



**ISPRA**

Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale

## SCHEDA METODOLOGICA PER IL CAMPIONAMENTO E L'ANALISI DEL MACROZOOBENTHOS DI FONDI MOBILI

### **Posizionamento delle stazioni**

Le stazioni di campionamento devono essere 2, lungo un transetto costa-largo. La 1° in corrispondenza di fondali con sedimenti sabbiosi (percentuale di sabbia  $\geq 75\%$ ), tale stazione potrà corrispondere alla stazione campionata in precedenti Programmi di Monitoraggio per le indagini sulla biocenosi delle SFBC. La 2° in corrispondenza di fondali fangosi (percentuale di sabbia  $\leq 25\%$ ). La stazione posta in corrispondenza di fondali fangosi dovrà essere coincidente con la stazione individuata per le indagini sui sedimenti e, almeno, in una delle aree di indagine, anche con quella più al largo individuata per le indagini sulla matrice acqua.

### **Frequenza di campionamento**

I campionamenti devono avvenire con frequenza semestrale, nei periodi primaverile (marzo-aprile) e autunnale (settembre - ottobre) al fine di evidenziare i cambiamenti stagionali del popolamento.

### **Imbarcazione di appoggio**

L'imbarcazione utilizzata per il prelievo dei campioni dovrà essere munita di: strumento DGPS o GPS per rilevare e registrare la posizione esatta della stazione di prelievo; di un verricello, con portata di almeno 100 kg, con annessa gru o ponticello salpa strumenti in grado di movimentare la benna, considerando che ad esempio una Van Veen da 0.1 m<sup>2</sup> ha uno sviluppo verticale, da chiusa, anche di 2 metri; spazio di coperta sufficientemente ampio per poter svolgere le operazioni di setacciatura del campione; ampia disponibilità di acqua di mare per la setacciatura.

### **Strumentazione per il campionamento**

Il prelievo dei campioni di sedimento per lo studio del macrozoobenthos dovrà essere effettuato tramite benna, di tipo Van Veen, aventi le seguenti caratteristiche: 0.1 m<sup>2</sup> di superficie di presa e 18/20 litri di volume.

### **Prelievo dei campioni**

Il prelievo dei campioni dovrà avvenire in maniera tale che ciascuna bennata raccolga un volume minimo di sedimento di almeno 5 litri per i campionamenti effettuati in corrispondenza di fondali

con sedimenti sabbiosi e di almeno 10 litri per i campionamenti effettuati in corrispondenza di fondali fangosi (ISO/DIS 16665- Water qualità- Guidelines for quantitative sampling and sample processing of marine soft-bottom macro fauna, 2003).

Per ogni stazione di prelievo devono essere considerate 3 repliche avendo l'accortezza di verificare, per ciascuna replica, che lo strumento abbia lavorato in condizioni ottimali e che non si sia avuta la fuoriuscita di sedimento. Per ogni stazione di campionamento va effettuata un'ulteriore quarta replica per le indagini relative alla granulometria e al contenuto di carbonio organico.

### **Setacciatura del sedimento in campo**

Gli organismi del macrozoobenthos devono essere separati dal sedimento tramite risciacquo in acqua marina corrente (avendo cura di mantenere un getto il più possibile moderato, in modo da non danneggiare gli organismi) su un setaccio con apertura regolare di maglia di 1mm. Il setaccio deve avere una superficie adeguata alle necessità, in modo da poter accogliere il campione ed effettuare il lavaggio senza che esso venga ostruito completamente; deve essere robusto ed avere i lati sufficientemente alti (15-25 cm) da ridurre al massimo la possibilità che il materiale fuoriesca durante il lavaggio. La setacciatura ha lo scopo di eliminare il sedimento nel quale sono contenuti gli organismi bentonici. Il materiale rimanente quindi dovrà essere accumulato nel setaccio e quindi inserito in idonei contenitori. Tali contenitori dovranno essere etichettati sia all'esterno, tramite un pennarello indelebile a vernice o un'etichetta stampata con stampante termica, sia all'interno con etichetta di carta resistente (carta da lucido) scritta a matita o inchiostro di china o di latta tenera in grado di essere incisa con la punta di una penna o matita. L'etichettatura del campione ha lo scopo di rendere identificabile il campione e di collegarlo in maniera univoca con la stazione di provenienza. Sull'etichetta vanno riportati: nome o sigla del progetto, data di campionamento, sigla della stazione, numero della replica e nel caso che il campione sia stato suddiviso in più barattoli, il numero relativo al contenitore rispetto al numero totale di barattoli utilizzati per quel campione (ad es. 1 di 2, 2 di 2, ecc.). I dati dell'etichetta dovranno essere riportati nel foglio stazione per l'identificazione del campione.

