

C.N. BIANCHI¹, R. PRONZATO¹, R. CATTANEO-VIETTI¹, L. BENEDETTI CECCHI², C. MORRI¹,
M. PANSINI¹, R. CHEMELLO³, M. MILAZZO³, S. FRASCHETTI⁴, A. TERLIZZI⁴, A. PEIRANO⁵,
E. SALVATI⁶, F. BENZONI⁷, B. CALCINAI⁸, C. CERRANO¹, G. BAVESTRELLO⁸

¹ Dipartimento Territorio e Risorse, Università di Genova, Corso Europa, 26 - 16132 Genova, Italia.

² Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente, Università di Pisa, Via Volta, 6 - 56126 Pisa, Italia.

³ Dipartimento di Biologia Animale, Università di Palermo, Via Archirafi, 18 - 90123 Palermo, Italia.

⁴ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, Università di Lecce

Via Provinciale Lecce-Monteroni - 73100 Lecce, Italia.

⁵ Centro Ricerche Ambiente Marino, ENEA Santa Teresa, CP 224 - 19100 La Spezia, Italia.

⁶ ICRAM, Via di Casalotti, 300 - 00166 Roma, Italia.

⁷ Civico Acquario e Stazione Idrobiologica di Milano, Viale G.B. Gadio, 2 - 20121 Milano, Italia.

⁸ Istituto di Scienze del Mare, Università di Ancona, Via Breccie Bianche - 60131 Ancona, Italia.

CAPITOLO 6

I FONDI DURI

Indice

- 6.1 Introduzione
- 6.2 Aspetti generali dei campionamenti in immersione subacquea
- 6.3 Rappresentatività del campionamento
 - 6.3.1 Accuratezza
 - 6.3.2 Precisione
 - 6.3.3 Diagnostiche
- 6.4 Scelta dell'unità di campionamento
 - 6.4.1 Area minima
- 6.5 Descrittori numerici
 - 6.5.1 Valutazioni qualitative e quantitative
 - 6.5.1.1 Biomassa e biovolume
 - 6.5.1.2 Abbondanza e densità
 - 6.5.1.3 Copertura e ricoprimento
 - 6.5.1.4 Frequenza
 - 6.5.2. Valutazioni semi-quantitative
- 6.6 Metodi di campionamento
 - 6.6.1 Metodi diretti di prelievo
 - 6.6.1.1 Grattaggio
 - 6.6.1.2 Sorbona
 - 6.6.1.3 Trattamento dei campioni in laboratorio
 - 6.6.2 Metodi fotografici e visivi
 - 6.6.2.1 Rilevamento fotografico
 - 6.6.2.2 Censimenti visivi
 - 6.6.2.2.1 Transetti
 - 6.6.2.2.2 Quadrati
- 6.7 Endobenthos perforante
 - 6.7.1 Analisi quantitativa della bioerosione
 - 6.7.1.1 Metodi indiretti e diretti
 - 6.7.1.1.1 Biomassa
 - 6.7.1.1.2 Biovolume
 - 6.7.1.2 Stima dei tassi e della modalità di bioerosione
 - 6.7.2 Studio morfologico delle perforazioni
- 6.8 Bibliografia

6.1 Introduzione

I fondi rocciosi costieri, comunemente riferiti con il termine di fondi duri, rappresentano una frazione quantitativamente insignificante nell'ambiente marino, se confrontati con lo sviluppo spaziale dei fondi molli, eppure rivestono un interesse scientifico ed economico assolutamente paragonabile. Ciò non sorprende in quanto le comunità che vi si instaurano consentono lo studio di numerosi processi ecologici (competizione, cascate trofiche, strutturazione di habitat, ecc.) di valore generale e rappresentano una grande riserva di biodiversità. L'eterogeneità dei fondi duri è infatti molto maggiore di quella dei fondi molli, determinando una ricchezza di situazioni e di popolamenti diversificati che contrastano vistosamente con l'apparente uniformità dei fondi molli. Inoltre, i fondi duri sono spesso caratterizzati da organismi sessili a struttura modulare (alghe, poriferi, cnidari, briozoi, tunicati), che non trovano corrispondenza in altri ambienti.

Il notevole valore economico dei fondi duri è dovuto sia alla pesca, in quanto ospitano una fauna alieutica di grande valore commerciale, sia alla loro attrazione nei confronti del turismo, in particolare di quello nautico e subacqueo. Non è un caso che praticamente tutte le aree marine protette vengano istituite in corrispondenza di coste rocciose. In anni recenti si è compreso che l'impatto della pesca e della frequentazione turistica crea problemi di gestione dei fondi rocciosi che richiedono, a loro volta, una migliore conoscenza della loro ecologia.

Importanza scientifica ed economica e necessità di gestione integrata richiedono dunque ulteriori ed approfonditi studi sulla distribuzione spazio-temporale e sulla dinamica delle comunità, nonché sulle strategie vitali delle specie che le compongono. La difficoltà di tali studi in un ambiente complesso come quello roccioso, fa sì che le metodiche di indagine siano più numerose e meno standardizzate di quelle utilizzate per i fondi molli. Un'ulteriore difficoltà risiede nel fatto che per studiare efficacemente i fondi duri costieri è necessario adottare tecniche in immersione subacquea, che solo in anni recenti sono diventate patrimonio comune ai biologi marini (Bianchi e Morri, 2000). In questo capitolo vengono presentate alcune delle principali metodiche, con particolare riguardo a quelle tradizionalmente utilizzate nei mari italiani (Pansini e Pronzato, 1982; Balduzzi *et al.*, 1986; Bianchi *et al.*, 1991). Ci si limiterà ai rilevamenti e campionamenti di tipo strettamente biologico, mentre le metodiche di misurazione di fattori ecologici in senso lato si possono trovare in altri lavori (Colantoni, 1982; Mazzella *et al.*, 1986; Sgorbini *et al.*, 1988) e sono trattati nel dettaglio nel Capitolo 1 di questo Manuale.

6.2 Aspetti generali dei campionamenti in immersione subacquea

La programmazione del campionamento (casualità, repliche, ecc.) si effettua con gli usuali approcci generali validi in tutti gli ambienti e con tutte le metodiche (vedi Cap. 13 di questo Manuale), ma presenta, per i fondi duri, aspetti particolari, legati sia alla loro grande complessità ed eterogeneità, sia al fatto di lavorare in immersione subacquea. Il sommozzatore, che contrariamente a chi lavora in ambiente terrestre o con metodi dalla superficie ha un campo visivo sempre limitato, può più facilmente lasciarsi influenzare da aspetti particolari del fondale. Per una scelta casuale delle stazioni di campionamento vengono generalmente usati due sistemi: 1) si porta sott'acqua una tabella plastificata con i numeri casuali, da sorteggiare direttamente sul fondo prima di eseguire il campionamento; 2) si sorteggiano preventivamente percorsi e distanze a partire da un punto sul fondale che verrà scelto in corrispondenza di un riferimento agevole.

Qualunque siano i criteri di programmazione adottata, essi devono assolutamente conciliare rigore scientifico e sicurezza in immersione. Il rilevamento subacqueo richiede che il sommozzatore scientifico abbia un allenamento costante all'immersione, soprattutto quando il lavoro deve essere effettuato in condizioni ambientali difficili (acque fredde, scarsa visibilità, buio, corrente, ecc.). Sono infatti indispensabili un'elevata acquaticità ed un'ottima padronanza delle attrezzature e della strumentazione, in quanto l'attenzione sarà inevitabilmente rivolta più al lavoro da svolgere che non al controllo dell'andamento dell'immersione: questo rimane così prevalentemente affidato agli automatismi acquisiti con la pratica. Per questi motivi, la programmazione dell'immersione deve essere particolarmente rigorosa ed attenta (Colantoni e de Strobel, 1980).

Nella programmazione dell'immersione deve essere tenuto conto dei tempi non solo rispetto alla profondità, ma anche rispetto alla temperatura dell'acqua, in quanto il sommozzatore scientifico svolge spesso un'attività piuttosto statica ed è quindi più facilmente esposto al freddo. È da tenere presente, inoltre, che l'efficienza del lavoro diminuisce con l'aumentare della profondità anche in subacquei esperti ed abituati alle immersioni profonde: oltre i 30 m è sempre opportuno preventivare tempi doppi a parità di lavoro. L'immersione deve essere condotta in coppia, ed i due sommozzatori, dei quali va curato al massimo l'affiatamento, devono essere equivalenti sia dal punto di vista della preparazione strettamente subacquea, sia come capacità di lavoro scientifico in immersione. Esistono casi in cui è meglio, in termini di efficienza, che il lavoro sia condotto da un singolo sommozzatore: il compagno funge allora da sommozzatore d'appoggio.

Per l'annotazione delle osservazioni effettuate in immersione si usano lavagnette bianche di laminato plastico e matite di grafite. Esistono molti materiali per le lavagnette: tra i più adatti si possono ricordare il polistirolo compresso, che ha la caratteristica di essere galleggiante, ed il PVC, non galleggiante. È importante che la superficie della lavagnetta non sia lucida né eccessivamente liscia, perché la matita vi scriverebbe male. Le dimensioni ideali di una lavagnetta sono all'incirca di 20×30 cm o un po' meno, in quanto rappresentano il miglior compromesso tra disponibilità di spazio e limitazione d'ingombro (inoltre sono fotocopiable sull'usuale formato A4). È utile predisporre la lavagnetta secondo uno schema guidato a seconda di quello che si dovrà fare, in modo da agevolare il più possibile il lavoro sott'acqua (Fig. 1). Infine, sulla lavagnetta possono essere fissati bussola e/o profondimetro e può essere inserito un clinometro. Alla fine dell'immersione è necessario ricopiare quanto prima possibile la lavagnetta sul quaderno immersioni, che deve essere appositamente strutturato per le osservazioni scientifiche (Abbiati *et al.*, 1989). In alcuni casi, sono anche stati impiegati registratori a cassetta scafandrati, su cui il sommozzatore può registrare a voce i dati rilevati. Tale sistema è utile quando il sommozzatore scientifico compie osservazioni lungo un percorso effettuato con veicoli autonomi o trainati, in quanto l'uso di un registratore lascia le mani libere e non è necessario fermarsi per scrivere. Per contro, presenta alcuni svantaggi: i) è necessario usare una maschera granfacciale; ii) la chiarezza vocale è spesso mediocre; iii) richiede molto tempo, finita l'immersione, per la trascrizione del nastro; iv) come tutta la strumentazione scafandrata, può subire infiltrazioni d'acqua o allagamenti.

Utili referenze per la programmazione e l'esecuzione delle immersioni di tipo scientifico si possono inoltre trovare in Melegari (1969), Woods e Lithgoe (1971), Drew *et al.* (1976), Earll (1977), Colantoni (1980), Gamble (1984), Hiscock (1987), Flemming e Max (1996), NOAA (2002).

Fig. 1 - Esempio di impostazione della lavagnetta subacquea per l'annotazione dei dati raccolti durante l'esecuzione di un transetto.

6.3 Rappresentatività del campionamento

Scopo primario del campionamento è quello di ottenere dati rappresentativi della variabile misurata. Con ciò si intende la proprietà che un insieme di misure di una variabile ha di stimare in modo adeguato i parametri della distribuzione di frequenza da cui la variabile origina (ad esempio la densità media o la varianza di una popolazione).

La rappresentatività di un insieme di dati campionari è definibile in funzione di due attributi delle stime che da essi derivano: l'accuratezza e la precisione (vedi anche Cap. 1 di questo Manuale).

6.3.1 Accuratezza

L'accuratezza indica quanto il valore stimato è vicino al valore vero della variabile.

Quanto più la stima si avvicina al parametro tanto maggiore è l'accuratezza. Vi sono diverse sorgenti di inaccuratezza in un insieme di dati campionari. Ad esempio, un obiettivo comune a molti studi ecologici è quello di esaminare ipotesi relative a variazioni stagionali nell'abbondanza media di una popolazione di organismi. Spesso il campionamento viene condotto in un'unica data per stagione e la "stagionalità" valutata comparando i dati relativi a quattro campionamenti condotti nell'arco di un anno.

È molto probabile che questo approccio fornisca stime di variazione stagionale inaccurate (sovrastime o sottostime), in quanto una seconda sorgente di inaccuratezza è rappresentata da errori inerenti il metodo di campionamento. Questi possono includere errori di conteggio dovuti allo sperimentatore, perdita di organismi durante la raccolta e sovrastima o sottostima dell'area campionata. L'accuratezza delle misure di densità di organismi è un attributo di rilievo in studi che si basano su valori assoluti, come nel caso del censimento di popolazioni naturali.

6.3.2 Precisione

La precisione si riferisce al grado di concordanza di un insieme di misure campionarie provenienti dalla stessa popolazione. Un insieme di misure tra loro simili sarà più preciso di un insieme di misure tra loro discordanti. La precisione dipende dalla variabilità intrinseca alla variabile misurata e dallo sforzo di campionamento. Maggiore è la precisione dei dati campionari maggiore è la probabilità di osservare differenze tra trattamenti qualora tali differenze esistano realmente.

6.3.3 Diagnostiche

Anche in un campionamento semplice vi sono almeno due livelli di variabilità: la variazione dei dati campionari e la variazione della stima campionaria.

