

**PROTOCOLLO DI CAMPIONAMENTO E
ANALISI DEI MACROINVERTEBRATI NEGLI
AMBIENTI LACUSTRI**

La realizzazione dei metodi per il campionamento e l'analisi degli elementi biologici di qualità delle acque dolci superficiali è stata coordinata dall'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici (APAT) in stretta collaborazione con il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare (MATTM).

L'elaborazione dei diversi protocolli è frutto della collaborazione di gruppi di lavoro, specifici per ogni elemento biologico. Si ringraziano vivamente i singoli esperti e i diversi Organismi ed Istituzioni che hanno collaborato per la realizzazione di questi metodi. L'impostazione, il coordinamento e la stesura finale dei diversi protocolli sono stati curati dal Servizio Metrologia Ambientale del Dipartimento Stato dell'Ambiente e Metrologia Ambientale in collaborazione con il Dipartimento Acque dell'APAT.

Componenti del Gruppo di lavoro:

MATTM - Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare

Sollazzo Caterina
Aste Fiorella
Scanu Gabriella

APAT – Agenzia per la protezione dell'Ambiente e per i servizi Tecnici

Belli Maria
Balzamo Stefania
Bernabei Serena
Cadoni Fabio
Martone Cristina

Università di Milano, Dipartimento di Biologia

Rossaro Bruno

Università La Sapienza, Dipartimento di Biologia animale e dell'Uomo

Bazzanti Marcello
Mastrantuono Luciana

C.N.R.- Istituto per lo Studio degli Ecosistemi (ISE)

Boggero Angela

Museo Tridentino di Scienze Naturali - Sezione di Zoologia degli Invertebrati e Idrobiologia

Lencioni Valeria

Joint Research Centre, Ispra

Solimini Angelo

Il documento è stato redatto da:

Bazzanti Marcello, Boggero Angela, Lencioni Valeria, Mastrantuono Luciana, Rossaro Bruno, Solimini Angelo.

INDICE

1. Introduzione	5
2. Scopo.....	5
3. Normativa di riferimento	6
4. Termini e definizioni.....	6
5. Strumentazione e attrezzatura.....	6
5.1 In campo.....	6
5.2 In laboratorio	7
6. Procedura di campionamento.....	8
6.1 Periodo di campionamento.....	8
6.2 Scelta delle stazioni di campionamento	8
6.3 Scelta strumento	9
6.4 Campionamento	11
6.5 Parametri di supporto al campionamento dei macroinvertebrati.....	13
6.6 Conservazione, trasporto dei campioni	13
7. Procedure analitiche	14
7.1 Esame dei campioni e sottocampionamento	14
7.2 Preparazione dei vetrini.....	15
7.3 Controllo di qualità.....	16
8. Archiviazione dei dati.....	16
Bibliografia	17

1. Introduzione

I macroinvertebrati bentonici nell'ambiente lacustre vivono all'interno del sedimento (endobenthos) o su di esso (epibenthos); nel sedimento essi spesso costruiscono tubi (Oligocheti, Chironomidi) o si muovono sopra di esso (benthos vagile, Crostacei, Efemerotteri etc.). Nei sedimenti possono infine svolgere l'intero ciclo vitale (Oligocheti) o solo una parte di esso (Insetti).

I sedimenti svolgono un ruolo fondamentale nei processi chimici e biologici dell'ecosistema lacustre, in quanto le sostanze disciolte nell'acqua sovrastante vi si accumulano per adsorbimento; la capacità di trattenere o rilasciare diversi elementi (il fosforo ad es.) condiziona lo stato trofico e la produttività del lago. Nello studio della fauna bentonica di un lago pertanto andranno tenute in considerazione le caratteristiche fisiche e chimiche dei sedimenti.

Nella Tabella 1 sono formulate ipotesi circa la risposta delle comunità a macroinvertebrati a pressioni ambientali di origine antropica in diverse zone o fasce lacustri. Le valutazioni si basano su osservazioni frammentarie, soltanto le caselle che si riferiscono all'acidificazione nella zona litorale e all'eutrofizzazione nella zona profonda si fondano su basi di dati consistenti, che tuttavia sono state sperimentate soprattutto in aree centro e nord europee (Solimini et al., 2006).

Si aggiunga che le comunità bentoniche a macroinvertebrati potrebbero essere influenzate dalle interazioni tra diversi altri impatti sulle attività umane (introduzione di specie esotiche, immissione di sostanze tossiche).

Tab. 1 - Risposta delle comunità a diversi impatti: i punti interrogativi indicano una incertezza nelle risposte

Zona	Eutrofizzazione	Idromorfologia	Acidificazione	Impatti combinati
Litorale	**	***	***	***?
Sublitorale	**?	**	**?	**?
Profonda	***	*	?	***?

