofite, macroinvertebrati bentonici e fauna ittica per le acque lacustri.

Il presente Manuale deriva dalla revisione e dall'aggiornamento del precedente “Metodi Biologici. Parte I” pubblicato sul sito web di ISPRA nel 2007, alla luce delle esigenze scaturite dall'applicazione delle metodiche sul territorio nazionale nei primi anni di monitoraggio ai sensi del D. Lgs. 152/2006.

Le modalità di campionamento descritte in questo Manuale sono i metodi di riferimento per il campionamento finalizzato al monitoraggio e alla classificazione dei corpi idrici per le acque dolci superficiali ai sensi del D. Lgs. 152/2006 e successivi decreti attuativi.

---

## TERMINI E DEFINIZIONI (GENERALE)

In questo documento si applicano per tutti i protocolli i seguenti termini e definizioni generali \*

**Campione:** integrazione di un numero definito di unità di campionamento raccolte in un dato mesohabitat di un sito in una specifica data.

**Taxon (pl. taxa):** unità tassonomica (ad es. specie, genere).

**Stazione di campionamento:** tratto di corpo idrico in cui viene effettuata la caratterizzazione e la raccolta dei campioni.

**Sito di campionamento:** porzione di corso d'acqua/lago rappresentativo delle condizioni del corpo idrico nel suo complesso, nell'ambito del quale vengono individuate una o più stazioni di campionamento.

**Corpo idrico superficiale:** un elemento distinto e significativo di acque superficiali, quali un lago, un bacino artificiale, un torrente, fiume o canale, acque di transizione o un tratto di acque costiere.

**Stato ecologico:** espressione della qualità della struttura e del funzionamento degli ecosistemi acquatici associati alle acque superficiali.

**Stazione:** punto del transetto in cui vengono prelevati i campioni; viene posizionata una stazione per ciascuna zona (litorale/fluviale, sublitorale/di transizione e profonda/lacustre).

**Substrato:** materiale naturale o non-naturale su cui vengono campionati gli organismi.

\* Ove necessario le voci verranno riportate con ulteriori precisazioni nel paragrafo 'termini e definizioni' di ciascun protocollo

---

**1000. METODICHE DI RIFERIMENTO PER IL  
CAMPIONAMENTO DEGLI ELEMENTI DI  
QUALITÀ' FISICO-CHIMICA**

# **1020. PROTOCOLLO PER IL CAMPIONAMENTO DEGLI ELEMENTI DI QUALITÀ' FISICO-CHIMICA IN AMBIENTE LACUSTRE**

## INDICE

<b>PREMESSA</b> .....	3
<b>INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>1 SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE</b> .....	<b>3</b>
<b>2. RIFERIMENTI NORMATIVI</b> .....	3
<b>3. TERMINI E DEFINIZIONI</b> .....	4
<b>4. FREQUENZE</b> .....	5
<b>5. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURA</b> .....	5
<b>6. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO</b> .....	5
6.1 Periodo di campionamento.....	6
6.2 Strategia di campionamento: localizzazione della stazione .....	6
6.3 Misure effettuate ad ogni campionamento .....	6
6.4 Profondità di campionamento.....	7
6.4.1 <i>Campionamento in presenza di stratificazione termica e chimica</i> .....	7
6.4.2 <i>Campionamento in completa circolazione</i> .....	8
6.5 Prelievo di campioni aggiuntivi.....	8
<b>7. CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE</b> .....	<b>9</b>
<b>8. SICUREZZA</b> .....	<b>9</b>
<b>9. QUALITÀ DEL CAMPIONAMENTO</b> .....	<b>9</b>
<b>APPENDICE A – Strumentazione</b> .....	11
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	12
<b>ALLEGATO A – Esempio di informazioni minime da inserire in una scheda di campionamento.</b> ..	13

## PREMESSA

Il protocollo per la raccolta di campioni per la determinazione degli elementi di qualità fisico-chimica in ambiente lacustre si affianca alle metodologie di campionamento e analisi di fitoplancton e di macrofite acquatiche in ambiente lacustre riportate in questo volume (Protocolli n. 3020 e 3040), completandole, e alla metodologia di campionamento della fauna a macroinvertebrati (Protocollo n. 3010). Il protocollo segue le indicazioni della Direttiva 2000/60/CE (Water Framework Directive, WFD) e delle linee guida per la progettazione del programma di monitoraggio e selezione dei siti di monitoraggio per i corpi idrici di acque superficiali (MATTM 2007), adattandosi alle esigenze emerse nei protocolli citati, in ottemperanza al principio di massima garanzia della rappresentatività e della affidabilità del campionamento definiti dalle buone procedure di qualità.

## INTRODUZIONE

Secondo la Direttiva 2000/60/CE un **buono stato chimico-fisico delle acque superficiali** è “*lo stato richiesto per conseguire gli obiettivi ambientali fissati dall'articolo 4, paragrafo 1, lettera a), ossia lo stato raggiunto da un corpo idrico superficiale nel quale la concentrazione degli inquinanti non supera gli standard di qualità ambientali fissati dall'allegato IX, e in forza dell'articolo 16, paragrafo 7 e di altre normative comunitarie pertinenti che istituiscono standard di qualità ambientale a livello comunitario*”.

L'Allegato V, paragrafo 1.1 nell'individuare lo stato delle acque superficiali stabilisce che gli elementi chimici e fisico-chimici a sostegno degli elementi biologici si distinguono in: **elementi generali** (trasparenza, condizioni termiche, condizioni di ossigenazione, salinità, stato di acidificazione, condizioni dei nutrienti) e **inquinanti specifici** (inquinamento da tutte le sostanze dell'elenco di priorità di cui è stato accertato lo scarico nel corpo idrico, inquinamento da altre sostanze di cui è stato accertato lo scarico nel corpo idrico in quantità significative).

Per la definizione dello stato ecologico gli Stati membri definiscono, per ciascun periodo cui si applica un piano di gestione dei bacini idrografici, un programma di **monitoraggio di sorveglianza** e un **programma di monitoraggio operativo**. In taluni casi può essere necessario istituire anche programmi di **monitoraggio d'indagine** (Allegato V, paragrafo 1.3).

## 1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

In base alle Linee Guida per l'applicazione della WFD (MATTM 2007), obiettivo del monitoraggio è quello di stabilire un quadro generale coerente ed esauriente dello stato ecologico e chimico delle acque all'interno di ciascun bacino idrografico e di classificare tutti i corpi idrici superficiali “individuati” per pervenire ad una descrizione dello stato delle acque superficiali come base per la gestione dell'ambiente acquatico.

Questo metodo spiega quando e come prelevare campioni rappresentativi di acque pelagiche lacustri naturali e artificiali o fortemente modificate (Articolo 2), allo scopo di effettuare indagini volte a stabilire lo stato chimico-fisico del corpo idrico e di garantire il confronto tra ambienti lacustri di diversa tipologia secondo quanto prescritto dalla Direttiva 2000/60/CE.

## 2. RIFERIMENTI NORMATIVI

Decreto Legislativo n. 152/2006. Norme in materia ambientale. G.U. 88 del 14/04/2006 – suppl. ord. n. 96.

UNI EN ISO 5667-1:2007 Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 1: Linee guida per la definizione dei programmi e delle tecniche di campionamento.

UNI EN ISO 5667-3:2004 Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 3: Guida per la conservazione ed il maneggiamento di campioni d'acqua.

D.M. 8 novembre 2010 n. 260.

### 3. TERMINI E DEFINIZIONI

Le seguenti definizioni sono riportate in quanto riferite a termini utili sia nella descrizione dello stato fisico-idrologico di un lago/invaso che per il prelievo dei campioni per la descrizione dello stato chimico, mentre altre sono utilizzate nell'usuale linguaggio limnologico e sono di supporto nella descrizione dello stato ecologico.

**Anossia/anossici:** situazione di assenza di ossigeno negli strati d'acqua profondi lacustri.

**Chemoclinio:** gradiente di densità dovuto a un cambiamento della concentrazione di sali.

**Dimittico:** lago/invaso caratterizzato da temperatura omogenea lungo l'intera colonna d'acqua in due periodi stagionali, tipicamente l'autunno e la primavera.

**Epilimnio:** strato d'acqua superficiale di un lago/invaso termicamente stratificato collocato sopra il metalimnio, che lo separa dagli strati profondi (ipolimnio)

**Eufotica:** zona porzione (strato eufotico) di un corpo lacustre raggiunto da una quantità di radiazione solare sufficiente per la fotosintesi.

**Eutrofico:** corpo d'acqua ricco di nutrienti (azoto, fosforo) e quindi capace di sostenere una intensa crescita algale.

**Eutrofizzazione:** progressivo arricchimento, naturale o artificiale, in nutrienti che causa un aumento della produzione algale.

**Invasi:** insieme dei corpi idrici superficiali interni fermi (laghi) di natura artificiale o fortemente modificata.

**Ipolimnio:** zona profonda di un lago/invaso termicamente stratificato separata dagli strati superficiali (epilimnio) dalla zona del metalimnio.

**Isoterma:** linea che congiunge i punti di uguale temperatura.

**Isotermità:** condizione di stessa temperatura.

**Meromittico:** lago che mostra una separazione in strati d'acqua con densità differente, dovuta non a differenze di temperatura, ma a differenze nella concentrazione dei soluti.

**Mesotrofia:** condizione trofica di un lago/invaso moderatamente ricco in nutrienti algali. La condizione di mesotrofia è intermedia tra l'oligotrofia (= scarsità di nutrienti) e l'eutrofia (= eccesso di nutrienti).

**Metalimnio:** zona compresa tra gli strati superficiali (epilimnio) e quelli profondi (ipolimnio). Il metalimnio è determinato dalla posizione del salto termico (termoclinio).

**Mixolimnio:** zona di un lago/invaso stratificato che è più prossima alla superficie e che subisce facilmente un rimescolamento per azione del vento.

**Monimolimnio:** strato d'acqua profondo di un lago meromittico.

**Monomittico:** lago/invaso caratterizzato da una sola fase di mescolamento delle acque, che si verifica tra la fine dell'autunno e l'inizio della primavera. Nei mesi estivi è presente una stratificazione termica e sono distinguibili un epilimnio, un metalimnio ed un ipolimnio.

**Nutriente:** ogni elemento o sostanza essenziale per gli organismi viventi. Carbonio, azoto, fosforo e silice sono nutrienti essenziali per tutte le alghe ed il silicio lo è per le diatomee.

**Olomittico:** lago/invaso che annualmente presenta una completa circolazione invernale.

**Oligomittici:** laghi nei quali una modesta differenza di temperatura invernale tra acque superficiali e acque profonde impedisce la regolare circolazione completa della colonna d'acqua. Questa avviene solo in particolari condizioni idroclimatiche.

**Oligotrofia:** condizione di un lago/invaso con limitato contenuto di nutrienti algali.

**Omeotermità:** situazione in cui si osservano temperature uniformi.

**Polimittico:** lago/invaso che non mostra una stratificazione termica evidente e stabile e può andare incontro a diverse fasi di mescolamento nel corso del suo ciclo annuale.

**Stratificazione:** situazione dei laghi/invasi le acque dei quali sono distribuite in strati diversificati da caratteristiche fisiche (temperatura) o chimiche (concentrazione di materia).

**Termoclinio:** zona dei corpi lacustri definita dal gradiente verticale negativo di temperatura solitamente stabilito in circa 1 °C/m (variazione di un grado centigrado per ogni metro di profondità).

## 4. FREQUENZE

Per il monitoraggio dei corpi idrici lacustri sono fissate frequenze che tengono conto della variabilità dei parametri derivanti da condizioni sia naturali che antropiche. Il momento in cui effettuare il monitoraggio è scelto in modo da minimizzare l'incidenza delle variazioni stagionali sul risultato ed assicurare quindi che quest'ultimo rispecchi i mutamenti intervenuti nel corpo idrico a seguito di cambiamenti dovuti alla pressione antropica. Per conseguire quest'obiettivo sono effettuati, se necessario, monitoraggi supplementari in stagioni diverse del medesimo anno.

Le frequenze di campionamento delle acque lacustri naturali e degli invasi indicate dalla Direttiva 2000/60/CE (Allegato 5, Paragrafo 1.3.4), e recepite dal Regolamento per i Programmi di monitoraggio, sia per l'attività di sorveglianza che per il monitoraggio operativo, sono:

- **bimestrali** per gli **elementi generali**: condizioni termiche, ossigenazione, conducibilità, stato dei nutrienti e stato di acidificazione;
- **trimestrali** per gli **inquinanti specifici**;
- **mensili** per le sostanze dell'elenco di priorità.

Le frequenze sono altresì scelte in modo da garantire il livello accettabile di attendibilità e precisione definito nel piano di gestione del bacino idrografico.

## 5. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURA

Nel seguito sono elencati a titolo orientativo i principali strumenti e le attrezzature necessarie per un campionamento effettuato secondo le normali pratiche di campo, in condizioni di qualità e sicurezza:

- dispositivi di protezione individuale;
- imbarcazione e relativi dispositivi di protezione e segnalazione obbligatori secondo le norme in vigore (Decreto 5 ottobre 1999 n. 478 "Regolamento recante norme di sicurezza per la navigazione da diporto"; G.U. del 17.12.1999);
- disco di Secchi;
- termistor (singolo o integrato in una sonda multiparametrica);
- sonda multiparametrica per profondità  $< 0 >$  di 300 m a seconda dei laghi/invasi;
- campionatore (bottiglia a strappo, di tipo Niskin o Van Dorn);
- verricello motorizzato o manuale per la raccolta di campioni in laghi/invasi con profondità massima superiore a 50 m;
- bottiglie da 1 litro per la raccolta dei campioni per le determinazioni chimico-fisiche;
- contenitori termici per la conservazione al freddo ed al buio dei campioni;
- bottiglie e fissativi per ossigeno, nel caso di misure discrete;

Caratteristiche dettagliate delle apparecchiature sopra riportate si trovano in Appendice A.

## 6. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

Le procedure di campionamento oltre a distinguersi sulla base delle diverse tipologie di campionamento (di sorveglianza, operativo e di indagine), devono tenere conto principalmente della profondità dei laghi e del loro stato naturale, artificiale o fortemente modificato. Và, infatti, ricordato che le procedure di campionamento dei laghi e degli invasi differiscono nella scelta del punto di campionamento. Negli invasi la significatività del prelievo deve essere rappresentativa dell'impatto globale delle pressioni idromorfologiche, che può essere influenzata dalla eccessiva vicinanza all'infrastruttura del punto di prelievo o di restituzione di acqua al corpo idrico.

Poiché il campionamento fisico-chimico deve essere di supporto alla valutazione dello stato ecologico del corpo idrico, ne consegue che la scelta del/dei punti di prelievo negli invasi deve avvenire in condizioni il più possibile poco disturbate dall'idrodinamica lacustre indotta artificialmente.

Nel periodo coperto dal monitoraggio di sorveglianza vanno applicate le frequenze indicate in precedenza (§ 5) per il monitoraggio dei parametri indicativi degli elementi di qualità fisico-chimica, a meno che le conoscenze tecniche e le perizie degli esperti non giustifichino intervalli più lunghi. Nel monitoraggio operativo la frequenza di monitoraggio deve garantire dati sufficienti a delineare una valutazione attendibile dello stato del pertinente elemento qualitativo. In linea di massima, il monitoraggio è effettuato a intervalli

non superiori a quelli indicati per il monitoraggio di sorveglianza, a meno che le conoscenze tecniche e le perizie degli esperti non giustificino intervalli più lunghi.

## 6.1 Periodo di campionamento

La Direttiva 2000/60/CE stabilisce (Allegato V, Paragrafo 1.3.4) che “Per il monitoraggio sono fissate frequenze che tengono conto della variabilità delle condizioni sia naturali che antropiche. Il momento in cui effettuare il monitoraggio è scelto in modo da minimizzare l’incidenza delle variazioni stagionali sul risultato ed assicurare quindi che quest’ultimo rispecchi i mutamenti intervenuti nel corpo idrico a seguito di cambiamenti dovuti alla pressione antropica. Per conseguire questo obiettivo sono effettuati, se necessario, monitoraggi supplementari in stagioni diverse del medesimo anno.”

Affinché la misura dei parametri chimico-fisici possa assicurare una stima affidabile dello stato del corpo idrico, il campionamento delle acque deve essere condotto congiuntamente a quello dell’elemento biologico maggiormente sensibile ai cambiamenti dovuti alla pressione antropica. Per minimizzare l’incidenza delle variazioni stagionali è necessario raggiungere una buona conoscenza della variabilità naturale legata alla stagionalità e per interpretare al meglio questa variabilità il sistema più efficace è quello di raccogliere il maggior numero possibile di campioni.

Per tale motivo i periodi di campionamento per la definizione dello stato chimico-fisico sono individuati sulla base dei criteri per la caratterizzazione della stagionalità delle associazioni fitoplanctoniche (APAT, 2007a).

Questo criterio fa riferimento ad aspetti limnologici e pratici: per i primi, la realizzazione del campionamento chimico-fisico congiuntamente a quello delle associazioni fitoplanctoniche risponde alla necessità di tenere conto delle mutue influenze che legano la componente abiotica con quella biotica; per i secondi, l’ovvia ottimizzazione di tempi, costi e risorse umane.

In ambienti lacustri per i quali non sono disponibili dati pregressi, si consiglia di effettuare dei campionamenti mirati nel periodo di stratificazione, per valutare eventuali condizioni di polimissi che possono determinare modifiche dallo schema generale sopra descritto.

Il campionamento non può comunque prescindere dallo stato fisico-idrologico del lago/invaso, che si riflette non tanto nella frequenza temporale, bensì in quella verticale. Per i laghi: dimittici, monomittici, oloimittici e polimittici le procedure di campionamento sono comuni, mentre per quelli oligomittici e meromittici va seguita una procedura che tiene conto della profondità delle stratificazioni (termoclinio e chemoclinio), secondo quanto indicato nel seguito.

## 6.2 Strategia di campionamento: localizzazione della stazione

Nei **laghi naturali** il campionamento per i parametri chimico-fisici deve essere effettuato nel punto di massima profondità, scelto come rappresentativo delle condizioni medie dell’ambiente. La stazione di campionamento dovrebbe trovarsi in posizione centrale rispetto allo sviluppo della superficie lacustre, in modo da non essere influenzata da fenomeni che si svolgono lungo le fasce litorali. Qualora il punto di massima profondità risultasse troppo vicino alla sponda del lago, privilegiare la scelta di una stazione più centrale.

Negli **invasi** va rispettato il principio di rappresentatività del punto di massima profondità, tenendo comunque conto che questo non deve essere influenzato dalle opere di prelievo e/o di immissione idraulica.

Nel caso in cui il lago/invaso presenti una conformazione tale da determinare la suddivisione in sottobacini con caratteristiche idrologiche, idrodinamiche e trofiche differenti, sarà necessario prevedere una stazione di campionamento per ogni sottobacino individuato.

## 6.3 Misure effettuate ad ogni campionamento

Ad ogni campionamento, contestualmente alla raccolta del campione di fitoplancton, sono effettuate le seguenti misure:

- profondità di scomparsa del disco di secchi;
- temperatura, ossigeno disciolto, pH e conducibilità con sonda multiparametrica.

Per ciascuna profondità vanno prelevati i campioni d'acqua rappresentativi di ciascuno strato e sui quali va effettuata l'analisi delle variabili idrochimiche di base indicate nella tabella dell'Allegato V, Paragrafo 1.3.4 della Direttiva 2000/60/CE:

- alcalinità totale;
- azoto ammoniacale;
- azoto nitrico;
- azoto totale;
- fosforo;
- fosforo totale;
- silice,

e dei restanti analiti che sono richiesti per la completa definizione dello stato chimico del corpo idrico (sostanze prioritarie, composti chimici connessi con le pressioni rilevate nel bacino idrografico, ecc.). L'esempio di una scheda di campionamento in cui sono definite le informazioni minime da raccogliere è riportata in allegato 1.

## 6.4 Profondità di campionamento

Per ciascuna stazione individuata nella strategia di campionamento vengono rilevate le coordinate geografiche con strumentazione GPS in modo tale da garantire il corretto posizionamento ad ogni replica delle operazioni di prelievo., i campioni sono prelevati a profondità discrete con l'obiettivo di descrivere lo stato chimico di strati diversamente omogenei: epilimnio, metalimnio, ipolimnio e mixolimnio.

### 6.4.1 Campionamento in presenza di stratificazione termica e chimica

L'identificazione degli strati è condotta con l'ausilio della misura della temperatura (laghi dimittici, monomittici, olomittici e polimittici), con l'utilizzo anche delle concentrazioni di ossigeno disciolto nei laghi oligomittici, e della conducibilità in quelli meromittici. E'consigliabile che le misure siano effettuate utilizzando una sonda multiparametrica con frequenze di registrazione di almeno 1 m fino alla profondità della zona eufotica (fino ad un massimo di 30 m) e con intervalli non superiori a 10 m per la restante parte della colonna. Dalla lettura diretta delle misure effettuate si potrà identificare:

- La struttura termica, da cui identificare l'epilimnio<sup>1</sup>. Il termoclinio viene identificato nel punto in cui la temperatura inizia a variare per più di 1 °C/m. Più delicata, invece, è l'identificazione del limite inferiore dello strato metalimnetico, da cui inizia l'ipolimnio, poiché la curva termica solitamente ha un andamento parabolico con una lenta diminuzione con la profondità. In questi casi ci si può aiutare con la curva dell'ossigeno. Negli ambienti di profondità massima > 50 m in caso di impossibilità di identificare con certezza il metalimnio profondo si può stabilire come limite inferiore la profondità della zona eufotica<sup>2</sup>. Per i laghi poco profondi (< 5 m) è necessario conoscere la durata del periodo di stratificazione. In alcuni casi, infatti, la stratificazione può essere interrotta precocemente da cambiamenti repentini delle condizioni climatiche (polimissi), con la conseguente difficoltà di identificare i periodi di stratificazione.
- La distribuzione delle concentrazioni di ossigeno sulla colonna. In talune condizioni di incipiente completa circolazione oppure, molto più frequentemente, nei laghi oligomittici, si può osservare una sostanziale omeotermia su tutta la colonna e contemporaneamente variazioni di concentrazione dell'ossigeno molto elevate. In questo caso il campionamento deve tenere conto della curva dell'ossigeno per l'identificazione degli strati omogenei.
- La distribuzione della conducibilità sulla colonna. I laghi meromittici sono caratterizzati sia da una stratificazione termica che da una stratificazione chimica. In questo caso il campionamento deve essere rappresentativo di ciascuno strato.

Effettuata l'individuazione degli strati si procede con l'identificazione delle profondità rappresentative.

**Nei laghi poco profondi (< 5 m)** il numero di profondità rappresentative è da ridurre al massimo a 3 in tutte le condizioni di stratificazione termica:

<sup>1</sup> Si fa notare che in condizioni di copertura di ghiaccio può verificarsi una stratificazione inversa, ovvero una temperatura più bassa in superficie che negli strati immediatamente al di sotto di essa. Il relativo salto termico non è comunque mai identificato come termoclinio e solitamente tutta la colonna epilimnetica va considerata omogenea dal punto di vista chimico-fisico.

<sup>2</sup> La necessità di determinare la profondità del metalimnio mediante la misurazione della concentrazione dell'ossigeno, piuttosto che la verifica del profilo di conducibilità per i laghi meromittici consigliano l'uso di una sonda multiparametrica che permette l'effettuazione di profili in continuo. Anche per la determinazione del profilo dell'ossigeno per i laghi oligomittici e la verifica della profondità di mescolamento nel periodo di piena circolazione è preferibile l'uso di una sonda per apprezzare la piena circolazione. La migliore soluzione, in questi casi, è quella di sonde dotate di cavo telemetrico per l'osservazione in tempo reale. Anche il calcolo del termoclinio diventa più agevole con tali strumenti.

- in superficie (0,5 m);
- nel centro del metalimnio;
- nell'ipolimnio ad almeno a 1 m dal fondo.

Nel caso di laghi polimittici con profondità molto basse (<3 m) il numero di campioni sulla colonna può essere ridotto a 2. Per laghi con profondità inferiore ai 2 metri può essere raccolto un solo campione.

Nei **laghi a profondità intermedia compresa tra 5 e 15 m** il numero massimo di profondità rappresentative è 4, in condizioni di piena stratificazione, e precisamente:

- in superficie (0,5 m);
- nel centro del metalimnio;
- nell'ipolimnio superiore (solo in stratificazione);
- nell'ipolimnio profondo ad almeno a 1,5 m dal fondo.

Per i **laghi/invasi più profondi (> 15 m)** è consigliabile differenziare le profondità di campionamento secondo questi criteri:

- a) *laghi/invasi con profondità minima di 15 m e massima  $\leq 50$  m.* In condizioni di stratificazione possono essere approssimativamente individuate al massimo 5 profondità:
  - in superficie (0,5 m);
  - a 4/5 dell'epilimnio (ad es. se il termoclinio è a 10 m, il prelievo può essere fatto a 8 m);
  - nel centro del metalimnio;
  - nell'ipolimnio superiore;
  - nell'ipolimnio profondo, ma almeno a 2 m dal fondo.
- b) *laghi/invasi con profondità massima  $\geq 50$  m.* Nei laghi con profondità fino a 200 m è consigliabile effettuare il prelievo di un ulteriore campione a metà dell'ipolimnio. Nei laghi più profondi è consigliabile aggiungere un'ulteriore profondità di prelievo tra 200 m ed una profondità di 50 m dal fondo. In entrambi i casi la scelta della profondità va fatta tenendo conto di criteri che privilegino una buona rappresentatività sulla colonna in base alle concentrazioni di ossigeno ed alla conducibilità, anche se non si ricade nelle condizioni descritte nei punti c) e d).
- c) *laghi oligomittici.* In questi casi, tipici di alcuni laghi profondi subalpini, la scelta delle profondità di campionamento dell'ipolimnio deve specificatamente tenere conto delle condizioni di ossigenazione. Tra l'ipolimnio superiore e quello profondo è consigliabile, effettuare il prelievo alla profondità in cui le concentrazioni di ossigeno divengono inferiori ad  $1 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ . Nel caso che ciò non succeda vale quanto indicato al punto b)
- d) *laghi meromittici.* In questi casi, di netta stratificazione chimica, dal profilo di conducibilità va dapprima individuata la profondità del chemioclinio. Il prelievo dei campioni ipolimnetici segue quindi il criterio della stratificazione termica secondo quanto indicato nei punti a) e b), considerando la profondità del chemioclinio come punto più profondo. Tra il chemioclinio ed il fondo è invece consigliabile il prelievo di non meno di 2 campioni, in modo da descrivere lo stato chimico più superficiale da quello nei pressi dei sedimenti da raccogliere ad almeno 2 m dal fondo.

#### 6.4.2 Campionamento in completa circolazione

Accertata la completa omeotermia attraverso la misura della temperatura (laghi dimittici, monomittici, olomittici e polimittici) e l'assenza di significative variazioni di concentrazione dell'ossigeno disciolto ( $>2 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ ) su tutta la colonna d'acqua, il prelievo in laghi/invasi con profondità  $< 50$  m può essere effettuato seguendo questi criteri:

- in superficie (0,5 m);
- in prossimità del fondo, ma almeno a 2 m dal fondo;
- alla profondità della zona eufotica.

In laghi/invasi con profondità  $\geq$  di 50 m è consigliabile il prelievo di un ulteriore campione in posizione intermedia tra la profondità della zona eufotica ed il fondo, se la profondità è di 200 m, e di due campioni per quelli più profondi.

### 6.5 Prelievo di campioni aggiuntivi

A volte può essere importante effettuare dei campionamenti aggiuntivi lungo la colonna, ma più solitamente tra il fondo ed il centro dell'ipolimnio. Tale scelta deve comunque rispondere ad esigenze strettamente

connesse ad un miglioramento della descrizione dello stato chimico riconducibili generalmente a situazioni di diversa ossigenazione delle acque.

## **7. CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE**

I campioni di acqua alle differenti profondità vanno posti in bottiglie di plastica di polietilene o policarbonato. Il campione va conservato al buio ed a 4° C. Il ciclo analitico deve iniziare entro una giornata dal prelievo. Le determinazioni chimico-fisiche di base vanno effettuate entro e non oltre i tempi indicati nei metodi analitici pubblicati dall'APAT & IRSA (2003). Per le sostanze prioritarie e pericolose prioritarie (decisione 2455/2001/CE) si rimanda ai metodi normati per tali sostanze.

## **8. SICUREZZA**

Il campionamento e l'analisi in campo sono generalmente pericolosi. Gli operatori che utilizzeranno questo protocollo dovranno avere la sufficiente formazione per le normali pratiche di laboratorio e di analisi in campo.

Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso. È responsabilità degli Organi preposti di definire i dispositivi più opportuni di protezione individuale e di individuare le azioni necessarie ad assicurare la sicurezza degli operatori secondo le disposizioni di legge.

## **9. QUALITÀ DEL CAMPIONAMENTO**

Il campionamento delle acque deve tenere conto che la matrice è caratterizzata da una intrinseca variabilità delle caratteristiche di interesse, di tipo spaziale (sulle tre dimensioni) e temporale. Al contempo le modalità con cui un programma e/o un protocollo di campionamento sono applicati possono variare in funzione della strumentazione utilizzata nonché dell'operatore. Tali fattori incidono sulla qualità del risultato analitico finale e la loro conoscenza consente una migliore interpretazione dei risultati stessi. Per tenere per quanto possibile sotto controllo tali fattori è consigliabile:

- seguire rigorosamente le specifiche procedure tecniche ed operative inerenti la definizione della strategia di campionamento (localizzazione delle stazioni di campionamento, stratificazione, scelta della tecnica di campionamento, definizione delle caratteristiche del campione da prelevare); si rilevano le coordinate geografiche (UTM32- WGS84);
- prelevare un numero di campioni sufficiente ad effettuare le elaborazioni necessarie (sulla base dello schema di campionamento prescelto) e di volume idoneo a condurre le misure richieste;
- osservare le specifiche procedure operative circa le modalità di conservazione e trasporto dei campioni;
- registrare per ogni campione prelevato le informazioni necessarie ad un suo riconoscimento (tracciabilità) lungo tutto il processo di misura (dal campionamento in campo fino alla analisi strumentale);
- considerare che, per quanto riguarda la precisione del prelievo, occorre considerare il problema della accuratezza dei dispositivi e delle condizioni di campionamento (corda con indicazione dei soli metri, bottiglia che copre ca. 80 cm di strato, deriva del campionatore per venti e/o correnti, ecc.) con quella dello spessore degli strati da cui prelevare i campioni, in particolare nei laghi poco profondi (< 5 m);
- tenere conto che per le sonde multiparametriche esistono dei riferimenti di precisione per alcuni sensori. E' quindi opportuno individuare dei criteri oggettivi per la calibrazione di tutti i parametri, evidenziando anche le condizioni operative per raggiungere le precisioni di riferimento. In questo senso una particolare attenzione va rivolta alla velocità di discesa della sonda in funzione dei tempi di equilibrio e di risposta dei sensori utilizzati. Una velocità di 10 m minuto<sup>-1</sup>, ad esempio, appare sufficiente, nella maggior parte dei casi, a garantire un adeguato rispetto delle velocità di scambio molecolare dell'ossigeno a livello della membrana dell'elettrodo. E' invece assolutamente sconsigliabile effettuare calate con velocità discontinue.

Fenomeni di contaminazione incrociata dei campioni prelevati sono possibili (ad esempio per l'uso di tamponi per la calibrazione di elettrodi di pH, oppure per la manipolazione di soluzioni per il funzionamento di sensori ecc.) e possono essere tenuti sotto controllo affiancando al campione primario uno o più campioni di controllo (bianco di campo) da sottoporre alle stesse procedure previste per il campione primario. Il "bianco di campo" può essere costituito da:

- acqua priva di contaminanti, fatta passare attraverso il campionatore (del sistema di pretrattamento, ad esempio la filtrazione) durante le operazioni di campionamento e posta nel contenitore selezionato (effetti del campionatore);
- acqua priva di contaminanti, posta nel contenitore selezionato prima di accedere alla stazione di campionamento (effetti della manipolazione, del trasporto, del contenitore).

Per una stima della ripetibilità dell'operazione di campionamento, almeno una volta a scopo indicativo è opportuno eseguire delle repliche di campionamento per ciascuna stazione selezionata. Su ogni campione replicato andranno eseguite misure in duplicato secondo un disegno bilanciato che consenta di valutare la ripetibilità della misura nelle sue due componenti (analisi e campionamento).

## APPENDICE A – Strumentazione

**Bottiglie di profondità:** dispositivi per l'acquisizione di campioni a profondità determinate. Sono disponibili diversi modelli che si differenziano in base alle modalità di chiusura:

- *Bottiglia a strappo.* Campionatore che utilizza un meccanismo di chiusura attivato mediante una improvvisa variazione di tensione, trasmessa manualmente, del cavo a cui è fissata.
- *Bottiglie di van Dorn e di Niskin.* Campionatore il cui meccanismo di chiusura è azionato da un messaggero che scorre lungo il cavo.

### Sonda multiparametrica

Strumento multifunzione che consente l'acquisizione contemporanea di più parametri quali: profondità (pressione), temperatura, pH, conducibilità, concentrazione e saturazione dell'ossigeno, concentrazione della clorofilla.

Esistono diverse tipologie di questi strumenti. Le più semplici sono dotate di sensori con cavi di lunghezza limitata e possono essere immerse nelle bottiglie di profondità<sup>3</sup>. Altre posseggono cavi più lunghi e vengono immerse direttamente nel corpo idrico: queste ultime sono dotate di memorie per l'archiviazione dei dati o sono interfacciabili con un notebook.

Le sonde oceanografiche sono gli strumenti più versatili e che consentono di raccogliere il maggior numero di informazioni. Sono dotate di sensori di temperatura, ossigeno, conducibilità, pH e pressione. Possono inoltre essere dotate di sensori per il potenziale redox e per la misura della clorofilla fluorometrica<sup>4</sup>, della radiazione PHAR, di sensori turbidimetrici ecc. Il grande vantaggio delle sonde oceanografiche è legato alla possibilità di effettuare dei profili in continuo lungo la colonna d'acqua e, con alcuni modelli, di osservare l'acquisizione dei dati in tempo reale. Questi strumenti richiedono una manutenzione molto accurata, la taratura prima di ogni campionamento e di uno specifico verricello dotato di contatto rotante per l'effettuazione dei profili in ambienti con profondità superiori a 25 m.

La qualità delle prestazioni riguarda l'accuratezza e la risoluzione dei sensori, nonché la frequenza di campionamento dell'elettronica strumentale. Rispetto alla scelta del sensore della clorofilla è utile riferirsi a quelle strutture che hanno già utilizzato le differenti tipologie presenti sul mercato.

La norma EN 25814 del 1992 stabilisce per l'ossigeno il limite di rilevabilità (0-35 °C) di 0,0 mg/l, ed un'accuratezza per ossigeno e temperatura di 0,1 °C; e 0,1 mg/l, rispettivamente per i due sensori.

### Disco di secchi

Disco bianco metallico di 30 cm di diametro utilizzato per valutare la trasparenza di un corpo d'acqua in base alla sua visibilità in profondità. Il disco viene calato fissato ad un cavo metrato ogni 0,5 m fino a 10 m, ed ogni metro oltre i 10 m.

<sup>3</sup> Va sottolineato che gli elettrodi del pH rilasciano ioni (cloruro e potassio), i tamponi rilasciano nutrienti (fosforo reattivo) e gli elettrodi di ossigeno altre specie chimiche in grado di alterare significativamente i campioni da analizzare. E' sempre consigliabile, quindi, non inviare all'analisi campioni di acqua utilizzata per misure con strumenti in tempo reale.

<sup>4</sup> Occorre precisare che le misure di clorofilla fluorometrica non sono sostitutive delle analisi spettrofotometriche.

## **BIBLIOGRAFIA**

APAT & IRSA. 2003. Metodi di campionamento. In: Metodi analitici per le acque. APAT Manuali e Linee Guida 29/2003. Metodo 1030. Vol. 1: 75-85.

ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.

ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.

APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006

**ALLEGATO A – Esempio di informazioni minime da inserire in una scheda di campionamento.**

Lago/invaso (toponimo)		Stazione (toponimo o sigla)		Coordinate geografiche della stazione (UTM32-WGS84)	
<input type="text"/>		<input type="text"/>		Nord	<input type="text"/>
				Est	<input type="text"/>
Data:	<input type="text"/>	Ora:	<input type="text"/>		
Meteo:	<input type="text"/>	Disco di Secchi:	<input type="text"/>	m	
Operatore:	<input type="text"/>		Strumento prelievo:	<input type="text"/>	

Profondità (m) <sup>5</sup>	Temperatura (°C)	Ossigeno (mg L <sup>-1</sup> )	Profondità (m) <sup>6</sup>	Temperatura (°C)	Ossigeno (mg L <sup>-1</sup> )
0					
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
23					
24					
25					
26					
27					
28					
29					
30					

<sup>5</sup> Profondità obbligatorie per la determinazione del profilo di temperatura.

<sup>6</sup> Altre profondità individuate secondo quanto indicato nel metodo di campionamento.

---

**2000. METODICHE DI RIFERIMENTO PER IL  
CAMPIONAMENTO DEGLI ELEMENTI DI QUALITA'  
BIOLOGICA NEI FIUMI**

---

**2010. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E  
ANALISI DEI MACROINVERTEBRATI  
BENTONICI DEI CORSI D'ACQUA GUADABILI**

**Manuali e Linee Guida**

**111/2014**

## INDICE

<b>PREMESSA</b> .....	<b>3</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
<b>1.SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE</b> .....	<b>4</b>
<b>2.RIFERIMENTI</b> .....	<b>4</b>
<b>3.TERMINI E DEFINIZIONI</b> .....	<b>5</b>
<b>4.STRUMENTAZIONE E ATTREZZATURA</b> .....	<b>5</b>
4.1 Strumenti per il campionamento .....	5
4.2 Materiale da campo necessario.....	7
4.3 Materiale da campo utile (non indispensabile).....	7
4.4 Materiale da laboratorio .....	7
<b>5.PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO</b> .....	<b>8</b>
5.1 Generalità .....	8
5.2 Pianificazione del monitoraggio .....	9
5.3 Periodo di campionamento e condizioni ambientali .....	10
5.4 Selezione del sito di campionamento .....	10
5.5 Selezione dell'area di campionamento .....	11
5.6 Stima della composizione in microhabitat e allocazione delle unità di campionamento.....	11
5.7 Raccomandazioni generali per il campionamento degli organismi.....	12
5.8 Descrizione delle modalità di campionamento nei singoli microhabitat .....	13
5.9 Scheda di campionamento.....	15
<b>6.PROCEDURE ANALITICHE</b> .....	<b>15</b>
6.1 Smistamento del campione e stima delle abbondanze.....	15
6.2 Trattamento del campione in campo e conservazione .....	16
6.3 Etichettatura.....	16
6.4 Identificazione degli organismi in laboratorio.....	17
<b>7.ESPRESSIONE DEI RISULTATI</b> .....	<b>17</b>
<b>8.SICUREZZA</b> .....	<b>17</b>
<b>9.ASSICURAZIONE DI QUALITÀ</b> .....	<b>17</b>
9.1 Qualifica degli operatori .....	18
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>19</b>
<b>ALLEGATO A</b> .....	<b>21</b>
<b>ALLEGATO B</b> .....	<b>22</b>
<b>ALLEGATO C</b> .....	<b>30</b>
<b>ALLEGATO D</b> .....	<b>43</b>
<b>ALLEGATO E</b> .....	<b>49</b>
<b>ALLEGATO F</b> .....	<b>56</b>

## PREMESSA

In relazione alle esigenze di adeguamento definite dal testo normativo europeo in materia di acque (Direttiva 2000/60/CE) l'Italia, come altri paesi europei, ha avviato ormai da qualche anno una fase di confronto tra esperti di macroinvertebrati bentonici fluviali volta alla selezione e alla messa a punto di metodi di campionamento che fossero conformi alle richieste europee.

La proposta italiana, sintetizzata nel presente documento, deriva direttamente dalle esperienze condotte in ambito europeo da CNR-IRSA, in particolare nell'ambito dei progetti di ricerca AQEM e STAR, dai contatti con il comitato CEN per la standardizzazione dei metodi, e dall'attività svolta collegialmente nei Gruppi di lavoro CIS REFCOND, Intercalibrazione e ECOSTAT. La base maturata e condivisa a livello europeo, con i necessari adattamenti volti a rendere il metodo maggiormente adatto alla realtà dei fiumi italiani, è stata quindi verificata a livello nazionale e affinata al fine di ottenere singole procedure e un metodo complessivo che fossero il più possibile standardizzati, applicabili su larga scala e non troppo onerosi per le Agenzie, sebbene solidamente poggianti su una base tecnica consolidata. Il risultato di queste attività, svoltesi tra il 1999 e oggi, i.e. il metodo qui brevemente descritto, rappresenta infine la sintesi del confronto condotto in ambito nazionale e al quale molti esperti del sistema agenziale e del mondo della ricerca hanno contribuito. Tale interazione ha consentito di affinare e adattare il protocollo di campionamento - basato su una raccolta proporzionale degli invertebrati in relazione alla presenza percentuale degli habitat osservati in un sito fluviale, in accordo con una linea definita in ambito europeo - in modo da renderlo conforme alle reali esigenze e potenzialità applicative delle Agenzie italiane. Più in generale, il metodo è stato espressamente definito per soddisfare i requisiti della Direttiva europea sulle acque, sia in merito alla registrazione delle abbondanze degli individui raccolti, sia in merito alla "ripetibilità" (i.e. standardizzazione) della procedura, con il fine specifico di consentire la raccolta di campioni di invertebrati volti alla classificazione dello stato ecologico.

La prima presentazione del metodo è avvenuta nel marzo 2007, quando è stato pubblicato un numero speciale del Notiziario dei Metodi Analitici del CNR-IRSA dedicato principalmente alla descrizione del metodo di campionamento degli invertebrati nei fiumi guadabili. Quasi contemporaneamente, veniva messo a disposizione degli operatori del settore anche un documento la cui stesura è stata coordinata da APAT (ora ISPRA) [1], sempre dedicato al campionamento degli invertebrati, che riprendeva alcuni degli aspetti affrontati nel Notiziario CNR-IRSA, in versione semplificata e riassunta.

Trovandoci ora a oltre 5 anni dalle prime esperienze di utilizzo del nuovo metodo di campionamento da parte delle Agenzie, è emersa la necessità di disporre di una nuova sintesi, comprensiva di qualche aggiornamento e di alcune nuove specifiche, di quanto descritto nel Notiziario CNR-IRSA del marzo 2007 e in APAT 2007. Per predisporre la nuova sintesi, è stato principalmente coinvolto, oltre a CNR-IRSA e ISPRA, il gruppo di Lavoro interagenziale 'Metodi Biologici'. Da questa collaborazione nasce quindi il presente documento, che riprende in gran parte testi già riportati nel Notiziario CNR-IRSA (2007). Data la necessità di sintetizzare quanto a volte più estesamente riportato nel Notiziario, sebbene si ritenga che quanto qui riportato sia sufficiente come guida al campionamento, si segnala l'opportunità di fare riferimento per alcuni dettagli ai testi specifici del citato Notiziario.

La tecnica di campionamento qui descritta è adatta alla raccolta dei macroinvertebrati bentonici in fiumi guadabili (o comunque accessibili) e si propone come testo di riferimento per la messa in opera del campionamento di questo elemento biologico ai fini dell'implementazione della Direttiva quadro sulle acque.

## INTRODUZIONE

I macroinvertebrati bentonici sono organismi particolarmente adatti all'impiego nel biomonitoraggio e nella valutazione della qualità dei fiumi, dati la limitata mobilità, la presenza di gruppi con differente sensibilità alle cause di alterazione, la relativa facilità di campionamento e di identificazione, i molteplici ruoli nella rete trofica, l'ampia diffusione nei corsi d'acqua.

In questo documento viene proposto un protocollo per la raccolta e la determinazione della composizione e dell'abbondanza dei macroinvertebrati bentonici, finalizzate alla ricostruzione di alcuni tratti caratteristici delle comunità per la valutazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua guadabili.

Il metodo proposto in questo documento si basa su un approccio multihabitat, che prevede una raccolta dei macroinvertebrati proporzionale all'estensione relativa dei diversi microhabitat osservati in un sito fluviale, la cui presenza deve quindi essere preventivamente stimata.

La validità delle indagini biologiche ed ecologiche dipende in grande misura dall'accuratezza e dalla precisione con cui il dato infine utilizzato viene prodotto. In questo ambito le attività collegate al campionamento (*sensu lato*) e alla determinazione tassonomica degli organismi rivestono un ruolo cruciale. È quindi necessario che queste attività vengano condotte da personale specializzato e che abbia ricevuto una formazione dedicata.

Il presente protocollo individua tutte le operazioni collegate al campionamento, e indica i comportamenti da adottare per tenere sotto controllo e ridurre i principali errori che potrebbero essere introdotti. Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso.

## 1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo documento definisce le modalità per il campionamento e la determinazione della composizione e dell'abbondanza dei macroinvertebrati bentonici in linea con le richieste della Direttiva 2000/60/CE [4], del D.Lgs. n. 152/2006 [5] e dei decreti attuativi (DM n. 131/2008, DM n. 56/2009 e DM n. 260/2010 [15, 16, 17, 18]) ai fini del monitoraggio e della valutazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua guadabili, utilizzando tali organismi come elementi di qualità biologica.

La tecnica di campionamento prevede una raccolta dei macroinvertebrati proporzionale all'estensione relativa dei diversi microhabitat osservati in un sito fluviale. Il campionamento multihabitat proporzionale è legato alla necessità di raccogliere gli invertebrati bentonici in modo standardizzato, riducendo il più possibile la variabilità legata alla fase di campionamento.

La procedura di campionamento è applicabile a tutti i corsi d'acqua guadabili. Per "guadabili" si intendono quei tratti di corso d'acqua dove sia possibile accedere, in sicurezza, a porzioni di alveo sufficientemente estese e tali da consentire di raggiungere tutti i principali microhabitat rappresentativi del sito per il campionamento. Nell'ambito del presente protocollo e a titolo orientativo, si considerano guadabili i corsi d'acqua il cui alveo risulta almeno accessibile per circa 1/3 della sua ampiezza.

## 2. RIFERIMENTI

UNI EN 27828:1996. Qualità dell'acqua – Metodi di campionamento biologico – Guida al campionamento di macroinvertebrati bentonici mediante retino manuale.

UNI EN 28265:1995. Qualità dell'acqua – Progettazione e utilizzo di campionatori quantitativi di macroinvertebrati bentonici su substrati rocciosi in acque dolci poco profonde.

UNI EN 16150:2013. Qualità dell'acqua - Guida per il campionamento proporzionale Multi-

Habitat dei macroinvertebrati bentonici di fiumi guadabili.

UNI EN 14996:2006. Qualità dell'acqua – Linea guida per assicurare la qualità delle valutazioni biologiche ed ecologiche nell'ambiente acquatico.

ISO 10870:2012. Water quality — Guidelines for the selection of sampling methods and devices for benthic macroinvertebrates in fresh waters.

### 3. TERMINI E DEFINIZIONI

Per il seguente protocollo si applicano i seguenti termini e definizioni (in ordine alfabetico).

**Bentonico:** associato al substrato del fondo di un ambiente acquatico o ancorato ad esso.

**Campione:** integrazione di un numero definito di unità di campionamento raccolte in un dato mesohabitat di un sito in una specifica data; ad ogni campione corrisponde una lista faunistica.

**Generico:** ai sensi del presente protocollo, termine utilizzato per indicare il campionamento effettuato in un'area fluviale in cui la sequenza pool/riffle non è riconoscibile al momento del campionamento; in questa area l'allocazione delle unità di campionamento viene effettuata in modo proporzionale in un tratto qualsiasi ritenuto rappresentativo del corso d'acqua.

**Macroinvertebrati:** invertebrati facilmente visibili senza ingrandimenti (> 0,5 mm)

**Mesohabitat o area di campionamento:** tratto fluviale in cui avviene il campionamento (pool, riffle o generico).

**Microhabitat:** porzione dell'ambiente fluviale caratterizzata da omogeneità di substrato (minerale o biotico).

**Pool:** ai sensi del presente protocollo, area omogenea del corso d'acqua con minor turbolenza rispetto all'area di riffle; tale area si riconosce anche per la tendenza ad ospitare – in regime di magra o morbida – depositi di detrito organico (e.g. CPOM, FPOM) e di sedimenti fini (e.g. limo) e si presenta spesso come un'area relativamente profonda; area a carattere tendenzialmente lentico o comunque meno lotico dell'area di riffle.

**Riffle:** ai sensi del presente protocollo, area omogenea del corso d'acqua caratterizzata da una turbolenza più elevata rispetto all'area di pool, dalla minor profondità relativa e dalla minor presenza di depositi di detrito organico; area a carattere più decisamente lotico

**Substrato:** materiale naturale o non-naturale sul quale si insediano i macroinvertebrati bentonici.

**Unità di campionamento, replica o incremento:** campione raccolto smuovendo, su una superficie definita, il substrato localizzato immediatamente a monte del punto in cui viene posizionata l'imboccatura della rete.

**Unità operazionali:** gruppi di taxa a livello predefinito di identificazione, basati su affinità tassonomiche, morfologiche o ecologiche tra le specie.

## 4. STRUMENTAZIONE E ATTREZZATURA

### 4.1 Strumenti per il campionamento

#### 4.1.1 Rete Surber [6]

La rete Surber è fornita di pareti laterali, di solito metalliche (in acciaio o lega di alluminio) ed è aperta sul davanti; la forma dell'intelaiatura del retino è di norma quadrata (raramente rettangolare).

Le dimensioni dell'intelaiatura che definisce l'unità di campionamento sono pari a 0,22x0,23m e 0,32x0,32m per aree unitarie rispettivamente di 0,05 m<sup>2</sup> e 0,1 m<sup>2</sup>. Le dimensioni dell'intelaiatura devono essere tali da garantire le superfici specificate e una superficie assimilabile a un

quadrato.

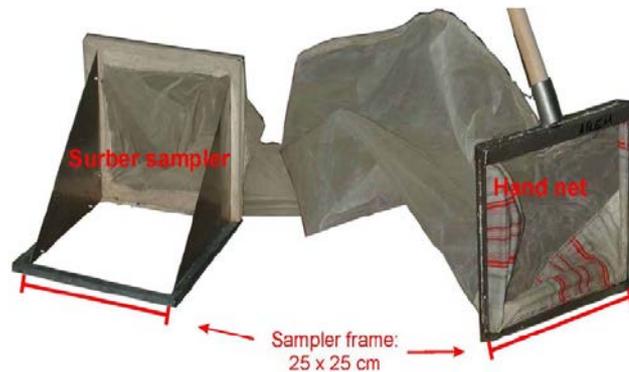
La forma della rete vera e propria è a cono, con una lunghezza approssimativa di 0,6-0,8 m.

La dimensione delle maglie della rete è di 500  $\mu\text{m}$ .

Nella parte terminale del sacco è presente un bicchiere di raccolta (facoltativo).

Per comodità di utilizzo la rete Surber può essere dotata di un manico avvitabile, sul lato superiore dell'intelaiatura.

L'uso della rete Surber è indicato per tutti gli habitat non molto profondi ( $< 0,5$  m e preferibilmente a campionario non completamente sommerso) a corrente elevata, media, scarsa o nulla.



**Figura 1 - Rete Surber.**

#### **4.1.2 Retino manuale immanicato[6]**

Il retino manuale immanicato è costituito da un'intelaiatura quadrata (o rettangolare), aperta sul davanti. Sul lato superiore dell'intelaiatura è inserito un manico, possibilmente avvitabile ed estensibile.

Durante il campionamento, davanti all'imboccatura del retino deve essere posizionato uno strumento che delimiti l'area da campionare che, a seconda del tipo fluviale, sarà pari a 0,05 m<sup>2</sup> o 0,1 m<sup>2</sup> per unità di campionamento (dimensioni rispettivamente di 0,22x0,23 m e 0,32x0,32 m). Le dimensioni dell'intelaiatura devono essere tali da garantire le superfici specificate e una superficie assimilabile a un quadrato.

La forma della rete vera e propria è a cono, con una lunghezza approssimativa di 0,6-0,8 m.

La dimensione delle maglie della rete è di 500  $\mu\text{m}$ .

Nella parte terminale del sacco è presente un bicchiere di raccolta (facoltativo).

L'uso del retino immanicato è consigliato nel caso di habitat caratterizzati da profondità maggiori di 0,5 m o da megalithal.



**Figura 2 - Retino manuale immanicato.** Il retino manuale immanicato deve essere utilizzato insieme ad un quadrato che delimiti l'area di campionamento affinché il campione raccolto possa essere considerato quantitativo.

## 4.2 Materiale da campo necessario

- Stivali (di gomma o neoprene) tuttacoscia
- Stivali (di gomma o neoprene) a salopette con cintura di sicurezza (raccomandata), per campionamenti in acque profonde
- Guanti (di gomma spessa o neoprene) lunghezza circa 70 cm (all'ascella)
- Guanti in lattice o in nitrile monouso
- Paletta con manico, raschietto, cacciavite, rastrello, palo o altri strumenti idonei per smuovere il substrato
- Secchi di diverso volume (e.g. 3, 5, 10 litri), consigliati con coperchio
- Vaschette per smistamento in plastica bianca consigliate con fondo a costolature, di varie dimensioni (e.g. 50x40x12 cm, 35x30x7 cm, 20x10x5 cm).
- Provette per raccolta di materiale da identificare in laboratorio con tappo a tenuta, consigliate di varie capacità (e.g. 5, 10, 30 mL)
- Alcool etilico 75-90% in quantità adeguata per la conservazione degli organismi
- Pinzette in acciaio da entomologo e/o da orologiaio, di vari modelli (e.g. punta acuminata, punta tonda)
- Lenti di ingrandimento
- Tavolo e sedie da campeggio pieghevoli
- Scheda di riferimento della stazione con le informazioni per raggiungere il punto di campionamento
- Schede per il rilevamento in campo
- Atlante fotografico macroinvertebrati
- Materiale di cancelleria minimo: matite, gomme, biro, pennarello indelebile
- Etichette di carta, eventualmente autoadesive
- Fotocamera

## 4.3 Materiale da campo utile (non indispensabile)

- Colini a diverse maglie, utili nella fase di smistamento
- Spruzzette da 500 mL o 1000 mL con acqua distillata
- Asta graduata per la misura della profondità
- Ricevitore GPS
- Strumenti portatili per misurazione di temperatura, ossigeno disciolto, pH, conducibilità
- Ombrellone o copertura mobile per ripararsi dal sole o dalla pioggia durante l'attività di separazione del campione in campo
- Borsa frigo per campioni

## 4.4 Materiale da laboratorio

- Microscopio ottico
- Microscopio stereoscopico
- Pinzette in da entomologo e/o da orologiaio, di vari modelli (e.g. punta acuminata, punta tonda)
- Piastre Petri e vetri da orologio di varie dimensioni
- Vetrini portaoggetti e vetrini coprioggetti
- Guide per l'identificazione degli organismi e iconografie
- Alcool etilico 75-90% in quantità adeguata per la conservazione degli organismi
- Glicerina (eventuale)

## 5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

### 5.1 Generalità

Il metodo si basa sul campionamento dei microhabitat più rappresentativi del tratto fluviale selezionato, in relazione alla loro presenza percentuale, con l'esplicito obiettivo minimo di poter successivamente giungere ad una valutazione della qualità ecologica del corpo idrico ai sensi della Direttiva 2000/60/CE.

La tecnica di campionamento multihabitat proporzionale consente di campionare in modo standard un tratto fluviale, riducendo il più possibile la variabilità legata alla scelta dei microhabitat nei quali effettuare il campionamento.

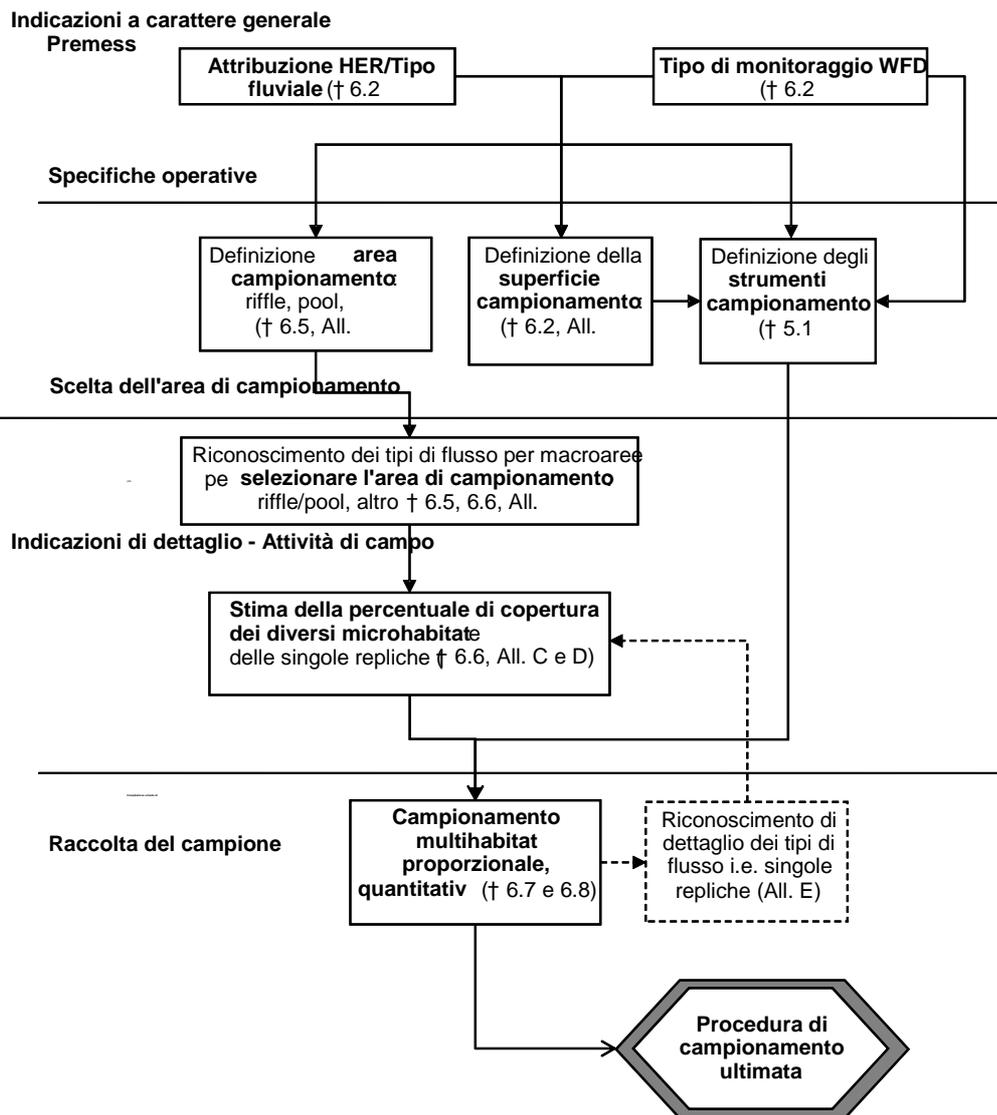
Un campione è costituito dall'insieme di 10 unità di campionamento (repliche o incrementi) raccolte in una definita area di campionamento (mesohabitat). Le unità di campionamento sono allocate in base alla presenza dei microhabitat minerali e biotici, la cui percentuale di copertura è registrata a intervalli minimi del 10%, relativamente all'area totale di campionamento (1 m<sup>2</sup> o 0,5 m<sup>2</sup>).

Una unità di campionamento corrisponde al campione raccolto smuovendo il substrato localizzato immediatamente a monte del punto in cui viene posizionata l'imboccatura della rete. Il campionamento è quantitativo, quindi si farà riferimento ad una superficie complessiva di 0,5 m<sup>2</sup> o 1 m<sup>2</sup>, specifica a seconda dell'idroecoregione (HER; Allegato A) alla quale il corpo idrico analizzato appartiene.

Le liste faunistiche che si ottengono dal campionamento multihabitat proporzionale possono essere utilizzate per la definizione dello stato ecologico del corpo idrico sulla base del metodo di valutazione idoneo allo scopo.

Il campionamento multihabitat proporzionale può non essere del tutto rappresentativo della reale diversità dei microhabitat presenti. Esso infatti per definizione trascura i microhabitat presenti al di sotto della soglia del 10%. Se l'obiettivo del campionamento è specificatamente legato alla valutazione della ricchezza tassonomica globale del sito si potranno effettuare raccolte integrative di tipo qualitativo o quantitativo.

L'intera procedura di campionamento è descritta nello schema di figura 3.



**Figura 3** - Diagramma illustrante i principali passaggi della procedura di campionamento (modificato da [6]).

## 5.2 Pianificazione del monitoraggio

Il campionamento dei macroinvertebrati bentonici è preceduto da una fase di pianificazione generale del monitoraggio nell'ambito della quale devono essere definiti:

- idroecoregione (HER; Allegato A) e tipo fluviale a cui appartiene il corpo idrico dove è collocato il sito da campionare;
- tipo di monitoraggio (sorveglianza, operativo, di indagine, altro) che deve essere effettuato;
- mesohabitat previsto per la raccolta del campione (riffle, pool o generico);
- superficie totale di campionamento (0,5 m<sup>2</sup> o 1 m<sup>2</sup>) e idonei strumenti di campionamento.

### 5.3 Periodo di campionamento e condizioni ambientali

La maggior parte delle popolazioni di invertebrati bentonici è soggetta a cicli vitali stagionali; pertanto, per poter definire in modo comparabile tra diversi siti la composizione tassonomica di un sito, le abbondanze degli individui e la diversità, le stagioni di campionamento devono essere chiaramente stabilite [6]. In molti tipi fluviali italiani, le stagioni migliori per il campionamento sono: inverno (febbraio, inizio marzo), tarda primavera (maggio), tarda estate (settembre). Il periodo di campionamento più adatto è soprattutto legato al tipo fluviale in esame e all'eventuale stagionalità degli impatti/pressioni. Peraltro, in alcuni tipi fluviali il campione raccolto in diverse stagioni porta a risultati del tutto comparabili, non richiedendo una particolare modulazione del campionamento nel corso dell'anno. In ogni caso, è preferibile procedere al campionamento in regime di magra e di morbida derivato da portate decrescenti, indipendentemente dalla stagione.

Va evitato il campionamento se si sono verificate o si verificano una o più delle seguenti situazioni:

- durante o subito dopo eventi di piena (si consiglia di attendere almeno 2 settimane per consentire la completa ricolonizzazione dei substrati);
- durante o subito dopo periodi di secca estrema; con il ripristino del normale regime idrologico è opportuno attendere almeno 3-4 settimane (meglio 2 mesi, se all'interno del bacino fluviale considerato solo in pochi settori fluviali non si manifesta la secca) allo scopo di permettere il ripopolamento;
- dopo periodi di magra è necessario fare molta attenzione sulla scelta delle aree di alveo in cui raccogliere i campioni in quanto occorre evitare zone (e.g. lungo le rive) che, rimaste in asciutta per lungo tempo, risultano da poco ricoperte dall'acqua e dove non è ancora avvenuta una colonizzazione;
- se qualche fattore impedisce una stima dell'estensione relativa dei microhabitat (e.g. in caso di elevata torbidità) è possibile procedere comunque al campionamento, collocando le repliche in maniera casuale all'interno dell'alveo e registrando successivamente il tipo di microhabitat riscontrato solo nel caso in cui tali fattori, naturali o antropici, si presentino costantemente o per buona parte dell'anno nel corpo idrico;
- per i fiumi temporanei, nel periodo in cui potrebbe manifestarsi una situazione di asciutta, verificare che non ci siano stati eventi di pioggia intensa o prolungata nei giorni/settimane precedenti il campionamento.

