

**METODI BIOLOGICI PER LA
VALUTAZIONE DELLO STATO
DI QUALITA' DELLE ACQUE**

Dr.ssa Claudia Vendetti

Tutor: Dr.ssa Stefania Balzamo

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
2 I MACROINVERTEBRATI BENTONICI: VALUTAZIONE ATTRAVERSO IL METODO I.B.E.....	4
2.1 CARATTERISTICHE DELL'INDICE	6
3 STUDIO COLLABORATIVO APAT-SC002	12
3.1 STANDARDIZZAZIONE E STRUTTURA DEGLI HABITAT	13
3.2 CARATTERISTICHE DELLA RETE SURBER E DEL RETINO IMMANICATO	15
3.3 METRICHE USATE PER LA VALUTAZIONE DEI DATI	17
3.4 RISULTATI	19
4 LE DIATOMEE BENTONICHE DEI CORSI D'ACQUA.....	26
4.1 CARATTERISTICHE DELLE DIATOMEE	27
4.2 PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO: STUDIO COLLABORATIVO APAT- SC002	28
4.3 PRINCIPALI INDICI DIATOMICI EUROPEI.....	32
BIBLIOGRAFIA	36
APPENDICE A	38

1 INTRODUZIONE

La Direttiva Europea 2000/60 (WFD, Water Framework Directive) sulle acque rappresenta un importante passo avanti della politica europea ai fini della tutela e del miglioramento della qualità ambientale e dell'utilizzazione accorta e razionale delle risorse idriche. Gli obiettivi della Direttiva si basano:

- Sul principio della precauzione e dell'azione preventiva.
- Sulla riduzione, soprattutto alla fonte, dei danni causati all'ambiente ed alle persone.
- Sul criterio ordinatore "chi inquina paga".
- Sull'informazione e la cooperazione di tutti i soggetti interessati.

La WFD è entrata in vigore alla fine del 2000 e si propone come obiettivo principale il raggiungimento, entro il 2015, di un "buono stato ecologico" dei corpi idrici europei mantenendo e migliorando l'ambiente acquatico del territorio dell'Unione attraverso misure integrate sugli aspetti qualitativi e quantitativi. Tale Direttiva sta cambiando in maniera radicale il modo di monitorare, valutare e gestire le acque in tutti gli Stati Membri. Per la prima volta sono stati infatti introdotti due concetti chiave, di "stato ecologico" e di "gestione delle acque a livello di bacino idrografico" in un contesto normativo.

Lo stato ecologico vuole essere la misura degli effetti dell'attività umana sugli ecosistemi acquatici ed è un'espressione della qualità della struttura degli ecosistemi stessi. Il "buono stato ecologico" di un corpo idrico comporta quindi la presenza di acqua di buona qualità, tale da permettere alle specie che vi si trovano naturalmente di vivere e riprodursi. La Direttiva prevede tre gruppi di elementi qualitativi (biologici, idromorfologici e fisico-chimici) attraverso i quali si procede alla classificazione dello stato ecologico degli ecosistemi acquatici.

Lo stato ecologico è definito come rapporto di qualità ecologica (EQR, ecological quality ratio) calcolato rapportando "i valori dei parametri biologici riscontrati in un dato corpo idrico superficiale a quelli constatabili nelle condizioni di riferimento applicabili al medesimo corpo. Il rapporto è espresso come valore numerico compreso tra 0 e 1: valori

prossimi a 1 tendono allo stato ecologico elevato, quelli prossimi allo zero allo stato ecologico cattivo (Allegato V, 1.4.1, iii).

Gli elementi di qualità ecologica sono gli aspetti tipici di un ecosistema acquatico che possono essere misurati come la presenza e l'abbondanza dei macroinvertebrati bentonici e delle macrofite.

La Direttiva prevede una descrizione generica delle classi di stato ecologico (ottimo, buono, moderato, mediocre, pessimo) in cui sono state suddivise le diverse categorie di acque superficiali. Ad ognuna delle 5 classi viene associato un diverso livello di disturbo, attraverso l'assegnazione di un valore numerico, rispetto ad uno stato di riferimento che può essere caratterizzato da alterazioni umane molto lievi o possibilmente assenti sulle condizioni ecologiche naturali dei corpi d'acqua. Per stabilire l'appartenenza di un sito alla classe di stato ecologico bisogna affiancare ad un monitoraggio di tipo biologico la valutazione di alcuni parametri idromorfologici e fisico-chimici. Gli Stati membri dovranno individuare e tenere aggiornate le informazioni sul tipo e la grandezza delle pressioni antropiche alle quali un corso d'acqua potrebbe essere sottoposto. Queste pressioni potranno derivare da una fonte puntuale o diffusa di inquinamento provocato da attività e impianti urbani, agricoli e industriali, ma anche da eccessivi prelievi della risorsa idrica per usi di diverso genere o da trasferimenti e deviazioni del regolare flusso idrico.

La Direttiva Europea introduce un nuovo concetto importante, già parzialmente anticipato dal D.Lgs 152/99, di gestione delle acque attraverso una visione ecosistemica e non più antropocentrica prendendo in considerazione non solo i parametri chimico-fisici ma anche i descrittori biologici di un ecosistema. E' noto infatti che lo studio degli organismi viventi permette di trarre conclusioni sullo stato ambientale del sistema, in vista del fatto che la salute di un ambiente è ben riflessa in quella degli organismi che vi abitano.

Gli indicatori biologici descrivono in maniera eccellente lo stato di un corpo idrico e gli effetti dell'inquinamento attraverso una memoria storica e spaziale dei fenomeni naturali e di perturbazione antropica; possono rivelare fenomeni di sinergia o di antagonismo di sostanze che risultano più dannose se presenti simultaneamente in ecosistema acquatico.

Inoltre la possibilità di scegliere specie differenti permette di valutare le reazioni delle stesse ad una vasta gamma di variazioni ambientali esprimendosi non tanto come variazione di un singolo fattore ma come cambiamento della situazione ambientale nel suo complesso.

Le attività di “biomonitoraggio” assumono, quindi, una notevole importanza all’interno della Direttiva che impone agli Stati membri l’adeguamento dei monitoraggi basati in precedenza solamente su indicazioni chimiche e microbiologiche. A tal proposito gli elementi qualitativi per la classificazione dello stato ecologico dei fiumi risultano essere:

- Composizione e abbondanza della flora acquatica.
- Composizione e abbondanza dei macroinvertebrati bentonici.
- Composizione, abbondanza e struttura di età della fauna ittica.

Alla luce di queste considerazioni l’attenzione di questo lavoro è rivolta a due dei principali indicatori biologici delle acque correnti, macroinvertebrati bentonici e diatomee utilizzati secondo la WFD per la classificazione dello stato di qualità ecologica dei corpi idrici.

L’APAT con la collaborazione delle Agenzie Regionali, delle Province Autonome e delle principali istituzioni tecnico-scientifiche di settore sta infatti svolgendo il lavoro per la predisposizione di manuali sulle metodologie, a livello nazionale, del monitoraggio e classificazione dei corpi idrici; sta aggiornando la rete di controllo nazionale qualitativa delle acque a livello di bacino idrografico ed inoltre partecipa al progetto di intercalibrazione con gli altri Stati Membri per l’adeguamento a livello europeo delle nuove metodologie e metriche applicate.

All’interno di queste prospettive si inserisce quindi il lavoro di definizione dei nuovi protocolli per il campionamento degli organismi, l’utilizzo degli strumenti standard, il trattamento in laboratorio nonché lo sviluppo di indici adatti allo studio dei diversi sistemi acquatici sul territorio nazionale e confrontabili a livello europeo.

2 I MACROINVERTEBRATI BENTONICI: VALUTAZIONE ATTRAVERSO IL METODO I.B.E.

I macroinvertebrati bentonici vengono ormai utilizzati come bioindicatori per la valutazione della qualità delle acque superficiali già da diversi decenni.

La condizione attuale delle acque è molto modificata rispetto ad un passato recente; in effetti la gestione del territorio e le esigenze economiche hanno contribuito nel tempo a modificare l'assetto naturale dei nostri corsi d'acqua provocando cambiamenti nella loro originale struttura ecosistemica. La comunità dei macroinvertebrati bentonici si inserisce con un peso notevole nella naturale struttura ecologica dei fiumi essendo una componente essenziale della rete alimentare; essa rappresenta infatti un collegamento fondamentale nel trasferimento di energia dai produttori primari ai restanti componenti dell'intera catena trofica; essendo anche la comunità ittica correlata con quella dei macroinvertebrati, la conoscenza dei fattori che influenzano la loro abbondanza ci dà una visione completa dei rapporti dinamici che si creano tra le diverse biocenosi di un fiume (Marklund *et al.*, 2001). Inoltre questi organismi partecipano al processo di ciclizzazione della materia organica entrando attivamente nel meccanismo autodepurativo ed autoregolativo degli ecosistemi delle acque correnti. Si intuisce quindi che la presenza di una comunità macrobentonica adeguata alla tipologia fluviale in esame indica un buon funzionamento dell'intero ecosistema, un allontanamento da questa condizione porta ad una modificazione delle biocenosi ed alla diminuzione dell'efficienza autodepurativa del fiume stesso (Campagna di biomonitoraggio 2005-IBE, Miani, Skert, Grahonja).