Il primo livello misura la variabilità tra singole osservazioni (o repliche). Se le repliche sono ottenute campionando una popolazione di organismi in diversi punti dello spazio, la variabilità dei dati campionari riflette la distribuzione spaziale degli organismi.

Questo tipo di variazione dipende dalla taglia dell'unità di campionamento in relazione al grado di aggregazione della popolazione. La variabilità dei dati campionari è misurata dalla varianza del campione o dalla deviazione standard (S), rappresentata dalla radice quadrata della varianza. Quest'ultima ha il vantaggio di essere direttamente commensurata alla media, mentre la varianza è una misura elevata al quadrato.

La variabilità della stima campionaria rappresenta la variabilità della media stimata dal campione. Questa misura è definita Errore Standard (Tab. 1) e rappresenta la deviazione standard di una popolazione di medie campionarie. Immaginiamo di ripetere il campionamento molte volte dalla stessa popolazione di organismi utilizzando lo stesso numero di repliche. Da ciascun campionamento otteniamo la stima di un valore di densità media della popolazione. Le medie non saranno esattamente uguali anche se i dati originano dalla stessa popolazione di organismi (quindi dalla stessa

Tab. 1 - Parametri comunemente stimati in studi ecologici e statistiche campionarie; x_i è il valore dell' i^{mo} campione ed n è il numero totale di campioni.

Parametro	Statistica	Formula
Media (μ)	\bar{x}	$\sum_{i=1}^n x_i/n$
Varianza (σ^2)	S^2	$\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2/(n-1)$
Deviazione standard (σ)	S	$\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2/(n-1)}$
Errore standard di \bar{x} ($\sigma_{\bar{x}}$)	$S_{\bar{x}}$	S/\sqrt{n}
Intervallo di confidenza al 95% di μ		$\bar{x} - t_{0,05}(s/\sqrt{n}) \leq \mu \leq \bar{x} + t_{0,05}(s/\sqrt{n})$

distribuzione di frequenza della variabile), perché il campionamento è casuale. Ogni volta stimiamo la media dai dati e l'insieme dei valori così ottenuti definisce una distribuzione di frequenza di medie campionarie. L'errore standard è la deviazione standard di questa distribuzione. Raramente nella pratica quotidiana abbiamo risorse sufficienti per generare distribuzioni di medie campionarie ricampionando più volte la stessa popolazione. L'errore standard viene invece stimato dal singolo campione e fornisce informazioni sulla variabilità intorno alla media campionaria. Si chiama "errore" in quanto ci dice quanto la media del campione (\bar{x}) è adeguata per stimare la media dell'intera popolazione (μ). Valori elevati di errore standard indicano che un campionamento ripetuto genererebbe medie tra loro molto dissimili (cioè imprecise), per cui la media stimata da ciascun campione di dati (incluso il campione di fatto in esame) non sarà una buona stima della media vera della popolazione. Se invece l'errore standard è basso, è probabile che un campionamento ripetuto dia luogo a valori simili di (\bar{x}) (elevata precisione), per cui ogni singola stima è con molta probabilità vicina al valore vero del parametro. Da ciò si evince che dati precisi sono generalmente anche accurati e che entrambi gli attributi possono essere incrementati aumentando il numero di repliche.

L'accuratezza di una stima campionaria, quale l'abbondanza media di una popolazione in un dato habitat oppure la varianza delle misure di abbondanza ad una particolare scala spaziale o temporale, è esprimibile anche in termini di intervallo di confidenza per il parametro stimato. Nel caso in cui la variabile misurata sia distribuita normalmente, l'intervallo di confidenza è calcolabile utilizzando le stime di parametri ottenute dai dati campionari ed una distribuzione di frequenza di riferimento. Ad esempio, l'intervallo di confidenza di una media campionaria per una variabile distribuita normalmente è calcolabile utilizzando la distribuzione t . In particolare si fa riferimento per convenzione a $t_{0,05}$, cioè al valore assoluto della distribuzione che include il 95% delle osservazioni. Altri valori di t possono comunque essere utilizzati per livelli di confidenza diversi. Intervalli di confidenza al 99% possono essere costruiti utilizzando $t_{0,01}$, cioè il valore assoluto che comprende il 99% dei valori della distribuzione. Per una trattazione più completa dell'argomento si rimanda a Burdick

e Graybrill (1992). Per variabili che non sono distribuite normalmente, invece, intervalli di confidenza possono essere ottenuti mediante procedure di ricampionamento (*bootstrap*) e simulazioni di Monte Carlo (Manly, 1991).

6.4 Scelta dell'unità di campionamento

La forma e la taglia dell'unità di campionamento influenzano l'accuratezza e la precisione delle stime, la percezione della realtà ecologica esaminata e l'efficienza del programma di studio.

Il criterio principale che influenza la scelta della forma geometrica dell'unità di campionamento è basato sulla possibile influenza di effetti margine. Forme geometriche diverse hanno un diverso rapporto perimetro/superficie secondo il seguente ordine: cerchio < quadrato < rettangolo. L'unità di campionamento circolare minimizza quindi gli effetti margine dovuti ad esempio alla incertezza di stabilire se un organismo si trova dentro oppure fuori l'unità di campionamento (Krebs, 1999). Tuttavia, la forma geometrica più comunemente utilizzata sui fondi duri è il quadrato.

La taglia dell'unità di campionamento dovrebbe essere scelta in relazione alla taglia degli organismi da campionare, alla loro organizzazione spaziale ed ai costi di realizzazione di un programma di campionamento.

Unità di campionamento di taglia troppo piccola rispetto agli organismi forniscono dati ecologicamente insignificanti. In casi limite, arriverebbero a generare due soli possibili valori, 0 e 1, che darebbero informazioni solo sulla presenza o assenza dell'organismo ma non sulla sua densità; al contrario, una taglia troppo grande rispetto alla scala di aggregazione degli organismi maschererebbe tale modalità distributiva (Fig. 2).

La taglia dell'unità di campionamento influenza anche le misure di associazione tra specie, conducendo addirittura a risultati opposti: la relazione potrebbe risultare di

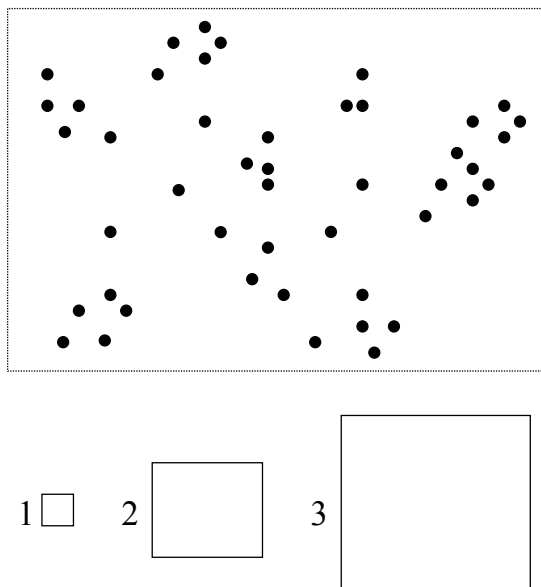


Fig. 2 - Relazione tra taglia dell'unità di campionamento e distribuzione di organismi. Lo schema illustra un'ipotetica popolazione di organismi in una chiazza di habitat e tre possibili taglie dell'unità di campionamento. Il campionamento mediante il quadrato di taglia 1 genererebbe due soli possibili valori di densità: 0 e 1. Il quadrato 3 è invece troppo grande rispetto alla scala di aggregazione degli organismi. Il quadrato 2 risulta di taglia adeguata.

tipo negativo con unità di campionamento troppo piccole, di tipo positivo con unità troppo grandi (Fig. 3).

In generale, considerazioni relative alle dimensioni degli organismi dettano la soglia minima relativa alla taglia dell'unità di campionamento. La conoscenza della storia naturale degli organismi studiati è di estrema importanza, in quanto fornisce la base conoscitiva per anticipare la grana ambientale a cui gli organismi verosimil-

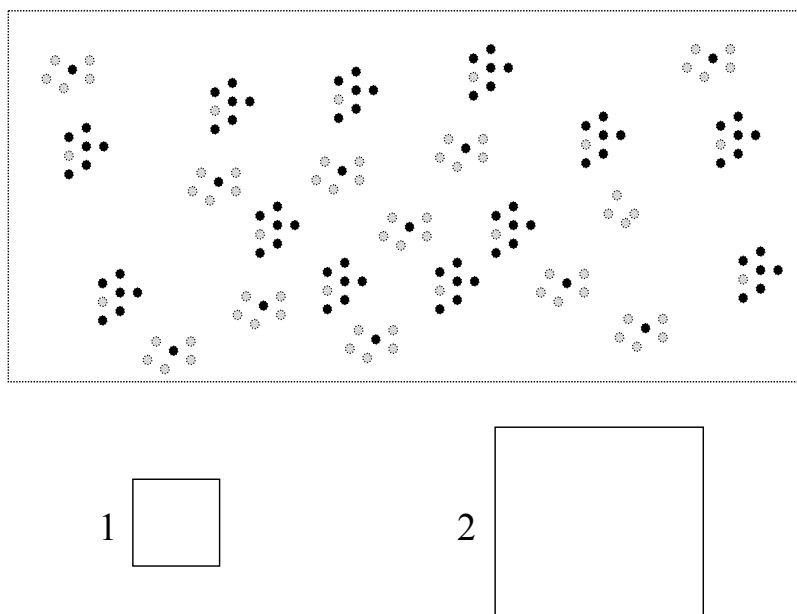


Fig. 3 - Relazione tra taglia dell'unità di campionamento e associazione tra due specie. Lo schema illustra due ipotetiche specie in una chiazza di habitat e due possibili taglie dell'unità di campionamento. La relazione tra le due specie risulta negativa se il campionamento viene condotto utilizzando unità di taglia 1, mentre risulta positiva se si utilizza l'unità di taglia 2.

mente rispondono. Identificare la taglia più appropriata richiede indagini specifiche di ottimizzazione. L'obiettivo è quello di definire una procedura di campionamento efficiente, dove l'efficienza è definita come il costo (in termini di tempo oppure di denaro) per ottenere un livello di precisione desiderato.

6.4.1 Area minima

Un aspetto particolare del problema della taglia dell'unità di campionamento riguarda la relazione tra numero di specie ed area campionata. La minima area in grado di contenere un numero rappresentativo di specie di un popolamento può essere valutata attraverso l'esame delle curve area-specie, curve che definiscono il numero di specie in funzione della superficie campionata. La taglia dell'unità di campionamento oltre la quale ulteriori incrementi di superficie non generano incrementi significativi nel numero di specie viene indicata come l'area minima per il popolamento in esame.

Il problema dell'area minima è di natura essenzialmente pratica e riguarda ancora una volta l'analisi costi-benefici tra quantità di informazione ottenuta e sforzo di cam-

pionamento (Fig. 4): quest'ultimo può essere espresso, oltre che come area, come numero di prelievi (Morri *et al.*, 1999) o in altri modi (Bianchi, 2002).

Per quanto riguarda la ricerca marina mediterranea, lo studio dell'area minima è stato affrontato inizialmente nel caso dei popolamenti algali (Boudouresque e Belsher, 1979) con due tipi di metodologie diverse: prelievi su piccole superfici uguali e contigue, e prelievi su superfici embricate via via crescenti.

Esperienze condotte su popolamenti animali (Weinberg, 1978) hanno portato a risultati molto diversi in termini di area minima, anche se molti autori si sono orientati, almeno nel caso di prelievi distruttivi, verso quadrati di 20 cm di lato (Bellan-

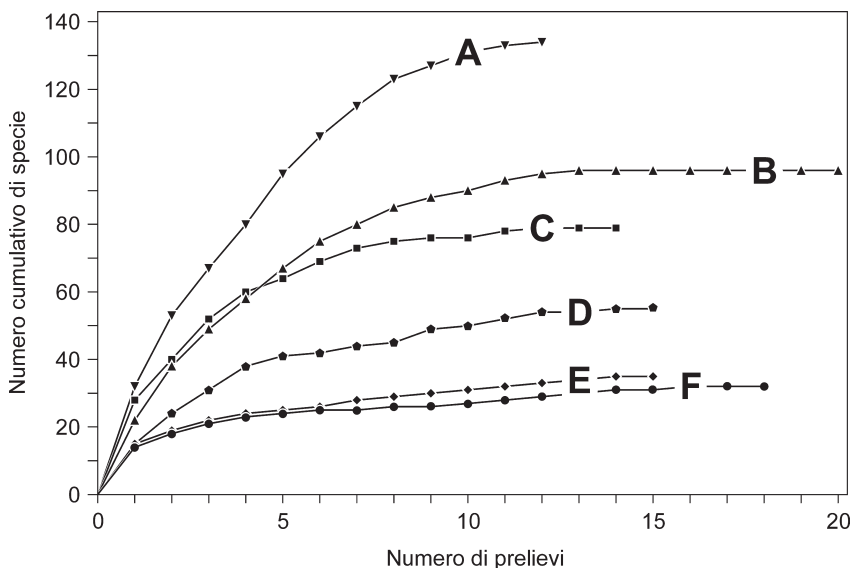


Fig. 4 - Esempio di stima dell'area minima per un popolamento di epifauna sessile di fondo roccioso ottenuto per cumulo di prelievi tramite grattaggio in 6 diverse stazioni (A-F): in questo esempio, la stazione più ricca (A) richiede non meno di 10 prelievi per un campionamento rappresentativo della biodiversità della sua epifauna sessile.