### 5.4 Selezione del sito di campionamento

Il sito di campionamento (stazione) è una porzione di corpo idrico in cui viene effettuata la raccolta del campione biologico. Esso dovrebbe essere rappresentativo, in termini di caratteristiche ambientali e di pressioni, del corpo idrico e non deve risentire di alterazioni molto localizzate. Il sito dovrebbe includere una sequenza riffle/pool, se collocato all'interno di un tipo fluviale che la prevede (par. 6.5).

L'estensione del sito da campionare dipende principalmente dalla variabilità degli habitat acquatici e dalla larghezza dell'alveo fluviale, i.e. è in relazione al tipo fluviale di appartenenza. In generale, essa non dovrebbe essere inferiore ai 15 metri di lunghezza e deve essere determinata con l'obiettivo di ottenere la massima rappresentatività di porzioni più ampie del corpo idrico.

Alcuni aspetti da valutare nella scelta dei siti di campionamento sono riportati nel seguito.

- Morfologia e composizione degli habitat. Il sito deve essere rappresentativo della composizione in microhabitat del corpo idrico a cui appartiene. Per esempio, se il corpo idrico è prevalentemente libero da accumuli di detrito organico si dovrebbe evitare di campionare in una zona con deposito di CPOM molto localizzato. Il rilievo delle

principali caratteristiche idromorfologiche (e.g. tipo di substrato, tipo di flusso) prima del campionamento su un tratto rappresentativo (e.g. 500 m) può aiutare a verificare la rappresentatività del campione che verrà raccolto.

- Idrologia. Aree fluviali affette da flusso residuo o da piene improvvise devono essere evitate a meno che non siano rappresentative di una porzione ritenuta significativa (e.g.  $\geq 15\%$ ) del corpo idrico considerato e/o la loro caratterizzazione non rientri nelle finalità del monitoraggio.
- Vegetazione di riva. Il sito deve essere rappresentativo, in termini di vegetazione riparia, dell'ombreggiatura mediamente presente nel corpo idrico.
- Presenza di strutture di origine antropica. Il campionamento in zone nelle immediate vicinanze di soglie o briglie (o altre strutture di origine antropica) dovrebbe essere evitato, a meno che tali strutture non siano rappresentative delle principali pressioni presenti sul corpo idrico da monitorare.
- Sorgenti puntiformi di inquinamento. Se vi sono scarichi inquinanti, come per esempio punti di immissione di acque reflue, in un breve tratto del corso d'acqua, il sito di campionamento non dovrebbe essere scelto vicino allo scarico. Al contrario, il sito di campionamento dovrebbe essere scelto in modo tale da garantire la raccolta del campione in una zona ove il rimescolamento delle acque sia completo.

## 5.5 Selezione dell'area di campionamento

Il campionamento viene condotto all'interno di un'area del sito che presenta caratteristiche omogenee (mesohabitat).

A tal fine si effettua, all'interno del sito di campionamento, la verifica della sequenza dei mesohabitat riffle/pool. Essa è costituita da due aree contigue che presentano caratteristiche di turbolenza, profondità, granulometria del substrato e carattere deposizionale/erosionale comparativamente diverso. La chiave del riconoscimento di tale sequenza è la comparazione fra due aree adiacenti che presentano caratteristiche di flusso differenti (Allegato B).

Nel caso in cui non sia possibile riconoscere questa sequenza, l'area di campionamento sarà individuata in un generico tratto rappresentativo del corso d'acqua. Questi casi si verificano tipicamente per i torrenti montani in area alpina ad elevata pendenza e nei piccoli corsi d'acqua di pianura con scarse variazioni di portata.

## 5.6 Stima della composizione in microhabitat e allocazione delle unità di campionamento

Dopo avere individuato il mesohabitat di campionamento idoneo (riffle, pool o generico), si procederà all'analisi della struttura in microhabitat dell'area stessa (Allegato C e Allegato D).

La percentuale di presenza dei singoli microhabitat deve essere registrata a intervalli del 10%, ciascuno dei quali corrisponde ad una unità di campionamento. Il numero totale di unità di campionamento per ciascun mesohabitat sarà pertanto pari a 10.

Eventuali altri microhabitat che dovessero essere presenti con una percentuale inferiore al 10% sono registrati come presenti. La presenza e la quantificazione di ciascun microhabitat sono registrate nella scheda di campionamento (par. 7.4).

Per definire le percentuali di presenza dei microhabitat, il substrato minerale e quello biotico devono essere considerati come un unico strato. La somma di tutti i microhabitat registrati (minerali e biotici) deve essere pari al 100%.

Se il substrato minerale è ricoperto totalmente o quasi da formazioni biotiche (ad esempio film batterici, crisofite come *Hydrurus foetidus*) o da un sottile strato di materiale fine inorganico o organico, ciò deve essere segnalato sulla scheda di campo. In tal caso si procederà all'allocazione delle unità di campionamento in relazione alla presenza dei microhabitat minerali sottostanti, e il campionamento verrà effettuato come se dette formazioni non esistessero. Nel caso in cui l'alveo fluviale sia interamente (o quasi) ricoperto da macrofite (es. alghe

filamentose),

all'allocazione delle unità di campionamento in relazione alla presenza dei microhabitat vegetali ed il campionamento verrà effettuato fino ad arrivare a disturbare la superficie del substrato minerale su cui tali formazioni biotiche sono situate.

All'interno del mesohabitat in cui il campionamento deve essere effettuato, ove possibile, le unità di campionamento dovranno essere adeguatamente distribuite tra centro alveo e rive. Quando si debbano posizionare più unità di campionamento sullo stesso tipo di substrato, l'allocazione delle repliche viene effettuata tenendo conto della eventuale diversificazione dei tipi di flusso presenti.

I tipi di flusso osservati in corrispondenza di ciascuna replica sono classificati visivamente in base al grado di turbolenza superficiale dell'acqua (Allegato E) e vengono segnalati sulla scheda di campionamento (par. 6.9). L'informazione così registrata potrà risultare un utile supporto all'interpretazione di eventuali differenze non imputabili all'effetto di alterazioni antropiche.

Per quanto riguarda i substrati biotici, sono da considerare tali solo quei substrati la cui copertura di macrofite è tale da non consentire l'individuazione dei substrati minerali sottostanti. In relazione al tipo fluviale alcuni di essi possono risultare poco rappresentativi o non rinvenibili con costanza. Si tratta cioè di habitat che, qualora inclusi nel campionamento, determinerebbero un incremento della variabilità associata al campione raccolto, rendendolo meno rappresentativo. Per tale motivo, in area alpina (HER 1, 2, 3, 4), per l'assegnazione proporzionale delle unità di campionamento devono essere considerati solo i substrati minerali.

## **5.7 Raccomandazioni generali per il campionamento degli organismi**

Per le operazioni di campo devono essere presenti almeno due operatori qualificati.

Il campionamento inizia nel punto più a valle dell'area scelta e prosegue verso monte in modo da non recare disturbo alle aree/microhabitat che saranno campionati successivamente. Particolare attenzione va posta a non calpestare in alcun modo gli habitat non ancora campionati. E' consigliabile, nel caso si preveda di entrare ed uscire dall'acqua, seguire un percorso prestabilito. Può essere utile disegnare una mappa della zona di campionamento come supporto alla scelta dei microhabitat.

Nel caso in cui ci si trovi a campionare in condizioni di portata crescente è necessario prestare attenzione a non selezionare microhabitat di riva.

Qualunque sia il substrato oggetto di campionamento, o il tipo di retino utilizzato, la rete deve essere disposta contro corrente ben appoggiata al fondo e il barattolo raccogliatore deve essere completamente riempito d'acqua in modo che i macroinvertebrati possano passare dalla rete al barattolo.

Per procedere al campionamento è necessario smuovere, su una superficie definita, il substrato localizzato immediatamente a monte del punto in cui viene posizionata l'imboccatura della rete. La tecnica di campionamento con la rete Surber prevede l'utilizzo delle mani (protette da guanti di adeguata lunghezza), ed eventualmente l'ausilio di adeguati strumenti (paletta con manico, raschietto, cacciavite, ...), per il disturbo del substrato di minore granulometria e la rimozione degli organismi.

Nel caso di uso di retino immanicato si può procedere al campionamento utilizzando i piedi o altri strumenti idonei (pali, rastrelli, ...) per smuovere il fondo. Quest'ultima modalità è sicuramente necessaria per gli ambienti caratterizzati da elevata profondità dell'acqua (> 0,5 m); in tali condizioni, il campionario deve essere tenuto verticale, in opposizione alla corrente, a valle dei piedi dell'operatore e il substrato fluviale deve essere rimosso con energia.

Il campione finale è costituito da un totale di 10 repliche raccolte, a seconda dell'HER cui appartiene il corpo idrico in questione:

- in un'area complessiva di 0,5 m<sup>2</sup> (ciascuna replica di area pari a 0,05 m<sup>2</sup>);
- o in un'area complessiva di 1 m<sup>2</sup> (ciascuna replica di area pari a 0,1 m<sup>2</sup>).

## **5.8 Descrizione delle modalità di campionamento nei singoli microhabitat**

I principali microhabitat rinvenibili in un fiume possono essere raggruppati in due categorie: microhabitat minerali (Allegato C) e microhabitat biotici (Allegato D).

I microhabitat minerali sono catalogati in base alle dimensioni del substrato dominante, rilevate lungo l'asse intermedio.

I substrati minerali più grossolani sono spesso caratterizzati dalla presenza di elementi a granulometria più fine che si depositano negli spazi interstiziali presenti tra le pietre più grosse. In questo caso il riconoscimento del microhabitat viene effettuato osservando la frazione più grossolana maggiormente presente nell'area scelta per il campionamento.

Nel seguito sono descritti in dettaglio le procedure di campionamento in alcuni microhabitat specifici [6].

### Megalithal (roccia e grossi massi)

Solo la superficie laterale o superiore può essere efficacemente campionata. Infatti, per via delle sue dimensioni, tale substrato non è sollevabile. Si deve fare in modo di sfregare la superficie del megalithal in diverse posizioni (superiore, anteriore, lati, etc.), spostando la rete in modo da rispettare comunque la superficie da campionare.

### Artificiale

In genere, la sola differenza tra megalithal ed artificiale consiste nella naturalità del substrato. L'habitat artificiale è solitamente costituito da cemento o grossi blocchi immessi non naturalmente nel fiume a scopo di rinforzo dell'alveo e/o delle rive. Il campionamento si effettua pertanto con le medesime modalità descritte per il megalithal.

### Macrolithal (massi)

Il substrato di questo tipo è di solito facilmente movibile, ma spesso presenta delle difficoltà ad essere compreso all'interno dell'area delimitata dalla rete Surber.

Individuato il masso da campionare si ripulisce accuratamente la superficie superiore e inferiore per rimuovere gli organismi più superficiali, quindi si procede al campionamento del substrato sottostante fino ad una profondità di almeno 10 cm, eventualmente utilizzando una paletta o un raschietto.

In caso di corrente molto scarsa o assente, si suggerisce di smuovere il substrato indirizzando il flusso con le mani affinché gli organismi entrino nella rete.

### Mesolithal (ciottoli e sassi)

Il campionamento inizia disturbando il substrato in superficie per rimuovere gli organismi più superficiali. Si procede quindi spostando le pietre e pulendole a fondo per favorire il distacco degli organismi eventualmente presenti. Si consiglia di mettere da parte le pietre più grosse per una successiva ispezione. Una volta rimosse le pietre, si deve procedere al campionamento dello strato di substrato sottostante fino ad una profondità di almeno 10 cm, eventualmente utilizzando una paletta o un raschietto. In caso di corrente molto scarsa o assente, si suggerisce di smuovere il substrato indirizzando il flusso con le mani affinché gli organismi entrino nella rete.

### Microlithal e substrati a granulometria fine (piccole pietre, ghiaia, sabbia, limo/argilla)

È necessario disturbare il substrato nell'area delimitata a monte della imboccatura della rete ad una profondità di 5-10 cm. È inoltre opportuno evitare che grandi quantità di substrato entrino nella rete, stando comunque attenti a non perdere gli organismi.

In caso di corrente molto scarsa o assente, si suggerisce di smuovere il substrato indirizzando il

flusso con le mani affinché gli organismi entrino nella rete; in tali condizioni è possibile muovere la rete nella colonna d'acqua attraverso la nuvola dei sedimenti eventualmente sollevati, in modo da catturare gli organismi che si staccano dal substrato.

Utilizzare la rete come setaccio per ripulire in acqua il campione dai substrati più sottili.

### Xylal (detrito legnoso)

È necessario evitare di campionare materiale legnoso depositatosi in tempi troppo recenti e quindi non ancora ben colonizzato. Il metodo migliore per separare gli organismi dal legno è quello di prelevare il materiale legnoso riponendolo in una vaschetta o in un secchio e lavarlo con vigore con acqua in modo che gli organismi si staccino dal substrato. Inoltre, andrà effettuata una ricerca diretta degli organismi eventualmente ancorati al supporto legnoso.

### Parti vive di Piante Terrestri (radichette sommerse alla base della sponda)

Posizionare la rete attorno alle radici, evitando le radici legnose, e scuoterle vigorosamente all'interno della rete ripulendole dagli organismi.

### CPOM (detrito fogliare e piccoli rametti)

Il campionamento avviene disturbando il substrato all'interno dell'area delimitata a monte dell'imboccatura della rete, evitando comunque la raccolta di grandi quantità di detrito. Il materiale che si raccoglie nella rete, deve essere accuratamente lavato per favorire il distacco degli animali dal detrito organico. È bene tenere separato il CPOM dalla restante porzione di campione per facilitarne lo smistamento.

### FPOM

Il materiale organico che costituisce il microhabitat FPOM può risultare più o meno frammentato. Il particolato organico finemente sminuzzato (diametro minore di 6 µm) rientra nel microhabitat limo/argilla, anche perché risulta difficile discriminare l'origine quando i substrati hanno tali dimensioni. In generale, valgono gli stessi accorgimenti descritti per i substrati minerali fini.

### Macrofite emergenti o sommerse

Sono da ricomprendere in questo habitat tracheofite e briofite. Il campionamento avviene smuovendo le macrofite nell'area da campionare. Se l'attività di monitoraggio richiede un'analisi di dettaglio si suggerisce di asportare – ed eventualmente portare in laboratorio – alcuni campioni di macrofite per un'ispezione più accurata che consenta la cattura dei taxa che non vengono facilmente rimossi dal semplice vigoroso lavaggio delle macrofite durante il campionamento.

### Alghe (principalmente filamentose)

Si procede a scuotere le alghe nella rete quando queste formino delle masse consistenti; in alternativa, quando esse si rivelino poco consistenti, si procede disturbando la superficie delle formazioni algali. In ogni caso, è utile non raccogliere substrato in quantità eccessiva. Lo smistamento degli organismi raccolti su questo microhabitat può risultare talvolta problematico per la difficoltà di isolare gli individui tenacemente adesi o intrappolati dal substrato. Si suggerisce in tal caso di tenere separata la replica, analogamente a quanto suggerito per il CPOM, e trattare poco per volta piccole quantità di substrato. Per lo smistamento in presenza di alghe può risultare utile sciacquare le stesse e posizionarle all'asciutto all'interno della vaschetta per favorire il distacco degli organismi.

## 5.9 Scheda di campionamento

Tutte le informazioni utili relative al campionamento devono essere annotate su un'apposita scheda. Un esempio di scheda di campionamento è riportato in Allegato F.

Nella parte generale della scheda di campionamento saranno indicati la data di campionamento, il codice del sito e la sua localizzazione (e.g. comune, provincia, regione) e l'idrocoregione di appartenenza.

Molto importante è fornire l'indicazione del tipo di monitoraggio che si sta effettuando, in modo da stabilire il numero complessivo di repliche da raccogliere. È necessario indicare se il campionamento è stato effettuato nell'area di riffle, nell'area di pool o in un mesohabitat generico. Il riconoscimento della sequenza riffle/pool è uno dei presupposti del campionamento, pertanto è utile indicare nella scheda se la sequenza riffle/pool sia o meno riconoscibile e a che tipo di sequenza somigli rispetto alle sequenze fotografiche riportate in Allegato B.

Ulteriore indicazione riferita alla raccolta da riportare sulla scheda riguarda lo strumento utilizzato per il campionamento e la superficie totale campionata.

È inoltre possibile riportare sulla scheda alcuni dei parametri chimico-fisici più spesso determinati direttamente su campo (e.g. pH, conducibilità, concentrazione di ossigeno disciolto e temperatura). Nel caso in cui alcune di queste misure non venissero effettuate su campo, le caselle corrispondenti possono essere lasciate vuote e completate una volta effettuate le analisi in laboratorio.

Qualora nella stagione di campionamento sia già in corso un programma di monitoraggio di qualità chimico-fisica dell'acqua, i dati relativi ai parametri chimico-fisici possono essere derivati da quelli reperiti durante le attività di monitoraggio di natura chimico-fisica.

Nella scheda dovranno essere indicati i vari microhabitat presenti nel sito di campionamento. In particolare, per la raccolta delle 10 repliche proporzionali, sono da indicare le percentuali di presenza dei singoli microhabitat e, accanto alla percentuale, il numero di unità di campionamento che è necessario raccogliere. Per ciascuna unità di campionamento sarà registrato il tipo di flusso associato.

## 6. PROCEDURE ANALITICHE

### 6.1 Smistamento del campione e stima delle abbondanze

Il campione deve essere completamente smistato in campo. Dopo avere mescolato nel contenitore principale il campione raccolto con la rete, il materiale viene trasferito in un adeguato numero di vaschette (sottocampioni). Successivamente si procede allo smistamento dell'intero campione, effettuando l'identificazione degli organismi al livello tassonomico richiesto (par. 7.4) e la stima delle corrispondenti abbondanze. Lo smistamento e la stima delle abbondanze possono avvenire utilizzando vaschette con fondo a costolature [6].

In caso di estrema necessità, qualora i tempi di trasporto lo consentano, il campione può essere trasferito in laboratorio – eventualmente suddiviso in più contenitori, all'occorrenza refrigerati e possibilmente ossigenati – dove si procederà allo smistamento in vivo e alla stima delle abbondanze nel più breve tempo possibile, e comunque entro il termine della giornata lavorativa. Per finalità specifiche, o semplicemente per facilità di smistamento degli organismi, le repliche possono essere raccolte e smistate singolarmente o aggregate in base ad altre caratteristiche (e.g. microhabitat omogenei).

Gli individui appartenenti a taxa con basse presenze numeriche per sottocampione (e.g. fino a 20-30 individui) vanno preferibilmente contati. Il numero di individui appartenenti a taxa con presenze numeriche molto elevate per sottocampione (e.g. > 50 individui), che risultano dominanti rispetto all'intera popolazione, è preferibilmente stimato.

Un metodo di stima che si è mostrato sufficientemente affidabile è quello che prevede di contare gli individui di una porzione del sottocampione (e.g. metà, un terzo, un quarto) e di moltiplicare tale numero per il fattore corrispondente (e.g. 2, 3, 4) al fine di ottenere la stima per l'intero sottocampione (vaschetta).

Un altro possibile metodo di smistamento e stima delle abbondanze degli organismi consiste nella distribuzione uniforme in più vaschette (e.g. 4) dell'intero campione raccolto e miscelato in modo da ottenere dei sottocampioni il più possibile omogenei. I taxa rappresentati da pochi individui (e.g. < 10-20) verranno contati in tutti i sottocampioni, quelli con presenze numeriche rilevanti verranno invece contati solo in un sottocampione e il valore osservato verrà moltiplicato per il numero totale di sottocampioni formati.

Quando nel campione sono presenti numerosi individui appartenenti a taxa o gruppi morfologicamente simili e difficilmente distinguibili in campo (e.g. unità operazionali di efemerotteri), si suggerisce di procedere nel seguente modo:

- stimare l'abbondanza complessiva degli individui morfologicamente simili, senza distinguere i diversi taxa o unità operazionali;
- conservare in etanolo un sottocampione di qualche decina di individui raccolti dai diversi sottocampioni differenziando e.g. taglia, colore, eventuale attitudine al nuoto;
- in laboratorio identificare e contare gli organismi raccolti;
- attribuire le abbondanze totali a ciascun taxon o gruppo in base alla sua distribuzione percentuale nel campione fissato.

*Esempio. Nel campione raccolto vengono stimati 150 individui appartenenti alla famiglia Heptageniidae. Nel campione fissato, dove sono stati raccolti 30 individui, vengono contati 10 individui del genere Ecdyonurus e 20 individui del genere Heptagenia. Le abbondanze finali attribuite saranno, Ecdyonurus:  $150 \cdot (10/30) = 50$ ; Heptagenia:  $150 \cdot (20/30) = 100$ .*

## 6.2 Trattamento del campione in campo e conservazione

Alcuni esemplari di taxa selezionati dovranno essere fissati e portati in laboratorio. Ciò, in particolare, per verificare l'identificazione effettuata in campo per organismi poco noti, poco frequenti o per i taxa che richiedano, per un'identificazione certa, l'ausilio di strumentazione di norma non disponibile su campo.

Si consiglia in ogni caso, ai fini delle procedure di assicurazione di qualità, di conservare alcuni individui di tutti i taxa presenti, anche se identificati con certezza in campo.

Gli organismi che devono essere portati in laboratorio possono essere riposti in tubetti di plastica contenenti etanolo 90% con relativo tappo. Si suggerisce di usare etanolo 90% perché in genere, insieme agli animali che vengono riposti nei tubetti, con le pinzette si inserisce sempre una certa quantità d'acqua. Così stoccati, gli organismi vengono portati in laboratorio per una conferma dell'identificazione. Per una migliore conservazione del campione si consiglia di riporre in tubetti separati gli organismi fragili (e.g. Efemerotteri Leptophlebiidae, le cui tracheobranchie possono facilmente staccarsi dal corpo rendendo così più difficoltosa l'identificazione).

## 6.3 Etichettatura

Ciascun campione deve essere correttamente e univocamente identificato mediante un'etichetta. A tal fine nel contenitore può essere inserita un'etichetta scritta a matita che riporti, a titolo di esempio, le seguenti informazioni: il nome del fiume, il codice del corpo idrico, il codice del sito, la data di campionamento, l'area di campionamento (pool, riffle o generica). Se il campione viene riposto in più contenitori, è opportuno che ciascun contenitore riporti una dicitura per indicare il numero totale di contenitori in cui il medesimo campione è diviso (ad es. 1/2, 2/2). Se alcuni taxa (e.g. organismi fragili) sono già stati identificati e riposti separatamente rispetto agli altri taxa, si suggerisce di specificare sull'etichetta i taxa contenuti.

## 6.4 Identificazione degli organismi in laboratorio

In laboratorio, mediante l'ausilio di microscopi stereoscopici e ottici, si procede alla identificazione tassonomica degli organismi raccolti in campo e conservati in etanolo.

Per l'identificazione degli organismi è necessario disporre di specifiche guide di riconoscimento [7], [8], [9], [10], [11].

Il livello di identificazione tassonomica richiesto dipende dal tipo di monitoraggio stabilito (e.g. sorveglianza, operativo, di indagine) per la stazione in esame e/o dalle finalità del campionamento. In generale, possono essere previsti i seguenti livelli minimi di identificazione, anche in funzione dei diversi gruppi faunistici: famiglia, genere, unità operativa (OU).

## 7. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il metodo di campionamento multihabitat proporzionale qui descritto permette di ottenere una lista dei taxa macrobentonici presenti e, per ciascun taxon, il corrispondente valore di abbondanza per unità di superficie. I dati possono essere utilizzati per la definizione dello stato ecologico dei corsi d'acqua superficiali, conformemente a quanto richiesto dalla Direttiva 2000/60/CE [4] e dal DLgs n. 152/2006 [5].

## 8. SICUREZZA

Il campionamento e l'analisi in campo per l'ampia variabilità delle condizioni sono generalmente operazioni che possono esporre gli operatori a rischi per la salute e la sicurezza. Gli operatori che utilizzeranno questo protocollo dovranno avere adeguata formazione e addestramento per svolgere le normali pratiche di laboratorio e di campionamento e analisi in campo.

Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso. È responsabilità del datore di lavoro ovvero dei dirigenti ai sensi del D.Lgs. n. 81/08 valutare e analizzare i rischi specifici associati alle attività svolte e individuare, sentiti i servizi di prevenzione e protezione, le misure e i dispositivi di protezione individuale necessari per assicurare la tutela della salute e della sicurezza degli operatori secondo le disposizioni di legge vigenti.

Come testi di riferimento è possibile utilizzare le pubblicazioni [12] e [13].

## 9. ASSICURAZIONE DI QUALITÀ'

Nell'ambito dell'applicazione del presente protocollo devono essere definite le attività più appropriate al fine di assicurare che la qualità delle valutazioni biologiche consegua specifici requisiti. In particolare dovranno essere definiti:

- il programma di monitoraggio (e.g. finalità del monitoraggio, numero e collocazione dei siti di campionamento, frequenza dei campionamenti, livello di identificazione tassonomica degli organismi, ...);
- la valutazione degli errori associati al campionamento (e.g. scelta dell'area di campionamento, stima della composizione in microhabitat, identificazione tassonomica, ...);
- i criteri per la qualifica del personale che esegue il campionamento;
- la partecipazione a confronti inter-laboratorio e/o a prove valutative.

## 9.1 Qualifica degli operatori

Il personale coinvolto nelle attività di monitoraggio biologico deve essere qualificato sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento, esperienza e/o comprovata abilità.

In particolare, gli operatori che eseguono il campionamento, l'identificazione e la stima di abbondanza dei taxa devono possedere adeguata e documentata preparazione (diploma di laurea e/o specializzazione post-universitaria) in campo ecologico, idrobiologico e tassonomico (zoologia degli invertebrati) e devono aver compiuto un percorso di apprendimento in affiancamento ad operatori esperti o frequentando un apposito corso di formazione.

Il mantenimento della qualifica del personale coinvolto nel monitoraggio con i macroinvertebrati bentonici deve essere assicurato attraverso la partecipazione regolare all'attività di monitoraggio e periodicamente verificato tramite, ad esempio: formazione-addestramento, partecipazione a confronti interlaboratorio organizzati da istituzioni o organizzazioni di riconosciuta competenza, e anche attraverso la partecipazione a seminari e conferenze di aggiornamento.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] APAT, 2007. Metodi biologici per le acque. Parte I. Fiumi. Protocollo di campionamento dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d'acqua guadabili.
- [2] Buffagni A., Erba S., Aquilano G., Armanini D., Beccari C., Casalegno C., Cazzola M., Demartini D., Gavazzi N., Kemp J.L., Mirolo N., Rusconi M., 2007. Macroinvertebrati acquatici e Direttiva 2000/60/EC (WFD) - Parte B. Descrizione degli habitat fluviali a supporto del campionamento biologico. *IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici*, Marzo 2007 (1): 28-52. <http://www.life-inhabit.it/cnr-irsa-activities/it/download/notiziari-irsa/notiziario-marzo-2007>
- [3] Erba S., Buffagni A., Alber R., Belfiore C, Bielli E., Armanini D.G., Cazzola M., Cuomo S., Demartini D., 2007. Macroinvertebrati acquatici e Direttiva 2000/60/EC (WFD) - Parte C. Scheda di campionamento per i fiumi guadabili e note generali a supporto delle attività di campo. *IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici*, Marzo 2007 (1): 53-68. <http://www.life-inhabit.it/cnr-irsa-activities/it/download/notiziari-irsa/notiziario-marzo-2007>
- [4] CE/2000/60. DIRETTIVA 2000/60/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. Gazzetta ufficiale delle Comunità europee L 327/2, 22.12.2000: 1-72. <http://www.direttivaacque.minambiente.it/>
- [5] DLgs n. 152/2006. Decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152: 'Norme in materia ambientale', *Supplemento Ordinario n. 96 alla Gazzetta Ufficiale*, 14 aprile 2006.
- [6] Buffagni A., Erba S., 2007. Macroinvertebrati acquatici e Direttiva 2000/60/EC (WFD) – Parte A. Metodo di campionamento per i fiumi guidabili. *IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici*, Marzo 2007 (1): 2-27. <http://www.life-inhabit.it/cnr-irsa-activities/it/download/notiziari-irsa/notiziario-marzo-2007>
- [7] Campaioli S., Ghetti P.F., Minelli A., Ruffo S., 1994. *Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane*. Volume I, Provincia Autonoma di Trento, 1-357.
- [8] Campaioli S., Ghetti P.F., Minelli A., Ruffo S., 1999. *Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane*. Volume II, Provincia Autonoma di Trento, 358-484.
- [9] Ruffo S. (coordinatore), 1977-1985. *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane*. CNR, Collana del Progetto Finalizzato "Promozione della qualità dell'ambiente", AQ/1/233.
1. *Irudinei* (Hirudinea) di A. Minelli, 1977
  2. *Driopidi, Elmintidi* (Coleoptera: Dryopidae, Elminthidae) di M. Olmi, 1978
  3. *Simuliidi* (Diptera: Simuliidae) di L. Rivosecchi, 1978
  4. *Decapodi* (Crustacea: Decapoda) di C. Frogliola, 1978
  5. *Isopodi* (Crustacea: Isopoda) di R. Argano, 1979
  6. *Eterotteri acquatici* (Heteroptera: Gerromorpha, Nepomorpha) di L. Tamanini, 1979
  7. *Gasteropodi*, 1 (Gastropoda: Pulmonata, Prosobranchia: Neritidae, Viviparidae, Bithyniidae, Valvatidae) di A. Girod, I. Bianchi, M. Mariani, 1980
  8. *Gasteropodi*, 2 (Gastropoda: Prosobranchia: Hydrobioidea, Pyrguloidea) di F. Giusti e E. Pezzoli, 1980
  9. *Plecoteri* (Plecoptera) di C. Consiglio, 1980
  10. *Bivalvi* (Bivalvia) di L. Castagnolo, D. Franchini, F. Giusti, 1980
  11. *Ostracodi* (Crustacea: Ostracoda) di P.F. Ghetti e K. McKenzie, 1981
  12. *Chironomidi*, 1. (Diptera: Chironomidae: Generalità, Diamesinae, Prodiamesinae) di U. Ferrarese e B. Rossaro, 1981
  13. *Palpicorni* (Coleoptera: Hydraenidae, Helophoridae, Spercheidae, Hydrochidae, Hydrophilidae, Sphaeridiidae) di Q. Pirisinu, 1981

16. *Chironomidi*, 2. (Diptera: Chironomidae: Orthocladiinae) di B. Rossaro, 1982
18. *Anostraci, Notostraci, Concostraci* (Crustacea: Anostraca, Notostraca, Conchostraca) di V. Cottarelli e G. Mura, 1983
19. *Tricotteri* (Trichoptera) di G.P. Moretti, 1983
21. *Odonati* (Odonata) di G. Carchini, 1983
24. *Efemerotteri* (Ephemeroptera) di C. Belfiore, 1983
25. *Blefariceridi* (Diptera: Blephariceridae) di P. Nicolai, 1983
26. *Chironomidi*, 3. (Diptera; Chironomidae: Tanypodinae) di U. Ferrarese, 1983
28. *Ditteri* (Diptera) di L. Rivosecchi, 1984
29. *Chironomidi*, 4. (Diptera: Chironomidae: Chironominae) di A. M. Nocentini, 1985

[10] Sansoni G., 1988. *Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d'acqua italiani*. Provincia Autonoma di Trento, 191 pp.

[11] Tachet H., Richoux P., Bournaud M., Usseglio-Polatera P., 2010. *Invertébrés d'eau douce. Systématique, biologie, écologie*. CNRS Editions, Paris, 607 pp.

[12] ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.

[13] APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006.

[14] Stribling J.B., 2011. Partitioning error sources for quality control and comparability analysis in biological monitoring and assessment. In: Eldin A.B. (Ed.). *Modern approaches to quality control*. ISBN: 978-953-307-971-4. InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/>

[15] Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, 16 giugno 2008, n. 131. *Criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici - Attuazione articolo 75, Dlgs 152/2006*. Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - Supplemento Ordinario n. 187 dell'11 agosto 2008.

[16] Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, 14 aprile 2009, n. 56. *Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo*. Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario n. 124 del 30 maggio 2009.

[17] Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, 17 luglio 2009. *Individuazione delle informazioni territoriali e modalità per la raccolta, lo scambio e l'utilizzazione dei dati necessari alla predisposizioni dei rapporti conoscitivi sullo stato di attuazione degli obblighi comunitari e nazionali in materia di acque*. Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario n. 203 del 2 settembre 2009.

[18] Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, 8 novembre 2010, n. 260. *"Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo"*. Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario n. 31 del 7 febbraio 2011.

**ALLEGATO A – ELENCO IDROECOREGIONI E RELATIVE  
SUPERFICII DI CAMPIOANMENTO (modificato da Buffagni & Erba.,  
2007).**

<b>Cod_HER</b>	<b>Idroecoregione</b>	<b>Superficie totale da campionare (m2)</b>
1	Alpi Occidentali	1
2	Prealpi Dolomiti	1
3	Alpi Centro Orientali	1
4	Alpi Meridionali	1
5	Monferrato	0,5
6	Pianura Padana	0,5
7	Carso	1
8	Appennino Piemontese	1
9	Alpi Mediterranee	1
10	Appennino Settentrionale	1
11	Toscana	0,5
12	Costa Adriatica	0,5
13	Appennino Centrale	0,5
14	Roma Viterbese	0,5
15	Basso Lazio	0,5
14	Vesuvio	0,5
16	Basilicata Tavoliere	0,5
17	Puglia Gargano	0,5
18	Appennino Meridionale	0,5
19	Calabria Nebrodi	0,5
20	Sicilia	0,5
21	Sardegna	0,5

## **ALLEGATO B – RICONOSCIMENTO DELLA SEQUENZA RIFFLE/POOL**

Modificato da: Buffagni A., Erba S., Aquilano G., Armanini D., Beccari C., Casalegno C., Cazzola M., Demartini D., Gavazzi N., Kemp J.L., Mirolo N., Rusconi M., 2007. Macroinvertebrati acquatici e Direttiva 2000/60/EC (WFD) - Parte B. Descrizione degli habitat fluviali a supporto del campionamento biologico. *IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici*, Marzo 2007 (1): 28-52. <http://www.life-inhabit.it/cnr-irsa-activities/it/download/notiziari-irsa/notiziario-marzo-2007>

## 1. Elementi utili per il riconoscimento della sequenza Riffle/Pool

La caratteristica rilevabile visivamente che più agevola la distinzione tra le aree di riffle e quelle di pool è il tipo di flusso superficiale i.e. la turbolenza. I flussi chiaramente turbolenti sono: *unbroken standing waves* (UW), *broken standing waves* (BW) e caotico (CF). Il flusso increspato/*rippled* ha turbolenza intermedia. Il flusso non percettibile (NP) e liscio/*smooth* (SM) sono considerati tipicamente flussi non turbolenti.

Il concetto di base nel riconoscimento della sequenza riffle/pool è l'identificazione di un'area omogenea dominata da flussi e.g. turbolenti da confrontare con un'altra area che presenti flussi comparativamente meno turbolenti, o viceversa. In altre parole un'area di pool potrà ad esempio essere caratterizzata da dominanza di flussi SM e RP, con a centro alveo l'eventuale presenza sporadica di UW, in contrasto con un'area di riffle invece caratterizzata da dominanza di flusso UW e presenza sporadica di BW, o RP e SM e.g. in prossimità delle sponde. Alternativamente, un'area di pool potrà essere caratterizzata dalla dominanza di RP e UW in confronto ad un'area di riffle dominata da BW e CF.

Ulteriori elementi che aiutano nel riconoscimento della sequenza riffle/pool sono:

- in genere, lungo la sezione trasversale, le aree di pool presentano una maggior profondità media e massima rispetto alle aree di riffle;
- le aree di pool sono in genere caratterizzate dalla presenza di materiale di deposito e.g. sabbia e limo, CPOM e FPOM;
- nell'area di riffle il substrato superficiale è in genere più grossolano rispetto a quello osservabile nella pool.

## 2. Note generali relative al riconoscimento della sequenza riffle/pool

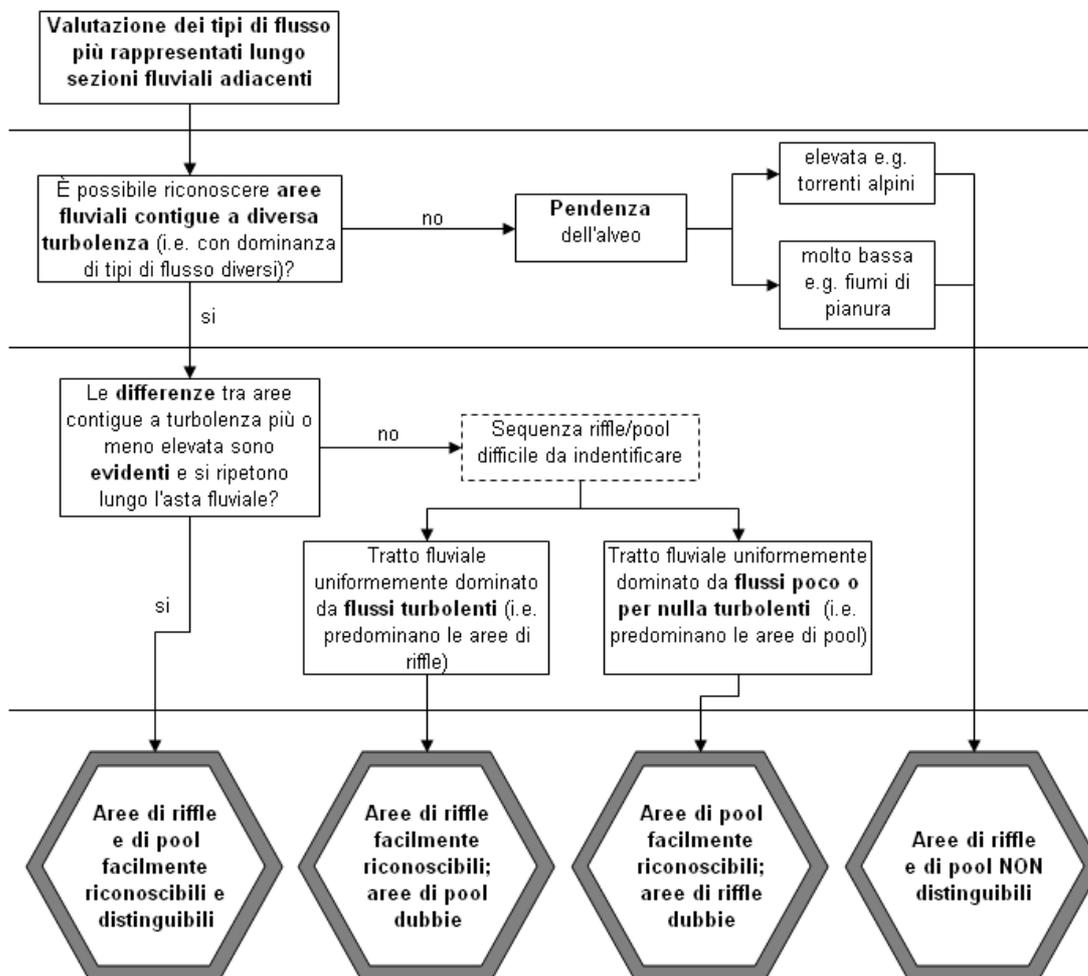
La chiave per il riconoscimento della sequenza riffle/pool in un dato tratto fluviale è il confronto fra aree adiacenti che presentino caratteristiche di flusso differenti a livello dell'intera sezione trasversale del canale (si veda il primo passaggio in fig. 1). Non sempre però il livello di turbolenza tra le due aree i.e. riffle e pool, risulta nettamente diverso. In questi casi, ove cioè le differenze tra i tipi di flusso dominanti in settori fluviali adiacenti non sono marcate, il riconoscimento della sequenza riffle/pool può risultare non agevole. Il diagramma di flusso di fig. 1 raffigura i passaggi attraverso i quali risulta possibile riconoscere le diverse categorie di sequenza riffle/pool.

Nel seguito del documento sono riportati esempi di sequenze riffle/pool osservate nei fiumi italiani che raffigurano rispettivamente:

- sequenze riffle/pool facilmente riconoscibili. Le immagini sono contraddistinte dalla lettera F seguita da un numero (Fig. F. 1-6);
- sequenze riffle/pool difficili da riconoscere. Le immagini sono contraddistinte dalla lettera D seguita da un numero (Fig. D. 7-12);
- sequenze riffle/pool il cui riconoscimento può essere più o meno agevole a seconda della stagione i.e. le elevate variazioni di portata influenzano la presenza di una tipica alternanza riffle/pool. Le immagini sono contraddistinte dalla lettera S seguita da un numero (Fig. S. 13-18);
- tratti fluviali in cui la sequenza riffle/pool non è di norma riconoscibile, a prescindere dalla stagione. Le immagini sono contraddistinte dalla lettera N seguita da un numero (Fig. N. 19-24).

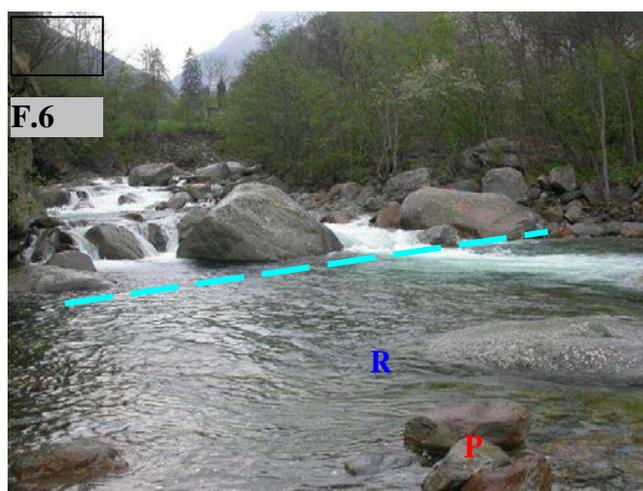
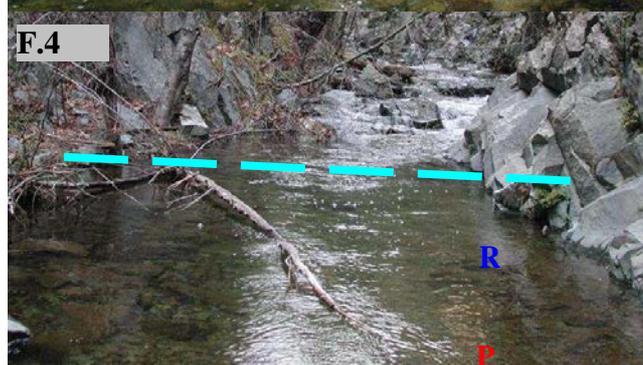
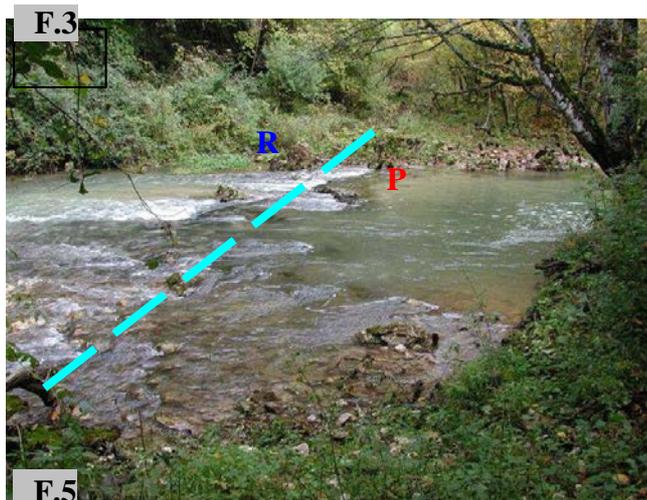
Alcune note generali:

- le aree di riffle e pool possono presentare caratteristiche diverse nei diversi tipi fluviali. Le caratteristiche di un'area di pool di un tipo fluviale possono essere comparabili a quelle del riffle di un altro tipo fluviale;
- in alcuni tipi fluviali, le sequenze riffle/pool possono presentare un'elevata variabilità stagionale legata sia a variazioni di portata sia a fenomeni di aggiustamento del letto fluviale (e.g. cambi della morfologia fluviale). Un determinato tipo fluviale può avere una caratteristica alternanza di riffle e pool in una stagione, ma in un'altra stagione essere caratterizzato dalla presenza quasi esclusiva di aree di pool o riffle. E.g. in estate, per via della diminuzione di portata; (Fig. S.15-16) si può avere una dominanza (o la presenza esclusiva) di aree lentiche, mentre in corrispondenza di periodi ad elevata portata si può avere la scomparsa delle aree di pool e.g. in area alpina;
- i tipi o zone fluviali in cui generalmente può essere difficile identificare la sequenza riffle/pool sono principalmente costituiti da: a) tratti ad elevata pendenza (Fig. N 19-20), b) tratti con flusso regolato, c) tratti canalizzati, d) piccoli fiumi di pianura con scarse variazioni di portata (e.g. di origine sorgiva) caratterizzati da substrato e tipi di flusso uniformi (Fig. N. 21-22), e) grandi fiumi.

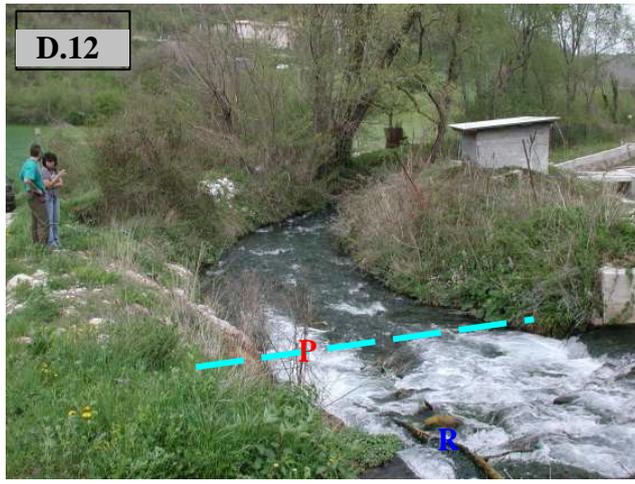
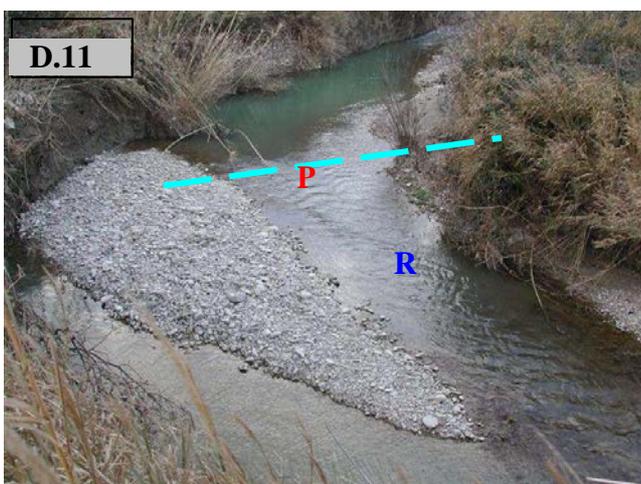
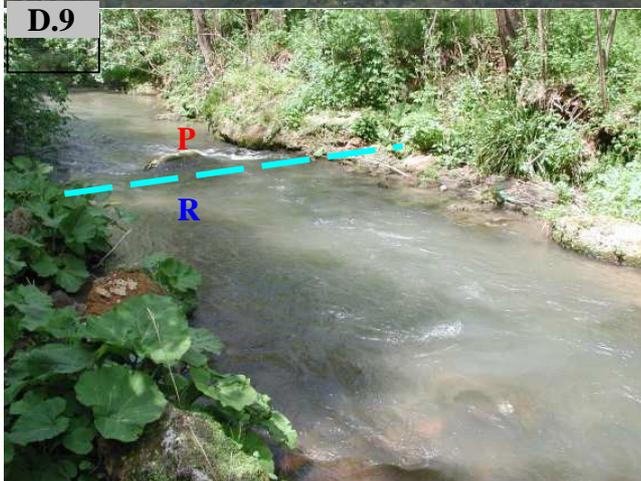
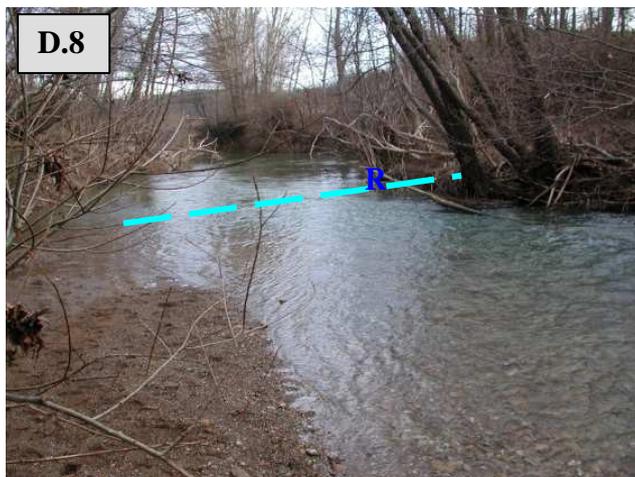


**Figura 1** - *Attribuzione di un tratto fluviale ad una delle quattro principali situazioni osservabili nei fiumi italiani in merito alla possibilità di distinguere le aree di riffle da quelle di pool. Tale informazione è utile nella fase di pianificazione delle attività a livello di tipo fluviale/HER per selezionare l'area in cui le raccolte del campione di fauna macrobentonica dovranno essere effettuate.*

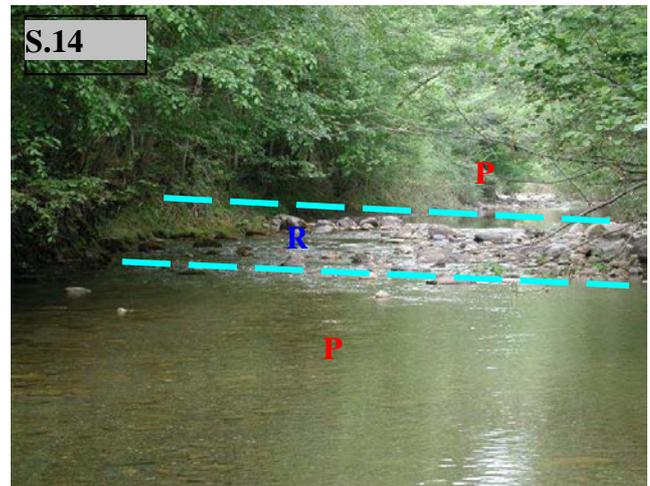
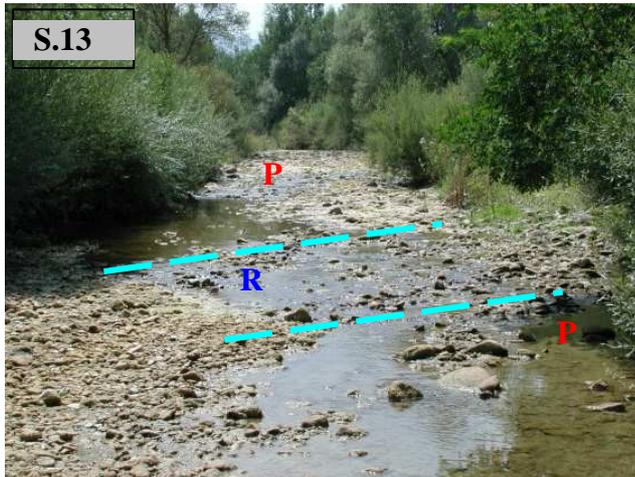
**Sequenza riffle/pool facilmente identificabile (R: Riffle, P: Pool)**



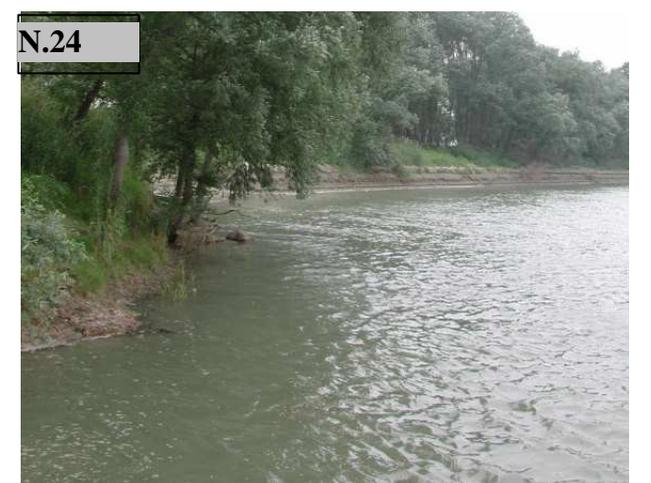
**Sequenza riffle/pool non facilmente identificabile (R: Riffle, P: Pool)**



**Sequenza riffle/pool dipendente dalla stagione (R: Riffle, P: Pool)**



**Sequenza riffle/pool non riconoscibile**



## **ALLEGATO C – LISTA E FOTOGRAFIE DEI SUBSTRATI MINERALI RINVENIBILI NEL CAMPIONAMENTO**

Da: Buffagni A., Erba S., Aquilano G., Armanini D., Beccari C., Casalegno C., Cazzola M., Demartini D., Gavazzi N., Kemp J.L., Mirolo N., Rusconi M., 2007. Macroinvertebrati acquatici e Direttiva 2000/60/EC (WFD) - Parte B. Descrizione degli habitat fluviali a supporto del campionamento biologico. *IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici*, Marzo 2007 (1): 28-52. <http://www.life-inhabit.it/cnr-irsa-activities/it/download/notiziari-irsa/notiziario-marzo-2007>

**Lista dei microhabitat minerali (modificata da AQEM Consortium, 2002<sup>1</sup>; Hering et al., 2004<sup>2</sup>), loro descrizione e riferimento fotografico.**

Microhabitat	Codice	Descrizione	Foto
<b>Limo/Argilla</b> < 6 µm	<b>ARG</b>	Substrati limosi, anche con importante componente organica, e/o substrati argillosi composti da materiale di granulometria molto fine che rende le particelle che lo compongono adesive, compattando il sedimento che arriva talvolta a formare una superficie solida	HM 1, HM 2
<b>Sabbia</b> 6 µm -2 mm	<b>SAB</b>	Sabbia fine e grossolana	HM 3, HM 4
<b>Ghiaia</b> 0.2-2 cm	<b>GHI</b>	Ghiaia e sabbia molto grossolana (con predominanza di ghiaia)	HM 5, HM 6
<b>Microlithal</b> 2- 6 cm	<b>MIC</b>	Pietre piccole	HM 7, HM 8
<b>Mesolithal</b> 6-20 cm	<b>MES</b>	Pietre di medie dimensioni	HM 9, HM 10
<b>Macrolithal</b> 20-40 cm	<b>MAC</b>	Pietre grossolane della dimensione massima di un pallone da rugby	HM 11, HM 12
<b>Megalithal</b> > 40 cm	<b>MGL</b>	Pietre di grosse dimensioni, massi, substrati rocciosi di cui viene campionata solo la superficie	HM 13, HM 14
<b>Artificiale</b> (e.g. calcestruzzo)	<b>ART</b>	Calcestruzzo e tutti i substrati solidi non granulari immessi artificialmente nel fiume	HM 15, HM 16
<b>Igropetrico</b> ricoperto da muschi	<b>IGR</b>	Sottile strato d'acqua su substrato solido, spesso ricoperto da muschi	HM 17, HM 18

<sup>1</sup> AQEM Consortium, 2002. Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Version 1.0. (www.aqem.de).

<sup>2</sup> Hering D., Moog O., Sandin L. & Verdonschot P.F.M., 2004. Overview and application of the AQEM assessment system. Hydrobiologia 516: 1–20.

*Immagini fotografiche dei microhabitat minerali*



Fig. HM 1. Limo (ARG)



Fig. HM 2. Argilla/Limo (ARG)



Fig. HM 3. Sabbia (SAB)



Fig. HM 4. Sabbia (SAB)



Fig. HM 5. Ghiaia (GHI)



Fig. HM 6. Ghiaia (GHI)



Fig. HM 7. Microlithal (MIC)



Fig. HM 8. Microlithal (MIC)



Fig. HM 9. Mesolithal (MES)

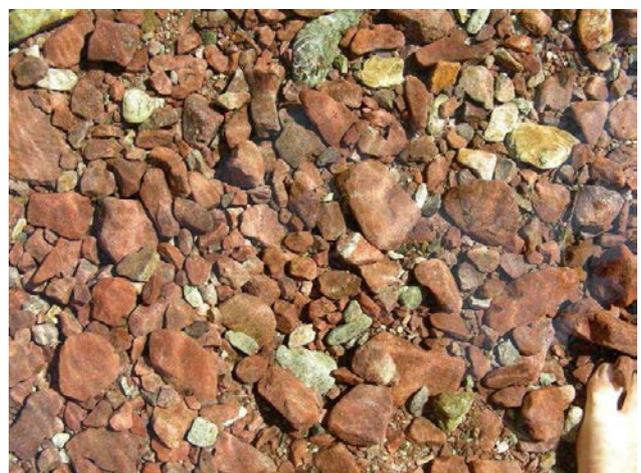


Fig. HM 10. Mesolithal (MES)



Fig. HM 11. Macrolithal (MAC)



Fig. HM 12. Macrolithal (MAC)



Fig. HM 13. Megalithal (grandi massi) (MGL)  
(MGL)



Fig. HM 14. Megalithal (substrato roccioso)



Fig. HM 15. Artificiale (ART)



Fig. HM 16. Artificiale (calcestruzzo) (ART)



Fig. HM 17. Igropetrico (IGR)



Fig. HM 18. Igropetrico – dettaglio (IGR)

## **ALLEGATO D – LISTA E FOTOGRAFIE DEI SUBSTRATI BIOTICI RINVENIBILI NEL CAMPIONAMENTO**

Da: Buffagni A., Erba S., Aquilano G., Armanini D., Beccari C., Casalegno C., Cazzola M., Demartini D., Gavazzi N., Kemp J.L., Mirolo N., Rusconi M., 2007. Macroinvertebrati acquatici e Direttiva 2000/60/EC (WFD) - Parte B. Descrizione degli habitat fluviali a supporto del campionamento biologico. *IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici*, Marzo 2007 (1): 28-52. <http://www.life-inhabit.it/cnr-irsa-activities/it/download/notiziari-irsa/notiziario-marzo-2007>

**Lista dei microhabitat biotici (modificata da AQEM Consortium, 2002<sup>3</sup>; Hering et al., 2004<sup>4</sup>), loro descrizione e riferimento fotografico.**

Microhabitat	Codice	Descrizione	Foto
<b>Alge</b>	<b>AL</b>	Principalmente alge filamentose; anche Diatomee o altre alge in grado di formare spessi feltri perifitici	HB 19, HB 20
<b>Macrofite sommerse</b>	<b>SO</b>	Macrofite acquatiche sommerse. Sono da includere nella categoria anche muschi, Characeae, etc.	HB 21, HB 22
<b>Macrofite emergenti</b>	<b>EM</b>	Macrofite emergenti radicate in alveo (e.g. <i>Thypha</i> , <i>Carex</i> , <i>Phragmites</i> )	HB 23, HB 24
<b>Parti vive di piante terrestri (TP)</b>	<b>TP</b>	Radici fluitanti di vegetazione riparia (e.g. radici di ontani), non lignificate	HB 25, HB 26
<b>Xylal (legno)</b>	<b>XY</b>	Materiale legnoso grossolano e.g. rami, radici (diametro almeno pari a 10 cm), legno morto, parti di corteccia	HB 27, HB 28
<b>CPOM</b>	<b>CP</b>	Deposito di materiale organico particellato grossolano (foglie, rametti)	HB 29, HB 30
<b>FPOM</b>	<b>FP</b>	Deposito di materiale organico particellato fine	HB 31, HB 32
<b>Film batterici</b>	<b>BA</b>	Funghi e sapropel (e.g. <i>Sphaerotilus</i> , <i>Leptomitus</i> ), solfobatteri (e.g. <i>Beggiatoa</i> , <i>Thiothrix</i> )	HB 33, HB 34

<sup>3</sup> AQEM Consortium, 2002. Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive. Version 1.0.(www.aqem.de).

<sup>4</sup> Hering D., Moog O., Sandin L. & Verdonschot P.F.M., 2004. Overview and application of the AQEM assessment system. Hydrobiologia 516: 1–20.



*Immagini fotografiche dei microhabitat biotici*



Fig. HB 19. Alge (filamentose nella foto) (AL)  
(AL)



Fig. HB 20. Alge (filamentose nella foto)



Fig. HB 21. Macrofite sommerse (SO)



Fig. HB 22. Macrofite sommerse (SO)



Fig. HB 23. Macrofite Emergenti (EM)



Fig. HB 24. Macrofite Emergenti (EM)



Fig. HB 25. Parti vive di piante terrestri (radici sommerse) (TP)



Fig. HB 26. Parti vive di piante terrestri (radici sommerse) (TP)



Fig. HB 27. Area fluviale con importanti depositi di Xylal (XY)



Fig. HB 28. Xylal – dettaglio (XY)



Fig. HB 29. CPOM (foglie e legnetti) (CP)



Fig. HB 30. CPOM (foglie) (CP)



Fig. HB 31. Area fluviale con importanti depositi di FPOM (FP)



Fig. HB 32. FPOM (FP)



Fig. HB 33. Film batterici (a valle dell'immissione di uno scarico molto inquinante) (BA)



Fig. HB 34. Film batterici (BA)

Allegato D – Lista e fotografie dei substrati biotici rinvenibili nel campionamento (da: Buffagni et al., 2007)

## **ALLEGATO E – LISTA E FOTOGRAFIE DEI TIPI DI FLUSSO RINVENIBILI NEL CAMPIONAMENTO**

Da: Buffagni A., Erba S., Aquilano G., Armanini D., Beccari C., Casalegno C., Cazzola M., Demartini D., Gavazzi N., Kemp J.L., Mirolo N., Rusconi M., 2007. Macroinvertebrati acquatici e Direttiva 2000/60/EC (WFD) - Parte B. Descrizione degli habitat fluviali a supporto del campionamento biologico. *IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici*, Marzo 2007 (1): 28-52. <http://www.life-inhabit.it/cnr-irsa-activities/it/download/notiziari-irsa/notiziario-marzo-2007>

## CARATTERISTICHE dei tipi di flusso

In questo allegato vengono presentati i principali tipi di flusso riconoscibili mediante identificazione visiva, rinvenibili nei fiumi italiani. Le immagini dei vari tipi di flusso sono contraddistinte dalla sigla FT seguita da un numero. In Tab. 1, i flussi – con l'esclusione degli ultimi tre - sono ordinati in funzione di un grado di turbolenza crescente. La prima categoria presentata (alveo asciutto), non è associabile ad un campionamento di invertebrati acquatici ai fini del monitoraggio standard, che deve evidentemente avvenire ove l'acqua sia presente. Essa viene comunque riportata per rappresentare con maggiore completezza le diverse situazioni osservabili negli alvei fluviali. Ciascun flusso è associato ad un codice univoco a due lettere (Tab. 1), che potrà essere utilizzato in fase di compilazione della scheda di campo o d'aiuto quando i flussi siano da indicare in forma abbreviata. Per ultimi, in Tab. 1, vengono presentati i due tipi di flusso ai quali più difficilmente può essere associata la raccolta di campioni biologici.

In particolare, si ricorda come l'identificazione del tipo di flusso associato alle singole unità di campionamento possa supportare una corretta interpretazione del dato biologico e come il suo riconoscimento su scala più ampia i.e. sito, possa coadiuvare nel posizionamento dei singoli punti di prelievo dei campioni.

Inoltre, l'individuazione dei diversi tipi di flusso è alla base del riconoscimento della sequenza riffle/pool (si veda a questo riguardo l'allegato B). Per ulteriori approfondimenti si rimanda a Buffagni & Erba (2007)<sup>1</sup>.