*** risposte significative

** risposte rilevabili

* risposte minori

2. Scopo

Il presente documento definisce le modalità per il rilevamento dei macroinvertebrati finalizzato alla determinazione dello stato ecologico di un lago, utilizzando questi organismi come elementi di qualità biologica.

Il protocollo di campionamento per il monitoraggio qui proposto dovrà essere adattato alle diverse tipologie e pressioni, al fine di raccogliere dati che saranno funzionali alla definizione dell'indice di qualità basato sui macroinvertebrati.

3. Normativa di riferimento

E.U., 2000. Direttiva 2000/60/EC del Parlamento e del Consiglio Europeo del 23 Ottobre 2000 che stabilisce un protocollo per l'azione comunitaria in materia di acque. Official Journal of the European Communities L 327, 22.12.2000, 1-72.

4. Termini e definizioni

- stato ecologico:** espressione della qualità della struttura e del funzionamento degli ecosistemi acquatici associati alle acque superficiali;
- macroinvertebrati:** invertebrati facilmente visibili senza ingrandimento (>0.5 mm);
- transetto:** sezione tracciata sulla carta topografica del lago (da riva verso la massima profondità) lungo la quale si fissano le stazioni di campionamento;
- stazione:** punto del transetto in cui vengono prelevati i campioni.

5. Strumentazione e attrezzatura

5.1 In campo

- Dispositivi di protezione individuale¹;
- barca a motore;
- argano a mano (basse profondità) ed argano elettrico (elevate profondità);
- corda metrata;
- draga di Ekman, Petersen, Ponar, eventualmente dotate di messaggero;
- setaccio di maglia adeguata (250 – 300 μm);
- retini da plancton per esuvie di insetti, maglie 300-250 μm^2 ;
- retino immanicato e draga a slitta;
- navigatore GPS per localizzare la posizione;
- ecoscandaglio;

¹ Il campionamento e l'analisi in campo possono comportare dei rischi per gli operatori. Per tali motivi gli operatori che utilizzeranno questi protocolli dovranno essere formati per le attività di campionamento. Questo protocollo non ha lo scopo di definire i problemi sulla sicurezza associati al suo uso. È responsabilità degli Organi preposti all'utilizzo di definire i dispositivi più opportuni di protezione individuale e di individuare le azioni necessarie ad assicurare la sicurezza degli operatori secondo le disposizioni di legge.

Come testi di riferimento è possibile utilizzare le seguenti pubblicazioni: "APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio chimico nei laboratori delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006". e "APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006.

² I retini da plancton a bocca rotonda sono di difficile uso nella raccolta di esuvie, il retino immanicato di forma rettangolare appare più utile, anche per raccolte quantitative (es. su percorsi di misura conosciuta).

- fissativi³ : formalina 40% neutralizzata con carbonato di Ca; se il campione è esaminato entro pochi giorni dal prelievo si può ridurre l'uso della formalina (bastano 2-3 ml di formalina concentrata al 36 % aggiunti al campione), se invece si prevede di esaminare il campione dopo lungo tempo la formalina va aggiunta in quantità tale da avere alla fine una concentrazione compresa tra il 5-10 %.
Alcool 75-80% (L'alcool anche concentrato non conserva bene i campioni, può sostituire la formalina solo quando il detrito non è troppo abbondante. Gli Oligocheti fissati in alcool restano comunque fragili e tenderanno a rompersi facilmente).
- colorante: rosa bengala;
- contenitori in polietilene da 0,5, 1 e 2 litri a bocca larga (in numero pari ai campioni da raccogliere);
- pennarelli indelebili, penna a china, matite, etichette adesive.

Per campionamento chimico dell'acqua

- disco di Secchi;
- corda metrata per disco di Secchi;
- bottiglia per chimica;
- termometro a rovesciamento;
- corda metrata per bottiglia;
- bottiglie in vetro con tappo smerigliato e tagliato a becco di flauto per ossigeno;
- reagenti per O₂;
- bottiglie in polietilene della capacità di 1 litro per altre analisi.

Per campionamento sedimenti

- contenitori cilindrici per sedimenti di piccole dimensioni;
- spatola.

5.2 In laboratorio

- bacinelle bianche;
- lente da tavolo ($\varnothing \approx 200$ mm);
- microscopio stereoscopico che raggiunga almeno 60 ingrandimenti con oculari x10 e x20;
- microscopio ottico in trasmissione con obiettivi x4, x10, x20, x40, x60 e x100 con tavolino traslatore;
- provette per conservare ed etichette;
- bottigliette in vetro o plastica da 100-500 ml (con tappo e controtappo) per la conservazione delle provette di ogni singola stazione di campionamento;
- vetrini portaoggetto e coprioggetto ($\varnothing=10-12$ mm);
- pinzette;
- pennelli;
- pipette;
- aghi da dissezione;

³ Data la tossicità della formalina, tutte le operazioni che ne prevedono l'uso, dalla preparazione della formalina tamponata al riempimento dei barattoli contenenti i campioni, devono avvenire in laboratorio sotto cappa e sono, comunque, sottoposte a misure di sicurezza stringenti. I contenitori utilizzati, l'acqua di lavaggio ed i preparati, devono essere opportunamente smaltiti.