La scelta dei macroinvertebrati rispetto ad altri gruppi sistematici è dovuta anche ad altre differenti motivazioni. La loro comunità è innanzitutto rappresentata da numerosi taxa con diversi livelli di sensibilità alle alterazioni dell'ambiente, hanno ruoli ecologici differenti e presentano cicli vitali relativamente lunghi. Rispondono quindi all'inquinamento di un ecosistema sia con la diminuzione della quantità che della qualità dei taxa costituenti la comunità stessa. Inoltre questi organismi sono adeguatamente campionabili, riconoscibili e classificabili ed essendo legati al substrato sono rappresentativi di una determinata sezione di corso d'acqua. Essi presentano quindi tutte le caratteristiche tipiche dei bioindicatori.

Si è messo in evidenza in questi ultimi anni l'importanza di considerare il vantaggio che si ottiene dalla valutazione della qualità ambientale di un corso d'acqua utilizzando la componente biologica. L'utilizzo di parametri esclusivamente chimici e fisici, che sono necessari in uno studio di qualità, ci fornisce una visione statica ed istantanea del sistema, mentre la possibilità di sfruttare anche gli indicatori biologici permette di valutare in maniera più esaustiva tutte le interazioni dinamiche tra le varie componenti, fornendo un quadro ambientale completo per possibili interventi futuri.

In questa nuova visione di valutazione dello stato di un sistema, si inserisce negli anni '80 l'utilizzo di un parametro di valutazione della qualità dei fiumi, l'I.B.E. (Indice Biotico Esteso) introdotto come una modificazione dell' E.B.I. (Extended Biotic Index), metodo sperimentato da Woodiwiss nel 1978 e successivamente tarato per la realtà italiana dal Prof. Francesco Ghetti e pubblicato nella revisione più aggiornata dalla Provincia Autonoma di Trento (Ghetti, 1997).

Tale metodo è stato introdotto nel Decreto Legislativo 152/99 ed inserito tra le analisi di base, e quindi obbligatorio, per il monitoraggio dei corsi d'acqua. Su di esso si basano quindi le informazioni raccolte in questi ultimi decenni dai differenti studi e dalle varie indagini di monitoraggio condotte sul nostro territorio. Esso racchiude la recente memoria storica dello stato di "qualità ecologica" dei nostri fiumi assumendo un ruolo centrale nella definizione dello stesso. Per contro esso segnala solo indirettamente la "qualità chimico-fisica" delle acque e dei sedimenti. Per questo motivo il metodo I.B.E. è stato negli anni complementare ai controlli chimico, fisico e microbiologiche delle acque.

L'indice si propone come scopo quello di definire una diagnosi della qualità di ambienti di acque correnti attraverso lo studio della comunità macrobentonica e delle sue possibili modificazioni dovute ad alterazioni provocate da fattori di inquinamento, di degrado del sistema nonché di alterazioni fisiche dell'ambiente fluviale. Queste informazioni permettono di integrare nel tempo gli effetti delle diverse cause di alterazione dell'ambiente essendo basate proprio sulle comunità viventi nello stesso e sulle loro modificazioni.

Questo metodo si è dimostrato particolarmente efficace nelle diagnosi preliminari di qualità di interi reticoli idrografici e del loro controllo nel tempo, per la valutazione degli effetti dovuti a scarichi inquinanti diffusi e puntiformi, e per stimare l'impatto di trasformazioni fisiche del corpo idrico. Purtroppo, come vedremo nel corso di questo

lavoro, l'I.B.E. si è anche dimostrato non esaustivo in alcune problematiche richieste invece dalla Direttiva Europea 2000/60. Da queste considerazioni nasce l'esigenza di creare un metodo alternativo e uniforme anche con gli altri stati membri ma al contempo continuativo con le informazioni storiche ottenute in questi decenni dall'Indice Biotico Esteso.

2.1 CARATTERISTICHE DELL'INDICE

L'I.B.E. può essere utilizzato in tutti gli ecosistemi di acque correnti purchè essi siano stabilmente colonizzati. Il monitoraggio di un fiume non viene infatti effettuato a seguito di una forte piena o di un periodo di asciutta, ma bisogna attendere il periodo necessario alla completa ricolonizzazione del tratto in esame. Questo perché concettualmente il metodo si basa sul confronto e sulle differenze riscontrate tra la composizione di una comunità "attesa" e la composizione della comunità campionata in una specifica zona del corso d'acqua. La comunità attesa viene definita sulla base della struttura della comunità che dovrebbe esser trovata in condizioni naturali dell'ecosistema ed i valori decrescenti dell'indice indicano proprio un allontanamento da questa condizione. Il presupposto necessario per l'applicazione del metodo sarà quello di poter ricostruire una comunità "attesa" attraverso l'uso di tecniche di campionamento idonee.

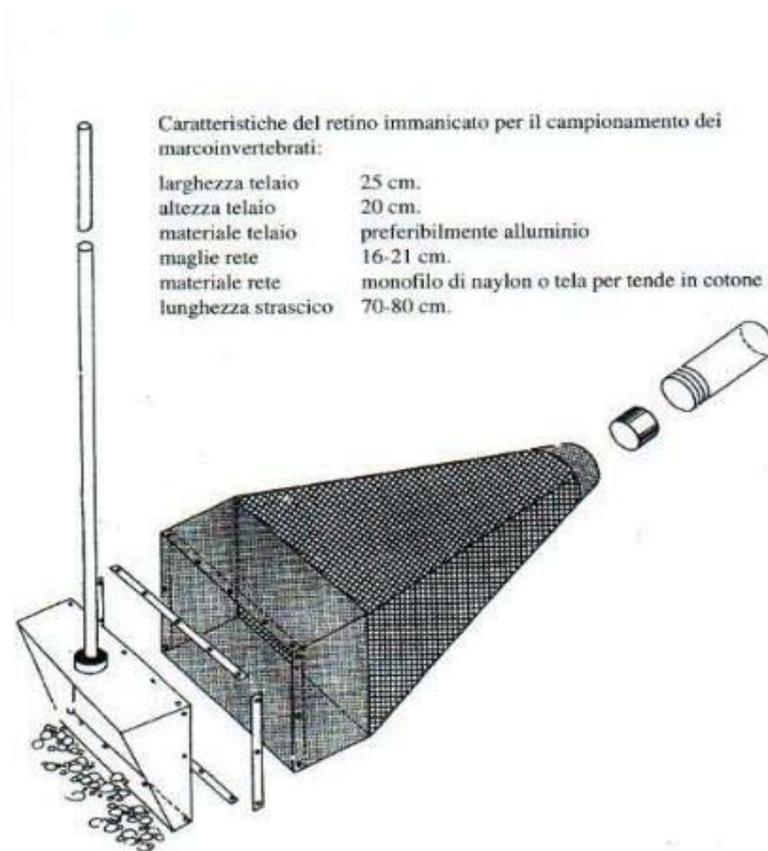
L'applicazione dell'I.B.E. prevede infatti una serie di procedure per ridurre i margini di soggettività e per uniformare il metodo così sintetizzate:

1. Definizione degli obiettivi di indagine
2. Studio preliminare del corso d'acqua
3. Campionamento e prima definizione del valore dell'indice biologico
4. Controllo in laboratorio e definizione della qualità dell'acqua

Per un corretto campionamento lo studio preliminare è di fondamentale importanza perché permette di raccogliere preziose informazioni e poter dislocare le stazioni di prelievo in modo mirato verificando la possibilità di accesso, la presenza di scarichi ecc.

Lo strumento utilizzato per il campionamento è il retino immanicato standard dotato di una rete in monofilo di nylon (21 fili/cm).

Fig. 1: caratteristiche del retino immanicato



Il campionamento viene effettuato su un transetto obliquo in controcorrente e prevede per ogni stazione d'indagine la raccolta di un campione significativo della comunità. Gli organismi raccolti vengono separati e fissati direttamente in campo dove si procede ad un primo riconoscimento degli stessi. Una volta fissati in soluzione alcolica al 70% vengono trasportati in laboratorio per completare la classificazione tassonomica con l'aiuto di uno stereo-microscopio ottico.

Nella tabella 1 sono riportati i limiti obbligati di determinazione tassonomica degli organismi.

Tabella 1: Limiti obbligati per la definizione delle Unità Sistematiche (U.S.).

Gruppi Faunistici	Livelli di determinazione tassonomica per definire le "Unità Sistematiche"
Plecoteri	genere
Tricotteri	famiglia
Efemerotteri	genere
Coleotteri	famiglia
Odonati	genere
Ditteri	famiglia
Eterotteri	famiglia
Crostacei	famiglia
Gasteropodi	famiglia
Bivalvi	famiglia
Tricladi	genere
Irudinei	genere
Oligocheti	famiglia
Altri taxa da considerare nel calcolo dell'I.B.E.	
Sialidae (Megalotteri)	
Osmylidae (Planipenni)	
<i>Prostoma</i> (Nemertini)	
Gordiidae (Nematomorfi)	

Fonte: Ghetti "Manuale di applicazione: Indice Biotico Esteso, Trento 1997

Una volta ottenuta la struttura della comunità macrobentonica presente nel tratto di fiume in esame si procede con il calcolo del valore dell'indice. Questo si effettua mediante una tabella di conversione a doppia entrata: il primo ingresso orizzontale è in corrispondenza del gruppo più sensibile all'inquinamento tra quelli presenti nella stazione in esame, considerando che nella tabella i gruppi sono sistemati dall'alto in basso, in ordine di sensibilità decrescente. Il secondo ingresso è verticale in corrispondenza di intervalli numerici che fanno riferimento al numero totale di Unità Sistematiche (U.S.) rinvenute nella stazione di campionamento.