### 1. Accorgimenti per il riconoscimento dei tipi di flusso e loro caratteristiche principali

Il principale criterio per il riconoscimento dei tipi di flusso è la modalità di increspatura della superficie dell'acqua. Il movimento della corrente può talvolta aiutare a discriminare differenti tipi di flusso, come ad esempio il flusso 'non percettibile' dal flusso 'liscio', entrambi non turbolenti, ma caratterizzati rispettivamente da assenza o presenza di movimento dell'acqua. Il flusso 'increspato' può invece presentare velocità di corrente molto differenti, da modeste a sostenute. La caratteristica peculiare di questo tipo di flusso è una superficie increspata con piccole onde, di altezza solitamente inferiore al centimetro, in movimento disordinato verso valle.

Le '*standing waves*' o 'onde stabili', siano esse '*unbroken*' ('non rotte') o '*broken*' ('rotte') si riconoscono per la stabilità del punto in cui è visibile la cresta dell'onda (o l'increspatura), i.e. non si percepisce lo spostamento verso valle delle onde, le quali presentano talvolta un apparente movimento contro corrente, nel caso delle '*broken standing waves*'. Caratteristica peculiare delle '*broken standing waves*' è la presenza di creste bianche disordinate, che denotano la 'rottura' dell'onda.

La caratteristica del flusso '*upwelling*' è quella di una superficie con grandi bolle che salgono dagli strati più profondi. Può essere associato alle pool, ma anche a tratti di fondo valle dei grandi fiumi, di portata considerevole.

I flussi '*chute*' e 'cascata' si rinvengono solitamente in corrispondenza di pietre di grandi dimensioni, massi, letti rocciosi (o superfici lisce artificiali). Nel caso del flusso '*Chute*', lo scorrimento dell'acqua è a contatto con il substrato sottostante, mentre esso è visibilmente separato dal substrato per il flusso 'cascata'.

La descrizione completa dei tipi di flusso è riportata in Tab. 1.

### 2. Indicazioni specifiche per il campionamento in presenza di alcuni tipi di flusso

Le modalità di campionamento possono differire sostanzialmente a seconda della presenza di un flusso turbolento, laminare o apparentemente privo di movimento. Con i flussi più turbolenti o veloci (per esempio CH, BW e UW) è necessario aver cura di assicurare la rete ben appoggiata al fondo, per tutta la durata della raccolta del campione biologico. È bene inoltre prestare attenzione al fatto che eventuali pietre non siano

---

<sup>1</sup> Buffagni A. & Erba S., 2007. Macroinvertebrati acquatici e Direttiva 2000/60/EC (WFD) - Parte A. Metodo di campionamento per i fiumi guadabili. IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici, Marzo2007 (1): 2-27.

trasportate attraverso l'imboccatura della rete, rischiando di intasare la stessa e di danneggiare gli individui raccolti.

Il flusso 'increspato' non presenta abitualmente problemi di sorta per il campionamento, dal momento che di solito è caratterizzato da una velocità sufficiente a trasportare gli animali nella rete, ma senza incidere sulla stabilità della rete sul fondo e senza determinare il trasporto di quantità eccessive di sedimento all'interno della rete. Per repliche effettuate in flusso 'liscio' e soprattutto in flusso 'non percettibile', ovvero dove la velocità dell'acqua sia scarsa o nulla, è di solito necessario determinare con le mani un movimento d'acqua da monte verso valle per facilitare l'ingresso degli animali nella rete, eventualmente anche muovendo la rete nella colonna d'acqua soprastante in cui il sedimento sollevato si venisse a trovare.

Ricordiamo che i flussi 'caotico' e 'cascata' sono raramente associati a raccolta di campioni biologici per attività di monitoraggio.

**Tabella 1** - Lista dei tipi di flusso (da Padmore, 19986 e Buffagni et al., 20047), loro descrizione e riferimento fotografico.

Tipo di flusso/"Flow type"	Cod	Definizione	Foto
<b>Asciutto/No flow</b>	<b>DR</b>	Assenza d'acqua. Ove si consideri un'intera sezione fluviale, (i.e. canale asciutto) essa può manifestarsi, ed è quindi da rilevare, sia in relazione a condizioni naturali sia in relazione all'intervento dell'uomo.	FT 35, FT 36
<b>Non percettibile/No perceptible flow</b>	<b>NP</b>	È caratterizzato da assenza di movimento dell'acqua. È possibile osservarlo anche in fiumi con regime idrico regolamentato, a monte o valle di dighe, oppure in presenza di strutture naturali presenti in alveo, come grossi massi, in grado di rallentare l'acqua. In questi casi c'è il rischio di confondere questo flusso con il <i>flow type</i> "liscio". Se in dubbio, si può introdurre verticalmente un bastoncino in acqua ed osservare gli eventuali cambiamenti della superficie dell'acqua intorno al bastoncino stesso, che non devono manifestarsi se il <i>flow type</i> è "non percettibile".	FT 37, FT 38
<b>Liscio/Smooth h</b>	<b>SM</b>	Si tratta di un flusso laminare, con superficie dell'acqua priva di turbolenze. Se in dubbio con "non percettibile", il riconoscimento può essere facilitato dall'uso di un bastoncino che, inserito verticalmente in acqua, determinerà, in presenza di questo tipo di flusso, la formazione di piccole onde ai suoi lati.	FT 39, FT 40
<b>Increspato/Rippled</b>	<b>RP</b>	La superficie dell'acqua mostra delle piccole increspature simmetriche, generalmente non più alte di un centimetro, che si muovono verso valle. Attenzione: in presenza di vento forte è possibile che i tipi di flusso "liscio" e talvolta anche "non percettibile" appaiano ad un'analisi superficiale come "increspato".	FT 41, FT 42
<b>Unbroken standing waves</b>	<b>UW</b>	La superficie dell'acqua appare disturbata, con un tipico profilo a "schiena di drago". Il fronte dell'onda non è rotto, anche se a volte le creste mostrano la presenza di schiuma bianca.	FT 43, FT 44
<b>Broken standing waves</b>	<b>BW</b>	L'acqua sembra scorrere verso monte, contro corrente. Perché le onde possano essere definite "rotte" è necessario che ad esse siano associate creste bianche e disordinate.	FT 45, FT 46
<b>Chute</b>	<b>CH</b>	L'acqua scorre aderente al substrato, con una dolce curvatura.	FT 47, FT 48
<b>Flusso caotico/Chaotic flow</b>	<b>CF</b>	È un misto di tre tra i flussi più veloci (per esempio FF, CH, BW e UW), in cui nessuno sia predominante.	FT 49, FT 50
<b>Upwelling</b>	<b>UP</b>	Questo <i>flow type</i> è caratterizzato da acqua che sembra in ebollizione, con 'bolle' che arrivano in superficie da porzioni più profonde del fiume. Tale aspetto è dovuto spesso alla presenza di forti flussi che risalgono dal letto del fiume, disturbando la superficie dell'acqua. Si trova generalmente all'uscita di stretti meandri, dietro a strutture presenti nel canale (per esempio i piloni di sostegno dei ponti) o ai piedi di cascate, toboga, briglie o chiuse. Questo <i>flow type</i> è spesso associato alle "pool" presenti nel fiume; a volte, può determinare erosione laterale delle sponde e.g. in aree di meandro.	FT 51
<b>Cascata/Free fall</b>	<b>FF</b>	L'acqua cade verticalmente, ed è visibilmente separata dal substrato sottostante o retrostante. Questo <i>flow type</i> è generalmente associato a cascate naturali.	FT 52

<sup>6</sup> Padmore C.L., 1998. The role of physical biotopes in determining the conservation status of flow requirements of British rivers. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 1: 25-35.

<sup>7</sup> Buffagni A., Erba S., Armanini D., Demartini D. & Somarè S., 2004. Aspetti idromorfologici e carattere lenticoloitico dei fiumi mediterranei: River Habitat Survey e descrittore LRD. *Quad. Ist. Ric. Acque, Roma* 122: 41-64.

*Immagini fotografiche dei diversi tipi di flusso*



Fig. FT 35. Asciutto (DR)



Fig. FT 36. Asciutto (DR)



Fig. FT 37. Non percettibile (NP)



Fig. FT 38. Non percettibile (NP)



Fig. FT 39. Liscio (SM)



Fig. FT 40. Liscio (SM)



Fig. FT 41. Increspato (RP)



Fig. FT 42. Increspato (RP) - dettaglio



Fig. FT 43. *Unbroken standing waves* (UW)



Fig. FT 44. *Unbroken standing waves* (UW) -  
dettaglio



Fig. FT 45. *Broken standing waves* (BW)  
dettaglio



Fig. FT 46. *Broken standing waves* (BW) -

Allegato E – Lista e fotografie dei tipi di flusso rinvenibili nel campionamento (da: Buffagni et al., 2007)

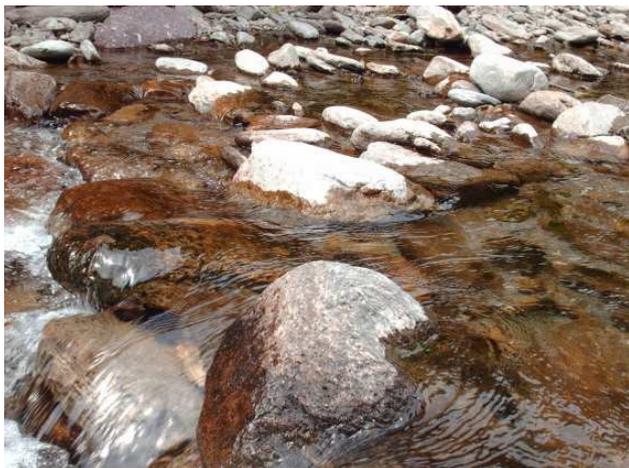


Fig. FT 47. *Chute* (CH)



Fig. FT 48. *Chute* (CH) - dettaglio



Fig. FT 49. Flusso Caotico (CF)



Fig. FT 50. Flusso Caotico (CF)



Fig. FT 51. *Upwelling* (UP)

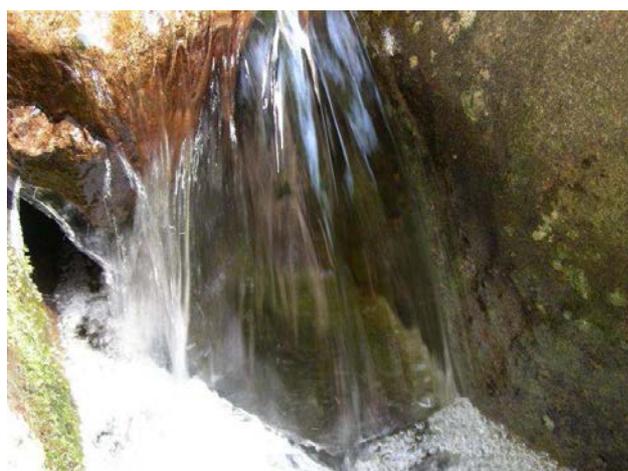


Fig. FT 52. Cascata (FF)

## **ALLEGATO F - ESEMPIO DI SCHEDA DI CAMPO**

Modificato da: Erba S., Buffagni A., Alber R., Belfiore C, Bielli E., Armanini D.G., Cazzola M., Cuomo S., Demartini D., 2007. Macroinvertebrati acquatici e Direttiva 2000/60/EC (WFD) - Parte C. Scheda di campionamento per i fiumi guadabili e note generali a supporto delle attività di campo. *IRSA-CNR Notiziario dei Metodi Analitici*, Marzo 2007 (1): 53-68. <http://www.life-inhabit.it/cnr-irsa-activities/it/download/notiziari-irsa/notiziario-marzo-2007>

Allegato F- Esempio di scheda di campo (modificato da: Erba et al., 2007)

SCHEMA CAMPIONAMENTO MACROINVERTEBRATI BENTONICI Fiumi guadabili - Campionamento multi-habitat proporzionale							
Fiume		Localizzazione					
Data		Ora -			Operatori		
Idrocoregione		Tipo fluviale			Corpi idrico		
Motivo del campionamento		<input type="checkbox"/> Monitoraggio operativo		<input type="checkbox"/> Monitoraggio sorveglianza		<input type="checkbox"/> Altro (spec.)	
		<input type="checkbox"/> Sito di riferimento		<input type="checkbox"/> Monitoraggio d'indagine			
Il letto del corso d'acqua è visibile?		<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> In parte (spec. %)		<input type="checkbox"/> Poco o nulla		
La sequenza riffle/pool è riconoscibile?		<input type="checkbox"/> Sì	<input type="checkbox"/> No		<input type="checkbox"/> Spec. foto di riferimento		
Raccolta 10 repliche effettuata in:		<input type="checkbox"/> Riffle	<input type="checkbox"/> Pool		<input type="checkbox"/> Proporzionale generico		
Tipo di retino utilizzato:		<input type="checkbox"/> Surber	<input type="checkbox"/> Retino manuale immanicato con misura superficie		<input type="checkbox"/> Retino manuale immanicato		
Superficie totale campionata:		<input type="checkbox"/> 0,5 m <sup>2</sup>	<input type="checkbox"/> 1 m <sup>2</sup>		<input type="checkbox"/> altro		
Parametri chimico-fisici		Temperatura dell'acqua °C		pH		Conducibilità a 20°C	
		Ossigeno disciolto mg/L		Saturazione di ossigeno %			
MICROHABITAT MINERALI		<i>Le dimensioni indicate si riferiscono all'asse</i>		10 repliche proporzionali			
			codice	presenza	%	N. repliche	Tipo di flusso
		limo/argilla <6 µm	ARG				
		sabbia 6 µm - 2 mm	SAB				
		ghiaia >0,2-2 cm	GHI				
		microlithal* 2-6 cm	MIC				
		mesolithal* 6-20 cm	MES				
		macrolithal* 20-40 cm	MAC				
		megalithal* >40 cm	MGL				
		artificiale	ART				
igropetrico	IGR						
MICROHABITAT BIOTICI		alghe	AL				
		macrofite sommerse (anche muschi, Characeae, etc.)	SO				
		macrofite emergenti (e.g. Typha, Carex, Phragmites)	EM				
		parti vive di piante terrestri (e.g. radichette sommerse)	TP				
		xylal/legno (rami, legno morto, radici)	XY				
		CPOM (materiale organico grossolano, foglie, rametti)	CP				
		FPOM (materiale organico fine)	FP				
		film batterici, funghi e sapropel	BA				
somma				100	10		

Il sito è uniformemente o quasi  
uniformemente ricoperto da:

un sottile strato di limo    alghe incrostanti    *Hydrurus*    altro (spec.)

**Tipi di flusso da considerare per il campionamento:**

**NP** Non percettibile

**SM** Liscio/*Smooth*

**UP** *Upwelling*

**RP** Increspato/*Rippled*

**UW** *Unbroken*

*standing waves*

**BW** *Broken standing*

*waves*

**CH** *Chute*

**Flussi da evitare nel campionamento:** FF *Cascata/Free fall* - CF Flusso caotico/*Chaotic flow*

**Note:**

\* Generalmente i substrati minerali sono caratterizzati dalla presenza di substrato a granulometria più fine che si deposita fra gli interstizi tra le pietre più grosse; il riconoscimento del microhabitat viene effettuato osservando la frazione più grossolana maggiormente presente nell'area scelta per il campionamento.

# **2020. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI DELLE DIATOMEI BENTONICHE DEI CORSI D'ACQUA**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
<b>1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE</b> .....	<b>3</b>
<b>2. RIFERIMENTI</b> .....	<b>3</b>
<b>3. TERMINI E DEFINIZIONI</b> .....	<b>3</b>
<b>4. STRUMENTAZIONE E ATTREZZATURA</b> .....	<b>4</b>
4.1 In campo .....	4
4.2 In laboratorio .....	4
4.2.1. <i>Conservazione del campione</i> .....	4
<b>5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO</b> .....	<b>5</b>
5.1 Generalità .....	5
5.2 Periodo di campionamento .....	6
5.3 Scelta della stazione .....	6
5.4 Scelta del substrato .....	6
5.5 Campionamento .....	7
5.6 Etichettatura.....	10
5.7 Scheda di campionamento.....	10
<b>6. PROCEDURE ANALITICHE</b> .....	<b>10</b>
6.1 Preparazione del campione – Metodi per la pulizia dei frustuli .....	11
6.2 Preparazione dei vetrini permanenti .....	11
6.3 Identificazione e conteggio.....	13
<b>7. ARCHIVIAZIONE DEI DATI, DEI VETRINI E DEI CAMPIONI</b> .....	<b>15</b>
<b>8. SICUREZZA</b> .....	<b>15</b>
<b>9. ASSICURAZIONE DI QUALITÀ</b> .....	<b>15</b>
9.1 Qualifica degli operatori.....	16
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>17</b>
<b>ALLEGATO A</b> .....	<b>20</b>
<b>ALLEGATO B</b> .....	<b>22</b>

## INTRODUZIONE

Le diatomee sono una componente importante degli ecosistemi acquatici e costituiscono uno strumento per il monitoraggio della qualità dell'acqua sia nei casi in cui l'obiettivo principale è la misura dello stato qualitativo generale sia quando l'obiettivo è la misura di specifici impatti (e.g. eutrofizzazione, acidificazione). L'utilizzo di questa comunità biologica per il monitoraggio dei corpi idrici è in linea con le richieste della Direttiva 2000/60/CE [1].

L'impiego delle diatomee come indicatori di qualità dei corsi d'acqua è ampiamente accettato in Europa e negli USA. La metodologia si basa sull'osservazione che tutte le specie di diatomee presentano limiti di tolleranza e valori ottimali rispetto alle condizioni dell'ambiente acquatico, quali la concentrazione di nutrienti, l'inquinamento organico e il livello di acidità. Le acque maggiormente inquinate tendono ad ospitare un maggior numero di specie con preferenze per elevate concentrazioni di inquinanti. Al contrario, alcune specie sono intolleranti ad elevati livelli di uno o più inquinanti, mentre altre ancora possono essere presenti in ambienti con stato qualitativo ampiamente variabile.

Le diatomee bentoniche vengono suddivise a seconda del substrato che colonizzano in:

- epilittiche (su substrati duri naturali o artificiali quali ciottoli, sassi o pilastri);
- epifittiche (su macrofite, muschi, altre alghe);
- epipeliche (su detrito più fine quale limo o argilla);
- epipsammiche (su sabbia);
- epizoiche (su animali, e.g. copepodi).

## 1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo documento definisce le modalità per il campionamento e la determinazione della composizione e dell'abbondanza delle diatomee bentoniche in linea con le richieste della Direttiva 2000/60/CE, del D.Lgs. n. 152/2006 [2] e dei decreti attuativi (DM n. 131/2008, DM n. 56/2009 e DM n. 260/2010 [3, 4, 5]) ai fini del monitoraggio e della valutazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua guadabili, utilizzando tali organismi come elementi di qualità biologica.

## 2. RIFERIMENTI

UNI EN 13946:2005. Qualità dell'acqua – Norma guida per il campionamento di routine ed il pretrattamento di diatomee bentoniche da fiumi.

UNI EN 14407:2004. Qualità dell'acqua – Linea guida per l'identificazione, il conteggio e la classificazione di campioni di diatomee bentoniche da acque correnti.

UNI EN 14996:2006. Qualità dell'acqua – Linea guida per assicurare la qualità delle valutazioni biologiche ed ecologiche nell'ambiente acquatico.

## 3. TERMINI E DEFINIZIONI

**Ciottolo:** substrato minerale con un diametro compreso tra 64 e 256 mm.

**Diatomee bentoniche:** diatomee che vivono su substrati, invece che nella colonna d'acqua.

**Frustolo:** parete cellulare delle diatomee, composta da silice e costituita da due valve legate da due o più bande connettivali

**Substrato artificiale:** substrato introdotto nel fiume dall'operatore specificatamente per permettere la colonizzazione delle diatomee

**Substrato:** materiale naturale o non-naturale su cui vengono campionate le diatomee

**Valva:** componente strutturale del frustulo delle diatomee

## 4. STRUMENTAZIONE E ATTREZZATURA

### 4.1 In campo

- stivali tutta coscia;
- spazzolino con setole dure (o strumento simile per raggiungere anfratti e piccole cavità) o coltellino;
- contenitori in plastica da circa 50 mL con tappo a tenuta;
- contenitori in plastica da 1 L circa, con apertura larga, o sacchetti di plastica (dimensioni 30x40 cm circa), per campionamento su macrofite;
- retino a maglia fine con manico (per superfici verticali);
- forbice (per steli macrofite sommerse);
- vaschetta in plastica (dimensioni circa 20x30 cm o maggiori);
- pennarello indelebile;
- acqua distillata;
- borsa frigo per campioni;
- substrati artificiali (se necessari);
- boe (per segnalare presenza substrati artificiali);
- corde e pesi di piombo (per substrati artificiali);
- guanti.

### 4.2 In laboratorio

#### 4.2.1. Conservazione del campione

##### *Conservanti*

- **Etanolo (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH).** È il liquido conservante consigliato. Aggiungere al campione una quantità tale da raggiungere una concentrazione finale al 70%.
- **Soluzione di Lugol.** La soluzione di Lugol si prepara sciogliendo 2 g di ioduro di potassio e 1 g di cristalli di iodio in 300 mL di acqua distillata o demineralizzata. Il liquido risultante dovrebbe avere colorazione paglierina. Dovrebbe essere conservato in contenitori ermetici e scuri per minimizzare la sublimazione. Aggiungere da 1 a 5 gocce di soluzione di Lugol per 100 mL di campione fino ad ottenere il colore finale paglierino. Può essere necessaria una quantità maggiore se i campioni sono ricchi di sostanza organica.  
NOTA. Alcune ricette per la soluzione di Lugol comprendono acido acetico o glutaraldeide per evitare la perdita di flagelli. Tali reagenti dovrebbero essere evitati quando la soluzione viene preparata per le diatomee, in quanto possono dissolvere la silice.
- **Soluzione di formaldeide tamponata al 4% v/v (HCHO)<sup>1</sup>.** Per preparare la soluzione di formaldeide diluire una soluzione stock di formaldeide al 37- 40% in una soluzione tamponata a pH 7. Soluzioni tamponate adatte comprendono HEPES (acido N-2-idrossietil-piperazina-N'-2-etansulfonico), borato e tetramina esametilene. La formaldeide va aggiunta al campione di diatomee fino ad avere una soluzione finale con concentrazione da 1% a 4% (v/v). La quantità di formaldeide

---

<sup>1</sup> data la tossicità della formalina, tutte le operazioni che ne prevedono l'uso, dalla preparazione della formalina tamponata al riempimento dei barattoli contenenti i campioni, devono avvenire in laboratorio sotto cappa e sono, comunque, sottoposte a misure di sicurezza stringenti. I contenitori utilizzati, l'acqua di lavaggio ed i preparati devono essere adeguatamente smaltiti.

che è necessario aggiungere al campione dipenderà inoltre dal quantitativo di materiale organico presente nello stesso.

NOTA. La soluzione di formaldeide va tamponata a pH 7 per prevenire la dissoluzione dei frustuli.

#### **4.2.2. *Trattamento del campione e pulizia dei frustuli***

- setaccio (per l'eliminazione del materiale vegetale grossolano);
- cappa chimica;
- centrifuga;
- pipette(per la misura di 5ml, 10 ml di campione);
- pinzette;
- piastra riscaldante o bagno a sabbia o sistema bagnomaria;
- beakers o provettoni resistenti alle alte temperature e alle sostanze ossidanti e acide (pyrex);
- vetreria idonea per la misura di 20 mL di agenti ossidanti;
- pipette Pasteur;
- tubi da centrifuga (opzionale); tali tubi devono essere resistenti all'attacco di agenti ossidanti o acidi utilizzati per la pulizia delle diatomee;
- reagenti: vedi Allegato B.

#### **4.2.3. *Preparazione dei vetrini permanenti***

- provette;
- vetrini portaoggetto;
- vetrini coprioggetto (preferibilmente circolari, di 11-15 mm di diametro);
- resina per il montaggio con indice di rifrazione > 1,6 (e.g. Naphrax, Hyrax).

#### **4.2.4. *Identificazione e conteggio***

- microscopio ottico, con carrello mobile e obiettivo ad alto ingrandimento per immersione ad olio (100 x). L'utilizzo del contrasto di fase o contrasto interferenziale (Nomarski) viene raccomandato. Il microscopio dovrebbe avere dispositivi per le misure (e.g. oculare graduato) con risoluzione di almeno 1  $\mu$ m. Il reticolo dell'oculare deve essere tarato mediante vetrino con micrometro;
- guide di identificazione e iconografie adatte all'habitat considerato;
- olio ad immersione e dispenser;
- carta per la pulizia delle lenti;
- dispositivi per registrare i dati durante il conteggio. Può essere utile un modulo con la lista dei taxa e spazi a fianco per annotare le abbondanze; può essere utile un contatore a tasti tipo contaleucociti per contare i taxa più abbondanti o un software collegato al microscopio;
- sistema di archiviazione immagini: attrezzature per la fotomicroscopia o videocattura utili per la documentazione delle specie di difficile identificazione e la misura delle dimensioni delle valve. A questo scopo può essere comunque utile annotare le coordinate mediante l'utilizzo della scala di Venier.

## **PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO**

### **5.1 Generalità**

Le modalità descritte in questo protocollo sono specificatamente volte a soddisfare le richieste della Direttiva 2000/60/CE per la valutazione dello stato ecologico dei corpi idrici.

Il campionamento può essere condotto in modo diverso per obiettivi ad esempio di ricerca. Per studi finalizzati alla caratterizzazione delle comunità diatomiche di un corpo d'acqua è consigliabile effettuare il prelievo su tutti i substrati, cercando, quando possibile, di considerare lo stesso substrato per tutti i siti inclusi nella campagna di campionamento.

Studi quantitativi richiedono il campionamento di superfici note (in letteratura è possibile trovare diverse metodiche che prevedono l'utilizzo sia di substrati artificiali sia naturali), nonché l'introduzione di particolari accorgimenti nella fase di preparazione dei vetrini e di conta delle valve [10].

## 5.2 Periodo di campionamento

Dato che le comunità di diatomee, più o meno ricche in specie, sono presenti in ogni periodo dell'anno, i campionamenti si possono effettuare in tutte le stagioni, ma esistono dei periodi più adatti a seconda della idroecoregione.

Va comunque sempre evitato il campionamento nei periodi successivi alle piene; si consiglia di attendere almeno 4 settimane per consentire la completa ricolonizzazione dei substrati.

La maggiore diversità di specie si riscontra nei mesi di maggio-giugno e di settembre-ottobre, periodi con alta intensità luminosa e temperatura mite.

Il periodo più adatto varia in funzione della zona in cui è situato il corso d'acqua.

Zona alpina e centrale:

- si consiglia di effettuare le campagne di campionamento in corrispondenza dei regimi idrologici di magra e di morbida (gennaio-febbraio oppure agosto-settembre per la magra e aprile-maggio per la morbida);
- nei corsi d'acqua di origine glaciale sono da evitare i mesi tardo primaverili e di inizio estate perché l'elevata concentrazione di solidi sospesi può alterare fortemente la comunità diatomica.

Zona mediterranea:

- si consiglia di effettuare le due campagne di campionamento in corrispondenza dei regimi idrologici di morbida e di magra (primavera per la morbida e fine estate/inizio autunno per la magra nei corsi d'acqua permanenti; inizio primavera per la morbida e inizio estate – massimo primi di luglio – per la magra nei corsi d'acqua temporanei, prima della fase asciutta).

I periodi indicati possono essere modulati in fase di pianificazione complessiva del monitoraggio su un corpo idrico in relazione al tipo di monitoraggio e qualora si vogliano perseguire specifici obiettivi.

## 5.3 Scelta della stazione

Il sito di campionamento (stazione) è la porzione di corpo idrico in cui viene effettuata la raccolta del campione biologico. Esso deve essere rappresentativo, in termini di caratteristiche ambientali e di pressioni, del corpo idrico e non deve risentire di alterazioni molto localizzate [12].

Deve essere selezionato un tratto di corpo idrico che presenti habitat e substrati di campionamento idonei, in particolare le zone di raschio (*riffles*). La lunghezza deve essere di almeno 10m; l'estensione dovrà comunque essere almeno pari alla larghezza dell'alveo bagnato.

## 5.4 Scelta del substrato

Le diatomee possono crescere sulla maggior parte delle superfici sommerse; tuttavia, la composizione della comunità varia in funzione del substrato prescelto per il campionamento. L'ideale sarebbe utilizzare un solo tipo di substrato per tutte le stazioni considerate in una campagna di monitoraggio.

All'avvio di un programma di monitoraggio è pertanto importante definire il tipo di substrato che si intende campionare.

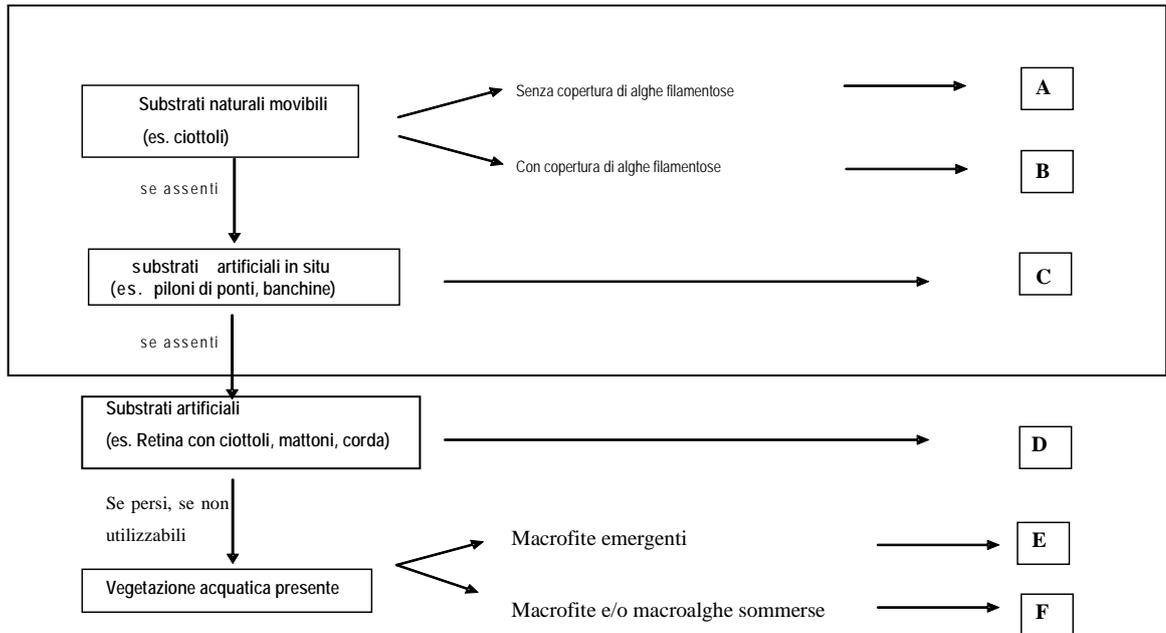
Per la scelta del substrato si deve comunque dare la preferenza ai substrati duri naturali movibili, ossia ai ciottoli (dimensioni da 64 mm a 256 mm) ed ai massi (diametro > 256 mm). I ciottoli sono preferibili perché le loro dimensioni consentono da un lato un agevole prelievo e dall'altro sono abbastanza stabili da permettere l'insediamento di una comunità di diatomee rappresentativa.

In mancanza di tale tipologia di substrato si può scegliere fra i seguenti, disposti secondo l'ordine di preferenza (Fig. 1):

- vegetazione acquatica: macrofite emergenti o sommerse;
- superfici artificiali *in situ*: manufatti, piloni, ...;
- substrati artificiali: retina contenente ciottoli, mattoni, piastrelle, ...;

In riferimento alla scelta dei microhabitat nella stazione, occorre tenere presente che:

- devono essere evitate zone del corso d'acqua con elevato grado di ombreggiamento; anche le aree troppo vicine alla riva devono essere evitate;
- nel caso di corsi d'acqua profondi, si devono considerare i substrati presenti nella zona eufotica;
- i campioni dovrebbero essere raccolti all'interno del flusso principale del corso d'acqua; occorre evitare zone di corrente molto lenta (con velocità < 20 cm/s), poiché in questo caso le diatomee risultano poco adese al substrato e si possono formare depositi di limo e altri detriti.



**Figura 1** – Schema relativo alla scelta del substrato da campionare; le lettere indicano l'ordine di preferenza.

In generale devono essere campionati substrati stabilmente colonizzati e sempre sommersi. Un periodo di almeno quattro settimane può essere ritenuto sufficiente per assicurare che le comunità di diatomee siano in equilibrio con l'ambiente acquatico [12].

Particolare attenzione va dedicata ad evitare la contaminazione del campione che si sta per raccogliere con diatomee di altre stazioni o con diatomee non rappresentative della stazione.

A tal fine si suggerisce:

- di campionare procedendo lungo il corso d'acqua da valle verso monte;
- di utilizzare uno spazzolino nuovo per ogni campionamento;
- di utilizzare acqua distillata nella vaschetta ove risciacquare lo spazzolino o la lama, al fine di evitare la contaminazione del campione, in particolare nei corsi d'acqua più lenti, con diatomee planctoniche;
- di sciacquare accuratamente il materiale utilizzato (lama del coltello, vaschetta) con l'acqua del corso d'acqua all'inizio ed al termine di ogni operazione di campionamento;
- di pulire accuratamente gli stivali per non diffondere specie invasive.

## 5.5 Campionamento

Il gruppo di lavoro che esegue il campionamento deve essere composto da un numero minimo di due persone, anche in relazione ai possibili rischi connessi con l'attività di campo.

Vengono di seguito riportate le tipologie di substrato campionabili, in ordine decrescente di preferenza (Fig. 1).

*A. Campionamento di superfici mobili dure naturali senza alghe filamentose*

1. Raccogliere, nel filone centrale della corrente, almeno 5 ciottoli in vari punti della stazione. Se i ciottoli non fossero disponibili, raccogliere 5 piccoli massi o 10 ciottoli di minori dimensioni; al termine della raccolta, la superficie totale campionata deve essere di almeno 100 cm<sup>2</sup>; negli ambienti oligotrofi è richiesto maggior sforzo di campionamento, in termini di accuratezza nel prelievo del film diatomico dal substrato.
2. Sciacquare delicatamente i ciottoli con l'acqua del fiume, al fine di eliminare eventuale materiale inorganico depositato su di essi.
3. Grattare con uno spazzolino da denti o con la lama di un coltello la superficie superiore e/o laterale dei ciottoli e risciacquare lo spazzolino o la lama in una vaschetta in cui sia stata posta una minima quantità di acqua.
4. Trasferire il campione in un contenitore ermetico; in alternativa è possibile sciacquare lo spazzolino o la lama direttamente nel contenitore (Fig. 2 e 3).



**Figura 2** - Sequenza delle operazioni in caso di campionamento di ciottoli.



**Figura 3** - Se il ciottolo è coperto da alghe filamentose, queste vanno rimosse prima di campionare le diatomee

*B. Campionamento di superfici mobili dure naturali con alghe filamentose*

Se più del 75% dei substrati fosse coperto da alghe filamentose, tali substrati vanno campionati dopo aver rimosso i filamenti (Fig. 4), e quindi procedendo dal punto 3 del paragrafo precedente.

*C. Superfici artificiali in situ (manufatti)*

1. Grattare la superficie colonizzata con una lama affilata inserita all'estremità di un manico come supporto. In alternativa utilizzare campionatori idonei (Fig. 5), costituiti da un manico e un telaio metallico (apertura di circa 8 cm) su cui è fissato un retino con maglie di 50 µm. Alla fine del retino è inserita una bottiglia svitabile per la raccolta ed il recupero delle diatomee campionate.
2. Campionare un'area di almeno 100 cm<sup>2</sup>.
3. Rimuovere il film che è rimasto adesivo alla lama direttamente nel contenitore per campioni.



**Figura 4** - Esempio di campionatore per superfici artificiali verticali.

#### *D. Substrati artificiali*

È necessario posizionare, nella zona eufotica del corso d'acqua, dei substrati con superficie rugosa. I più indicati sono i ciottoli raccolti nella zona della stazione di monitoraggio, opportunamente lavati e posizionati in sacchetti a rete con maglia di almeno 2 cm. In alternativa sono comunque utilizzabili piastrelle (superficie 100 cm<sup>2</sup>), mattoncini o tegole. Tali substrati dovrebbero essere lasciati immersi per almeno quattro settimane, nella zona eufotica, in modo da permetterne la colonizzazione da parte delle diatomee. In casi particolari, quali basse temperature dell'acqua od oligotrofia dell'ambiente da esaminare, i substrati devono essere esposti per tempi più lunghi (almeno 6 settimane). Substrati con superfici eterogenee (ad esempio piastrelle ruvide, corda in polipropilene sfilacciato) sono preferite rispetto substrati con superfici lisce (ad esempio lastre di vetro). In ogni caso la scelta del materiale va effettuata in base alla tipologia di corpo idrico selezionato.

I substrati esposti (ciottoli, mattoncini o tegole) vengono poi campionati seguendo la procedura utilizzata per i substrati duri (A).

Per effettuare studi comparativi in fiumi non guadabili è opportuno utilizzare lo stesso tipo di supporto e sottoporre i substrati alle identiche condizioni ambientali, per gli stessi periodi di esposizione.

#### *E. Vegetazione acquatica - macrofite emergenti*

I campioni dovrebbero essere raccolti dalle macrofite emergenti solo se vengono campionate parti che rimangono permanentemente sommerse e che non sono contaminate dai sedimenti di fondo. Procedere nel seguente modo:

1. tagliare con una forbice o una lama affilata 5-6 steli (parte sommersa);
2. mettere gli steli in un contenitore;
3. in laboratorio staccare le diatomee agitando il contenitore o grattando delicatamente gli steli.

Le operazioni possono essere svolte anche in campo, avendo l'accortezza di utilizzare una minima quantità di acqua.

Se il film di diatomee fosse particolarmente delicato, procedere nel seguente modo:

1. tagliare gli steli fino al livello dell'acqua;
2. posizionare sopra di essi un contenitore rovesciato;
3. tagliare gli steli alla base;
4. rivoltare il contenitore;
5. procedere come sopra al punto 3.

#### *F. Vegetazione acquatica - macrofite e macroalghe sommerse*

1. raccogliere 5 piante intere;
2. metterle in un sacchetto di plastica per il trasferimento in laboratorio;
3. in laboratorio mettere le macrofite in un beaker capiente, aggiungere una piccola quantità di acqua distillata e scuotere, per favorire il distacco delle diatomee;

4. rimuovere le macrofite;
5. lasciare sedimentare ed eliminare il surnatante.

Le operazioni possono essere svolte anche in campo; anche in questo caso occorre però ridurre al minimo la quantità di acqua utilizzata per il lavaggio.

Per studi comparativi tra corpi idrici sarebbe opportuno riferirsi a campioni prelevati da macrofite della stessa specie o da un gruppo comprendente specie morfologicamente simili.

## 5.6 Etichettatura

Ciascun campione deve essere correttamente e univocamente identificato mediante un'etichetta. A tal fine sul contenitore può essere riportato, con pennarello indelebile, ad esempio: il nome del fiume, il codice del corpo idrico, il nome del sito, la data di campionamento.

## 5.7 Scheda di campionamento

Tutte le informazioni utili relative al campionamento devono essere annotate su un'apposita scheda. Un esempio di scheda di campionamento è riportato in allegato A.

Nella parte generale della scheda saranno indicati la data di campionamento, il nome del sito e la sua localizzazione (e.g. comune, provincia, regione) e l'idroecoregione di appartenenza.

Ai fini di una caratterizzazione di maggior dettaglio della stazione, devono essere rilevati ed annotati sulla scheda di campionamento i valori relativi ad alcuni parametri fortemente condizionanti la distribuzione e la composizione delle comunità diatomiche quali la temperatura dell'acqua, il pH, l'ossigeno disciolto, la velocità della corrente, la torbidità, etc.

Qualora nella stagione di campionamento sia già in corso un programma di monitoraggio di qualità chimico-fisica dell'acqua, i dati relativi ai parametri chimico-fisici possono essere derivati da quelli reperiti durante le attività di monitoraggio di natura chimico-fisica.

## 6. PROCEDURE ANALITICHE

### *Operazioni preliminari*

In laboratorio si procede alle seguenti operazioni.

1. Eliminazione dei residui di grandi dimensioni o materiale vegetale grossolano (anche con l'ausilio di un setaccio da cucina).
2. Analisi preliminare del campione al microscopio: annotare qualsiasi particolare insolito (es. numero elevato di frustuli vuoti).
3. Preparazione del campione o, in alternativa, stoccaggio in un luogo freddo e buio (frigorifero) fino a 24 ore prima della preparazione o aggiunta di conservante. Dopo 24 ore il materiale in sospensione è sedimentato sul fondo del contenitore ed il surnatante limpido può essere tolto con cautela. In alternativa, il campione può essere centrifugato.
4. Conservazione di una parte del campione tal quale, sia per l'eventuale archiviazione, sia per disporre di altra quantità di campione nel caso vi siano problemi durante la preparazione.

### *Conservazione del campione*

L'aggiunta di liquido conservante ha lo scopo di interrompere il processo di divisione cellulare e la decomposizione della sostanza organica.

Non è necessario aggiungere conservante se il campione viene preparato entro alcune ore dalla raccolta e se si prendono accorgimenti per ridurre al minimo il processo di divisione cellulare (e.g. conservazione in luogo freddo e buio).

Si osservi che:

- la soluzione di Lugol può essere utilizzata per la conservazione a breve termine, ma non è adatta per la conservazione a lungo termine per i problemi di sublimazione;

- per la conservazione a lungo termine dei campioni si raccomanda l'uso di etanolo (Par. 5.2.1)
- o, in subordine, di formaldeide tamponata a pH 7;
- i campioni possono essere anche congelati.

La procedura di eliminazione del surnatante dopo la sedimentazione o centrifugazione del campione "fresco" (non conservato) può portare alla eliminazione di diatomee vive rimaste in sospensione.

Si consiglia di ridurre al minimo l'acqua (50-100 mL) nella quale verrà posto il film di diatomee campionato (si consiglia l'utilizzo di un contenitore da 50-100 mL), al fine di avere un campione già concentrato in partenza e di non dover procedere alla decantazione o centrifugazione dello stesso per concentrarlo [12].

## 6.1 Preparazione del campione – Metodi per la pulizia dei frustuli

Esistono vari metodi di laboratorio, basati sull'ossidazione della sostanza organica contenuta nel campione, che permettono di ottenere la pulizia dei frustuli [12].

I primi due metodi presentati nell'Allegato C sono quelli maggiormente usati perché non richiedono l'uso di sostanze tossiche.

Nella fase di pulizia delle diatomee occorre prestare particolare attenzione a non contaminare i campioni fra loro. Si dovrà pertanto utilizzare, per ogni campione, materiale distinto e separato. In particolare per ogni campione dovrà essere utilizzato un beaker, una provetta di centrifugazione, una pipetta Pasteur, una bacchetta di vetro, che devono essere opportunamente siglati.

### *Preparazione da campione non conservato*

1. Omogeneizzare il campione agitando.
2. Prelevare una piccola quantità del campione (5-10 mL).
3. Mettere in un beaker o provetta.
4. Procedere con uno dei metodi 1-4 (Allegato C).

### *Preparazione da campione conservato*

1. Omogeneizzare il campione agitando.
2. Prelevare una piccola quantità di campione (5-10 mL).
3. Mettere il campione prelevato in una provetta per centrifuga.
4. Centrifugare a 1500 giri/min. per 10 minuti ed eliminare il surnatante (ripetere l'operazione altre due volte).
5. Mettere in un beaker o provetta.
6. Procedere con uno dei metodi 1-4 (Allegato C).

Se non fosse disponibile la centrifuga, i campioni con soluzione conservante possono essere lasciati a sedimentare per una notte fino a che il materiale solido si deposita, dopodiché il surnatante può essere eliminato con cautela.

## 6.2 Preparazione dei vetrini permanenti

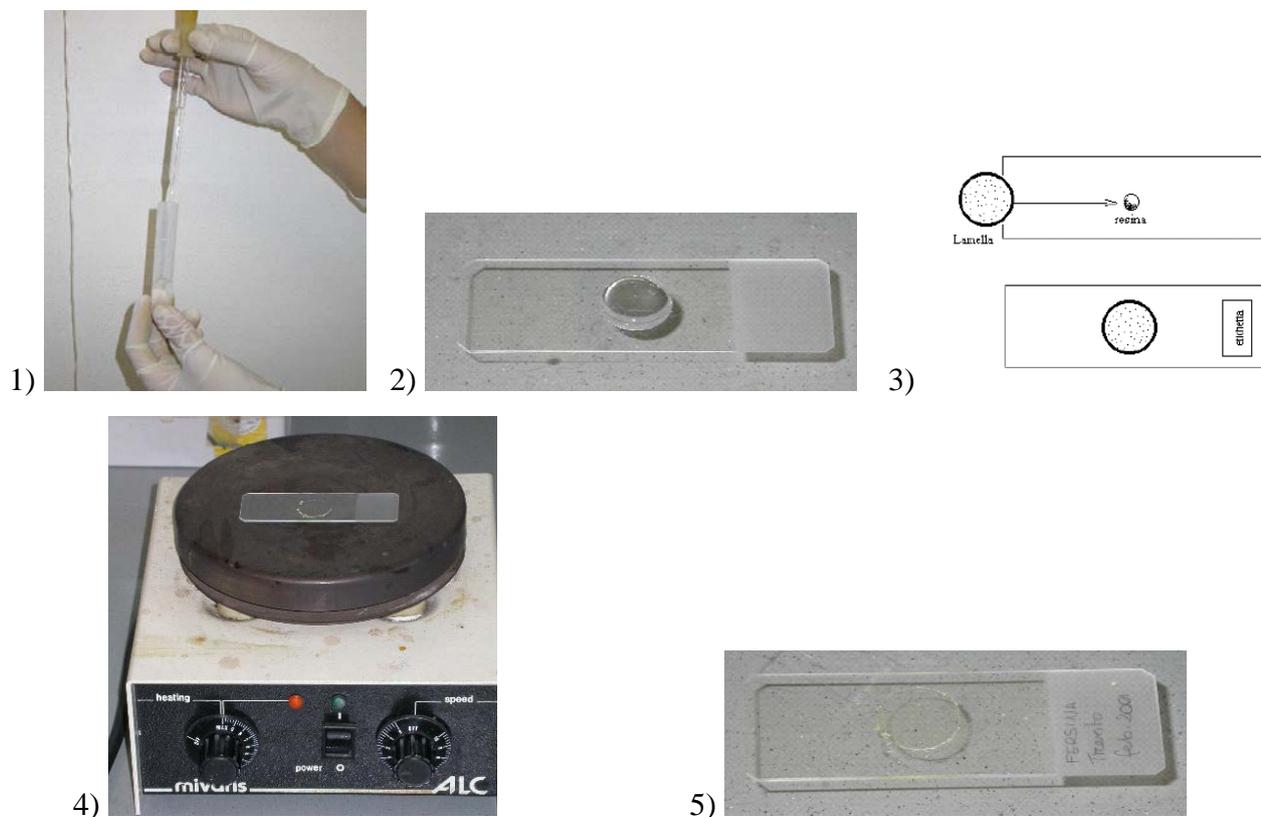
- Se i vetrini non sono perfettamente puliti, pulire i vetrini coprioggetti e portaoggetti con sapone detergente o con alcool etilico;
- Agitare la provetta contenente il preparato ossidato al fine di sospendere omogeneamente i frustuli;
- preparare una diluizione del campione, in modo da ottenere una sospensione che ad occhio nudo appaia lievemente lattescante o quasi limpida;
- identificare il vetrino mediante una scritta indicante almeno il nome del corso d'acqua, la località e la data di prelievo;
- porre i vetrini coprioggetti su di una superficie piana (può essere comodo posizionarli direttamente sul vetrino portaoggetti corrispondente);
- prelevare con una pipetta Pasteur una piccola quantità della sospensione diluita ed omogenizzata e porla su un vetrino coprioggetti, facendo attenzione a non fare uscire la goccia dal bordo dello stesso (Fig. 6); usare sempre pipette nuove per ogni campione;

- lasciare asciugare la goccia a temperatura ambiente e in un luogo al riparo dalla polvere, oppure sulla piastra riscaldante a bassa temperatura. L'essiccamento veloce in stufa potrebbe determinare la formazione di agglomerati di diatomee e va quindi evitato;
- posizionare sul vetrino portaoggetti, in corrispondenza del punto su cui andrà messo il coprioggetto, una goccia di resina ad alto potere di rifrazione (e.g. Naphrax; Hyrax); se si tratta di Naphrax, contenente toluene come solvente, si raccomanda di lavorare sotto una cappa di aspirazione;
- con una pinzetta prendere il coprioggetto e capovolgerlo sulla goccia, in modo che la superficie ricoperta dalle diatomee sia a contatto con la resina;
- porre il vetrino così preparato su una piastra riscaldante a circa 90-100°C, sotto cappa chimica,
- lasciare scaldare fino a che il solvente della resina non evapori completamente: nell'evaporazione produrrà delle bolle, esercitare una leggera pressione con la pinzetta per migliorare l'adesione;
- lasciare raffreddare completamente il vetrino;
- pulire il contorno del coprioggetto dalla resina in eccesso.

Per una lettura agevole del vetrino, controllare che la concentrazione di valve o frustuli non sia troppo elevata: un'eccessiva sovrapposizione delle valve non permetterebbe la conta e l'identificazione.

Si consiglia di preparare, per ogni campione più di un vetrino coprioggetti (almeno due), con quantità differenti di sospensione, al fine di ottenere concentrazioni diverse. In alternativa, verificare di aver ottenuto la giusta concentrazione di valve (i preparati dovrebbero avere indicativamente da 10 a 15 valve per campo ad un ingrandimento 1000x); nel caso di campione troppo denso o troppo rado, ripetere la procedura. È preferibile, inoltre, una volta trovata la concentrazione ideale, preparare ulteriori repliche dei vetrini.

Si consiglia l'utilizzo di vetrini coprioggetti di forma rotonda (diametro 11-15 mm), che permettono una distribuzione più omogenea delle valve rispetto a quelli di forma rettangolare.



**Figura 5** - Diversi passaggi durante la preparazione dei vetrini permanenti: 1) preparazione della diluizione idonea; 2) collocazione della goccia di campione (appositamente diluito) sul vetrino coprioggetto; 3) il copri oggetto dopo essiccazione viene posto sulla resina; 4) il vetrino allestito viene posto sulla piastra per far evaporare il solvente della resina; 5) il vetrino è pronto.

## 6.3 Identificazione e conteggio

### *Criteri tassonomici per l'analisi*

Quando si utilizzano le diatomee per uno studio sulla qualità dell'acqua, bisogna assicurarsi che venga eliminata qualsiasi fonte di confusione sul nome corretto da assegnare. A tal fine, alla specie identificata deve essere associato il nome dell'autore.

Attualmente, la maggior parte dei metodi che utilizzano le diatomee come bioindicatori della qualità dell'acqua richiedono la definizione fino al livello di specie [13].

### *Unità per il conteggio*

Vi sono differenti convenzioni circa l'unità di base per il conteggio delle diatomee, in quanto può essere utilizzato:

- il numero di valve;
- il numero di frustuli;
- il numero sia delle valve sia dei frustuli.

L'effetto che tali convenzioni hanno sui risultati finali non è stato formalmente analizzato. È importante che la convenzione sia stabilita all'inizio del conteggio. Si osservi che, comunque, nel caso di diatomee di piccole dimensioni, come alcune specie di *Achnanthes* e *Navicula*, può non essere possibile distinguere fra frustulo e valva.

Attualmente si consiglia, ove possibile, di effettuare il conteggio delle valve.

Per il genere *Cocconeis* si suggerisce di contare solo le valve senza il rafe e moltiplicare per due. Per le specie *Planothidium lanceolatum* e *P. frequentissimum*, si suggerisce di contare le valve senza rafe e moltiplicare per due.

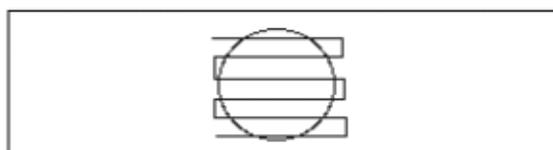
Particolare attenzione si deve porre ad individuare nel campione i generi *Fistulifera* e *Mayamaea*, per i quali si consiglia l'osservazione in contrasto di fase.

### *Dimensione del campione*

Ai fini del presente protocollo si consiglia di effettuare il conteggio di 400-450 valve.

### *Conteggio*

1. Identificare e contare le valve presenti in un campo.
2. Spostarsi su un altro campo in senso orizzontale o verticale (Fig. 7), evitando le zone di bordo. Si può procedere a zig-zag, o lungo determinate direzioni orizzontali o verticali od oblique. Quando viene utilizzato lo spostamento verticale od orizzontale, è importante che il campo visibile in ogni spostamento non si sovrapponga con quello visibile prima dello spostamento, al fine di evitare che nessuna diatomea venga contata più di una volta. La distanza dello spostamento in ogni fase dovrebbe considerare anche le diatomee solo parzialmente visibili in un campo;
3. Ripetere la procedura fino al raggiungimento del numero di unità da contare (400).



**Figura 6** - Esempio di procedura per lo spostamento lungo il vetrino portaoggetti durante il conteggio.

### *Come considerare le diatomee rotte*

Per eliminare il rischio di comprendere frammenti separati di valve o frustuli rotti, occorre definire una procedura prima dell'inizio del conteggio. Possibili approcci sono:

- comprendere un individuo rotto solo se è presente in un frammento di circa  $\frac{3}{4}$ ;
- comprendere individui solo se almeno un polo e l'area centrale sono visibili;
- escludere tutti gli individui rotti.

Attualmente si consiglia di comprendere gli individui solo se presente più della metà della valva (almeno circa  $\frac{3}{4}$ ).

La presenza di molti frammenti di grandi dimensioni potrebbe indicare che diatomee morte sono state portate a valle da siti posti a monte. Comunque, in alcuni casi si dovrebbe valutare di ripetere la preparazione utilizzando un trattamento meno aggressivo.

#### *Come considerare le diatomee sul bordo del campo*

Nel caso in cui le valve da contare siano comprese solo parzialmente in una definita area di conta, si considerano solo gli esemplari visibili sulla parte superiore ma non su quella inferiore, oppure quelli presenti a destra ma non a sinistra (Fig. 8).



**Figura 8** – Visione parziale delle diatomee nell'area di conta.

#### *Come considerare le diatomee non identificabili*

Una valva può risultare non identificabile per varie ragioni:

- è disposta in vista connettivale;
- è presente materiale sovrapposto che impedisce una chiara visione. Se numerose valve sono coperte da altro materiale, occorre preparare un vetrino partendo da una sospensione più diluita o variando i tempi di sedimentazione al fine di separare le diatomee dal materiale estraneo;
- l'analista non è in grado di riconoscerla.

Alcuni taxa sono identificabili in vista connettivale, sia perché ad esempio la vista connettivale è caratteristica (es. *Rhoicosphenia abbreviata*), sia perché è possibile attribuire la vista connettivale ad un taxon particolare con un certo livello di sicurezza, sulla base delle viste valvari rinvenute nello stesso vetrino. Comunque ciò non è sempre possibile e, se ci sono dubbi, l'analista dovrebbe annotare le viste connettivali al livello più basso al quale possono essere assegnate (e.g. *Gomphonema* sp. non identificato, pennata connettivale non identificata) (Fig. 9).

Un elevato numero di unità non identificabili può essere dovuto alla cattiva preparazione del vetrino o alla scarsa capacità di identificazione dell'analista. In generale, per i metodi che prevedono l'identificazione tassonomica al livello di specie, si raccomanda che non più del 12% delle unità contate sia composto da individui non identificati fino al livello specifico, considerando anche le forme connettivali.

Per indici basati sui generi o su un misto di generi e specie, non più del 5 % dovrebbe essere composto da individui che non siano stati identificati almeno fino al livello di genere.



**Figura 9 - Diatomee in vista connettivale.**

## 7. ARCHIVIAZIONE DEI DATI, DEI VETRINI E DEI CAMPIONI

E' utile predisporre un archivio dei campioni esaminati al fine di disporre per eventuali riesami successivi. In particolare sarà utile archiviare per ogni campione:

- una provetta con parte del campione non ossidato, con soluzione conservante;
- una provetta con parte del campione ossidato, con soluzione conservante;
- uno o più vetrini etichettati.

È inoltre utile organizzare un archivio dei dati e un archivio delle immagini acquisite con il supporto di software di analisi dell'immagine.

## 8. SICUREZZA

Il campionamento e l'analisi in campo per l'ampia variabilità delle condizioni sono generalmente operazioni che possono esporre gli operatori a rischi per la salute e la sicurezza. Gli operatori che utilizzeranno questo protocollo dovranno avere adeguata formazione e addestramento per svolgere le normali pratiche di laboratorio e di campionamento e analisi in campo.

Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso. È responsabilità del datore di lavoro ovvero dei dirigenti ai sensi del D.Lgs. n. 81/08 valutare e analizzare i rischi specifici associati alle attività svolte e individuare, sentiti i servizi di prevenzione e protezione, le misure e i dispositivi di protezione individuale necessari per assicurare la tutela della salute e della sicurezza degli operatori secondo le disposizioni di legge vigenti.

Come testi di riferimento è possibile utilizzare le pubblicazioni [10] e [11].

## 9. ASSICURAZIONE DI QUALITÀ

Nell'ambito dell'applicazione del presente protocollo devono essere definite le attività più appropriate al fine di assicurare che la qualità delle valutazioni biologiche consegua specifici requisiti. In particolare dovranno essere definiti:

- il programma di monitoraggio (e.g. finalità del monitoraggio, numero e collocazione dei siti di campionamento, frequenza dei campionamenti ...);
- la valutazione degli errori associati al campionamento e all'identificazione delle specie;
- la qualificazione e l'esperienza del personale che esegue il campionamento;
- la partecipazione a confronti inter-laboratorio e/o a prove valutative.

## **9.1 Qualifica degli operatori**

Il personale coinvolto nelle attività di monitoraggio biologico deve essere qualificato sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento, esperienza e/o comprovata abilità.

In particolare, gli operatori che eseguono il campionamento, la preparazione dei campioni e dei vetrini permanenti ed effettuano l'identificazione dei taxa devono possedere adeguata e documentata preparazione (diploma, diploma di laurea e/o specializzazione post-universitaria) in campo ecologico, idrobiologico e tassonomico (diatomee) e devono aver compiuto un percorso di apprendimento in affiancamento ad operatori esperti o frequentando un apposito corso di formazione.

Il mantenimento della qualifica del personale coinvolto nel monitoraggio con le diatomee bentoniche deve essere assicurato attraverso la partecipazione regolare all'attività di monitoraggio e periodicamente verificato tramite, ad esempio: formazione-addestramento, partecipazione a confronti interlaboratorio organizzati da istituzioni o organizzazioni di riconosciuta competenza, e anche attraverso la partecipazione a seminari e conferenze di aggiornamento.

## BIBLIOGRAFIA

[1] DIRETTIVA 2000/60/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L 327/2, 22.12.2000: 1-71.

[2] Italia, 2006. Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n.152. Norme in materia ambientale. Gazzetta Ufficiale-Supplemento Ordinario n. 96 del 14 aprile 2006.

[3] Italia, 2008. Decreto Legislativo 11 Agosto 2008, n. 131. «Regolamento recante i criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici (tipizzazione, individuazione dei corpi idrici, analisi delle pressioni) per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, recante : Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo». Gazzetta Ufficiale Supplemento Ordinario Serie generale n. 187 dell 11/8/2008.

[4] Italia, 2009. Decreto 14 Aprile 2009, n.56. Regolamento recante «Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, recante Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo». Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario n. 83, 30 maggio 2009.

[5] Italia, 2011. Decreto 8 novembre 2010, n. 260. Regolamento recante « Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo». Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario n. 31, 7 febbraio 2011.

[6] Mancini L, Sollazzo C (Ed.) 2009. Metodo per la valutazione dello stato ecologico delle acque correnti: comunità diatomiche. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 09/19).

[7] JRC, AA.VV, WFD Intercalibration Phase 2: WFD Intercalibration Phase 2: Milestone 6 report. Rivers / Mediterranean GIG / Phytobenthos pp. 42. Disponibile online all' indirizzo [http://circa.europa.eu/Public/irc/jrc/jrc\\_eewai/library?l=/download3/xmilestone\\_reports/rivers/new\\_results&vm=detailed&sb=Title](http://circa.europa.eu/Public/irc/jrc/jrc_eewai/library?l=/download3/xmilestone_reports/rivers/new_results&vm=detailed&sb=Title)

[8] JRC. AA.VV, WFD Intercalibration Phase 2: WFD Intercalibration Phase 2: Milestone 5/Alpine GIG/Phytobenthos. pp 17. Disponibile online all' indirizzo [http://circa.europa.eu/Public/irc/jrc/jrc\\_eewai/library?l=/download3/milestone\\_reports\\_2011\\_1/rivers/phytobenthos\\_alpinegig\\_1&vm=detailed&sb=Title](http://circa.europa.eu/Public/irc/jrc/jrc_eewai/library?l=/download3/milestone_reports_2011_1/rivers/phytobenthos_alpinegig_1&vm=detailed&sb=Title)

[9] JRC, AA.VV, WFD Intercalibration Phase 2: WFD Intercalibration Phase 2: Milestone 5/Central Baltic GIG / Phytobenthos. pp. Disponibile online all' indirizzo [http://circa.europa.eu/Public/irc/jrc/jrc\\_eewai/library?l=/download3/milestone\\_reports\\_2011\\_1/rivers/phytobenthos\\_gigs\\_1&vm=detailed&sb=Title](http://circa.europa.eu/Public/irc/jrc/jrc_eewai/library?l=/download3/milestone_reports_2011_1/rivers/phytobenthos_gigs_1&vm=detailed&sb=Title)

[10] ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.

[11] APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006

## [12] Protocolli di campionamento e preparazione dei campioni

Cambra J., Ector L., Sabater S., 2005. Metodologia para el establecimiento del Estrado Ecologico segun la Directiva MARCO del Agua. Protocols de muestreo y analisis para Fitobenthos (Microalgas bentonicas). Ministerio de Medio Ambiente. Confederacion Hidrografica del Ebro. 43 pp.

Diatoms for Assessing River Ecological Status (DARES project), 2004. Enumeration protocol. 13 pp.

Diatoms for Assessing River Ecological Status (DARES project). Preparation protocol. 2 p.

Diatoms for Assessing River Ecological Status (DARES project). Sampling protocol. 9 pp.

Della Bella V., Pace G., Barile M.C., Zedde A., Puccinelli C., Ciadamidaro S., Danieli P.P., Belfiore C., Andreani P., Aulicino F.A. and Mancini L. Benthic diatom assemblages and their response to human stress in small sized volcanic-siliceous streams of central Italy (Mediterranean eco-region). *Hydrobiologia* 2012.

Dell'Uomo A., 2004. L'indice diatamico di eutrofizzazione/polluzione (EPI-D) nel monitoraggio delle acque correnti. Linee guida. APAT Agenzia per la protezione dell'ambiente e per I servizi tecnici, Roma, 101 pp.

Kelly M.G., A. Cazaubon, E. Coring, A. Dell'Uomo, L. Ector, B. Goldsmith, H. Guasch, J. Hürlimann, A. Jarlman, B. Kawecka, J. Kwadrans, R. Laugaste, E.A. Lindstrøm, M. Leitao, P. Marvan, J. Padisák, E. Pipp, J. Prygiel, E. Rott, S. Sabater, H. van Dam & J. Vizinet, 1998 - Recommendations for routine sampling of diatoms for water quality assessment in Europe. *J. Appl. Phycol.*, 10: 215-224.

Krammer K., Taylor J.C., de la Rey P.A., van Rensburg L., 2005. Recommendations for the collection, preparation and enumeration of diatoms from riverine habitats for the water quality monitoring in South Africa.

Minciardi M.R., Rossi G.L., Azzollini R., Betta G., 2003. Linee guida per il biomonitoraggio dei corsi d'acqua in ambiente alpino. ENEA, Provincia di Torino, 63 pp.