- liquidi per montaggio e diafanizzazione (Faure, glicerina, acido lattico, alcoli, acido acetico, alcool butilico, xylene, fenolo, balsamo, eukitt, ecc).

Per analisi granulometrica

- agitatore meccanico per sedimenti;
- serie di setacci Standard calibrati;
- pestello;
- mortaio;
- becker;
- acqua ossigenata;
- stufa;
- bilancia analitica;
- pennelli;
- contenitori cilindrici per sedimenti di piccole dimensioni;
- spatola.

6. Procedura di campionamento

6.1 Periodo di campionamento

Un programma di minima prevede che vengano effettuati due campionamenti annuali. Il primo deve essere effettuato durante il periodo di piena circolazione del lago a fine inverno-inizio primavera, prima che il lago vada incontro al processo di stratificazione termica estiva (ciò considerando che molti dei laghi italiani sono monomittici caldi, con circolazione inverno-primaverile e stratificazione estiva). Il secondo campionamento deve essere effettuato durante il periodo di massima stratificazione (fine-estate), quando il lago è presumibilmente nel peggiore stato ecologico.

In caso di laghi dimittici è da dare priorità al periodo di piena circolazione primaverile rispetto al periodo di circolazione autunnale in quanto in primavera più che in autunno si osserva una elevata diversità di specie; resta ferma la necessità di fare un secondo campionamento alla fine del periodo di massima stratificazione.

6.2 Scelta delle stazioni di campionamento

Il numero di transetti e delle stazioni viene stabilito caso per caso, tenendo conto di quanto suggerito nella Tabella 2. La scelta della posizione del transetto deve tenere conto della variabilità degli habitat lungo il perimetro del lago. Nei piccoli laghi, per i quali può essere previsto un unico transetto, questo deve essere scelto in modo da campionare l'habitat più esteso presente nel lago. A parità di altre condizioni si suggerisce di scegliere il transetto ove la pendenza è minore, perché in genere è più colonizzato rispetto ai siti dove la pendenza delle rive è elevata. Un'elevata pendenza può essere di serio ostacolo alla chiusura delle draghe usate (vedi paragrafo "Scelta strumento").

Per quanto riguarda i campionamenti nella zona litorale la scelta delle stazioni di campionamento può divenire più complessa e richiedere un numero più elevato di campioni in modo da coprire tutti i diversi mesohabitat, in presenza di diversi tipi di substrato e di

macrofite acquatiche. Si tenga conto che può essere necessario usare diversi strumenti di campionamento a seconda del mesohabitat considerato (vedi paragrafo “Scelta strumento”). La zona litorale è di particolare interesse nei laghi sottoposti a impatto idromorfologico, fluttuazioni di livello e cementificazione delle rive. Tali impatti vanno documentati in sede di campionamento sulla scheda di rilevamento e registrazione dati, come previsto dal Lake Habitat Survey (LHS) (Rowan et al., 2006).