Santini, 1969). Si tratta, ad ogni modo, di una soluzione di compromesso: non esiste una taglia dell'unità di campionamento che possa essere raccomandata universalmente. La taglia dell'unità dipende dalla natura e dagli obiettivi del programma di indagine ed in particolare dall'entità degli effetti che si ritiene importante rilevare, dalla variabilità intrinseca delle popolazioni studiate e dalle risorse a disposizione.

6.5 Descrittori numerici

Nello studio dei popolamenti dei fondi duri, si incontrano caratteristiche difficoltà nel valutare l'importanza quantitativa degli organismi, legate soprattutto alla difficoltà di unificare su una stessa scala e di comparare dati numerici relativi sia ad organismi unitari sia ad organismi modulari (Morri e Bianchi, 1983; Bianchi *et al.*, 1989).

6.5.1 Valutazioni qualitative e quantitative

Nel caso più semplice ci si può limitare a rilevare la presenza o l'assenza di una determinata specie dal sito investigato. Si parla in questo caso di rilevamento qualitativo, il cui risultato sarà fondamentalmente una tabella in cui la presenza della specie è contrassegnata da 1, l'assenza da 0.

Spesso, tuttavia, è necessario affiancare la presenza della specie con una stima della sua quantità e si opererà quindi un rilevamento quantitativo. La quantità (o numerosità) di una specie può essere espressa con parametri differenti, a seconda degli scopi dello studio, o delle sue caratteristiche intrinseche.

6.5.1.1 Biomassa e biovolume

La biomassa rappresenta la quantità di sostanza organica per unità di superficie; in determinati contesti applicativi vengono talvolta utilizzati i termini inglesi *standing crop* (per risorse vegetali) o *standing stock* (per risorse animali). La biomassa può essere rappresentata in vari modi (peso fresco, peso secco, peso secco privo di ceneri, contenuto energetico), ma tutti richiedono il prelievo, comportano la perdita del campione e sono in genere piuttosto laboriosi (Palmerini e Bianchi, 1994). La misura della biomassa è fondamentale quando si voglia studiare il flusso energetico della comunità. Quando però si vogliono caratterizzare i popolamenti dal punto di vista dell'occupazione del substrato, alla biomassa può essere preferibile il biovolume, cioè la quantità di spazio occupata dagli organismi. La misura del biovolume in campo è laboriosa e poco precisa: può essere effettuata con misure biometriche nelle tre dimensioni o con fotografie, successivamente elaborate al computer. La misura in laboratorio richiede il prelievo degli organismi, ma presenta diversi vantaggi: non comporta la perdita del campione e, se effettuata per immersione e spostamento del livello dell'acqua in cilindri graduati, combina semplicità operativa e precisione. Biomassa e biovolume permettono di comparare su una stessa scala organismi unitari e modulari (vedi anche Cap. 10).

6.5.1.2 Abbondanza e densità

La misura dell'abbondanza richiede il conteggio di tutti gli esemplari di una determinata specie. Qualora sia riferita ad una superficie nota può essere trasformata in densità, che rappresenta appunto il numero di esemplari per unità di superficie. Il conteggio è in teoria un metodo molto preciso e può essere effettuato abbastanza agevolmente, ma ha lo svantaggio di richiedere molto tempo. Inoltre, può essere applicato solo ad organismi unitari e non ad alghe ed animali coloniali, che tendono a formare tappeti più o meno continui: questa limitazione è cruciale nello studio del benthos sessile, in cui alghe e fauna coloniale rappresentano spesso i maggiori costituenti del popolamento. Anche nel caso di organismi unitari, tuttavia, il conteggio degli individui si rivela di fatto impossibile nel caso di specie gregarie e molto numerose (serpuloidei, cirripedi, ecc.), con individui insediati l'uno sull'altro in strati sovrapposti o in grappoli inestricabili. È invece il metodo più adatto per la fauna vagile.

6.5.1.3 Copertura e ricoprimento

Copertura e ricoprimento sono spesso utilizzati interscambiabilmente, ma in realtà sono due grandezze differenti. La copertura è un attributo del fondale e rappresenta la proporzione di substrato non nuda, vale a dire coperta da un insediamento biotico; per definizione, non può mai essere superiore al 100%. Il ricoprimento è invece un attributo degli organismi, ed esprime la porzione di substrato ricoperta in proiezione

da ogni singola specie (Boudouresque, 1971). Il ricoprimento è correntemente utilizzato per le alghe ed è applicabile anche ad animali sia solitari sia coloniali. Si può esprimere come misura assoluta di superficie, ma solitamente si preferisce esprimerlo in percentuale. Non è adatto per la fauna vagile.

Un limite del ricoprimento è che considera la percentuale di substrato occupata in proiezione dalla specie ma non il suo sviluppo tridimensionale. Il fatto che il ricoprimento totale possa superare il 100%, in presenza ad esempio di epibiosi o di popolamenti pluristratificati (Boudouresque, 1971), ovvia solo in parte a questo problema.

6.5.1.4 Frequenza

Un altro metodo che permette l'unificazione su una stessa scala di organismi unitari e modulari è rappresentato dal computo della frequenza delle specie all'interno di un grigliato di riferimento (Bianchi *et al.*, 1991). Ad esempio, se si appoggia al substrato un reticolo formato da 25 quadrati di 20×20 cm, si può rapidamente contare in quanti di questi quadrati compare una determinata specie, indipendentemente dalla quantità con cui di fatto essa compare all'interno di ogni quadrato; se ad esempio la specie è presente in 4 quadrati si può affermare che la sua frequenza è $4/25$, cioè 0,16. La misura della frequenza associa rapidità a precisione di stima quantitativa, e si applica indifferentemente ad organismi unitari o modulari sessili: non è invece adatta per la fauna vagile. La frequenza rappresenta una stima rapida e precisa: deve però essere ben chiaro che la frequenza non è confrontabile né con un'abbondanza né con un ricoprimento (Fig. 5). Tuttavia, quando si usa un grigliato molto fitto, con numerosi piccoli quadrati, il computo della frequenza tende a convergere verso una misura di ricoprimento (Foster *et al.*, 1991; Meese e Tomich, 1992).

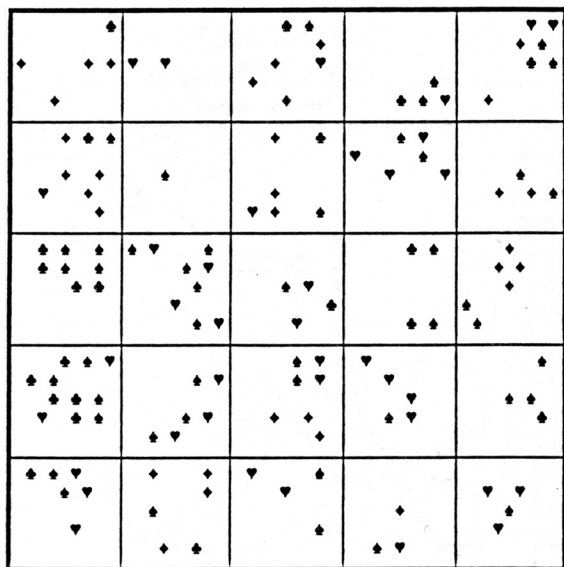


Fig. 5 - Esempio di rilevamento quantitativo su fondi duri utilizzando un quadrato di 1 m di lato.

♥, ♦, ♣, e ♠ sono 4 specie sessili le cui quantità possono essere stimate nei modi seguenti:

	Abbondanza	Densità	Ricoprimento	Frequenza
Specie ♥	38	$38 \cdot m^{-2}$	2.5 %	0,68 (17/25)
Specie ♦	32	$32 \cdot m^{-2}$	2.1 %	0,40 (10/25)
Specie ♣	21	$21 \cdot m^{-2}$	1.4 %	0,52 (13/25)
Specie ♠	46	$46 \cdot m^{-2}$	3.1 %	0,88 (22/25)

La misura della frequenza è applicabile essenzialmente al caso di rilevamenti *in situ*: la disposizione spaziale degli organismi va distrutta con l'asportazione del campione dal substrato e quindi è impossibile valutare la frequenza a *posteriori*. Anche nel caso della frequenza, inoltre, la presenza di organismi di grande mole e/o disposti su più strati rende la valutazione insoddisfacente.

6.5.2 Valutazioni semi-quantitative

La quantità delle specie può essere grossolanamente stimata in maniera semi-quantitativa, ad esempio mediante indici di vario tipo (Boudouresque, 1971; Hiscock, 1987). Il vantaggio del metodo è l'estrema rapidità, comparabile a quella delle osservazioni puramente qualitative. Una stima semi-quantitativa è talvolta sufficiente alla caratterizzazione di un popolamento. Attributi descrittivi immediati, quali "scarso", "abbondante", "molto abbondante", possono essere trasformati in indici con valore 1, 2, e 3 rispettivamente (l'assenza vale naturalmente 0): esistono tecniche statistiche adeguate applicabili a simili indici con risultati del tutto soddisfacenti.

6.6 Metodi di campionamento

Nel loro classico manuale di bionomia bentica mediterranea, Pérès e Picard (1964) affermano che con l'immersione subacquea è possibile un lavoro utile fino a circa 50 m di profondità e sostengono che il vantaggio precipuo di questa tecnica è quello di poter combinare rilevamenti fisionomici speditivi su superfici relativamente vaste con campionamenti puntiformi esaustivi, effettuati con metodi distruttivi (prelievo) o non distruttivi (visuali e fotografici). Ognuno di questi metodi ha vantaggi e svantaggi (Tab. 2) e solo la loro integrazione permette il raggiungimento di risultati completi (Zabala *et al.*, 1982; Ros e Gili, 1984).

I metodi qui presentati riguardano essenzialmente l'epibenthos. Viene evidenziato, ogniqualvolta opportuno, quando le tecniche esposte sono più indicate per gli organismi sessili o per la piccola fauna vagile; per la fauna vagile di grandi dimensioni (crostacei decapodi, molti echinodermi) vanno applicate procedure specifiche: alcuni esempi si possono trovare in Kingsford e Battershill (1998). Lo studio dell'endobenthos perforante richiede tecniche specifiche alle quali è espressamente dedicato un paragrafo di questo Capitolo.

Tab. 2 - Confronto tra tre comuni metodi di campionamento subacqueo dei popolamenti bentici di fondo duro.

CAMPIONAMENTO PER PRELIEVO DIRETTO

Vantaggi	Tassonomia accurata. Valutazioni obiettive. Collezione di riferimento.
Svantaggi	Costo elevato. Lentezza. Laboriosità. Necessità di specialisti. Area di campionamento piccola. Impatto distruttivo sull'ecosistema.
Impiego	Studi approfonditi con importante base sistematica.

CAMPIONAMENTO FOTOGRAFICO O VIDEO

Vantaggi	Valutazioni obiettive. Ripetibilità. Collezione di riferimento. Possibilità di automazione. Rapidità di lavoro sott'acqua. Ampia area di campionamento. Impatto nullo sull'ecosistema.
Svantaggi	Scarsa precisione tassonomica. Difficoltà di lettura ed interpretazione dell'immagine a posteriori.
Impiego	Studi di cicli o variazioni temporali. Lavori a profondità elevate.

CAMPIONAMENTO VISIVO

Vantaggi	Basso costo. Immediatezza dei risultati. Vasta area di campionamento. Ripetibilità. Impatto nullo sull'ecosistema.
Svantaggi	Rischio di soggettività nella tassonomia. Lentezza di lavoro sott'acqua.
Impiego	Ricerche preliminari. Indagini esplorative. Valutazioni di differenze. Studi bionomici.

6.6.1 Metodi di prelievo diretto

Obiettivi

Caratteristica comune dei metodi di campionamento diretto è quella di comportare il prelievo degli organismi che possono essere quindi portati in laboratorio ed analizzati in grande dettaglio. I principali metodi di prelievo di organismi sui fondi duri sono essenzialmente due: il grattaggio e la sorbona. Entrambi permettono prelievi quantitativi su superfici fisse prestabilite.

6.6.1.1 Grattaggio

Materiali ed equipaggiamenti necessari

I mezzi e gli strumenti impiegati per il grattaggio sono generalmente di estrema semplicità. Generalmente si ricorre all'uso, a seconda del tipo di substrato e degli organismi da prelevare, di coltelli, raschietti, piccozzette ("maleppeggio") ed altri utensili. L'uso di uno scalpello e di un mazzuolo è raccomandato per un campionamento accurato. Stante la densità dell'acqua, il mazzuolo deve essere di peso adeguato (2-4 kg). Per raccogliere il materiale campionato si utilizza un robusto sacchetto di tela o di plastica (polietilene) o anche di tessuto da zooplancton (con maglia comunque non superiore a 400 μm). Una cornice quadrata di metallo (in genere alluminio) o PVC può essere utile per delimitare la superficie da campionare.