Schaumburg J., Schmedtje U., Schranz C., Köpf B., Schneider S., Meilinger P., Hofmann G., Gutowski A., Foerster J. 2005. Instruction Protocol for the ecological Assessment of Running Waters for Implementation of the EU Water Framework Directive: Macrophytes and Phytobenthos. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft. 89 pp.

STAR, 2002. Sampling protocol and audit benthic diatoms. 14 pp.

Puccinelli C., Marcheggiani S., Bernabei S., e Mancini L. 2012. Linea guida per l'analisi delle comunita' diatomiche. In stampa

Puccinelli C., Marcheggiani S., Scenati R. e Mancini L. 2012. An experimental approach on benthic diatom sampling using artificial substrates in deep water bodies.

## [13] Testi per l'identificazione

Hofmann G., Werum M., Horst Lange-Bertalot H., 2011. Diatomeen im Süßwasser - Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie.

Krammer K., Lange-Bertalot H., 1997. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 02:01: Bacillariophyceae 1: Naviculaceae. Teil A: TEXT.

Krammer K., Lange-Bertalot H., 1997. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 02:01: Bacillariophyceae 1: Naviculaceae. Teil B: TAFELN (plates).

Krammer K., Lange-Bertalot H., 1997. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 02:02: Bacillariophyceae. Teil 2: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae.

Krammer K., Lange-Bertalot H., 2000. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 02:05: Bacillariophyceae: English and French translation of the keys. Engl. transl. by Nian Bate (keys) and Andrew Podzorski (general part)/ French translation by Jeanne Bukowska, Monika Michel Jean Prygiel (keys).

Krammer K., 2002. Diatoms of Europe: Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Edited by Horst Lange - Bertalot. Volume 3: Cymbella.

Krammer K., 2003. Diatoms of Europe: Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Edited by H. Lange-Bertalot. Volume 4: Cymbopleura, Delicata, Navicymbula, Gomphocymbellopsis, Afrocybella Supplements to cymbelloid taxa.

Krammer K., Lange-Bertalot H., 2004. Süßwasserflora von Mitteleuropa - Band 02:03: Bacillariophyceae: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Rev. ed.

Krammer K., Lange-Bertalot H., 2004. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 02:04: Bacillariophyceae: Achnanthes, Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lincolata) und Gomphonema.

Lange-Bertalot H., 2001. Diatoms of Europe: Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Edited by Horst Lange-Bertalot. Volume 2: Navicula sensu stricto, 10 Genera

Separated from Navicula sensu stricto, Frustulia.

Lange-Bertalot (ed) 2012. Diatomeen im Süßwasser - Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie.

Prygiel J. & Coste M., 2000. Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées – NFT 90-354.

Reichardt E., 1999. Iconographia Diatomologica, Annotated Diatom Micrographs. Edited by Horst Lange - Bertalot. Volume 08: TAXONOMY: Zur Revision der Gattung Gomphonema. Die Arten um G.affine/insigne, G.angustatum/ micropus, G.acuminatum sowie gomphonemoide Diatomeen aus dem Oberoligozän in Böhmen.

Puccinelli C., Vendetti C., Marcheggiani S., Grassi F., De Meo S., Martone C., Balzamo S., Belli M. e Mancini L. 2012. Atlante delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua italiani. In stampa

#### [14] Software dedicati

Lecointe C., Coste M. & Prygiel J., 1993. "OMNIDIA": software for taxonomy, calculation of diatom indices and inventories management. Hydrobiologia 269/270: 509-513.

## ALLEGATO A

### ESEMPIO DI SCHEDA CAMPIONAMENTO DIATOMEI BENTONICHE

Data del Prelievo: ..... ore:.....

Identificativo del campione: .....

Descrizione del campione: .....

.....

.

N° di accettazione assegnato al campione in laboratorio: .....

Sito ..... di ..... campionamento:

.....

.....

Punto ..... di ..... campionamento:

.....

.....

Contenitore: ..... Quantità prelevata:.....

Parametri rilevati su campo:

.....

.

.....

.

.....

.

.....

.

## INFORMAZIONI SUL SITO

<b>Bacino idrografico di appartenenza</b>	
<b>Sito di riferimento a livello nazionale</b>	sì/no
<b>Tipologia fluviale</b>	HER – Tipo:
<b>Macrotipo fluviale</b>	
<b>Latitudine</b>	
<b>Longitudine</b>	
<b>Altitudine s.l.m.</b>	metri
<b>Area del bacino idrografico</b>	km <sup>2</sup>
<b>Composizione del substrato</b>	
<b>Ombreggiatura</b>	%

<b>Morfologia generale</b>	
<b>Idrologia generale</b>	
<b>* valore</b>	1=non alterato; 2= poco alterato; 3= molto alterato
<b>Substrato campionato</b>	
<b>Vegetazione ripariale</b>	
<b>Uso del territorio</b>	
Urbanizzazione	
Agricoltura	
Uso ricreativo	
<b>* valore</b>	1=assente; 2=presente; 3=diffuso

Altre Osservazioni:

.....  
 .....

Personale che ha eseguito il Campionamento:

\_\_\_\_\_

## ALLEGATO B - METODI PER LA PREPARAZIONE DEI FRUSTULI

### Metodo 1: perossido di idrogeno a caldo

#### Reagenti

- soluzione di perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) al 30% (100 volumi);
- acido cloridrico diluito (HCl) 1M.

#### Metodo

1. Omogeneizzare il campione scuotendolo e trasferire da 3 a 10 mL di sospensione in un beaker o provetta resistente a calore e acidi-basi. Aggiungere circa 9 parti di perossido di idrogeno ad una parte di campione e riporre su piastra riscaldante, bagno a sabbia o bagnomaria a circa  $90 \pm 5^\circ C$ , fino a che tutta la sostanza organica non si sia ossidata (generalmente da 1 a 3 ore). Nei campioni particolarmente ricchi di sostanza organica i tempi di ossidazione possono aumentare notevolmente. Nei campioni di diatomee epifitiche il materiale vegetale grossolano può essere rimosso dopo 30 minuti. Deve essere usata cautela mentre si versa il perossido di idrogeno freddo concentrato nel materiale ricco di sostanza organica, così come durante il processo di riscaldamento. Nei primi momenti dell'ossidazione si formerà una schiuma densa: è necessario evitare di farla tracimare, continuando a mescolare il campione con una bacchetta di vetro per alcuni minuti. Quando la schiuma scompare, procedere nella concentrazione del campione sulla piastra riscaldante, finché nel beaker non siano rimasti pochi mL di sospensione.
2. Togliere il beaker o il provettone dalla piastra. Aggiungere alcune gocce di acido cloridrico al fine di rimuovere il perossido di idrogeno in eccesso ed i carbonati e lavare le pareti del beaker con acqua distillata o demineralizzata. Lasciare raffreddare sotto cappa.  
NOTA: l'aggiunta di acido cloridrico può essere evitata se il campione è stato prelevato in una zona dove è improbabile la presenza di carbonati.
3. Trasferire il contenuto del beaker o del provettone in un tubo da centrifuga, portare a volume con acqua distillata o demineralizzata e centrifugare a 1500 giri/min per 10 minuti. Decantare la sospensione, eliminare il surnatante in eccesso, risospendere il contenuto con acqua distillata o demineralizzata e ripetere la centrifugazione. Il processo di lavaggio dovrebbe essere ripetuto almeno 3 volte, o almeno fino a che siano state rimosse tutte le tracce di perossido di idrogeno. In alternativa è possibile effettuare la decantazione naturale del campione, avendo l'accortezza di lasciarlo sedimentare per un tempo adeguato (almeno una notte). Eliminare quindi il surnatante in eccesso, aggiungere una adeguata quantità di acqua distillata o demineralizzata, omogeneizzare e procedere con un nuovo ciclo di decantazione/lavaggio (mediamente sono necessari 3 cicli).
4. Una volta che tutte le tracce di perossido di idrogeno sono state rimosse, mescolare il contenuto di diatomee in una piccola quantità di acqua distillata o demineralizzata e trasferire in una fialetta pulita di piccola capacità. Aggiungere alcune gocce di etanolo, perossido di idrogeno o formalina tamponata per prevenire la crescita fungina. Il campione così preparato può essere conservato per un tempo illimitato.

In generale l'uso della centrifuga consente di velocizzare le operazioni di pulizia dei campioni (sia dal conservante, sia dai vari reagenti impiegati nei processi di ossidazione). Questa metodica, se effettuata con tempi e velocità non adeguate, potrebbe portare alla rottura dei frustuli delle specie di dimensioni maggiori. In generale se si utilizza la centrifuga è probabile ottenere un campione nel quale sarà più elevata la presenza di valve e non di frustuli interi, mentre con la decantazione naturale, più dolce, la presenza di frustuli interi è maggiore.

La sedimentazione naturale consente di conservare meglio i frustuli, soprattutto se di grandi dimensioni: se si sceglie di utilizzare questo sistema, dopo ogni lavaggio si deve lasciare decantare il campione per almeno 8 ore.

## **Metodo 2: perossido di idrogeno a freddo**

### *Attrezzatura e reagenti*

Come metodo 1, ma senza piastra riscaldante, bagno a sabbia o bagnomaria.

### *Metodo*

- 1 Seguire il metodo 1, ma non scaldare il beaker contenente il campione. Invece, lasciarlo, coperto da vetrino da orologio o simile, per almeno quattro giorni al sole o sotto una lampada UV per accelerare l'ossidazione. Aggiungere alcune gocce di acido cloridrico al fine di rimuovere i carbonati e lavare le pareti del beaker con acqua distillata o demineralizzata.
- 2 Trasferire poi il contenuto del beaker in un tubo da centrifuga e continuare con il Metodo 1 dal punto 4.
- 3 Se non si dovessero ottenere frustuli puliti, aggiungere perossido di idrogeno e lasciare agire per un altro giorno o utilizzare un altro metodo dopo il lavaggio.

NOTA. L'aggiunta di HCl può portare a reazioni esotermiche più o meno violente in base alla quantità di carbonati e materia inorganica (frustuli compresi) presente nel campione. Nel caso si formi abbondante schiuma e fenomeni di ebollizione prestare attenzione e aggiungere acqua distillata per attenuare la reazione. A reazione terminata il campione assumerà una colorazione giallo-verde.

### **Metodo 3: perossido di idrogeno a caldo con potassio dicromato**

#### *Reagenti*

Come Metodo 1, con in più aggiunta di cristalli di potassio dicromato (o potassio permanganato).

#### *Metodo*

1. Omogeneizzare il campione agitando e trasferire da 2 a 5 mL della sospensione concentrata in un beaker. Aggiungere 50 mL di perossido di idrogeno e scaldare sotto cappa su una piastra riscaldante a 90 °C fino a che tutto il materiale organico non sia stato ossidato (da 0,5 a 3 ore). I campioni possono bollire vigorosamente. È necessaria cautela nell'aggiunta di perossido di idrogeno freddo concentrato in materiale ricco di sostanza organica e piante acquatiche, così come durante il riscaldamento.
2. Rimuovere il beaker dalla piastra. Aggiungere la punta di una spatola di potassio dicromato ( $K_2Cr_2O_7$ ) in grani (ciò provoca normalmente effervescenza). Si dovrebbe ottenere, alla fine del processo, dopo alcuni minuti, una soluzione limpida blu-verde.
3. Se c'è ancora torbidità, aggiungere alcune gocce di acido cloridrico per rimuovere il perossido di idrogeno in eccesso e carbonati e lavare i bordi del beaker con acqua distillata o demineralizzata. Se sono presenti quantitativi più alti di carbonati, aggiungere 20 mL di acido cloridrico concentrato e scaldare dolcemente.
4. Quindi trasferire il contenuto del beaker in un tubo da centrifuga e continuare con il metodo 1.
5. Quando tutte le tracce di perossido di idrogeno ed acido cloridrico sono state rimosse, mescolare il contenuto di diatomee con una piccola quantità di acqua distillata o demineralizzata e trasferire in una fiala pulita di piccola capacità. Aggiungere alcune gocce di etanolo, perossido di idrogeno o formalina tamponata per prevenire la crescita fungina. Il campione può essere così conservato per un tempo illimitato.

## Metodo 4: acido a freddo e permanganato.

### Reagenti

- acido cloridrico (HCl) diluito (es. 1M);
- acido solforico concentrato (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>);
- potassio permanganato (KMnO<sub>4</sub>), in cristalli (circa 0,1 – 0,5 g per campione) o soluzione satura di potassio permanganato (1-2 mL per campione);
- acido ossalico saturo (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

Sciogliere circa 10 g di cristalli di acido ossalico in 100 mL di acqua distillata o demineralizzata riscaldando e agitando leggermente la soluzione. Lasciare raffreddare. Dovrebbero precipitare cristalli di acido ossalico. Se non precipitano aggiungere altro acido ossalico e ripetere le fasi di riscaldamento e raffreddamento.

### Metodo

1. Omogeneizzare il campione scuotendolo e trasferire da 5 a 10 mL della sospensione in un tubo da centrifuga.
2. Se è presente materiale calcareo (o si presume che vi sia) nel campione, questo dovrebbe essere rimosso prima. Aggiungere acido cloridrico diluito a gocce fino a che non si osserva più effervescenza, indice che il rilascio di CO<sub>2</sub> è terminato. NOTA: Questo passaggio può essere saltato se si ha la certezza che il campione non sia stato raccolto in un bacino con presenza di rocce calcaree.
3. Aggiungere acqua distillata o demineralizzata e centrifugare. Togliere il surnatante.
4. Aggiungere con cautela 5 mL di acido solforico concentrato.
5. Aggiungere circa 0,1 g di potassio permanganato solido (o alcune gocce di soluzione satura di potassio permanganato) e agitare dolcemente per far sciogliere i cristalli. La sospensione virerà al viola dopo questo passaggio. Se si utilizzano i cristalli di potassio permanganato, è importante che questi si siano sciolti completamente prima di procedere al passaggio successivo.
6. Aggiungere lentamente 10 mL di acido ossalico saturo al campione, che provocherà forte effervescenza. Il risultato finale dovrebbe essere una sospensione bianca di particelle (soprattutto valve di diatomee).
7. Aggiungere acqua distillata o demineralizzata e centrifugare. Circa 1500 giri/minuto per 5 minuti in una centrifuga da banco sono adatti ad assicurare che tutte le valve precipitino. Decantare ed eliminare il surnatante.
8. Aggiungere acqua distillata o demineralizzata e agitare. Ripetere il processo di centrifugazione almeno 3 volte per rimuovere tutte le tracce di acidità dalla sospensione. Il pH del surnatante può essere facilmente controllato con una cartina tornasole.
9. Quando il surnatante del campione ha raggiunto la neutralità, mescolare il contenuto di diatomee in un piccolo quantitativo di acqua distillata o demineralizzata e trasferire in una fiala pulita di ridotta capacità. Aggiungere alcune gocce di etanolo, perossido di idrogeno o formalina 4%, per prevenire la crescita fungina. Il campione può essere così conservato per un tempo illimitato.

# **2030.PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI DELLE MACROFITE DEI CORSI D'ACQUA GUADABILI**

## INDICE

<b>PREMESSA</b> .....	3
<b>INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE</b> .....	4
<b>2. RIFERIMENTI</b> .....	4
<b>3. TERMINI E DEFINIZIONI</b> .....	4
<b>4. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURA</b> .....	5
4.1 Materiale da campo necessario [11, 13, 24, 28].....	5
4.2 Materiale da campo utile [11, 13, 24, 28].....	5
4.3 Materiale da laboratorio [11, 13, 24, 28].....	6
<b>5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO</b> .....	6
5.1 Periodo di campionamento e condizioni ambientali.....	6
5.2 Caratteristiche e scelta della stazione.....	7
5.3 Obiettivo del campionamento.....	9
5.4 Rilievo stazionario e parametri di supporto.....	9
5.5 Scheda di rilevamento [11, 28].....	10
5.6 Prelievo e trasporto dei campioni.....	10
5.7 Attribuzione delle percentuali di copertura in campo [11, 13, 24, 28].....	11
5.8 Valutazione dell'abbondanza dei taxa a scarsa copertura in stazioni caratterizzate da elevata copertura della comunità macrofita [28].....	13
5.9 Il campionamento e l'attribuzione delle percentuali di copertura alla componente algale [13, 28].....	14
5.10 Cenosi caratterizzate da pluristratificazione e compenetrazione[28].....	14
5.11 Campionamenti in torrenti montani con comunità a prevalenza di briofite [28].....	15
<b>6. PROCEDURE ANALITICHE</b> .....	16
6.1 Trattamento e conservazione dei campioni in laboratorio.....	16
6.2 Procedimento di fissazione.....	17
6.3 Identificazione.....	17
6.4 Attribuzione delle percentuali di copertura reale ai singoli taxa [11,13,28].....	18
6.5 Preparazione dei vetrini degli agglomerati algali e attribuzione delle percentuali di copertura reali ai taxa algali [11, 13, 24, 28].....	19
<b>7. ESPRESSIONE DEI RISULTATI</b> .....	19
<b>8. ARCHIVIAZIONE DEI CAMPIONI</b> .....	19
<b>9. SICUREZZA</b> .....	19
<b>10. ASSICURAZIONE DI QUALITÀ</b> .....	20
10.1 Qualifica degli operatori.....	20
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	21
<b>ALLEGATO A</b> .....	26

## **PREMESSA**

Le macrofite dei corsi d'acqua sono state inserite dalla Direttiva Europea 2000/60/CE "Acque" [1] tra gli elementi biologici di qualità ambientale di cui è richiesta l'analisi per la valutazione dello stato ecologico dei corpi idrici fluviali. La Direttiva "Acque" ha così recepito quanto la ricerca, a livello europeo, aveva dimostrato nel corso degli ultimi decenni dello scorso secolo, riconoscendo alle macrofite non solo il ruolo di componente ecologica fondamentale degli ecosistemi acquatici, ma anche la loro rilevanza come comunità bioindicatrice per la valutazione a livello ecosistemico dei sistemi acquatici stessi [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8].

In Italia, già nell'ultimo decennio del secolo scorso sono state compiute ricerche e sperimentazioni che da un lato avevano dimostrato la rilevanza ecosistemica della comunità, dall'altro avevano consentito di evidenziare ambiti e modalità di applicazione di diversi indici macrofitici proposti a livello europeo [9, 10, 11]. . La conduzione di tali attività di sperimentazione si è dimostrata di utilità strategica nel facilitare il processo di adeguamento dell'Italia agli obblighi imposti dalla normativa europea, quando il recepimento della Direttiva con l'emanazione del D. Lgs. 152 del 2006 e dei successivi decreti attuativi ha introdotto l'obbligo di utilizzare anche le macrofite acquatiche nelle attività di monitoraggio finalizzate alla classificazione dei corsi d'acqua.

Le modalità di rilievo e campionamento descritte in questo protocollo sono il frutto sia dell'esperienza maturata da ENEA a partire dagli ultimi due decenni del secolo scorso sia delle esperienze condotte dalle Agenzie Regionali per l'Ambiente di varie Regioni italiane nel corso degli ultimi 5 anni [10, 11, 12, 13, 14,15, 16, 17].

Le modalità di campionamento descritte in questo protocollo sono riferite ai corsi d'acqua guadabili e sono proposte come testo di riferimento per il rilievo ed il campionamento per il monitoraggio e la classificazione dei corsi d'acqua ai sensi della D. Lgs. 152/06 e successivi decreti attuativi [18, 19, 20, 21, 22]. .

## INTRODUZIONE

Le macrofite acquatiche sono un gruppo definito su base ecologico-funzionale e comprendono i vegetali macroscopicamente visibili presenti negli ambienti acquatici, palustri e di greto che caratterizzano gli ambiti fluviali; la comunità oggetto di questo protocollo costituisce una delle componenti del comparto vegetale degli ecosistemi acquatici [3, 4, 5, 7, 8, 11, 23].

Questo raggruppamento è composto da angiosperme erbacee, pteridofite, briofite e da alghe filamentose o comunque formanti aggregati macroscopicamente visibili. In relazione all'importanza del ruolo ecologico da essa svolto, la comunità macrofita rappresenta un potente indicatore ecosistemico capace di rilevare le alterazioni derivanti dalle pressioni antropiche agenti sugli ecosistemi fluviali [3,4, 6, 7, 8, 9, 17, 23, 24, 25, 26, 27].

Sulla base dell'ecologia delle specie (igrofilia, preferenze in termini di granulometria del substrato, tolleranza alla sommersione, ecc.) è possibile distinguere le macrofite in gruppi ecologico-funzionali [4, 8, 17, 23, 24, 28]. Nello specifico si possono individuare i seguenti gruppi ecologico-funzionali:

- Idrofite: sono le macrofite che vivono sempre totalmente in acqua: sia completamente sommerse sia flottanti sulla superficie dell'acqua;
- Anfifite: sono le macrofite che pur potendo vivere completamente immerse possono colonizzare substrati soggetti a periodica emersione; presentano spesso importante dimorfismo in funzione della profondità dell'acqua presente nel sito colonizzato;
- Elofite: sono macrofite caratterizzate dall'essere radicate ad un substrato anche solo periodicamente sommerso; sono quindi piante in cui la maggior parte del corpo vegetativo è, in genere, fuori dall'acqua.

## 1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo documento definisce le modalità per il campionamento e il rilievo della comunità macrofita attraverso la valutazione della composizione e dell'abbondanza, in linea con le richieste della Direttiva 2000/60/CE e del D. Lgs. 152/06 e successivi decreti attuativi ai fini del monitoraggio e della valutazione dello Stato Ecologico dei Corpi Idrici utilizzando tali organismi come elementi di qualità biologica [18, 19, 20, 21, 22]. Obiettivo delle procedure descritte nel protocollo è definire un metodo standard per il rilievo ed il campionamento della comunità macrofita nei corsi d'acqua guadabili a carattere naturale o artificiale.

La metodologia descritta può comunque essere utilizzata come base per attuare un rilievo con finalità diverse dalla classificazione dello Stato Ecologico e per altre applicazioni di studio e/o ricerca.

## 2. RIFERIMENTI

UNI EN 14184:2004. Qualità dell'acqua - Linee guida per la valutazione delle macrofite acquatiche nelle acque correnti.

UNI EN 14996:2006. Qualità dell'acqua – Linea guida per assicurare la qualità delle valutazioni biologiche ed ecologiche nell'ambiente acquatico.

## 3. TERMINI E DEFINIZIONI

**Comunità campionata:** insieme di organismi rinvenuti in una data stazione in una specifica data. Una comunità campionata è associata ad un campionamento e ad essa corrisponde il campione globale della stazione; quest'ultimo corrisponde, a sua volta, ad una lista floristica, costituita dall'elenco dei taxa rinvenuti e dalla relativa percentuale di copertura reale.

**Campione:** singoli organismi, parte di essi o agglomerati di taxa (nel caso di alghe) raccolti durante il campionamento.

**Guadabile:** ai sensi di questo protocollo è da ritenersi guadabile un corpo idrico o un tratto rappresentativo di esso ove sia possibile accedere a piedi ed in sicurezza ad ampie porzioni di alveo in modo tale da consentire la raccolta ed il rilievo della comunità macrofittica; tale caratteristica, deve essere propria del corpo idrico o del tratto in tutte le stagioni dell'anno nelle quali è previsto il campionamento (condizioni idrologiche di magra e magra-morbida).

Si precisa che si possono considerare guadabili quei corpi idrici in cui sono rinvenibili stazioni rappresentative nell'ambito di tratti in cui l'alveo risulti accessibile per almeno i 2/3 dell'ampiezza (1/2 per corsi d'acqua appartenenti ai tipi fluviali "Grandi"), con possibilità di accesso da entrambe le sponde [19,20, 21, 22, 28].

**Non guadabile:** ai sensi di questo protocollo è da ritenersi non guadabile un corpo idrico o un tratto rappresentativo di esso nel quale non è possibile accedere a piedi ed in sicurezza, ad ampie porzioni di alveo, tanto da non consentire il campionamento e la stima della copertura della comunità [19,20, 21, 22, 28].

**Corridoio fluviale:** porzione di territorio direttamente influenzato dal punto di vista idrologico dalla presenza delle acque del corso d'acqua almeno durante le piene e/o dall'interazione con le acque di falda. Il corridoio fluviale comprende l'alveo attivo e la piana inondabile [11, 14, 15, 17, 28].

**Zona sopracquatica:** porzione dell'alveo attivo coperta dall'acqua solo in condizioni idrologiche di morbida e caratterizzata da substrato a granulometria fine. Le caratteristiche granulometriche unitamente alle condizioni idrologiche e climatiche determinano il permanere di un substrato intriso anche per lungo tempo dopo una morbida [11, 14, 15, 17, 23, 24, 28].

**Macrofite acquatiche:** organismi vegetali acquatici formanti aggregati macroscopicamente visibili riferibili a fanerogame, pteridofite, briofite, alghe; tra gli organismi presi in considerazione nell'ambito delle macrofite vi sono anche alcuni licheni, funghi acquatici e batteri eterotrofi filamentosi.

La gran parte degli indici macrofittici, tra le alghe formanti aggregati macroscopicamente visibili, prende prevalentemente in considerazione quelle filamentose e quelle organizzate in strutture complesse (quali ad es. i generi *Hydrurus*, *Lemanea* o *Chara*) [3, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 24, 28].

## 4. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURA

### 4.1 Materiale da campo necessario [11, 13, 24, 28]

- schede di campo e cartellina rigida;
- schede di riferimento stazionale per la localizzazione ed il raggiungimento della stazione;
- stivali da campo alti sino alla coscia;
- salopette di gomma o neoprene;
- guanti di gomma spessa o neoprene lunghi sino all'ascella;
- buste di plastica trasparente di varie dimensioni;
- barattoli da 50/100 cc. con tappo e controtappo (contenitori per alghe e organismi vegetali molto piccoli appartenenti ad altri gruppi);
- borsa frigo per campioni con pani refrigeranti;
- lenti di ingrandimento da campo;
- GPS;
- macchina fotografica;
- rastrello;
- etichette di carta autoadesive;
- matita e pennarello con inchiostro indelebile;
- binocolo;
- strumentazione portatile per la misurazione di temperatura, ossigeno disciolto, pH, conducibilità.

### 4.2 Materiale da campo utile [11, 13, 24, 28]

- mappe e foto aeree del sito di campionamento;
- telemetro;
- rotella metrica o corda metrata;

- paletta da giardinaggio;
- pinzette;
- secchio;
- vaschette in plastica bianche.

### **4.3 Materiale da laboratorio [11, 13, 24, 28]**

#### Conservazione dei campioni

- fogli di giornale;
- graticci per essiccazione;
- sacchetti di carta (tipo carta da pane);
- formalina;
- siringa o pipetta;
- cappa aspirante.

#### Determinazione dei *taxa*

- stereoscopio;
- microscopio ottico;
- vetrini e copri vetrini;
- lenti da orologio;
- pipette;
- vaschette;
- piastre Petri;
- pinzette;
- lamette;
- bisturi;
- aghi montati;
- eventuali coloranti, quali lugol, per facilitare il riconoscimento delle strutture cellulari;
- testi per l'identificazione degli organismi (Chiavi di determinazione, Guide, Atlanti).

## **5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO**

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

Il campionamento deve essere effettuato in corrispondenza del massimo sviluppo della vegetazione acquatica, in un periodo compreso tra la tarda primavera e l'inizio della stagione autunnale, indicativamente da aprile a ottobre, in funzione delle differenze climatiche locali e del regime idrologico dei corsi d'acqua indagati.

Le comunità macrofittiche possono costituire cenosi significativamente diverse nel corso di una stessa stagione vegetativa in funzione degli andamenti fenologici e dei tassi di accrescimento stagionali; per garantire la rappresentatività del rilievo il campionamento va essere effettuato 2 volte durante la stagione vegetativa; in linea di massima, il primo campionamento dovrebbe essere realizzato tra aprile e giugno e il secondo tra luglio e ottobre e comunque devono trascorrere almeno 7 settimane tra i due campionamenti.

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

A tale proposito, a titolo di esempio, si ricorda che molti corsi d'acqua delle idroecoregioni dell'area geografica mediterranea, anche in ambito montano, possono essere soggetti, a partire dalla tarda primavera, ad un calo delle portate ed un contemporaneo aumento della temperatura, con effetti significativi sulla

struttura delle comunità; successivamente il ristabilirsi di condizioni idrologiche e termiche ottimali per lo sviluppo della comunità potrebbe realizzarsi solo ad autunno avviato.

Nei corpi idrici di origine glaciale occorre attendere che la vegetazione possa colonizzare i corsi d'acqua dopo la fine delle piene di scioglimento dei ghiacci dell'inizio estate per procedere al campionamento [14, 23, 28].

Il campionamento deve essere effettuato nel periodo compreso tra una morbida e una magra o in magra. Il campionamento in magra, però, può essere effettuato solo se quest'ultima non determina condizioni idrologiche stazionali di prevalenza del carattere lentico determinanti la sola presenza di una o più pozze isolate nell'alveo. Tali condizioni altererebbero la rappresentatività del campionamento stesso.

Il campionamento deve, inoltre, essere realizzato a distanza di diversi giorni (una settimana) da una morbida, se abbondante o sostenuta e di diversi giorni da una piena (2-3 settimane). Rispettando tali tempistiche si ha la garanzia che la comunità sia strutturalmente integra e, nel contempo, che il livello dell'acqua sia ragionevolmente basso e che la torbidità si sia ridotta consentendo un'adeguata visibilità nel tratto da indagare [11, 13, 28].

Nei corsi d'acqua intermittenti il primo campionamento deve essere eseguito prima del periodo di asciutta e comunque prima che l'avvicinarsi dell'asciutta comprometta in maniera rilevante l'integrità della comunità acquatica; il secondo campionamento deve essere eseguito a distanza di almeno 2-3 settimane dal termine dell'asciutta.

Per i corsi d'acqua episodici ed effimeri le modalità di campionamento descritte in questo protocollo possono essere limitative.

## 5.2 Caratteristiche e scelta della stazione

Il tratto deve essere rappresentativo, in termini di caratteristiche ambientali e di pressioni, del corpo idrico e non deve risentire di alterazioni molto localizzate.

La stazione scelta per il rilievo delle macrofite, indipendentemente dallo scopo del campionamento, deve presentare alcune caratteristiche ineludibili di seguito elencate:

- la stazione deve avere uno sviluppo longitudinale di almeno 100 m e nel caso di corsi d'acqua di ampiezza maggiore di 50 m la stazione deve essere estesa per almeno il doppio dell'ampiezza del corso d'acqua. Ad esempio in un corso d'acqua ampio 80 m la stazione si deve estendere per 160 m;
- nel caso di presenza di una comunità caratterizzata da scarsa copertura o da distribuzione particolarmente disomogenea, si deve incrementare l'estensione della stazione di circa 1/3 rispetto all'estensione longitudinale prevista;
- la comunità macrofita deve presentare una copertura non inferiore al 5 %, rispetto all'estensione dell'alveo bagnato, nell'ambito della stazione.

Qualora si rilevino stazioni nelle quali non è possibile campionare l'intero alveo bagnato, pur all'interno di tratti considerati comunque guadabili ai sensi della definizione riportata al paragrafo 4, la valutazione della soglia di copertura della comunità macrofita va valutata rispetto alla sola superficie campionata e non all'intera estensione dell'alveo bagnato [28].

Per garantire la rappresentatività della stazione, la stazione stessa deve comprendere, per quanto possibile, tutte le facies idrologiche e biologiche presenti nel tratto stesso, comprese le porzioni lentiche del corso d'acqua [13, 24, 28]. Inoltre, l'estensione delle facies nella stazione deve essere proporzionale allo sviluppo delle stesse facies a scala di corpo idrico. Tutte le facies presenti, per essere oggetto di rilievo, devono essere comprese all'interno di mesohabitat che, almeno in condizioni di morbida, siano in continuità di flusso con il canale principale del corso d'acqua. La conoscenza delle caratteristiche del territorio oggetto del monitoraggio e di quelle stazionali in particolare, unitamente all'esame della vegetazione presente, consentono di individuare quali sono i mesohabitat posti in continuità di flusso, almeno in condizioni di morbida, con il canale principale. Le caratteristiche e la composizione delle cenosi presenti possono aiutare ad individuare, anche in condizioni idrologiche di magra, quali siano i mesohabitat posti in continuità di flusso in morbida.

Altrimenti, qualora si ritenga di non poter individuare con chiarezza, al momento del campionamento, quali siano i mesohabitat posti in tali condizioni di continuità idrologica con il canale principale in morbida, è opportuno non effettuare il campionamento nei mesohabitat dubbi in condizioni idrologiche di magra e limitarsi al rilievo dei mesohabitat in continuità di flusso al momento del rilievo.

Nel caso in cui il campionamento comporti il rilievo di porzioni acquatiche poste in discontinuità spaziale (ad esempio canale principale e ramo secondario) e/o in discontinuità spaziale ed idrologica la momento del rilievo (ad esempio canale principale e porzioni temporaneamente lentiche) è consigliabile effettuare rilievi separati per una più efficace attribuzione della percentuali di coperture; le diverse cenosi rilevate devono contribuire alla caratterizzazione della stazione proporzionalmente rispetto alla rappresentatività spaziale delle porzioni acquatiche in cui si insediano. Si ricorda che la scelta della stazione, dovendo rispondere a criteri di rappresentatività rispetto al corpo idrico, conduce comunque a rilevare stazioni in cui le porzioni acquatiche presenti sono proporzionalmente rappresentative rispetto al complesso del corpo idrico considerato.

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

Per l'individuazione della stazione di campionamento bisogna effettuare un esame preliminare della cartografia e di immagini (satellitari ed aeree); tali fonti unitamente ad altre informazioni, consentono di individuare una prima selezione di siti potenzialmente idonei; successivamente, anche sulla scorta di informazioni logistiche, derivanti anch'esse dall'esame della cartografia e dalle immagini, è opportuno effettuare a piedi un'ispezione dei tratti fluviale ritenuti idonei, allo scopo di verificare sia la congruità della stazione per le finalità prefissate, sia l'accessibilità della stessa in condizioni di sicurezza.

La presenza delle macrofite acquatiche lungo i corsi d'acqua è comune, anche se la banalizzazione della morfologia dei corsi d'acqua ne condiziona fortemente la diffusione e la consistenza delle comunità. E' tuttavia importante ricordare che la comunità macrofittica è diffusa ma non ubiquitaria nei corsi d'acqua e che, quindi, la stazione idonea, all'interno del corpo idrico indagato, deve essere cercata attivamente e può non coincidere con quella individuata per macroinvertebrati e/o diatomee [28].

Le stazioni con comunità caratterizzata da idonea copertura si individuano, nella maggior parte delle tipologie fluviali, con accurate osservazioni anche in acqua nei siti potenzialmente utili, non essendo sufficiente una sommaria valutazione effettuata dalle sponde.

E' bene ricordare che in numerose tipologie fluviali la comunità macrofittica può essere caratterizzata naturalmente da livelli di copertura anche piuttosto contenuti (10-15%). Solo in alcune tipologie fluviali la comunità macrofittica può risultare con coperture < 5% o del tutto assente per ragioni naturali. Altre volte la comunità è assente in risposta ad una o più pressioni antropiche. L'assenza della comunità (o la presenza con coperture < 5%) deve essere registrata come dato anche se non viene effettuato il rilievo/campionamento della comunità stessa. A tali conclusioni si può giungere, però, solo dopo aver compiuto un'accurata ricerca della stazione idonea all'interno del corpo idrico [11, 15, 28].

Nel caso di campionamenti finalizzati all'applicazione del D. Lgs. 152/06 e s.d.a., risulta fondamentale, in termini di scelta della stazione, l'individuazione di stazioni rappresentative in relazione alle caratteristiche del corpo idrico oggetto di monitoraggio, sia in termini di caratteristiche ambientali (quali livello di confinamento, substrato, ombreggiamento, presenza di vegetazione riparia, tipologie di flusso) sia di pressioni antropiche (quali presenza di manufatti, uso del territorio). E' da ritenere comunque prioritaria la presenza di una comunità bioindicatrice in grado di fornire informazioni robuste.

In pratica, occorre individuare, all'interno del tratto fluviale da indagare, rappresentativo dell'intero corpo idrico, le porzioni morfologicamente più diversificate e a buona naturalità in cui, in genere, si insedia una comunità macrofittica con maggior potere bioindicatore.

Si ricorda che le macrofite si insediano nelle porzioni che, alla scala delle caratteristiche idrologiche del corso d'acqua esaminato, presentano substrati caratterizzati da relativa stabilità rispetto all'energia del dinamismo fluviale in quel tratto [23, 28].

### 5.3 Obiettivo del campionamento

Obiettivo del campionamento è acquisire informazioni esaustive in merito a composizione ed abbondanza della comunità macrofittica presente nella stazione, anche se i dati definitivi si otterranno solo dopo le attività di identificazione in laboratorio.

Nell'ambito della stazione, il campionamento comporta:

- il rilievo di tutti i taxa macrofittici presenti;

- la raccolta di campioni dei taxa presenti;
- la valutazione della copertura complessiva della comunità a macrofite presente in acqua, in termini di copertura percentuale della comunità rispetto alla superficie totale dell'alveo bagnato nella stazione;
- la valutazione della copertura dei singoli taxa presenti in rapporto alla totalità della comunità macrofittica presente.

La comunità macrofittica che deve essere presa in considerazione è quella acquatica, ovvero quella costituita dagli organismi insediati in ambiti stabilmente sommersi, nell'ambito della stazione di campionamento.

## 5.4 Rilievo stazionario e parametri di supporto

Le osservazioni compiute durante il rilievo devono contribuire, unitamente all'analisi territoriale effettuata in fase di pianificazione delle attività di monitoraggio, ad un'efficace caratterizzazione del territorio e sono fondamentali per una corretta interpretazione dei risultati ottenuti; in corrispondenza della stazione è prevista la compilazione della Scheda di Rilevamento (Allegato).

Il campionamento deve essere compiuto almeno da due operatori qualificati.

Deve essere determinata l'esatta localizzazione geografica della stazione attraverso l'uso del GPS.

E' opportuno scattare foto della stazione e di aspetti particolari ritenuti importanti.

Sulla scheda vanno annotati i valori relativi ad alcuni parametri fisico-chimici fortemente condizionanti la distribuzione e la composizione delle comunità macrofittiche, tra questi: temperatura, conducibilità, ossigeno disciolto.

Sono di interesse anche i dati relativi alla concentrazione di nutrienti (quali nitrati, sali di ammonio, fosfati); per il rilievo di questi parametri devono essere, eventualmente, prelevati campioni d'acqua al momento del rilievo.

Qualora nella stagione di campionamento sia già in corso un programma di monitoraggio di qualità fisico-chimica dell'acqua, i dati relativi ai parametri chimico-fisici possono essere derivati da quelli reperiti durante le attività di monitoraggio di natura fisico-chimica.

La comunità macrofittica che deve essere presa in considerazione è quella acquatica, ovvero quella costituita dagli organismi insediati in ambiti stabilmente sommersi. La comunità insediata nella zona sopracquatica non è oggetto di campionamento ma solo di osservazione speditiva nell'ambito della rilevazione delle caratteristiche ambientali stazionali.

L'ampiezza dell'alveo bagnato non è continuamente stabile negli intervalli temporali in cui sussistono le condizioni idrologiche in cui è corretto effettuare il rilievo (in magra-morbida e in magra) ed alcune piccole porzioni di comunità possono risultare emerse o sommerse a seconda della fase idrologica. In linea generale la stessa fisionomia della vegetazione dà indicazioni su quale debba essere l'ambito spaziale corretto in cui effettuare il rilievo: la presenza esclusiva o, quantomeno, dominante di anfifite ed elofite rispetto a specie tipiche delle aree circostanti non acquatiche consente di delimitare agevolmente la corretta area del rilievo.

L'operatore esperto potrà, quindi, avere utili indicazioni dalla stessa comunità vegetale circa il corretto ambito spaziale in cui effettuare il rilievo. Altrimenti è comunque possibile identificare la comunità macrofittica da campionare come quella costituita dagli organismi che si trovano con almeno la porzione basale immersa in acqua al momento del rilievo.

Nel caso in cui si stia campionando in morbida-magra occorre porre attenzione a non campionare l'ecotono posto al limite esterno della comunità acquatica. Al fine di verificare la correttezza del campionamento effettuato, è comunque consigliabile verificare a posteriori la presenza e la quota di specie a scarsa o nulla acquaticità campionate; in tal senso è possibile utilizzare gli stessi testi di determinazione per verificare l'ecologia delle specie ed esaminare l'elenco dei taxa macrofittici ricorrenti. In un campionamento corretto le specie non igrofile non possono superare la soglia del 10% di copertura reale; qualora tale soglia sia stata superata il campionamento non può essere considerato totalmente affidabile.

Per l'osservazione e la raccolta si deve percorrere a zig zag, nel senso della corrente (ove possibile), l'intero sviluppo della stazione rilevando e annotando la presenza di tutti i taxa presenti nella stazione sulla Scheda di Rilevamento ed effettuandone, nel contempo, la raccolta [11, 13, 24, 28].

Si deve avere cura di raccogliere campioni il più possibile completi di parti vegetative e riproduttive per consentire, successivamente, una corretta determinazione.

Nelle stazioni o nelle porzioni di stazione in cui l'altezza dell'acqua supera i 40 cm circa per la raccolta si consiglia l'uso del rastrello.

In molti casi non è possibile effettuare una corretta determinazione dei taxa in campo; ciò che è importante, però, è la corretta individuazione della presenza di organismi distinti, che possa condurre ad un efficace riconoscimento in laboratorio. Tutti i taxa non determinati in campo dovranno essere annotati descrivendone

le caratteristiche peculiari che ne consentano a posteriori la distinzione rispetto agli altri. La stessa determinazione in campo, nella quasi totalità dei casi, deve essere confermata da un controllo in laboratorio.

Nel caso non sia possibile rinvenire al momento del rilievo campioni comprendenti tutte le parti necessarie per l'identificazione, si deve programmare un successivo sopralluogo in cui si provvederà alla raccolta solo di campioni per quei taxa che al momento del rilievo erano risultati privi di alcune parti determinanti per l'identificazione.

Per quegli organismi per i quali non è possibile un'identificazione di taxa distinti in campo, quali gli aggregati algali macroscopicamente omogenei (si veda a tale proposito lo specifico paragrafo 7.5 di approfondimento), una corretta raccolta deve prevedere il prelievo, in più punti della stazione, di alcuni sub-campioni (>4) rappresentativi dell'aggregato stesso; l'obiettivo è quello di giungere ad ottenere un campione finale rappresentativo per quell'aggregato [11, 13, 28].

Completato il primo percorso di rilievo nella stazione nel senso della corrente si deve ripercorre la stazione in direzione opposta, controcorrente (ove possibile) e si effettua una seconda osservazione, stavolta più speditiva, della comunità con la duplice finalità di effettuare un controllo del rilievo e di stimare in maniera integrata le coperture dei singoli taxa di cui si è individuata la presenza.

Nel caso di corsi d'acqua caratterizzati da substrato a granulometria molto fine, in cui la sola presenza di un operatore in movimento induce livelli di torbidità molto elevata è bene effettuare due passaggi entrambi controcorrente, uscendo dalla stazione tra un percorso e l'altro ed aspettando che la torbidità si riduca.

Per quanto riguarda il campionamento in corpi idrici le cui acque appaiono caratterizzate da torbidità propria e non indotta dalle attività dell'operatore durante il campionamento stesso si deve valutare se si sta campionando nel periodo corretto dal punto di vista idrologico, se si è in presenza di un evento derivante da una pressione antropica in atto o se si tratta di un corso d'acqua caratterizzato da peculiare e fisiologica torbidità.

Se si comprende che si sta effettuando il campionamento in un periodo non corretto occorre rimandare la sua esecuzione; qualora, invece, ci si trovi a campionare un corso d'acqua "stabilmente" torbido occorre effettuare un campionamento randomizzato della comunità cercando di sondare tutti le facies e i mesohabitat presenti, in maniera analoga a quanto previsto per i corsi d'acqua non guadabili.

Da ultimo, ricordare che al fine di non compromettere l'integrità della comunità oggetto del rilievo e, soprattutto nel caso si trovi in presenza di specie che si ipotizzano rare, è raccomandabile raccogliere solo il materiale strettamente necessario per l'identificazione dei taxa presenti.

## **5.5 Scheda di rilevamento [11, 28]**

Tutte le informazioni utili relative al campionamento ed alla stazione di campionamento devono essere annotate su un'apposita scheda; in Allegato è riportato un esempio di "Scheda di Rilevamento". Nella Scheda si fa riferimento a tutte le caratteristiche che devono essere rilevate per poter effettuare non solo una corretta valutazione della comunità presente ma anche un'efficace caratterizzazione del corridoio fluviale nella stazione; è prevista anche la registrazione di caratteristiche del territorio circostante il corridoio fluviale.

Una speditiva caratterizzazione del corridoio fluviale e del territorio circostante alla scala della stazione consente, tra l'altro, di poter mettere in relazione la comunità rilevata con le caratteristiche stazionali anche per una corretta valutazione delle pressioni che interessano la comunità stessa.

La compilazione della Scheda di Rilevamento consente, infatti, di annotare sia informazioni di caratterizzazione, riferite alle diverse componenti dell'ecosistema, sia informazioni riferite alle pressioni agenti a scala stazionale.

La compilazione della Scheda prevede, inoltre, la realizzazione di un disegno schematico della sezione trasversale e di un disegno in pianta della stazione.

Le schede compilate, soprattutto per quel che riguarda il rilievo della comunità macrofita, contengono quanto osservato dai rilevatori direttamente in campo. Nelle successive fasi di identificazione dei campioni ed elaborazione dei dati è opportuno custodire l'integrità della scheda di campo senza effettuare cancellazioni e correzioni e utilizzare altri supporti per riportare ed elaborare i dati.

## 5.6 Prelievo e trasporto dei campioni

I campioni di fanerogame, felci e della maggioranza delle briofite vanno custoditi in sacchetti di plastica. Solitamente, il materiale campionato in una stazione può essere riposto in un solo sacchetto. E' ovviamente possibile, qualora si ritenga utile, separare alcuni organismi o tutti gli organismi campionati in sacchetti diversi; tale procedura, pur onerosa in termini di tempo, può essere molto utile soprattutto qualora la comunità sia prevalentemente costituita da organismi non noti agli operatori oppure nel caso di organismi a particolare fragilità (come nel caso di piante con fiori facilmente deperibili o piccole briofite).

Dentro i sacchetti va comunque posta un'etichetta, scritta a matita, con l'indicazione della stazione, data ed eventuali note utili all'identificazione.

I campioni di alghe vanno posti all'interno di barattoli di plastica chiusi con controtappo e riempiti con acqua di raccolta; è consigliabile riporre in modo analogo anche piccole fanerogame (ad es. *Lemna* sp.) e alcuni piccoli muschi ed epatiche.

I barattoli devono essere pieni d'acqua di raccolta e non devono essere riempiti per più della metà in biomassa vegetale.

I barattoli devono essere dotati di etichette sulle quali devono essere riportati i dati relativi alla stazione di rilevamento, il nome identificativo del campione che ne assicuri la corrispondenza con quanto riportato nella Scheda, la data ed eventuali notazioni utili per facilitare il riconoscimento dei campioni durante la determinazione.

Ultimato il rilevamento, le macrofite raccolte nei sacchetti e nei barattoli devono essere riposte in una borsa frigo per evitare che si degradino durante il trasporto in laboratorio, dove verranno opportunamente conservate.

## 5.7 Attribuzione delle percentuali di copertura in campo [11, 13, 24, 28].

L'attribuzione delle percentuali di copertura è una fase importante del rilievo, fondamentale per la successiva trattazione dei dati.

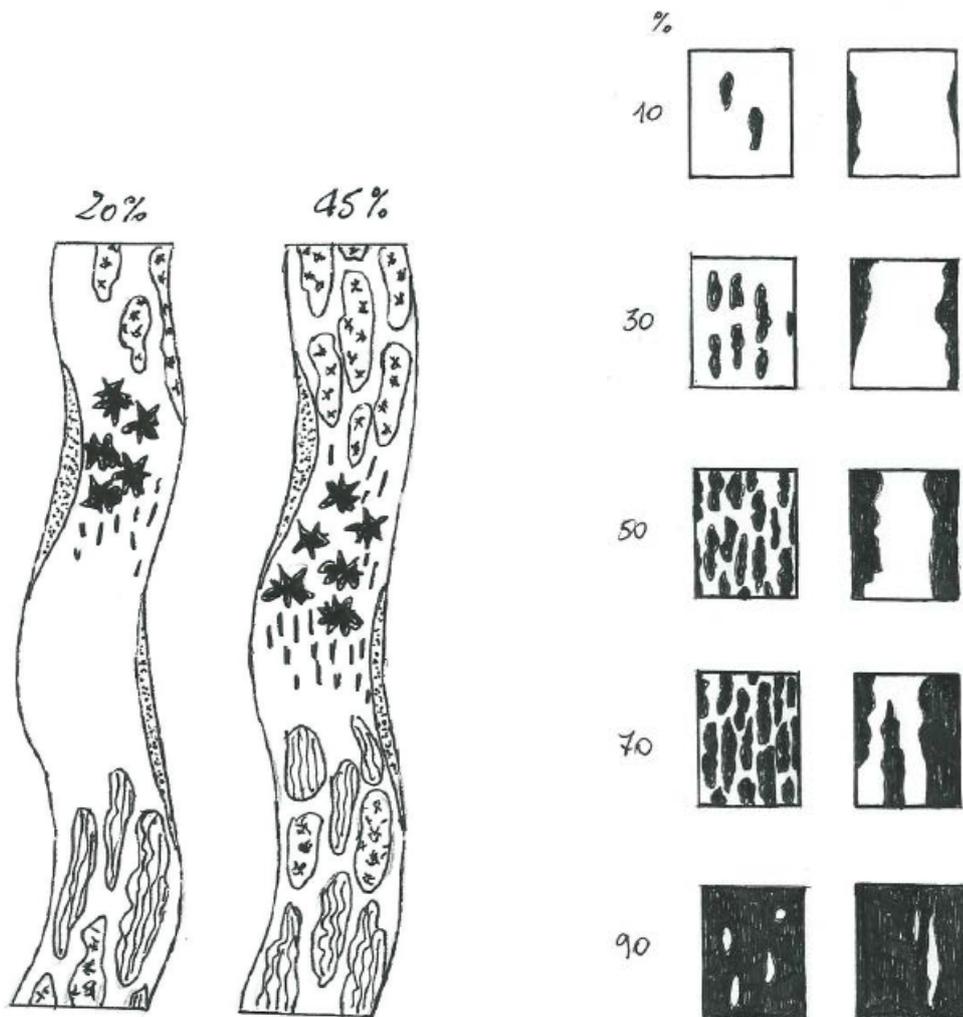
Le valutazioni di copertura devono essere effettuate, ovunque sia possibile, attraverso un esame visuale. Devono essere rilevate la copertura totale della comunità macrofita nell'ambito della stazione in esame e le coperture percentuali dei diversi taxa presenti rispetto al totale rappresentato dalla comunità macrofita che colonizza la stazione.

I valori di copertura si esprimono secondo una scala che va da 5% a 100% secondo valori che coincidono comunque con numeri interi multipli di cinque.

Il dato della copertura totale della comunità va espresso in termini di copertura percentuale della comunità macrofita rispetto alla superficie dell'alveo bagnato nella stazione oggetto del rilievo (Fig. 1).

La valutazione delle coperture dei diversi taxa presenti va rapportata anch'essa a 100, che rappresenta la totalità della comunità macrofita rinvenuta. Ovvero, per ciascun *taxon* si deve esprimere la percentuale di copertura rispetto ad un totale (100%) rappresentato dalla copertura dell'intera comunità macrofita presente in quella stazione.

E' importante comprendere che anche se la copertura dell'intera comunità macrofita fosse comunque molto limitata (ad esempio 5%) la somma delle coperture percentuali dei singoli taxa che compongono tale comunità deve, comunque, ammontare a 100.



**Figura 1.** Schemi per la valutazione della copertura della comunità macrofitica a scala stazionale (da AFNOR, 2007 modificato).

L'attribuzione dei valori di copertura dei singoli *taxa* deve essere espressa anch'essa in una scala che va da 5% a 100% secondo valori che coincidono comunque con numeri interi multipli di cinque.

Una modalità pratica che facilita tale valutazione può essere, ad esempio, quella di individuare innanzitutto i *taxa* (o il taxon) più abbondanti, a cui si assegneranno valori di copertura elevati (>20). Successivamente si individueranno i *taxa* ancora significativamente presenti ma con valori di copertura via via minori (15-5). Ai *taxa* caratterizzati da presenza solo puntuale sarà attribuito un indice di copertura "+", analogamente a quanto previsto nel rilievo fitosociologico.

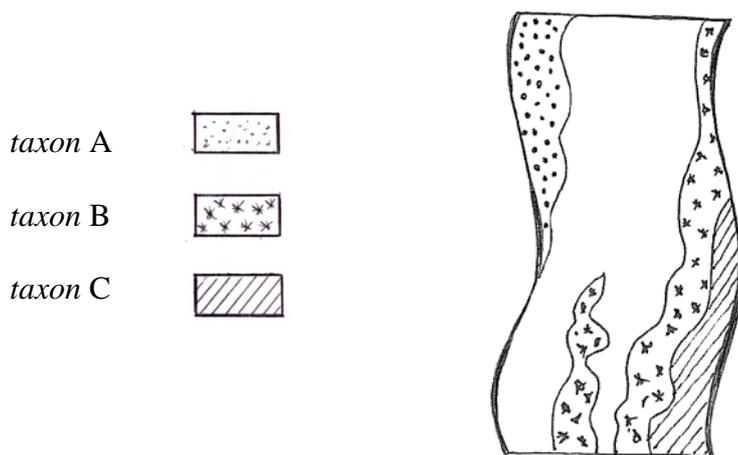
In casi particolari (come descritto nell'apposito paragrafo di approfondimento 6.9) è possibile attribuire a singoli *taxa* un valore di copertura ++.

La somma dei valori di copertura attribuiti ai diversi *taxa* deve, alla fine, ammontare a 100%. L'indice di copertura + (o ++) non contribuisce alla somma complessiva.

È importante che il processo di attribuzione delle coperture comporti una serie di osservazioni reiterate, con conseguente correzione e riverifica delle valutazioni complessive sulle coperture dei vari *taxa* (controllando sempre che la somma delle coperture sia comunque 100%); quanto più le stazioni sono caratterizzate da buona diversità floristica tanto più sarà importante porre particolare attenzione nell'attribuzione delle percentuali di copertura.

È importante che i valori di copertura attribuiti alla fine siano frutto dell'osservazione di almeno due persone qualificate quali operatori esperti.

Di seguito è riportato un esempio schematico (Fig. 2) che riassume le modalità di attribuzione delle percentuali di copertura.



**Figura 2.** Stazione esemplificativa per il calcolo delle coperture dei taxa

Si consideri una stazione caratterizzata dalla comunità rappresentata in figura.

La copertura totale della comunità a macrofite è pari al 50% dell'alveo bagnato. Rispetto alla copertura totale della comunità macrofittica, i 3 taxa presenti (A, B e C) sono caratterizzati dalle seguenti coperture rilevate:

copertura rilevata *taxon A* 25%

copertura rilevata *taxon B* 50%

copertura rilevata *taxon C* 25%

Si rimanda al paragrafo 7.4 per la descrizione della procedura di attribuzione delle coperture reali ai singoli taxa.

## 5.8 Valutazione dell'abbondanza dei taxa a scarsa copertura in stazioni caratterizzate da elevata copertura della comunità macrofittica [28]

In alcuni casi particolari e, soprattutto, solo in stazioni caratterizzate dalla presenza di una comunità contraddistinta da buona copertura e strutturazione, l'attribuzione dei valori di copertura percentuale in campo può prevedere l'uso, per i taxa a copertura molto limitata e puntuale, dell'indice ++. Tale indice può essere usato quando l'operatore ritenga di trovarsi in casi in cui è utile adottare una notazione di copertura che possa risultare intermedia tra il valore 5% e l'indice +. Usando l'indice ++ si possono discriminare quei taxa la cui copertura non è costituita dalla sola presenza, ma allo stesso tempo non giunge a coprire il 5% della superficie vegetata.

Come l'indice +, anche l'indice ++ non contribuisce alla somma complessiva delle coperture.

L'utilità relativa all'uso dell'indice ++ si presenta solo in quelle situazioni in cui la trasposizione dei valori di copertura rilevati in valori di copertura reali può porre nelle condizioni di discriminare poco, nell'ambito dei taxa a scarsa copertura, quelli solo presenti da quelli caratterizzati da una presenza lievemente maggiore: ciò accade nelle stazioni in cui la comunità ha una copertura maggiore del 20% (ovvero quando è almeno pari al 25%) e, in linea di principio, quando si riscontra un numero elevato di taxa presenti, almeno pari a 15. In tali casi, infatti, l'uso dell'indice ++ può favorire una più corretta procedura di assegnazione delle percentuali di copertura.

Si elencano schematicamente le condizioni e le modalità che devono essere rispettate per poter correttamente utilizzare l'indice ++:

- la copertura vegetale della comunità deve essere superiore al 20% (ovvero almeno pari 25%) rispetto all'alveo bagnato nella stazione;
- il numero di taxa presenti deve essere elevato ( $\geq 15$ );
- il numero di taxa a cui viene assegnato l'indice ++ non deve essere superiore a 1/3 dei taxa a cui viene assegnato l'indice + e a 1/3 dei taxa a cui viene assegnato il valore 5%;
- il numero di taxa con indice ++ non deve essere maggiore di 1/4 rispetto al numero di taxa totali campionati;
- non è possibile assegnare l'indice ++ agli agglomerati algali.

## 5.9 Il campionamento e l'attribuzione delle percentuali di copertura alla componente algale [13, 28]

Il campionamento e la valutazione delle percentuali di copertura per la componente algale presentano alcune peculiarità. Gli organismi algali che fanno parte delle macrofite acquatiche, a parte alcuni *taxa* con elevata complessità strutturale e con morfologia caratteristica e di facile individuazione (quali ad es. le *Characeae* o il genere *Lemanea*), si presentano sottoforma di aggregati solo macroscopicamente omogenei, costituiti tuttavia da diversi generi algali. In campo non è quindi possibile né distinguere i diversi generi algali né attribuire correttamente le rispettive percentuali di copertura.

Un corretto campionamento delle alghe prevede, innanzitutto, l'individuazione di aggregati macroscopicamente visibili omogenei per colore, spessore e struttura degli agglomerati. Successivamente, per ciascuna delle tipologie individuate macroscopicamente, vanno raccolti sub-campioni (almeno 5) in più punti nell'ambito della stazione, al fine di ottenere un campione rappresentativo per quel dato agglomerato algale.

In campo si procederà, quindi, all'attribuzione delle percentuali di copertura alle diverse tipologie di aggregati algali macroscopicamente visibili, omogenei e distinguibili gli uni dagli altri.

L'attribuzione corretta delle percentuali di copertura dei *taxa* costituenti un dato agglomerato algale potrà essere fatta solo in laboratorio, esaminando il campione algale al microscopio ed in funzione della valutazione delle abbondanze dei diversi *taxa* all'interno dell'aggregato.

## 5.10 Censì caratterizzate da pluristratificazione e compenetrazione[28]

La valutazione dell'abbondanza sia della comunità oggetto del rilievo sia dei singoli *taxa* viene solitamente effettuata in termini di copertura, intesa come proiezione sulla superficie del rilievo dell'estensione della comunità e dei singoli *taxa* distinti.

La metrica copertura è, quindi, utilizzata come misura dell'abbondanza. Tale modalità di rilievo è correntemente utilizzata in tutti i rilievi vegetazionali quali-quantitativi ed il rilievo delle macrofite si configura come tale.

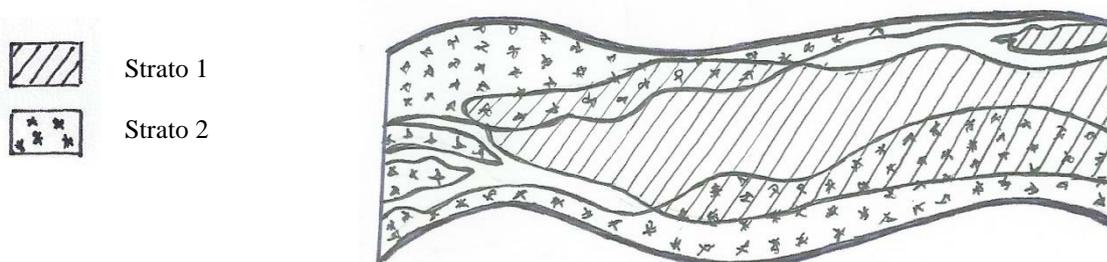
E' possibile rinvenire stazioni in cui è presente una sovrapposizione, anche solo parziale, della comunità presente con la costituzione di diversi livelli di vegetazione.

Per effettuare un'analisi più corretta della comunità, nel suo complesso, in questi casi è opportuno riferirsi a due differenti parametri: la copertura e la copertura cumulativa.

Per copertura della comunità si deve intendere l'estensione percentuale del complesso della comunità rispetto alla superficie della stazione rilevata (la semplice proiezione dello spazio occupato dalla comunità sulla superficie della stazione).

Per copertura cumulativa della comunità si deve intendere il valore percentuale derivante dalla valutazione della sommatoria dell'estensione dei diversi strati eventualmente presenti; anche nel caso in cui non siano presenti strati effettivamente differenziati ma siano presenti ambiti di compenetrazione verticale di diversi *taxa*, è possibile fare una valutazione dell'estensione delle aree di sovrapposizione e stimare un valore di copertura cumulativa, incrementato rispetto al valore di copertura (che sarebbe raggiunto se fosse presente un solo strato).

E' opportuno, quindi, rilevare ed annotare entrambi i parametri così come definiti: nella maggior parte dei rilievi stazionali la copertura e la copertura cumulativa della comunità avranno valori coincidenti, nei casi di sovrapposizione/compenetrazione di diversi strati, la copertura cumulativa sarà maggiore della copertura (Fig. 3).



Copertura 90 %

Porzione in sovrapposizione 20 %

Copertura cumulativa 110 %

**Figura 3.** *Schema di stazione con sovrapposizione di due livelli di vegetazione*

Si ricorda che, essendo le macrofite organismi autotrofi, una reale sovrapposizione degli organismi si configura come un evento poco frequente. Si deve, quindi, porre attenzione a non eccedere nella stima di eventuali sovrapposizioni che condurrebbero ad una sovrastima dell'abbondanza reale dei taxa. L'effettiva sovrapposizione/compenetrazione di strati si realizza solo in tratti caratterizzati da regime idrologico stabile, turbolenza e velocità limitate e laddove siano presenti comunità ricche e ben strutturate.

Si fa presente che la struttura "in bancate" (tridimensionalità) propria dei popolamenti di alcune specie (quali quelle appartenenti ai generi Callitriche o Potamogeton) non è da considerarsi come costituente una compenetrazione/sovrapposizione; si può parlare di sovrapposizione solo se derivante dalla presenza di specie diverse nei diversi strati.

La valutazione della presenza di una copertura cumulativa è da ritenersi come una procedura eccezionale da utilizzare solo in casi particolari; tale procedura è quindi consigliabile solo in presenza di una reale e diffusa sovrapposizione/compenetrazione tra i taxa e in stazioni caratterizzate da elevata ricchezza e complessità strutturale della comunità.

In relazione a ciò, il valore massimo di copertura cumulativa che può essere rilevata è pari al 150 %.

Si ricorda che, nella successiva fase di calcolo della copertura reale, laddove la copertura e la copertura cumulativa rilevate presentassero valori differenti, per la determinazione delle percentuali di copertura reali da associare ai singoli taxa è necessario proporzionare la percentuale rilevata in campo non alla copertura bensì alla copertura cumulativa.