Tabella 2: Calcolo del valore di I.B.E

Gruppi faunistici che determinano con la loro presenza l'ingresso orizzontale in tabella (primo ingresso)		Numero totale delle Unità Sistematiche costituenti la comunità (secondo ingresso)								
		0-1	2-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36 -...
Plecotteri presenti (<i>Leuctra</i> ^o)	Più di una U.S.	-	-	8	9	10	11	12	13*	14*
	Una sola U.S.	-	-	7	8	9	10	11	12	13*
Efemerotteri presenti ^{oo} (escludere Baetidae e Caenidae)	Più di una U.S.	-	-	7	8	9	10	11	12	-
	Una sola U.S.	-	-	6	7	8	9	10	11	-
Tricotteri presenti (comprendere Baetidae e Caenidae)	Più di una U.S.	-	5	6	7	8	9	10	11	-
	Una sola U.S.	-	4	5	6	7	8	9	10	-
Gammaridi e/o Atiidi e/o Palemonidi presenti	Tutte le U.S. sopra assenti	-	4	5	6	7	8	9	10	-
Asellidi e/o Niphargidi presenti	Tutte le U.S. sopra assenti	-	3	4	5	6	7	8	9	-
Oligocheti o Chironomidi	Tutte le U.S. sopra assenti	1	2	3	4	5	-	-	-	-
Altri organismi	Tutte le U.S. sopra assenti	-	-	-	-	-	-	-	-	-

LEGENDA:

- ^o nelle comunità in cui *Leuctra* è presente come unico taxon di Plecotteri e sono contemporaneamente assenti gli Efemerotteri (o tutt'al più presenti Baetidae e Canidae), *Leuctra* deve essere considerata al livello dei Tricotteri per definire l'entrata orizzontale in tabella;
- ^{oo} per la definizione dell'ingresso orizzontale in tabella le famiglie Baetidae e Caenidae vengono considerate a livello dei Tricotteri;
- giudizio dubbio, per errore di campionamento, per presenza di organismi di drift non scartati dal computo, per ambiente non colonizzato adeguatamente, per tipologia non valutabile con l'I.B.E. (es. sorgenti, acque di scioglimento di nevai, acque ferme, zone deltizie, salmastre);
- * questi valori di indice vengono raggiunti raramente nelle acque correnti italiane per cui occorre prestare attenzione, sia nell'evitare la somma di biotipologie (incremento artificioso della ricchezza in taxa), che nel valutare eventuali effetti prodotti dall'inquinamento, trattandosi di ambienti con elevata ricchezza di taxa.

Fonte: Ghetti "Manuale di applicazione: Indice Biotico Esteso, Trento 1997

Queste unità sono definite a livello di determinazione sovraspecifica (genere o famiglia) definito per i vari gruppi essendo troppo difficile e laborioso, per una finalità pratica, classificare gli organismi a livello di specie.

Il valore dell'I.B.E. viene letto in corrispondenza dell'incrocio tra l'ingresso orizzontale e verticale. I valori così ottenuti vengono convertiti, mediante un'altra tabella, in cinque classi di qualità a ciascuna delle quali corrisponde un determinato grado d'inquinamento. Come si osserva in tabella 3 ogni classe è rappresentabile in cartografia con un colore specifico.

Tabella 3: Conversione dei valori di I.B.E. in classe di qualità con relativo giudizio e colore per la rappresentazione in cartografia.

CLASSI DI QUALITÀ	VALORI DI I.B.E.	GIUDIZIO DI QUALITÀ	COLORE E/O RETINATURA RELATIVI ALLA CLASSE DI QUALITÀ
Classe I	10-11-12-...	Ambiente non inquinato o comunque non alterato in modo sensibile	azzurro -----
Classe II	8-9	Ambiente con moderati sintomi di inquinamento o di alterazione	verde //////
Classe III	6-7	Ambiente inquinato o comunque alterato	giallo X X X X X X
Classe IV	4-5	Ambiente molto inquinato o molto alterato	arancione X X X X X X X X
Classe V	1-2-3	Ambiente fortemente inquinato o fortemente alterato	rosso □

Fonte: Ghetti "Manuale di applicazione: Indice Biotico Esteso, Trento 1997

L'I.B.E. consente quindi di diagnosticare la classe di qualità per ogni corso d'acqua ed i risultati ottenuti sullo stato di salute di un fiume possono essere, con questo metodo, controllati nel tempo. Per contro esso presenta anche dei limiti di applicabilità: non è infatti utilizzabile negli ambienti di transizione e di foce, dove il cuneo salino definisce un ambiente con caratteristiche diverse da quello degli ambienti dulciacquicoli correnti e non può essere applicato ad ecosistemi con acque ferme come stagni o laghi. Il metodo I.B.E.

prevede che ci sia anche un'adeguata preparazione degli operatori in campo ecologico, idrobiologico e tassonomico, ed un periodo di formazione specifica sotto la guida di personale qualificato a causa della sua complessità nella procedura di applicazione.

L'Indice Biotico Esteso, sebbene sia un eccellente rilevatore dello stato di qualità di un corpo idrico, presenta una mancanza notevole per quanto riguarda l'indagine di tipo quantitativo. Lo stato di salute di una risorsa idrica va tutelata non solo dal punto di vista qualitativo ma anche per quanto riguarda l'abbondanza degli organismi presi in esame (come già previsto dalla legge del 5 gennaio 1994, n.36).

Anche lo scopo della Direttiva Europea 2000/60 è quello di tutelare un corpo idrico affinché possa supportare l'esistenza e lo sviluppo di comunità biologiche naturali, e ciò prevede un'integrazione assoluta degli organismi in tutte le sue parti. Come richiesto dalla Direttiva Quadro nell'Allegato V, lo stato delle acque superficiali, e nello specifico dei fiumi, deve esser valutato attraverso *la composizione ed abbondanza dei macroinvertebrati bentonici*, oltre agli altri elementi biologici.

Abbiamo quindi l'esigenza di aggiornare il nostro metodo di valutazione dell'elemento biologico "Macroinvertebrati" con quelle che sono le richieste della Direttiva. Mentre per gli altri elementi biologici i protocolli di campionamento sono stati già definiti e manca solo la determinazione delle metriche da utilizzare nella definizione dell'indice, per quanto riguarda i macroinvertebrati bentonici di acque correnti si stanno incontrando delle difficoltà anche nella scelta del metodo di campionamento, degli strumenti da utilizzare per il campionamento (retino surber, retino immanicato), per le metriche e quindi per l'indice da utilizzare. Bisognerebbe infatti trovare un punto d'incontro tra quelle che sono le nuove esigenze di valutazione imposte dalla Direttiva Europea con le informazioni ottenute in questi anni di monitoraggio dei macroinvertebrati sui nostri corsi d'acqua. A questo proposito l'APAT ha organizzato nel mese di Aprile 2007 uno studio collaborativo al quale hanno partecipato diversi enti ed istituti di ricerca con lo scopo proprio di arrivare alla condivisione di un metodo standard per il campionamento dei macroinvertebrati.

3 STUDIO COLLABORATIVO APAT-SC002

CAMPIONAMENTO ED IDENTIFICAZIONE TASSONOMICA DEI MACROINVERTEBRATI DELLE ACQUE SUPERFICIALI

Lo studio collaborativo APAT-SC002 è stato organizzato dal Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT in collaborazione con i Dipartimenti dell'ARPA Lazio di Frosinone e Latina e la partecipazione dei rappresentanti del Gruppo di Lavoro GdL "metodi biologici sui macroinvertebrati (APAT, APPA/ARPA, ISS, Università della Tuscia, CNR-IRSA, Provincia di Viterbo).

L'obiettivo dello studio collaborativo è quello di giungere alla stesura di un protocollo per la determinazione di composizione e abbondanza dei macroinvertebrati bentonici di acque correnti accettato da tutte le istituzioni ed enti di ricerca e conforme alle richieste della normativa comunitaria (Direttiva 2000/60/CE) in materia di monitoraggio delle acque. Per il raggiungimento di tale obiettivo il primo passo fondamentale è stato quello di verificare la criticità delle fasi di campionamento ed identificazione degli organismi ed i metodi idonei a tale fine.

Lo studio collaborativo si è incentrato su due punti principali:

- verificare i tempi necessari ad effettuare il campionamento dei macroinvertebrati secondo le richieste della Direttiva (individuazione dei microhabitat e campionamento).
- confrontare il campionamento degli organismi tramite retino surber con quello tramite retino immanicato.

Lo studio si è svolto sul fiume Melfa (comune di Atina, Provincia di Frosinone), località Settignano. Questo fiume, affluente di sinistra del Liri, è un corso d'acqua calcareo, caratterizzato da un substrato prevalentemente sassoso-ciottoloso (mesoliti e microliti coprenti circa il 50% dell'alveo bagnato), con massi (circa 35%), sabbia e ghiaia. Per lo studio sono stati scelti due siti diversi, il primo tratto si trova ad un'altitudine di circa 350m

slm, il secondo molto più a monte subito dopo (5km) la diga di Grotta Campanaro e vicino ad un ponte di tufo.

3.1 STANDARDIZZAZIONE E STRUTTURA DEGLI HABITAT

Per poter effettuare dei campionamenti bisogna avvalersi di metodi che siano “ripetibili” al fine di ridurre notevolmente gli elementi di soggettività; la riproducibilità di un metodo è infatti uno degli elementi più importanti che ne caratterizzano la sua efficacia. Affinché un metodo possa considerarsi idoneo ad un determinato tipo di campionamento bisogna ridurre tutti quei fattori che determinano incertezze nelle sue misure; per le attività in campo riguardanti le acque correnti queste incertezze possono essere rappresentate dagli strumenti scelti per il campionamento, dalle condizioni ambientali nonché dagli operatori stessi. Un primo passo importante è quello di effettuare una valutazione del sito attraverso una semplice analisi preliminare che metta in luce le caratteristiche dell’habitat scelto, la sua struttura e composizione. A questo punto l’operatore potrà effettuare un campionamento di tipo quantitativo attraverso un numero di incrementi (macroinvertebrati raccolti in una singola applicazione dello strumento utilizzato) proporzionale all’estensione relativa dei diversi habitat.

