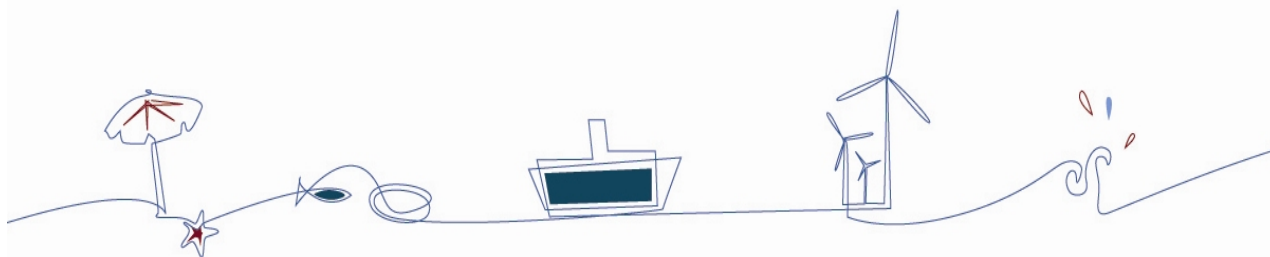


Report Nazionale sui Programmi di Monitoraggio per la Direttiva sulla Strategia Marina Art. 11, Dir. 2008/56/CE

Maggio 2020

Descrittore 2

**Le specie non indigene introdotte
dalle attività umane si attestano
a livelli che non hanno effetti
negativi sugli ecosistemi**



INDICE

STRATEGIA DI MONITORAGGIO. DESCRITTORE 2 – SPECIE NON INDIGENE

1. Descrizione della strategia di monitoraggio.....	1
2. Tempistiche per completare la copertura della strategia di monitoraggio.....	2
3. Criteri correlati.....	2
4. Target correlati.....	2
5. Misure correlate.....	3
6. Programmi di monitoraggio.....	3

PROGRAMMA DI MONITORAGGIO MAD-IT-D2-01, MWE-IT-D2-01, MIC-IT-D2-01 MONITORAGGIO PER IL RILEVAMENTO DI SPECIE NON INDIGENE.....	4
---	----------

SCHEDA METODOLOGICA/PROTOCOLLO MAD-IT-D2-01, MWE-IT-D2-01, MIC-IT-D2-01....	8
--	----------

Strategia di monitoraggio

DESCRITTORE 2 – SPECIE NON INDIGENE

1. Descrizione della strategia di monitoraggio

Il Programma di Monitoraggio per il rilevamento di specie non indigene (NIS) è finalizzato alla valutazione del raggiungimento del Buono Stato Ambientale (GES 2.1) e dei traguardi ambientali (T 2.1, T2.2 e T 2.4) stabiliti per il Descrittore 2 dal D.M. 15/2/2019, nonché alla verifica dell'efficacia delle misure.

Il monitoraggio prevede l'acquisizione di dati di presenza e di abbondanza di specie non indigene in aree associate ai principali vettori di introduzione, quali traffico marittimo e acquacoltura. I dati di presenza relativi alle specie non indigene di nuova introduzione saranno utilizzati ai fini della valutazione del GES e contribuiranno al raggiungimento dei traguardi ambientali T2.1 e T2.4, mentre i dati di abbondanza consentiranno valutazioni relative alla invasività delle specie di interesse per lo sviluppo di ulteriori indicatori e per il raggiungimento del Target T 2.3.