Da ultimo, si sottolinea come, essendo il valore di copertura utilizzato come misura del valore di abbondanza, si deve evitare di valutare con lo stesso peso due diversi "strati" generati da cenosi di consistenza estremamente differenziata. Ad esempio, in presenza di una sovrapposizione generata da velature algali su cenosi di fanerogame acquatiche, il peso della componente algale deve essere correttamente valutato in relazione alla reale importanza di tali organismi nella comunità e non è necessario chiamare in causa nessuna sovrapposizione nell'attribuire i valori di copertura.

Passando all'attribuzione delle percentuali di copertura ai singoli taxa in campo occorre distinguere due casistiche fondamentali:

- il valore della copertura cumulativa è  $\leq 100\%$ : non ci sono varianti rispetto alla procedura "standard" di attribuzione delle percentuali di copertura vista in precedenza;
- il valore della copertura cumulativa è  $> 100\%$ : ai singoli taxa possono essere attribuiti valori di copertura già corrispondenti ai valori reali la cui somma corrisponderà al valore della percentuale cumulativa rilevata (superiore al 100%).

Considerato che l'evenienza della sovrapposizione si ha solo in caso di cenosi ricche e molto strutturate è bene avere direttamente in campo la possibilità di attribuire i valori di copertura potendo disporre di un valore sommatoria soglia più elevato. È comunque facoltà dell'operatore effettuare l'attribuzione delle percentuali di copertura in campo avendo come soglia il valore 100; in tal caso tali valori dovranno poi essere proporzionati rispetto al valore di copertura cumulativa registrato.

## **5.11 Campionamenti in torrenti montani con comunità a prevalenza di briofite [28]**

Oltre alle procedure da utilizzare in casi particolari si propongono anche una serie di avvertenze utili per il campionamento dei corsi d'acqua montani e comunque in tutti i corsi d'acqua caratterizzati dalla presenza di comunità macrofite a prevalenza di briofite.

I torrenti di tipo montano sono caratterizzati da una comunità vegetale costituita da organismi di piccole dimensioni ed adattati alle condizioni ecologiche presenti; la comunità è costituita quasi esclusivamente da briofite, in particolare muschi, e da alghe.

Il campionamento della comunità vegetale in tali corsi d'acqua presenta notevoli difficoltà dovute alle piccole dimensioni degli organismi, alla scarsa visibilità causata dalla turbolenza, e alle difficoltà pratiche di accesso e percorribilità.

La comunità di briofite si distribuisce lungo il corso d'acqua formando una struttura "a mosaico". I muschi formano spesso "tessere" generalmente costituite da singoli taxa la cui posizione nel tratto è strettamente determinata dai fattori ecologici cui sono sottoposti (insolazione, profondità, emersione/immersione, turbolenza, intensità della corrente).

Il campionamento deve prevedere un'accurata ricerca in tutti i mesohabitat presenti, o almeno in tutti quelli in cui le condizioni idrologiche lo rendano possibile.

È necessaria una fase, preliminare al campionamento, di analisi e riconoscimento dei diversi mesohabitat (ad es: raschi, pozze) e dei microhabitat generati dalle differenti condizioni idrologiche e dalle caratteristiche granulometriche (ad es.: grossi massi completamente sommersi, massi submersi, substrati a ciottoli sommersi, pozze sabbiose).

Successivamente si procede con il campionamento percorrendo, per quanto possibile, la stazione a zig zag e campionando in tutti i diversi mesohabitat.

È importante effettuare già in campo un attento esame della morfologia degli organismi che costituiscono la comunità sulla base di caratteristiche morfologiche rilevanti.

Le alghe verranno distinte in base a colore, forma dell'aggregato, struttura, tipologia di adesione al substrato.

Per muschi ed epatiche, la distinzione dei singoli taxa avverrà attraverso un'accurata osservazione di una serie di caratteri macroscopici od osservabili attraverso l'ausilio di una lente di ingrandimento da campo:

- struttura pleurocarpica o acrocarpica;
- presenza di nervatura sulla foglia (osservare con una lente);
- aspetto della foglia: falcata, concava, lineare;
- numero di file di foglie distribuite lungo il fusto: foglie distiche, in tre o più file;
- dimensioni delle foglie e del gametofito: struttura robusta o gracile,
- distribuzione delle ramificazioni rispetto al fusto principale: ramificazione pennata, irregolare, dendroide;
- colore (nero-bruno, verde, verde/giallo, rossiccio);
- portamento rispetto alla superficie occupata: appiattite ed adese al substrato con strutture più o meno complanate, o ancorate solo alla base attraverso un dischetto basale o su tutta la superficie attraverso i rizoidi con struttura tridimensionale.

È necessario osservare e suddividere i muschi in base alle caratteristiche descritte e riporre un singolo taxon per sacchetto (è possibile conservarne un numero maggiore all'interno di un solo sacchetto solo se presentano caratteristiche nettamente differenti).

È consigliabile utilizzare sacchetti di plastica (tipo sacchetti da congelatore) che verranno successivamente sostituiti da sacchetti di carta per la conservazione. Su ciascun sacchetto dovrà essere riportato il nome (i nomi) del muschio attribuito in campo, il nome della stazione e la data di campionamento.

La turbolenza determina in molti punti condizioni di scarsa visibilità che non permettono di effettuare una valutazione visuale delle coperture e, quindi, in tali condizioni, la valutazione della copertura complessiva della comunità si baserà su una stima derivante in parte da una valutazione al tatto della superficie campionata e in parte da un'osservazione diretta nelle porzioni visibili a occhio nudo.

A conclusione del campionamento è bene compiere un esame complessivo del materiale campionato prima di procedere all'attribuzione delle percentuali di copertura.

La valutazione ultima delle abbondanze relative dei singoli taxa deriva dall'osservazione dei campioni raccolti.

Qualora nella stazione siano presenti più specie di muschi tra loro non facilmente distinguibili macroscopicamente si opera analogamente a quanto descritto precedentemente per il campionamento e l'attribuzione delle percentuali di copertura degli aggregati algali.

## 6. PROCEDURE ANALITICHE

### 6.1 Trattamento e conservazione dei campioni in laboratorio

Il materiale campionato deve essere portato in laboratorio per l'identificazione.

Se l'identificazione del materiale in laboratorio non viene effettuata immediatamente sarà necessario ricorrere a trattamenti che hanno la finalità di mantenere i campioni vegetali in condizioni tali da poter poi essere determinati.

Se si prevede di effettuare l'identificazione entro pochissimi giorni (2-3) i campioni possono essere posti in frigorifero dentro i sacchetti ed i barattoli di raccolta, anche se, per quanto riguarda i campioni algali, la fissazione entro le 24 ore costituisce una garanzia rispetto a fenomeni di consumo biologico selettivo di porzioni dell'agglomerato, che possono avvenire anche nell'arco di pochissimi giorni.

## 6.2 Procedimento di fissazione

Nel caso in cui sia previsto un intervallo temporale più lungo di 2-3 giorni tra la raccolta e la determinazione degli organismi si deve procedere alla fissazione dei campioni.

Per tutte le fanerogame, le pteridofite e le briofite si deve effettuare un procedimento di essiccazione.

Fanerogame e pteridofite devono essere fatte seccare tra fogli di giornale (quotidiani e non riviste in carta patinata) o carta assorbente o lamina di gommapiuma (spessore massimo 50 mm), avendo cura di disporre le piante in modo tale da facilitare la conservazione di tutti le parti degli organismi. I campioni racchiusi tra fogli di giornale (o altro) vanno impilati e messi a seccare. Per favorire l'essiccazione è necessario, inoltre, disporre le pile di fogli tra due graticci di legno per consentire l'aerazione dei campioni e, infine, porre un peso sopra a tutto.

È necessario cambiare con una certa frequenza (una volta al giorno) i fogli di giornale, soprattutto nei primi giorni, per impedire la formazione di muffe e la perdita del campione.

Si sconsiglia di riutilizzare i fogli di giornale usati per l'essiccazione.

Le briofite non devono essere schiacciate e, dopo una sommaria asciugatura, devono essere riposte all'interno di sacchetti di carta lasciati aperti per alcuni giorni sul bancone del laboratorio.

Le alghe ed i piccoli organismi conservati al momento della raccolta in barattolo devono essere lasciati dentro gli stessi barattoli aggiungendo all'acqua di raccolta un volume di formalina tale da far raggiungere una diluizione pari al 3 % [11, 13, 24, 28].

Data la tossicità della formalina, tutte le operazioni che ne prevedono l'uso, dalla preparazione della formalina tamponata al riempimento dei barattoli contenenti i campioni, devono avvenire in laboratorio sotto cappa e sono sottoposte a misure di sicurezza stringenti. I contenitori utilizzati, l'acqua di lavaggio ed i preparati, devono essere opportunamente smaltiti.

Qualsiasi altra modalità di fissazione non garantisce che venga conservata la visibilità ottimale di tutte le parti dell'organismo necessarie per la determinazione. In alternativa alla formalina possono essere utilizzate solo eventuali modalità di fissazione con preparati che abbiano analoghe prestazioni nella conservazione a medio e lungo periodo, ovvero che garantiscano la conservazione dell'agglomerato algale campionato, delle caratteristiche morfologiche e cromatiche fondamentali per la determinazione, la possibilità di rivedere e sottoporre a verifica l'identificazione dei campioni.

Occorre ricordare che alcuni organismi, o parti di organismi, sono comunque di difficile fissazione; si pensi, ad esempio, ad alcuni fiori quali quelli delle specie del genere *Ranunculus* o alle epatiche tallose. È quindi opportuno organizzare, laddove possibile, le attività di campo e di laboratorio in maniera da poter osservare velocemente gli organismi più velocemente deperibili.

## 6.3 Identificazione

Il procedimento di identificazione può essere effettuato correttamente solo in laboratorio, dove si hanno a disposizione sia le chiavi di determinazione degli organismi sia la strumentazione ottica idonea.

L'identificazione deve essere effettuata a livello di specie per tutti i gruppi tassonomici di macrofite; fanno eccezione le alghe, per le quali la determinazione si ferma quasi sempre a livello di genere. Il livello tassonomico richiesto, comunque, dipende dal metodo di valutazione (indice) con cui si elaboreranno i dati raccolti e dalle specifiche previste per i diversi gruppi tassonomici.

È necessario l'utilizzo dello stereoscopio e del microscopio ottico per osservare alcuni particolari anatomici che vengono richiesti per la corretta identificazione delle specie.

Prima di procedere alla determinazione di campioni essiccati, è necessario reidratare gli organismi, immergendo in acqua in una piastra Petri la porzione che ci si accinge ad esaminare. È importante non

idratare tutto il campione a disposizione: in particolare, per fanerogame e pteridofite si perderebbe la possibilità di fissare nuovamente il campione; per i muschi, risulta spesso utile, durante la fase di identificazione, poter osservare anche il campione essiccato; si ricordi, però, che è sempre possibile seccare nuovamente un campione di muschio o di epatica fogliosa.

Alla fine della fase di identificazione verrà prodotto l'elenco floristico della stazione, nel quale ad ogni taxon è associato il valore di copertura rilevato in campo; si dovrà, quindi, procedere all'attribuzione delle percentuali di copertura reali ai singoli taxa.

## 6.4 Attribuzione delle percentuali di copertura reale ai singoli taxa [11, 13, 28]

Per l'attribuzione delle percentuali di copertura reali ai diversi taxa identificati è necessario proporzionare la copertura rilevata in campo associata a ciascun taxon rispetto alla copertura complessiva della comunità campionata.

Con riferimento alla stazione esemplificativa di Fig. 2 le coperture rilevate in campo risultano le seguenti:

copertura totale della comunità a macrofite = 50%

copertura *taxon A* 25%

copertura *taxon B* 50%

copertura *taxon C* 25%

Alla fine del procedimento di determinazione si avrà una lista floristica con 3 *taxa* a cui sarà associato il valore di copertura rilevato in campo:

*Berula erecta* 25%

*Ranunculus fluitans* 50%

*Potamogeton natans* 25%

Per esprimere correttamente l'abbondanza si deve procedere alla traduzione dei valori di copertura relativi rilevati in campo (considerando la copertura dell'intera comunità macrofita come il totale rispetto al quale valutare la copertura percentuale dei vari *taxa*) in valori di copertura reali di ciascun *taxon* rispetto alla superficie dell'alveo bagnato nella stazione.

Tale operazione viene eseguita attraverso la proporzione:

$$\text{COP\_RIL\_X} : 100 = \text{COP\_REA\_X} : \text{COP\_TOT}$$

dove

COP\_RIL\_X corrisponde alla copertura del taxon X rilevata in campo

COP\_REA\_X corrisponde alla copertura reale del taxon X

COP\_TOT corrisponde alla copertura totale della comunità a macrofite rilevata

Ovvero:

$$\text{COP\_REA\_X} = \text{COP\_RIL\_X} \times \text{COP\_TOT} / 100$$

Nel caso in esame, ad esempio:

$$25 : 100 = \text{copertura reale } Berula\ erecta : 50$$

$$50 : 100 = \text{copertura reale } Ranunculus\ fluitans : 50$$

$$25 : 100 = \text{copertura reale } Potamogeton\ natans : 50$$

ovvero:

$$\text{copertura reale } Berula\ erecta = 12,5$$

$$\text{copertura reale } Ranunculus\ fluitans = 25$$

$$\text{copertura reale } Potamogeton\ natans = 12,5$$

I valori di copertura reale così ottenuti potranno essere tradotti successivamente in coefficienti di copertura, in funzione della metodologia di valutazione utilizzata.

Si ricorda che nel caso sia stata rilevata una copertura cumulativa della comunità maggiore della copertura, nella fase di calcolo della copertura reale, per la determinazione delle percentuali di copertura reali dei vari *taxa*, è necessario proporzionare la percentuale rilevata in campo non alla copertura totale bensì alla copertura cumulativa.

## 6.5 Preparazione dei vetrini degli agglomerati algali e attribuzione delle percentuali di copertura reali ai taxa algali [11, 13, 24, 28]

Come anticipato, l'attribuzione corretta delle percentuali di copertura dei *taxa* costituenti un dato agglomerato algale potrà essere fatta solo in laboratorio, esaminando il campione algale al microscopio ed in funzione della valutazione delle abbondanze dei diversi *taxa* all'interno dell'aggregato.

Per ciascun campione, corrispondente ad un agglomerato omogeneo individuato in campo, devono essere preparati 3 vetrini, prelevando dall'agglomerato stesso la giusta quantità di campione che ne permetta l'identificazione al microscopio, avendo cura di prelevare il campione in modo randomizzato rispetto alla massa algale conservata.

Le operazioni di preparazione del campione devono essere svolte sotto cappa nel caso in cui al campione sia già stata aggiunta la formalina. In tal caso, inoltre, i sub-campioni che vengono prelevati devono essere lavati prima di essere posti sul vetrino.

Dopo aver preparato i tre vetrini la massa algale rimanente va ricollocata nel barattolo.

L'osservazione al microscopio dei tre vetrini preparati permette l'individuazione e la determinazione dei *taxa* campionati, nonché la valutazione dell'abbondanza di ciascuno di essi. Per ciascun vetrino dovrà essere valutata l'abbondanza di ciascun *taxon* individuato, utilizzando, come per la fase di campo, multipli di 5 tra il valore 100% ed l'indice +.

L'abbondanza percentuale di ciascun *taxon*, riferita all'agglomerato di appartenenza, sarà calcolata come media dei valori attribuiti sui tre vetrini e approssimando in una scala di multipli di 5 o all'indice +.

Nel caso in cui dall'analisi dei vetrini risulti una significativa presenza di sedimento e/o materiale detritico o, ancora, di diatomee non ascrivibili a *taxa* macrofitici, è necessario sottrarne la percentuale di copertura dal computo totale del singolo aggregato.

Le abbondanze assegnate ai campioni sul vetrino devono essere trasformate in coperture reali attraverso due proporzioni successive: in un primo passaggio la valutazione al 100 delle abbondanze dei singoli *taxa* nei vetrini deve essere rapportata alla percentuale relativa assegnata in campo all'agglomerato algale. In un secondo passaggio, i valori ottenuti dovranno essere rapportati alla percentuale di copertura totale della comunità macrofittica stimata in campo, così come avviene per i *taxa* non algali, ottenendo così i valori di copertura reali.

## 7. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Il metodo di campionamento e di elaborazione dei dati descritto conduce, per ciascun campionamento, ad una lista floristica dei *taxa* macrofitici presenti in cui, a ciascun *taxon*, è associato un valore di copertura percentuale reale; inoltre, a ciascun campionamento è associato un valore di copertura complessiva della comunità.

I dati ottenuti possono essere utilizzati per la definizione dello stato ecologico dei corsi d'acqua superficiali, conformemente a quanto richiesto dalla Direttiva 2000/60/CE e dal DLgs n. 152/2006.

## 8. ARCHIVIAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni determinati devono essere conservati per permettere confronti e verifiche successive.

Le fanerogame, le pteridofite e le briofite, una volta seccate, possono essere conservate all'interno di fogli di giornale o spillate su fogli da erbario (nel caso di briofite in buste di carta) corredati da indicazioni relative al nome della specie, data e codice stazione. Le alghe conservate nell'acqua di raccolta e fissate con formalina possono essere mantenute a lungo in un luogo fresco e buio.

Nei barattoli devono essere indicati il nome attribuito in campo all'aggregato macroscopico, il nome del *taxon* o dei *taxa* algali determinati, data e codice della stazione.

E' inoltre consigliabile realizzare un archivio fotografico; in particolare per le alghe è opportuno scattare alcune foto al microscopio a ingrandimenti opportuni per l'osservazione delle caratteristiche utili per la determinazione.

La corretta archiviazione dei campioni consente di poter effettuare controlli e verifiche a posteriori.

## **9. SICUREZZA [29, 30]**

Lavorare in campo e in laboratorio è potenzialmente rischioso: la salute e la sicurezza degli operatori devono sempre essere tenute in considerazione.

Questo protocollo, pur non essendo lo strumento idoneo per definire come affrontare e risolvere i problemi di sicurezza inerenti il campionamento e la successiva determinazione dei campioni in laboratorio, descrivendo in dettaglio tutte le attività da compiere è un efficiente complemento alle procedure di sicurezza che devono essere definite in merito.

Una qualifica degli operatori anche in termini di sicurezza deve essere una finalità degli enti e delle strutture preposte alle attività di monitoraggio.

## **10. ASSICURAZIONE DI QUALITÀ**

### **10.1 Qualifica degli operatori**

Il personale coinvolto nelle attività di monitoraggio biologico deve essere qualificato sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento, esperienza e/o comprovata abilità.

Un operatore qualificato deve possedere un'adeguata e documentata preparazione (diploma di laurea e/o specializzazione post-universitaria) in campo ecologico, idrobiologico e tassonomico (botanica) e deve, inoltre, aver compiuto un percorso di apprendimento in affiancamento ad operatori esperti o frequentando un apposito corso di formazione

Il mantenimento della qualifica del personale coinvolto nel monitoraggio attraverso l'uso delle macrofite acquatiche deve essere periodicamente verificata.

Il rilievo in campo e l'identificazione dei taxa devono essere effettuati da operatori qualificati.

La qualifica degli operatori è essenziale: il rischio di rilevare in modo scorretto la comunità presente è altrimenti molto significativo. Essa garantisce infatti che siano registrati dati accurati e riproducibili, con una trascurabile variazione inter-operatore.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] DIRETTIVA 2000/60/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L 327/2, 22.12.2000: 1-71.
- [2] Harding J. P. C., 1981. Macrophytes as monitors of river quality in the Southern N.W.W.A. area. North West Water Authority, Rivers Divisions, Ref. TS-BS-81-2: 1-54.
- [3] Caffrey J. M. – 1987 - Macrophytes as biological indicators of organic pollution in Irish rivers. In: Richardson D. H. S. (eds.), Biological indicators of pollution. Dublin, 24-25 february 1986. Royal Irish Academy: 77-87
- [4] Haslam S. M., 1987. River plants of Western Europe - The macrophytic vegetation of watercourses of the European Economic Community. Cambridge University Press: 504 pp.
- [5] Kelly M. G., Whitton B. A., 1995. Workshop: "Plants for monitoring rivers" Durham, 26-27 September 1994. National Rivers Authority: 34 pp
- [6] Haury J., Peltre M.C., Muller S., Tremolieres M., Barbe J., Dutatre A. & Guerlesquin M. - 1996 - Des indices macrophytes pour estimer la qualite des cours d'eau francais: premières proposition. *Écologie*: 233-244.
- [7] Newman J. R., Dawson F. H., Holmes N. T. H., Chadd S., Rouen K. J., Sharp L., 1997. Mean Trophic Rank: A User's Manual. R & D Technical Report E38-Environmental Agency: 129 pp.
- [8] Haury J., Peltre M. C., Muller S., Thiébaud G., Tremolieres M., Demars B., Barbe J., Dutatre A., Daniel H., Bernez I., Guerlesquin M. & Lambert E. – 2000 – Les macrophytes aquatiques bioindicateurs des systèmes lotique – Intérêts et limites des indices macrophytiques. Synthèse bibliographique des principales approches européennes pour le diagnostic biologique des cours d'eau. UMR INRA-ENSA EQHC Rennes & CREUM-Phytoécologie Univ. Metz, Agence de l'Eau, Artois-Picardie: 101 pp.
- [9] Bielli E., Buffagni A., Cotta Ramusino M., Crosa G., Galli P., Guzzi L., Guzzella L., Minciardi M.R., Spaggiari R. & Zoppini A. – 1999 – Linee guida per la classificazione biologica delle acque correnti superficiali. Manuale UNICHIM 191, 59 pp.
- [10] Azzollini R., Betta G., Minciardi M. R. – 2003 - Uso di macrofite acquatiche per il biomonitoraggio delle acque di canali irrigui: prime applicazioni in un'area del Vercellese. In: Atti del Convegno Nazionale: Botanica delle zone umide. Vercelli 10-11 novembre 2000. Società Botanica Italiana, Bollettino del Museo Regionale di Storia Naturale del Piemonte: 269-292.
- [11] Minciardi M.R., Rossi G.L., Azzollini R. & Betta G. – 2003 – Linee Guida per il biomonitoraggio di corsi d'acqua in ambiente alpino. ENEA, Provincia di Torino: 46 pp.
- [12] Centro Tematico Acque Interne e Marino Costiere – 2005 - Metodologie analitiche della componente vegetazionale negli ambienti di acque correnti (Macrofite). 57 pp.
- [13] APAT – 2007 – Protocollo di campionamento ed analisi per le macrofite delle acque correnti. In "Metodi Biologici per le acque. Parte I". Manuali e Linee Guida APAT. Roma.
- [14] Azzollini R., Gerbaz D., Sara I., Viquéry L., Rossi G. L., Spada C. D., Minciardi M. R. – 2009 - Uso di macrofite acquatiche per il monitoraggio di corsi d'acqua alpini. Le applicazioni in Valle d'Aosta. In: Atti del XIX Congresso della Società Italiana di Ecologia: Dalle vette alpine alle profondità marine. Bolzano 15-18 settembre 2009, Bottarin R., Schirpke U., Tappeiner U., Oggioni A., Bolpagni R., (eds.). EURAC Research, EURAC Book 58: 91-104.

- [15] Mezzotero A., Minciardi M. R., Spada C. D., Lucadamo L., Gallo L., De Filippis A. - 2009 - Prima caratterizzazione e valutazione delle comunità a macrofite acquatiche nei corsi d'acqua della Provincia di Cosenza. *Studi Trent. Sci. Nat.*, 86: 23-31.
- [16] Minciardi M.R., Spada C. D., Rossi G. L., Angius R., Orrù G., Mancini L., Pace G., Marcheggiani S. & Puccinelli C. - 2009 - Metodo per la valutazione e la classificazione dei corsi d'acqua utilizzando la comunità delle Macrofite acquatiche. *Rapporto Tecnico ENEA RT/2009/23/ENEA*: 35 pp.
- [17] Olivieri L., Lia R., Spada C.D. & Minciardi M.R. - 2012 - Studio della vegetazione acquatica per la valutazione ecosistemica dei corsi d'acqua. *Rapporto Tecnico ENEA RT/2012/1/ENEA*: 48 pp.
- [18] Decreto Legislativo 3 aprile 2006 n. 152. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale Supplemento Ordinario* n. 96 del 14 aprile 2006.
- [19] Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, 16 giugno 2008, n. 131. Criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici - Attuazione articolo 75, Dlgs 152/2006. *Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana - Supplemento Ordinario* n. 187 dell'11 agosto 2008.
- [20] Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, 14 aprile 2009, n. 56. Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 124 del 30 maggio 2009.
- [21] Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, 17 luglio 2009. Individuazione delle informazioni territoriali e modalità per la raccolta, lo scambio e l'utilizzazione dei dati necessari alla predisposizione dei rapporti conoscitivi sullo stato di attuazione degli obblighi comunitari e nazionali in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 203 del 2 settembre 2009.
- [22] Decreto del Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, 8 novembre 2010, n. 260. "Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo". *Gazzetta Ufficiale - Supplemento Ordinario* n. 31 del 7 febbraio 2011.
- [23] Minciardi M.R., Azzolini R. & Spada C. D. - 2010 - Le macrofite acquatiche come comunità bioindicatrice negli ambienti fluviali del bacino padano: ricerche pregresse, prospettive di utilizzo e necessità conoscitive. In: *Atti XVIII Congresso della Società Italiana di Ecologia*, Parma 1-3 settembre 2008, sessione speciale "Aggiornamento delle conoscenze sul bacino idrografico Padano", Viaroli P., Puma F., Ferrari I. (eds.). *Biologia Ambientale*, 24 (1): 1-10.
- [24] AFNOR - 2003 - Qualité de l'eau : Détermination de l'indice biologique macrophytique en rivière (IBMR) - NF T 90-395.
- [25] Meilinger P., Schneider S. & Melzer A. - 2005 - The Reference Index Method for the Macrophyte-Based Assessment of Rivers - a Contribution to the Implementation of the European Water Framework Directive in Germany. *Internat. Rev. Hydrobiol.* (2005) 90: 322-342.
- [26] Schaumburg J., Schranz C., Stelzer D., Hofmann G., Gutowski A. & Foerster J. - 2006 - Instruction Protocol for the ecological Assessment of Running Waters for Implementation of the EC Water Framework Directive: Macrophytes and Phytobenthos. *Bavarian Environment Agency*, 121 pp.
- [27] Schneider S. & Melzer A. - 2003 - The Trophic Index of Macrophytes (TIM). A New Tool for Indicating the Trophic State of Running Waters. *Internat. Rev. of Hydrobiol.*, (2003) 88: 49-67.
- [28] Minciardi M. R., Abati S., Bisceglie S., Ciadamidaro S., Olivieri L., Rossi G. L. & Spada C.D.- in stampa - Il rilievo delle macrofite acquatiche nei corsi d'acqua: soluzioni pratiche per l'applicazione di metodiche di classificazione. *Rapporto Tecnico ENEA*.

[29] ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.

[30] APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006

### **Chiavi di determinazione**

I testi di riferimento fondamentali necessari per lo svolgimento routinario del rilievo della comunità macrofittica sono indicati con l'asterisco.

#### **Per i funghi:**

Ingold C.T. - 1975 - An illustrated guide to aquatic and water-borne Hyphomycetes (funghi imperfecti) : with notes on their biology. Freshwater Biological Association, Scientific Publication, 30, 1-96.

#### **Per i licheni:**

Nimis P.L. & S. Martellos - 2008 - The Information System on Italian Lichens Version 4.0. Dryades - Università di Trieste. <http://dbiodbs.univ.trieste.it/italic/italic03>

Wrth V. - 1995 - Die Flechten (Teil 1,2) Ulmer. Stuttgart, 1600 pp.

Clauzade G. & Roux C. - 1985 - Likenoj de okcidenta europo Bulletin da la Societé Botanique du Centr Ouest Nouvelle série - Numéro Spécial : 7 - 1985, 893 pp.

Tiévant P. - 2001- Guide des Lichens. Delachaux et Niestlé - 304 pp.

#### **Per le alghe:**

Bazzichelli G., Abdelahad N. - 2009 - Alghe d'acqua dolce d'Italia. Flora analitica delle Caroficee. Università La Sapienza, Roma, 73 pp.

\* Bourrelly P. - 1966 - Les algues d'eau douce. - Éditions N. Boubée & Cie. Tome I-II-III.

\* John D. M., Whitton B.A., Brook A.J. - 2005 - The Freshwater Algal Flora of the British Isles - Cambridge University Press, 702 pp.

Moore J.A. - 1986 - Charophytes of Great Britain and Ireland. BSBI Handbook N° 5. Botanical Society of the British Isles, 140 pp.

\* Wehr J. D. & Sheath R. G. (Eds.) - 2003 - Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification. Academic Press, San Diego, CA, 950 pp.

#### **Per le epatiche:**

\* Casas C., Brugues M., Cros R.M., Sergio C. & Infante M. - 2009 - Handbook of liverworts and hornworts of the Iberian Peninsula and the Balearic Islands : illustrated keys to genera and species. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona, 177 pp.

Paton J. A. - 1999 - The Liverwort Flora of the British Isles. Harley Books, 626 pp.

\* Smith A.J.E. - 1991 - The Liverworts of Britain and Ireland. Cambridge University Press, 376 pp.

**Per i muschi:**

Atherton I.D.M., Bosanguet S.D.S. & Llawley M. – 2010 – Mosses and Liverworts of Britain and Ireland: a field guide. British Bryological Society, 856 pp.

Casas C., Brugués M. & Cros R.M.- 2001- Flora dels Briòfits dels Països Catalans, Volum I. Molses. Institut d'Estudis Catalans, 278 pp.

Casas C., Brugués M., Ros R.M. & Sérgio C. – 2006 - Handbook of mosses of the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona, 349 pp.

\* Cortini Pedrotti C. – 2001 – Flora dei muschi d'Italia. 2 Vol. Antonio Delfino Editore, 1235 pp.

\* Smith A.J.E. – 2004 – The Moss Flora of Britain & Ireland. Cambridge University Press, 1012 pp.

**Per le pteridofite e fanerogame:**

\* Castroviejo S., Lainz M., López G., Gonzàles Z., Montserrat P., Munoz Garmendia F., Paiva J. & Villar L. (eds.) – 1986-2012 – Flora iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Real Jard. Bot. C.S.I.C. Madrid.

\* Pignatti S. - 1982 - Flora d'Italia. 3 Vol. Edagricole, Bologna.

\* Tutin T.G., Heywood V.H., Burges N.A., Moore D.N., Valentine D.H., Walkers S.M. & Webb D. A., (eds.) – 1968-1980 – Flora Europaea. 5 Vol. Cambridge University Press, Cambridge.

**Altri testi utili**

Aeschimann D., Lauber K., Martin Moser D. & Theurillat. J.P. – 2004 – Flora Alpina. 3 Vol. Zanichelli, Bologna.

Aleffi M., Tacchi R. & Cortini Pedrotti C. – 2008 – Check-list of the Hornworts, Liverworts and Mosses of Italy. Bocconea, 22, 254 pp.

Bellinger E.G. & Sigeo D. 2010. Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators. Wiley, 284 pp.

Celesti-Grapow L., Pretto E., Carli E. & Blasi C. (eds.) – 2010 – Flora vascolare alloctona e invasiva delle regioni d'Italia. Casa Editrice Università La Sapienza, Roma, 208 pp.

Conti F., Abbate G., Alessandrini A. & Blasi C. (eds.) – 2005 – An Annotated Checklist of the Italian Vascular Flora. Palombi Editori, Roma. pp. 420.

Conti F., Alessandrini A., Bacchetta G., Banfi E., Barberis G., Bartolucci F., Bernardo L., Bonacquisti S., Bouvet D., Bovio M., Brusa G., Del Guacchio E., Foggi B., Frattini S., Galasso G., Gallo L., Gangale C., Gottschlich G., Grünanger P., Gubellini L., Liriti G., Lucarini D., Marchetti D., Moraldo B., Peruzzi L., Poldini L., Prosser F., Raffaelli M., Santangelo A., Scassellati E., Scortegagna S., Selvi F., Soldano A., Tinti D., Ubaldi D., Uzunov D., Vidali M. – 2007 – Integrazioni alla checklist della flora vascolare italiana. Natura Vicentina 10 (2006): 5-74.

Dalla Fior G.- 1962 - La Nostra Flora. Monauni, Trento, 752 pp.

Fitter R., Fitter A. & Farrer A. – 2006 – Guide des graminées, carex, joncs et fougères. Les Guide du Naturaliste, Delachaux et Niestlé ed., Paris., 256 pp.

Fontani N., Algeri M., Coccolini L. – 1998 – Atlante fotografico. Guida al riconoscimento delle principali muffe presenti nelle acque da destinarsi al consumo umano. ACAG, Reggio Emilia, 107 pp.

- Frahm J.-P. & Frey W. – 2004 – Moosflora. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, 538 pp.
- Frey W., Frahm J.-P., Fischer E. & Lobin W. – 2006 – The liverworts, mosses and ferns of Europe. Blockeel T. L. Ed., Colchester, 512 pp.
- Jermy A.C., Simpson D.A., Foley M.J.Y. & Porter M.S. – 2007 – Sedges of British Isles. BSBI Handbook N° 1, 554 pp.
- Komarek J. – 1999 - Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/1: Cyanoprokaryota: Teil 1 / Part 1: Chroococcales. Ettl H., Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D. (Hrsg./ Eds.), Spektrum, 548 pp.
- Komarek J. – 1999 – Süßwasserflora von Mitteleuropa, Bd. 19/2: Cyanoprokaryota: Teil 2 / Part 2: Oscillatoriales. Ettl H., Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D. (Hrsg./ Eds.), Spektrum, 759 pp.
- Lansdown R.V. – 2008 – Water-Starworts Callitriche of Europe. BSBI Handbook N° 11. Botanical Society of the British Isles, 180 pp.
- Merryweather J. & Hill M. – 1992 – The Fern Guide, An Introductory Guide to the Ferns, Clubmosses, Quillworts and Horsetails of the British Isles. In: Field studies 8 (1992), 101-188.
- Nimis P.L., Dal Borgo A., Macor A., Pavan A., Sinesi A., Virgilio D. & Zanut E. – 2012 – Guide alle macrofite acquatiche del Friuli Venezia Giulia. I - Piante vascolari. Progetto Dryades, ARPA Friuli Venezia Giulia - Università di Trieste, 104 pp.
- Preston C.D. – 1995 – Pondweeds of Great Britain and Ireland BSBI Handbook N° 8. Botanical Society of the British Isles, 352 pp.
- Streble H. & Krauter D. – 1984 – Atlante dei microrganismi acquatici. La vita in una goccia d'acqua. Muzzio & C., Padova, 334 pp.
- Van den Hoek C. – 1963 – Revision of the European species of Cladophora. E.J. Brill, 248 pp.
- Watson E.V. – 1995 – British mosses and liverworts. An introductory work. Cambridge University Press, 519 pp.

## Allegato A

### Scheda di rilevamento

SCHEDA DI RILEVAMENTO DELLE MACROFITE NEI CORSI D'ACQUA			
<b>Codice / Nome stazione</b>		<b>Data</b>	
<b>Località</b>		<b>Ora</b>	
<b>Corso d'acqua</b>		<b>Operatori</b>	
<b>Coordinate</b>			
<b>Bacino</b>		<b>NOTE</b>	
<b>Idroecoregione</b>			
<b>Tipo fluviale</b>			
<b>Macrotipo per le macrofite</b>			

1. Profilo trasversale dell'alveo di piena

2. Parametri dimensionali	
lunghezza della stazione (m)	
ampiezza media alveo di magra (m)	
ampiezza media alveo bagnato al momento del rilievo (m)	
ampiezza media alveo di morbida (m)	
ampiezza media alveo di piena (m)	
profondità massima alveo bagnato al momento del rilievo (cm)	
profondità media alveo bagnato al momento del rilievo (cm)	

3. Morfologia dell'alveo	
confinato	
non confinato	
Semiconfinato	

4. Condizioni idrologiche	
morbida/magra	
Magra	

5. Andamento della portata (rispetto al periodo antecedente il rilievo)	
in aumento	
stabile	
in diminuzione	

<b>6. Velocità della corrente</b> (valutazione speditiva dell'estensione % delle tipologie di flusso)	
lenta	
media	
elevata	
molto elevata	

<b>8. Ombreggiamento</b>	
nessuno	
parziale	%
totale	

<b>10. Struttura del substrato dell'alveo bagnato</b> (% delle tipologie strutturali presenti)	
diversificato e stabile	
movibile a tratti	
facilmente movibile	
uniformemente compatto	
compatto per artificializzazione	

<b>7. Turbolenza</b> (valutazione speditiva dell'estensione % delle tipologie di flusso)	
assente	
limitata	
da media a forte	
molto forte	

<b>9. Trasparenza dell'acqua</b>	
nulla	
parziale*	
totale	

\* rispondere: leggermente opalescente, opalescente, leggermente torbida

<b>11. Granulometria</b> (% abbondanza delle classi granulometriche)	
roccia	
massi	
ciottoli	
ghiaia	
sabbia	
limo	
substrato artificiale	

<b>12. Zona sopra-acquatica (qualora presente)</b>		
riva sx		riva dx
	superficie % rispetto all'alveo di morbida emerso	
	estensione % lineare (rispetto alla lunghezza della stazione)	
	ampiezza massima trasversale (cm)	
	ampiezza media trasversale (cm)	
	copertura vegetale %	

tipologie di copertura vegetale in zona sopra-acquatica		
riva sx		riva dx
	specie dominanti	

13. Altre formazioni vegetali presenti nel corridoio fluviale		
riva sx	<b>formazioni di greto (altre cenosi nell'alveo di morbida emerso)</b> considerare le formazioni di greto presenti in alveo di morbida oltre alle cenosi in zona sopra-acquatica	riva dx
	copertura % delle formazioni di greto nelle porzioni di alveo di morbida non sopra-acquatiche	

riva sx		riva dx
	specie dominanti **	
	copertura % di specie esotiche	
	specie esotiche presenti	

riva sx	<b>formazioni esterne all'alveo di morbida</b> considerare l'estensione % delle tipologie di copertura vegetale rispetto allo sviluppo areale della porzione di corridoio fluviale posta al di fuori del limite esterno dell'alveo di morbida: considerare 10-100 m di ampiezza in funzione delle dimensioni del corso d'acqua	riva dx
	formazioni riparie legnose	
	formazioni riparie erbacee (a elofite e/o idrofite di zone umide perfluviali)	
	copertura vegetale rada o assente per ragioni naturali	
	formazioni e popolamenti non ripari	
	copertura erbacea (anche non igrofila) in stazioni di alta quota (praterie primarie)	
	copertura vegetale di origine antropica (anche coltivi)	
	assenza di copertura vegetale per cause antropiche e rive artificiali	
	indicare ampiezza media considerata (m)	

riva sx		riva dx
	formazioni dominanti **	
	specie dominanti **	
	copertura % di specie esotiche	
	specie esotiche presenti	

\*\* elencare le formazioni e/o le specie dominanti dalle aree prossimali a quelle distali il corso d'acqua

14. Parametri fisico-chimici	
conducibilità (µS/cm)	
temperatura (°C)	

ossigeno disciolto (mg/L)	
ossigeno disciolto (% sat)	
pH	

### 15. Fenomeni erosivi

riva sx	assenti o molto limitati (1); localizzati (2); diffusi (3); molto evidenti (4)	riva dx

### 16. Integrità idromorfologica

presenza di dighe a monte		sì/no e distanza approssimativa
presenza di dighe a valle		sì/no e distanza approssimativa
presenza di <i>hydropeaking</i>		sì/no
integrità della sezione trasversale		totale (1); lieve artificializzazione (2); compromessa (3); solo residuale (4)
integrità della sezione longitudinale (in pianta)		totale (1); lieve artificializzazione (2); compromessa (3); solo residuale (4)

### 17. Opere di artificializzazione nella stazione e nel suo intorno

riva dx	_____
riva sx	_____
alveo	_____

### 18. Uso del suolo nel territorio circostante il corridoio fluviale

(estensione % in una fascia perfluviale di ampiezza 500 m; per fiumi grandi e molto grandi: 1 km)

riva sx		riva dx
	aree naturali	
	aree seminaturali	
	agricoltura estensiva	
	agricoltura intensiva	
	aree urbanizzate, industriali, strade ed infrastrutture	

<b>19. Attività recenti di disturbo antropico nel corridoio fluviale</b> (valutare estensione ed intensità: 1 lieve, 2 medio, 3 elevato) (considerare sino a 100 m di ampiezza, in funzione delle dimensioni del corso d'acqua)		
riva sx		riva dx
	manutenzione della vegetazione acquatica	
	calpestamento umano e/o animale	
	sfalcio	
	diserbo	
	presenza di terreno di riporto / Rimaneggiamento	
	presenza di rifiuti	
	Incendio	

<b>20. Periphyton</b>			
diffusione		consistenza	
assente		visibile (solo bidimensionale)	
localizzato		lieve (già tridimensionale)	
diffuso		spesso	
molto diffuso		molto spesso	

<b>Bordure subverticali a dominanza di briofite su substrati intrisi duri e/o terrosi (qualora presenti)</b>			<b>facoltativo</b>
riva sx			riva dx
	estensione % lineare della comunità (rispetto alla lunghezza della stazione)		
	ampiezza massima trasversale della comunità (cm)		
	ampiezza media trasversale della comunità (cm)		

riva sx	composizione % della comunità	riva dx
	muschi acrocarpi	
	muschi pleurocarpi	
	epatiche tallose	
	epatiche fogliose	
	altro	

**NOTE:**

<b>21. Dati stazionali della comunità</b> (% di copertura rispetto all'estensione dell'alveo bagnato al momento del rilievo)	
copertura della comunità macrofitica	
copertura cumulativa della comunità macrofitica	
copertura algale	
<b>Taxon</b>	<b>Copertura rilevata (%) ***</b>
Licheni	
Alghe	
Epatiche	
Muschi	
Pteridofite	



DISEGNO IN PIANTA DELL'ALVEO	
100 m	
90 m	
80 m	
70 m	
60 m	
50 m	
40 m	
30 m	
20 m	
10 m	
0 m	

**2040. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI  
DELLA FAUNA ITTICA DEI SISTEMI LOTICI  
GUADABILI**

## INDICE

<b>PREMESSA</b> .....	<b>3</b>
<b>1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE</b> .....	<b>4</b>
<b>2. RIFERIMENTI NORMATIVI</b> .....	<b>4</b>
<b>3. TERMINI E DEFINIZIONI</b> .....	<b>4</b>
<b>5. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURA</b> .....	<b>5</b>
<b>5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO</b> .....	<b>5</b>
5.1 Periodo di campionamento .....	5
5.2 Scelta della stazione .....	5
5.3 Campionamento.....	6
5.3.1. <i>Condizioni per il campionamento</i> .....	6
5.3.2. <i>Sforzo di cattura</i> .....	6
5.3.3. <i>Campionamento quantitativo</i> .....	6
5.3.4. <i>Analisi degli individui catturati</i> .....	8
5.3.5. <i>Campionamento qualitativo</i> .....	8
5.4 Precauzioni per l'incolumità dei Pesci .....	9
5.5 Rilievo stazionario .....	9
<b>6. SICUREZZA</b> .....	<b>9</b>
<b>7. QUALIFICA DEGLI OPERATORI</b> .....	<b>10</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>11</b>
<b>ALLEGATO A</b> .....	<b>15</b>

## PREMESSA

L'inserimento della fauna ittica tra gli elementi di qualità biologica ai fini della definizione dello stato ecologico dei corpi idrici fluviali, così come stabilito dalla Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60/CE, ha determinato la necessità di sviluppare nell'ambito del sistema agenziale e, più in generale, nel sistema dei controlli ambientali, specifiche competenze anche attraverso l'evoluzione delle modalità tradizionali di valutazione della comunità ittica.

Infatti, storicamente la bioindicazione in Italia si è concentrata sull'analisi della comunità macrozoobentonica, e solo nel corso degli ultimi anni si è diffusa la competenza relativa alle comunità acquatiche vegetali, diatomica e macrofitica.

Lo studio della fauna ittica è stato invece tradizionalmente e principalmente orientato a scopi gestionali, attraverso la realizzazione di attività di monitoraggio finalizzate a valutare la distribuzione e la consistenza delle specie di interesse alienico ai fini della pianificazione dei prelievi e ripopolamenti, soprattutto mediante la redazione di Carte Ittiche. Solo nell'ultimo decennio sono stati proposti indici formalizzati finalizzati alla valutazione dello stato della comunità, quali l'Indice Ittico (Forneris et al., 2007), l'EFI+ (EFI+ Consortium, 2009), anche attraverso approcci basati sull'uso di reti neurali (Scardi e Tancioni, 2007).

L'Indice di Stato Ecologico per la Comunità Ittica ISECI, che nella sua ultima versione (Zerunian et al, 2009) è stato adattato alle richieste della WFD ed è stato individuato dalla normativa italiana come metodo ufficiale per la fauna ittica fluviale (D.M. 260/2010), è nato (Zerunian, 2004; 2007) come un indice di tipo naturalistico, mirato a valutare la comunità ittica non solo per le funzioni ecosistemiche da essa svolte, ma anche dal punto di vista della naturalità e della coerenza ecologica. Questo tipo di approccio differisce in modo sensibile da quanto proposto da altri autori ed applicato in altri Paesi, dove vengono privilegiati gli aspetti di funzionalità.

Per l'applicazione di questo metodo si è resa necessaria la predisposizione di uno specifico protocollo di campionamento che, a partire dalle modalità operative già tracciate e formalizzate a livello nazionale ed internazionale (v. riferimenti normativi, Cap.2), permetta da un lato di raccogliere tutti i dati necessari all'elaborazione dell'indice (composizione, abbondanza e struttura di età della fauna ittica) per rispondere alle richieste della Direttiva 2000/60/CE e, dall'altro, di disporre degli strumenti conoscitivi necessari a procedere alla validazione del metodo stesso, nonché alla sua intercalibrazione a scala europea.

Questi ultimi due processi si trovano ad uno stadio iniziale rispetto al percorso effettuato per gli altri elementi di qualità biologica e, per questo motivo, anche lo stesso protocollo può essere considerato come uno strumento di lavoro ancora potenzialmente soggetto a integrazioni e modifiche.

## INTRODUZIONE

Il presente protocollo si basa sul primo protocollo predisposto da APAT nelle prime fasi di avvio dell'implementazione della Direttiva in Italia (Scardi et al., 2007) e, riferendosi esclusivamente alle procedure relative ai campionamenti nei fiumi guadabili di piccole-medie dimensioni, integra le indicazioni derivate dalla letteratura internazionale e dai protocolli utilizzati in diverse realtà, tenendo anche conto delle indicazioni fornite dall'AIAD per la redazione delle Carte Ittiche. Uno degli obiettivi tenuti in conto nella predisposizione del protocollo stesso è stato quello di permettere di costituire, a scala nazionale, un database completo che permetta, anche attraverso analisi di tipo numerico e statistico, la validazione e l'eventuale integrazione e modifica della metodologia di valutazione della comunità ittica, nonché la correlazione dei dati faunistici con le informazioni statiche e dinamiche di tipo stazionale e territoriale (relative, quindi, alle caratteristiche ambientali e di pressione antropica nei diversi siti).

Il presente protocollo rappresenta, in definitiva, un compromesso tra la necessità di disporre di procedure che garantiscano rigore scientifico e offrano la possibilità di elaborazioni statistiche affidabili e l'esigenza di definire modalità operative applicabili su ampia scala nelle diverse realtà.

## 1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo documento definisce le modalità per il campionamento e il rilievo della comunità ittica dei corsi d'acqua guadabili finalizzato alla definizione di composizione, abbondanza e struttura di età della fauna ittica, in linea con le richieste della Direttiva 2000/60/CE e del D. Lgs. 152/06 e dei decreti attuativi DM 131/2008, DM 56/2009 e DM 260/2010, ai fini del monitoraggio e della valutazione dello stato ecologico dei corpi idrici utilizzando tali organismi come elementi di qualità biologica e, più in generale, per la conduzione di campionamenti della fauna ittica standardizzati e replicabili.

Il protocollo fornisce anche l'elenco dei parametri ambientali, stazionali e territoriali, da rilevare allo scopo di disporre di informazioni utilizzabili per l'elaborazione dei dati faunistici.

Ai fini del presente protocollo, si intendono guadabili i corsi d'acqua in cui gli operatori possono accedere in sicurezza a tutte le porzioni dell'area individuata come "stazione" nel periodo previsto per il campionamento. Si prevede quindi che il presente protocollo sia applicabile nei corsi d'acqua con profondità media delle acque non superiore ai 70 cm.

## 2. RIFERIMENTI NORMATIVI

UNI-EN 14011:2003 - Campionamento di pesci mediante elettricità.

UNI-EN 14962:2006 - Linee guida sullo scopo e la selezione dei metodi di campionamento di pesci.

UNI-EN 14996:2006 - Linee guida per assicurare la qualità delle valutazioni biologiche ed ecologiche nell'ambiente acquatico.

## 3. TERMINI E DEFINIZIONI

**Stazione:** porzione di corpo idrico in cui viene effettuato il campionamento ittico, secondo le modalità definite nel presente protocollo. Ogni stazione è suddivisa in due tratti consecutivi, il primo dei quali viene campionato con approccio quantitativo ed il secondo con approccio qualitativo.

**Tratto:** porzione di una stazione di campionamento in corrispondenza della quale si adotta uno specifico approccio di campionamento (quantitativo o qualitativo). Il tratto può avere una lunghezza minima di 50 o di 100 metri (a seconda che la larghezza dell'alveo attivo sia inferiore o uguale a 5m oppure superiore); la lunghezza complessiva deve comunque essere sempre un multiplo di 25m. Ciascun tratto viene suddiviso in incrementi di 25m .

**Incremento:** porzione del tratto di lunghezza pari a 25 m. All'incremento vengono riferiti tutti i dati rilevati, sia di tipo biologico sia stazionali.

## 5. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURA

- autorizzazioni per effettuare l'attività di elettropesca e per l'eventuale attraversamento di proprietà private;
- schede da campo per la registrazione dei dati e matite con gomma e temperino;
- stivali in gomma o altro materiale isolante di altezza adeguata alla profondità del tratto da campionare;
- guanti di gomma, lattice o neoprene (isolanti);
- elettrostorditore;
- attrezzatura di supporto per l'uso dell'elettrostorditore (batteria/e di ricambio, carburante, ecc.);
- guadini con rete a maglia sciolta di 0.5 cm ed asta di lunghezza opportuna per la tipologia ambientale campionata; in caso di utilizzo di una maglia diversa da quella raccomandata deve esserne annotata la misura;
- secchi per il trasporto dei pesci appena catturati, di dimensioni adeguate alla comunità attesa;
- contenitori adeguati per la stabulazione dei pesci in attesa dei rilevamenti morfometrici di dimensione e tipologia idonea rispetto alla comunità ittica attesa (mastelli, contenitori forati, nasse a maglia fine);
- strumentazione per le misurazioni (bilancia elettronica digitale con precisione minima 1 grammo, ittiometro con precisione di 1 millimetro);
- anestetico (se ritenuto opportuno);
- forbici e altri utensili;
- strumentazione portatile per la misura di temperatura, ossigeno disciolto, pH e conducibilità;
- GPS;
- telemetro/rotella metrica;
- stadia o asta graduata.

Ulteriore attrezzatura di utilità

- macchina fotografica;
- aeratori /Ossigenatori;
- borsa frigo per campioni;
- sacchetti di plastica trasparente;
- guide per l'identificazione delle specie.

## 5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

### 5.1 Periodo di campionamento

Il campionamento deve essere effettuato in un periodo in cui le portate idrologiche permettano l'accesso in sicurezza alla stazione di campionamento, le condizioni di trasparenza dell'acqua siano le migliori possibili, evitando nel contempo di interferire con i periodi riproduttivi e con le esigenze biologiche delle specie presenti.

### 5.2 Scelta della stazione

Nell'ambito di ciascun corpo idrico da monitorare deve essere individuato un sito rappresentativo all'interno del quale possono essere localizzate una o più stazioni di campionamento. Tale sito, secondo il giudizio esperto dell'operatore qualificato, deve essere in grado di rappresentare le tipologie e situazioni ambientali nella proporzione in cui esse sono presenti nel corpo idrico stesso. In ciascun sito devono essere individuate una o più stazioni di campionamento rappresentative, sempre sulla base del giudizio esperto.

Il sito di campionamento dovrebbe essere individuato in modo da evitare il campionamento di comunità soggette in tempi recenti (almeno un anno) ad interventi di biomanipolazione (introduzioni, ripopolamenti, prelievi selettivi di massa), che potrebbero determinare errate valutazioni su composizione, abbondanza e struttura della comunità naturale.

Possibilmente, devono essere privilegiati siti e stazioni di campionamento in relazione ai quali esistano già dati pregressi o che siano stati individuati anche per il monitoraggio di altri elementi di qualità biologica.

Una stazione di campionamento è costituita da 2 tratti consecutivi, il primo dei quali dovrà essere campionato con approccio quantitativo ed il secondo con approccio qualitativo.

Per i corsi d'acqua con larghezza dell'alveo attivo uguale o inferiore ai 5 metri, ognuno dei due tratti avrà lunghezza non inferiore a 50 metri. Per i corsi d'acqua con larghezza dell'alveo attivo da 5 a 20 metri i tratti dovranno avere lunghezza non inferiore a 100 metri

Per i corsi d'acqua con larghezza dell'alveo attivo superiore ai 20 metri si rimanda al Protocollo per i corsi d'acqua non guadabili.

## 5.3 Campionamento

### 5.3.1. Condizioni per il campionamento

Al fine di adottare modalità standardizzate e replicabili, il campionamento dovrà essere evitato nelle seguenti condizioni:

- in caso di portate elevate (Anon, 2003);
- in caso di torbidità dell'acqua tale da non consentire di vedere il substrato;
- in caso di pioggia continua;
- in caso di vento intenso (indicativamente superiore a forza 2 della scala Beaufort);
- con temperature dell'acqua inferiori ai 4°C o superiori ai 20°C per i tratti salmonicoli o superiori ai 30°C per i tratti ciprinicoli.

Il campionamento deve essere condotto in orari e condizioni di copertura del cielo tali da consentire un'adeguata illuminazione ai fini dell'individuazione degli esemplari da catturare.

### 5.3.2. Sforzo di cattura

Il campionamento viene effettuato esclusivamente tramite elettro-pesca, utilizzando un elettrostorditore in grado di emettere sia corrente continua (DC) che corrente continua pulsata (PDC).

L'uso della corrente continua (DC = Direct Current) dovrebbe sempre essere privilegiato, in quanto determina un impatto più contenuto. Solamente quando la DC non risulta efficace, neppure ad elevato voltaggio, è opportuno utilizzare la modalità PDC (pulsata); evitando sempre comunque l'uso della corrente alternata (AC).

Nel tratto quantitativo il campionamento deve garantire un livello di efficienza tale da rappresentare la completa comunità ittica presente nel tratto. A tale scopo devono essere eseguite almeno 2 passate. Qualora nella seconda passata il numero di pesci complessivamente catturato non sia inferiore della metà rispetto al numero di pesci catturati con la precedente, si procede ad un'ulteriore passata con le medesime modalità. Tale procedura va ripetuta fino a quando in una passata il numero di esemplari catturati sia inferiore alla metà di quelli prelevati nella passata precedente.

Nel caso in cui alla prima passata non venga catturato alcun esemplare (comunità pressoché inesistente), può non essere eseguita la seconda passata.

Il tratto qualitativo deve essere campionato con una singola passata.

La squadra che opera in alveo dovrà essere costituita da un numero adeguato di operatori in funzione della dimensione del corpo idrico campionato e delle caratteristiche della comunità attesa. Nella maggior parte delle situazioni si reputa idonea una squadra costituita da almeno 4 operatori (1 deputato all'uso dell'elettrostorditore, 2 muniti di guadino, 1 adibito al trasporto dei pesci alle vasche di stabulazione, al periodico controllo delle condizioni degli stessi ed alla registrazione dei dati stazionali).

### 5.3.3. Campionamento quantitativo

Deve essere definita, innanzitutto, la lunghezza della stazione da campionare (tratto quantitativo + tratto qualitativo), in relazione alla larghezza dell'alveo attivo, individuando il punto di inizio e di termine della stazione (è necessario effettuare tutti i rilievi preliminari dalle sponde o, comunque, evitando di camminare all'interno del tratto da campionare).

Ogni tratto (qualitativo o quantitativo) dovrà essere suddiviso in incrementi di 25 m, in corrispondenza del termine di ciascuno dei quali dovranno essere posizionati i contenitori per la stabulazione dei pesci catturati nelle diverse passate. Può essere opportuno numerare i contenitori (nel caso in cui a campionamento quantitativo terminato vengano trasportati tutti nello stesso punto per le misurazioni).

Solo nel caso in cui la comunità attesa sia estremamente semplificata (non più di due specie), può essere evitata la suddivisione del tratto in incrementi.

Prima di iniziare il campionamento è necessario rilevare temperatura, torbidità e conducibilità dell'acqua, anche per determinare le opportune impostazioni (dosaggio) dell'elettroscandaglio.

L'elettroscandaglio deve essere utilizzato col dosaggio minimo efficace, da stabilirsi prima del campionamento in un tratto a valle e a debita distanza dalla stazione di campionamento.

Ad esempio, qualora non sia già noto il dosaggio ottimale dell'elettroscandaglio per la stazione considerata (per precedenti esperienze di campionamento nel medesimo sito), si potrà procedere alla ricerca del dosaggio ottimale utilizzando in prima istanza DC ed aumentando il voltaggio gradualmente (a partire da 100 V con conduttività di 500  $\mu\text{S}$ ); qualora non si raggiunga un risultato efficace (si può arrivare anche a 1000-1100 V in acque con conduttività inferiore ai 100  $\mu\text{S}$ ), si potrà passare all'utilizzo della PDC (procedendo per incrementi graduali del voltaggio come effettuato in precedenza per la DC). Se l'esito rimane negativo si dovrà aumentare la durata (senza comunque superare i 5 milliSec), quindi l'ampiezza del segnale e, infine, la frequenza (senza mai superare i 60 Hz). In acque basse, dove più frequentemente sono presenti pesci di piccole dimensioni, è bene non superare di norma i 30 Hz; in acque più profonde possono essere raggiunti i 40 Hz, mentre in quelle molto profonde possono essere necessarie anche frequenze di 50-60 Hz (ma solo per brevi periodi).

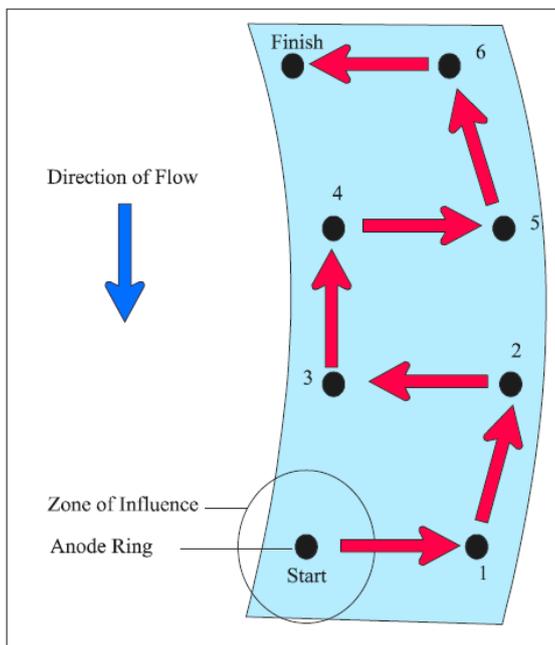


Figura 1 - Schema campionamento

Una volta stabilito il dosaggio minimo efficace, si procede al campionamento percorrendo il tratto da valle verso monte (Fig. 1), con l'operatore munito di elettroscandaglio in posizione avanzata, gli operatori con il guadino ai lati ed arretrati di circa 1 metro dal primo, l'operatore con secchio e materiale per la registrazione dei dati dinamici in coda, ma in posizione tale, comunque, da consentire un agevole trasferimento dei pesci nel secchio. La squadra procede alternando un tratto lineare verso monte ad un tratto di attraversamento trasversale del corso d'acqua. La lunghezza dei tratti verso monte non dovrebbe superare di 2-3 volte la lunghezza operativa dell'anodo immancato.

Laddove non si incontrino ricoveri o habitat idonei ai pesci o, comunque, non si sospetti possano essere presenti pesci e l'habitat sia omogeneo, deve essere impresso all'anodo un movimento continuo e a forma di W, in modo da esplorare tutto lo spazio alla portata dell'operatore;

L'operatore adibito al trasporto del secchio nel quale vengono raccolti i pesci appena catturati deve provvedere al regolare ricambio parziale dell'acqua.

Lo svuotamento dei secchi contenenti i pesci catturati deve avvenire in corrispondenza dei punti di raccolta al termine di ogni segmento incremento. È necessario svuotare i secchi

quando il tempo di permanenza e/o il numero di esemplari contenuti rischiano di essere eccessivo. Ciò dipende dalle dimensioni dei secchi e dalla temperatura dell'acqua, nonché dalle specie presenti e dalle taglie degli esemplari.

Per lo svuotamento dei secchi l'operatore deve raggiungere la sponda seguendo la via più breve per uscire dall'acqua e, avendo l'accortezza di mantenersi sempre a valle della squadra, raggiungere il punto di raccolta più a monte procedendo sulla terraferma.

Al termine della passata deve essere registrato il tempo impiegato, al netto di eventuali interruzioni, il numero di esemplari complessivamente catturati (indipendentemente dalla specie di appartenenza).

La squadra deve tornare al punto di inizio della stazione di campionamento procedendo lungo le rive, controllando le condizioni dei pesci stabulati nelle vasche e procedendo al parziale ricambio dell'acqua e all'eventuale areazione.

Raggiunto il punto di inizio del tratto si procede con la passata successiva, adottando identica procedura e impegnandosi ad applicare il medesimo sforzo (velocità di progressione, accuratezza nell'esplorazione, dosaggio dell'elettroscandaglio, operatori).

Nel corso della seconda passata l'operatore di coda potrà rilevare al termine di ogni incremento anche i dati stazionali previsti dalla scheda.

A partire dalla seconda passata, terminato il campionamento si confronta il numero di individui catturati rispetto a quello della precedente passata e, qualora non sia inferiore del 50%, si procederà ad una successiva passata con le medesime modalità delle precedenti, sino ad un massimo di 4 ripetizioni.

Gli individui catturati nel corso della prima passata vanno tenuti separati da quelli campionati nelle passate successive (fermo restando la necessità di contare ed annotare separatamente gli esemplari catturati in ciascuna passata).

#### **5.3.4. Analisi degli individui catturati**

Concluse le operazioni di elettropesca si raccolgono i contenitori con i pesci stabulati per procedere alla determinazione ed alle misurazioni degli individui. In alternativa, le misure possono essere effettuate nei diversi punti di raccolta.

I dati rilevati devono essere distinti sia per singola passata (o, almeno, mantenendo separati quelli della prima passata da quelli delle successive), per consentire la stima dell'abbondanza, dell'efficienza di cattura, del tasso di catturabilità specie-specifico e taglia-specifico, sia per singolo incremento.

Per ciascuno degli individui catturati devono essere annotati:

- 1) Specie
- 2) Lunghezza totale (in mm)
- 3) Peso (rilevato alla precisione minima di 1 grammo).
- 4) Eventuali anomalie esterne di coda, pinna dorsale, pinna anale, pinne pettorali, corpo, testa, occhi, narici, labbri, opercoli, barbigli, quali:
  - pigmentazione anomala;
  - forma anomala;
  - riduzione anomala (es. accorciamento opercoli);
  - aumento anomalo (es. esoftalmia: occhio rigonfio, protruso);
  - assenza anomala (es. assenza di barbigli);
  - erosione delle pinne;
  - escrescenze, rigonfiamenti, tumefazioni, noduli;
  - lesioni;
  - emboli (vescicole gassose);
  - emorragie;
  - presenza di funghi;
  - presenza di vermi.