L’analisi della struttura degli habitat avviene a due livelli:

- MESOHABITAT: Riconoscimento del tratto di fiume dove esista l’alternanza delle zone di “riffle” (zone di raschi) e di “pool”(zone di pozze); il campionamento potrà essere effettuato in entrambi questi due mesohabitat o in uno solo di essi, a seconda del modulo di valutazione applicato.

- MICROHABITAT: questi sono definiti come la porzione di un tratto fluviale caratterizzata da un substrato omogeneo. Le repliche verranno effettuate in numero proporzionale all’estensione dei principali microhabitat identificati (a questo scopo è stata introdotta per lo studio collaborativo una “scheda dei microhabitat” da utilizzare direttamente in campo prima del campionamento).

Le informazioni acquisite durante l'indagine preliminare del sito sono state raccolte in una scheda da campo la quale permette di sintetizzare tutte le informazioni ottenute in maniera schematica ed utilizzabile anche nelle indagini future. Questa scheda include i seguenti punti:

- identificazione dei mesohabitat;
- riconoscimento dei microhabitat presenti;
- valutazione della loro estensione relativa (percentuali);
- attribuzione del numero di incrementi per ciascun microhabitat;

L'importanza di saper quantificare la percentuale di estensione di ogni microhabitat presente risiede nel fatto che ciascun campione sarà costituito da un numero definito di incrementi che sarà proporzionale all'estensione del microhabitat preso in esame; in un microhabitat dominante verranno effettuate un numero maggiore di incrementi rispetto ad un altro presente in misura minore; un habitat sarà caratterizzato da una soglia minima di occorrenza, laddove la sua percentuale di estensione risulta minore del 10% esso non verrà incluso nel campionamento (non verranno effettuate delle repliche).

A questo proposito, durante lo studio collaborativo APAT-SC002 è stata effettuata inizialmente una valutazione delle percentuali di microhabitat presenti nel tratto di fiume prescelto, che è stata determinata da tutti i partecipanti e trascritta nelle apposite "Schede Rilevamento Microhabitat" (Allegato A). Questa valutazione è stata effettuata cercando di entrare il meno possibile all'interno del tratto di fiume per non distruggere l'habitat e le comunità di organismi presenti al suo interno (specialmente sui microhabitat organici). Sono state organizzate 6 squadre, ognuna delle quali ha compilato una scheda, che hanno campionato su un tratto di 300m nel primo sito sul Melfa (3 squadre hanno campionato in riffle e tre squadre in pool), e su un tratto di circa 100m sul secondo sito scelto (2 squadre hanno campionato in pool e 4 in riffle). Per il campionamento sono stati messi a confronto come strumenti la rete surber ed il retino immanicato; tre squadre hanno campionato con il primo e tre con il secondo.

3.2 CARATTERISTICHE DELLA RETE SURBER E DEL RETINO IMMANICATO

L'uso della rete surber è indicato per tutti gli habitat non molto profondi (<0.4m) a corrente elevata, scarsa o nulla. Questa rete è fornita di pareti laterali metalliche (in lega di alluminio), le quali individuano un'area pari a 0.1 m², ed è aperta sul davanti. La forma dell'intelaiatura può essere quadrata o rettangolare. La caratteristica di questa rete è che l'intelaiatura definisce l'area del campionamento. Le sue dimensioni sono pari a ca 0.22 x 0.23 m e ca 0.32 x 0.32 m per aree unitarie rispettivamente di 0.05 e 0.1 m². La rete ha una forma a cono con una lunghezza approssimativa di 0.6-0.8 m, le dimensioni delle maglie sono di 500 µm e può essere prevista la presenza di un bicchiere di raccolta nella parte terminale del sacco.

Il retino immanicato (compatibile con quanto previsto nella norma EN 27828) è costruito con materiale resistente ma non troppo pesante (ad es. lega di alluminio); l'imboccatura del telaio, che è di forma quadrata, ha dimensioni di 250 x 250 mm, mentre il manico ha una lunghezza di almeno 150 cm. Il sacco fatto di rete ha un numero di maglie per cm lineare pari a 21, profondità di 60 cm che con l'eventuale bicchiere terminale può arrivare a 80 cm.

Il campionamento attraverso questi due strumenti prevede alcuni passaggi comuni. Innanzitutto per entrambi è necessaria l'individuazione preliminare dei principali microhabitat e la valutazione della percentuale di copertura degli stessi nel tratto prescelto. Queste informazioni dovranno essere riportate nella scheda di rilevamento dei microhabitat. Inoltre per entrambi gli strumenti il campionamento dovrà iniziare a valle dell'area in esame proseguendo verso monte per non disturbare gli habitat che si incontrano nel percorso.

Per la rete surber il campionamento viene effettuato smuovendo il terreno sottostante direttamente con le mani ed è importante che la rete sia ben aderente al fondo e posizionata controcorrente. La dimensione dell'area da campionare è definita dalla dimensione stessa dell'intelaiatura che è stata posizionata sul substrato.

Il campionamento con il retino immanicato prevede invece che il terreno possa essere smosso sia con i piedi e/o con le mani sempre in controcorrente e non prevede la

determinazione di un'area definita ma si campiona lungo un transetto. Questo porta ad una grossa variabilità dovuta all'operatore e al tempo di campionamento e non è possibile dare una stima dell'abbondanza in quanto non determina l'area di campionamento. E' stato quindi richiesto di dare una valutazione dell'area da campionare sempre proporzionale alla percentuale di estensione di ogni microhabitat prescelto. Queste stime dovranno essere sufficientemente precise per ogni superficie campionata e dovranno essere ricondotte ad una "superficie totale di campionamento" che deve essere equivalente per entrambi gli strumenti a 0,05 m².

Dopo aver effettuato il campionamento si procederà per entrambi i metodi allo smistamento degli organismi, alla classificazione degli stessi fino al livello tassonomico richiesto (famiglia) ed infine al conteggio/stima numerica degli individui (per ogni taxon otterremo quindi il numero di individui/m²). Queste operazioni vengono effettuate direttamente sul campo.

Fig.. 2: immagine dei due strumenti, retino surber a sinistra, retino immanicato a destra. (Buffagni A., CNR-IRSA)



3.3 METRICHE USATE PER LA VALUTAZIONE DEI DATI

Durante lo Studio Collaborativo è stato applicato l'indice multimetrico ufficialmente in uso a scala europea per il Processo di Intercalibrazione dei Metodi Biologici, denominato STAR_ICMi (Intercalibration Common Metrics Index). Questo indice è stato derivato, dopo specifiche normalizzazioni e ponderazioni, da una serie di metriche biologiche scelte sulla base delle conoscenze acquisite in esperienze precedenti (e.g. AQEM Consortium, 2002; Buffagni *et al.*, 2004, Pinto *et al.*, 2004; condotte in progetti di ricerca finanziati dalla comunità europea) e dal confronto avvenuto con diversi gruppi di lavoro europei. La loro selezione è partita dall'analisi di più di 50 metriche diverse e sono state scelte quelle che presentavano le migliori regressioni lineari con le classi di qualità. Nella scelta si è ovviamente tenuto conto delle richieste della Direttiva Europea verso i tre aspetti definiti dalla stessa per i macroinvertebrati (tolleranza, ricchezza/diversità e abbondanza), nonché della possibilità di definire un indice in grado di descrivere il gradiente di alterazione ambientale di un ecosistema partendo da un'ampia gamma di contesti geografici e di esperienze diverse di monitoraggio.

La lista completa delle metriche è riportata in tabella 4:

Tab. 4: Metriche utilizzate nello studio collaborativo APAT-SC002

Metrica	Taxa	Peso
ASPT	Intera comunità a livello di famiglia	0,333
$\text{Log}_{10}(\text{Sel_EPTD}+1)$	Log(somma(Heptgeniidae, Ephemeridae, Leptophlebiidae, Brachycentridae, Goeridae, Polycentropodidae, Limnephilidae, Odontoceridae, Dolichopodidae, Stratyomidae, Dixidae, Empididae, Athericidae & Nemouridae) + 1)	0,266
1-GOLD	1 - (abbondanza relativa di Gastropoda, Oligochaeta e Diptera)	0,067
Numero totale di famiglie	Somma di tutte le famiglie presenti nel campione	0,167
Numero famiglie di EPT	Somma delle famiglie di Ephemeroptera, Plecoptera e Trichoptera	0,083
Indice di diversità di Shannon-Wiener	$D_{S_w} = \frac{1}{\sum_{i=1}^S \left(\frac{n_i}{A}\right)} \cdot \ln\left(\frac{n_i}{A}\right)$	0,083

Come si può osservare dalla tabella ogni metrica viene inserita all'interno di un gruppo concettuale il quale definisce il tipo d'informazione che si ottiene dallo sviluppo di quella specifica metrica. È possibile che una metrica possa essere inclusa all'interno di più gruppi

in quanto alcune di esse forniscono informazioni riguardanti gruppi concettuali diversi. A ciascuna metrica è stato attribuito un peso diverso a seconda della sua importanza: metriche che prenderanno in considerazione la comunità intera o che presentano minore variabilità naturale avranno un peso maggiore rispetto alle altre. La sommatoria dei valori dei pesi attribuiti a ciascuna metrica all'interno di un gruppo darà un valore del peso complessivo del gruppo stesso. Questo valore sarà all'incirca uguale per tutti i diversi gruppi concettuali. I pesi delle sei metriche utilizzate sono riportati nella tabella 5:

Tab. 5: pesi utilizzati nelle 6 metriche selezionate

METRICHE	PESI UTILIZZATI
ASPT	0.333
Log10(sel_EPTD+1)	0.266
1-GOLD	0.067
N-taxa	0.167
EPT	0.083
Shannon-Wiener	0.083

La composizione faunistica tra IdroEcoregioni e tipi fluviali può risultare molto differente e questo influisce negativamente sulla comparazione dei dati ottenuti in aree diverse. Per poter far fronte a questo problema le metriche dovranno essere normalizzate, dividendo il valore di ciascuna ICM per un valore di riferimento. Inoltre, in accordo con la Direttiva Quadro, è necessario esprimere lo stato ecologico in termini di *Rapporto di Qualità Ecologica* (EQR) attraverso dei valori che dovranno essere rapportati ad una scala da 0 a 1, dove 0 rappresenta il valore minimo ottenibile ed 1 la migliore situazione osservabile corrispondente alla condizione di riferimento. È opportuno, prima di derivare i valori EQRs, che le condizioni di riferimento siano stabilite precedentemente e su una comparazione tra valori Osservati/Attesi.

Una corretta definizione delle opzioni di normalizzazione basate sui principi appena descritti (il riferimento ad una scala 0-1 ed il confronto con condizioni di riferimento) sono quindi di fondamentale importanza per il confronto tra indagini effettuate in contesti ambientali diversi.

Una volta che si è proceduto con la normalizzazione, le metriche verranno combinate nell'Indice Multimetrico finale (ICMi) ottenuto dalla sommatoria delle sei metriche normalizzate, ciascuna moltiplicata per il proprio peso (Buffagni *et al.*, 2004).

Le metriche sono raggruppate in tre categorie principali che sono: Tolleranza, Abbondanza/Habitat e ricchezza /Diversità, ad ognuna di esse viene attribuito lo stesso peso pari a 0.333. Dopo il calcolo della media ponderata delle sei metriche, i valori risultanti vengono normalizzati rispetto al valore mediano osservato per i siti di riferimento.

Per quanto concerne lo Studio Collaborativo sono stati utilizzati valori di riferimento indicativi, relativi ad un tipo fluviale differente (valori riferiti ai corsi d'acqua della zona di Viterbo) a causa della indisponibilità di dati su siti di riferimento aventi la stessa tipologia fluviale.

I concetti ottenuti in questo studio dovranno quindi essere rivisti quando le condizioni di riferimento saranno stabilite per ogni specifica tipologia fluviale; in termini relativi comunque, i valori ottenuti per i vari siti ed i campioni sono decisamente comparabili e utilizzabili per il calcolo dello STAR_ICMi.

3.4 RISULTATI

IDENTIFICAZIONE DEL MICROHABITAT

L'identificazione dei microhabitat è stata effettuata il primo giorno e ripetuta il successivo prima del campionamento. Nelle tabelle seguenti sono riportati i numeri di incrementi assegnati da ogni squadra ai microhabitat presenti; nella riga denominata TOT è riportato il valore percentuale attribuito in media ai diversi microhabitat.

Tabella 6 Risultati del rilevamento dei microhabitat effettuato nel primo giorno di sperimentazione

SITO 1

squadre	POOL/RIFFLE	MGL	MAC	MES	MIC	GHI	SAB	ARG	AL	SO	EM	TP	XY	CP	FP
1	P		2	4	3				1						
2	P			2	3	3	1			1					
3	P			1	1	3						2			3
TOT		0	7%	23%	23%	20%	3%	0%	3%	3%	0%	7%	0%	0%	10%
4	R	1	2	3	1	1									2
5	R			2	3				1			1			3
6	RP	1	2	4	3										
TOT		7%	13%	30%	23%	3%	0%	0%	3%	0%	0%	3%	0%	0%	17%

SITO2

Squadre	POOL/RIFFLE	MGL	MAC	MES	MIC	GHI	SAB	ARG	AL	SO	EM	TP	XY	CP	FP
1	P		2	3	1	2					1	1			
3	P		1	1	1	2	1					1	1	2	
TOT		0%	15%	20%	10%	20%	5%	0%	0%	0%	5%	10%	5%	10%	0%
4	R		3	1	2	1			1	2				1	
5	R	1	2	1	1		1			2		2			
6	R	1	1	2	2	1	1			1				1	
2	R	1	1			2	2			1			2	2	
TOT		8%	18%	10%	13%	10%	10%	0%	3%	15%	0%	5%	5%	10%	0%

Tabella 7 Risultati del rilevamento dei microhabitat effettuati prima del campionamento

SITO 1

squadre	POOL/RIFFLE	MGL	MAC	MES	MIC	GHI	SAB	ARG	AL	SO	EM	TP	XY	CP	FP
1	P		3	3	2				1						1
2	P		2	2	2	2				2					
3	P			2	2	2			1						2
4	P			2	7					1					
5	P	1	3	1	1	1				1		1			1
6	P		2	3	3	2									
TOT		2%	17%	22%	28%	12%	0%	0%	3%	7%	0%	2%	0%	0%	7%

SITO2

Squadre	POOL/RIFFLE	MGL	MAC	MES	MIC	GHI	SAB	ARG	AL	SO	EM	TP	XY	CP	FP
1	P		2	3	1	2								2	
3	P	1	2	1	1	2	1			1				1	
TOT		5%	20%	20%	10%	20%	5%	0%	0%	5%	0%	0%	0%	15%	0%
4	R			1	4		3				2				
5	R	2	1		1	3				2					1
6	R	1	2	2	2	2						1			
2	R		1	1	1	1	2			1			1	2	
TOT		7.5%	10%	10%	20%	15%	12.5%	0%	0%	7.5%	5%	2.5%	2.5%	5%	2.5%

Al termine della sperimentazione in campo i risultati ottenuti sono stati inseriti nelle apposite Schede dei Microhabitat;

L'analisi dei dati è stata effettuata utilizzando un software messo a punto dal Prof. C. Belfiore per il calcolo delle sei metriche. L'indice multimetrico è stato ottenuto con la somma ponderata delle sei metriche:

$$\text{NUNTAX} \times 0.167 + \text{EPT} \times 0.083 + \text{ASPT} \times 0.334 + \text{logseIEPTD} \times 0.266 + 1\text{-GOLD} \times 0.067 + \text{SHANNON} \times 0.083$$

Nella tabella seguente sono riportate le elaborazioni finali delle metriche utilizzate per il confronto dei dati di campionamento.

Tabella 8 Sito Melfa 2 (c/da Settignano –Atina). Confronto dei risultati

METRICHE			c/da Settignano –Atina					
		squadra	Pace/ Belfiore/ Balzamo	Floris/ Bernabei/ Vendetti	Mancini/ Buffagni/ Martone	Andreani/ Marcheggiani/ Cara	Damiani/ Ciaramidaro	Casino/ Le Foche/ Cadoni
dettagli	metrica	descrizione	Surber	Retino	Surber	Retino	Surber	Retino
Punteggio medio per Taxon (dai punteggi BMWP) Logaritmo delle abbondanze delle famiglie(*) +1 1-(rapporto tra abbondanza di Gasteropodi+ Ditteri+ Oligocheti e abbondanza totale)	NUMTAX	Numero Famiglie	18	23	29	25	17	19
	EPT	n.fam Efem-Pleco-Trico	9	9	11	10	7	9
	ASPT	Avg Score per Tax	5,824	5,714	5,652	5,955	5,8	6,6
	log selePTD	log(famiglie selez.)	2,029	2,262	1,991	1,978	1,881	1,724
	_1-GOLD	_1-Gast,Olig,Dipt	0,509	0,548	0,638	0,631	0,462	0,26
	SHANNON	indice di Shannon	1,943	2,012	2,019	1,756	1,516	1,625
				Pace/ Belfiore/ Balzamo	Floris/ Bernabei/ Vendetti	Mancini/ Buffagni/ Martone	Andreani/ Marcheggiani/ Cara	Damiani/ Ciaramidaro
			Surber	Retino	Surber	Retino	Surber	Retino
		Indice Multimetrico	0,724	0,77	0,79	0,774	0,672	0,727
		CLASSE	II-III	II	II	II	III	II

Tabella 9 Sito Melfa 1 (Borgo Castellone – Picinisco). Confronto dei risultati

METRICHE			Borgo Castellone – Picinisco					
		squadra	Pace/ Belfiore/ Balzamo	Floris/ Bernabei/ Vendetti	Mancini/ Buffagni / Martone	Andreani/ Marcheggiani/ Cara	Damiani/ Ciaramidaro	Casino/ Le Foche/ Cadoni
dettagli	metrica	descrizione	Surber	Retino	Surber	Retino	Retino	Surber
Punteggio medio per Taxon (dai punteggi BMWP) Logaritmo delle abbondanze delle famiglie(**) +1 1-(rapporto tra abbondanza di Gasteropodi+Ditteri+Oligocheti e abbondanza totale)	NUMTAX	Numero Famiglie	25	26	28	24	23	30
	EPT	n.fam Efem-Pleco-Trico	13	12	13	11	11	13
	ASPT	Avg Score per Tax	6,682	6,435	6,12	6,286	5,75	6,154
	logselEPTD	log(famiglie selez.)	2,318	2,694	2,199	2,449	2,193	2,173
	_1-GOLD	_1-Gast,Olig,Dipt	0,845	0,85	0,74	0,86	0,689	0,798
	SHANNON	indice di Shannon	2,416	2,297	2,218	2,66	2,537	2,776
				Pace/ Belfiore/ Balzamo	Floris/ Bernabei/ Vendetti	Mancini/ Buffagni / Martone	Andreani/ Marcheggiani/ Cara	Damiani/ Ciaramidaro
			Surber	Retino	Surber	Retino	Retino	Surber
		Indice Multimetrico	0,916	0,929	0,865	0,893	0,807	0,9
		CLASSE	II	II	II	II	II	II