Le aree di indagine, in ciascuna sottoregione, saranno scelte in funzione della presenza delle attività antropiche che maggiormente favoriscono l'entrata di specie non indigene: 1) le aree portuali di categoria 2 classe 1, in relazione alla maggiore frequenza di imbarcazioni che effettuano rotte internazionali a cui sono associate le vie di introduzione riconducibili alla categoria *"transport stowaway"* (*ship fouling, ballast water, ship hitchhiker*); 2) impianti di molluschicoltura, dove avvengono frequenti movimentazioni e importazioni di lotti di bivalvi a cui è associata prevalentemente la via di introduzione *"transport contaminant"* (*contaminant on animals*) e, in misura minore, *"release in nature"*. Le categorie delle vie di introduzione sono riportate secondo la definizione contenuta nel documento della CBD, 2014 (*Pathways of introduction of invasive species, their prioritization and management*). Il numero di aree selezionate dovrà essere adeguato a rappresentare l'intera sottoregione sulla base della caratterizzazione delle aree di indagine e dei chilometri di costa (che per ogni sottoregione corrispondono a: MAD-IT 2041 km, MWE-IT 4725 km, MIC-IT 1509 km).

Per la caratterizzazione delle aree di indagine saranno restituite, per quanto riguarda i porti, le informazioni relative a intensità del traffico marittimo e rotte ricavate dai dati AIS e per gli impianti di molluschicoltura le informazioni relative alle importazioni e i movimenti dei lotti di molluschi o, in assenza di queste, le informazioni relative alle produzioni.

In ciascuna area di indagine verranno effettuati i campionamenti per il monitoraggio delle componenti planctonica (fitoplancton, mesozooplancton, macrozooplancton) e bentonica (macrobenthos, epimegabenthos).

In aggiunta al campionamento standard, si ritiene strategico integrare il monitoraggio con analisi del DNA ambientale in un'area portuale di maggiore rilevanza per ciascuna macroarea. L'identificazione tassonomica basata sul metabarcoding del DNA ambientale si sta sempre più

utilizzando come strumento complementare ai protocolli standard; tra i vantaggi riconosciuti a queste tecniche vi è la possibilità di rilevare la presenza di specie che possono sfuggire ai monitoraggi tradizionali in quanto rappresentate da un basso numero di individui o in stati di sviluppo difficilmente riconoscibili su base morfologica, tale caratteristica risulta particolarmente rilevante ai fini di un rilevamento precoce di specie non indigene.

2. Tempistiche per completare la copertura della strategia di monitoraggio

- ✓ *un monitoraggio adeguato sarà attuato entro luglio 2020 (data per l'aggiornamento dei programmi di monitoraggio);*

3. Criteri correlati

Criterio primario D2C1:

viene ridotto al minimo e, se possibile, a zero, il numero di specie non indigene di nuova introduzione nell'ambiente mediante attività umane, per ciascun periodo di valutazione (6 anni) misurato dall'anno di riferimento indicato per la valutazione iniziale ai sensi dell'articolo 8, paragrafo 1, della direttiva 2008/56/CE. Gli Stati membri stabiliscono il valore di soglia per quanto riguarda il numero di nuove introduzioni di specie non indigene, attraverso la cooperazione regionale o sottoregionale.

4. Ges e Target correlati

G 2.1 È ridotto al minimo il numero di specie non indigene di nuova introduzione in aree associate ai principali vettori di introduzione

T 2.1 Entro il 2020 tutti i porti ed i terminali di categoria 2 classe 1 sono dotati di un sistema di “early warning” per la tempestiva rilevazione della presenza di specie non indigene invasive e la segnalazione di allarme alle autorità competenti

T 2.2 Sono implementati i sistemi di tracciabilità di tutte le importazioni, traslocazioni e spostamenti di specie non indigene in impianti di acquacoltura come previsto dal Regolamento 708/2007 e successive modifiche

T 2.3 Sono attivati sistemi di risposta da parte delle Autorità competenti in seguito a segnalazioni di specie invasive in aree portuali e in zone destinate all’acquacoltura.