Metodo di campionamento

La tecnica consiste nell'asportazione di tutto il popolamento presente sulla superficie di campionamento prefissata. Tipicamente, per eseguire un grattaggio è necessaria la collaborazione di due sommozzatori, uno dei quali tiene il sacchetto (e a volte anche la cornice), guidando la caduta del materiale al suo interno, mentre l'altro provvede al grattaggio della roccia con mazzuolo e scalpello (Fig. 6). È utile che quest'ultimo regoli il ritmo del proprio respiro con quello delle martellate, in modo che il



Fig. 6 - Esecuzione di un campionamento su una parete rocciosa tramite grattaggio con martello e scalpello (notare il paramano di gomma su quest'ultimo); il materiale staccato dalla roccia viene fatto cadere in un sacchetto di polietilene.

mazzuolo venga calato nelle fasi di espirazione: in questo modo si imprime maggiore efficacia al colpo. Un utile accorgimento è anche quello di delimitare inizialmente con lo scalpello il contorno dell'area da asportare, in modo da poter togliere il quadrato di riferimento, soprattutto nel caso di superfici verticali o sub-verticali.

Problematiche e consigli pratici

La tecnica del grattamento fornisce ottimi risultati per la flora e per la fauna sessile o sedentaria, mentre la fauna vagile può facilmente sfuggire (Abbiati, 1991). È di facile applicazione quando si opera al di sotto della profondità di 3-4 m; al di sopra di tali quote è possibile fare campionamenti solo in condizioni di mare calmo, altrimenti le perdite di materiale invaliderebbero la raccolta.

Per migliorare l'efficacia degli strumenti manuali sono stati anche utilizzati dispositivi ad aria compressa (trapani e scalpelli) ma essi, salvo casi particolari, non hanno fornito buoni risultati poiché non consentono di operare con la necessaria delicatezza e precisione.

Per limitare le possibilità di fuga della fauna vagile, sono stati anche adottati dispositivi appositamente costruiti che racchiudono sotto una specie di cappa trasparente la superficie da campionare. L'operazione di distacco del materiale viene poi compiuta manualmente, con guanti a manicotto, o con un più elaborato sistema di aspirazione funzionante con il principio della sorbona (Finnish IBP-PM Group, 1969). Un inconveniente di questi dispositivi è di essere ingombranti e complessi, ed essi non hanno grande diffusione. Nel caso di campionamento in ambienti oscuri (es., grotte o campionamenti notturni) è opportuno che gli operatori indossino caschi da speleologia subacquea con annesse le fonti luminose, in modo da avere le mani libere.

6.6.1.2 Sorbona

Materiali ed equipaggiamenti necessari

Quadrato di riferimento in metallo o PVC, sorbona con tubo in PVC, plexiglas o metallo; retini di tela, rete da zooplankton, o anche calze di nylon; 1° stadio di erogatore collegato ad un tubo di plastica telata (frusta) di lunghezza adeguata (4-5 m circa), bombola subacquea supplementare dedicata all'uso della sorbona.

Metodo di campionamento

La sorbona è costituita da un tubo rigido, generalmente in PVC o plexiglas (più raramente di acciaio inox), collegato attraverso una frusta ed un riduttore di pressione (primo stadio di erogatore) ad una bombola di aria compressa (Fig. 7).

Pur essendo con diametro e lunghezza variabile a seconda del tipo di substrato di campionamento e del tipo di organismi da raccogliere, la sorbona viene solitamente costruita con una lunghezza di circa 80-100 cm ed un diametro interno di 5-8 cm (Benson, 1989).

Uno strumento molto maneggevole ed idoneo, ideato per i fondi duri ma utilizzato anche nell'ambito dei sistemi a fanerogame marine (vedi anche Cap. 5 di questo Manuale) è stato proposto da Giangrande *et al.* (1986). L'ingresso dell'area compressa nella sorbona è ottenuto mediante un ugello, generalmente a "becco d'anatra", collegato attraverso una frusta a pressione ad un primo stadio di erogatore (regolato a 3-4 bar), a sua volta fissato ad una bombola ad aria compressa. All'estremità opposta a quella aspirante viene legato un sacchetto di rete di nylon

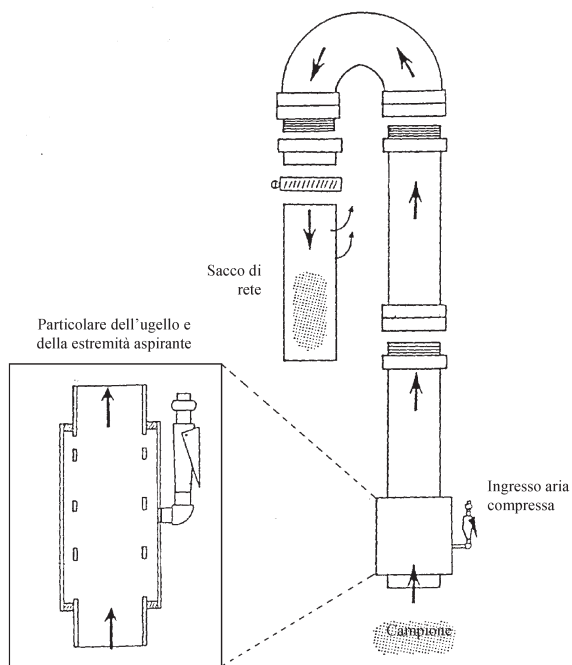


Fig. 7 - Schema esemplificativo di una sorbona ad aria (modificato da Benson, 1989).

cura di aprire il flusso d'aria lontano dal substrato per evitare colpi di riflusso, il suo passaggio su tutta la vegetazione.

con luce di maglia variabile in relazione al tipo di organismi che si vogliono campionare (generalmente 400 μ m).

Il funzionamento dello strumento è molto semplice e sfrutta la depressione che si crea all'interno della sorbona dovuta alla trazione verticale dell'aria che si espande verso la superficie. Questa depressione trascina all'interno del tubo la maggior parte della fauna fitale a rapido riflesso di caduta o molto vagile che viene trattenuta nel sacchetto di rete posto all'estremità superiore dello strumento (Fig. 8).

Il metodo, che normalmente viene impiegato sui substrati duri a prevalente copertura vegetale, prevede la delimitazione dell'area di campionamento mediante un quadrato di superficie nota, il posizionamento della sorbona e, avendo

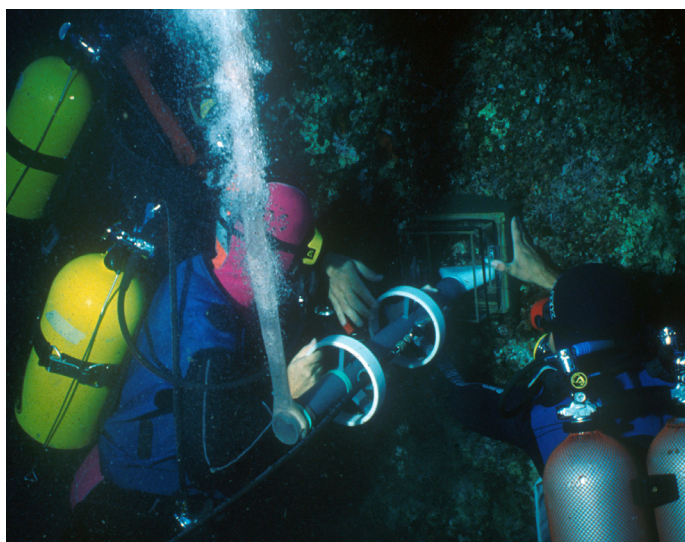


Fig. 8 - Una fase dell'utilizzo di una sorbona per un campionamento su una parete rocciosa.

Al termine di questa prima fase si procede con l'asportazione delle macrofite (eventualmente da conservare in un sacchetto a parte) e con un'ulteriore sorbonata per la raccolta della fauna vagile caduta dalle alghe sul substrato.

Problematiche e consigli pratici

La sorbona è uno strumento generalmente efficace su superfici orizzontali o sub-orizzontali (massimo con 45-50° di pendenza) e a profondità superiori alla sua lunghezza.

Tra gli svantaggi sono da enumerare sia la relativa lentezza di esecuzione del campionamento sia l'ingombro delle attrezzature, che prevedono una bombola in più e la sorbona stessa. Tra i vantaggi, invece, è da evidenziare una raccolta più efficace della fauna vagile (Giangrande *et al.*, 1986; Gambi *et al.*, 2003).

L'uso della sorbona può essere integrato con il grattaggio, per la raccolta sia della componente sessile sia di quella vagile. Si effettua dapprima un prelievo con sorbona, seguita dall'asportazione delle macroalghe sino a denudare il substrato (facendo attenzione a non danneggiare i dischi basali delle macroalghe, utili spesso per la determinazione specifica in laboratorio).

Si procede successivamente al grattaggio completo, con mazzuolo e scalpello, della copertura biologica dal substrato fino al raggiungimento della sottostante roccia madre e prelievo selettivo di eventuali forme endobionti. Infine, si dà una passata finale con la sorbona con lo scopo di raccogliere tutto il materiale asportato, anche il più fine, ed animali eventualmente sfuggiti al prelievo.

Nel caso in cui si debba operare in sospensione e su pareti verticali o sub-verticali, si consiglia di legare la bombola della sorbona e lo strumento stesso ad un gavitello con cima di lunghezza corrispondente alla quota operativa. Anche nel caso della sorbona, per campionamenti notturni o in grotta si consiglia l'uso di caschi da speleologia subacquea muniti di illuminatori.

6.6.1.3 Trattamento dei campioni in laboratorio

Sui prelievi ottenuti da grattaggio o da sorbona, in laboratorio viene effettuata la cernita (*sorting*), cioè la separazione degli organismi per specie o almeno, preliminarmente, per grandi taxa. È utile fare questa operazione, quando possibile, sul materiale fresco, prima della fissazione.

Effettuare la cernita con gli organismi ancora vivi è importante soprattutto per la fauna vagile. Il campione viene adagiato in una vaschetta contenente acqua di mare e lasciato indisturbato per alcune ore, anche per una notte intera. Col degradarsi della qualità del mezzo acquoso (nel caso si può coprire la vaschetta in modo da accelerare il processo di ipossia), la fauna vagile nascosta tra gli interstizi dei frammenti di substrato o tra le fronde algali emerge, e può quindi essere facilmente raccolta con la pinzetta, o risciacquando il campione e filtrandolo con setacci fini (luce di maglia possibilmente non superiore a 400 µm). Il materiale viene successivamente smistato in provette o in barattolini.

Quando non è possibile lavorare sul materiale fresco, i campioni devono essere fissati in formalina al 10% in acqua di mare ben neutralizzata, ad esempio con borace: l'uso di formalina non neutralizzata danneggia le strutture esoscheletriche di molti organismi, spesso necessarie per il riconoscimento delle specie. Al momento della cernita, il campione deve essere posto in una bacinella ed abbondantemente sciacquato in acqua corrente, facendo in modo che l'eventuale fauna vagile portata

via dal flusso ricada in un setaccio (con luce di maglia sempre non superiore a 400 µm) sottostante.

Il materiale raccolto dal setaccio viene poi trasferito in una vaschetta. Le operazioni procedono esaminando sotto una lente luminosa da tavolo o uno stereomicroscopio da dissezione sia la bacinella del campione sia la vaschetta della fauna vagile, separando e raccogliendo manualmente i singoli organismi. È necessario rompere delicatamente gli eventuali blocchi di concrezione e frugare accuratamente tra le fronde algali per recuperare tutta la fauna vagile.

Nel corso dell'analisi dei campioni, freschi o fissati che siano, le alghe e la fauna sessile (ivi compresi gli epifiti) vanno distaccati dal substrato con estrema attenzione, utilizzando bisturi e scalpellini da laboratorio. Nel caso di specie incrostanti, è talvolta necessario tenere anche un pezzo del substrato, perché il tentativo di distacco potrebbe comportare la distruzione dell'organismo.

Le diverse specie (o *taxa* superiori) smistate vanno conservate in barattolini di dimensioni adeguate in un liquido appropriato (alcol al 70% per organismi con strutture calcaree, formalina neutra al 4% per organismi a corpo molle) fino alla loro completa determinazione ed enumerazione. Eventuali collezioni di riferimento potranno essere mantenute in alcol.

Le operazioni sopra menzionate sono descritte con maggiore dettaglio anche nel Cap. 4 di questo Manuale.

6.6.2 Metodi fotografici e visivi

Obiettivi

Si tratta di metodi definiti non distruttivi, in quanto non comportano il prelievo degli organismi: i campioni sono in questi casi costituiti da fotografie o registrazioni video, oppure da inventari e conteggi effettuati direttamente in immersione con censimento visivo.

Per quanto riguarda il primo metodo, la fotografia vanta una tradizione d'uso ed una standardizzazione operativa molto maggiore del video, che ha cominciato ad essere usato solo in tempi recenti e più a scopo di documentazione e esplorazione che di vero e proprio rilevamento (George *et al.*, 1985). Il secondo metodo richiede un censimento visivo (*visual census*) e comporta il riconoscimento degli organismi sott'acqua: può pertanto essere effettuato solo da sommozzatori scientifici esperti.

6.6.2.1 Rilevamento fotografico

Materiali ed equipaggiamenti necessari

Macchina fotografica stagna o scafandrata, flash subacquei, obiettivi macro o grandangolari per particolari esigenze, quadrati o cornici di riferimento, rullini fotografici, videocamera o cinepresa subacquea, nastri video.