### **Preparazione dei campioni in campo**

La fase terminale è la fissazione del campione. Il fissativo più comunemente usato è rappresentato da una soluzione di formalina al 10% (che si ottiene diluendo 1 a 10 la formaldeide al 40%), neutralizzata (carbonato di Calcio,  $\text{CaCO}_3$ , o Borace, Tetraborato di Sodio  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , a saturazione (un cucchiaino circa)) e acqua di mare; nel caso il campione contenga notevoli quantità di sostanza organica tale percentuale andrà aumentata.. Con tale soluzione si riempiranno i contenitori con i

campioni da fissare e conservare. Occorre ricordare e ribadire che la formalina è un composto chimico con caratteristiche tossiche e cancerogene, attualmente classificata dalla Comunità Europea “un cancerogeno di categoria 3e”, pertanto è necessario prestare particolare attenzione nella manipolazione e seguire le apposite indicazioni di comportamento indicate nelle schede di sicurezza del prodotto chimico. La preparazione della soluzione dovrà avvenire o sotto apposite cappe aspiranti qualora tale operazione venga effettuata in laboratorio prima della campagna di prelievo dei campioni, o in un luogo aperto se effettuata direttamente sul natante. Il campione è al fine pronto per essere trasportato in laboratorio, avendo cura che le modalità di viaggio non creino sversamento del liquido di fissaggio o danneggiamenti del campione, per le successive fasi di smistamento e di identificazione specifica.

### **Smistamento (Sorting) dei campioni in laboratorio**

In laboratorio verranno svolte le operazioni di smistamento e identificazione specifica degli organismi campionati. Lo smistamento consiste nel separare gli organismi da identificare dal materiale inorganico residuo da eliminare.

In laboratorio il campione deve essere lavato con acqua dolce su un setaccio certificato, con maglia delle dimensioni di quello usato in campo o più piccola. La soluzione fissativa, formalina, va rimossa versandola attraverso il setaccio e con un imbuto, in appositi bidoni per lo stoccaggio e il successivo smaltimento delle sostanze tossiche. Il lavaggio deve essere eseguito con delicatezza usando molta acqua corrente, per rimuovere il fissativo e l'eccesso di sedimento ancora presente. L'operazione va effettuata sotto cappa per evitare di inalare i vapori di formalina, con guanti in lattice e protezione per gli occhi. Il materiale dopo essere stato abbondantemente lavato va posto in una vaschetta di plastica bianca di dimensioni adeguate alla grandezza del campione, ricoperto d'acqua ed esaminato con l'ausilio di uno stereomicroscopio con ingrandimenti inferiore a 10x, mettendo all'incirca un cucchiaino di materiale alla volta, coperto d'acqua, in una capsula Petri. Lo smistamento va effettuato in ambiente ben areato o utilizzando un aspiratore da banco, poiché pur lavando accuratamente il materiale con acqua è molto difficile riuscire ad eliminare completamente la formalina. Il campione va smistato in modo sistematico, utilizzando delle pinzette da orologiaio; tutti gli organismi ed i frammenti vanno estratti ed inseriti nel rispettivo contenitore: nel dubbio è sempre meglio raccogliere tutto ciò che può sembrare un individuo o parte di esso. Gli organismi vanno separati nei taxa prioritari (Policheti, Molluschi, Crostacei ed Echinodermi), che andranno poi identificati fino al livello specifico, laddove possibile; gli altri taxa potranno essere raggruppati insieme e conservati per eventuali approfondimenti tassonomici.

A seconda delle dimensioni dei diversi taxa, gli esemplari vengono inseriti in contenitori di plastica di volume variabile e conservati in etanolo al 70%. Gli organismi di maggiori dimensioni vanno conservati a parte. Tutti i contenitori devono avere un'etichetta all'interno (carta da lucido con la scritta a matita) e all'esterno, in cui vanno indicate la sigla o nome del progetto, la data di campionamento, la sigla della stazione, la replica, il gruppo sistematico di appartenenza. Va compilata una "scheda laboratorio" in cui vanno riportate, oltre alle caratteristiche relative al campione (data campionamento, sigla stazione, replica), anche la data in cui si è effettuato lo smistamento, il tempo impiegato, il nome dell'operatore e qualunque nota relativa al campione ritenuta utile.