Benché sia sempre preferibile misurare e pesare tutti gli esemplari catturati, è possibile, quando il numero di esemplari sia superiore alle 500 unità, procedere al rilevamento delle morfometrie e degli altri dati su un esemplare ogni 3 o 5 individui (a seconda dell'entità complessiva del campione e delle condizioni operative), senza operare alcuna scelta arbitraria sull'esemplare da misurare (fermo restando che tutti gli individui dovranno comunque essere contati e attribuiti alla specie di appartenenza).

Qualora il campione sia straordinariamente numeroso è possibile utilizzare un subcampionamento ancora più limitato, che garantisca, in ogni caso, un campione di individui misurati e pesati non inferiore alle 50 unità per specie. La decisione di operare o meno una forma di subcampionamento su una o più specie deve essere presa prima di iniziare le misurazioni. Gli esemplari delle specie poco frequenti nel campione ( $N_i < 50$ ) devono essere tutti pesati e misurati.

Gli esemplari pesati e misurati devono essere rilasciati in prossimità dell'incremento nel quale sono stati catturati.

#### **5.3.5. Campionamento qualitativo**

Si procede quindi al campionamento tramite singola passata del tratto qualitativo, anch'esso suddiviso in incrementi di 25m.

Lo scopo del campionamento lungo il tratto qualitativo consiste esclusivamente nella determinazione delle specie incontrate.

Qualora, considerando anche gli incrementi del precedente tratto quantitativo, non vengano contattate specie nuove per 4 incrementi consecutivi, il campionamento qualitativo può essere interrotto. Ad esempio: se dopo il primo incremento del tratto quantitativo non vengono incontrate più specie nuove, si può concludere il

campionamento una volta effettuato il primo incremento del tratto qualitativo (evitando, così, di effettuare i rimanenti 3).

## 5.4 Precauzioni per l'incolumità dei Pesci

Indipendentemente dal tipo di corrente utilizzata, si deve partire da un voltaggio ridotto e con una frequenza bassa (es. 100 V e 30 Hz), aumentando gradualmente i livelli sino a quando il dosaggio impostato non diviene efficace per la cattura dei pesci (è necessario tenere in considerazione che oltre i 40 Hz il rischio di danno per i pesci diviene consistente).

Poiché i pesci sono maggiormente vulnerabili ai campi elettrici alle alte temperature, non dovrebbero essere condotti campionamenti con temperatura dell'acqua superiore ai 20 °C per le specie di acque fredde e ai 30°C per quelle di acque fresche o calde. E' opportuno, inoltre, evitare di campionare anche quando la temperatura è inferiore ai 4°C.

E' opportuno non prolungare eccessivamente l'attività di elettropesca in uno spazio limitato.

Gli operatori devono controllare spesso i guadagni perché può accadere che vi entrino esemplari senza che l'operatore se ne accorga (ciò può comportare un rischio per l'incolumità degli esemplari che verrebbero sottoposti a scariche elettriche eccessive).

Deve essere evitato il contatto diretto degli esemplari con l'anodo (la zona di danno potenziale per i pesci è a 50 cm dall'anodo).

E' necessario interrompere il campionamento, o modificare le impostazioni dell'elettrostorditore, qualora si rilevino danni troppo frequenti o segni di stress eccessivo sui pesci catturati.

E' opportuno segnalare sulla scheda di campo i casi e le cause di mortalità.

E' necessario cambiare spesso un'adeguata quota d'acqua nei secchi di trasporto. Analogamente, deve essere cambiata un'adeguata quota d'acqua nelle vasche di stabulazione presso i punti di raccolta secondo le necessità. In caso di temperature elevate, qualora non si disponga di vasche che consentono il naturale riciclo dell'acqua, è necessario utilizzare aeratori (almeno per le vasche contenenti i pesci della prima passata, più numerosi e destinati ad una più lunga attesa prima del rilascio) e/o ossigenatori.

Dopo i rilevamenti morfometrici i pesci devono essere stabulati in vasche areate e monitorati per rilevare eventuali stress e danni (bande scure, tempo di recupero eccessivamente lungo, danni spinali) prima di essere rilasciati.

I piccoli pesci dovrebbero essere sempre mantenuti separati dai soggetti di grandi dimensioni.

## 5.5 Rilievo stazionario

Sulla scheda di campionamento devono essere riportate le informazioni necessarie per la localizzazione della stazione.

Ai fini di una caratterizzazione di maggior dettaglio della stazione, devono essere rilevati ed annotati sulla scheda i valori relativi ad alcuni parametri fortemente condizionanti la distribuzione e la composizione della comunità ittica.

I dati ambientali e di supporto possono essere ottenuti con 3 modalità:

- A. Rilevati/stimati sul campo tramite strumentazione adeguata.
- B. Rilevati/stimati a posteriori da riprese fotografiche standardizzate effettuate sul campo.
- C. Reperiti a priori o a posteriori del campionamento da bibliografia, cartografia, SIT/GIS, foto aeree, web.

## 6. SICUREZZA

Il campionamento e l'analisi in campo sono generalmente pericolosi. Gli operatori che utilizzeranno questo protocollo dovranno avere la sufficiente formazione per le normali pratiche di laboratorio e di analisi in campo.

Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso. È responsabilità degli Organi preposti di definire i dispositivi più opportuni di protezione individuale e di individuare le azioni necessarie ad assicurare la sicurezza degli operatori secondo le disposizioni di legge.

## **7. QUALIFICA DEGLI OPERATORI**

Il personale coinvolto nelle attività di monitoraggio biologico deve essere qualificato sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento, esperienza e/o comprovata abilità.

In particolare, almeno due degli operatori che eseguono il campionamento e l'analisi delle specie ittiche devono possedere adeguata e documentata preparazione (diploma di laurea e/o specializzazione post-universitaria) in campo ecologico, idrobiologico e tassonomico (pesci) e devono aver compiuto un percorso di apprendimento in affiancamento ad operatori esperti o frequentando un apposito corso di formazione.

Il mantenimento della qualifica del personale coinvolto nel monitoraggio con la fauna ittica deve essere periodicamente verificato, anche attraverso la partecipazione a confronti interlaboratorio organizzati da istituzioni o organizzazioni di riconosciuta competenza.

## BIBLIOGRAFIA

AA.VV., 2008 - A field manual of scientific protocols for capture, handling, and tagging of wild salmonids in the Upper Columbia River Basin using passive integrated transponder (PIT) tags within the Upper Columbia Monitoring Strategy. Working Version 2008 - Bonneville Power Administration's Integrated Status and Effectiveness Monitoring Program. Terraqua Inc. Wauconda, WA.

APAT, 2007 – Protocollo di campionamento e analisi della fauna ittica dei sistemi lotici. In: “Metodi Biologici per le Acque. Parte I”. Manuali e Linee Guida APAT, Roma, pp.31.

APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006

Baltanàs A., 1992. On the use of some methods for estimation of species richness. *Oikos*, 65: 484-492.

Barbour M.T., Gerritsen J., Snyder B.D. & Stribling J.B., 1999. Rapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadable Rivers: Peryphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, Second Edition. EPA 841-B-99-002. U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington, D.C., pp.372.

Beaumont W.R.C., Taylor A.A.L. & Welton J.S., 2002. Guidelines for Electric Fishing Best Practice. R&D Technical Report W2-054/TR. Environmental Agency, Bristol, pp.197.

Bohlin, T., 1990 - Estimation of population parameters using electric fishing: aspects of the sampling design with emphasis on salmonids in streams. In: I.G. Cowx (ed). *Developments in Electric Fishing*. Fishing News Books, Blackwell Scientific Publications, Oxford

Bohlin, T., Heggberget, T.G., Strange, C., 1990 - Electric fishing for sampling and stock assessment. In: Cowx, Lamarque 'Fishing with Electricity - Applications in Freshwater Fisheries Management.' Ed. Fishing News Books, Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Boulinier T, Nichols J.D., Sauer J.R., Hines J.E. & Pollock K.H., 1998. Estimating species richness: the importance of heterogeneity in species detectability. *Ecology*, 79(3): 1018-1028.

Bozek M.A. & Rahel F.J., 1991. Comparison of Streamside Visual Counts to Electrofishing Estimates of Colorado River Cuthroat trout Fry and Adult. *North American Journal of Fisheries Management* 11:38-42.

Copp G.H., 1989. Electrofishing for fish larvae and 0+ juveniles: equipment modifications for increased efficiency with short fishes. *Aquaculture and Fisheries Management*: 453-462.

Cowx I.G. & Fraser D., 2003. Monitoring the Atlantic Salmon. *Conserving Natura 2000 Rivers Monitoring Series N.7*. English Nature, Peterborough, pp.39.

Cuplin P., 1986. Fish. In: *Inventory and Monitoring of Wildlife habitat*. Cooperrider A.Y., Boyd R.J. & Stuart H.R. (eds.). U.S. Dept. Inter., Bur. Land Manage. Service Center. Denver, pp.858: 257-266.

Dalbey S.R., McMahon T.E. & Fredenberg W., 1996. Effect of Electrofishing Pulse Shape and Electrofishing-Induced Spina Injury on Long-Term Growth and Survival of Wild Rainbow Trout. *North American Journal of Fisheries Management* 16: 560-569.

Ecological Assessment Section Division of Water Quality Planning & Assessment, 1989. *Biological Criteria for the Protection of Aquatic Life. Volume III: Standardized Biological Field Sampling and Laboratory Methods for Assessing Fish and Macroinvertebrate Communities*. EPA (US Environmental Protection Agency, Ohio) pp.61.

EFI+ CONSORTIUM, 2009. Manual for the application of the new European Fish Index - EFI+. A fish based method to assess the ecological status of European running water in support of the Water Framework Directive, pp.45.

Elliott J.M., 1990. Mechanism responsible for population regulation in young migratory trout, *Salmo trutta*. III. The role of territorial behaviour. *Journal of Biogeography* 59:803-818.

FCC - Scottish Fisheries Co-ordination Centre, 2007. Manage Electrofishing Operations. Training Manual. Fisheries Management SVQ Level 3, Inverness/Barony College, pp.78.

FCC - Scottish Fisheries Co-ordination Centre, 2007. Catch Fish Using Electrofishing Techniques. Introductory Electrofishing Training Manual. Fisheries Management SVQ Level 2, Inverness/Barony College, pp.44.

Ferson S. & Akçakaya H.R., 1990. RAMAS/age User Manual: Modelling Fluctuations in Age - structured Populations, pp.143. Exeter Software. Setauket, New York.

Flotemersch J.E., Stribling J.B. & Paul M.J., 2006. Concepts and Approaches for the Bioassessment of Non-wadable Streams and Rivers. EPA 600-R-06-127. US Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, pp.245.

Fukushima M., 2001. Salmonid habitat-geomorphology relationships in low-gradient streams. *Ecology*, 82(5): 1238-1246.

Gorman O.T. & Karr J.R., 1978. Habitat structure and stream fish communities. *Ecology* 59(3): 507-515.

Gowan C. & Fausch K.D., 1996. Long-term demographic responses of trout populations to habitat manipulation in six Colorado streams. *Ecological Applications* 6(3): 931-946.

Greenwood J.J.D., 1996. Basic techniques. In "Ecological Census Techniques - a handbook" (ed. Sutherland W.J.), Cambridge University Press: 11-110.

Gruppo di Lavoro Salmonidi, 2014. I Salmonidi italiani: linee guida per la conservazione della biodiversità. Associazione Italiana Ittiologi Acque Dolci (A.I.I.A.D.), pp.73

Habera J.W., Kulp M.A., Moore S.E. & Henry T.B., 2010. Three-Pass Depletion Sampling Accuracy of Two Electric Fields for Estimating Trout Abundance in a Low-Conductivity Stream with Limited Habitat Complexity. *North American Journal of Fisheries Management* 30:757-766.

Hansen M.J., Newman S.P. & Edwards C.J., 2004. A Reexamination of the Relationship between Electrofishing Catch Rate and Age-0 Walleye Density in Northern Wisconsin Lakes. *North American Journal of Fisheries Management* 24:429-439.

Higgins K.F., et al., 1994. Vegetation Sampling and Measurement. In: Research and management techniques for wildlife and habitats, pp.: 567-605. T.A. Bookhout (ed.). Fifth ed. The Wildlife Society, Bethesda, Md.

Hillman T.W., 2004. Monitoring strategy for the upper Columbia Basin. Draft Report. Upper Columbia Basin Monitoring Plan, pp.105.

Hughes R.M., Kaufmann P.R. & Weber M.H., 2011. National and regional comparison between Strahler order and stream size. *J.N.Am.Benthol. Soc.*, 2011, 30(1)

Humpl M. & Lusk S., 2006. Effect of multiple electro-fishing on determining the structure of fish communities in small streams. *Folia Zool.* -55(3): 315-322.

Hurlbert S.H., 1984. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. *Ecological Monographs*, 54(2): 187-211.

ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.

Institutional Animal and Care Committee, 2011. Electrofishing Guidelines. IACUC Michigan University.

JCGM 100, 2008. Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement. Working Group 1 of the Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM/WG1), pp.134. (GUM 1995 with minor corrections).

Johnston T., 2010. Capturing Wild Fishes by Electrofishing. Standard Operating Procedures. Laurentian University, pp.2.

Justus B., 1994. Observations on Electrofishing Techniques for Three Catfish Species in Mississippi. Proc. Annu. Conf. Southeast Assoc. Fish and Wildl. Agencies 48:524-532.

Kanno Y., Vokoun J.C., Dauwalter D.C., Hughes R.M., Herlihy A.T., Maret T.R. & Patton T.M., 2009. Influence of Rare Species on Electrofishing Distance When Estimating Species Richness of Stream and River Reaches. Transactions of the American Fisheries Society 138: 1240-1251.

Forneris G., Merati F., Pascale M., Perosino G.C., 2007 - Indice Ittico - I.I. *Biologia Ambientale*, 21 (1): 43-60.

Lasne E., Bergerot B., Lek S. & Laffaille P., 2007. Fish zonation and indicator species for the evaluation of the ecological status of rivers: example of the Loire Basin (France). *River Research and Applications* 23(8): 877-890.

Macchio S., 2007. Progetto per il Monitoraggio Faunistico ed Ambientale Finalizzato al Miglioramento delle Capacità Ittiogeniche Naturali dei Corsi d'Acqua Provinciali. Relazione Tecnica della Sezione Faunistica della Polizia Provinciale della Spezia, pp. 1557 (2007).

Manly B.F.J., 1990 *Stage-Structured Populations: Sampling, Analysis and Simulation*. Chapman & Hall, London.

Maret T.R. & Ott D.S., 2002. Assessment of fish assemblages and minimum sampling effort required to determine biotic integrity of large rivers in southern Idaho. USGS Water-Resources Investigations Report 03-4274, pp.17.

Mazzoni R., Fenerich-Verani N. & Caramaschi E.P., 2000. Electrofishing as a sampling technique for coastal stream fish population and communities in the southeast of Brazil. *Rev.Brasil.Biol.*, 60(2): 205-216.

McArdle B.H., 1990. When are rare species not there? *Oikos* 57(2):276-277.

McGrath C.J., Beausang T.J., Murphy D.F. & Sharkey P.J., 1969. Application of Electricity to Freshwater Fishery Management and Development in Ireland. EIFAC Occasional Paper N.3, pp.43. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

McInerney M.C. & Cross T.K., 2004. Comparison of day electrofishing, night electrofishing, and trap netting for sampling inshore fish in Minnesota lakes. Minnesota Department of Natural Resources. Special Publication 161, pp.49.

Miranda L.E. & Kratochvíl M., 2008. Boat Electrofishing Relative to Anode Arrangement. Transactions of the American Fisheries Society 137: 1358-1362.

Moore K., Jones K., Dambacher J., Burke J. & Stein C., 1999. Surveying Oregon's streams "A snapshot in time" - Aquatic Inventory Project, Oregon Department of Fish and Wildlife's Restoration. Bowers P. (ed.), pp.272.

National Marine Fisheries Service, 2000. Guidelines for Electrofishing Waters Containing Salmonids Listed Under the Endangered Species Act. NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration), pp.5.

Novotny D.W. & Priegel G.R., 1971. A guideline for portable directly current electrofishing systems. Technical Bulletin N.51. Department of Natural Resources, Madison, Wisconsin 53701, pp.15.

Perrow M.R., Côté I.M. & Evans M., 1996. Fish. In: *Ecological Census Techniques*. Sutherland W.J. (ed.). Cambridge University Press, pp.336: 178 - 204.

Reynolds L., Herlihy A.T., Kaufmann P.R., Gregory S.V. & Hughes R.M., 2003. Electrofishing Effort Requirements for Assessing Species Richness and Biotic Integrity in Western Oregon Streams. *North American Journal of Fisheries Management* 23:450-461.

Scardi M., Tancioni L., 2007 - Un metodo basato sulla fauna ittica e su tecniche di Intelligenza Artificiale per la valutazione dello stato ecologico dei fiumi ai sensi della Direttiva 2000/60/CE. *Biologia Ambientale*, 21 (2): 31-41.

Scott R., Ward D., Clark B. & Makinster A., 2008. History and Development of Long-term Fish Monitoring with Electrofishing in Grand Canyon, 2000-2007. Arizona Game and Fish Department, Research Branch, pp.70.

Stromberg L.P., 1995. Vegetation Sampling Methods for Use in Wildlife Habitat Evaluation. In: *The Development of International Principles and Practices of Wildlife Research and Management - Asian and American Approaches*. Berwick S.H & Saharia V.B. (eds.). Oxford University Press.: 133-174.

Syracuse Research Corporation, ESC-DVO, 2001. Fish Collection by Seining or Electrofishing. Technical Standard Operating Procedure. SOP No.: SRC-OGDEN-03, pp.22.

Temple G.M. & Pearson T.N., 2007. Electrofishing: Backpack and Drift Boat. In "Salmonid field protocols handbook - techniques for assessing status and trends in Salmon and Trout populations". American Fisheries Society, pp.478.

Terraqua Inc., 2009. A field manual for electrofishing protocol of the upper Columbia monitoring strategy. Draft: 2009 Working Version. Terraqua, Inc., Wauconda, WA, pp.22.

Thompson W.L., White G.C. & Gowan C., 1998. *Monitoring Vertebrate Populations*. Academic Press Inc., pp. 367.

Toft C.A. & Shea P.J., 1983. Detecting community - wide patterns: estimating power strengthens statistical inference. *Am. Nat.*, 122(5): 618-625.

Tokeshi M., 1996. Power fraction: a new explanation of relative abundance patterns in species-rich assemblages. *Oikos* 75: 543-550.

#### Testi per tassonomia e nomenclatura

Zerunian S., 2002 - Condannati all'estinzione? Biodiversità, biologia, minacce e strategie di conservazione dei Pesci d'acqua dolce indigeni in Italia. Edagricole, Bologna, X + 220 pp

Zerunian S., 2003. Piano d'azione generale per la conservazione dei Pesci d'acqua dolce italiani. Quad. Cons. Natura, 17, Min. Ambiente - Ist. Naz. Fauna Selvatica, pp.129.

Zerunian S., 2004. Pesci delle acque interne d'Italia. Quad.Cons.Natura, 20, Mi.Ambiente – Ist.Naz. Fauna Selvatica, pp.265.

Zerunian S., 2004. Proposta di un Indice dello Stato Ecologico delle Comunità Ittiche viventi nelle acque interne italiane. *Biologia Ambientale*, 18(2):25-30.

Zerunian S., 2007. Primo aggiornamento dell'Indice dello Stato Ecologico delle Comunità Ittiche. *Biologia Ambientale*, 21(2):43-47.

Zerunian S., Goltara A., Schipani I. & Boz B., 2009. Adeguamento dell'Indice dello Stato Ecologico delle Comunità Ittiche alla Direttiva Quadro sulle Acque 2000/60/CE. *Biologia Ambientale*, 23(2):15-30.

**ALLEGATO A – Scheda di campionamento**



FIUME		STAZ (nome e cod.)			DATA	N.SCHEDA		
<b>NOTE (rapporto subcampionamento, specie interessate, altro):</b>								
ID	SP./SEG./PASS.	L	P	ID	SP./SEG./PASS.	L	P	ID/NOTE
1				23				
2				24				
3				25				
4				26				
5				27				
6				28				
7				29				
8				30				
9				31				
10				32				
11				33				
12				34				
13				35				
14				36				
15				37				
16				38				
17				39				
18				40				
19				41				
20				42				
21				43				
22				44				

ID	SP./SEG./PASS.	L	P	ID	SP./SEG./PASS.	L	P	ID/NOTE
1				27				
2				28				
3				29				
4				30				
5				31				
6				32				
7				33				
8				34				
9				35				
10				36				
11				37				
12				38				
13				39				
14				40				
15				41				
16				42				
17				43				
18				44				
19				45				
20				46				
21				47				
22				48				
23				49				
24				50				
25				51				
26				52				

ID: per scheda serve per richiamare il numero del record nel caso di annotazioni aggiuntive sull'esemplare misurato.

Sp./SEG./PASS.: n questa colonna deve essere inserito il numero di segmento e di passata ad ogni inizio di segmento trattato e, successivamente, la specie di appartenenza dell'esemplare misurato.

L: lunghezza totale

PARAMETRI STAZIONALI	
1	Temperatura
2	Conducibilità elettrica
3	Ossigeno disciolto
4	pH
5	Trasparenza dell'acqua
6	Condizioni meteo
7	Larghezza alveo attivo
8	Larghezza alveo bagnato
9	Ombreggiamento
10	Mesohabitat
11	Profondità
12	Tipo di flusso
13	Microhabitat – Tipologia di substrati
14	Copertura % vegetazione/materiale organico in alveo
15	Presenza evidente di schiume di origine sintetica e/o idrocarburi
16	Evidenza di attività antropica in alveo
17	Barre di meandro e/o isole

**Note:**

I dati 1-5 (chimico-fisici) devono essere rilevati una sola volta prima dell'inizio del campionamento ittico.	
I dati 6 (condizioni meteo) devono essere rilevati all'inizio e al termine del campionamento ittico.	
I dati 7-8 (larghezza alveo) devono derivare dalla media di non meno di 3 misurazioni effettuate in punti adeguatamente distanziati della stazione.	
I dati 9-10 (Ombreggiamento e Mesohabitat) devono essere forniti stimandone la % di copertura su ciascun segmento.	
I dati 11-14 (Profondità, Tipo di flusso, Microhabitat, Vegetazione/materiale organico) devono essere forniti in % di copertura per ciascun segmento del tratto quantitativo e per l'intero tratto qualitativo procedendo nel seguente modo:	
<b>A</b>	seguendo il percorso seguito dalla squadra, effettuare ogni 2 metri (4-5 passi) un'osservazione in un intorno di 1 metro e attribuendo a tale plot la tipologia dominante;
<b>B</b>	calcolare la percentuale di plot dominati da ciascuna tipologia;
<b>C</b>	integrare l'informazione attribuendo alle tipologie risultate escluse dal campionamento, in quanto rare o molto circoscritte (ma effettivamente osservate), una stima della copertura % sul segmento considerato.
<b>D</b>	relativamente alla vegetazione/materiale organico, stimare la copertura % totale occupata dall'insieme di tale variabile (indipendentemente dalle tipologie di dettaglio) sulla superficie di ciascun segmento.
I dati 15-17 (schiume/idrocarburi, disturbo antropico, barre/isole) devono essere registrati come presenza/assenza per ciascun segmento campionato o sull'intero tratto.	

FIUME		STAZ (nome e cod.)			DATA	N.SCHEDA		
Vara		Castiglione XXX			xxxxx	1/8		
NOTE (rapporto subcampionamento, specie interessate, altro): <b>Cavedano e Barbo</b> <b>subcampionati 1/3</b>								
ID	SP./SEG./PASS.	L	P	ID	SP./SEG./PASS.	L	P	ID/NOTE
1	<i>S1/P1</i>	/	/	23	...			
2	<i>CAV.</i>	<i>14</i>	<i>23</i>	24	<i>BAR</i>	<i>10.1</i>	<i>10</i>	1/p.caudale erosa
3	<i>ANG</i>	<i>31.1</i>	<i>69</i>	25				
4	<i>BAR</i>	<i>5.8</i>	<i>2</i>	26				
5	<i>BAR.CAN.</i>	<i>10.6</i>	<i>12</i>	27				
6	...			28				
7	<i>S2/P1</i>	/	/	29				
8	...			30				
9				31				
10				32				
11				33				
12				34				
13				35				
14				36				
15				37				
16				38				
17				39				
18				40				
19				41				
20				42				
21				43				
22				44				

---

**3000. METODICHE DI RIFERIMENTO PER IL  
CAMPIONAMENTO DEGLI ELEMENTI DI QUALITÀ  
BIOLOGICA NEI LAGHI.**

---

# **3010. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO DEI MACROINVERTEBRATI NEGLI AMBIENTI LACUSTRI**

**Manuali e Linee Guida  
111/2014**

## **INDICE**

<b>INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>1. SCOPO</b> .....	3
<b>2. RIFERIMENTI</b> .....	3
<b>3. TERMINI E DEFINIZIONI</b> .....	3
<b>4. STRUMENTAZIONE E ATTREZZATURA</b> .....	4
4.1 Materiale da campo.....	4
<b>5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO</b> .....	5
5.1 Periodo di campionamento .....	5
5.2 Scelta dei siti di campionamento e posizionamento dei transetti.....	5
5.3 Posizionamento delle stazioni di campionamento .....	6
5.4 Prelievo dei campioni .....	7
5.5 Substrato da campionare e strumenti di campionamento.....	8
5.6 Specifiche per l'uso di benne e carotatori.....	8
5.8 Metodo a supporto dell'identificazione tassonomica.....	9
5.9 Parametri di supporto al campionamento dei macroinvertebrati .....	9
5.12 Specifiche per gli invasi.....	9
<b>6. PROCEDURE ANALITICHE</b> .....	10
6.1 Trattamento preliminare del campione .....	10
6.2 Trattamento del campione in campo e in laboratorio.....	11
6.3 Conservazione dei campioni .....	12
<b>7. SICUREZZA</b> .....	12
<b>8. QUALIFICA DEGLI OPERATORI</b> .....	12
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	13
<b>ALLEGATO A</b> .....	14

## INTRODUZIONE

I macroinvertebrati bentonici lacustri vivono all'interno del sedimento (endobentos) o su di esso (epibentos); nel sedimento essi spesso costruiscono tubi (Oligocheti, Chironomidi) o si muovono sopra di esso (bentos vagile, Crostacei, Efemerotteri etc.). Nei sedimenti possono infine svolgere l'intero ciclo vitale (Oligocheti) o solo una parte di esso (Insetti).

I sedimenti svolgono un ruolo fondamentale nei processi chimici e biologici dell'ecosistema lacustre, in quanto le sostanze disciolte nell'acqua sovrastante vi si accumulano; la capacità di trattenere o rilasciare diversi elementi (il fosforo ad es.) condiziona lo stato trofico e la produttività del lago.

Il protocollo di campionamento per il monitoraggio qui proposto è standardizzato e quindi utile a raccogliere dati che sono funzionali alla valutazione dello stato ecologico attraverso l'applicazione dell'indice di qualità basato sui macroinvertebrati.

## 1. SCOPO

Questo documento definisce le modalità per il campionamento e la determinazione della composizione e dell'abbondanza dei macroinvertebrati in linea con le richieste della Direttiva 2000/60/CE, del D.Lgs. n. 152/2006 e dei decreti attuativi (DM n. 131/2008, DM n. 56/2009 e DM n. 260/2010) ai fini del monitoraggio e della valutazione dello stato ecologico.

Il presente documento definisce le modalità per il rilevamento della comunità di macroinvertebrati di tutte le tipologie di laghi naturali o invasi appartenenti alle due ecoregioni alpina e mediterranea. La metodologia descritta può comunque essere utilizzata come base per attuare rilievi con finalità diverse dalla classificazione dello Stato Ecologico, quali applicazioni di studio e/o ricerca.

## 2. RIFERIMENTI

ISO 5667-4. 1987. Water quality. Sampling – Part 4: Guidance on sampling from lakes, natural and man-made.

ISO 9391. 1993. Water quality. Sampling in deep waters for macro-invertebrates. Guidance on the use of colonization, qualitative and quantitative samplers: 13 pp.

ISO 10870. 2012. Water quality. Guidelines for the selection of sampling methods and devices for benthic macroinvertebrates in fresh waters: 24 pp.

UNI EN ISO 5667-1. Qualità dell'acqua, Campionamento - Parte 1: Linee guida per la definizione dei programmi e delle tecniche di campionamento.

## 3. TERMINI E DEFINIZIONI

Per il seguente protocollo si applicano i seguenti termini e definizioni (in ordine alfabetico):

**Zona litorale o costiera o neritica** (laghi naturali – Fig. 1): strato d'acqua superficiale (epilimnio) dove arriva la radiazione luminosa (zona eufotica), compreso tra la linea dell'acqua (0 m) ed alcuni metri di profondità. In genere, coincide con il limite inferiore di sviluppo delle macrofite sommerse. Presenta substrato molto variabile a seconda dell'influenza del moto ondoso che può o meno eroderlo. Nel contesto nazionale, questa zona si estende da un minimo di 5-7 m a un massimo di 20-25 m.

**Zona sublitorale (laghi naturali)**: compresa fra epilimnio ed ipolimnio; presenta attenuazione della luce incidente. Quando il lago si trova nella condizione di massima stratificazione, corrisponde al metalimnio. Nei laghi con buona trasparenza, la zona sublitorale è situata sotto la fascia litorale ed è delimitata dallo sviluppo delle macrofite sommerse. Presenta un substrato prevalentemente uniforme per deposito di materiale dalla zona litorale dovuto al moto ondoso. Spesso coincide con la profondità limite per molte specie di molluschi ed è quindi zona di deposito di conchiglie (*shell zone*).

**Zona profonda o bentonica** (laghi naturali): compresa fra metalimnio e le massime profondità. Costituisce la zona ipolimnica di un lago. Non si ha penetrazione della radiazione luminosa ed è in genere costituita da substrato uniformemente fine.

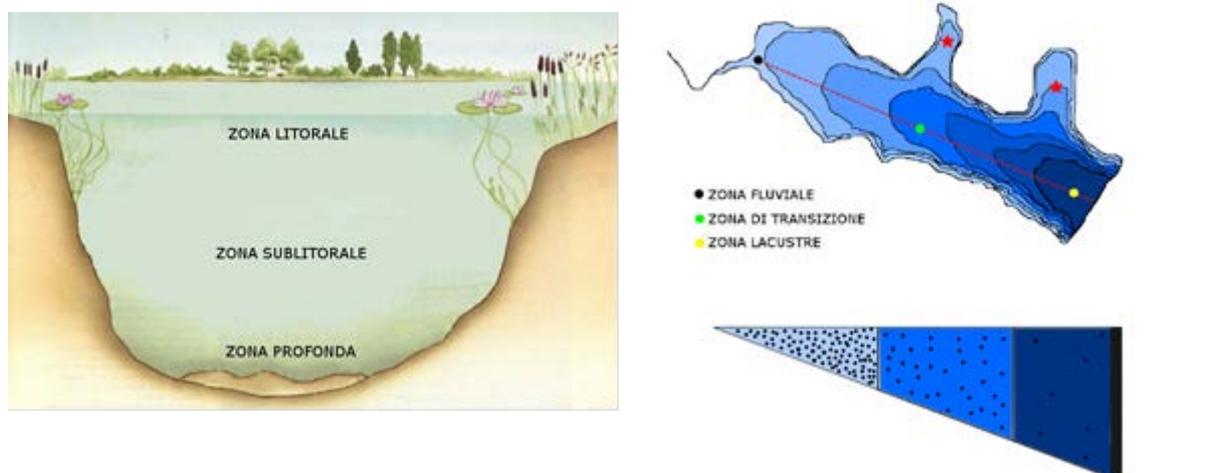
**Zona fluviale o lotica** (invasi - *upper riverine zone*, Fig. 1): è caratterizzata dalla presenza di un substrato a materiale grossolano (ciottoli, sassi), da una velocità di corrente simile a quella dell'immissario, forte torbidità delle acque e quindi luce limitata.

**Zona di transizione** (invasi - *transition o mixing zone*): presenta un notevole rallentamento del flusso d'acqua e una prima sedimentazione del particolato, generalmente povero rispetto a un lago naturale.

**Zona lacustre** (invasi - *pool zone*): coincide solitamente con la presenza dello sbarramento. Presenta un carattere più lenticò, costituendo quindi l'unica delle tre fasce con caratteristiche simili a quelle lacustri, una maggior sedimentazione con accumulo cospicuo di particolato, acque limpide e buona penetrazione della luce.

**Invaso:** corpo idrico fortemente modificato o lago naturale-ampliato o artificiale.

**Sedimenti molli:** sedimenti a granulometria fine che è possibile campionare con benna o carotatore e composta da sabbia, limo, argilla.



**Fig.ura 1** – Distribuzione delle tre diverse fasce batimetriche in un lago naturale e in un invaso di derivazione fluviale con scarso apporto di sedimento.

## 4. STRUMENTAZIONE E ATTREZZATURA

### 4.1 Materiale da campo

- barca a motore (grandi laghi), pedalò o imbarcazione a remi (laghi di ridotte dimensioni);
- argano a mano (basse profondità) ed argano elettrico (elevate profondità);
- corda metrata;
- draga di Ekman, Petersen, Ponar, eventualmente dotate di messaggero e pesi come carico aggiunto; carotatori manuali, a gravità, a pistone, Jenkin;
- retino per lavaggio (maglie 250  $\mu$ m);
- vaschette o secchi per il lavaggio;
- scheda di rilevamento di campo;
- navigatore GPS per localizzare la posizione;
- fissativi: formalina 5-10%, alcool etilico 75-80%;
- colorante rosa bengala;
- contenitori in polietilene da 0,5, 1 e 2 litri a bocca larga (in numero adeguato ai campioni da raccogliere);
- pennarelli indelebili, matite, etichette;
- retini da drift per eventuale raccolta di esuvie di insetti (maglie 250  $\mu$ m).

## 5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

### 5.1 Periodo di campionamento

Il campionamento dei macroinvertebrati è svolto in almeno due periodi stagionali:

- in **primavera**, corrispondente al periodo di circolazione delle acque nella maggior parte dei nostri laghi,
- in **autunno**, nel periodo successivo all'instaurarsi della stratificazione estiva a causa delle elevate temperature raggiunte in superficie.

La scelta del periodo più adeguato per il campionamento è modulata in funzione degli obiettivi del monitoraggio e delle caratteristiche climatiche dei laghi indagati.

Ad esempio, nei laghi alpini si dovrà tenere conto della durata della copertura ghiacciata per cui il periodo di campionamento potrà considerare il periodo estivo (periodo libero da ghiacci), coincidente con la massima produttività lacustre e il periodo autunnale (comunque prima della ricomparsa del ghiaccio sulla loro superficie).

Per gli invasi o comunque per i laghi soggetti a forti escursioni di livello, ad esempio per la presenza di captazioni, si dovrà porre attenzione ai periodi con forti riduzioni di livello.

Il campionamento deve comunque sempre essere antecedente al periodo di intenso sfarfallamento degli insetti (indicativamente prevedibile verso fine inverno-inizio primavera), per non incorrere in errori nella valutazione della composizione del popolamento macrobentonico.

### 5.2 Scelta dei siti di campionamento e posizionamento dei transetti

Ai fini del presente protocollo, il campionamento dei macroinvertebrati è preceduto da una fase di pianificazione nell'ambito della quale è definita la tipologia di monitoraggio prevista e di conseguenza le finalità perseguite.

La scelta dei siti di campionamento, nell'ambito dei quali posizionare i transetti, è strettamente correlata all'estensione del lago stesso (tabella 1), alla possibile diversificazione degli habitat (granulometria del substrato e presenza di vegetazione), alla morfologia del lago, all'estensione della linea di costa e alla presenza di impatti antropici (ad esempio artificializzazione delle sponde, aree urbanizzate, recapiti di reflui, etc.). L'insieme dei siti di campionamento, nel suo complesso, deve essere rappresentativo delle caratteristiche ambientali e delle principali pressioni insistenti sul corpo idrico e non deve risentire di alterazioni troppo localizzate.

È necessario effettuare un'analisi preliminare del perimetro lacustre attraverso l'utilizzo di cartografie, batimetrie e di foto aeree al fine di selezionare delle aree omogenee. Anche i dati idromorfologici possono risultare utili. Vanno inoltre escluse le aree a ridosso di immissari e/o emissari. Importanti informazioni sulla morfologia della zona litorale, sulle pressioni insistenti sul lago e sulla distribuzione orizzontale e verticale delle macrofite, si possono ricavare anche dal monitoraggio delle macrofite nei corpi idrici per i quali è previsto tale monitoraggio.

L'omogeneità delle aree individuate nella fase preliminare verrà quindi verificata e confermata in campo sulla base dei seguenti aspetti: vegetazione ripariale, granulometria del substrato, vegetazione sommersa, pendenza della linea di costa, diversificazione degli habitat.

L'analisi preliminare risulta molto importante soprattutto per i laghi di ampie dimensioni al fine di garantire il massimo di rappresentatività.

Il posizionamento del transetto deve tenere conto delle zonazioni verticali del lago (litorale, sublitorale e profonda) e del tipo di sedimento (limoso, sabbioso, pietroso, ecc). Il numero di transetti minimo indicativo previsto per il monitoraggio è in relazione alle dimensioni del lago ed è riportato in tabella 1. Nel caso di laghi suddivisi in più corpi idrici il numero di transetti per corpo idrico risulterà dal posizionamento complessivo dei transetti nel lago effettuato sulla base dei criteri sopra descritti.

Superficie (km <sup>2</sup> )	N. transetti	N. stazioni	N. replicati	Esempi
≤0,5	1	3	9	
0,6	2,9	2	6	18
3	6,5	3	9	27

6,6	11,9	4	12	36	
12	19	5	15	45	
20	31	6	18	54	
32	49	7	21	63	Lugano
50	75	8	24	72	Bracciano, Iseo
76	115	9	27	81	
116	174	10	30	90	Bolsena, Como
175	262	11	33	99	Maggiore
263	395	12	36	108	Garda

**Tabella 1** - Numero indicativo minimo di transetti da posizionare sulla base dell'area superficiale dei laghi. Vengono riportati alcuni esempi per i grandi laghi.

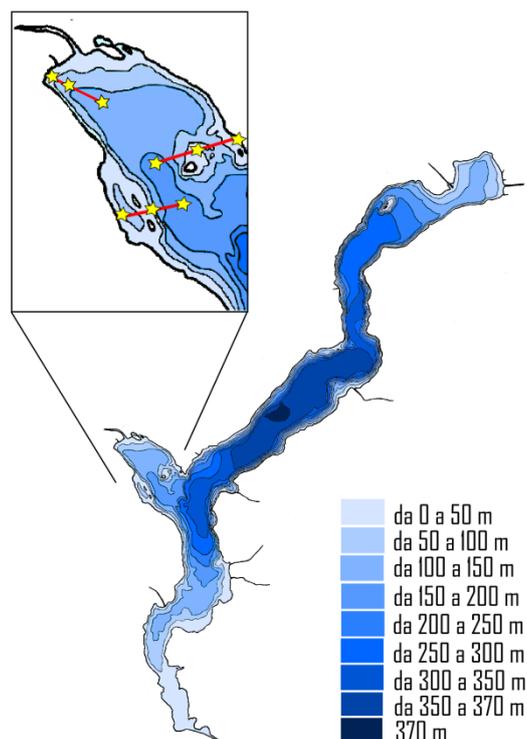
### 5.3 Posizionamento delle stazioni di campionamento

All'interno di ogni transetto, per ognuna delle 3 zone, litorale/fluviale, sublitorale/intermedia e profonda/lacustre, è prevista 1 stazione di campionamento (Tab. 1, Fig. 2).

Per l'individuazione di tali zone è necessario conoscere la struttura termica del lago nel periodo di stratificazione, che permette di determinare l'estensione del metalimnio. Una volta fissate le zone durante il periodo di stratificazione, si può stabilire la dislocazione delle stazioni di campionamento e rilevarne le coordinate geografiche tramite GPS, al fine di mantenere fissa la loro posizione anche durante il periodo di circolazione.

Nel posizionamento delle stazioni sono importanti le informazioni derivanti dal monitoraggio delle macrofite, in quanto consentono di individuare le zone litorali a substrato molle; è anche importante verificare la pendenza delle linea di costa mediante analisi della carta batimetrica per individuare ed escludere zone con forti pendenze dove le benne si chiudono con difficoltà.

In laghi (Fig. 3) dove a causa della totale copertura di macrofite o della scarsa profondità (in generale laghi poco profondi, laminari o polimittici) non si riesca ad evidenziare una zona profonda o addirittura una zona sublitorale, non si deve operare tramite transetti, ma campionare distribuendo le stazioni di campionamento in modo casuale all'interno della conca lacustre, tenendo sempre in considerazione la presenza di immissari e/o emissari e la diversa composizione a macrofite o del substrato (qualora si evidenziassero delle differenze). Il numero delle stazioni complessive è determinato dalla superficie del lago e dalla tipologia di habitat come riportato in tabella 1.



**Figura 2** - Particolare della distribuzione di alcuni transetti e delle relative stazioni di campionamento in un lago subalpino grande e molto profondo. La figura è da intendersi indicativa.

Nello specifico, non si prevede il campionamento con asportazione di macrofite, ma il posizionamento del campionatore in area con substrato molle con vegetazione più rada o con scarsa presenza di apparati radicali.



**Figura 3** – Distribuzione delle stazioni di campionamento in un piccolo lago naturale poco profondo.

## 5.4 Prelievo dei campioni

Il numero di campioni minimo, statisticamente accettabile, è pari a tre per stazione (zona litorale/fluviale, sublitorale/intermedia e profonda/lacustre) (Figg 1 e 2), qualora si utilizzino benne con apertura utile pari o superiore a 225 cm<sup>2</sup>, altrimenti, qualora si utilizzino campionatori di dimensioni inferiori (Es: benne con apertura utile inferiore o carotatori) bisognerà considerare la raccolta di un numero di replicati per stazione tale da arrivare a coprire un'area utile di almeno 675 cm<sup>2</sup> (pari alla somma delle aree utili del numero standard di replicati 225\*3 cm<sup>2</sup> = 675 cm<sup>2</sup>).

## 5.5 Substrato da campionare e strumenti di campionamento

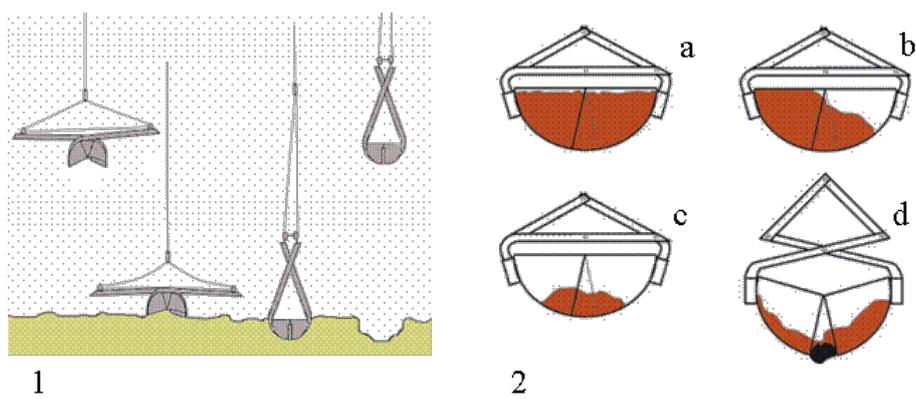
In ogni stazione di campionamento devono essere campionati i substrati molli utilizzando campionatori di tipo quantitativo (draghe/benne, carotatori) che permettono di stimare sia la composizione della comunità che la densità dei singoli taxa. Nel caso in cui la zona litorale sia composta da substrato duro, limitare il campionamento alle rimanenti due zone.

## 5.6 Specifiche per l'uso di benne e carotatori

### Benne

Generalmente, le benne consistono di un sistema di chiusura a cucchiaio (dotato di ganasce) che si chiude una volta toccato il fondo, con o senza l'aiuto di un messaggero. A questo proposito, si consiglia di portare sempre con sé un messaggero di riserva. Una volta raccolto il campione, le benne vanno riaperte all'interno di un contenitore di buona capacità per essere svuotate dal sedimento.

Dato il loro peso e l'uso del messaggero, è preferibile usare le draghe in condizioni di scarsa corrente, in modo che possano penetrare perpendicolarmente alla superficie. Il mal funzionamento di una draga può avvenire quando forti correnti o pendenze impediscono una discesa lineare della draga e/o del messaggero. Quando la draga tocca il fondo, tende quindi ad inclinarsi, appoggiandosi su un lato, rendendo impossibile la buona riuscita del campionamento (Fig. 4(1)). Inoltre, pietre di piccole dimensioni possono rimanere tra le ganasce o particelle fini possono insinuarsi tra il lato della scatola e le ganasce, creando attrito ed impedendo la buona chiusura dello strumento, con conseguente parziale perdita di campione (Fig. 4(2)).



**Figura 4** – (1) Schema di funzionamento e (2) raccolta di un campione da draga: a) draga con campione integro accettabile; b) campione inaccettabile dovuto ad inclinazione della draga al momento della raccolta; c) campione inaccettabile per mancato sprofondamento nel sedimento; d) campione inaccettabile per inceppamento delle ganasce con pietre.

In questi casi il campione deve essere eliminato e l'operazione deve essere ripetuta.

Inoltre, nel far scendere la draga a grandi profondità, va considerato che il cavo dell'organo subisce un naturale spostamento rispetto alla posizione della barca, vuoi per la deriva a cui la barca stessa è soggetta e vuoi per la presenza di correnti di fondo. Quindi, l'uso di un messaggero risulta inadeguato, in quanto la sua discesa è rallentata dallo scorrimento diagonale e la sua potenza ne risulta ridotta. Infine, spesso, sponde scoscese e ripide, impediscono un buon funzionamento della draga che tende a rotolare, impedendo la riuscita del campionamento o riducendone l'efficienza. L'uso di un ecoscandaglio permette di ovviare, almeno in parte, a tali inconvenienti, facilitando la ricerca di punti più pianeggianti.

### Carotatori

I carotatori (detti anche carotieri) vengono utilizzati per campionare i sedimenti profondi e ottenere sezioni trasversali (così da riuscire ad avere una distribuzione verticale dei parametri chimico-fisici e biologici).

Sono formati da una camicia metallica che può avere peso variabile, all'interno della quale è presente un tubo (*liner*) in polietilene inerte, oppure in policarbonato trasparente, ma anche in PVC ed in acciaio inossidabile. Esistono molti tipi di carotatori, con diverse misure e diverse aree di campionamento.

All'estremità inferiore del tubo possono essere presenti alette o lamelle stabilizzatrici, che hanno la funzione di agevolare l'ingresso del sedimento lungo il tubo in plexiglass. Inoltre, possono essere presenti lamelle convergenti con la funzione di trattenere il campione. Per migliorare la penetrazione possono essere montati

esternamente dei pesi, dei pistoni o un sistema che produce vibrazioni. I carotatori possono essere fatti scendere a velocità inferiori rispetto a quelle di una draga per ridurre l'onda d'urto, limitando il più possibile l'azione di disturbo del sedimento; i carotatori con maggior diametro riducono anche l'alterazione del campione per compressione.

I carotatori vengono utilizzati in substrati soffici (fondali di facile perforazione), costituiti prevalentemente da sedimenti fini come quelli limosi e limo-argillosi. Quando sono presenti substrati sabbiosi o limo-sabbiosi non si hanno buone penetrazioni. Inoltre, non sono adatti per campionare substrati a ghiaia o pietrosi (a struttura e grana grossa). In ambiente lacustre, gli strumenti più utilizzati sono i carotatori a gravità e quelli a pistone.

Il carotatore dovrà penetrare per una profondità all'incirca pari a quella di cattura di una benna (20-30 cm). Qualora il carotatore penetri con facilità, si limiterà l'analisi ai primi 20 cm di sedimento molle.

## 5.7 Metodo a supporto dell'identificazione tassonomica

Il metodo descritto di seguito può essere adottato per raccogliere dati a supporto dell'identificazione tassonomica dei campioni prelevati con la benna.

Nello studio delle popolazioni bentoniche risulta importante la raccolta delle exuviae/esuvie degli insetti acquatici, lasciate dalle larve e dalle pupe al momento dello sfarfallamento (Ruse, 2002). Queste si raccolgono tramite un retino da *drift*, che viene trascinato sulla superficie dell'acqua con imboccatura semi-sommersa, dalla riva o da un'imbarcazione, in punti della riva caratterizzati da accumulo delle esuvie ad opera del vento. Il retino da *drift* è costituito da una rete conica che può terminare con un contenitore per la raccolta degli organismi e dovrà essere dotato di maglie pari a 250 µm, ossia delle stesse dimensioni delle maglie utilizzate nel retino per il risciacquo del campione. La scelta delle maglie della rete ha infatti, effetti sull'efficienza di filtrazione e di occlusione delle maglie stesse.

## 5.8 Parametri di supporto al campionamento dei macroinvertebrati

Il campionamento per lo studio della fauna bentonica andrebbe abbinato ad un prelievo di un campione di acqua per la determinazione dei parametri chimico-fisici che condizionano la distribuzione e la composizione delle comunità macrobentoniche quali: temperatura, pH, conducibilità, fosforo totale, azoto totale, carbonio organico totale, clorofilla *a*, ossigeno disciolto.

Qualora, nella stagione di campionamento sia già in corso un programma di monitoraggio di qualità chimico-fisica dell'acqua, i dati relativi ai parametri chimico-fisici possono essere derivati da quelli reperiti durante le attività di monitoraggio di natura chimico-fisica.

Nel caso in cui il campionamento risulti disgiunto da un programma di monitoraggio, andrebbero prelevati campioni dalla colonna d'acqua in centro lago, nel caso di laghi di piccole dimensioni quali i laghi alpini, mentre nei laghi profondi il campionamento può essere effettuato in un unico punto (su colonna) situato nel punto di massima profondità del transetto o in zona limitrofa al campione prelevato nella stazione profonda per l'analisi della fauna bentonica. In quest'ultimo caso è necessario effettuare il campionamento dell'acqua per le analisi chimico-fisiche prima di effettuare la raccolta degli organismi ed eseguirlo almeno 1 metro al di sopra del punto di massima profondità, per evitare l'intorbidimento dell'acqua e che il campione si "sporchi" con eventuale particolato portato in sospensione.

## 5.9 Specifiche per gli invasi

Nell'ambito degli invasi, i più recenti corpi idrici lacustri derivanti da sbarramenti fluviali, sono stati costruiti a partire dai primi decenni del '900. Fra di essi riconosciamo invasi con scarso trasporto solido, ossia corpi idrici molto giovani che non hanno avuto il tempo di ricevere forti quantitativi di particolato dal bacino imbrifero e che hanno anche scarsi *input* dalla conca lacustre dove la flora e la fauna insediatesi contribuiscono alla creazione di sedimento solamente durante i periodi dell'anno di maggior fioritura, e invasi a forte trasporto solido in quanto allacciati ad altri bacini con significativo interrimento annuo.

La scelta dei siti di campionamento dovrà tener conto di questi aspetti. Nella figura 1 si propone un esempio di distribuzione dei siti di campionamento in relazione alle specifiche ambientali di corpi idrici a scarso trasporto solido.

Nel predisporre un piano di campionamento di questi ambienti si deve tenere conto innanzitutto dello sfruttamento delle loro acque, che nell'Ecoregione mediterranea è intensivo nel periodo estivo, in

corrispondenza di più elevate temperature, più intensa evaporazione e lunghi periodi di siccità. Dovendo mantenere un campionamento semestrale, il periodo di circolazione delle acque coincide grossolanamente con quello dell'Ecoregione alpina (leggermente anticipato per le più miti temperature), mentre il periodo di stratificazione, decisamente protratto nel tempo (da Aprile a Novembre), si sovrappone all'emunzione d'acqua per uso irriguo e/o potabile. Non si può quindi aspettare la fine di questo periodo per effettuare il campionamento, in quanto la scarsità d'acqua riduce notevolmente la profondità del corpo idrico, ma il campionamento dovrà necessariamente essere effettuato in periodo antecedente rispetto alle forti riduzioni di volume.

Solitamente, in un lago derivante da sbarramento fluviale a scarso trasporto solido si posiziona un unico transetto che consideri le tre profondità prima menzionate. Quando tale ambiente ha forma pressoché lineare e l'immissario è unico, il transetto deve essere predisposto secondo l'asse lacustre maggiore: la prima stazione sarà posta in corrispondenza dell'entrata dell'immissario, l'ultima in corrispondenza dello sbarramento, in area protetta, mentre la seconda in un punto intermedio fra i due. Se invece la forma è complessa e sinuosa, sicuramente il corpo idrico è dotato di più tributari; si deve quindi considerare un transetto in corrispondenza dell'asse maggiore, più una serie di punti corrispondenti all'entrata di ciascuno dei tributari. Qualora il corpo idrico avesse profondità ragguardevoli (superiori al pescaggio dell'imbarcazione) anche lungo gli assi secondari, i punti di campionamento per ogni asse (corrispondente a un tributario) dovranno essere due (Cooke *et al.*, 1986).

Anche il campionamento di questi ambienti presenta criticità, in particolare l'assoluta sicurezza dell'operatore e la modalità di campionamento. Nel primo caso, l'Ente gestore del corpo idrico fornisce agli operatori una mappa delle zone pericolose (esempio: eventuali presenze di centri abitati rimasti coperti dall'acqua al momento del riempimento dell'invaso, in particolare campanili; l'area antistante la diga, qualora l'emunzione avvenga con creazione di vortici e mulinelli). Nel secondo caso, la ricerca del punto di campionamento è in molti casi difficile, perché i laghi, soprattutto se derivati da sbarramenti fluviali, sono troppo giovani per aver accumulato sufficiente sedimento, in particolar modo nelle prime due fasce ed in presenza di sponde ripide. Può essere molto utile dotarsi di ecoscandagli che permettano di rilevare l'alveo fluviale, dove si raccoglie la maggior parte del sedimento, e qui tentare di mantenere l'imbarcazione il più ferma possibile e far scendere la draga.

Nel pianificare nel tempo l'eventuale monitoraggio di tali corpi idrici, si deve tenere conto delle pratiche di rimozione del sedimento a cui tali ambienti possono essere sottoposti, qualora il trasporto solido sia significativo in relazione alle caratteristiche fisiche del corpo idrico, all'erodibilità delle aree che alimentano il bacino imbrifero e allo stato di dissesto idrogeologico del bacino, pratiche che sono regolate dalla normativa nazionale. Una volta che il sedimento di fondo è completamente rimosso, ci vogliono almeno 2-3 anni per un recupero dal punto di vista faunistico; qualora invece venga rimosso solamente in modo parziale, il recupero può essere pressoché immediato (ILEC, 1999). Nel caso di corpi idrici naturali ampliati e di invasi di origine fluviale con forte contributo di materiale sospeso dal bacino si procederà nella distribuzione dei transetti come per i laghi naturali (paragrafi 6.2 e 6.3), evitando di campionare lungo l'asse che unisce il tributario principale con il muraglione della diga. Nei laghi artificiali, in assenza di tributari, si procede come nei laghi naturali poco profondi.

## 6. PROCEDURE ANALITICHE

### 6.1 Trattamento preliminare del campione

Il campione di sedimento raccolto con la draga viene setacciato in campo utilizzando un retino a base quadrata (Fig. 5) o rettangolare (circa 50 x 70 cm di lato, 70 cm di altezza, con maglie da 250  $\mu\text{m}$ ) al fine di liberare il campione dal detrito più fine. È opportuno disporre di tre-quattro retini in modo da poter lavorare contemporaneamente sulle diverse repliche campionate per stazione. Questo primo risciacquo si effettua smuovendo il retino colmo di sedimento in acqua, dall'alto verso il basso e da sinistra verso destra, fino a quando non si vede più fuoriuscire materiale (facilmente osservabile perché la fuoriuscita crea una macchia torbida in acqua). Questo tipo di risciacquo risulta però molto invasivo nel caso di Oligocheti: si consiglia quindi di adottare la stessa metodica introducendo il retino all'interno di un contenitore ripieno d'acqua, e qui, tramite movimenti analoghi a quelli prodotti dall'imbarcazione, ma più delicati, condurre l'opportuno risciacquo.

In laboratorio si può procedere ad una seconda setacciatura, suddividendo ogni campione in due frazioni: una prima frazione rappresentata da ciò che rimane dopo setacciatura con rete a maglie da 500  $\mu\text{m}$  ed una

seconda frazione rappresentata da ciò che rimane dopo setacciatura con rete a maglie da 250  $\mu\text{m}$ . Questa metodica facilita e velocizza la successiva osservazione allo microscopio stereoscopico.



**Fig.ura 5 - Retino utilizzato per sciacquare i campioni**

## 6.2 Trattamento del campione in campo e in laboratorio

Quando non è possibile esaminare il campione da vivo, subito dopo i prelievi, questo deve essere fissato sul posto con formalina al 10% e, qualora lo si ritenga necessario, con aggiunta di rosa bengala che può facilitare la visibilità degli organismi. Etichette esterne al contenitore devono essere sempre accompagnate da un'etichetta interna al contenitore. Le etichette, se scritte a mano, devono essere scritte con penna a china o matita, non con penna a sfera, e devono riportare l'indicazione di: lago, località, stazione di rilevamento lungo il transetto, replica, profondità, data ed eventuali notazioni di identificazione.

Data la pericolosità dell'utilizzo della formalina, in relazione all'esposizione derivante dalle varie fasi di smistamento, è possibile organizzare la campagna di campionamento in modo tale che lo smistamento avvenga in maniera tempestiva e si concluda entro i pochi giorni successivi al campionamento. In questo caso non è necessaria la fissazione in campo con la formalina, ma i campioni vengono comunque conservati in frigorifero (4° C) fino al momento dello smistamento.

Se il campione è esaminato entro pochi giorni dal prelievo si può ridurre l'uso della formalina, se invece si prevede di esaminare il campione dopo lungo tempo la formalina va aggiunta in quantità tale da avere alla fine una concentrazione compresa tra il 5 e il 10 %.

Tutte le operazioni che prevedono l'uso della formalina, dalla preparazione della formalina tamponata al riempimento dei barattoli contenenti i campioni, devono avvenire in laboratorio sotto cappa e sono, comunque, sottoposte a misure di sicurezza stringenti. I contenitori utilizzati, l'acqua di lavaggio ed i preparati, devono essere opportunamente smaltiti.

L'alcool anche concentrato non conserva bene i campioni, può sostituire la formalina solo quando il detrito non è troppo abbondante. Gli Oligocheti fissati in alcool restano però fragili e tendono a rompersi facilmente.

In linea generale è prevista l'identificazione tassonomica fino al livello di specie, dove possibile, per tutti i gruppi tassonomici di macroinvertebrati.

Il metodo qui descritto permette di ottenere l'elenco dei taxa macrobentonici presenti (composizione del popolamento) e, per ciascun taxon, il corrispondente valore di abbondanza espresso come numero di individui per metro quadrato.

### **6.3 Conservazione dei campioni**

Dopo lo smistamento effettuato in laboratorio, i campioni, qualora non siano prima stati fissati in formalina, possono essere conservati per lungo tempo in alcool all'80%, mentre, se in campo si è adottata la formalina come conservante, sarà sufficiente una concentrazione pari al 50%.

## **7. SICUREZZA**

Il campionamento e l'analisi in campo sono generalmente pericolosi. Gli operatori che utilizzeranno questo protocollo dovranno avere la sufficiente formazione per le normali pratiche di laboratorio e di analisi in campo.

Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso. È responsabilità degli Organi preposti di definire i dispositivi più opportuni di protezione individuale e di individuare le azioni necessarie ad assicurare la sicurezza degli operatori secondo le disposizioni di legge.

Come testi di riferimento è possibile utilizzare le pubblicazioni [12] e [13].

## **8. QUALIFICA DEGLI OPERATORI**

Il personale coinvolto nelle attività di monitoraggio biologico deve essere qualificato sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento, esperienza e/o comprovata abilità.

In particolare, gli operatori che eseguono il campionamento, l'identificazione e la stima di abbondanza dei taxa devono possedere adeguata e documentata preparazione (diploma di laurea e/o specializzazione post-universitaria) in campo ecologico, limnologico e tassonomico (zoologia degli invertebrati) e devono aver compiuto un percorso di formazione/apprendimento in affiancamento ad operatori esperti o frequentando un apposito corso di formazione.

Il mantenimento della qualifica del personale coinvolto nel monitoraggio con i macroinvertebrati bentonici deve essere garantito e periodicamente verificato tramite esperienza lavorativa, partecipazione a confronti interlaboratorio organizzati da istituzioni o organizzazioni di riconosciuta competenza, e anche attraverso la partecipazione a incontri di aggiornamento quali seminari e conferenze.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] Bazzanti, M., A. Boggero, V. Lencioni, L. Mastrantuono, B. Rossaro & A. Solimini. 2007. Protocollo di campionamento e analisi dei macroinvertebrati negli ambienti lacustri. MATTM-APAT, Roma: 16 pp.
- [2] Cooke, G.D., E.B. Weich, S.A. Peterson & P.R. Newroth. 1986. *Lake and reservoir restoration*. Butterworths Ed., Boston.
- [3] De Bernardi, R. 1984. Methods for the estimation of zooplankton abundance. In: Downing J.A. & F.H. Rigler (Eds), *A manual on method for the assessment of secondary productivity in fresh waters*. Ed. Blackwell Scientific Publications, Handbook, 17: 59-86.
- [4] Decreto Legislativo n. 152/2006. Norme in materia ambientale. G.U. 88 del 14/04/2006 - suppl. ord. n. 96.
- [5] Decreto Ministeriale n. 56/2009. Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento. G.U. n. 124 del 30/05/2009 - suppl. ord. n. 83.
- [6] Decreto Ministeriale n. 131/2008. Criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici - Attuazione articolo 75, Dlgs 152/2006 – GU n. 187 del 11/08/2008 - suppl. ord. n. 189.
- [7] Decreto Ministeriale n. 260/2010. Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali - Modifica norme tecniche Dlgs 152/2006. G.U. n. 30 del 7/02/2011 - suppl. ord. n. 31.
- [8] E.U., 2000. Direttiva 2000/60/EC del Parlamento e del Consiglio Europeo del 23 Ottobre 2000 che stabilisce un protocollo per l'azione comunitaria in materia di acque. Official Journal of the European Communities L 327, 22.12.2000, 1-72. <http://www.direttivaacque.minambiente.it/>
- [9] ILEC, 1999. *Guidelines of lake management*. Vol. 9. Reservoir water quality management. 229 pp.
- [10] Kennedy, R.H., K.W. Thornton & D.E. Ford. 1985. Characterization of the reservoir ecosystem. In: Gunnison D. (Ed.), *Microbial processes in reservoir*. The Hague, Netherlands, Junk Publishers.
- [11] Ruse, L. 2002. Chironomid pupal exuviae as indicators of lake status. *Archiv für Hydrobiologie*, 153: 367-390.
- [12] ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.
- [13] APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006.