Metodo di campionamento

Il rilevamento fotografico sui fondi duri consiste nel fotografare una superficie definita, solitamente delimitata da una cornice che funge da riquadratore, garantendo il parallelismo della pellicola rispetto al fondale tramite un distanziale rigido.

Per piccole superfici vengono utilizzati tubi di prolunga (macrofotografia). Per

superfici comprese tra 70 cm² e 400 cm² vengono impiegati sistemi *close-up*, eventualmente con lenti addizionali: il sistema Nikonos, purtroppo attualmente fuori produzione, è tuttora il più utilizzato (Tab. 3). Per superfici più ampie, fino a circa 1 m² (Fig. 9), può essere preferibile utilizzare un obiettivo grandangolare; in questo caso, il flash deve essere dotato di diffusore onde evitare discrepanza di illuminazione (e

Obiettivo	Superficie campionata
UW Nikkor 80 mm	7 × 10 cm
Nikkor 35 mm	13 × 19 cm
Nikkor 28 mm	16 × 24 cm

Tab. 3 - Superfici rilevabili, in funzione di diversi obiettivi, con fotocamera della serie Nikonos e complesso macro originale.

differente leggibilità) tra centro e bordi dell'immagine. È sempre consigliabile l'uso di due flash subacquei amovibili montati su staffa di cui uno adibito a servoflash. Per fotografie effettuate a circa 1 m di distanza, la distorsione sferica dovuta all'uso del grandangolo è trascurabile (Sgorbini *et al.*, 1996).

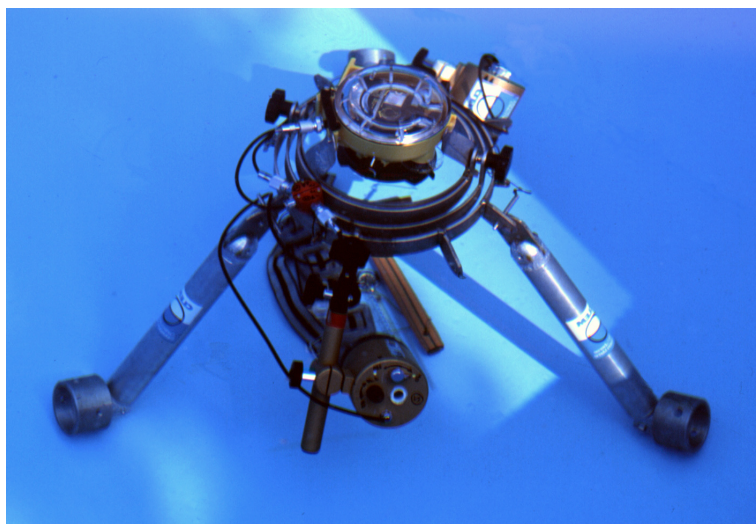


Fig. 9 - Apparato per rilevamento fotografico subacqueo *time-lapse*.

Nel caso si volesse costruire un distanziale *ad hoc*, le misure dei lati *a* e *b* del campo inquadrato (nel formato 24 (36 mm) si possono calcolare con le seguenti formule:

$$a = 0,56 \times 2d \times \text{tg}\alpha/2 \quad b = 0,83 \times 2d \times \text{tg}\alpha/2,$$

dove *d* = distanza di ripresa misurata dal piano della pellicola, e α = angolo di ripresa in acqua dell'obiettivo (per gli obiettivi Nikkor: 35 mm → 46,5°; 28 mm → 59°; 15 mm → 94°).

La distanza focale deve essere regolata su infinito o sul minimo a seconda del mezzo utilizzato (*close-up*, lenti o tubi di prolunga) e della casa costruttrice. È consigliabile lavorare in modalità automatica in maniera che la potenza del lampo sia proporzionale alla luce riflessa dal soggetto. Il diaframma dell'obiettivo va impostato

sull'apertura minima possibile in relazione alla potenza dei mezzi di illuminazione (in genere tra 16 e 22).

Problematiche e consigli pratici

Oltre che a scopo di documentazione, la fotografia subacquea trova ampie applicazioni nella valutazione delle modalità di distribuzione spaziale e/o di evoluzione temporale di popolazioni e/o popolamenti (Pronzato, 1997). Per quanto riguarda la distribuzione spaziale, il rilevamento fotografico subacqueo permette di raccogliere informazioni sia sulla densità di singole specie sia sulla struttura di comunità. Per lo studio di serie temporali, possono essere programmate serie crono-fotografiche su postazioni fisse: le informazioni ottenute vanno dalle variazioni individuali (cicli biologici, evoluzione di patologie) alla dinamica di popolazione, e dalla colonizzazione del substrato allo sviluppo di comunità. Per serie temporali molto brevi, quando si vogliano studiare fenomeni che si svolgono nell'arco di alcune ore o ritmi circadiani, sono di particolare utilità le fotocamere *time-lapse* (Fig. 10): l'apparecchiatura realizzata da Cicogna e Pronzato (1985) rappresenta uno strumento semplice, economico e versatile, adatto ad operare in ambienti diversi in completa autonomia ed automatismo.

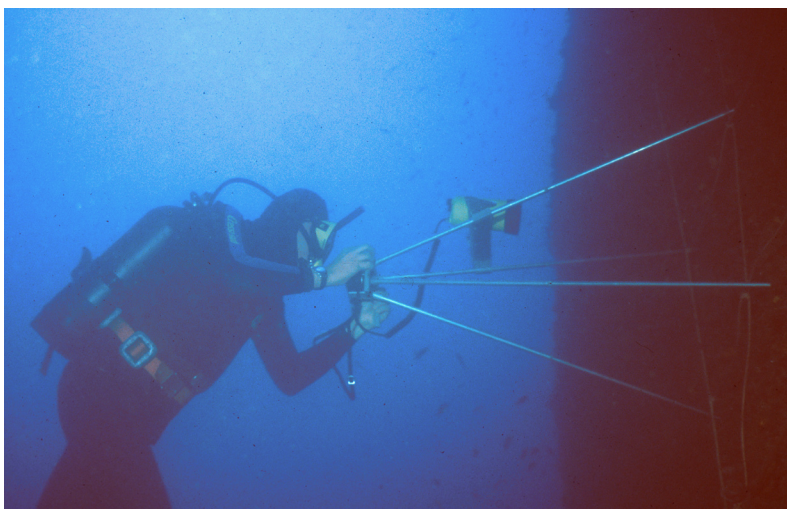


Fig. 10 - Esempio di campionamento fotografico del popolamento di una parete rocciosa con un sistema autocostruito di distanziale e riquadratore che permette di riprendere ad ogni scatto 1 m² di fondale.

L'equipaggiamento per il campionamento fotografico può essere assai diverso a seconda delle finalità ed in relazione alla torbidità dell'acqua e del minore o maggior sviluppo dello strato elevato del popolamento in esame. Attualmente sono disponibili fotocamere (e videocamere) digitali affidabili ed efficienti. La maggior parte delle applicazioni documentate in letteratura, però, riguarda l'uso di fotocamere 35 mm, stagne o scafandrate, munite di pellicole invertibili a colori di sensibilità compresa tra i 50 ed i 100 ISO.

Nel caso in cui con un unico rullino si debbano campionare più siti, è consigliabile frappare uno scatto di separazione tra la serie di campioni di un sito e quella del

successivo. Lo scatto di separazione può essere fatto sulla lavagnetta in cui saranno riportati tutti i dati relativi al campionamento.

In laboratorio, le diapositive possono essere analizzate al binoculare utilizzando un supporto che permetta di sovrapporre all'immagine una griglia regolare trasparente. Oppure si può proiettare l'immagine su uno schermo e sovrapporre la griglia. In casi specifici (ma le procedure sono più lunghe e laboriose) ci si può anche avvalere di *software* di analisi d'immagine come ad esempio NIH-image, liberamente scaricabile dalla rete ai siti <http://rsb.info.nih.gov/niH-image/> (versione per Macintosh) o al sito <http://www.scioncorp.com/> (versione per Windows).

6.6.2.2 Censimenti visivi

Nel corso del rilevamento con tecniche di censimento visivo, il sommozzatore scientifico rivolge tipicamente la propria attenzione alle cosiddette specie cospicue. Si tratta di specie non criptiche, di taglia sufficientemente grande da poter essere agevolmente riconosciute ed identificate in immersione e fisionomicamente vistose, in termini di abbondanza e/o biomassa e/o ricoprimento. È da tenere presente che l'elenco delle specie cospicue che si possono osservare nel corso di una immersione non può mai essere considerato in alcun modo alternativo (ma piuttosto complementare) dell'inventario floro-faunistico che si può ottenere solo attraverso un adeguato numero di prelievi diretti.

Le tecniche di censimento visivo si riducono sostanzialmente a due tipologie fondamentali: 1) rilevamento lungo un percorso stabilito (transetto); 2) rilevamento puntiforme in un sito specifico e ben delimitato da un'area di riferimento (quadrato). Entrambi i metodi derivano dalla pratica dell'ecologia terrestre e sono stati adattati all'ambiente marino senza sostanziali modifiche.

6.6.2.2.1 Transetti

Il significato primario della parola italiana "transetto" (cui corrisponde l'inglese *transept*) deriva dal latino *trans-* e *saepire* (recingere) e richiama un elemento architettonico trasversale all'asse principale di una chiesa.

Tuttavia, lo stesso termine, invalso ormai nell'uso scientifico corrente, viene usato per tradurre la parola inglese *transect*, derivante da *trans-* e *secare* (tagliare), con la doppia accezione di linea di riferimento di lunghezza definita, e di metodo di campionamento che usa tale linea.

Nello studio del bentos marino, la linea di riferimento consiste generalmente in una cima metrata, una bindella da cantiere o una catena, posta sul fondo, lungo la quale si contano e/o misurano gli organismi al di sotto, o in una fascia d'ampiezza definita ai due lati, della linea stessa.

Il transetto può essere utilizzato come pura linea di riferimento lungo cui posizionare altri strumenti di campionamento, ad esempio il quadrato; nelle tecniche di campionamento qui descritte, invece, il transetto rappresenta non solo la linea lungo la quale l'operatore subacqueo si muove per raccogliere i dati, ma anche lo strumento con il quale li raccoglie (Krebs, 1999).

L'orientamento del transetto rispetto alla linea di costa è un elemento importante da considerare secondo il tipo di studio da effettuare. Un transetto perpendicolare alla costa (Fig. 11), comunemente detto "transetto di profondità" (*depth transect*), massimizza la variabilità ambientale ed è adatto per studi bionomici mirati a descrivere la



Fig. 11 - Transetto di profondità (*depth transect*).

zonazione dei popolamenti (Bianchi *et al.*, 1991). Invece, un transetto posto parallelamente alla costa, e quindi a profondità costante, minimizza la variabilità ambientale e consente di studiare la composizione quali-quantitativa di un popolamento specifico (Loya, 1978).

La cima o altro materiale predisposto per definire il transetto (catena, bindella metrata, ecc.) deve essere stesa seguendo quanto più possibile il profilo del fondo alla profondità prefissata, avendo cura di assicurarne entrambe le estremità al substrato.

È preferibile evitare, o almeno limitare, gli effetti di possibili spostamenti dovuti alla corrente o ad altri movimenti d'acqua sulla posizione della cima stessa. A questo proposito possono rendersi utili piccoli ganci metallici, o cimette, o anche piccole zavorre (piombi da cintura) attaccati alle estremità della cima che s'intende usare.

Mentre un operatore stende la cima, un secondo registra sulla lavagnetta la profondità, l'inclinazione del substrato (in gradi rispetto all'orizzontale), l'esposizione (in gradi bussola), la direzione del transetto (in gradi bussola), ed altre osservazioni d'interesse.

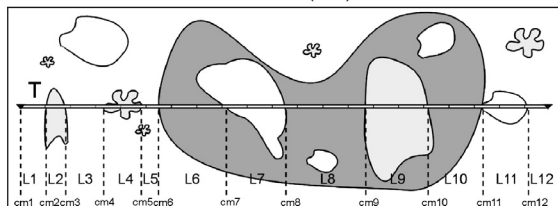
Vengono qui descritte le procedure relative a quattro diverse tipologie di transetto (Fig. 12 e Tab. 4), ognuna delle quali con finalità e caratteristiche differenti (Tab. 5).

Line Intercept Transect (LIT)

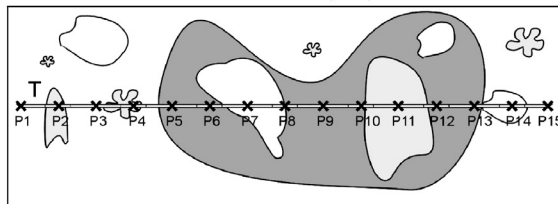
Materiali ed equipaggiamenti necessari

Cima metrata, o bindella da cantiere in *fiberglass*, profundimetro, bussola, clinometro, lavagnetta subacquea, matita, cimette, ganci, zavorre.