** famiglie utilizzate per il log selEPTD: BRACHYCENTRIDAE, EPHEMERIDAE, GOERIDAE, HEPTAGENIIDAE, LEPTOPHLEBIIDAE, LIMNPHILIDAE, NEMOURIDAE, ODONTOCERIDAE, POLYCENTROPODIDAE, ATHERICIDAE, DIXIDAE, EMPIDIDAE, STRATIOMYIIDAE, DOLICHOPODIDAE

Sito 1

	surber	retino
Numero Famiglie	27±2	24,3±0,6
n.fam Efem-Pleco-Trico	13±0	11,3±0,6
Avg Score per Taxa log(famiglie selez.)	6,3±0,3	6,1±0,4
_1-Gast,Olig,Dipt indice di Shannon	2,23±0,07	2,4±0,2
	0,79±0,05	0,80±0,09
	2,5±0,3	2,5±0,2

Lo studio collaborativo ha messo in evidenza l'esigenza di introdurre nel campionamento la fase preliminare dell'identificazione dei microhabitat. Questo sistema permette di valutare l'eterogeneità spaziale e la conseguente distribuzione dei macroinvertebrati nel tratto di fiume prescelto e quindi di minimizzare gli errori. Inoltre la valutazione delle percentuali di estensione dei microhabitat permette di assegnare ad ognuno di essi un numero definito di incrementi. Gli operatori sul campo non hanno avuto difficoltà nella valutazione dei microhabitat; è però opportuno prestare una maggiore attenzione proprio laddove l'estensione di un habitat è molto piccola (nella soglia del 10%), perché potrebbe verificarsi l'errore di tralasciare un zona che invece risulta significativa.

La tempistica dei campionamenti effettuata con i due strumenti è risultata confrontabile (circa due ore compresa la valutazione dei microhabitat e l'identificazione degli organismi).

Per quanto riguarda il confronto tra i due metodi si è osservato che il campionamento effettuato tramite la rete surber stabilisce un'area specifica, determinata dalla dimensione dell'intelaiatura stessa. In questo modo si isola precisamente il punto dove poter campionare. Con il retino immanicato invece si ha una stima della superficie, valutata dall'operatore, che comporta però un aumento dell'incertezza del campionamento. È quindi consigliabile campionare su una superficie misurata, anche attraverso l'uso di un perimetro di grandezza nota laddove le caratteristiche idromorfologiche del fiume lo consentano; è infatti vero che l'uso del retino immanicato si è dimostrato più versatile

proprio perchè utilizzabile anche in corsi d'acqua di profondità superiore a 40 cm ed oltre 120 cm.

Le due stazioni campionate in questo studio mostravano delle differenze notevoli: nella prima si poteva osservare un alveo poco ombreggiato, con presenza di feltro perfitico e abbondante detrito organico fine (FPOM). Il valore dell'indice multimetrico ha inserito questa stazione in una seconda classe di qualità, confermando il giudizio ottenuto con l'I.B.E. La seconda stazione si presentava in condizioni ottime: acque fredde e limpide, urbanizzazione rada, presenza di vegetazione arborea riparia e ritenzione di detrito ottima grazie alla presenza in alveo di grossi tronchi. Con entrambi i metodi di campionamento si è ottenuto in questa stazione un valore dell'I.B.E. pari ad 11 inserendo (giustamente) la stazione in prima classe di qualità. Il valore ottenuto invece dall'indice multimetrico collocava questa stazione in una seconda classe di qualità, mostrando quindi una incapacità di tale indice di discriminare tra due stazioni di livello qualitativo sensibilmente differenti.

4 LE DIATOMEE BENTONICHE DEI CORSI D'ACQUA

La seconda tipologia di bioindicatori che andiamo a trattare in questo lavoro sono le Diatomee, alghe unicellulari che appartengono al Phylum delle Diatomee o Bacillariophyceae, le cui dimensioni possono variare da pochi micron ad oltre mezzo millimetro. Esse rappresentano una delle maggiori componenti del perifiton fluviale ed assumono un interesse rilevante tra gli indicatori biologici.

La Direttiva Europea 2000/60 prevede, nell'Allegato V, che per la classificazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua vengano presi in considerazione diversi elementi biologici, tra cui la "Composizione ed abbondanza della flora acquatica". La componente vegetale viene valutata solitamente dallo studio delle macrofite acquatiche e delle alghe, in particolar modo queste ultime sembrano svolgere un ruolo essenziale come bioindicatori per diversi fattori. In primo luogo esse sono ben fissate al substrato ed hanno il corpo vegetativo o tallo sempre immerso in acqua; inoltre sono presenti tutto l'anno e sono sensibili alle variazioni chimico-fisiche di un ecosistema.

Tra tutte le alghe però, le Diatomee si rivelano le più indicate per il monitoraggio delle acque perché sono distribuite su tutto il bacino idrografico con un elevato numero di specie (elevata diversità) e non presentano particolari problemi di raccolta; sono presenti tutto l'anno in tutti i corsi d'acqua ed in tutti gli ambienti fluviali, con generi e specie diverse a seconda della stagione, delle condizioni ambientali e della tipologia del corso d'acqua; sono sensibili ad un elevato numero di fattori chimici e fisici e costituiscono associazioni che riflettono le condizioni dell'ambiente acquatico. Inoltre le Diatomee sono molto reattive al variare delle condizioni ambientali ed avendo un basso tempo di resilienza (2-4 settimane) ricolonizzano in tempi brevi il corso d'acqua in seguito ad eventi che hanno destabilizzato la composizione della comunità. Le Diatomee inoltre sono ben conosciute sia dal punto di vista sistematico che ecologico. Per questi motivi esse sono considerate "indicatori d'eccellenza".

Per il monitoraggio fluviale vengono solitamente campionate le diatomee bentoniche, in particolare quelle epilittiche che formano rivestimenti brunastri su massi sommersi, pietre e ciottoli nei corsi d'acqua. I campionamenti possono variare da due a quattro volte l'anno in base alla tipologia del tratto fluviale ed agli obiettivi della ricerca.

Sono stati avviati e definiti dall'APAT in collaborazione con i partecipanti al Gdl (gruppo di lavoro per gli elementi biologici) i protocolli per il campionamento delle diatomee in modo conforme alle richieste della Direttiva Europea. Questi protocolli definiscono i metodi del campionamento e le corrette procedure da seguire in campo ed in laboratorio per l'analisi delle stesse.

4.1 CARATTERISTICHE DELLE DIATOMEE

Le Diatomee sono alghe unicellulari di piccole dimensioni (da pochi μm fino ad oltre mezzo millimetro) che colonizzano qualsiasi specchio d'acqua dolce o salata necessitando sostanzialmente di acqua e luce per la loro sopravvivenza. Nei diversi habitat si ritrovano generi e specie diverse in base alle caratteristiche idrologiche, geografiche e chimico-fisiche del corpo idrico che le ospita.

Sono dotate di una parete cellulare fortemente impregnata di silice che ha una funzione protettiva ed un ruolo importante per la loro classificazione. Questa parete chiamata *frustolo* è formata da due valve ineguali che si incastrano l'una nell'altra come una scatola con il suo coperchio. Le valve presentano sulla loro superficie degli alveoli e dei pori necessari per lo scambio di sostanze con l'ambiente, la cui disposizione forma delle ornamentazioni specie-specifiche. La dimensione, la forma e la disposizione delle ornamentazioni sono utilizzate per il loro riconoscimento a livello di specie ed hanno quindi un grande valore sistematico.

Le diatomee si dividono in due grandi gruppi:

- Diatomee centriche, con valve circolari, triangolari quadrate, poligonali e con ornamentazioni disposte a raggi o in forma concentrica.
- Diatomee pennate, con valve allungate, lanceolate od ellittiche ed un'ornamentazione bilaterale simmetrica rispetto all'asse longitudinale. Esse sono caratterizzate spesso dalla presenza di un *rafe*, che è una linea longitudinale

mediana di struttura complessa ai lati della quale le ornamentazioni si dispongono come le barbe di una penna.

Le diatomee utilizzate nel monitoraggio dei corsi d'acqua sono quelle pennate, e sono alghe tipicamente bentoniche. I periodi consigliati per il campionamento sono quelli in cui si ha un'elevata luminosità ed una temperatura moderata dell'acqua (maggio-giugno, settembre-ottobre) perché in queste condizioni si raggiunge il massimo sviluppo in termini di biodiversità e copertura vegetale. Essendo però ubiquitarie e presenti tutto l'anno si possono comunque campionare in tutte le stagioni, evitando il campionamento nei periodi successivi alle piene (si consiglia di attendere almeno 4 settimane per la completa ricolonizzazione).