### Siti internet consultati

<http://www.icram.org/nav1/strumentazione.htm>

<http://www.eman-rese.ca/eman/ecotools/protocols/freshwater/benthics/fig1abc.html>

<http://www.eman-rese.ca/eman/ecotools/protocols/freshwater/benthics/introduc.html>

<http://lter.limnology.wisc.edu/>

**ALLEGATO A - Scheda di campionamento**

A - Scheda di campo per transetti (Zone Litorale, SubLitorale, Profonda)

Campionamento quantitativo su fondo molle

<b>Lago (toponimo)</b>		<b>codice corpo idrico</b>	
<b>Data:</b>	<input type="text"/>	<b>Ora:</b>	<input type="text"/>
<b>Località</b>	<input type="text"/>	<b>Coordinate geografiche lago(UTM32-WGS84)</b>	<b>Nord</b> <input type="text"/> <b>Est</b> <input type="text"/>
<b>Tipologia lago</b>	<input type="checkbox"/> Naturale	<input type="checkbox"/> Artificiale	<input type="checkbox"/> Fortemente modificato
<b>Meteo:</b>	<input type="text"/>	<b>Disco di Secchi:</b>	<input type="text"/> m(nel punto di campionamento della chimica su colonna)
<b>Operatore:</b>	<input type="text"/>		
<b>Strumento di prelievo</b>	<input type="text"/>	<b>Superficie di cattura strumento prelievo)</b>	<input type="text"/> cm <sup>2</sup>
<b>Maglie setaccio 250 µm</b>			

ad 1 m dal fondo  
(vedi testo per spiegazioni)

Transetto	Zona	Replica	Prof. m	Lat N	Long E	Temp °C	O2 %	Presenza di macrofite (presente/assente)	Codice replica
1	L*								
1	L								
1	L								
1	SL								
1	SL								
1	SL								
1	P								
1	P								
1	P								
2									
2									
2									
2									
2									
2									
2									
2									
2									
2									
3									
3									
3									
3									
3									
3									
3									

da compilare con L-SL-P:

L = litorale

SL = sublitorale

P = Profondo

## **3020. PROTOCOLLO PER IL CAMPIONAMENTO DI FITOPLANCTON IN AMBIENTE LACUSTRE**

**Manuali e Linee Guida  
111/2014**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>1. SCOPO</b> .....	3
<b>2. RIFERIMENTI NORMATIVI</b> .....	3
<b>3. TERMINI E DEFINIZIONI</b> .....	4
<b>4. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURA</b> .....	5
4.1 In campo .....	5
<b>5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO</b> .....	5
5.1 Periodo di campionamento .....	5
5.2 Scelta della stazione .....	6
5.3 Misura dei parametri di contorno .....	6
5.4 Campionamento.....	7
5.5 Preparazione di campioni integrati.....	11
5.6 Raccolta di un subcampione e fissazione .....	11
<b>6. PROCEDURE ANALITICHE</b> .....	12
6.1 Conservazione del campione.....	12
6.2 Prelievo di campioni aggiuntivi .....	12
<b>7. SICUREZZA</b> .....	12
<b>8. QUALIFICA DEGLI OPERATORI</b> .....	12
<b>APPENDICE 1</b> .....	13
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	14
<b>ALLEGATO A</b> .....	13

## INTRODUZIONE

Il fitoplancton è costituito da minuscoli organismi fotosintetici (microalghe) viventi in sospensione nelle acque di laghi, fiumi e mari; esso provvede la base di nutrimento senza la quale non sarebbe possibile una equilibrata sopravvivenza delle altre forme di vita acquatica. Un suo eccessivo sviluppo, tuttavia, determina uno scadimento rapido della qualità delle acque (eutrofizzazione).

Negli ecosistemi acquatici il fitoplancton ricopre un ruolo fondamentale. La produzione primaria fitoplanctonica costituisce un importante anello della catena alimentare nelle acque dolci e marine, garantendo il flusso di materia ed energia necessario per il mantenimento degli eterotrofi, i quali si nutrono a spese di sostanze organiche già elaborate dagli autotrofi. Il fitoplancton comprende numerosissime specie che si differenziano per dimensione, morfologia, fisiologia ed ecologia. Nel fitoplancton delle acque interne i principali gruppi sono rappresentati da cianobatteri, clorofite (conjugatoficee e cloroficee), diatomee, criptoficee, dinoficee e crisoficee.

## 1. SCOPO

Questo metodo spiega come prelevare campioni di fitoplancton pelagico lacustre, allo scopo di effettuare indagini limnologiche volte a definire la qualità delle acque, con particolare attenzione a quanto prescritto dalla Direttiva 2000/60/CE.

Lo scopo del metodo di seguito descritto è quello di permettere la raccolta di campioni, destinati all'analisi della clorofilla a [1] e alla determinazione della componente algale, rappresentativi delle associazioni fitoplanctoniche presenti in momenti stagionali diversi. Il metodo deve garantire, inoltre, la possibilità di confrontare tra loro ambienti lacustri di diversa tipologia e caratteristiche trofiche.

## 2. RIFERIMENTI NORMATIVI

UNI EN 15204:2006 Norma guida per la conta del fitoplancton utilizzando la microscopia inversa (Tecnica di Utermöhl).

UNI EN 14996:2006 Qualità dell'acqua-Linea guida per assicurare la qualità delle valutazioni biologiche ed ecologiche nell'ambiente acquatico.

UNI EN ISO 5667-1:2007 Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 1: Linee guida per la definizione dei programmi e delle tecniche di campionamento.

UNI EN ISO 5667-3:2004 Qualità dell'acqua - Campionamento - Parte 3: Guida per la conservazione ed il maneggiamento di campioni d'acqua.

Decreto Legislativo n. 152/2006. Norme in materia ambientale. G.U. 88 del 14/04/2006 – suppl. ord. n. 96.

### 3. TERMINI E DEFINIZIONI

**Campione integrato:** campione singolo rappresentativo di uno strato d'acqua di spessore opportuno, ottenuto miscelando, in aliquote simili, acque provenienti da profondità differenti.

**Clorofilla a:** principale pigmento fotosintetico posseduto da tutti gli organismi algali: la sua misura fornisce una stima della quantità di biomassa fitoplanctonica presente in lago;

**Lago dimittico:** lago caratterizzato da temperatura omogenea lungo l'intera colonna d'acqua in due periodi stagionali, tipicamente l'autunno e la primavera. La condizione di omeotermia in queste stagioni favorisce il mescolamento della colonna d'acqua. Nel periodo invernale la superficie può essere coperta da ghiaccio ed avere una stratificazione termica inversa; nel periodo estivo si osservano, dalla superficie al fondo rispettivamente, uno strato superficiale di acque calde a temperatura uniforme (epilimnio), uno strato dove sono presenti gradienti termici superiori ad  $1\text{ }^{\circ}\text{C m}^{-1}$  (metalimnio) ed uno strato profondo a temperatura omogenea, ma decisamente inferiore a quella dell'epilimnio (ipolimnio);

**Lago monomittico caldo:** lago caratterizzato, durante il ciclo annuale, da una sola fase di mescolamento delle acque, che si verifica tra la fine dell'autunno e l'inizio della primavera. Nei mesi estivi è presente una stratificazione termica e sono distinguibili un epilimnio, un metalimnio ed un ipolimnio (si veda lago dimittico).

**Lago polimittico:** lago che non mostra una stratificazione termica evidente e stabile e può andare incontro a diverse fasi di mescolamento nel corso del suo ciclo annuale.

**Lago meromittico:** lago che mostra una separazione in strati d'acqua con densità differente, dovuta non a differenze di temperatura, ma a differenze nella concentrazione dei soluti. Queste possono essere talmente elevate da impedire l'omogeneizzazione ed il rimescolamento dell'intera colonna d'acqua.

**Radiazione fotosinteticamente attiva:** (PAR, Photosynthetically Active Radiation)

Spettro della radiazione luminosa utilizzato dal fitoplancton per la fotosintesi: comprende lunghezze d'onda nell'intervallo 400-700 nm.

**Zona eufotica:** strato d'acqua compreso tra la superficie e la profondità alla quale si misura una attenuazione della radiazione PAR incidente fino ad un valore pari al 1% dell'intensità misurata immediatamente sotto il pelo dell'acqua.

## 4. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURA

### 4.1 In campo

- Dispositivi di protezione individuale;
- Imbarcazione;
- Radiometro;
- Disco di Secchi;
- Thermistor (singolo o integrato in una sonda multiparametrica);
- Sonda multiparametrica;
- Campionatore (Bottiglia per campioni integrati, bottiglia a strappo o tipo Van Dorn, bottiglia di Schroeder o tubo per campione integrato);
- Bidone di almeno 25 litri per mescolare campioni singoli;
- Bottiglie da 1-2 litri per la raccolta di subcampioni per l'analisi della clorofilla a;
- Boccette da 100-250 ml per subcampioni di fitoplancton;
- Soluzione di Lugol acetico per la fissazione dei campioni di fitoplancton, da preparare come segue:

potassio ioduro	100	g
Iodio	50	g
acido acetico	100	g
acqua	1000.0	ml

Sciogliere prima il potassio ioduro in 1 litro di acqua, aggiungere lo iodio (cristalli), sciogliere completamente, aggiungere 100 g di acido acetico glaciale. Dato che la soluzione è prossima alla saturazione l'eventuale precipitato può essere rimosso mediante decantazione.

Conservare in bottiglia di vetro scuro ed al riparo dalla luce e da fonti di calore. Caratteristiche dettagliate delle apparecchiature sopra riportate si trovano in Appendice A.

## 5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

### 5.1 Periodo di campionamento

La Direttiva 2000/60/CE stabilisce (Allegato V,1.3.4) che “Per il monitoraggio sono fissate frequenze che tengono conto della variabilità da condizioni sia naturali che antropiche. Il momento in cui effettuare il monitoraggio è scelto in modo da minimizzare l'incidenza delle variazioni stagionali sul risultato ed assicurare quindi che quest'ultimo rispecchi i mutamenti intervenuti nel corpo idrico a seguito di cambiamenti dovuti alla pressione antropica. Per conseguire questo obiettivo sono effettuati, se necessario, monitoraggi supplementari in stagioni diverse del medesimo anno.”

Poiché le associazioni fitoplanctoniche variano con una periodicità stagionale abbastanza precisa e ripetibile da un anno con l'altro, è possibile ottimizzare lo sforzo di raccolta ed analisi dei campioni scegliendo opportunamente i mesi in cui effettuare il prelievo, in modo da limitare il campionamento ai periodi realmente significativi. Questo aspetto assume un diverso significato per i laghi artificiali di quelle regioni in cui, oltre che al normale susseguirsi di situazioni stagionali tipiche, si verifica anche l'alternarsi non regolare di annate di intensa siccità, capaci di modificare ed influenzare in maniera sensibile e significativa la limnologia di base degli invasi e, quindi, lo stesso fitoplancton.

Sulla base dei dati relativi alla successione delle associazioni fitoplanctoniche, disponibili per i laghi italiani, si consiglia di effettuare almeno 6 campionamenti nel corso dell'anno, ripartiti come segue:

- 1 campione da prelevare nel periodo Gennaio – 15 Marzo, rappresentativo delle comunità invernali;
- 1 campione da prelevare nel periodo Aprile - 15 Maggio, rappresentativo delle comunità primaverili;
- 1 campione da prelevare nel periodo Luglio – Agosto, rappresentativo delle comunità estive;
- 1 campione da prelevare nel periodo 15 Ottobre – Novembre, rappresentativo delle comunità autunnali.

In aggiunta a questi prelievi è opportuno prelevare altri 2 campioni, rispettivamente nel periodo 15 Maggio – 15 Giugno e nel mese di Settembre, come rappresentativi delle fasi di transizione dalla comunità primaverile a quella estiva e da quella estiva a quella autunnale.

In ambienti lacustri per i quali non sono disponibili dati pregressi, si consiglia di effettuare dei campionamenti mensili nel periodo Marzo-Novembre per almeno due anni, per valutare eventuali scostamenti dallo schema generale sopra descritto.

## 5.2 Scelta della stazione

I campioni vanno prelevati, preferibilmente, nel punto di massima profondità, scelto come rappresentativo delle condizioni medie dell'ambiente. La stazione di campionamento dovrebbe trovarsi in posizione centrale rispetto allo sviluppo della superficie lacustre, in modo da non essere influenzata da fenomeni che si svolgono lungo le fasce litorali. Qualora il punto di massima profondità risultasse troppo vicino alla sponda del lago, privilegiare la scelta di una stazione più centrale. Nei laghi artificiali la stazione, scelta, se possibile, nel punto di massima profondità, o, comunque, in una stazione rappresentativa dell'ambiente pelagico, dovrebbe essere posta ad una distanza di sicurezza dal muro della diga e dalle opere di presa.

Devono essere rilevate le coordinate geografiche della stazione di campionamento con idonea strumentazione GPS che consenta il corretto posizionamento ad ogni replica del prelievo.

Nel caso in cui il lago presentasse una conformazione tale da determinare la suddivisione in corpi idrici con caratteristiche idrologiche, idrodinamiche e trofiche differenti, sarà necessario prevedere una stazione di campionamento per ogni corpo idrico individuato.

Prelevare sempre campioni integrati nella zona eufotica, stabilita come descritto al punto 4, tenendo comunque presente che:

- se la profondità della zona eufotica risulta superiore a 20 metri, è sufficiente prelevare un campione integrato tra 0 e 20 metri;
- se la profondità della zona eufotica si estende fino al fondo o se a livello del fondo non si

raggiunge un valore di PAR corrispondente al 1% di quello superficiale, è bene prelevare un campione integrato tra la superficie ed 1 metro dal fondo del lago. In questo caso va posta una particolare attenzione, onde evitare qualsiasi operazione che possa disturbare i sedimenti.

## 5.3 Misura dei parametri di contorno

Per definire meglio il quadro delle relazioni tra la composizione specifica del fitoplancton e la qualità ecologica dell'ambiente, l'informazione sulla struttura delle biocenosi algali andrebbe completata misurando altre variabili fisiche e chimiche. In particolare, si suggerisce l'utilizzo di una sonda multiparametrica per determinare la variabilità verticale di:

- ossigeno disciolto (espresso come percentuale di saturazione)
- pH
- temperatura.

Inoltre, contestualmente alla raccolta del campione di fitoplancton andrebbero prelevati campioni d'acqua sui quali effettuare l'analisi dei parametri chimici di base riportati in tabella 1.

<b>Parametri fisico-chimici</b>
alcalinità
conducibilità
azoto ammoniacale
azoto nitrico
azoto totale
azoto nitroso
fosforo reattivo
fosforo totale
silice reattiva

**Tabella 1 – Parametri idrochimici di base**

## 5.4 Campionamento

Prelievo di un campione integrato di fitoplancton nello strato d'acqua all'interno del quale si svolgono i processi di fotosintesi e corrispondente allo spessore della zona eufotica. Il campione integrato si ottiene o con l'uso di un tubo di lunghezza proporzionale allo strato d'acqua che si vuole campionare, o di un campionatore che integra il campione durante la risalita lungo la colonna d'acqua, miscelando uguali quantità d'acqua prelevate a profondità successive, oppure prelevando campioni puntiformi, di volume uguale, da profondità diverse e mescolandoli successivamente. Il campione prelevato è poi preparato per l'osservazione microscopica degli organismi.

Lo spessore della zona eufotica si stabilisce dopo aver effettuato una misura della radiazione luminosa subacquea con l'uso di un radiometro (si veda Appendice A), valutando la profondità corrispondente all'1% del valore della radiazione superficiale. Per ottenere lo spessore della zona eufotica è sufficiente effettuare due misure, la prima immediatamente sotto il pelo dell'acqua e la seconda dove si legge il valore pari all'1% della prima. L'individuazione della profondità della zona eufotica (Zeu) può essere in via approssimativa determinata dai valori di disco di Secchi (Zs) attraverso la relazione:

$$Zeu=2,5*Zs$$

L'utilizzo di questo fattore di conversione è accettato anche nella comune attività scientifica, sebbene esso non sia da ritenersi costante ed universalmente valido, essendo possibili deviazioni significative da questo rapporto. Va quindi ribadito che la misura con il radiometro PAR rimane la determinazione di riferimento della Zeu ed è da preferire rispetto all'applicazione di un fattore di conversione.

Data la possibilità di errore associata al calcolo della profondità zona eufotica è bene, soprattutto nel caso di laghi caratterizzati dalla presenza di specie che si collocano nella zona metalimnetica nel periodo di stratificazione, verificare il profilo della concentrazione di ossigeno per verificare che la Zeu comprenda le profondità caratterizzate da eventuali picchi della concentrazione di ossigeno.

Per i laghi profondi subalpini appartenenti alla tipologia AL-3, il campione integrato verrà raccolto nello strato 0-20 metri in quanto, sulla base delle serie storiche di dati raccolti dai centri di ricerca che li hanno studiati nel corso dei decenni passati, è ritenuto il più significativo ed offre garanzie di comparabilità dei risultati.

## 5.5 Preparazione di campioni integrati

I subcampioni per l'analisi del fitoplancton e della clorofilla *a* devono essere preparati a partire dallo stesso campione integrato. Bisogna dunque considerare di raccogliere un volume di acqua proporzionato alle esigenze delle analisi da effettuare. In linea generale, la raccolta di almeno 4 litri di acqua dovrebbe garantire la disponibilità di un volume adeguato per la preparazione di un campione di fitoplancton non fissato (vivo) ed uno fissato, per un campione per la misura della concentrazione di clorofilla *a* e per conservare una eventuale riserva d'acqua.

### Preparazione dei campioni usando un integratore

L'uso di un integratore rappresenta la scelta ottimale, poiché il campione viene raccolto in modo continuo. Il contenuto del campionatore va travasato in un bidone e rimescolato, prima di trasferire il campione in una bottiglia.

### Preparazione dei campioni integrati con altri sistemi

Un campione integrato può essere preparato anche a partire da campioni singoli raccolti con bottiglia a strappo o tipo Van Dorn o tipo Niskin. In questo caso va prelevato un campione per ogni metro d'acqua, fino a raggiungere la profondità voluta. I campioni raccolti vanno trasferiti in un contenitore di volume opportuno e mescolati, prima di preparare dei subcampioni. In alternativa alla bottiglia, è possibile utilizzare un tubo di diametro opportuno e di lunghezza uguale a quella dello strato da campionare: il tubo, dotato di rubinetto di chiusura all'estremità superiore e provvisto di una cima di recupero all'estremità opposta, va calato in acqua verticalmente, recuperato attraverso la cima e svuotato in un contenitore di volume opportuno.

Il contenitore utilizzato per mescolare i campioni va tenuto al riparo dalla luce solare diretta.

## 5.6 Raccolta di un subcampione e fissazione

La raccolta di subcampioni va effettuata dopo avere accuratamente rimescolato l'acqua nel contenitore di provenienza del campione principale. Le bottiglie dei subcampioni vanno riempite fino a circa 4/5 del loro volume totale, in modo da permettere la successiva agitazione ed omogeneizzazione. Per l'analisi della clorofilla *a* è opportuno preparare un subcampione di almeno 2 litri, mentre per il conteggio del fitoplancton e l'osservazione in vivo sono necessari subcampioni di almeno 100 ml ognuno.

L'aggiunta del fissativo (soluzione di Lugol) deve conferire al campione una colorazione simile al cognac o ad un infuso di thè: orientativamente, si suggerisce di aggiungere 8 gocce di Lugol al campione da 100 ml. Rimescolare delicatamente il campione dopo l'aggiunta del fissativo, per favorire la migliore diffusione di quest'ultimo.

Per il conteggio dei campioni occorre fare riferimento alle indicazioni contenute nella norma tecnica. I

subcampioni destinati alle analisi vanno conservati lontano da luce solare diretta o da fonti di calore sia durante il trasporto, che in laboratorio. Il campione destinato all'analisi della clorofilla *a* va tenuto in condizioni refrigerate e al buio sino all'analisi stessa, che deve essere effettuata entro le 24 h.

## **6. PROCEDURE ANALITICHE**

### **6.1 Conservazione del campione**

I campioni di fitoplancton fissati in Lugol vanno posti in bottiglie di vetro trasparenti, in modo da valutare un eventuale cambiamento di colore, dovuto ad evaporazione dello iodio. In caso di eccessiva decolorazione del campione, aggiungere nuovamente qualche goccia di Lugol. Il campione fissato va conservato a temperatura ambiente, lontano da luce solare diretta e fonti di calore. Gli organismi fissati con il reattivo di Lugol mantengono inalterate le loro caratteristiche per circa sei mesi. Comunque per la conservazione, l'immagazzinamento e il conteggio dei campioni fare riferimento alle indicazioni contenute nella norma "UNI EN 15204:2006 Norma guida per la conta del fitoplancton utilizzando la microscopia inversa (Tecnica di Utermöhl).

### **6.2 Prelievo di campioni aggiuntivi**

A volte può essere importante determinare gli organismi algali in vivo: in questi casi va preparato un campione non fissato, del volume di 100 ml, che va conservato in frigorifero fino al momento dell'analisi e, comunque, non oltre 24 ore. Si suggerisce di prelevare anche un campione di rete (retino 10-25  $\mu\text{m}$ ), che può essere osservato in vivo oppure dopo fissazione, e che può essere utile per indagare la presenza di specie rare o poco abbondanti.

## **7. SICUREZZA**

Il campionamento e l'analisi in campo sono generalmente pericolosi. Gli operatori che utilizzeranno questo protocollo dovranno avere la sufficiente formazione per le normali pratiche di laboratorio e di analisi in campo.

Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso. È responsabilità degli Organi preposti di definire i dispositivi più opportuni di protezione individuale e di individuare le azioni necessarie ad assicurare la sicurezza degli operatori secondo le disposizioni di legge.

Come testi di riferimento è possibile utilizzare le pubblicazioni [2] e [3].

## **8. QUALIFICA DEGLI OPERATORI**

Il personale coinvolto nelle attività di monitoraggio biologico deve essere qualificato sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento, esperienza e/o comprovata abilità.

In particolare, gli operatori che eseguono il campionamento, l'identificazione e la stima di abbondanza dei taxa devono possedere adeguata e documentata preparazione (diploma di laurea e/o specializzazione post-universitaria) in campo ecologico, limnologico e tassonomico e devono aver compiuto un percorso di formazione/apprendimento in affiancamento ad operatori esperti o frequentando un apposito corso di formazione.

Il mantenimento della qualifica del personale coinvolto nel monitoraggio del fitoplancton deve essere garantito e periodicamente verificato tramite esperienza lavorativa, partecipazione a confronti interlaboratorio organizzati da istituzioni o organizzazioni di riconosciuta competenza, e anche attraverso la partecipazione a incontri di aggiornamento quali seminari e conferenze.

## APPENDICE 1

### Strumentazione

#### Campionatore di acqua

Bottiglia per campioni integrati: dispositivo che consente la raccolta di un quantitativo costante di acqua per unità di colonna campionata. Può essere utilizzato anche per la raccolta di campioni a profondità determinate

Bottiglie di profondità: dispositivi per l'acquisizione di campioni a profondità determinate. Sono disponibili diversi modelli che si differenziano in base alle modalità di chiusura:

*Bottiglia a strappo* utilizza un meccanismo di chiusura attivato mediante una improvvisa variazione di tensione, trasmessa manualmente, del cavo a cui è fissata.

*Bottiglie di van Dorn e di Niskin*. Il meccanismo di chiusura è azionato da un messaggero che scorre lungo il cavo.

#### Radiometro

Strumento che rileva l'attenuazione della PAR nelle acque. Esistono alcune configurazioni dello strumento e ne vengono di seguito indicate due di base:

- una è costituita da un data logger e da un sensore subacqueo (fotocellula), che può essere piano o sferico. Il sensore sferico è più preciso, in quanto permette di misurare non solo la radiazione incidente, ma anche quella riflessa dal mezzo circostante (acqua e particelle). Esistono in commercio radiometri dotati di sensori piani e sferici intercambiabili.
- la seconda tipologia prevede l'utilizzo di una sonda multiparametrica come supporto per il sensore. In questo caso i dati sono rilevati in continuo lungo la colonna e memorizzati tramite il software della sonda multiparametrica. È utile porre l'attenzione sulla sensibilità, sulla risposta spettrale (intervallo 400-700 nm) e sulla profondità di esercizio dei sensori.

#### Sonda multiparametrica

Strumento multifunzione che consente l'acquisizione contemporanea di più parametri quali profondità (pressione), temperatura, pH, conducibilità, concentrazione e saturazione dell'ossigeno, concentrazione della clorofilla *a* fluorimetrica e torbidità.

Esistono diverse tipologie di questi strumenti. Le più semplici sono dotate di sensori con cavi di lunghezza limitata e possono essere immerse nelle bottiglie di profondità. Altre posseggono cavi più lunghi e vengono immerse direttamente nel corpo idrico: queste ultime sono dotate di memorie per l'archiviazione dei dati o sono interfacciabili con un notebook.

Le sonde oceanografiche sono gli strumenti più versatili e che consentono di raccogliere il maggior numero di informazioni. Sono dotate di sensori di temperatura, ossigeno, conducibilità, pH e pressione. Possono inoltre essere dotate di sensori per il potenziale redox e per la misura della clorofilla fluorimetrica. Il grande vantaggio delle sonde oceanografiche è legato alla possibilità di effettuare dei profili in continuo lungo la colonna d'acqua, avendo la possibilità, con alcuni modelli, di osservare l'acquisizione dei dati in tempo reale. Questi strumenti richiedono una manutenzione molto accurata e nel caso di utilizzo in tempo reale anche di uno specifico verricello dotato di contatto rotante.

Occorre precisare che le misure di clorofilla fluorimetrica non sono sostitutive delle analisi spettrofotometriche.

La qualità delle prestazioni riguarda l'accuratezza e la risoluzione dei sensori, nonché la frequenza di campionamento dell'elettronica strumentale. Rispetto alla scelta del sensore della clorofilla è utile riferirsi a quelle strutture che hanno già utilizzato le differenti tipologie presenti sul mercato.

La norma UNI EN 25814:1994 Qualità dell'acqua. Determinazione dell'ossigeno disciolto. Metodo elettrochimico a sonda stabilisce per l'ossigeno il limite di rilevabilità (0-35 °C) di 0,0 mg/l, ed una accuratezza per ossigeno e temperatura di 0,1 °C e 0,1 mg/l, rispettivamente per i due sensori.

#### Disco di Secchi

Disco bianco metallico di 30 cm di diametro, fissato ad un cavo metrato.

## **BIBLIOGRAFIA**

[1] APAT & IRSA. 2003. Determinazione della clorofilla: metodo spettrofotometrico. In: Metodi analitici per le acque. Metodo 9020. Vol. 3. 1137-1142.

[2] ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.

[3] APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006

## ALLEGATO A

### Esempio di Scheda di campionamento

<b>Lago (toponimo)</b>	<b>Stazione (toponimo o sigla)</b>	<b>Coordinate geografiche della stazione (UTM32-WGS84)</b>
		Nord <input style="width: 100%;" type="text"/>
		Est <input style="width: 100%;" type="text"/>
<b>Data:</b>	<b>Ora:</b>	
<b>Meteo:</b>	<b>Disco di Secchi:</b>	<b>m</b>
<b>Operatore:</b>	<b>Strumento prelievo:</b>	

Profondità (m)	Temperatura (°C)	PAR ( $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
0		<b>Valore corrispondente al 100 %</b>
1		<input style="width: 100%;" type="text"/>
2		<b>Valore corrispondente al 1%</b>
3		<input style="width: 100%;" type="text"/>
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		

# **3030.PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO DELLA FAUNA ITTICA NEI LAGHI ITALIANI**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>3</b>
<b>1. SCOPO</b> .....	<b>3</b>
<b>2. RIFERIMENTI NORMATIVI</b> .....	<b>3</b>
<b>3. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURE</b> .....	<b>3</b>
<b>4. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO</b> .....	<b>4</b>
4.1 Metodi di campionamento .....	4
4.2 Periodo di campionamento.....	12
4.3 Scelta dei siti di campionamento.....	12
4.4 Operazioni pre- campionamento .....	12
4.5 Campionamento: operazioni campo.....	13
<b>5. PROCEDURE ANALITICHE</b> .....	<b>14</b>
<b>6. OPERAZIONI POST- CAMPIONAMENTO</b> .....	<b>15</b>
6.1 Pulizia delle reti.....	15
6.2 Completamento dei protocolli di cattura .....	15
6.3 Resoconto sintetico del campionamento .....	15
<b>7. SICUREZZA</b> .....	<b>16</b>
<b>8. QUALIFICA DEGLI OPERATORI</b> .....	<b>16</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>17</b>
<b>ALLEGATO A</b> .....	<b>18</b>
<b>ALLEGATO B</b> .....	<b>18</b>
<b>ALLEGATO C</b> .....	<b>19</b>

## INTRODUZIONE

Il presente protocollo di campionamento della fauna ittica è stato sviluppato all'interno dei seguenti progetti di monitoraggio e ricerca svolti dal CNR-Istituto per lo Studio degli Ecosistemi e dedicati all'implementazione della Direttiva Quadro sulle Acque:

- LIFE+ INHABIT ([www.life.inhabit.it](http://www.life.inhabit.it))
- FP7-WISER ([www.wiser.eu](http://www.wiser.eu))
- Monitoraggio della fauna ittica nei laghi della Provincia autonoma di Bolzano (Ripartizione Foreste, PROVINCIA DI BOLZANO)
- Censimento della fauna ittica dei laghi alpini della Regione Lombardia (DG Agricoltura – REGIONE LOMBARDIA)
- Monitoraggio della fauna ittica nei laghi della Regione Piemonte (DG Ambiente – Settore Tutela Quantitativa e Qualitativa delle Acque – REGIONE PIEMONTE).

### 1. SCOPO

Il presente documento definisce le modalità per il campionamento della fauna ittica in ambienti lacustri finalizzato alla valutazione dello stato ecologico di un lago in linea con le richieste della Direttiva 2000/60/CE (European Union 2000).

Il protocollo definisce un metodo *standard* per il campionamento della fauna ittica finalizzato alla raccolta dei dati necessari per valutare la composizione, abbondanze e struttura di popolazione della comunità ittica in un ambiente lacustre.

### 2. RIFERIMENTI NORMATIVI

UNI EN 14757, 2005. Water quality – Sampling of fish with multi-mesh gillnets.

UNI EN 14962, 2006. Water quality – Guidance on the scope and selection of fish sampling methods.

UNI - EN 14011, 2003. Water quality - Sampling of fish with electricity.

### 3. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURE

- Dispositivi di protezione individuale
- Equipaggiamento per lo svolgimento delle operazioni di elettropesca in sicurezza.
- Giubbetti salvagente: devono essere indossati durante le operazioni su imbarcazione.
- Abbigliamento per le uscite in campo anche in condizioni avverse: stivali, cerata.
- Equipaggiamento per comunicazioni: ricetrasmittenti LPD/VHF o telefono cellulare che dovrebbero essere sempre disponibili per comunicazioni di emergenza.
- Mappa del lago.
- Ecoscandaglio-profondimetro per la misurazione della profondità.
- Boe galleggianti per la segnalazione delle reti.

- Contenitori in plastica (almeno 50-70 litri) per il trasporto delle reti e lo stoccaggio dei pesci catturati.
- GPS per la geolocalizzazione dei punti di campionamento.
- Strumentazione per l'effettuazione dell'elettropesca (generatore, anodo, catodo, guadini, occhiali con lenti polarizzate, dotazioni di sicurezza).
- Ittiometro per il rilievo di campo della lunghezza totale dei pesci catturati (precisione 0,1 cm).
- Bilancia elettronica digitale (precisione 0,1 grammo) per il rilievo del peso dei pesci catturati.

## 4. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

### 4.1 Metodi di campionamento

#### a) *Elettropesca (EP)*

L'elettropesca (Figura 1) deve essere utilizzata in ambiente litorale (max 1,5 m di profondità). Le informazioni tecniche sono specifiche della metodologia e quindi si rimanda al protocollo di riferimento UNI - EN 14011, 2003. Water quality - Sampling of fish with electricity. Un sommario è presente nella Tabella 1.

Si raccomanda di eseguire il campionamento mediante EP nello stesso periodo del campionamento con reti multimaglia.

Si consiglia di utilizzare un generatore con una potenza di almeno 5.000 W.

Il campionamento con EP deve essere fatto per punti (*Point Abundance Sampling Electrofishing-PASE*) utilizzando il generatore nella modalità "corrente continua".



Figura 1 - Operazioni di elettropesca con imbarcazione.

Criteri	Obiettivi
Strumento	Elettrostorditore
Periodo di campionamento	Luglio - Ottobre
Numero punti di campionamento	almeno 50 se lago $\leq 1$ km <sup>2</sup> almeno 80 se lago $> 1$ km <sup>2</sup>
Tempo di immersione anodo	20 secondi per punto
Posizionamento punti	equidistanti lungo il perimetro
Profondità	<1,5 m

**Tabella 1-** *Sommario della metodologia che utilizza l'elettropesca.*

Il numero di punti di campionamento deve essere pari ad almeno 50 per bacini lacustri con superficie minore od uguale a 1 km<sup>2</sup> e 80 per bacini lacustri con superficie maggiore di 1 km<sup>2</sup>.

Il punto di campionamento deve essere scelto a priori in base a due criteri:

1. I punti di campionamento devono essere il più possibile equidistanti tra loro (il metodo migliore è dividere la lunghezza della linea di costa per il numero di punti richiesti e determinare quindi la distanza tra due punti consecutivi).
2. Ogni tipologia di *habitat* (substrato roccioso, fangoso, sabbioso, zona a canneto, rami sommersi, *etc*) deve essere campionata comunque, eventualmente aumentando il numero di punti di campionamento.

L'esecuzione deve avvenire nelle modalità seguenti:

- Gli operatori a bordo dell'imbarcazione si avvicinano al punto individuato per il campionamento.
- Raggiunto il punto (la cui profondità deve essere minore di 1,5 metri) iniziano il campionamento immergendo l'anodo solo una volta per 20 secondi.
- Durante il campionamento l'imbarcazione deve essere ferma.
- Per ogni punto, tutti i pesci storditi devono essere raccolti e tenuti in un apposito contenitore pieno d'acqua.
- Per ogni pesce catturato si devono registrare i parametri come richiesto dal REGISTRO DI CATTURA (Allegato 1) e specificato nel capitolo 6 (Procedure analitiche).
- Al termine di ogni misurazione ogni pesce deve essere reimmesso prontamente in acqua per minimizzarne lo *stress*.
- Ogni punto di campionamento deve essere georeferenziato (coordinate GPS).

Il sommario relativo alla metodologia di campionamento con elettropesca è presentato nella tabella 1.

### **b) Reti Multimaglia branchiali (RM)**

Le Reti Multimaglia branchiali (Foto 2) sono strumenti di cattura passivi, poiché si basano sul fatto che il pesce in movimento rimane immagliato nella rete in corrispondenza della regione branchiale.

Ciascuna rete è composta da una serie di pannelli di dimensioni *standard*, ciascuno caratterizzato da una diversa dimensione della maglia in modo tale che possano essere catturati pesci di taglie differenti. Le RM si possono suddividere in due categorie: "da fondo" o "bentiche" (RMB) e "mesopelagiche" (RMP) in relazione alla tipologia di posa: le prime ancorate e posate sul fondo, le seconde rialzate rispetto al fondo lacustre.



**Figura 2 - Particolare di una rete multimaglia e del suo catturato.**

Il metodo proposto si basa su un campionamento stratificato della colonna d'acqua e sulla definizione casuale delle stazioni di campionamento. Il numero di strati, di stazioni di campionamento, nonché il numero di reti da utilizzare per ciascuno strato, sono determinati in base alla superficie e alla profondità massima del lago.

Il sommario relativo alla metodologia di campionamento con le reti è riassunto in breve nella tabella seguente (Tab. 2) e spiegato per esteso nei paragrafi successivi.

Criteri	Obiettivi
Periodo di campionamento	Luglio - Ottobre
Tempo di posa delle reti	12 ore ( <i>range</i> accettabile da 10,5 a 13,5 ore)
Strumento	Reti multimaglia bentiche e mesopelagiche
Orientamento reti	Casuale rispetto alla linea di costa
Profondità	Strati multipli
Disposizione spaziale	Casuale

**Tabella 2 - Sommario della metodologia che utilizza reti multimaglia.**

### **c) Reti multimaglia bentiche (RMB)**

Ogni RMB è composta da 12 pannelli di rete con maglia variabile da 5 a 55 mm. Ciascuna RMB è lunga 30 metri e alta 1,5 metri. La larghezza delle maglie (mm) deve essere in questo ordine: 43,0 mm,

19,5 mm, 6,25 mm, 10,0 mm, 55,0 mm 8,0 mm, 12,5 mm, 24,0 mm, 15,5 mm, 5,0 mm, 35,0 mm, 29,0 mm.

Se si presume che con questo disegno delle RMB non vengano catturati individui di grandi dimensioni di alcune specie (quali per es. carpa, tinca, luccio, lucioperca, siluro, etc), e dunque non sia possibile ottenere un quadro realistico della struttura di taglia della popolazione di alcune specie ittiche, è possibile aggiungere all'estremità di ogni rete, ulteriori 4 pannelli della stessa altezza e lunghezza dei precedenti, e con maglie di lato pari a 70 mm, 90 mm, 110 mm, 135 mm. Ogni RMB sarà quindi formata da 16 pannelli.

#### **d) Reti multimaglia mesopelagiche (RMP)**

Ciascuna rete pelagica è lunga 27,5 metri e alta 6,0 metri, ha la stessa struttura delle RMB ma la maglia inferiore ha una dimensione del lato pari a 6,25 mm, sono pertanto presenti 11 pannelli di maglia diversa. Se si presume che con questo design delle RMP (Foto 3) non vengano catturati individui di grandi dimensioni di alcune specie, e dunque non sia possibile ottenere un quadro realistico della struttura di taglia della popolazione, è possibile aggiungere alla rete dei pannelli aggiuntivi con maglie di lato pari a 70 mm, 90 mm, 110 mm e 135 mm. I pannelli aggiuntivi devono avere una lunghezza pari a 10 metri e un'altezza di 6 metri.

Le reti mesopelagiche RMP sono sostenute alla profondità desiderata da galleggianti collegati alla corda superiore della rete. Almeno una delle due estremità della rete deve essere collegata ad una cima, a sua volta collegata ad una boa galleggiante. La cima dovrà essere dello spessore adatto a sorreggere il peso della rete durante le operazioni di salpaggio.

Le RMP devono essere posizionate - se possibile - in corrispondenza della zona lacustre che presenta la massima profondità.



**Figura 3 - Posa di reti mesopelagiche.**

**e) Sforzo di campionamento con reti**

L'intensità del campionamento, ossia il numero di reti utilizzate è determinato da due fattori:

1. Superficie del lago
2. Profondità massima del lago

Lo sforzo di pesca con Reti Multimaglia Bentiche (RMB) richiesto per il campionamento è indicato nella Tabella 3.

Nel caso in cui si proceda al campionamento di un grande lago (>160 km<sup>2</sup>), è necessario suddividerlo in due sottobacini, e trattare ciascun sottobacino separatamente.

Qualora il bacino lacustre abbia una profondità massima superiore a 10 metri è necessario effettuare campionamenti anche con RMP. Infatti anche se non vi sono specie tipicamente pelagiche (agone, coregonidi, *etc*) molte specie "litorali" hanno comunque la tendenza a condurre parte della loro esistenza in ambiente pelagico. Il numero di reti mesopelagiche da utilizzare dipende dalla superficie lacustre (Tab. 4).

N.B.: Facendo riferimento ad un lago mediamente produttivo, un team di 4 persone adeguatamente formate è sufficiente per svolgere il lavoro di campagna richiesto (comprendente la posa e il salpaggio di 8 reti bentiche e 3 reti mesopelagiche e il trattamento del campione) in circa 8 ore lavorative.

Area del Lago (km <sup>2</sup> )	Strato della colonna d'acqua (m)	Profondità massima (m)						
		<6	da 6 a 11,9	da 12 a 19,9	da 20 a 34,9	da 35 a 49,9	da 50 a 75	>75
<b>&lt;0,20</b>	<3 m	4	3	4	4	3		
	da 3 a 5,9	4	3	4	3	3		
	da 6 a 11,9		2	4	3	3		
	da 12 a 19,9			4	3	3		
	da 20 a 34,9				3	2		
	da 35 a 49,9					2		
	<b>TOTALE</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	-	-
<b>da 0,21 a 0,50</b>	<3 m	4	5	5	5	5		
	da 3 a 5,9	4	6	5	5	5		
	da 6 a 11,9		5	3	5	6		
	da 12 a 19,9			3	5	6		
	da 20 a 34,9				4	6		
	da 35 a 49,9					4		
	<b>TOTALE</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	-	-
<b>da 0,51 a 1,00</b>	<3 m	8	8	7	7	7	7	
	da 3 a 5,9	8	8	7	7	7	7	
	da 6 a 11,9		8	5	9	7	10	
	da 12 a 19,9			5	6	4	4	
	da 20 a 34,9				3	4	4	
	da 35 a 49,9					3	4	
	da 50 a 75						4	
<b>TOTALE</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>40</b>	-	

Area del Lago (km <sup>2</sup> )	Strato della colonna d'acqua	Profondità massima						
		<6	da 6 a 11,9	da 12 a 19,9	da 20 a 34,9	da 35 a 49,9	da 50 a 75	>75
<b>da 1,01 a 2,50</b>	<3 m	8	8	8	7	7	7	
	da 3 a 5,9	8	8	8	7	7	7	
	da 6 a 11,9		8	8	10	10	6	
	da 12 a 19,9			8	8	6	6	
	da 20 a 34,9				8	6	6	
	da 35 a 49,9					4	4	
	da 50 a 75						4	
	<b>TOTALE</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>-</b>
<b>da 2,51 a 10,00</b>	<3 m	12	11	10	10	10	10	10
	da 3 a 5,9	12	11	10	10	10	10	10
	da 6 a 11,9		10	10	10	10	10	10
	da 12 a 19,9			10	10	8	8	10
	da 20 a 34,9				8	6	8	5
	da 35 a 49,9					4	6	5
	da 50 a 75						4	4
	>75							4
<b>TOTALE</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>40</b>	<b>48</b>	<b>48</b>	<b>56</b>	<b>58</b>	
<b>da 10,01 a 50,00</b>	<3 m	12	11	10	10	10	10	10
	da 3 a 5,9	12	11	10	10	10	10	10
	da 6 a 11,9		10	10	12	12	10	10
	da 12 a 19,9			10	12	9	10	10
	da 20 a 34,9				10	9	10	10
	da 35 a 49,9					6	8	8
	da 50 a 75						4	4
	>75							4
<b>TOTALE</b>	<b>24</b>	<b>32</b>	<b>40</b>	<b>54</b>	<b>56</b>	<b>62</b>	<b>66</b>	
<b>da 50,01 a 160,00</b>	<3 m	16	14	14	14	14	14	14
	da 3 a 5,9	16	14	14	14	14	14	14
	da 6 a 11,9		12	13	12	12	12	12
	da 12 a 19,9			13	12	12	12	12
	da 20 a 34,9				10	10	10	10
	da 35 a 49,9					8	8	8
	da 50 a 75						6	6
	>75							4
<b>TOTALE</b>	<b>32</b>	<b>40</b>	<b>54</b>	<b>62</b>	<b>70</b>	<b>76</b>	<b>80</b>	

**oltre 160 km<sup>2</sup>**

Separare il lago in due sottobacini e posare il numero di reti in accordo con la superficie dei due sottobacini. Se la superficie di uno dei due bacini così definiti è comunque superiore a 160 km<sup>2</sup>, si deve adottare lo schema di posa relativo a superfici tra 50,01 e 160 km<sup>2</sup>.

**Tabella 3 - Schema riassuntivo per la posa delle reti branchiali multimaglia bentiche RMB.**

Area del lago (km <sup>2</sup> )	Strato della colonna d'acqua	n.ro reti
<b>&lt;1,01</b>	0-9,9	1
	10-19,9	1
	20-29,9	1
	30-39,9	1
	40-49,9	1
	<b>totale</b>	<b>5</b>
<b>da 1,01 a 2,5</b>	0-9,9	2
	10-19,9	2
	20-29,9	2
	30-39,9	2
	40-49,9	2
	<b>totale</b>	<b>10</b>
<b>da 2,51 a 10</b>	0-9,9	4
	10-19,9	4
	20-29,9	4
	30-39,9	4
	40-49,9	4
	<b>totale</b>	<b>20</b>
<b>da 10,01 a 50</b>	0-9,9	8
	10-19,9	8
	20-29,9	8
	30-39,9	8
	40-49,9	8
	<b>totale</b>	<b>40</b>
<b>&gt;50</b>	0-9,9	12
	10-19,9	12
	20-29,9	12
	30-39,9	12
	40-49,9	12
	<b>totale</b>	<b>60</b>

**Tabella 4 - Numero di Reti Mesopelagiche (RMP) da utilizzare nei laghi con profondità massima superiore a 10 metri. Il numero di reti dipende dalla superficie del lago.**

## 4.2 Periodo di campionamento

I campionamenti devono essere effettuati tra il mese di Luglio ed il mese di Ottobre.

Le reti devono essere posate al tramonto, indicativamente tra le 18:00 e le 20:00, e salpate alla mattina seguente tra le ore 6:00 e le ore 8:00.

È raccomandato un tempo di permanenza in acqua di circa 12 ore, ma nel caso di laghi eutrofi o iper-eutrofi il tempo di posa può essere ridotto.

N.B.: Il tempo di permanenza (in ore) delle reti in acqua, deve essere sempre registrato accuratamente.

Per il primo giorno di campionamento si consiglia di posare le reti a profondità differenti in modo tale da "esplorare" la distribuzione verticale della fauna ittica e delle sue abbondanze. La conoscenza della distribuzione verticale delle specie ittiche e della loro abbondanza nei diversi strati della colonna d'acqua, è di fondamentale importanza per poter impostare la posa nei giorni successivi e rendere il più possibile omogenea la quantità di pesce catturata in ogni singolo giorno. Ciò facilita le operazioni di rilevazione dei parametri morfometrici, etc, e permette altresì di ottimizzare i tempi di lavoro. In sintesi, è necessario evitare di catturare una quantità di pesce che è poi impossibile processare in giornata.

## 4.3 Scelta dei siti di campionamento

I punti di posa delle Reti Multimaglia Bentiche (RMB) devono essere scelti in modo casuale, rispettando tuttavia numero e profondità come da Tabella 3.

Ogni punto di campionamento deve essere georeferenziato.

## 4.4 Operazioni pre- campionamento

Un buon campionamento deve essere preparato minuziosamente prima di essere svolto. È pertanto necessario:

- valutare lo sforzo di pesca (numero reti e tipologia) in relazione alla tipologia lacustre (superficie, profondità);
- valutare lo stato del materiale da utilizzare.

Una volta selezionato il lago da campionare è necessario:

- assicurarsi che tutti i permessi necessari per svolgere il campionamento siano stati ottenuti (per es. Provincia, Parchi, Diritti esclusivi, *etc*) così come i permessi per l'eventuale navigazione a motore;
- informare tutti i soggetti interessati (Enti locali, proprietari dei diritti di pesca, associazioni pescatori) dello scopo e dell'ampiezza temporale che richiederà lo svolgimento delle operazioni di campionamento;
- preparare il materiale necessario, assicurandosi che ogni rete abbia un segnale di riferimento univoco (ID rete).

Prima di iniziare ogni lavoro di campagna è necessario che gli operatori siano familiari all'ambiente di studio (come raggiungerlo, luoghi per mettere l'imbarcazione in acqua, eventuali pericoli per la navigazione).

Si raccomanda di fare il punto della situazione tra i vari operatori coinvolti il giorno precedente l'uscita.

Gli operatori dovranno avere con sé la mappa del lago con indicate le stazioni da campionare e il numero di reti da posare per ciascuna profondità.

Gli operatori dovranno essere in possesso delle schede di rilevamento dei dati (Allegati 1, 2 e 3).

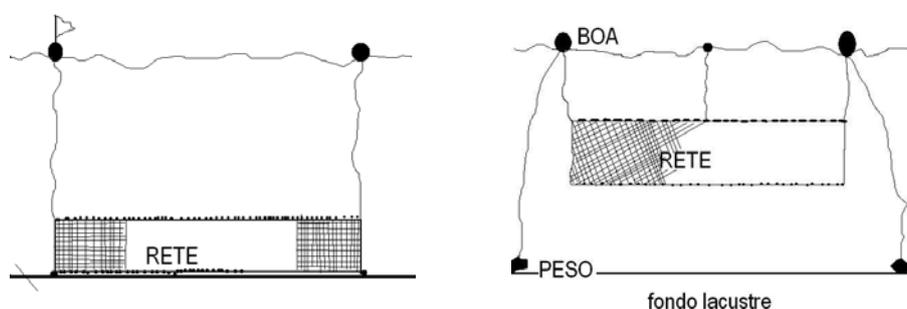
## 4.5 Campionamento: operazioni campo

### a) *Posa delle reti*

Le reti debbono essere calate nell'area lacustre scegliendo in modo il più possibile casuale quali zone campionare. Ciascuna rete deve essere opportunamente segnalata da una boa o segnale galleggiante numerato che deve fungere da ID rete univoco (non si deve far confusione tra le diverse reti, poiché rappresentano campioni indipendenti tra loro).

Le reti devono essere posate con un angolo casuale rispetto alla linea di costa. Possibilmente la posa delle reti deve avvenire come rappresentato in figura 4.

La RMB dovrà essere opportunamente segnalata in superficie con una boa galleggiante/segnale ben visibile ed essere appesantita alle estremità con due pesi che mantengano la rete vicina al fondo anche in presenza di corrente o di pesci di dimensioni tali da poterla spostare. La cima di collegamento al segnale galleggiante dovrà essere abbastanza robusta da poter essere utilizzata per salpare la rete anche in presenza di eventuali ostacoli.



**Figura 4** - Rappresentazione schematica della metodologia di posa per le Reti Multimaglia Bentiche RMB (a sn) e Mesopelagiche RMP (a dx).

Le RMP devono essere sostenute alla profondità desiderata da boe grandi e ben visibili (almeno 50 cm di diametro) collegate all'estremità della rete, e da galleggianti ogni 15 metri circa. Questi ultimi potranno essere costituiti da un rettangolo di polistirolo o materiale della stessa tipologia (35 cm x 15 cm x 10 cm) legato alla rete da una cima sottile (max 2 mm) e adeguatamente lunga in modo da permettere alla rete di raggiungere la profondità desiderata. Si raccomanda di appesantire le estremità inferiori di ogni rete con pesi di circa 100 g (per es. anelli di acciaio) nel caso in cui la corda piombata sul lato inferiore non sia sufficiente a mantenere verticale la rete.

La rete può essere mantenuta ferma rispetto al punto di posa mediante due cime collegate alle boe situate alle estremità della stessa e fissate al fondo con un peso di almeno 10 kg. È possibile non ancorare le reti al fondo, e lasciarle libere di muoversi secondo le correnti dominanti.

I dati di riferimento delle reti (numero identificativo ID rete, punto GPS e profondità di posa) devono essere registrati nel "Registro di posa reti" (Allegato 2).

### b) *Salpaggio delle reti*

Le reti devono essere salpate il giorno successivo alla posa, indicativamente tra le 6 e le 8 del mattino. Le reti vanno salpate con lo stesso ordine in cui sono state calate. Ogni rete e il relativo catturato devono essere tenute separate dalle altre.

## 5. PROCEDURE ANALITICHE

Il campione catturato durante le operazioni di elettropesca deve essere analizzato sul posto e rilasciato quanto prima possibile. I dati devono essere registrati nel "Registro di cattura elettropesca" (Allegato 1).

I parametri da registrare sul "Registro di cattura elettropesca" sono i seguenti:

- ID Punto elettropesca e coordinate GPS;
- specie ittica;
- la lunghezza totale (**Ltot**) di tutti gli individui, misurata a partire dall'estremità del muso fino all'estremità della coda a lobi riuniti;
- il peso totale **Ptot** per almeno 100 individui per specie divisi per classi di taglia omogenee<sup>1</sup>;
- età (se viene effettuato il prelievo delle scaglie<sup>2</sup>).

Il campione delle reti multimaglia deve essere analizzato a terra e possibilmente al coperto - o almeno - non sotto il sole. Nel caso in cui non venga immediatamente analizzato, tutto il materiale delle reti deve essere conservato in cella frigorifera ad una temperatura di 3-4 °C circa, per uno-due giorni al massimo.

I dati analitici devono essere registrati nel "Registro di cattura reti multimaglia" (Allegato 3).

I parametri da registrare sul "Registro di cattura reti multimaglia" sono i seguenti:

- il numero della rete di riferimento (da cui, attraverso il "Registro di posa" si risale alla posizione GPS e alla profondità di posa o di pesca);
- la specie ittica;
- la lunghezza totale **Ltot** di tutti gli individui, misurata a partire dall'estremità del muso fino all'estremità della coda a lobi riuniti;
- il peso totale **Ptot**, per almeno 100 individui per specie, divisi per classi di taglia omogenee<sup>1</sup>;
- il prelievo delle scaglie per la rilevazione dell'età è facoltativo<sup>2</sup>.

Per la determinazione dell'età e per la stima dell'accrescimento di un pesce si utilizzano le scaglie. Solo nel caso in cui le scaglie fossero molto piccole, ovvero assenti o di difficile interpretazione, si ricorre alla lettura delle otoliti (le piccole ossa che forniscono al sistema nervoso centrale le informazioni sull'equilibrio) o delle sottili ossa opercolari (formazioni ossee che ricoprono le camere branchiali). La lettura delle scaglie o di altre strutture ossee deve essere effettuata da personale opportunamente formato. Per approfondimenti sull'argomento si consiglia la lettura di testi specifici quali - per esempio - Murphy & Willis (1996).

Nel caso in cui si prelevino le scaglie, o altre strutture ossee utili alla determinazione dell'età, queste devono essere conservate in bustine di carta/provette eppendorf (o similari) e tenute separate per ogni individuo. Durante la compilazione dei registri di cattura si deve indicare il codice identificativo del contenitore/busta/provetta, in cui sono state raccolte nella casella "Note".

<sup>1</sup> Ciascuna classe di taglia è definita come un decimo della lunghezza massima della specie. Ad esempio se una specie ha una lunghezza massima di 100 cm, ciascuna classe di taglia sarà pari ad un intervallo di 10 cm. Dieci individui per ogni classe di taglia, sono sufficienti per ricostruire la relazione tra lunghezza e peso di quella specie secondo la relazione:

$$P_{tot} = a \times L_{tot}^b$$

e quindi per calcolare il peso per il restante numero di individui per i quali il peso non è stato misurato partendo dalla sola lunghezza totale ( $L_{tot}$ ).

<sup>2</sup> La determinazione dell'età è facoltativa. Tuttavia l'età è necessaria per poter costruire la relazione lunghezza-età da cui ricavare la lunghezza massima teorica di quella specie in quel determinato ambiente. Quest'ultimo dato è necessario per definire i parametri di l'applicazione della metrica 2 (Struttura di popolazione) del Lake Fish Index. Pertanto, se non esistono dati pregressi recenti relativi alla lunghezza massima di una specie ittica in quel determinato ambiente, la rilevazione dell'età si rende necessaria. Infatti, la lunghezza massima teorica di una specie può variare significativamente in relazione alla dimensione, profondità e stato trofico dell'ambiente lacustre.

Nel caso in cui si determini l'età del pesce, la stessa deve essere indicata nel foglio di lavoro nel seguente modo:

se il pesce catturato si trova nel suo primo anno di vita si scriva 0 (zero), se si trova nel suo secondo anno di vita si scriva 1 (uno), se si trova nel terzo anno di vita si scriva 2, e così via.

N.B.: All'interno della pubblicazione del CNR-ISE relativa al *Lake Fish Index* (Volta 2013) è presente una indicazione della lunghezza massima per le specie ittiche chiave.

## 6. OPERAZIONI POST- CAMPIONAMENTO

### 6.1 Pulizia delle reti

È necessario che le reti vengano pulite accuratamente, secondo le disposizioni prescritte:

- Risciacquo delle reti con acqua tiepida.
- Eliminazione dei residui vegetali (piante acquatiche, rami, *etc*).
- Asciugatura quasi completa delle reti.
- Sistemazione delle reti in modo ordinato in appositi contenitori.

### 6.2 Completamento dei protocolli di cattura

I dati raccolti nelle schede di campagna per campionamenti con RMB, RMP o EP devono essere inseriti in un foglio di lavoro .

Ciascuna colonna rappresenta uno dei seguenti parametri/dati:

Nome Lago	Data di campionamento	ID strumento (RMB, RMP, EP)
Latitudine stazione (N)	Longitudine stazione (E)	Profondità (m)
Tempo posa reti o tempo elettropesca <sup>3</sup> (h)	Operatori	Note
ID Specie	Nome scientifico	Nome comune
Lunghezza totale	Peso totale	Età

### 6.3 Resoconto sintetico del campionamento

Gli operatori stileranno un resoconto sintetico del campionamento indicando:

- Data e luogo di campionamento.
- Numero di specie campionate.
- Peso totale del pescato.

Il resoconto sintetico del campionamento deve essere consegnato alle autorità preposte alla gestione della fauna ittica del bacino lacustre.

<sup>3</sup> Per il tempo dell'elettropesca si può assumere un valore standard di 0,006 h.

## **7. SICUREZZA**

Il campionamento e l'analisi in campo sono generalmente pericolosi. Gli operatori che utilizzeranno questo protocollo dovranno avere la sufficiente formazione per le normali pratiche di laboratorio e di analisi in campo.

Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso. È responsabilità degli Organi preposti di definire i dispositivi più opportuni di protezione individuale e di individuare le azioni necessarie ad assicurare la sicurezza degli operatori secondo le disposizioni di legge.

## **8. QUALIFICA DEGLI OPERATORI**

Il personale coinvolto nelle attività di monitoraggio biologico deve essere qualificato sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento, esperienza e/o comprovata abilità.

In particolare, gli operatori che eseguono il campionamento, l'identificazione e la stima di abbondanza dei taxa devono possedere adeguata e documentata preparazione (diploma di laurea e/o specializzazione post-universitaria) in campo ecologico, limnologico e tassonomico e devono aver compiuto un percorso di formazione/apprendimento in affiancamento ad operatori esperti o frequentando un apposito corso di formazione.

Il mantenimento della qualifica del personale coinvolto nel monitoraggio della fauna ittica deve essere garantito e periodicamente verificato tramite esperienza lavorativa, partecipazione a confronti interlaboratorio organizzati da istituzioni o organizzazioni di riconosciuta competenza, e anche attraverso la partecipazione a incontri di aggiornamento quali seminari e conferenze.

## **BIBLIOGRAFIA**

Murphy, B.R. & D.W. Willis (Eds). 1996. Fisheries techniques. 2nd ed. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland: 732 pp.

Volta, P. 2013. Indice per l'analisi dello stato di qualità della fauna ittica finalizzato alla valutazione dello stato ecologico dei laghi italiani: Lake Fish Index (LFI). In: Indici per la valutazione della qualità ecologica dei Laghi. Report CNR-ISE, 02.13: 115-138.

ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.

APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006

## ALLEGATO A

### REGISTRO DI CATTURA ELETTROPESCA

<b>LAGO</b>	<b>Data (gg.mm.aa)</b>
-------------	------------------------

--	--

#### Operatori


N*	GPS**	Prof. (m)	Specie	Ltot (mm)	Ptot (g)	Età	Note
<b>1</b>							
....							
....							
<b>2</b>							
....							
...							
<b>3</b>							
...							
...							

\*N = è semplicemente un numero progressivo d'ordine, utile nella fase di compilazione delle tabelle e durante l'inserimento dei dati in formato elettronico.

\*\*GPS = numero del *mark* GPS (da trasformare poi in coordinate nel foglio di lavoro).

## ALLEGATO B

## REGISTRO DI POSA RETI

**LAGO**

**Data** (gg.mm.aa)

**Operatori**

ID Rete	GPS***	Prof. (m)	Tempo di posa (ore)
RMB1*		3,5	
RMB2*		12,8	
RMP1**		0	
...			
...			

\*RMB = Rete Multimaglia Bentica

\*\*RMP = Rete Multimaglia Mesopelagica

\*\*\*GPS = numero del mark GPS (da trasformare poi in coordinate nel foglio di lavoro).

## ALLEGATO C

## REGISTRO DI CATTURA RETI MULTIMAGLIA

<b>LAGO</b>		<b>Data (gg.mm.aa)</b>	
-------------	--	------------------------	--

<b>Numero griglia</b>		<b>Operatori</b>	
-----------------------	--	------------------	--

oppure

<b>GPS</b>			

N*	ID Strumento	Specie	Ltot (mm)	Ptot (g)	Età	Note
1	RMB1					
2	....					
3	....					
4	RMB2					
5	...					
6	...					
7	RMP1					
...	....					
...	....					

\*N = è un numero progressivo, utile nella fase di compilazione delle tabelle e durante l'inserimento dei dati in formato elettronico.

\*RMB = Rete Multimaglia Bentica

\*\*RMP = Rete Multimaglia Mesopelagica

# **3040. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI DI MACROFITE ACQUATICHE IN AMBIENTE LACUSTRE**

**Manuali e Linee Guida  
111/2014**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE .....</b>	<b>3</b>
<b>1. SCOPO .....</b>	<b>3</b>
<b>2. RIFERIMENTI NORMATIVI.....</b>	<b>3</b>
<b>3. TERMINI E DEFINIZIONI.....</b>	<b>3</b>
<b>4. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURA .....</b>	<b>4</b>
4.1 Materiale da campo necessario.....	4
4.2 Materiale da campo utile .....	4
4.3 Materiale da laboratorio.....	4
<b>5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO .....</b>	<b>5</b>
<b>6. SICUREZZA .....</b>	<b>7</b>
<b>7. ASSICURAZIONE DI QUALITÀ.....</b>	<b>7</b>
7.1 Qualifica degli operatori.....	7
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>9</b>
<b>ALLEGATO A -SCHEDE DI CAMPAGNA.....</b>	<b>10</b>

## INTRODUZIONE

Le macrofite acquatiche sono considerate dei buoni indicatori della qualità ambientale in quanto sono sensibili ai pesticidi, all'inquinamento inorganico e all'eutrofizzazione. A questo si deve aggiungere la relativa facilità con cui possono essere individuate e classificate; l'assenza di mobilità che ne consente l'uso per la valutazione di uno specifico sito ed infine il ciclo vitale annuale o pluriennale che permette di valutare l'effetto dei fattori di stress nel tempo.

### 1. SCOPO

Il protocollo qui descritto ha lo scopo di definire una metodologia univoca per la raccolta delle informazioni relative alla presenza nei laghi di macrofite acquatiche finalizzata alla determinazione dello stato ecologico di questi corpi idrici, utilizzando tali organismi come elementi di qualità biologica. Le macrofite acquatiche, a cui la metodologia fa riferimento, appartenengono alle seguenti 3 categorie: sommerse (es. *Myriophyllum*), radicate a foglie galleggianti (es. *Nymphaea*) e liberamente galleggianti (es. *Lemna*), classificate in base alla *Flora d'Italia* (Pignatti, 1982; Bazzichelli & Abdelahad, 2009; John, Whitton & Brook 2005). Queste categorie comprendono sia le fanerogame sia le piante inferiori come muschi (es. *Fontinalis*), felci (es. *Salvinia*) e macroalghe sessili (es. *Chara*) formanti colonie ed aggregati macroscopicamente visibili. La stagione di massima presenza delle macrofite lacustri dipende dalla latitudine, altitudine e dalle specie. Viene perciò consigliato per svolgere al meglio il lavoro di campionamento, individuare il periodo di massima crescita dell'ambiente di studio compreso tra giugno e settembre. Il campionamento non deve essere comunque eseguito più di una volta l'anno.

### 2. RIFERIMENTI NORMATIVI

EN 15460:2007. Water quality - Guidance standard for the surveying of macrophytes in lakes;

EN 14184:2003. Water quality - Guidance standard for the surveying of aquatic macrophytes in running waters;

EN 14996:2006. Water quality - Guidance on assuring the quality of biological and ecological assessments in the aquatic environment.

### 3. TERMINI E DEFINIZIONI

**Sito:** porzione continua di riva, di ampiezza variabile, al cui interno è possibile individuare una comunità macrofita omogenea in termini di composizione specifica e che si estende fino ad una profondità costante.

**Transetto:** linea all'interno del sito, perpendicolare alla costa, lungo la quale si effettuano le osservazioni o i campionamenti.