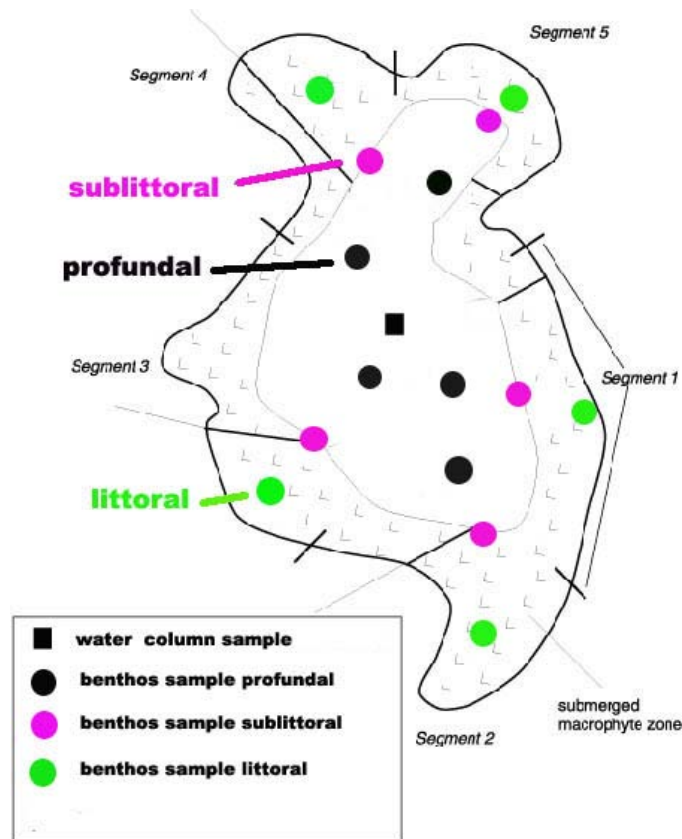


Fig. 1- Esempio di distribuzione delle stazioni di prelievo: sono indicati 5 transetti (Segment nella figura) ciascuno con 3 stazioni (verde, magenta, nero) più una stazione nel punto di massima profondità, ove è prevista un'analisi della colonna d'acqua (quadratino nero) per i parametri chimico-fisico-biologici (modificato da <http://www.epa.gov/owow/monitoring/tech/chap07.html>).

6.3 Scelta strumento

I campioni di benthos si effettuano nei fondi molli mediante una benna o draga. Differenti modelli di benna sono descritti nel sito:

<http://www.biosbcc.net/ocean/marinesci/01intro/tosamp.htm>

La draga di Ekman (Figura 2) ha una superficie di raccolta di ca. 225 cm². Tale draga è preferita a causa del suo minor peso, tuttavia in substrati sabbiosi o ricchi di detrito organico grossolano può non riuscire a penetrare nel sedimento e non chiude. Per queste situazioni esistono modelli di draga appesantiti. Tutti i tipi si chiudono con l'invio di un messaggio.

La draga di Ekman comunque è suggerita nella maggior parte dei casi.

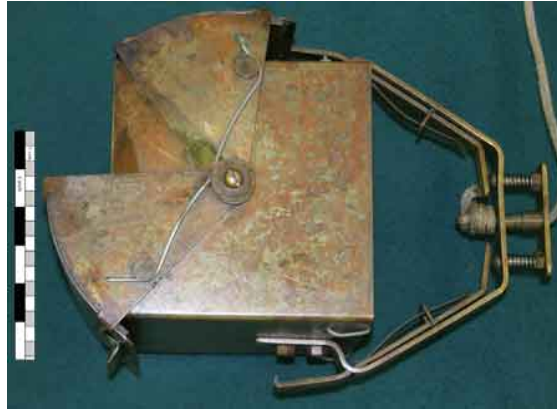


Fig. 2 - draga di Ekman

La draga di Petersen (Figura 3) ha una superficie di cattura di 400-574 cm² ed è stata in passato una delle più usate. E' più pesante ed è suggerita in substrati sabbiosi.



Fig 3 - draga di Petersen

La draga Ponar (Figura 4) è più usata attualmente della draga di Petersen. Come la precedente è scomoda da manovrare per il peso e le dimensioni. Essa copre un'area di 420 cm² e raccoglie uno strato di sedimento spesso ca. 10-15 cm. Ha il vantaggio che la chiusura è meno ostacolata dalla presenza di detrito, ha una più ampia superficie di cattura e non necessita di messaggero; ha lo svantaggio di pesare molto (20-30 Kg). Si suggerisce l'uso di una corda di grosso diametro (20-30 mm) per ridurre lo sforzo necessario per il suo sollevamento in mancanza di un argano; è invece consigliata quando si abbia a disposizione un argano che riduce lo sforzo di sollevamento.
Si veda il sito: <http://www.geneq.com/catalog/en/spgpd.html>



Fig. 4 - draga Ponar

Questi strumenti sono in grado di fornire misure quantitative (individui*m⁻²).

Gli strumenti per il campionamento della fauna litorale possono essere differenti. Bisogna prevedere la possibilità di avere un substrato con vegetazione e/o un substrato sabbioso, ciottoloso, con detrito organico grossolano. Come strumento di raccolta si usa in tal caso una rete a slitta con apertura rettangolare di 30 cm, altezza 15 cm e maglie da 250 µm. La rete si cala da un'imbarcazione e la si trascina sino a riva in direzione perpendicolare alla linea di costa, ovvero parallelamente a riva nel caso in cui si vogliono effettuare campionamenti a differenti profondità. In acque di profondità non superiore ad 0,50 m si può usare un retino immanicato identico a quello utilizzato nelle acque correnti per la raccolta dei macroinvertebrati bentonici, manovrandolo dalla barca in caso di sedimenti molli o direttamente da riva.