Le diatomee possono trovarsi adese a substrati duri come ciottoli o massi (diatomee *epilitiche*), tra le macrofite acquatiche o su alghe macroscopiche (diatomee *epifitiche*) oppure adagate sul limo di fondo dell'alveo fluviale (diatomee *epipeliche*). In generale per il monitoraggio delle acque correnti si preferisce campionare le diatomee epilitiche, laddove la scelta del substrato sarà differente la metodologia del campionamento risulterà adeguata alla tipologia del substrato scelto.

4.2 PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO: STUDIO COLLABORATIVO APAT-SC002

Durante lo svolgimento dello studio collaborativo SC002 si è proceduto al campionamento delle diatomee epilitiche secondo quanto stabilito nel protocollo di campionamento e analisi delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua. Come per i macroinvertebrati, le varie procedure sono state svolte sul fiume Melfa.

Una volta selezionato il tratto di campionamento idoneo, in particolare un raschio con una lunghezza di almeno 10 m, si è definito un transetto lungo il quale eseguire il campionamento evitando zone ombreggiate, in acque ferme poco ossigenate come anse morte o acque stagnanti. I massi e ciottoli scelti erano infatti completamente sommersi

dall'acqua, soggetti alla corrente del fiume ed alla radiazione solare diretta. In generale devono essere campionati substrati stabilmente colonizzati e sempre sommersi.

Il campionamento procede sempre lungo il corso d'acqua da valle a monte, lo strumento utilizzato per raschiare le diatomee dai ciottoli raccolti è stato un semplice spazzolino da denti con setole dure; il campione è stato raccolto in provette di plastica da 50 ml contenente acqua prelevata dal corso d'acqua. Si è proceduto quindi al risciacquo dello spazzolino con acqua distillata in una vaschetta per evitare la contaminazione del campione con diatomee planctoniche (le diatomee utilizzate nei monitoraggi dei fiumi sono solo quelle bentoniche). Secondo quanto stabilito nel protocollo bisogna prelevare un numero di ciottoli o massi tali che la superficie totale campionata risulti essere di almeno 100 cm², nel nostro caso sono stati scelti 5 ciottoli con una superficie di almeno 20 cm² ciascuno.

Al campione così ottenuto va aggiunto del liquido conservante (etanolo al 70%, formaldeide tamponata al 4%, lugol) che ha lo scopo di interrompere il processo di divisione cellulare e la decomposizione della sostanza organica. Non è però necessario aggiungere il conservante se il campione viene preparato entro poche ore dalla raccolta. Durante il nostro campionamento si è preferito procedere senza aggiungere il conservante; per questo motivo il prelievo delle diatomee è stato effettuato l'ultimo giorno della nostra permanenza, conservando e trasportando poi il campione in un luogo freddo e buio, accorgimento necessario per interrompere il processo di divisione cellulare. Ogni campione è stato etichettato con riferimenti circa la data, la stazione di raccolta e la tipologia del substrato campionato.

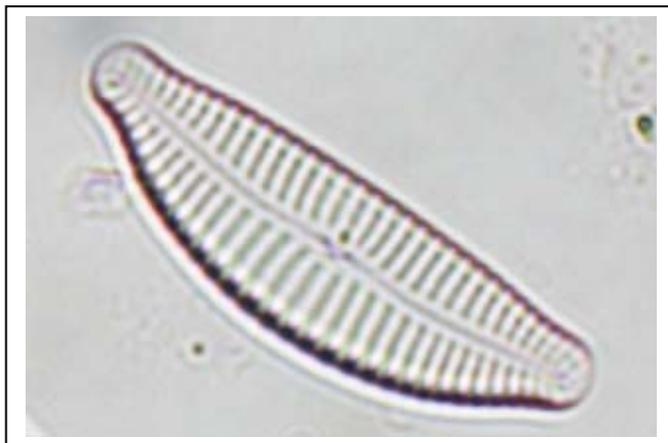
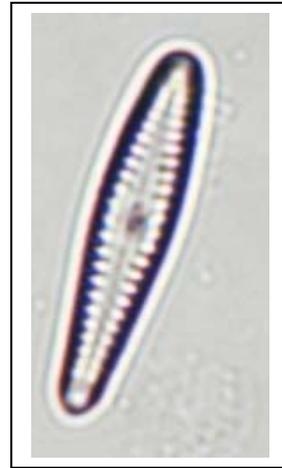
Dal momento che il riconoscimento delle diatomee a livello di specie avviene sulla base sistematica delle caratteristiche riferite alla parete cellulare (frustolo), è necessario procedere con l'eliminazione di tutta sostanza organica che altrimenti renderebbe difficile la lettura al microscopio ottico. Questa eliminazione può essere effettuata attraverso 4 diversi metodi di laboratorio, tutti inseriti nel protocollo di campionamento. Per il nostro studio è stato scelto il trattamento che si avvale dell'uso di perossido di idrogeno (metodo 1 nel protocollo): dopo aver omogeneizzato il campione si prelevano all'incirca 5-10 ml di soluzione a cui verranno aggiunti 20 ml di perossido di idrogeno. Bisogna riporre la soluzione così ottenuta su una piastra riscaldante fino a $90 \pm 5^{\circ}\text{C}$ in modo da ossidare completamente la sostanza organica. A questo punto si aggiungono delle gocce di acido cloridrico per rimuovere il perossido di idrogeno in eccesso e si lascia raffreddare sotto

cappa. Infine si trasferisce il contenuto in un tubo da centrifuga, si porta a volume con acqua distillata e si centrifuga a 1500 giri/min per 10 minuti eliminando così il surnatante in eccesso. L'operazione va ripetuta fino a che non siano state rimosse tutte le tracce di perossido di idrogeno. In alternativa si può effettuare una decantazione naturale della sospensione; in questo caso i tempi saranno maggiori ma si evita che la velocità delle operazioni effettuate con la centrifuga portino alla rottura dei frustoli.

Una volta terminate le operazioni di eliminazione della sostanza organica le diatomee possono essere montate sui vetrini per la lettura al microscopio ottico. Per il loro montaggio è stata utilizzata una resina ad alto indice di rifrazione (Naphrax, $i.r.= 1.74$). L'utilizzo della resina è necessario in quanto la silice, che è il componente principale della parete cellulare, ha un indice di rifrazione molto simile a quello dell'acqua e senza questo accorgimento non verrebbero evidenziate le ornamentazioni.

Per la preparazione dei vetrini permanenti abbiamo prelevato qualche goccia di sospensione con una pipetta, riposta su un vetrino coprioggetto di forma circolare e lasciata asciugare su una piastra riscaldante a bassa temperatura. E' stata messa una goccia di resina sul vetrino ed è stato capovolto il coprioggetto dalla parte contenente i frustoli delle diatomee. Utilizzando una piastra riscaldante si attende che il solvente venga eliminato aiutando la fuoriuscita delle bolle che si creano con delle semplici pressioni sul coprioggetto. Il vetrino è così pronto per essere osservato al microscopio ottico a 1000 ingrandimenti. Attualmente si consiglia di contare 400 valve spostandosi sul campo del vetrino in senso orizzontale o verticale ed evitando le zone di bordo.

La maggior parte dei metodi che utilizzano le diatomee come bioindicatori della qualità delle acque richiedono la definizione fino al livello di specie. Nel nostro lavoro ci siamo avvalse dell'uso di testi in lingua tedesca per la loro identificazione (Collana Süßwasserflora von Mitteleuropa). Sono riportate di seguito alcune immagini scattate nei nostri laboratori delle diatomee rinvenute sul fiume Melfa.



4.3 PRINCIPALI INDICI DIATOMICI EUROPEI

Le Diatomee sono ormai utilizzate per il monitoraggio dei corsi d'acqua in quasi tutti i paesi d'Europa. Lo studio della valutazione della qualità delle acque utilizzando le diatomee come bioindicatori può essere effettuato attraverso semplici metriche oppure utilizzando indici composti. L'indice di diversità (Shannon e Weaver, 1948) è un esempio di metrica semplice, applicata ad una vasta gamma di indicatori, che può fornire una prima indicazione dello stato di un ecosistema.

In Europa sono stati formulati diversi indici, con criteri e modalità di calcolo diversi, tutti basati sulla sensibilità delle diatomee all'inquinamento ambientale.

Il "Differentiating Species System" (Lange-Bertalot, 1979) è stato uno dei primi indici formulati il quale assegna a 50 specie di diatomee tre classi di qualità: resistente, sensibile, ubiquitaria. Sulla base della loro presenza e della quantità delle specie rinvenute si definisce lo stato di qualità di un corso d'acqua.

L'indice CEE (Descy e Coste, 1991) utilizza una matrice a due entrate, come nell'I.B.E., la quale si basa sull'utilizzo di 208 specie. Nella colonna verticale sono inserite le specie stenoece, in orizzontale quelle euriecie. In entrambe le specie sono disposte in ordine crescente di sensibilità all'inquinamento. L'intersezione della riga con la colonna fornisce il valore dell'indice.

Attualmente uno degli indici europei meglio conosciuti e funzionale è l'IBD (Indice Biologico Diatomee) utilizzato in Francia. Per ogni specie sono stati assegnati dei profili di probabilità di presenza secondo sette classi di qualità. Il calcolo dell'IBD prende in considerazione la "frequenza dei taxon" e la "probabilità di presenza per ciascuna classe di qualità" (Lenoir e Coste, 1996; Prygiel e Coste, 1998, 2000).