### **Identificazione dei TAXA**

L'obiettivo dell'analisi tassonomica è di identificare tutti gli organismi a livello tassonomico più basso possibile e, per ogni taxon identificato, fornire un conteggio accurato del numero di organismi presenti nel campione. Il livello tassonomico raggiungibile dipende ovviamente dall'esperienza dell'operatore, e dalle condizioni degli organismi, che possono essere stati danneggiati nei vari passaggi. Il numero di organismi deve corrispondere a quelli vivi al momento del campionamento, bisogna fare attenzione a non conteggiare molluschi vuoti, a tale scopo è preferibile aprire i molluschi bivalvi o ispezionare i molluschi gasteropodi per vedere che all'interno ci sia l'animale e non sedimento. I frammenti degli organismi a simmetria bilaterale devono essere contati solo se hanno la parte cefalica o se sono chiaramente identificabili; per organismi a simmetria radiale (es. ofiure, antozoi) vanno identificati e contati solo i frammenti che presentano la maggior parte del disco orale. Gli organismi che vengono identificati e contati vanno segnati su un apposito "foglio-dati", su cui si annota quali e quanti individui sono stati prelevati per essere inseriti nella collezione di riferimento. L'ordine da seguire per la compilazione del foglio-dati dovrà essere quello sistematico.

Qualora l'organismo da identificare sia incompleto, o le parti diagnostiche specifiche siano irricognoscibili, l'identificazione avverrà a livello sistematico superiore, genere, famiglia, ordine o classe, se le parti integre permettono di accertare tali livelli sistematici. In questi casi nella matrice di identificazione tale organismo verrà denominato "genere ind.", "famiglia ind." e così via.

Qualora l'organismo sia integro, ma l'identificazione non sia certa, ovvero le caratteristiche sistematiche dell'esemplare non corrispondano a nessuna specie descritta nelle chiavi dicotomiche consultate, è sufficiente numerare la specie (es. *Lumbrineris* sp.1, *Lumbrineris* sp.2), numerazione che deve rimanere costante in ogni studio. L'identificazione di ogni specie dovrebbe essere controllata con un individuo di una collezione di riferimento verificata. Dopo l'identificazione gli

organismi vanno conservati in alcool al 70% nei barattolini etichettati. Per le determinazioni vanno utilizzate, se disponibili, le chiavi dicotomiche dell'area geografica da cui proviene il campione.

### **Quantificazione**

Il numero di specie ritrovate deve essere calcolato secondo il principio *de minimis*, ovvero gli individui identificati come taxon ind. devono essere conteggiati solo se non sono presenti altri esemplari dello stesso taxon a livello sistematico inferiore. Ad esempio, se nel foglio dati sono presente *Ampelisca diadema* e *Ampelisca* ind., quest'ultima non verrà conteggiata, al contrario, se è presente *Ampelisca* ind. e nessun'altro esemplare appartenente al genere *Ampelisca*, l'individuo ind. andrà conteggiato.

### **Collezione di riferimento**

Almeno tre individui di ogni specie devono essere inviati per la verifica ad esperti riconosciuti. Le specie verificate vanno poi inserite nella collezione di riferimento, che può in seguito essere usata per confermare le identificazioni successive. Tutte le specie nella collezione di riferimento dovrebbero essere tenute in contenitori etichettati, separate per specie e per campione, ogni contenitore può contenere più individui dello stessa specie e campione. L'etichetta deve contenere: nome della specie, autore, raccoglitore, data e luogo di raccolta, identificatore ed eventualmente la conferma dell'identificazione da parte di esperti (nome dell'esperto e data di verifica). Il nome della specie deve essere scritto sia all'interno che all'esterno e periodicamente va controllato il livello del conservante.

### **Trattamento dei dati**

Per ogni stazione di campionamento dovrà essere ricostruita separatamente la lista delle specie e l'abbondanza (numero di individui per bennata) di ciascuna specie per ognuna delle 3 repliche effettuate.

A partire invece dalla lista di specie riferita al campione totale e al numero di individui totali riportati al m<sup>2</sup> (ottenuta unendo tra loro le 3 liste di specie e sommandole relative abbondanze) dovranno calcolarsi i seguenti parametri: numero totale di individui, numero totale di specie, indice di diversità specifica, indice di ricchezza specifica, indice di equiripartizione.

Sul sedimento prelevato con la 4° replica si dovranno determinare la granulometria ed il contenuto di carbonio organico.

A CURA DI:

BENEDETTA TRABUCCO, PAOLO TOMASSETTI, TIZIANO BACCI, MARINA PENNA (ISPRA, ROMA)

IDA FLORIANA ALEFFI (ARPA FRIULI VENEZIA GIULIA).