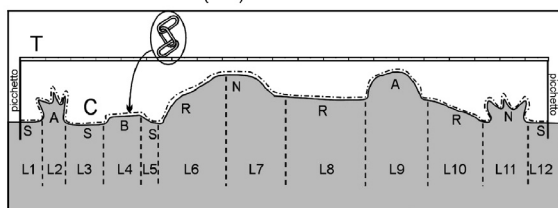
a) LINE INTERCEPT TRANSECT (LIT)



b) POINT INTERCEPT TRANSECT (PIT)



c) CHAIN TRANSECT (CT)



d) BELT TRANSECT (BT)

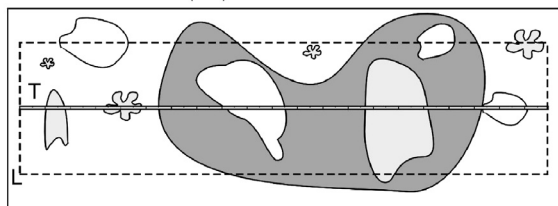


Fig. 12 - Rappresentazione schematica di diversi tipi di transetti. a) LIT (*Line Intercept Transect*); b) PIT (*Point Intercept Transect*); c) CT (*Chain Transect*); d) BT (*Belt Transect*). T = transetto; C = catena; W = ampiezza della fascia del BT. A, B, N = specie o forma di crescita; R = roccia; S = sabbia. L = lunghezza del segmento di cima (LIT) o catena (CT) che ricopre un organismo o un tratto di substrato; cm = intercetta al centimetro del nuovo organismo o substrato sotto la cima del LIT; P = punti progressivi del PIT.

Metodo di campionamento

Consiste nel registrare sulla lavagnetta l'intercetta al centimetro in ogni punto in cui cambia la categoria di organismo, o di substrato, sotto la cima (Fig. 12a). La lunghezza del transetto può variare a seconda degli scopi e del tipo di organismi o comunità che s'intende studiare. Le lunghezze più frequentemente utilizzate sono 10 m e 20 m (Rogers *et al.*, 1994; English *et al.*, 1997).

Problematiche e consigli pratici

La misura di ogni organismo (L) è la distanza tra le intercette registrate, e viene ricavata per differenza. Per calcolare il ricoprimento percentuale (r%) della specie (o della forma di crescita) x lungo un transetto di lunghezza T, si applica la formula:

Tab. 4 - Dati ottenuti nei diversi transetti in base all'esempio schematico rappresentato in Fig. 12.

LIT	Intercette	Lunghezza	Abbondanza
A	cm2 - cm3; cm9 - cm10	L2; L9	2
B	cm4 - cm5	L4	1
N	cm7 - cm8; cm11 - cm12	L7; L11	2
S	cm1 - cm2; cm3 - cm4; cm5 - cm6; cm12-T	L1; L3; L5; L12	1
R	cm6 - cm7; cm8 - cm9 cm10 - cm11	L6; L8; L10	1

PIT	Punti	-	-
A	P2, P11	-	-
B	P4	-	-
N	P7, P8, P14	-	-
S	P1, P3, P15	-	-
R	P5, P6, P9, P10, P12, P13	-	-

CT	Anelli della catena	Lunghezza	Abbondanza
A	n° anelli L2; n° anelli L9	L2; L9	2
B	n° anelli L4	L4	1
N	n° anelli L7; n° anelli L11	L7; L11	2
S	n° anelli L1; n° anelli L3; n° anelli L5; n° anelli L12	L1; L3; L5; L12	1
R	n° anelli L6; n° anelli L8; n° anelli L10	L6; L8; L10	1

BT	-	-	Abbondanza
A	-	-	2
B	-	-	4
N	-	-	4
S	-	-	1
R	-	-	1

Tab. 5 - Principali caratteristiche dei diversi metodi di effettuazione dei transetti.

	Tipo di dati	Vantaggi	Svantaggi
LIT	Abbondanza. Ricoprimento percentuale. Sequenza.	Basso costo. Ripetibilità.	Lentezza.
PIT	Frequenza. Ricoprimento percentuale.	Rapidità. Basso costo. Ripetibilità.	Non fornisce informazioni sull'abbondanza, sulla sequenza e sulle dimensioni degli organismi.
CT	Abbondanza. Frequenza. Ricoprimento percentuale. Sequenza. Indice di "rugosità" del substrato.	Basso costo. Ripetibilità. Unico metodo in grado di fornire informazioni sulla rugosità del substrato.	Laboriosità. Può essere distruttivo. Non adatto ad organismi piccoli (meno della metà dell'unità di campionamento, ovvero dell'anello della catena). Non adatto ad organismi fragili e/o con forme laminari o ramificate perpendicolari al substrato.
BT	Abbondanza. Densità.	Basso costo. Ripetibilità. Adatto ad organismi fragili e/o con forme laminari o ramificate perpendicolari al substrato.	Non consente di ricavare informazioni sul ricoprimento percentuale. Non adatto ad organismi con distribuzione aggregata su vaste superfici. Necessità di training di procedura per gli operatori per standardizzare la valutazione dell'ampiezza della fascia.

$$r_x\% = L_x/T \times 100$$

Per calcolare l'abbondanza di ogni categoria di organismi è utile annotare quando la cima vi passa sopra più di una volta lungo lo stesso transetto, indicando le diverse intercette con un numero sequenziale.

Point Intercept Transect (PIT)

Materiali ed equipaggiamenti necessari

Cima metrata, o bindella da cantiere in *fiberglass*, profondimetro, bussola, clinometro, lavagnetta subacquea, matita, cimette, ganci, zavorre.

Metodo di campionamento

A differenza del metodo precedente in cui i dati sono registrati in continuo, questo metodo prevede che sia identificato l'organismo, o il substrato, che si trova in corrispondenza di punti a distanza predeterminata lungo la cima (Fig. 12b).

Problematiche e consigli pratici

La percentuale di ricoprimento di x ($r_x\%$) si ottiene dividendo il numero di punti in corrispondenza dei quali è stato trovato (P_x) per il numero totale di punti di rilevamento lungo il transetto (P_{tot}):

$$r_x\% = P_x/P_{tot} \times 100$$

Il numero di punti deve essere stabilito in modo da fornire un buon compromesso tra velocità di campionamento e rappresentatività del campione, oltre che in base alla lunghezza della cima. Le distanze tra punti di rilevamento più frequentemente riportate in letteratura sono di 20-50 cm (Rogers *et al.*, 1994).

Chain Transect (CT)

Materiali ed equipaggiamenti necessari

Cima metrata, o bindella da cantiere in *fiberglass*, picchetti, catena zincata, profondimetro, bussola, clinometro, lavagnetta subacquea, matita, cimette, ganci, zavorre.

Metodo di campionamento

In questo caso la cima non deve essere stesa sul fondo, ma tesa tra due picchetti infissi nel fondale. Sul fondo, in corrispondenza della cima tesa, si appoggia una catena per tutta la lunghezza del transetto, avendo cura di seguire quanto più possibile il profilo del fondo e degli organismi con gli anelli della catena (Fig. 12c). È consigliabile l'uso di catene leggere e ovviamente di lunghezza maggiore rispetto alla cima.

Problematiche e consigli pratici

Contando lungo il transetto il numero degli anelli di lunghezza conosciuta si ottengono per i diversi organismi dati di copertura percentuale, abbondanza, sequenza

e si può calcolare un indice spaziale (IS) che fornisce informazioni sulla complessità strutturale, o “rugosità” del substrato, in base al rapporto tra la lunghezza della catena usata (C) e del transetto (T).

$$IS = C/T$$

La percentuale di ricoprimento di x ($r_x\%$) si ottiene dividendo il numero di anelli che lo ricoprono (A_x) per il numero totale di anelli della catena usata per coprire la distanza del transetto (A_{tot}):

$$r_x\% = A_x/A_{tot} \times 100$$

Belt Transect (BT)

Materiali ed equipaggiamenti necessari

Cima metrata, o bindella da cantiere in *fiberglass*, asticella di lunghezza adeguata, profundimetro, bussola, clinometro, lavagnetta subacquea, matita, cimette, ganci, zavorre.

Metodo di campionamento

Si usa la cima metrata come riferimento, e si contano gli organismi all'interno di una fascia di area definita ai lati di essa (Fig. 12d). L'ampiezza della fascia da considerare ai lati della cima è solitamente compresa tra 2 m e 5 m.

Problematiche e consigli pratici

Per eseguire il BT può essere utile, almeno per le prime volte, usare un oggetto (per esempio un'asticella) di lunghezza pari all'ampiezza della fascia (W), o a metà di essa, per familiarizzare con le distanze dalla cima (Fig. 13). Il BT consente di

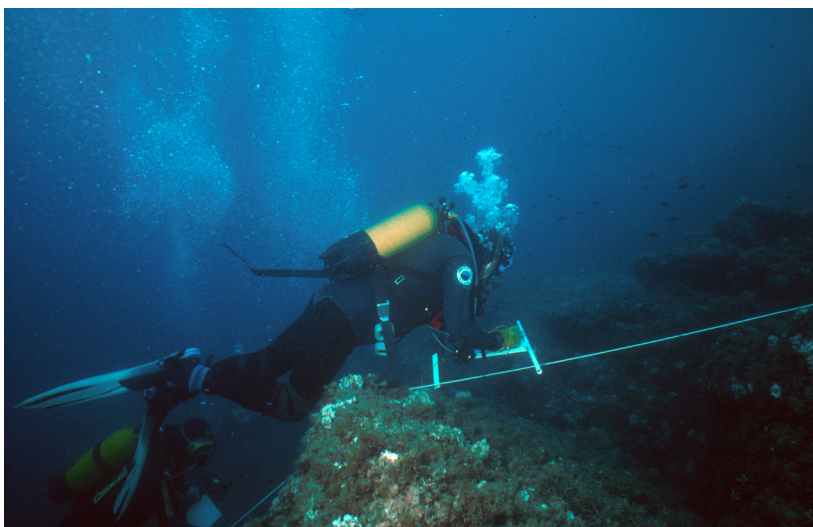


Fig. 13 - Campionamento visivo lungo un *belt transect* eseguito tenendo un'asta lunga 1 m (fissata alla lavagnetta) perpendicolare alla cima del transetto.

calcolare dati di densità di un organismo in base alla sua abbondanza nell'area esaminata, pari a $W \times T$.

6.6.2.2.2 Quadrati

Materiali ed equipaggiamenti necessari

Cornice quadrata di metallo (solitamente alluminio) o meglio di materiale plastico (PVC), cime piombate, profondimetro, bussola, clinometro, lavagnetta subacquea, matita, cimette, piombi, ganci.

Metodo di campionamento

Questo metodo consiste nel posizionare (utilizzando piccoli ganci e cimette quando opportuno) una cornice di forma quadrata sul substrato e nel rilevare gli organismi sessili che si vengono a trovare all'interno.

La cornice impiegata può avere, a seconda degli scopi, dimensioni variabili: un quadrato di 0,5-1 m di lato rappresenta un buon compromesso tra maneggevolezza

sott'acqua e rappresentatività del rilevamento. È utile che il quadrato sia suddiviso al suo interno, per mezzo di una serie di cimette, in quadrati più piccoli (ad es. 25 quadratini di lato 20 cm) che fungono da riferimento per i rilevamenti quantitativi.

La cornice può essere costituita di materiali diversi, ma bisogna tenere presente che cornici metalliche sono molto negative e malamente maneggevoli sott'acqua.

La soluzione migliore è rappresentata da un tubo di materiale plastico (ad es. PVC) con alcuni fori che lascino entrare l'acqua: a terra la cornice presenta peso trascurabile, in immersione la penetrazione dell'acqua nei tubi la rende debolmente negativa ma sempre molto leggera e maneggevole. In questo modo è assai stabile sia su fondali pianeggianti sia su pareti verticali (Fig. 14).



Fig. 14 - Campionamento visivo del popolamento di una parete rocciosa per mezzo di un quadrato di 1 m di lato, suddiviso in un grigliato di 25 quadratini.

Problematiche e consigli pratici

Con l'impiego del quadrato possono essere effettuati (Fig. 5): I) conteggi degli individui (ottenendo così direttamente la densità per m²); II) stima del ricoprimento percentuale (stimando ad occhio il ricoprimento all'interno di ogni singolo quadratino e riportando poi al totale); III) valutazioni di frequenza (contando il numero di quadratini interni in cui ogni specie è presente rapportati al totale di quadratini); IV) ovviamente, è comunque possibile limitarsi alla semplice presenza/assenza. A questi dati vanno sempre comunque aggiunte la profondità, l'inclinazione (in gradi rispetto all'orizzontale) e l'esposizione (in gradi bussola) del substrato (Tab. 6).

Tab. 6 - Rilevamenti bionomici quantitativi su fondo roccioso effettuati tramite quadrati di 1 m di lato in quattro stazioni diverse per profondità, inclinazione del substrato (α), ed esposizione. Per ogni specie è stata rilevata la frequenza (numero di quadrati unitari di 20 cm di lato in cui essa è presente, su 25).