Nella zona litorale si può anche utilizzare un retino da plancton trascinato in orizzontale sul pelo dell'acqua in un punto sottovento lungo il perimetro di riva, al fine di campionare le esuvie di insetti acquatici lasciate dagli adulti che sfarfallano. Il metodo non richiede imbarcazione e può fornire abbondante materiale biologico che consente un'identificazione delle unità tassonomiche assai accurata. Il metodo è attualmente utilizzato con successo dall'UK Environmental Agency ed è utilizzato in diversi paesi europei e negli USA. Il metodo della raccolta delle esuvie di insetti merita particolare attenzione per la sua semplicità, rapidità e basso costo e consente di monitorare in breve tempo un elevato numero di stazioni.

In presenza di substrati a profondità intermedie (da -5 m a -25 m o più), con forte pendenza, in presenza di pareti rocciose, massi, ciottoli, banchi di macrofite e in generale in substrati ove è difficile campionare con una benna o draga, è necessario campionare mediante l'ausilio di squadre di subacquei. In questo caso i subacquei, muniti dell'attrezzatura standard adeguata alla profondità di campionamento e di una sacca a rete contenente dei contenitori da 100-500 ml, una spatola ed uno wet-notes, asportano da una superficie prestabilita (ad es. 30 x 30 cm) il substrato che viene riposto nei contenitori.

6.4 Campionamento

Nel redigere un piano di campionamento si deve tener conto della variabilità spaziale e temporale dei macroinvertebrati bentonici e degli impatti antropici a cui il lago è sottoposto (Tab. 1). Per esempio, in caso di eutrofizzazione, fermo restando un campionamento nella zona sublitorale, andrà anche campionata ed esaminata accuratamente la zona profonda, mentre nel caso di impatto idromorfologico solo la zona litorale.

Il tipo di sedimento (limoso, sabbioso, pietroso), la disponibilità di nutrimento (detrito organico fresco o già in avanzato stato di decomposizione), di ossigeno, la presenza di macrofite acquatiche nella zona fotica condizionano la struttura in specie, al di là dell'azione modificatrice indotta dall'impatto ambientale determinato dalle attività umane.

Il campionamento è di solito fatto scegliendo dei transetti, il cui numero da prevedere dipende dalla estensione del lago (oltre che dalla possibile diversificazione degli habitat). Ad esempio in un lago di 5 km² di superficie si suggeriscono 3 transetti (Figura 1, Tabella 2). Nei laghi più estesi il numero di transetti deve tener conto della morfologia e della estensione della linea di costa. Nei grandi laghi muniti di sottobacini il piano di campionamento deve prevedere ciascuno dei diversi sottobacini, specie se sottoposti a diverse pressioni antropiche. La distanza tra i transetti potrà essere ovviamente superiore ai 2-3 km. Orientativamente in un grande lago come il Maggiore si possono prevedere una quindicina di transetti che includano i sottobacini di maggiore interesse.

Lungo ogni transetto sono previste delle stazioni scelte in corrispondenza delle tre fasce o zone litorale, sublitorale, profonda (Figura 1). La zona litorale corrisponde alla zona eufotica (bene illuminata), compresa tra la linea di costa ed alcuni metri di profondità, ed in genere coincide con il limite di sviluppo delle macrofite sommerse (*Potamogeton*, *Chara*, etc.). La zona sublitorale corrisponde ad una zona più scarsamente illuminata e al metalimnio (= termoclinio estivo, quando il lago si trova nella condizione di massima stratificazione) o, nei laghi con buona trasparenza delle acque, si trova dopo il limite inferiore della fascia colonizzata da macrofite sommerse; spesso è una zona di deposito di conchiglie di molluschi (shell zone). La zona profonda corrisponde alla zona ipolimnica del lago, priva di illuminazione, in genere caratterizzata da sedimento fine.

Entro ogni stazione sono previsti più campioni replicati (min 3, max 5).

Tab. 2 - Indicazione orientativa del numero di transetti, stazioni e campioni replicati da prevedere in rapporto alla superficie del lago supposta circolare.

Superficie Km ²	N° Transetti	N° Stazioni	N° Campioni
<0,600	1	3	9
0,700-2,900	2	6	18
3,000-6,500	3	9	27
>6,600	4	12	36

La variabilità temporale è meno accentuata nel benthos che non nel plancton, ma bisogna tenere conto di una variabilità stagionale legata ai cicli biologici: molti Insetti acquatici sono monovoltini, vale a dire hanno un solo ciclo annuale, sfarfallano in primavera, subito dopo depongono le uova, le larve si accrescono raggiungendo le massime dimensioni alla fine della stagione invernale. Esistono però specie bi-voltine con 2 generazioni per anno, multi-voltine con più di due generazioni o semi-voltine con un ciclo biennale. Il tempo di generazione è più lungo a basse temperature.

Nella zona litorale la frequenza di campionamento può essere modificata in rapporto ai cicli biologici delle diverse specie nei diversi tipi lacustri ed alle fluttuazioni di livello del lago.