**Intervallo di profondità:** porzione di transetto compreso tra la profondità  $x$  e la profondità  $x + 1$  metro entro la quale si effettua l'osservazione o il campionamento. Il primo intervallo di profondità è quello compreso tra 0 m (riva) e la profondità di 1 metro. Al suo interno si collocano 4 punti di osservazione o di campionamento secondo le modalità indicate più avanti. L'osservazione o il

campionamento prosegue poi all'intervallo successivo, terminando poi nel punto di massima profondità lacustre oppure al termine della zona vegetata.

Nel caso particolare in cui, percorrendo il transetto dalla riva al punto di massima profondità, la batimetria non continui a degradare occorre considerare l'intervallo di profondità come già campionato.

Nel caso poi che l'intervallo di profondità abbia una estensione notevole (superiore ai 300 m) occorre che il numero di punti di osservazione aumentino in modo da rilevare al meglio l'abbondanza di tutte le possibili specie presenti nell'intervallo.

## **4. STRUMENTAZIONE ED ATTREZZATURA**

### **4.1 Materiale da campo necessario**

- Dispositivi di protezione individuale
- Carta topografica del lago in scala 1:5000 o 1:10000. La scala dovrà essere scelta per raffigurare al meglio l'intero bacino imbrifero ed il relativo uso del suolo
- Disco di Secchi per la misura della trasparenza dell'acqua
- GPS
- Corda metrata o ecoscandaglio per la misura della profondità del fondale (nel caso che si utilizzi l'ecoscandaglio occorre verificare che la profondità rilevata corrisponda al fondale e non al tetto della vegetazione sommersa)
- Batiscopio
- Rastrello con denti opposti e spazio interdente regolabile per la raccolta della vegetazione.
- Schede di campagna (Allegato A)

### **4.2 Materiale da campo utile**

- Telecamera subacquea munita di video a cristalli liquidi
- Palmare o computer portatile, interfacciati con strumento GPS avente un errore inferiore a 3 m, per il rilevamento delle coordinate geografiche richieste
- Telemetro ottico per il rilevamento delle distanze rispetto alla riva (nel caso non si disponga di GPS)
- Ecosonda in grado di rappresentare, su schermo o su carta, la presenza della vegetazione sommersa; questo strumento facilita la ricerca della vegetazione sommersa nei laghi di grande estensione
- Draga per la determinazione della granulometria del fondo
- Buste di plastica, per la conservazione degli esemplari di piante non immediatamente determinabili
- Lente di ingrandimento
- Matita e penna con inchiostro indelebile
- Borsa frigorifera per la conservazione dei campioni
- Macchina fotografica

### **4.3 Materiale da laboratorio**

- Conservazione campioni
- Stereomicroscopio
- Microscopio
- Conservanti alghe

- Pipette
- Vetrini
- Pinzette
- Manuali di riconoscimento e chiavi dicotomiche per la determinazione delle specie.

## 5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

Il procedimento d'indagine per ciascun corpo idrico si compone di 4 fasi:

- I. Raccolta preliminare di informazioni circa la presenza di macrofite attraverso la consultazione dei frequentatori e dei fruitori del lago e la ricerca bibliografica.
- II. Individuazione dei siti in base alle informazioni raccolte nel corso della fase I e all'esito di perlustrazioni propedeutiche al campionamento.
- III. Descrizione delle caratteristiche ambientali dei siti e del territorio a ridosso dei siti medesimi.
- IV. Esecuzione delle osservazioni o dei campionamenti lungo i transetti.

Le fasi II, III e IV vanno svolte tra maggio e settembre, ma comunque cercando di effettuare le osservazioni o i campionamenti nel periodo di massima espansione della flora macrofita. Si consiglia l'utilizzo di operatori subacquei ove possibile.

### FASE I

L'indagine anche informale condotta presso i frequentatori o i fruitori del lago (gestori di strutture turistiche, di cantieri o di centri nautici, operatori del servizio civile, pescatori, residenti, ecc.) e la ricerca bibliografica permettono di ottenere le informazioni di base utili per indirizzare e velocizzare le successive fasi dell'indagine.

### FASE II

L'attendibilità, l'attualità e la completezza delle informazioni raccolte durante la prima fase devono essere verificate ed integrate da ispezioni in campo al fine di poter individuare i siti. Questa fase, così come quelle successive, viene svolta a bordo di un'imbarcazione leggera a remi che possa penetrare anche all'interno della vegetazione galleggiante ed utilizzando la strumentazione precedentemente indicata. I margini del sito devono essere rilevati mediante GPS e riportati su una cartografia in scala 1:5000 o 1:10000 utilizzando un sistema informativo geografico con riferimenti UTM32-WGS84.

### FASE III

Una volta individuato il sito se ne descrivono le caratteristiche principali, relativamente al territorio adiacente, segnalando: l'eventuale presenza di darsene, moli, porti, scarichi di qualsiasi tipo, immissari, nonché l'uso del suolo agricolo, ecc. Tutte queste informazioni dovranno essere riportate nelle sezioni appositamente predisposte sulle schede di campionamento (Allegato A). Dovranno essere segnalati anche quei fattori che possono incidere sulla presenza della vegetazione acquatica quali la presenza di animali erbivori (uccelli selvatici, pesci, ecc.) oppure l'asportazione periodica delle piante mediante sfalci (Allegato A).

### FASE IV

#### *Disposizione dei transetti*

I siti che pur avendo caratteristiche simili tra loro sono distribuiti su tratti di litorale separati sono considerati siti diversi e, in quanto tali, vanno tutti campionati.

In ciascun sito andrà percorso, ispezionato e campionato un solo transetto senza tener conto dell'estensione del sito stesso. Infatti essendo il sito omogeneo dal punto di vista della composizione in specie, può essere descritto da un solo transetto.

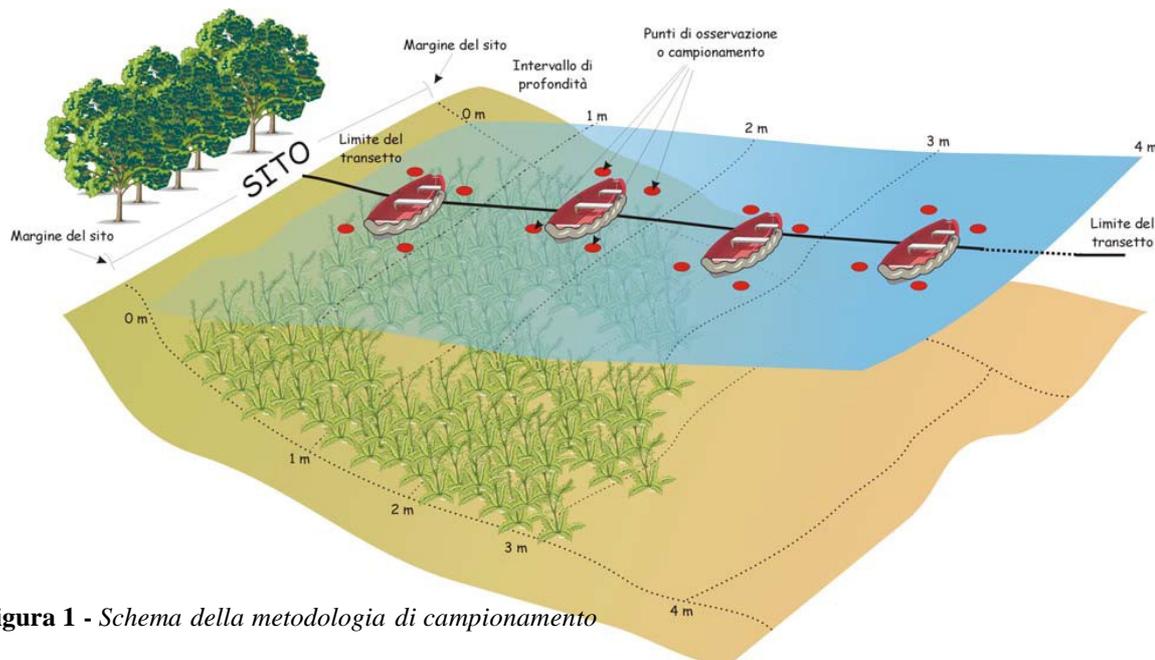
Il transetto, in ciascun sito è disposto ortogonalmente alla riva. I limiti dei transetti, inizio in corrispondenza della riva e fine nel punto di massima profondità, così come i margini del sito devono essere rilevati mediante GPS e riportati su una cartografia in scala 1:5000 o 1:10000 utilizzando un sistema informativo geografico con riferimenti UTM32-WGS84.

#### *Ispezione del transetto*

L'ispezione viene effettuata con la barca posizionata (ancorata) all'interno dell'intervallo di profondità. I punti di osservazione o di campionamento sono 4 in totale: uno verso prua ed uno verso poppa da ciascun lato della barca (Fig. 1). Nel punto in cui si posiziona la barca, che è uno solo per ogni intervallo, si misura la profondità, si rilevano le coordinate geografiche (UTM32-WGS84) e si determina la tipologia del fondale (Allegato A), ricorrendo, se necessario, all'impiego di draghe comunemente usate in limnologia. L'ispezione del transetto si esegue partendo dalla riva e procedendo verso il lago e termina quando si rileva l'assenza di vegetazione su tutti i 4 punti in due intervalli di profondità consecutivi oppure quando è stata raggiunta la massima profondità del lago. L'ispezione deve consentire di rilevare le specie presenti e di assegnare un valore di abbondanze per ciascuna specie individuata. I risultati vanno riportati nella scheda di campagna assegnando un codice numerico a ciascuna specie trovata. L'abbondanza viene assegnata utilizzando il metodo di Kohler che prevede 5 classi così come riportato in Tabella 1. In acque poco profonde e sufficientemente trasparenti può bastare la semplice osservazione senza o con batiscopio. Si fa ricorso all'osservazione con la telecamera o al campionamento con il rastrello quando a causa della profondità o della scarsa trasparenza non si può accertare la presenza della vegetazione, oppure non si distinguono le specie che compongono la comunità usando il batiscopio. Assieme all'indagine occorre misurare la trasparenza dell'acqua con il disco di Secchi, una sola volta nel corso della giornata, nella zona pelagica.

Valore	Abbondanza della specie	Descrizione
1	Molto rara	Presenza di 1 - 5 piante
2	Rara	Presenza di 6 - 10 piante
3	Comune	Deve essere ritrovata senza una ricerca dedicata appositamente
4	Frequente	Frequente ma non in massa con zone estese in cui è assente
5	Molto frequente	Dominante, con una copertura oltre il 50%

**Tabella 1** - Scala delle abbondanze secondo Kohler (1978). Nella colonna "Descrizione" viene riportato, come ausilio, il criterio esplicativo delle classi di abbondanza utilizzato nell'ambito dell'intercalibrazione europea nel Geographic Intercalibration Group Central-Baltic.



**Figura 1** - Schema della metodologia di campionamento

## 6. SICUREZZA

Il campionamento e l'analisi in campo sono generalmente pericolosi. Gli operatori che utilizzeranno questo protocollo dovranno avere la sufficiente formazione per le normali pratiche di laboratorio e di analisi in campo.

Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso. È responsabilità degli Organi preposti di definire i dispositivi più opportuni di protezione individuale e di individuare le azioni necessarie ad assicurare la sicurezza degli operatori secondo le disposizioni di legge.

## 7. ASSICURAZIONE DI QUALITÀ

Nell'ambito dell'applicazione del presente protocollo devono essere definite le attività più appropriate al fine di assicurare che la qualità delle valutazioni biologiche consegua specifici requisiti. In particolare dovranno essere definiti:

- Il programma di monitoraggio (e.g. finalità del monitoraggio, numero e collocazione dei siti di campionamento, frequenza dei campionamenti ...)
- La valutazione degli errori associati al campionamento e all'identificazione delle specie
- La valutazione di possibili inquinamenti dei campioni, attraverso la preparazione di "bianchi"
- La qualificazione e l'esperienza del personale che esegue il campionamento
- La partecipazione a confronti inter-laboratorio e/o a prove valutative.

### 7.1 Qualifica degli operatori

Il personale coinvolto nelle attività di monitoraggio biologico deve essere qualificato sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento, esperienza e/o comprovata abilità.

In particolare, gli operatori che eseguono il rilievo in campo e l'identificazione dei taxa devono possedere un'adeguata e documentata preparazione di base (diploma di laurea e/o specializzazione post-universitaria) in campo ecologico, idrobiologico e tassonomico (diatomee) e devono aver compiuto un percorso di apprendimento in affiancamento ad operatori esperti o frequentando un apposito corso di formazione.

Il mantenimento della qualifica del personale coinvolto nel monitoraggio con le diatomee deve essere assicurato attraverso la partecipazione regolare all'attività di monitoraggio e periodicamente verificato tramite, ad esempio: formazione-addestramento, partecipazione a confronti interlaboratorio organizzati da istituzioni o organizzazioni di riconosciuta competenza, e anche attraverso la partecipazione a seminari e conferenze di aggiornamento.

## **BIBLIOGRAFIA**

Pignatti S. 1982. Flora d'Italia (3 vol). Edagricole, Bologna.

Bazzichelli G. & Abdelahad N. 2009. Flora analitica delle Caroficee. Università La Sapienza. Editrice Sapienza, Roma.

John D.M., Whitton B.A. & Brook A.J. 2005. The Freshwater Algal Flora of the British Isles - An identification guide to freshwater and terrestrial algae. John D.M., Whitton B.A., Brook A.J. (eds.), Cambridge University Press.

Kohler, A. 1978. Methoden der Kartierung von Flora und Vegetation von Süßwasserbiotopen. Landschaft. Stadt 10(2): 73-85.

ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.

APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006

## ALLEGATO A -SCHEDE DI CAMPAGNA

A 1 - Descrizione del sito

<b>Lago (toponimo)</b>	<input type="text"/>		
<b>Data:</b>	<input type="text"/>	<b>Ora:</b>	<input type="text"/>
<b>Meteo:</b>	<input type="text"/>	<b>Disco di Secchi:</b>	<input type="text"/> m
<b>Operatore:</b>	<input type="text"/>		

<b>Sito n°</b> <input type="text"/>	<b>Coordinate (UTM32-WGS84) dei margini del sito</b>				
	<b>Inizio (riva)</b>	<b>N</b>	<input type="text"/>	<b>E</b>	<input type="text"/>
	<b>Fine</b>	<b>N</b>	<input type="text"/>	<b>E</b>	<input type="text"/>

<b>Caratteristiche della zona di costa a ridosso del sito</b>			
<b>Vegetazione</b>	<b>Linea di costa</b>	<b>Uso del suolo</b>	<b>Linea di costa</b>
Bosco	<input type="checkbox"/>	Tessuto urbano	<input type="checkbox"/>
Arbusti	<input type="checkbox"/>	Parchi urbani e aree sportivo o ricreative	<input type="checkbox"/>
Alberi e arbusti	<input type="checkbox"/>	Aree portuali	<input type="checkbox"/>
Erba alta	<input type="checkbox"/>	Strade, parcheggi, piste ciclabili, sentieri	<input type="checkbox"/>
Canneti, cariceti	<input type="checkbox"/>	Zone coltivate	<input type="checkbox"/>
Paludi	<input type="checkbox"/>	Zone industriali	<input type="checkbox"/>
Prati, pascoli	<input type="checkbox"/>	Altro	<input type="text"/> <input type="checkbox"/>
Orti, giardini	<input type="checkbox"/>		
Aree senza vegetazione	<input type="checkbox"/>		
Altro	<input type="text"/> <input type="checkbox"/>		

<b>Tipologia della zona costiera</b>	<b>Caratteristiche particolari</b>
Rive ripide <input type="checkbox"/>	Accumulo di legname morto o trasportato <input type="checkbox"/>
Rive piatte <input type="checkbox"/>	Scarichi, rifiuti o inquinamento <input type="checkbox"/>
Muri <input type="checkbox"/>	Afflussi (canali, fiumi, torrenti) <input type="checkbox"/>
Altro <input type="text"/> <input type="checkbox"/>	Emissario <input type="checkbox"/>
<b>Tipologia degli argini</b>	Scaricatori (canali, drenaggio) <input type="checkbox"/>
Pietre, massi <input type="checkbox"/>	Pontili di sbarco <input type="checkbox"/>
Muri <input type="checkbox"/>	Altro <input type="text"/> <input type="checkbox"/>
Naturale <input type="checkbox"/>	
Altro <input type="text"/> <input type="checkbox"/>	

## A 2.1 - Scheda di campionamento macrofite

Lago (toponimo)			
Data:		Ora:	
Meteo:		Disco di Secchi:	m
Operatore:			
Sito n°			
Transetto n°	Coordinate (UTM32-WGS84) dei limiti del transetto		
	Inizio (riva)	N	E
	Fine	N	E
Strumento di campionamento:		<input type="checkbox"/> Batiscopio	<input type="checkbox"/> Telecamera <input type="checkbox"/> Rastrello

Intervallo di profondità (m)	Profondità* (m)	Coordinate* (UTM32-WGS84)		Specie presenti**									
				Sp1	Sp2	Sp3	Sp4	Sp5	Sp6	Sp7	Sp8		
0 - 1 m	m	N											
		E											
1 - 2 m	m	N											
		E											
2 - 3 m	m	N											
		E											
3 - 4 m	m	N											
		E											
4 - 5 m	m	N											
		E											
5 - 6 m	m	N											
		E											

\*al centro della barca

\*\*indicare per ciascuna specie l'abbondanza secondo la scala in tabella 1





# **3050. PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E ANALISI DELLE DIATOMEE BENTONICHE DEI LAGHI E DEGLI INVASI**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b> .....	3
<b>1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE</b> .....	3
<b>2. RIFERIMENTI</b> .....	3
<b>3. TERMINI E DEFINIZIONI</b> .....	3
<b>4. STRUMENTAZIONE E ATTREZZATURA</b> .....	4
4.1 In campo.....	4
4.2 In laboratorio .....	4
4.2.1 <i>Conservazione del campione</i> .....	4
4.2.2 <i>Trattamento del campione e pulizia dei frustuli</i> .....	4
4.2.3 <i>Preparazione dei vetrini permanenti</i> .....	5
4.2.4 <i>Identificazione e conteggio</i> .....	5
<b>5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO</b> .....	5
5.1 Periodo di campionamento.....	5
5.2 Scelta della stazione .....	5
5.3 Scelta del substrato .....	6
5.4 Campionamento.....	6
5.5 Etichettatura.....	9
5.6 Scheda di campionamento.....	9
<b>6. PROCEDURE ANALITICHE</b> .....	9
6.1 Preparazione del campione – Metodi per la pulizia dei frustuli .....	9
6.2 Preparazione dei vetrini permanenti .....	10
6.3 Identificazione e conteggio.....	11
<b>7. ARCHIVIAZIONE DEI DATI, DEI VETRINI E DEI CAMPIONI</b> .....	13
<b>9 SICUREZZA</b> .....	13
<b>8. ASSICURAZIONE DI QUALITÀ</b> .....	13
8.1 Qualifica degli operatori .....	13
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	14
<b>ALLEGATO A</b> .....	16
<b>ALLEGATO B</b> .....	18

## INTRODUZIONE

Le diatomee sono una componente importante degli ecosistemi acquatici e costituiscono uno strumento per il monitoraggio della qualità dell'acqua nei casi in cui l'obiettivo principale è sia la misura dello stato qualitativo generale sia la misura di specifici impatti (e.g. eutrofizzazione, acidificazione). L'utilizzo di questa comunità biologica per il monitoraggio dei corpi idrici è richiesta dall'Allegato V della Direttiva 2000/60/CE.

L'impiego delle diatomee come indicatori di qualità dei corsi d'acqua è ampiamente accettato in Europa e negli USA, mentre per i laghi è meno utilizzata. Metodi specifici per la valutazione della qualità dei laghi a partire dalla comunità di diatomee, o dall'insieme delle macrofite e delle diatomee sono stati sviluppati per esempio in Gran Bretagna, Germania e Francia.

La metodologia si basa sull'osservazione che tutte le specie di diatomee presentano limiti di tolleranza e valori ottimali rispetto alle condizioni dell'ambiente acquatico, quali la concentrazione di nutrienti, l'inquinamento organico e il livello di acidità. Le acque maggiormente inquinate tendono ad ospitare un maggior numero di specie con preferenze per elevate concentrazioni di inquinanti. Al contrario, alcune specie sono intolleranti ad elevati livelli di uno o più inquinanti, mentre altre ancora possono essere presenti in ambienti con stato qualitativo ampiamente variabile.

Le diatomee bentoniche vengono suddivise a seconda del substrato che colonizzano in:

- epilittiche (su substrati duri naturali o artificiali quali ciottoli, sassi o pilastri);
- epifitiche (su macrofite, muschi, altre alghe);
- epipeliche (su detrito più fine quale limo o argilla);
- epipsammiche (su sabbia);
- epizoiche (su animali, ad esempio copepodi).

## 1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo protocollo stabilisce un metodo per il campionamento, la determinazione ed il conteggio delle diatomee bentoniche come strumento per la valutazione della qualità dei laghi e degli invasi mediante metodi e indici che utilizzano l'abbondanza relativa dei taxa. Obiettivo del metodo è la raccolta di campioni standard delle diatomee bentoniche in linea con le richieste della Direttiva 2000/60/CE. Questo protocollo è stato sviluppato tenendo conto del lavoro svolto per il protocollo di campionamento e analisi delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua e all'interno delle attività europee di implementazione della Direttiva 2000/60/CE (Italia, 2008; Italia 2009, Italia, 2011, JRC 2012).

## 2. RIFERIMENTI

UNI EN 13946:2005. Qualità dell'acqua – Norma guida per il campionamento di routine ed il pretrattamento di diatomee bentoniche da fiumi.

UNI EN 14407:2004. Qualità dell'acqua – Linea guida per l'identificazione, il conteggio e la classificazione di campioni di diatomee bentoniche da acque correnti.

UNI EN 14996:2006. Qualità dell'acqua – Linea guida per assicurare la qualità delle valutazioni biologiche ed ecologiche nell'ambiente acquatico.

## 3. TERMINI E DEFINIZIONI

**Substrato:** materiale naturale o non-naturale su cui vengono campionate le diatomee.

**Substrato artificiale:** substrato introdotto nel lago dall'operatore specificatamente per permettere la colonizzazione delle diatomee.

**Ciottolo:** substrato minerale con un diametro compreso tra 64 e 256 mm.

**Massi:** substrato minerale con un diametro superiore a 256 mm.

**Diatomee bentoniche:** diatomee che vivono su substrati.

**Frustulo:** parete cellulare delle diatomee, composta da silice e costituita da due valve legate da due o più bande connettivali.

**Valva:** componente strutturale del frustulo delle diatomee.

## 4. STRUMENTAZIONE E ATTREZZATURA

### 4.1 In campo

- stivali tutta coscia;
- spazzolino con setole dure (o strumento simile per raggiungere anfratti e piccole cavità) o coltellino e/o lama;
- contenitori in plastica da circa 50 mL con tappo a tenuta;
- contenitori in plastica da 1 L circa, con apertura larga, o sacchetti di plastica (dimensioni 30x40 cm circa), per campionamento su macrofite;
- retino a maglia fine con manico (per superfici verticali);
- forbice (per steli macrofite sommerse);
- vaschetta in plastica (dimensioni circa 20x30 cm o maggiori);
- pennarello indelebile;
- acqua distillata;
- borsa frigo per campioni;
- substrati artificiali (se necessari);
- boe (per segnalare presenza substrati artificiali);
- corde e pesi di piombo (per substrati artificiali);
- guanti.

### 4.2 In laboratorio

#### 4.2.1 Conservazione del campione

Aggiungere etanolo ( $C_2H_5OH$ ) al 70% con un rapporto 3:1 per conservare i campioni. In alternativa si può usare la soluzione di Lugol.

Si consiglia di ridurre al minimo l'acqua nella quale verrà posto il film di diatomee campionato (si consiglia l'utilizzo di un contenitore da 50-100 mL).

#### 4.2.2 Trattamento del campione e pulizia dei frustuli

- setaccio (per l'eliminazione del materiale vegetale grossolano);
- cappa chimica;
- pinzette;
- sistema bagnomaria o lampada UV;
- beakers e/o provette resistenti alle alte temperature e alle sostanze ossidanti e acide (pyrex);
- pipette in vetro per l'aggiunta di agenti ossidanti;
- centrifuga e tubi da centrifuga (opzionale), tali tubi devono essere resistenti all'attacco di agenti ossidanti o acidi utilizzati per la pulizia delle diatomee;
- reagenti: vedi Allegato B.

#### 4.2.3 Preparazione dei vetrini permanenti

- Provette;
- vetrini portaoggetto;

- vetrini coprioggetto (preferibilmente circolari, di 11-15 mm di diametro);
- resina per il montaggio con indice di rifrazione  $> 1,6$  (ad es. Naphrax, Hyrax).

#### 4.2.4 *Identificazione e conteggio*

- microscopio ottico, con carrello mobile e obiettivo ad alto ingrandimento per immersione (100 x) in contrasto di fase o contrasto interferenziale (Nomarski). Il microscopio deve avere dispositivi per le misure (e.g. oculare graduato) con risoluzione di almeno 1  $\mu\text{m}$ . Il reticolo dell'oculare deve essere tarato mediante vetrino con micrometro;
- guide di identificazione e iconografie adatte all'habitat considerato (alcune indicazioni in bibliografia);
- olio ad immersione e dispenser;
- carta per la pulizia delle lenti;
- fotocamera collegata al microscopio e software per l'effettuazione di misure;
- dispositivi per registrare i dati durante il conteggio, ovvero un foglio di lavoro cartaceo e/o elettronico composto da righe e colonne dove annotate la lista dei taxa e le abbondanze. Può essere utile un contatore a tasti tipo contaleucociti per contare i taxa più abbondanti o un software collegato al microscopio;
- sistema di archiviazione immagini: attrezzature per la fotomicroscopia o videocattura utili per la documentazione delle specie di difficile identificazione e la misura delle dimensioni delle valve. A questo scopo può essere comunque utile annotare le coordinate mediante l'utilizzo della scala di Venier.

## 5. PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

### 5.1 Periodo di campionamento

Dato che le comunità di diatomee, più o meno ricche in specie, sono presenti in ogni periodo dell'anno, i campionamenti si possono effettuare in tutte le stagioni, ma esistono dei periodi più adatti a seconda della idroecoregione.

Va comunque sempre evitato il campionamento nei momenti di marcato aumento di livello del lago; si consiglia di attendere almeno 3 settimane per consentire la completa ricolonizzazione dei substrati.

La maggiore diversità di specie si riscontra nei mesi di luglio, agosto e settembre, periodi con alta intensità luminosa e temperatura mite.

I periodi indicati possono essere modulati in fase di pianificazione complessiva del monitoraggio su un corpo idrico in relazione al tipo di monitoraggio e qualora si vogliano perseguire specifici obiettivi.

### 5.2 Scelta della stazione

Il sito di campionamento (stazione) è la porzione di corpo idrico in cui viene effettuata la raccolta del campione biologico. Esso deve essere rappresentativo, in termini di caratteristiche ambientali e di pressioni, del corpo idrico e non deve risentire di alterazioni molto localizzate.

Deve essere selezionato un tratto di corpo idrico che presenti habitat e substrati di campionamento idonei, evitando le aree fortemente ombreggiate.

In ogni lago devo essere scelti tre siti approssimativamente equidistanti. Per i laghi della categoria AL-3 è necessario prevedere almeno 9 siti; per bacini particolarmente complessi può essere opportuno utilizzare un numero più elevato di siti rispetto a quelli previsti.

Nel caso di presenza di scarichi puntuali che possono esercitare una pressione significativa nella zona litorale, e quindi provocare una variazione dello stato di qualità di una ampia porzione del corpo idrico, è necessario posizionare un numero di stazioni tali da determinare l'area influenzata da tale apporto.

Laddove è stata effettuata la valutazione della comunità macrofita del lago i siti dovranno essere posizionati in prossimità dei transetti campionati per le macrofite e nelle aree prive di vegetazione acquatica.

Quando possibile, i siti devono inoltre essere scelti in aree prive di ombreggiatura in prossimità degli habitats utilizzati per il rilievo dei parametri idromorfologici per il Lake Habitat Survey

### 5.3 Scelta del substrato

Le diatomee possono crescere sulla maggior parte delle superfici sommerse; tuttavia, la composizione della comunità varia in funzione del substrato prescelto per il campionamento. L'ideale sarebbe utilizzare un solo tipo di substrato per tutte le stazioni considerate in una campagna di monitoraggio.

All'avvio di un programma di monitoraggio è pertanto importante definire il tipo di substrato che si intende campionare.

Per la scelta del substrato si deve comunque dare la preferenza ai substrati duri naturali movibili, ossia ai ciottoli (dimensioni da 64 mm a 256 mm) ed ai massi (diametro > 256 mm). I ciottoli sono preferibili perché le loro dimensioni consentono da un lato un agevole prelievo e dall'altro sono abbastanza stabili da permettere l'insediamento di una comunità di diatomee rappresentativa.

In mancanza di tale tipologia di substrato si può scegliere fra i seguenti, disposti secondo l'ordine di preferenza (Fig. 1):

- superfici movibili dure naturali con alghe filamentose;
- vegetazione acquatica: macrofite emergenti o sommerse, dando la preferenza agli steli di *Phragmites*;
- superfici artificiali *in situ*: manufatti, piloni, e simili;
- substrati artificiali posti *in situ*, per almeno 20 giorni.

In riferimento alla scelta dei microhabitat nella stazione, occorre tenere presente che:

- devono essere evitate zone con elevato grado di ombreggiamento;
- i campioni dovrebbero essere raccolti ad una profondità di circa 30 cm.

In generale devono essere campionati substrati stabilmente colonizzati e sempre sommersi. Un periodo di almeno tre-quattro settimane può essere ritenuto sufficiente per assicurare che le comunità di diatomee siano in equilibrio con l'ambiente acquatico.

Per evitare la contaminazione del campione di un sito con quello di un altro si devono adottare i seguenti accorgimenti:

- sciacquare accuratamente il materiale utilizzato) con l'acqua del lago all'inizio ed al termine di ogni operazione di campionamento;
- utilizzare uno spazzolino nuovo per ogni campionamento;
- utilizzare acqua distillata nella vaschetta ove risciacquare lo spazzolino o la lama, al fine di evitare la contaminazione del campione;
- pulire accuratamente gli stivali per non diffondere specie invasive.

### 5.4 Campionamento

Il gruppo di lavoro che esegue il campionamento deve essere composto da un numero minimo di due persone, anche in relazione ai possibili rischi connessi con l'attività di campo.

Vengono di seguito riportate le tipologie di substrato campionabili, in ordine decrescente di preferenza (Fig. 1).

#### A. Campionamento di superfici movibili dure naturali senza alghe filamentose

1. Raccogliere, a profondità di almeno 30 cm, almeno 3 ciottoli in vari punti della stazione. Se i ciottoli non fossero disponibili, raccogliere 3 piccoli massi o 10 ciottoli di minori dimensioni; al termine della raccolta, la superficie totale campionata deve essere di almeno 100 cm<sup>2</sup>.

2. Sciacquare delicatamente i ciottoli con l'acqua del lago, al fine di eliminare eventuale materiale inorganico depositato su di essi.
3. Grattare con uno spazzolino o con la lama la superficie superiore e/o laterale (se esposta alla luce) dei ciottoli e risciacquare lo spazzolino o la lama in una vaschetta in cui sia stata posta una minima quantità di acqua.
4. Trasferire il campione in un contenitore sterile con tappo a vite; in alternativa è possibile sciacquare lo spazzolino o la lama direttamente nel contenitore.



**Figura 1-** Sequenza delle operazioni in caso di campionamento di ciottoli.



**Figura 2 -** Se il ciottolo è coperto da alghe filamentose, queste vanno rimosse prima di campionare le diatomee

#### *B. Campionamento di superfici mobili dure naturali con alghe filamentose*

Se più del 75% dei substrati fosse coperto da alghe filamentose, tali substrati vanno campionati dopo aver rimosso i filamenti (Fig. 2), e quindi procedendo dal punto 3 del paragrafo precedente.

#### *C. Superfici artificiali in situ (manufatti)*

1. Grattare la superficie colonizzata con una lama affilata inserita all'estremità di un manico come supporto. In alternativa utilizzare campionatori idonei (Fig. 3), costituiti da un manico e un telaio metallico (apertura di circa 8 cm) su cui è fissato un retino con maglie di 50  $\mu\text{m}$ . Alla fine del retino è inserita una bottiglia svitabile per la raccolta ed il recupero delle diatomee campionate.
2. Campionare un'area di almeno 100  $\text{cm}^2$ .
3. Rimuovere il film che è rimasto adeso alla lama direttamente nel contenitore per campioni.



Figura 3 - Esempio di campionatore per superfici artificiali verticali.

#### D. *Vegetazione acquatica - macrofite emergenti*

I campioni dovrebbero essere raccolti dalle macrofite emergenti solo se vengono campionate parti che rimangono permanentemente sommerse e che non sono contaminate dai sedimenti di fondo. Procedere nel seguente modo:

1. Tagliare con una forbice o una lama affilata 5-6 steli (parte sommersa).
2. Mettere gli steli in un contenitore.
3. In laboratorio staccare le diatomee agitando il contenitore o grattando delicatamente gli steli.

Le operazioni possono essere svolte anche in campo, avendo l'accortezza di utilizzare una minima quantità di acqua.

Se il film di diatomee fosse particolarmente delicato, procedere nel seguente modo:

1. Tagliare gli steli fino al livello dell'acqua.
2. Posizionare sopra di essi un contenitore rovesciato.
3. Tagliare gli steli alla base.
4. Rivoltare il contenitore.
5. Procedere come sopra al punto 3.

#### E. *Vegetazione acquatica - macrofite e macroalghe sommerse*

1. Raccogliere 5 piante intere.
2. Metterle in un sacchetto di plastica per il trasferimento in laboratorio.
3. In laboratorio mettere le macrofite in un beaker capiente, aggiungere una piccola quantità di acqua distillata e scuotere, per favorire il distacco delle diatomee.
4. Rimuovere le macrofite.
5. Lasciare sedimentare ed eliminare il surnatante.

#### F. *Substrati artificiali*

Porre in situ i substrati artificiali, composti da piastrelle impilate, ciottoli, tegole ed altro materiale con porosità tale da consentire la colonizzazione da parte della comunità diatomica, per una superficie campionabile di 100 cm<sup>2</sup>.

I substrati più indicati sono i ciottoli raccolti nella zona della stazione di monitoraggio, opportunamente lavati e posizionati in sacchetti a rete con maglia di almeno 2 cm. In alternativa sono comunque utilizzabili piastrelle, mattoncini o tegole.

Substrati con superfici eterogenee (ad esempio piastrelle ruvide, corda in polipropilene sfilacciato) sono preferite rispetto substrati con superfici lisce (ad esempio lastre di vetro).

In ogni caso la scelta del materiale va effettuata in base alla tipologia di corpo idrico selezionato.

Per il posizionamento del substrato artificiale si deve tener conto della tipologia del fondale e della zona eufotica.

I substrati devono essere posizionati per un periodo pari a tre e/o quattro settimane, in modo da permetterne la colonizzazione da parte delle diatomee. In casi particolari, quali basse temperature dell'acqua od oligotrofia dell'ambiente da esaminare, i substrati devono essere esposti per tempi più lunghi.

I substrati esposti (ciottoli, mattoncini o tegole) vengono poi campionati seguendo la procedura utilizzata per i substrati duri.

Ogni substrato deve essere segnalato da boe.

## 5.5 Etichettatura

Ciascun campione deve essere correttamente e univocamente identificato mediante un'etichetta. A tal fine sul contenitore può essere riportato, con pennarello indelebile, ad esempio: il nome del lago, il codice del corpo idrico, il nome del sito, la data di campionamento.

## 5.6 Scheda di campionamento

Tutte le informazioni utili relative al campionamento devono essere annotate su un'apposita scheda. Un esempio di scheda di campionamento è riportato in allegato A.

Nella parte generale della scheda saranno indicati la data di campionamento, il nome del sito e la sua localizzazione (e.g. comune, provincia, regione) e l'idroecoregione di appartenenza.

Il campionamento deve essere effettuato nella stessa data o in una data prossima a quella del campionamento dei parametri chimico-fisici, in modo da avere a disposizione i dati necessari dei parametri che maggiormente influenzano la composizione della comunità diatomica.

## 6. PROCEDURE ANALITICHE

### *Operazioni preliminari*

In laboratorio si procede alle seguenti operazioni.

1. Eliminazione dei residui di grandi dimensioni o materiale vegetale grossolano (anche con l'ausilio di un setaccio da cucina).
2. Analisi preliminare del campione al microscopio: annotare qualsiasi particolare insolito (es. numero elevato di frustuli vuoti).
3. Preparazione del campione o, in alternativa, stoccaggio in un luogo freddo e buio (frigorifero) fino a 24 ore prima della preparazione o aggiunta di conservante (ad es. Etanolo in rapporto 3:1).

### *Conservazione del campione*

L'aggiunta di liquido conservante ha lo scopo di interrompere il processo di divisione cellulare e la decomposizione della sostanza organica.

Non è necessario aggiungere conservante se il campione viene preparato entro 24 ore dalla raccolta e se si prendono accorgimenti per ridurre al minimo il processo di divisione cellulare (e.g. conservazione in luogo freddo e buio).

Si osservi che:

- per la conservazione a lungo termine dei campioni si raccomanda l'uso di etanolo o, in subordine, della soluzione di Lugol;
- i campioni possono essere anche congelati.

Si consiglia di ridurre al minimo l'acqua nella quale verrà posto il film di diatomee campionato (si consiglia l'utilizzo di un contenitore da 50-100 mL), al fine di avere un campione già concentrato in partenza e di non dover procedere alla decantazione o centrifugazione dello stesso per concentrarlo.

## 6.1 Preparazione del campione – Metodi per la pulizia dei frustuli

Esistono vari metodi di laboratorio, basati sull'ossidazione della sostanza organica contenuta nel campione, che permettono di ottenere la pulizia dei frustuli.

I metodi presentati nell'Allegato B sono quelli maggiormente usati perché non richiedono l'uso di sostanze tossiche.

Nella fase di pulizia delle diatomee occorre prestare particolare attenzione a non contaminare i campioni fra loro. Si dovrà pertanto utilizzare, per ogni campione, materiale distinto e separato. In particolare per ogni campione dovrà essere utilizzato un beaker, una provetta di centrifugazione, una pipetta Pasteur, una bacchetta di vetro, che devono essere opportunamente siglati.

#### *Preparazione da campione non conservato*

1. Omogeneizzare il campione.
2. Prelevare una piccola quantità del campione (5-10 mL).
3. Mettere in un beaker.
4. Procedere con uno dei metodi proposti nell'allegato B.

#### *Preparazione da campione conservato*

1. Omogeneizzare il campione
2. Prelevare una piccola quantità di campione (5-10 mL).
3. Centrifugare a 1500 giri/min. per 3-5 minuti ed eliminare il surnatante.
4. Procedere con uno dei metodi proposti nell'allegato B.

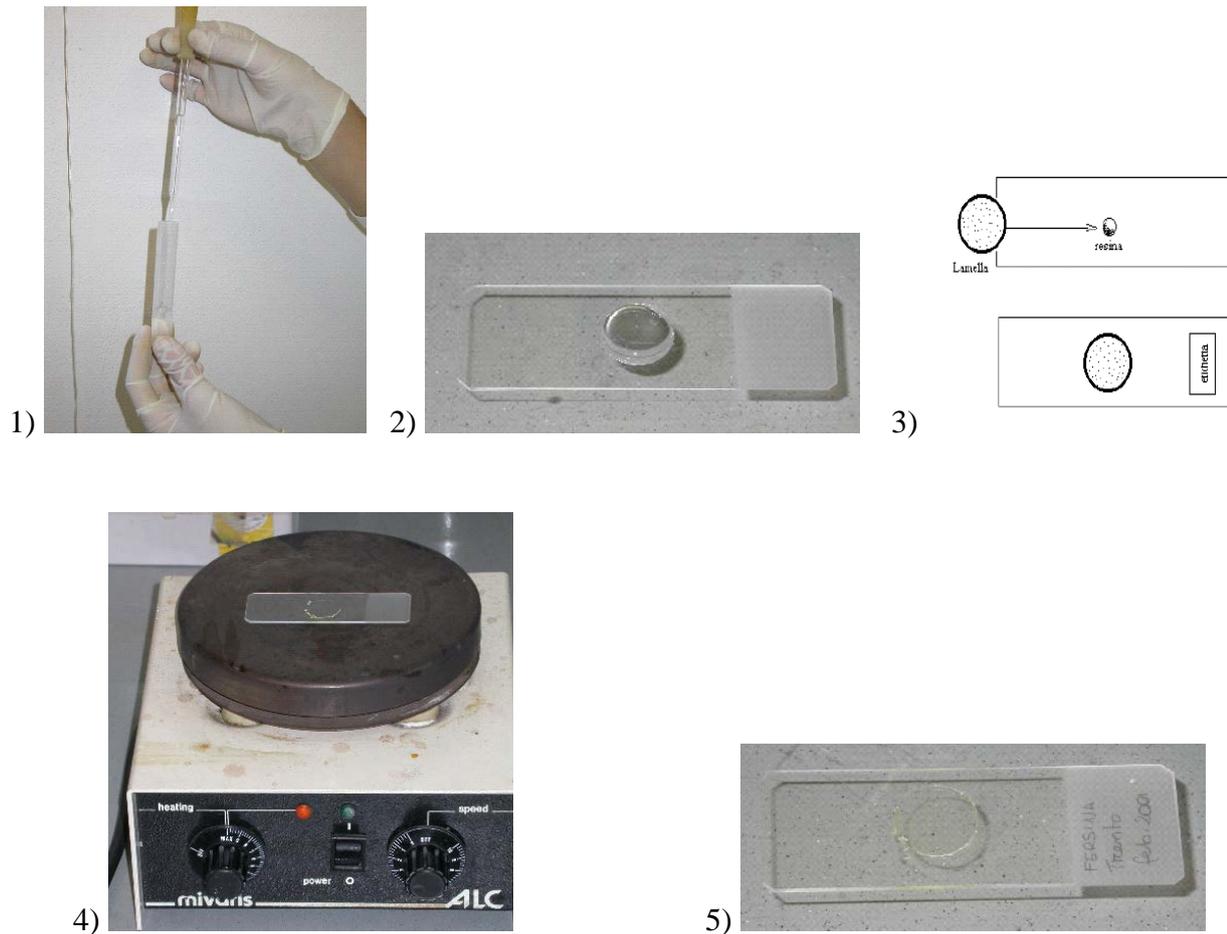
## **6.2 Preparazione dei vetrini permanenti**

- se i vetrini non sono perfettamente puliti, pulire i vetrini coprioggetti e portaoggetti con sapone detergente o con alcool etilico;
- agitare la provetta contenente il preparato ossidato al fine di sospendere omogeneamente i frustuli;
- preparare una diluizione del campione, in modo da ottenere una sospensione che ad occhio nudo appaia lievemente lattescente o quasi limpida;
- identificare il vetrino mediante una scritta indicante almeno il nome del lago, la località e la data di prelievo;
- porre i vetrini coprioggetti su di una superficie piana (può essere comodo posizionarli direttamente sul vetrino portaoggetti corrispondente);
- prelevare con una pipetta Pasteur una piccola quantità della sospensione diluita ed omogeneizzata e porla su un vetrino coprioggetti, facendo attenzione a non fare uscire la goccia dal bordo dello stesso (Fig. 4); usare sempre pipette nuove per ogni campione;
- lasciare asciugare la goccia a temperatura ambiente e in un luogo al riparo dalla polvere, oppure sulla piastra riscaldante a bassa temperatura. L'essiccamento veloce in stufa potrebbe determinare la formazione di agglomerati di diatomee e va quindi evitato;
- posizionare sul vetrino portaoggetti, in corrispondenza del punto su cui andrà messo il coprioggetto, una goccia di resina ad alto potere di rifrazione (e.g. Naphrax; Hyrax); se si tratta di Naphrax, contenente toluene come solvente, si raccomanda di lavorare sotto una cappa di aspirazione;
- con una pinzetta prendere il coprioggetto e capovolgerlo sulla goccia, in modo che la superficie ricoperta dalle diatomee sia a contatto con la resina;
- porre il vetrino così preparato su una piastra riscaldante a circa 90-100°C, sotto cappa chimica;
- Lasciare scaldare fino a che il solvente della resina non evapori completamente: nell'evaporazione produrrà delle bolle, esercitare una leggera pressione con la pinzetta per migliorare l'adesione;
- lasciare raffreddare completamente il vetrino;
- pulire il contorno del coprioggetto dalla resina in eccesso.

Per un'agevole lettura del vetrino, controllare che la concentrazione di valve o frustuli non sia troppo elevata: un'eccessiva sovrapposizione delle valve non permetterebbe la conta e l'identificazione.

Si consiglia di preparare, per ogni campione più di un vetrino coprioggetti (almeno due), con quantità differenti di sospensione, al fine di ottenere concentrazioni diverse. In alternativa, verificare di aver ottenuto la giusta concentrazione di valve (i preparati dovrebbero avere indicativamente da 10 a 15 valve per campo ad un ingrandimento 1000x); nel caso di campione troppo denso o troppo rado, ripetere la procedura. È preferibile, inoltre, una volta trovata la concentrazione ideale, preparare ulteriori repliche dei vetrini.

Si consiglia l'utilizzo di vetrini coprioggetti di forma rotonda (diametro 11-15 mm), che permettono una distribuzione più omogenea delle valve rispetto a quelli di forma rettangolare.



**Figura 4** - Diversi passaggi durante la preparazione dei vetrini permanenti: 1) preparazione della diluizione idonea; 2) collocazione della goccia di campione (appositamente diluito) sul vetrino coprioggetto; 3) il copri oggetto dopo essiccazione viene posto sulla resina; 4) il vetrino allestito viene posto sulla piastra per far evaporare il solvente della resina; 5) il vetrino è pronto.

## 6.3 Identificazione e conteggio

### *Criteria tassonomici per l'analisi*

Per l'utilizzo delle diatomee per la valutazione della qualità delle acque lacustri è necessaria l'identificazione al livello di specie e sottospecie. Considerando l'attuale fase di revisione continua della sistematica delle diatomee, è opportuno verificare con cautela la nomenclatura utilizzata rispetto alla lista di specie (con relativi sinonimi) contenuta nella definizione dell'indice di qualità

### *Unità per il conteggio*

Il conteggio delle diatomee lacustri va effettuato in ogni caso a 1000x in contrasto di fase. Per il conteggio delle diatomee lacustri si userà in ogni caso il numero di valve.

Nel caso di diatomee di piccole dimensioni, o particolarmente resistenti, come le specie dei generi *Achnanthes sensu lato*, *Cyclotella sensu lato*, *Navicula sensu lato* e *Pinnularia*, verificare con un'attenta messa a fuoco se si tratti di una sola valva o di un frustulo intero, che conterà per due valve.

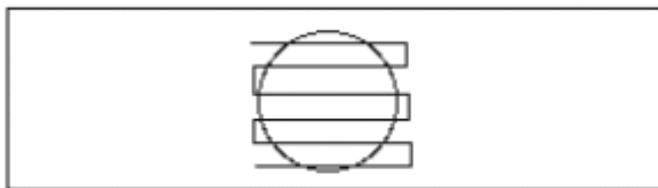
Nel caso di frustoli frammentati, se si tratta di specie relativamente isodiametriche, conteggiare i frammenti di dimensioni maggiori a mezzo frustulo. Nel caso di specie molto allungate (ad es. *Asterionella sp.*, *Diatoma tenuis*, *Fragilaria sp.*, *Synedra sp.*), conteggiare soltanto i frammenti contenenti il tratto terminale della

valva, che conterranno come mezza valva. Lo stesso criterio andrà utilizzato per gli esemplari che debordano dal campo del microscopio

### Conteggio

Ai fini del presente protocollo si consiglia di effettuare il conteggio di 400-450 valve.

1. Identificare e contare le valve presenti in un campo, iniziando da un campo prossimo al centro del vetrino
2. Spostarsi su un altro campo in senso orizzontale o verticale (Fig. 5), evitando le zone di bordo. Si può procedere a zig-zag, o lungo determinate direzioni orizzontali o verticali od oblique. Quando viene utilizzato lo spostamento verticale od orizzontale, è importante che il campo visibile in ogni spostamento non si sovrapponga con quello visibile prima dello spostamento, al fine di evitare che nessuna diatomea venga contata più di una volta.
3. Ripetere la procedura fino al raggiungimento del numero di unità da contare (400).



**Figura 5** - Esempio di procedura per lo spostamento lungo il vetrino portaoggetti durante il conteggio.

### Come considerare le diatomee rotte

Per eliminare il rischio di comprendere frammenti separati di valve o frustoli rotti, occorre definire una procedura prima dell'inizio del conteggio. Possibili approcci sono:

- comprendere un individuo rotto solo se è presente in un frammento di circa  $\frac{3}{4}$ ;
- comprendere individui solo se almeno un polo e l'area centrale sono visibili;
- escludere tutti gli individui rotti.

Si consiglia di comprendere gli individui solo se presente più della metà della valva (almeno circa  $\frac{3}{4}$ ) e nel caso di specie molto allungate (*Asterionella sp.*, *Diatoma tenuis*, *Fragilaria sp.*, *Synedra sp.*), conteggiare soltanto i frammenti contenenti il tratto terminale della valva, che conterranno come mezza valva.

Lo stesso criterio si utilizzerà anche per le valve comprese solo parzialmente in una definita area di conta.

### Come considerare le diatomee non identificabili

Una valva può risultare non identificabile per varie ragioni:

- è disposta in vista connettivale;
- è presente materiale sovrapposto che impedisce una chiara visione. Se numerose valve sono coperte da altro materiale, occorre preparare un vetrino partendo da una sospensione più diluita o variando i tempi di sedimentazione al fine di separare le diatomee dal materiale estraneo;
- l'analista non è in grado di riconoscerla.

Alcuni taxa sono identificabili in vista connettivale, sia perché ad esempio la vista connettivale è caratteristica (es. *Rhoicosphenia abbreviata*), sia perché è possibile attribuire la vista connettivale ad un taxon particolare con un certo livello di sicurezza, sulla base delle viste valvari rinvenute nello stesso vetrino. Comunque ciò non è sempre possibile e, se ci sono dubbi, l'analista dovrebbe annotare le viste connettivali al livello più basso al quale possono essere assegnate (e.g. *Gomphonema sp.* non identificato, pennata connettivale non identificata)

Un elevato numero di unità non identificabili può essere dovuto alla cattiva preparazione del vetrino o alla scarsa capacità di identificazione dell'analista. In generale, per i metodi che prevedono l'identificazione tassonomica al livello di specie, si raccomanda che non più del 12% delle unità contate sia composto da individui non identificati fino al livello specifico.

Per indici basati sui generi o su un misto di generi e specie, non più del 5 % dovrebbe essere composto da individui che non siano stati identificati almeno fino al livello di genere.

## **7. ARCHIVIAZIONE DEI DATI, DEI VETRINI E DEI CAMPIONI**

E' utile predisporre un archivio dei campioni esaminati al fine di disporre per eventuali riesami successivi. In particolare sarà utile archiviare per ogni campione

- uno o più vetrini etichettati;
- un archivio dei dati;
- un archivio delle immagini acquisite.

## **8. SICUREZZA**

Il campionamento e l'analisi in campo sono generalmente pericolosi. Gli operatori che utilizzeranno questo protocollo dovranno avere la sufficiente formazione per le normali pratiche di laboratorio e di analisi in campo.

Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso. È responsabilità degli Organi preposti di definire i dispositivi più opportuni di protezione individuale e di individuare le azioni necessarie ad assicurare la sicurezza degli operatori secondo le disposizioni di legge.

## **9. ASSICURAZIONE DI QUALITÀ**

Nell'ambito dell'applicazione del presente protocollo devono essere definite le attività più appropriate al fine di assicurare che la qualità delle valutazioni biologiche consegua specifici requisiti. In particolare dovranno essere definiti:

- il programma di monitoraggio (e.g. finalità del monitoraggio, numero e collocazione dei siti di campionamento, frequenza dei campionamenti ...);
- la valutazione degli errori associati al campionamento e all'identificazione delle specie;
- la valutazione di possibili inquinamenti dei campioni, attraverso la preparazione di "bianchi";
- la qualificazione e l'esperienza del personale che esegue il campionamento;
- la partecipazione a confronti inter-laboratorio e/o a prove valutative.

### **9.1 Qualifica degli operatori**

Il personale coinvolto nelle attività di monitoraggio biologico deve essere qualificato sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento, esperienza e/o comprovata abilità.

In particolare, gli operatori che eseguono il rilievo in campo e l'identificazione dei taxa devono possedere un'adeguata e documentata preparazione di base (diploma di laurea e/o specializzazione post-universitaria) in campo ecologico, idrobiologico e tassonomico (diatomee) e devono aver compiuto un percorso di apprendimento in affiancamento ad operatori esperti o frequentando un apposito corso di formazione.

Il mantenimento della qualifica del personale coinvolto nel monitoraggio con le diatomee deve essere assicurato attraverso la partecipazione regolare all'attività di monitoraggio e periodicamente verificato tramite, ad esempio: formazione-addestramento, partecipazione a confronti interlaboratorio organizzati da istituzioni o organizzazioni di riconosciuta competenza, e anche attraverso la partecipazione a seminari e conferenze di aggiornamento.

## BIBLIOGRAFIA

Italia, 2006. Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n.152. Norme in materia ambientale. Gazzetta Ufficiale-Supplemento Ordinario n. 96 del 14 aprile 2006.

Italia, 2008. Decreto Legislativo 11 Agosto 2008, n. 131. «Regolamento recante i criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici (tipizzazione, individuazione dei corpi idrici, analisi delle pressioni) per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, recante : Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo». Gazzetta Ufficiale Supplemento Ordinario Serie generale n. 187 dell 11/8/2008.

Italia , 2009. Decreto 14 Aprile 2009, n.56. Regolamento recante «Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, recante Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo». Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario n. 83, 30 maggio 2009.

Italia, 2011. Decreto 8 novembre 2010, n. 260. Regolamento recante « Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo». Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario n. 31, 7 febbraio 2011.

ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011.

APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006

### Protocolli di campionamento e preparazione dei campioni

Kelly M.G., A. Cazaubon, E. Coring, A. Dell'Uomo, L. Ector, B. Goldsmith, H. Guasch, J. Hürlimann, A. Jarlman, B. Kawecka, J. Kwadrans, R. Laugaste, E.A. Lindstrøm, M. Leitao, P. Marvan, J. Padisák, E. Pipp, J. Prygiel, E. Rott, S. Sabater, H. van Dam & J. Vizinet, 1998 - Recommendations for routine sampling of diatoms for water quality assessment in Europe. *J. Appl. Phycol.*, 10: 215-224.

Schaumburg J., Schmedtje U., Schranz C., Köpf B., Schneider S., Meilinger P., Hofmann G., Gutowski A., Foerster J. 2005. Instruction Protocol for the ecological Assessment of Running Waters for Implementation of the EU Water Framework Directive: Macrophytes and Phytobenthos. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft. 89 pp.

Puccinelli C., Marcheggiani S., Scenati R. e Mancini L. 2012. An experimental approach on benthic diatom sampling using artificial substrates in deep water bodies.

### Testi per l'identificazione

Hofmann G., Werum M., Horst Lange-Bertalot H., 2011. Diatomeen im Süßwasser - Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie.

Krammer K., Lange-Bertalot H., 1997. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 02:01: Bacillariophyceae 1: Naviculaceae. Teil A: TEXT.

- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1997. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 02:01: Bacillariophyceae 1: Naviculaceae. Teil B: TAFELN (plates).
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1997. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 02:02: Bacillariophyceae. Teil 2: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 2000. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 02:05: Bacillariophyceae: English and French translation of the keys. Engl. transl. by Nian Bate (keys) and Andrew Podzorski (general part)/ French translation by Jeanne Bukowska, Monika Michel Jean Prygiel (keys).
- Krammer K., 2002. Diatoms of Europe: Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Edited by Horst Lange - Bertalot. Volume 3: Cymbella.
- Krammer K., 2003. Diatoms of Europe: Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Edited by H. Lange-Bertalot. Volume 4: Cymbopleura, Delicata, Navicymbula, Gomphocymbellopsis, Afrocybella Supplements to cymbelloid taxa.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 2004. Süßwasserflora von Mitteleuropa - Band 02:03: Bacillariophyceae: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. Rev. ed.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 2004. Süßwasserflora von Mitteleuropa, Band 02:04: Bacillariophyceae: Achnanthes, Kritische Ergänzungen zu Navicula (Lincolata) und Gomphonema.
- Lange-Bertalot H., 2001. Diatoms of Europe: Diatoms of the European Inland Waters and Comparable Habitats. Edited by Horst Lange-Bertalot. Volume 2: Navicula sensu stricto, 10 Genera Separated from Navicula sensu stricto, Frustulia.
- Lange-Bertalot (ed) 2012. Diatomeen im Süßwasser - Benthos von Mitteleuropa. Bestimmungsflora Kieselalgen für die ökologische Praxis. Über 700 der häufigsten Arten und ihre Ökologie.
- Prygiel J. & Coste M., 2000. Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées – NFT 90-354.
- Reichardt E., 1999. Iconographia Diatomologica, Annotated Diatom Micrographs. Edited by Horst Lange - Bertalot. Volume 08: TAXONOMY: Zur Revision der Gattung Gomphonema. Die Arten um G.affine/insigne, G.angustatum/ micropus, G.acuminatum sowie gomphonemoide Diatomeen aus dem Oberoligozän in Böhmen.

## ALLEGATO A

### SCHEDA CAMPIONAMENTO DIATOMEE BENTONICHE LACUSTRI

Data del Prelievo: ..... ore:.....

Identificativo del campione: .....

Tipologia di substrato campionato: ciottoli , (massi, macrofite etc).....

.....

N° di accettazione assegnato al campione in laboratorio: .....

Sito di campionamento: .....

Punto di campionamento: .....

Contenitore: ..... Quantità prelevata:.....

Parametri rilevati su campo:

.....

.....

.....

.....

## INFORMAZIONI SUL SITO

<b>Bacino idrografico di appartenenza</b>	
<b>Sito di riferimento a livello nazionale</b>	si/no
<b>Tipologia lacustre</b>	
<b>Latitudine</b>	
<b>Longitudine</b>	
<b>Altitudine s.l.m.</b>	metri
<b>Composizione del substrato</b>	
<b>Ombreggiatura</b>	%

<b>Morfologia generale</b>	
<b>Idrologia generale</b>	
<b>* valore</b>	1=non alterato; 2= poco alterato; 3= molto alterato
<b>Substrato campionato</b>	
<b>Vegetazione ripariale</b>	
<b>Uso del territorio</b>	
Urbanizzazione	
Agricoltura	
Uso ricreativo	
<b>* valore</b>	1=assente; 2=presente; 3=diffuso

Altre Osservazioni:

.....  
 .....  
 .....

Personale che ha eseguito il Campionamento:

## ALLEGATO B - METODI PER LA PREPARAZIONE DEI FRUSTULI

### Metodo 1: perossido di idrogeno a caldo

#### Reagenti

- soluzione di perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) al 30% (100 volumi);
- acido cloridrico diluito (HCl) 1M.

#### Metodo

1. Omogeneizzare il campione scuotendolo e trasferire da 3 a 10 mL di sospensione in un beaker o provetta resistente a calore e acidi-basi. Aggiungere circa 9 parti di perossido di idrogeno ad una parte di campione e riporre a bagnomaria a circa  $90 \pm 5^\circ C$ , fino a che tutta la sostanza organica non si sia ossidata (generalmente tutta la notte).  
Attenzione il perossido di idrogeno a temperature maggiore di  $30^\circ$  può esplodere. In estate le bottiglie di reagente vanno tenute in frigorifero, e il bagnomaria va usato in un luogo dove l'esplosione di una provetta non possa danneggiare il personale, tipicamente sotto cappa con i vetri chiusi.  
Nei campioni di diatomee epifitiche il materiale vegetale grossolano può essere rimosso dopo 30 minuti. Deve essere usata cautela mentre si versa il perossido di idrogeno freddo concentrato nel materiale ricco di sostanza organica, così come durante il processo di riscaldamento. Nei primi momenti dell'ossidazione si formerà una schiuma densa: è necessario evitare di farla tracimare, continuando a mescolare il campione con una bacchetta di vetro per alcuni minuti.
2. Togliere il beaker o la provetta dalla piastra. Aggiungere alcune gocce di acido cloridrico al fine di rimuovere il perossido di idrogeno in eccesso ed i carbonati e lavare le pareti del beaker con acqua distillata o demineralizzata. Lasciare raffreddare sotto cappa.
3. Lasciare sedimentare per tutta la notte e il giorno successivo eliminare il surnatante in eccesso, risospingere il contenuto con acqua distillata o demineralizzata. Il processo di lavaggio dovrebbe essere ripetuto almeno 3 volte, o almeno fino a che siano state rimosse tutte le tracce di perossido di idrogeno.
4. In caso di urgenza si può procedere alla centrifugazione, che è sconsigliata per la fragilità dei frustoli di alcune specie lacustri.
5. Una volta che tutte le tracce di perossido di idrogeno sono state rimosse, mescolare il contenuto di diatomee in una piccola quantità di acqua distillata o demineralizzata e trasferire in una fialetta pulita di piccola capacità. Aggiungere alcune gocce di etanolo, per prevenire la crescita fungina. Il campione così preparato può essere conservato per un tempo illimitato.

In generale l'uso della centrifuga consente di velocizzare le operazioni di pulizia dei campioni (sia dal conservante, sia dai vari reagenti impiegati nei processi di ossidazione). Questa metodica, se effettuata con tempi e velocità non adeguate, potrebbe portare alla rottura dei frustoli delle specie di dimensioni maggiori. In generale se si utilizza la centrifuga è probabile ottenere un campione nel quale sarà più elevata la presenza di valve e non di frustoli interi, mentre con la decantazione naturale, più dolce, la presenza di frustoli interi è maggiore.

La sedimentazione naturale consente di conservare meglio i frustoli, soprattutto se di grandi dimensioni: se si sceglie di utilizzare questo sistema, dopo ogni lavaggio si deve lasciare decantare il campione per almeno 8 ore.

**Metodo 2: perossido di idrogeno a freddo***Attrezzatura e reagenti*

Come metodo 1, ma senza piastra riscaldante, bagno a sabbia o bagnomaria.

*Metodo*

- 1 Seguire il metodo 1, ma non scaldare il beaker contenente il campione. Invece, lasciarlo, coperto da vetrino da orologio o simile, per almeno quattro giorni al sole o sotto una lampada UV per accelerare l'ossidazione. Aggiungere alcune gocce di acido cloridrico al fine di rimuovere i carbonati e lavare le pareti del beaker con acqua distillata o demineralizzata.
- 2 Trasferire poi il contenuto del beaker in un tubo da centrifuga e continuare con il Metodo 1 dal punto 4.
- 3 Se non si dovessero ottenere frustuli puliti, aggiungere perossido di idrogeno e lasciare agire per un altro giorno o utilizzare un altro metodo dopo il lavaggio.

NOTA. L'aggiunta di HCl può portare a reazioni esotermiche più o meno violente in base alla quantità di carbonati e materia inorganica (frustuli compresi) presente nel campione. Nel caso si formi abbondante schiuma e fenomeni di ebollizione prestare attenzione e aggiungere acqua distillata per attenuare la reazione. A reazione terminata il campione assumerà una colorazione giallo-verde.



ISPRA  
ARTA Abruzzo  
ARPA Basilicata  
ARPA Calabria  
ARPA Campania  
ARPA Emilia-Romagna  
ARPA Friuli Venezia Giulia  
ARPA Lazio  
ARPA Liguria  
ARPA Lombardia  
ARPA Marche  
ARPA Molise  
ARPA Piemonte  
ARPA Puglia  
ARPA Sardegna  
ARPA Sicilia  
ARPA Toscana  
ARPA Umbria  
ARPA Valle d'Aosta  
ARPA Veneto  
APPA Bolzano  
APPA Trento