Stazione A: 10 m, $\alpha = 80^\circ$, 270°N		Stazione B: 6,5 m, $\alpha = 0^\circ$	
<i>Acanthella acuta</i>	1	<i>Acetabularia acetabulum</i>	4
<i>Amphiroa rigida</i>	8	<i>Amphiroa rigida</i>	1
<i>Cladophora prolifera</i>	3	<i>Codium bursa</i>	2
<i>Cladostephus spongiosus</i>	1	<i>Dasycladus vermicularis</i>	17
<i>Codium bursa</i>	3	<i>Flabellia petiolata</i>	3
<i>Dasycladus vermicularis</i>	5	<i>Jania rubens</i>	7
<i>Flabellia petiolata</i>	16	<i>Lithophyllum incrustans</i>	1
<i>Halimeda tuna</i>	9	<i>Padina pavonica</i>	11
<i>Halopteris filicina</i>	2	<i>Penicillus capitatus</i>	2
<i>Lithophyllum stictaeforme</i>	2	<i>Stypocaulon scoparium</i>	3
<i>Mesophyllum lichenoides</i>	7		
<i>Padina pavonica</i>	22	Stazione D: 7 m, $\alpha = 55^\circ$, 290°N	
<i>Peyssonnelia</i> sp. 1	14	<i>Amphiroa rigida</i>	9
<i>Peyssonnelia</i> sp. 2	1	<i>Phorbas ficticius</i>	2
<i>Phorbas ficticius</i>	1	<i>Codium bursa</i>	6
		<i>Dictyota dichotoma</i>	5
Stazione C: 9,5 m, $\alpha = 65^\circ$, 330°N		<i>Eudendrium</i> sp.	2
<i>Amphiroa rigida</i>	10	<i>Flabellia petiolata</i>	9
<i>Chondrosia reniformis</i>	2	<i>Halimeda tuna</i>	5
<i>Codium bursa</i>	1	<i>Ircinia oros</i>	2
<i>Corallina elongata</i>	5	<i>Ircinia variabilis</i>	2
<i>Flabellia petiolata</i>	22	<i>Lithophyllum stictaeforme</i>	5
<i>Halimeda tuna</i>	3	<i>Mesophyllum lichenoides</i>	12
<i>Halocynthia papillosa</i>	1	<i>Padina pavonica</i>	21
<i>Lithophyllum stictaeforme</i>	7	<i>Petrosia ficiformis</i>	4
<i>Mesophyllum lichenoides</i>	5	<i>Peyssonnelia</i> sp. 1	12
<i>Padina pavonica</i>	17	<i>Peyssonnelia</i> sp. 2	5
<i>Peyssonnelia</i> sp. 1	23	<i>Stypocaulon scoparium</i>	1
<i>Sertella</i> sp.	2	<i>Tricleocarpa fragilis</i>	1

La stima visiva di ricoprimento percentuale è il metodo attualmente preferito dalla maggior parte dei ricercatori. Frascchetti *et al.* (2001) hanno proposto la seguente metodica. Ad ogni specie viene assegnato un punteggio da 0 a 4 in ogni quadratino: 0 in caso di totale assenza; 1 se la specie copre circa $\frac{1}{4}$ della superficie del quadratino; 2 se il ricoprimento interessa circa $\frac{1}{2}$ della superficie del quadratino; 3 se il ricoprimento è intorno ai $\frac{3}{4}$; 4 se la specie occupa praticamente tutto il quadratino. Con il simbolo «+» (cui in fase di elaborazione si attribuisce generalmente il valore convenzionale di 0,5) si indica una presenza con ricoprimento trascurabile

(inferiore a $\frac{1}{4}$ di quadratino). I valori finali vengono sommati per tutti i quadrati ed espressi come percentuale. È talvolta utile, anche per motivi di sicurezza, che ogni quadrato sia rilevato da una coppia di sommozzatori scientifici; entrambi devono avere ottime conoscenze floro-faunistiche, almeno a livello delle specie cospicue. I due rilevamenti così ottenuti dovrebbero teoricamente essere identici: in realtà ci sono sempre piccole differenze, legate ad errori di conteggio, al diverso angolo visuale, ecc.; in sede di analisi dei dati, i due rilevamenti possono successivamente essere mediati, ottenendo dunque un unico rilevamento integrato (e quindi più preciso), oppure possono essere mantenuti separati, in modo da costituire una stima indiretta dell'errore associato alle osservazioni. Diversi studi hanno dimostrato che il campionamento visivo è molto robusto rispetto all'errore introdotto dall'operatore (Dethier *et al.*, 1993; Benedetti-Cecchi *et al.*, 1996). Per particolari esigenze di studio l'area in cui effettuare il censimento visivo potrebbe essere più grande, in questo caso, per maggiore maneggevolezza in acqua, si può delimitare l'area con cime piombate (o comunque appesantite con piombi da cintura agli angoli e ai lati) di dimensione prescelta.

6.7 Endobenthos perforante

Oltre agli organismi sessili o vagili viventi sopra il substrato (epibenthos), il benthos dei fondi duri comprende anche specie viventi all'interno della roccia (endobenthos). Tali organismi possono semplicemente essere specie cavarie (che si insediano in cavità preesistenti) oppure essere capaci di perforare attivamente il substrato: quest'ultima modalità si osserva soprattutto nei substrati calcarei. La bio-perforazione dei substrati calcarei appare un fenomeno di grande portata ecologica in quanto costituisce una fase del *turnover* delle formazioni carbonatiche e un agente di disturbo intermedio, in grado di promuovere la tridimensionalità e la biodiversità dell'habitat. Gli organismi coinvolti si possono distinguere in micro- e macro perforatori. I primi includono cianobatteri, clorofite, rodofite e funghi; tra i secondi sono importanti spugne, bivalvi, sipunculidi, policheti e cirripedi. La bioperforazione è attuata tramite due meccanismi: chimico e meccanico, spesso non mutualmente esclusivi (Hutchings, 1986).

6.7.1.1 Metodi indiretti e diretti

La bioerosione di un substrato può essere stimata indirettamente valutando la superficie delle strutture (fori, papille, sifoni) che mettono in comunicazione il bio-perforatore con l'esterno. Con appropriate equazioni, i cui coefficienti vanno valutati sperimentalmente per le diverse specie, è possibile risalire al volume o alla biomassa degli organismi perforatori (Schönberg, 2001). Stime quantitative dirette utilizzano invece una stima della biomassa o del biovolume di un bioperforatore. Tali variabili devono essere calcolate tenendo conto della presenza di strutture minerali solitamente presenti in molti organismi perforatori (spicole, conchiglie, tubi, ecc.). Per la stima di entrambe le variabili sono disponibili diverse tecniche (Peyrot-Clausade *et al.*, 1995; Becker e Reaka-Kudla, 1997; Schönberg, 2001).

6.7.1.1.1 Biomassa

Porzioni di substrato infestato vengono pesate prima e dopo la digestione dei tessuti, che può essere effettuata ponendo il campione in H_2O_2 al 50% per 2 settimane. In alternativa, soprattutto nel caso si tratti di microperforatori, è possibile decalcificare completamente piccoli cubi di substrato per ottenere direttamente i tessuti del

perforatore (una buona soluzione decalcificante che non danneggia i tessuti è la soluzione di Perenyi, composta da acido cromico al 0,05%, acido nitrico al 10%, alcool al 90% in rapporto 30:40:30). Il materiale residuo (organismi perforatori) viene raccolto per filtrazione dalla soluzione decalcificante. Il residuo decalcificato può anche essere utilizzato per uno studio qualitativo degli organismi coinvolti. Si veda a tale proposito anche il Cap. 8 di questo Manuale sul Microfitobenthos.

6.7.1.1.2 Biovolume

Il volume totale delle perforazioni si può calcolare in diversi modi, quattro dei quali sono descritti di seguito. I primi tre metodi prevedono il taglio del substrato, il che comporta che il campione non potrà essere ulteriormente utilizzato per successive analisi; inoltre la fresa diamantata utilizzata per il taglio asporta almeno 2-3 mm di substrato per ogni fetta; il taglio può causare lo sgretolamento del campione quando l'erosione è particolarmente estesa. Il quarto metodo, invece, lascia il campione intatto e quindi riutilizzabile per altre analisi.

- 1) Il substrato è tagliato in sezioni dello spessore di 0,4-1 cm. Le aree delle cavità infestate sono misurate o direttamente o su fotografie delle sezioni tramite tavoletta grafica. La superficie delle cavità può altrimenti essere valutata ponendo una griglia millimetrata, e contando i quadrati sovrapposti alle aree erose. Successivamente si calcola la media delle aree così misurate sulle fette adiacenti; questa media è poi moltiplicata per lo spessore della fetta per ottenere il volume.
- 2) Sottili fette di substrato, fissate e incluse in resina possono essere osservate al microscopio ottico o al microscopio elettronico a scansione per ottenere valutazioni quantitative dell'erosione dei microperforatori (alghe, funghi).
- 3) Sezioni di substrato, ripulite dalla sostanza organica tramite immersione prolungata in H_2O_2 o $NaClO$ sono sottoposte ad analisi ai raggi X (utilizzando esposizioni di 5-20 sec a 45-65 Kv in dipendenza del substrato). Le aree erose sono misurate direttamente sulla lastra radiografica appoggiata su un piano luminoso oppure su immagini in bianco e nero stampate utilizzando le lastre come negativi. Le diverse tracce di erosione lasciate da numerosi gruppi di organismi (spugne, bivalvi, vermi, ecc.) devono essere riconosciute. Le cavità prodotte da sipunculidi e policheti non sono facilmente distinguibili e per questo sono spesso considerate unitamente. L'analisi ai raggi X dà buoni risultati soprattutto nel caso di substrati poco porosi; al contrario in substrati molto porosi, come le madrepore, può essere difficile distinguere le zone di erosione più sottili dalle aree più porose del substrato.
- 4) I campioni di substrato vengono seccati e successivamente sottoposti a tomografia (120 Kv e 60 mA). Sulla stampa, ogni gruppo di organismi perforatori può essere visualizzato con colori diversi. Le zone di bioerosione sono valutate tramite analisi d'immagine computerizzata. Come per il metodo dei raggi X, risulta difficile la distinzione tra piccole bioerosioni e porosità originali del substrato.

6.7.1.2 Stima dei tassi e della modalità di bioerosione

L'utilizzo di substrati artificiali permette di valutare con precisione i tassi e le modalità di perforazione dei diversi organismi (Peyrot-Clausade *et al.*, 1995; Neumann, 1966). Vengono ritagliati blocchetti regolari (per esempio 8×4×4 cm oppure 2-4 cm² per 0,5-1 cm) di substrato calcareo. È utile che, prima dell'utilizzo, i blocchetti siano accuratamente ripuliti in H_2O_2 o $NaClO$ e sciacquati in acqua distillata per alcuni giorni per rimuovere ogni eventuale traccia di materia organica o di altri

materiali estranei, asciugati e pesati. I blocchetti, posti *in situ*, sono poi rimossi ad intervalli successivi di tempo (6 mesi, 2, 5 e 10 anni) in modo da valutare l'evoluzione delle comunità di perforatori.

I blocchetti possono essere fissati con fili di acciaio a frammenti di substrato naturale infestati da organismi perforanti. Successivamente, i blocchetti infestati possono essere posti, insieme a blocchetti non infestati da utilizzare come controllo, in ambiente naturale o in acquario per tempi diversi. L'utilizzo come substrato dello Spato d'Islanda, un carbonato trasparente, permette di osservare l'evolversi delle perforazioni.

6.7.2 Studio morfologico delle perforazioni

Si effettua solitamente tramite calchi. Nel caso di organismi microperforatori (alghe, funghi), si parte da frammenti di substrato che sono prelevati e tagliati in modo da ottenere blocchetti di piccole dimensioni (3×3×8 mm); questi sono successivamente fissati in glutaraldeide al 4% e post-fissati in tetraossido di osmio all'1% (Golubic *et al.*, 1970).

Al termine della fase di post-fissazione e del successivo risciacquo in tampone e acqua distillata, i campioni sono disidratati lungo una serie crescente di soluzioni di acetone, a partire dalla soluzione al 10%, attraverso nove passaggi della durata di 30 minuti fino all'acetone puro.

Dopo il bagno di acetone i campioni devono essere immersi per una notte, a 5 °C, in una soluzione contenente 60 parti di una mistura di Epon e 40 parti di acetone. La mistura Epon deve essere preparata in questo modo: 50 parti di Epon-812, 47,5 parti di NMA (naftil-metil-anidride) e 2,5 parti di BDMA (benzil-dimetil-ammina). Il tutto è mescolato per 15 minuti con un agitatore. La mistura può essere conservata in congelatore per molto tempo, con la cautela di evitarne l'idratazione. L'infiltrazione prosegue a temperatura ambiente, sotto vuoto, per 4 ore. Successivamente il materiale deve essere trasferito nella mistura pura di Epon, sotto vuoto, per 1 o 2 ore. Infine il materiale è trasferito in contenitori (in genere capsule o formine) e posto in stufa a 60 °C per 40-72 ore.

I blocchi induriti di resina sono successivamente spuntati e parzialmente disciolti in HCl fino a mettere in evidenza i calchi dei canali nei quali gli organismi erano presenti, fissati nella posizione originale. I calchi così ottenuti possono essere osservati sia allo stereomicroscopio sia al microscopio elettronico a scansione (SEM). Inoltre i calchi possono essere inclusi nuovamente in resina e sezionati per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Una procedura più semplice prevede l'utilizzo di resine epossidiche a due componenti (Kresten-Nielsen e Maiboe, 2000). Ulteriori dettagli su questo tipo di tecniche si trovano nel Cap. 8 di questo Manuale.