Sebbene meno accentuate sono da considerare anche variazioni tra anni, legate alle diverse vicende climatiche (piovosità, ventosità) osservabili nei diversi anni o legate al diverso impatto antropico nel corso degli anni.

6.5 Parametri di supporto al campionamento dei macroinvertebrati

Il campionamento per lo studio della fauna bentonica va abbinato necessariamente ad un campionamento della colonna d'acqua prelevata in centro lago. In situazioni di particolare interesse si può prevedere anche un prelievo di acqua nelle stesse stazioni previste per lo studio della fauna bentonica, su cui effettuare le medesime analisi richieste sulla colonna.

Sono necessarie le seguenti analisi:

Parametri fisico-chimici
alcalinità
conducibilità
pH
TP
TN
TOC
Clorofilla a
Ossigeno disciolto

La trasparenza viene misurata in superficie con il disco di Secchi.

Si consiglia anche, almeno nella fase iniziale di studio di un determinato lago, un campionamento di sedimento per l'analisi della granulometria e della sua composizione (contenuto in sostanza organica, carbonati, TP, TN, carbonio organico).

Prelievo per le analisi chimiche delle acque

Il prelievo d'acqua per lo studio dei parametri chimici di interesse se effettuato nelle stesse stazioni in cui si raccolgono i campioni per lo studio della fauna bentonica deve essere fatto prima del campionamento del benthos e almeno 1 metro al di sopra del punto di massima profondità, per evitare che il campione si "sporchi" con eventuale particellato portato in sospensione. Questo significa che, qualora il campionamento del benthos venisse effettuato a 3 m di profondità, il campionamento chimico abbinato dovrà essere effettuato a $3-1 = 2$ m di profondità. Per tale motivo si consiglia l'uso di un'ecosonda che fornisca un valore di massima della profondità nella stazione desiderata

6.6 Conservazione, trasporto dei campioni

Il campione di sedimento raccolto con la draga viene setacciato sul campo utilizzando un retino a base quadrata (Figura 5) o rettangolare (circa 50 x 70 cm di lato, 70 cm di altezza, con maglie da 250 μ m) al fine di liberare il campione dal detrito più fine. E' opportuno disporre di tre-quattro retini in modo da poter lavorare contemporaneamente sulle diverse repliche campionate per stazione.

Dato che in genere non è possibile esaminare il campione da vivo subito dopo i prelievi questo deve essere fissato sul posto in formalina al 10% con aggiunta di rosa bengala. Etichette esterne preparate con stampante laser devono essere sempre accompagnate da un'etichetta interna. Le etichette, se scritte a mano, devono essere scritte con penna a china o matita, non con penna a sfera, e devono riportare l'indicazione di località, stazione di rilevamento, data ed eventuali notazioni di identificazione.



Fig. 5 - Retino utilizzato per sciacquare i campioni

7. Procedure analitiche

7.1 Esame dei campioni e sottocampionamento

Il campione fissato sul campo in formalina viene sciacquato in laboratorio sotto cappa, per evitare il più possibile il contatto con i vapori di formalina, utilizzando un setaccio a 250 μm . L'esame viene fatto dapprima ad occhio nudo sul campione posto in bacinelle con fondo bianco in buone condizioni di luce, con l'aiuto di una grossa lente di ingrandimento (diametro 200 mm o più). Se il numero di animali è inferiore ai 300 individui è necessario l'esame dell'intero campione.

Il materiale identificato una volta separato dal detrito deve essere conservato per eventuali futuri controlli. Gli esemplari devono essere conservati in tubi di plastica o vetro di opportune dimensioni in alcool al 75% con un cartellino che indichi stazione e data di prelievo, eventualmente la specie e il nome dell'operatore che ne ha fatto la determinazione. Il tubo contenente gli animali va tappato con un tappo di cotone idrofilo imbevuto di alcool; tutti i tubi opportunamente chiusi devono poi essere riuniti in un unico contenitore a tenuta contenente alcool al 75%. Solo così si evita che gli esemplari si rompano in caso di trasporto o che vadano incontro ad essiccamento.

Il sottocampionamento è necessario quando il numero di animali catturati è molto elevato (più di 300 esemplari per campione) e deve essere limitato al conteggio delle specie più abbondanti (ad es. *Chaoborus flavicans*, *Limnodrilus hoffmeisteri*). E' comunque necessario l'esame dell'intero campione per il conteggio delle specie rare. Il sottocampionamento può essere fatto disponendo il campione in bacinelle suddivise in riquadri, contando solo alcuni riquadri scelti a caso, ovvero diluendo il campione con acqua ad un volume di ca. 5 - 10 litri. Il volume è accuratamente misurato usando un cilindro graduato. Il campione è poi posto in un secchio e accuratamente rimescolato, da esso si prelevano 5 - 10 aliquote da ca. 100 ml evitando che il particellato sospeso sedimenti. Il volume di ogni aliquota è accuratamente misurato in un cilindro graduato.