La Francia ha compiuto numerosi sforzi per rendere i metodi basati sulle diatomee applicabili su larga scala; l'IBD è stato progressivamente introdotto nel monitoraggio routinario così come il TDI (Trophic Diatom Index) che è l'indice utilizzato in Gran Bretagna candidato ad essere la forma di sorveglianza corrente da parte dei biologi della Environmental Protection Agency. Inoltre sempre in Francia è stato sviluppato il software OMNIDIA che oltre ad essere un buon database per l'archiviazione dei risultati ed a

contenere informazioni circa l'ecologia delle specie, è in grado di effettuare il calcolo in automatico di molti indici europei, compreso quello in uso sul nostro territorio.

In Italia è stato prodotto infatti un manuale per il biomonitoraggio tramite diatomee, pubblicato dall'APAT e disponibile sul sito internet: www.sinanet.apat.it (Dell'Uomo,2004).

Il manuale è basato sulla metodica EPI-D, ovvero "Eutrophication and/or Pollution Index – Diatom based" (Dell'Uomo, 1996, 1999). Questo è un indice integrato ponderato di eutrofizzazione e/o inquinazione basato sulla sensibilità delle diatomee alle condizioni ambientali quali sostanza organica, nutrienti e sali minerali disciolti in acqua, in particolare i cloruri. L'indice esprime pertanto un giudizio sulla qualità globale del corpo idrico, con riferimento al suo stato trofico ed ai fenomeni di inquinamento organico e minerale. Gli studi effettuati per arrivare al completamento dell'EPI-D sono stati svolti nella zona centro appenninica, in particolar modo sul fiume Chienti.

L'EPI-D è calcolato usando l'abbondanza relativa di 93 specie e si basa, come la maggior parte degli indici diatomici utilizzati in Europa, sulla formula matematica di Zelinka e Marvan (1961):

$$EPI-D = \frac{\sum_{j=1}^n a_j r_j i_j}{\sum_{j=1}^n a_j r_j}$$

Dove:

a_j = abbondanza della specie

r_j = affidabilità della specie J; valori utilizzati : 5 per un indicatore ottimo, 3 per un indicatore buono, 1 per un indicatore sufficiente

$i_j =$ indice integrato ponderato della specie J. I valori attribuiti da 0 (specie di un ambiente di ottima qualità) a 4 (specie che indica un ambiente degradato)

L'abbondanza di ogni specie (a_j) varia da 1 a 5 ed il valore è assegnato mediante la quantificazione del numero di individui.

L'affidabilità (r_j) assume i valori 1, 3 o 5. essa indica se una specie è dotata di una valenza ecologica ampia o ristretta e quindi quanto sia "affidabile" come bioindicatore.

L'indice integrato ponderato di sensibilità della specie (i_j) varia tra 0 e 4 ed esprime la sensibilità decrescente della specie ai sali minerali, ai nutrienti ed al materiale organico.

Il risultato fornito dall'indice è interpretato in termini di classi di qualità. Ad ogni valore sarà associata una specifica classe secondo una tabella suddivisa in 5 classi e 4 sottoclassi (corrispondenti ad una specifico colore) le quali esprimeranno una condizione di qualità delle acque da buona a pessima.

L'indice qui proposto è complementare all'I.B.E. (Ghetti, 1997) e solo in alcuni casi può sostituirsi ad esso, quando ad esempio ci si trova in prossimità delle sorgenti o quando i corsi d'acqua sono molto profondi (con opportuni accorgimenti le diatomee, ovunque presenti, consentono il campionamento anche in particolari situazioni).

Purtroppo l'applicazione dell'EPI-D trova in Italia alcuni ostacoli (come per molti altri indici diatomici europei). Manca innanzitutto un collegamento dell'EPI-D con i parametri di supporto richiesti dalla Direttiva: le diverse tipologie di pressioni antropiche non trovano riscontro in questo indice. Mancano inoltre metodologie standardizzate e manuali di determinazione che risultino accessibili a tutti gli operatori; per poter applicare un indice sull'intero territorio è necessario svolgere uno studio a livello nazionale delle comunità delle diatomee dei corsi d'acqua nelle due ecoregioni mediterranea ed alpina; acquisire quindi conoscenze sull'autoecologia delle specie presenti in Italia. Tutte queste informazioni devono poter essere contenute in un database disponibile per tutti gli operatori del settore.

Bisogna infatti investire risorse umane e finanziarie in questo progetto. E' opportuno innanzitutto consolidare la rete delle Agenzie coordinate da APAT e supportate dagli enti di riferimento per poter avviare periodi di formazione e sperimentazione per quanto riguarda le metodologie di campionamento normative a livello europeo. Gli operatori

dovranno avere una preparazione specifica che consenta un approccio di base all'ecologia, alle modalità del campionamento nonché alla preparazione e conservazione del campione e la possibilità in futuro di poter lavorare per il riconoscimento sistematico su testi e guide in italiano (considerando il fatto che ad oggi i testi in dotazione sono tutti in lingua straniera). Nonostante molti paesi europei, compresa l'Italia, utilizzino indici diatomici sono pochi quelli che soddisfano completamente i requisiti richiesti dalla Direttiva Europea 2000/60. Sarà difficile stabilire uno strumento unico di valutazione per tutti gli stati membri, considerando che le diatomee vivono in condizioni climatiche molto diverse tra loro, ma è auspicabile che almeno si possa arrivare presto all'applicazione di un indice di qualità a livello nazionale che segua completamente i principi dettati dalla Direttiva Quadro.

BIBLIOGRAFIA

- Baudo R., 2001. Biological monitoring of aquatic ecosystems in Italy. *J. Limnol.* 60 (Supp.1): 49-52.2001.
- Buffagni A. & Furse M., 2006. Intercalibration and comparison – major results and conclusions from the STAR project. In: M.T. Furse, D. Hering, K. Brabec, A. Buffagni, L. Sandin & P.F.M. Verdonschot (eds), *The Ecological Status of European Rivers: Evaluation and Intercalibration of Assessment Methods*. *Hydrobiologia*, 566:357-364.
- Buffagni A. & Belfiore C., 2007. ICMeasy 1.2: A software for the intercalibration Common Metrics and Index easy calculation. User guide. *Notiziario dei Metodi Analitici*, CNR-IRSA Marzo 2007(1): 20pp (in stampa).
- Ciutti F. Il monitoraggio dei corsi d'acqua con indicatori algali. *Ann Ist Super Sanità* 2005; 41(3): 393-397.
- Dell'Uomo A., 2004. L'indice diatamico di eutrofizzazione/polluzione (EPI-D) nel monitoraggio delle acque correnti. Linee guida. APAT, Roma, pp101.
- Falasco E., Bona F., Fascina S. Le Diatomee “sentinelle” dell'arricchimento in nutrienti. XV Congresso della Società Italiana di Ecologia-Torino 2005.
- Furse M.T., Hering D., Brabec K., Buffagni A., Sandin L. & P.F.M. Verdonschot (eds). *The Ecological Status of European Rivers: Evaluation and Intercalibration of Assessment Methods*. *Hydrobiologia* (2006) 566:39-58.
- Ghetti, P.F., 1997. Manuale di Applicazione Indice Biotico Esteso (I.B.E.). I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti. Provincia Autonoma di Trento. Trento 1997, pp.222.
- Giaj-Levra, P.& Abate, O. 1994 – Le diatomee d'acqua dolce in Italia. ENEA: Serie Studi Ambientali, pp.290.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. 1986- Bacillariophyceae 1. Teil: Naviculaceae. *S_wasseflora von Mitteleuropa*. G. Fischer Verlag, Stuttgart, 2/1, 876p.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. 1988- Bacillariophyceae 2. Teil: Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae. *S_wasseflora von Mitteleuropa*. G. Fischer Verlag, Stuttgart, 2/2, 596p.

- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. 1991a- Bacyllariophyceae 3. Teil: Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae. S_wasseflora von Mitteleuropa. G. Fischer Verlag, Stuttgart, 2/3, 600p.
- Krammer, K. & Lange-Bertalot, H. 1991b- Bacyllariophyceae 4. Teil: Achnanthaceae, Kritische Ergänzungen zu navicula (Lineolate) und Ghomphonema. G. Fischer Verlag, Stuttgart, 2/4, 437p.
- Mancini L.. Bioindicatori: necessità di nuovi sviluppi a seguito della attuazione del decreto legislativo 152/99 e del recepimento della Direttiva 2000/60/CE. Istituto Superiore di Sanità.
- Miani N., Skert N., Grahonja R., Biomonitoraggio della qualità dei principali corsi d'acqua della provincial di Trieste tramite il metodo EPI-D. Campagna di biomonitoraggio 2005-diatomee. ARPA Trieste.
- Miani N., Skert N., Grahonja R., Biomonitoraggio delle acque correnti superficiali con il metodo IBE. Campagna di biomonitoraggio 2005-diatomee. ARPA Trieste.
- Rimet F., Ciutti F., Cappelletti C., Ector L. Ruolo delle Diatomee nell'applicazione della Direttiva Europea Quadro sulle acque. *Biologia Ambientale*, 19(1): 87-93. Atti del Seminario: classificazione ecologica delle acque interne. Applicabilità della Direttiva 2000/60/CE, Trento, 2004.
- UNIONE EUROPEA, 2000. 2000/60/CE Directive of the European Parliament and the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. OJ, L327 (22.12.2000): 1-72.
- UNI EN 28265, Qualità dell'acqua. Progettazione e utilizzo di campionatori quantitative di macroinvertebrati bentonici su substrati rocciosi in acque dolci poco profonde. Ottobre 1995.
- UNI EN 27828, Qualità dell'acqua. Metodi di campionamento biologico. Settembre 1996.
- UNI EN 14407, Qualità dell'acqua – Linee guida per l'identificazione, il conteggio e la classificazione di campioni di diatomee bentoniche da acque correnti. Novembre 2004.