La riproduzione tridimensionale di un organismo macroperforatore può essere ottenuta infiltrando a freddo una resina (*Batson's #17 plastic replica and corrosion kit*, Polysciences Inc.) all'interno dell'organismo, attraverso l'apertura delle perforazioni (Burlando *et al.*, 1990).

In alternativa a questa resina è possibile utilizzare silicone commerciale che è di uso molto semplice ma permette una risoluzione inferiore dei dettagli. Dopo l'indurimento delle resine il substrato deve essere eliminato tramite cambi di HCl al 10%. Il materiale così ottenuto può essere studiato tramite osservazione allo stereomicroscopio, o tramite microscopio elettronico a scansione.

6.8 Bibliografia

- ABBIATI M. (1991) - Metodi di campionamento biologico subacqueo. In: Abbiati M. (ed), *Lezioni del corso formativo per ricercatore scientifico subacqueo*, International School for Scientific Diving, Pisa: 3-12.
- ABBIATI M., ALIANI S., BIANCHI C.N., CINELLI F., SGORBINI S. (1989) - *Libretto immersioni per ricercatore scientifico subacqueo*. SEU, Pisa.
- BALDUZZI A., BOERO F., CATTANEO-VIETTI R., PANSINI M., PRONZATO R. (1986) - Esperienze di studio in immersione dello zoobenthos sessile. In: Bregant D., Fonda Umani S. (eds), *Atti del 7° Congresso della Associazione italiana di Oceanologia e Limnologia*. AIOL: 511-518.
- BECKER L.C., REAKA-KUDLA M.L. (1997) - The use of tomography in assessing bioerosion in coral. *Proc. 8th int. Coral Reef Symp.*, **2**: 1819-1823.
- BELLAN-SANTINI D. (1969) - Contribution à l'étude des peuplements infralittoraux sur substrat rocheux (étude qualitative et quantitative de la frange supérieure). *Recl. Trav. Stn Mar. Endoume*, **47** (=63): 1-294.
- BENEDETTI-CECCHI L., AIROLDI L., ABBIATI M., CINELLI F. (1996) - Estimating the abundance of benthic invertebrates: a comparison of procedures and variability between observers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **138**: 93-101.
- BENSON B.L. (1989) - Airlift sampler: applications for hard substrata. *Bull. Mar. Sci.*, **44** (2): 752-756.
- BIANCHI C.N. (2002) - Il monitoraggio della biodiversità nelle Aree Marine Protette: considerazioni scientifiche e metodologiche. *Notiz. Soc. It. Biol. Mar.*, **41**: 89-95.
- BIANCHI C.N., BEDULLI D., MORRI C., OCCHIPINTI-AMBROGI A. (1989) - L'herbier de Posidonies: écosystème ou carrefour éco-éthologique? In: Boudouresque C.F., Meinesz A., Fresi E., Gravez V. (eds), *2nd International Workshop on Posidonia Beds*. GIS Posidonie, Marseille, Fr **2**: 257-272.
- BIANCHI C.N., COCITO S., MORRI C., SGORBINI S. (1991) - Rilevamento bionomico subacqueo. In: Abbiati M. (ed), *Lezioni del corso formativo per ricercatore scientifico subacqueo*. International School for Scientific Diving, Pisa: 67-83.
- BIANCHI C.N., MORRI C. (2000) - Training scientific divers: Italian style. *Ocean Challenger*, **10** (1): 25-29.
- BOUDOURESQUE C.F. (1971) - Méthodes d'étude qualitative et quantitative du benthos (en particulier du phytobenthos). *Tethys*, **3** (1): 79-104.
- BOUDOURESQUE C.F., BELSHER T. (1979) - Une méthode de détermination de l'aire minimale qualitative. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, **25-26**: 273-275.
- BURDICK R.K., GRAYBILL F.A. (1992) - *Confidence intervals on variance components*. Marcel Dekker, New York: 224 pp.
- BURLANDO B., BAVESTRELLO G., SARÀ M. (1990) - The canal system of *Spongia officinalis* and *Cliona viridis* (Porifera) based on corrosion cast analysis. *Boll. Zool.*, **57**: 233-239.
- CICOGLA F., PRONZATO R. (1985) - A time-lapse photography equipment for the investigation of macrozoobenthos activity. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, **29** (6): 183.
- COLANTONI P. (1980) - *La scienza subacquea. Le moderne tecniche d'immersione e ricerca subacquea*. La Cuba, Roma: 157 pp.
- COLANTONI P. (1982) - Techniques modernes d'échantillonnage des fonds marins par plongeurs. *Bull. Inst. océanogr. Monaco*, n° special **3**: 25-41.
- COLANTONI P., DE STROBEL F. (1980) - Normative di sicurezza per l'immersione scientifica. CNR, Laboratorio di Geologia Marina, Bologna, RT 11.
- DETHIER M.N., GRAHAM E.S., COHEN S., TEAR L.M. (1993) - Visual versus random-point percent cover estimations: "objective" is not always better. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **96**: 93-100.
- DREW E.A., LYTTHGOE J.N., WOODS J.D. (1976) - *Underwater research*. Academic Press, London.

- EARLL R. (1977) - A methodology for primary surveys of the shallow sublittoral zone. *Progr. Underwater Sci.*, **2**: 47-63.
- ENGLISH S., WILKINSON C., BAKER V. (1997) - *Survey manual for tropical marine resources*. Australian Institute of Marine Science, Townsville (2^a edizione): 390 pp.
- FINNISH IBP-PM GROUP (1969) - Quantitative sampling equipment for the littoral benthos. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, **54**: 185-193.
- FLEMMING N.C., MAX M.D. (1996) - *Scientific Diving: a general code of practice*. Best Publishing Company, Flagstaff, Arizona, e Unesco, Paris: 278 pp.
- FOSTER M.S., HARROLD C., HARDIN D.D. (1991) - Point vs. photo quadrat estimates of the cover of sessile marine organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **146**: 193-203.
- FRASCHETTI S., BIANCHI C.N., TERLIZZI A., FANELLI G., MORRI C., BOERO F. (2001) - Spatial variability and human disturbance in shallow subtidal hard substrate assemblages: a regional approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **212**: 1-12.
- GAMBI M.C., DAPPIANO M., LANERA P., IACONO B. (2003) - Biodiversità e bionomia dei popolamenti bentonici dei fondi duri delle isole Flegree: analisi di diverse metodologie di studio. *Soc. Naz. Sc. Lett. Arti in Napoli: Mem. Acc. Sc. Fis. Mat.*, **5** (2003).
- GAMBLE J.C. (1984). - Diving. In: Holme N.A., McIntyre A.D. (eds), *Methods for the study of marine benthos*. Blackwell Sci., Oxford (2^a edizione), IBP Handbook, **16**: 99-139.
- GEORGE J.D., LYTGOE G., LYTGOE J.N. (1985) - *Underwater photography and television for scientists*. Oxford University Press, London (Underwater Association Special Volume n° 2).
- GIANGRANDE A., MANCONI R., PRONZATO R. (1986) - Selective sampling method for hard bottom vagile fauna. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, **30** (2): 265.
- GOLUBIC S., BRENT G., LE CAMPION T. (1970) - Scanning electron microscopy of endolithic algae and fungi using a multipurpose casting-embedding technique. *Lethaia*, **3**: 203-209.
- HISCOCK K. (1987) - Subtidal rock and shallow sediments using diving. In: Baker J.M., Wolff W.J. (eds), *Biological surveys of estuaries and coasts*. Cambridge University Press, Cambridge: 198-237.
- HUTCHINGS P.A. (1986) - Biological destruction of coral reefs: a review. *Coral Reefs*, **4**: 239-252.
- KINGSFORD M., BATTERSHILL C. (1998) - *Studying temperate marine environments. A handbook for ecologists*. Canterbury University Press, Christchurch, New Zealand.
- KREBS C.J. (1999) - *Ecological Methodology*. Addison-Wesley Educational Publishers, New York (2^a edizione): 576 pp.
- KRESTEN-NIELSEN J., MAIBOE J. (2000) - Epofix and vacuum: an easy method to make casts of hard substrates. *Pal. Electr.*, **3**: 1-10.
- LOYA Y. (1978) - Plotless and transect methods. In: Stoddart D.R., Johannes R.E. (eds), *Coral reefs: research methods*. UNESCO, Paris, Monographs on oceanographic methodology, **5**: 197-217.
- MANLY B.F.J. (1991) - *Randomization and Monte Carlo methods in biology*. Chapman and Hall, New York: 424 pp.
- MAZZELLA L., BUIA M.C., GAMBI M.C., LORENTI M., RUSSO G.F., SCIPIONE M.B. (1986) - Metodi di rilevamento *in situ* e loro utilità nello studio di alcuni ecosistemi bentonici costieri. In: Bregant D., Fonda Umani S. (eds), *Atti del 7° Congresso Associazione Italiana Oceanologia e Limnologia*, AIOL: 483-502.
- MEESE R.J., TOMICH P.A. (1992) - Dots on the rocks: a comparison of percent cover estimation methods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **165**: 59-73.
- MELEGARI G. (1969) - *Operatività subacquea. Trattato di attività e ricerche subacquee*. Pescasport, Genova.
- MORRI C., BIANCHI C.N. (1983) - Studio quantitativo dell'insediamento degli Idroidi (Cnidaria, Hydrozoa) su substrati artificiali immersi a diverse profondità nell'avamposto di Genova. *Boll. Mus. civ. St. nat. Venezia*, **33**: 73-89.

- MORRI C., BIANCHI C.N., COCITO S., PEIRANO A., DE BIASI A.M., ALIANI S., PANSINI M., BOYER M., FERDEGHINI F., PESTARINO M., DANDO P. (1999) - Biodiversity of marine sessile epifauna at an Aegean island subject to hydrothermal activity: Milos, Eastern Mediterranean Sea. *Mar. Biol.*, **135** (4): 729-739.
- NEUMANN A.C. (1966) - Observation on coastal erosion in Bermuda and measurements of the boring rate of the sponge *Cliona lampa*. *Limnol. Oceanogr.*, **11**: 92-108.
- NOAA (2002) - *Diving manual: diving for science and technology*. US Department of Commerce, Washington D.C. (4th edition): 668 pp.
- PALMERINI P., BIANCHI C.N. (1994) - Biomass measurements and weight-to-weight conversion factors: a comparison of methods applied to the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Biol.*, **120**: 273-277.
- PANSINI M., PRONZATO R. (1982) - L'impiego della tecnica subacquea nel rilevamento delle biocenosi bentoniche di substrato duro. *Natur. Siciliano*, IV-VI, **6** (3): 467-476.
- PÉRÈS J.M., PICARD J. (1964) - Nouveau manuel de bionomie benthique de la Mer Méditerranée. *Rec. Trav. Stat. mar. Endoume*, **31** (47): 1-137.
- PEYROT-CLAUDE M., LE CAMPION-ALSUMARD T., HUTCHINGS P., PAYRI C., FONTAINE M. (1995) - Initial bioerosion and bioaccretion on experimental substrates in high island and atoll lagoons (French Polynesia). *Oceanol. Acta*, **18**: 531-451.
- PRONZATO R. (1997) - Underwater photographic techniques for field-research in shallow marine environments. In: Jensen A.C. (ed), *European artificial reef research*. Publications of the Oceanographic Centre, Southampton: 337-346.
- ROGERS C., GARRISON G., GROBER R., HILLIS Z.M., FRANKE M.A. (1994) - *Coral reef monitoring manual for the Caribbean and Western Atlantic*. Virgin Islands National Park Service, St. John.
- ROS J., GILI J.M. (1984) - L'estudi de les comunitats bentòniques de les illes Medes: metodologia i relació de mostres. In: Ros J.D., Olivella I., Gili J.M. (eds), *Els sistemes naturals de les illes Medes*. Institut d'Estudis Catalans, Barcelona: 619-636.
- SCHÖNBERG C.H.L. (2001) - Estimating the extent of endolithic tissue of a Great Barrier Reef clionid sponge. *Senck. Mar.*, **31**: 29-39.
- SGORBINI S., BIANCHI C.N., DIVIACCO G., FORTI S., MORRI C., NICCOLAI I. (1988) - Méthodologie d'une étude hydrobiologique dans la grotte marine de Bergeggi (mer Ligure). *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, **31** (2): 119.
- SGORBINI S., COCITO S., BIANCHI C.N. (1996) - Underwater photography as a tool to monitor the population dynamics of a clonal organism. In: Albertelli G., De Maio A., Piccazzo M. (eds), *Atti dell'11° Congresso della Associazione italiana di Oceanologia e Limnologia*. AIOL, Genova: 819-826.
- WEINBERG S., 1978 - The minimal area problem in invertebrate communities of Mediterranean rocky substrata. *Mar. Biol.*, **49**: 33-40.
- WOODS J.D., LYTHGOE J.N. (1971) - *Underwater science: an introduction to experiments by divers*. Oxford University Press, London.
- ZABALA M., OLIVELLA I., GILI J.M., ROS J.D. (1982) - Un intento de tipificación metodológica en el estudio del bentos marino accesible en escafandra autónoma. *Acta 1^{er} Simp. ibér. Est. Bentos mar.*, **2**: 961-982.