Vengono poi contati tutti gli individui presenti nell'aliquota. I valori sono poi rapportati al volume totale. Ad es. se il campione totale è diluito a 4500 ml e conto 47 individui della stessa specie in un'aliquota di 110 ml, il valore stimato per quella specie sarà: $47 \cdot 4500 / 110$. Il

numero di sottocampioni dipende dalla varianza stimata della specie nelle aliquote replicate. In genere per avere un intervallo fiduciale non troppo ampio è necessario fare almeno 6-10 sottocampioni.

E' opportuno controllare le aliquote allo stereomicroscopio a 10-30 ingrandimenti al fine di rilevare l'eventuale presenza di esemplari di piccole dimensioni, che potrebbero essere sfuggiti all'esame a occhio nudo. In presenza di essi (ad es. Chironomidi appartenenti ai generi *Parakiefferiella*, *Cladopelma*), qualora l'indice biotico ne preveda l'identificazione, sarà necessario esaminare l'intero campione allo stereomicroscopio a ca. 10 ingrandimenti.

L'esame del campione deve prevedere un'analisi tassonomica sufficientemente dettagliata, che consenta il calcolo della metrica utilizzata. In questa prima fase sperimentale, non essendo stato ancora proposto un indice biotico in via definitiva, si suggerisce di spingere l'analisi tassonomica fino al livello più basso consentito dalle chiavi di determinazione usate e dalle competenze degli operatori.

7.2 Preparazione dei vetrini

Per l'identificazione di alcuni taxa è necessario l'allestimento di preparati microscopici. Il materiale da preparare può essere diafanizzato in acido lattico (o KOH al 10 % per gli insetti) a freddo per alcune ore (lasciato tutta la notte) o a caldo su piastra elettrica o in stufa a 50-60 °C per pochi minuti se gli animali sono delicati (Oligocheti) o per più tempo per animali di grosse dimensioni (grossi Ditteri, Tricotteri).

Il materiale diafanizzato è poi lavato con acqua distillata e montato in liquido di Faure.

Il liquido di Faure ha la seguente composizione:

- idrato di cloralio 100 g;
- acqua distillata 150 g;
- glicerina 40 g;
- gomma arabica 60 g;
- timolo 2 g.

Preparazione del Faure: sciogliere a freddo il cloralio in acqua distillata, aggiungere la gomma arabica rimescolando con agitatore magnetico, aggiungere la glicerina. Filtrare prima dell'uso con una tela di nylon o polietilene, resistente agli acidi ed ai solventi, a maglie di apertura 100-110 µm al massimo.

Ogni preparato deve essere subito etichettato, indicando località, stazione, data di raccolta ed eventualmente il nome di chi ha determinato l'esemplare (Det.). Le etichette devono essere scritte con stampante laser o a mano, a china o a matita, mai con penne a sfera.

I preparati in Faure si conservano a lungo (anche per anni) ma non sono permanenti. Se si vogliono conservare i vetrini per un tempo illimitato bisogna disidratare gli esemplari con la serie degli alcoli o con un passaggio in acido acetico glaciale seguito da un passaggio in alcool butilico, eventualmente con un terzo passaggio in xylene+fenolo (3:1) utile per l'esame dei genitali degli Oligocheti. Infine gli esemplari si montano in resine (Balsamo del Canada, Eukitt, Euparal).

Per la identificazione spesso è necessario dissezionare alcune parti (pezzi boccali, estremità caudali, genitali ecc.). La dissezione si può fare in glicerina se poi si monta in Faure o in olio di cedro (dopo il passaggio in alcool butilico) se si monta in Balsamo. Per effettuare le dissezioni si veda la letteratura specialistica citata in bibliografia.

7.3 Controllo di qualità

Uno dei problemi più critici nell'utilizzo delle analisi biologiche è il controllo di qualità del dato sia per quanto riguarda l'accuratezza delle determinazioni tassonomiche, sia per quanto si riferisce all'accuratezza e precisione dei conteggi.

Si tenga conto che attualmente il lavoro del tassonomo non è soggetto a controlli tali che impediscano che talvolta vengano dati nomi diversi alla stessa specie o che a diverse specie venga dato lo stesso nome (ad es. specie appartenenti addirittura a diversi generi di Oligocheti tutte identificate come *Tubifex tubifex*). Il problema è più grave per le determinazioni di specie, mentre è meno rilevante per determinazioni di generi o famiglie ed è più grave per i taxa meno descritti a livello tassonomico. Il problema può essere risolto con la predisposizione di manuali di identificazione semplificati rispetto agli originali e bene illustrati, in modo che il loro uso risulti più facile, e con lo scambio di materiale tra diversi laboratori.

Per quanto si riferisce all'accuratezza e precisione nei conteggi si raccomanda di evitare l'uso di sottocampioni e di non ridurre il numero di campioni replicati al di sotto dei 3. E' inoltre opportuno che uno stesso campione scelto a caso venga esaminato da più operatori per un confronto.

Analisi dei sedimenti

Le analisi sui sedimenti lacustri vengono eseguite secondo quanto previsto dalle norme ISO. Le analisi dei sedimenti sono usate per la misura di sostanze prioritarie ad elevato rischio per l'ambiente acquatico (Direttiva 2000/60/CE, Art. 16, Alleg. X). In questi casi è opportuno che l'analisi dei macroinvertebrati bentonici sia fatta congiuntamente all'analisi dei sedimenti al fine di acquisire informazioni circa la risposta della comunità macrobentonica a situazioni di rischio da tossici.

Analisi chimiche delle acque

Per quanto riguarda le metodologie delle analisi chimiche si veda il manuale APAT, CNR-IRSA (2003).

8. Archiviazione dei dati

I risultati devono essere archiviati su supporto informatico con l'utilizzo di Microsoft EXCEL o preferibilmente di un database relazionale (ad es. Microsoft ACCESS).

Bibliografia

- AA. VV., coordinatore S. Ruffo. Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, Collana del progetto finalizzato 'Promozione della qualità dell'ambiente', 29 volumi, Verona 1977-1985.
- APAT, CNR-IRSA. 2003. Metodi Analitici per le acque. Manuale 29, Vol. I, II e III.
- Campaioli S., Ghetti P.F., Minelli A. & Ruffo S. 1994. Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane, Vol. I-II. Provincia Autonoma di Trento.
- Lencioni V., Marziali L. & Rossaro B., 2007 - I Ditteri Chironomidi: morfologia, tassonomia, ecologia, fisiologia e zoogeografia. Quaderni del Museo Tridentino di Scienze Naturali, 1, Trento, 172 pp.
- Rossaro B. 2005. Review of available information on lake macroinvertebrates in Italy, their use as lake quality indicators and in lake classification, scaricabile da: <http://users.unimi.it/~roma1999/rossaro.html>.
- Rowan J.S., Duck R.W., Carardine J., Bragg A.R., Cutler M.E.J. & Soutar I. 2006. Development of Technique for Lake Habitat Survey (Phase 2). Lake Habitat Survey for the United Kingdom. Field survey guidance manual. Scottish and Northern Ireland Forum for Environmental Research (SNIFFER). WFD Contract 42. Available for download from <http://www.sniffer.org.uk/search.asp>
- Sansoni G., 1998. Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati dei corsi d'acqua italiani. Provincia Autonoma di Trento: 191 pp.
- Solimini A., Free G., Donohue I., Irvine K., Pusch M., Rossaro B., Sandin L. & Cardoso A.C. 2006. Using benthic macroinvertebrates to assess ecological status of lakes current knowledge and way forward to support WDF implementation. Technical Report EUR. 22347 EN: 1-48, J.R.C., I.E.S., Ispra.
- Tachet H., Richoux P., Bournaud M. & Usseglio-Polatera P. 2000. Invertébrés d'eaux douces. Systématique, biologie, écologie. CNRS editions, Paris: 588 pp.
- Timm T. 1999. A Guide to Estonian Annelida. Estonian Academy Publishers: 207 pp.
- Wiederholm T. (ed.). 1983. Chironomidae of the Holarctic region. Keys and Diagnoses. Part I: Larvae. Entomologica Scandinavica, Supplement 19: 457 pp.
- Wiederholm T. (ed.). 1986. Chironomidae of the Holarctic region. Keys and Diagnoses. Part II: Pupae. Entomologica Scandinavica, Supplement 28: 482 pp.
- Wiederholm T. (ed.). 1989. Chironomidae of the Holarctic region. Keys and diagnoses. Part III: Adult males. Entomologica Scandinavica, Supplement 34: 532 pp.

Altre opere da consultare

Wiederholm T. 1980. Use of benthos in lake monitoring. *Journal of the Water Pollution Control Federation*, 52: 537-547.

Wiederholm T. 1984. Responses of aquatic insects to environmental pollution. In: Resh V.H. & Rosenberg D.M. (eds). *The ecology of aquatic insects*. Praeger, New York: 508-557.

Informazioni inerenti al campionamento del benthos lacustre sono reperibili in:
<http://www.epa.gov/owow/monitoring/tech/lakes.html>