T 2.4 Sono ridotte le lacune conoscitive in merito alle principali vie di introduzione e vettori

5. Misure correlate

Elenco delle misure incluse nel “Programma nazionale di misure” (DPCM del 10 ottobre 2017) con diretta connessione al Descrittore 2

Codice misura			Nome della misura
Mediterraneo Occidentale	Mar Adriatico	Ionio e Medit. Centrale	
MWEIT-M040	MADIT-M037	MICIT-M037	Misure per la protezione degli habitat acquatici dai rischi derivanti dall'impiego di specie alloctone in acquacoltura
MWEIT-M041	MADIT-M038	MICIT-M038	Misure per la mitigazione degli effetti negativi sulla biodiversità causati dall'introduzione e dalla diffusione delle specie invasive non autoctone
MWEIT-M042	MADIT-M039	MICIT-M039	Misure per il controllo delle specie aliene invasive
	MADIT-M040		WFD18 Misure di gestione della flora e fauna autoctona protetta
	MADIT-M041		Misure per il controllo e la gestione delle acque di zavorra
MWEIT-M043	MADIT-M042	MICIT-M040	Misure per il controllo e la gestione delle introduzioni e traslocazioni di specie aliene ai fini di acquacoltura

Elenco delle nuove misure incluse nel “Programma nazionale di misure” (DPCM del 10 ottobre 2017) con diretta connessione al Descrittore 2

Codice misura			Nome della misura
Mediterraneo Occidentale	Mar Adriatico	Ionio e Medit. Centrale	
MWEIT -M045-NEW8	MADIT - M044-NEW8	MICIT -M042-NEW8	Istituzione di un National Focal Point per specie acquatiche nocive e specie non indigene

6. Programmi di monitoraggio

Programma di monitoraggio	Componenti monitoraggio	Codice di programma
Monitoraggio per il rilevamento di specie non indigene	Variabili chimico-fisiche	MAD-IT-D2-01 MWE-IT-D2-01 MIC-IT-D2-01
	Composizione quali-quantitativa delle comunità fitoplanctoniche	
	Composizione quali-quantitativa delle comunità mesozooplanctoniche	
	Composizione quali-quantitativa delle comunità macrozooplanctoniche	
	Composizione quali-quantitativa delle comunità macrobentoniche	
	Composizione quali-quantitativa delle comunità epimegabentoniche	

Programma di monitoraggio MAD-IT-D2-01, MWE-IT-D2-01, MIC-IT-D2-01 Monitoraggio per il rilevamento di specie non indigene

1. Programma di monitoraggio

Monitoraggio per il rilevamento di specie non indigene

MAD-IT-D2-01

MWE-IT-D2-01

MIC-IT-D2-01

2. Descrizione del Programma di monitoraggio

Il programma di monitoraggio per le specie non indigene intende valutare il numero di nuove introduzioni rispetto al ciclo di monitoraggio precedente (2015-2020) in ciascuna sottoregione ai fini della valutazione del raggiungimento del GES. Inoltre, i dati nel loro complesso contribuiscono al raggiungimento dei traguardi ambientali e, per quanto riguarda i dati di abbondanza potranno essere utili per la definizione di nuovi indicatori.

In ciascuna sottoregione, le aree di indagine relative ai porti saranno, in linea di massima, le stesse di quelle monitorate nel ciclo precedente (2015-2020) al fine di consentire un confronto tra i diversi cicli di monitoraggio. Per quanto riguarda gli impianti di molluschicoltura, si stima di individuare 2 impianti per sottoregione, selezionati sulla base delle informazioni relative alla frequenza di movimentazione dei lotti e/o alla produzione e in aree sufficientemente distanti da aree portuali per facilitare l'assegnazione delle NIS al vettore.

Il monitoraggio interessa le componenti planctoniche (fitoplancton, mesozooplancton, macrozooplancton) e bentoniche (macrobenthos, epimegabenthos).

Al fine di valutare la variabilità temporale della matrice biotica nelle aree di indagine, i campionamenti per la componente bentonica di fondo mobile saranno condotti semestralmente, in primavera e autunno, mentre quelli per la componente planctonica avranno cadenza bimestrale. Il monitoraggio dei fondi duri, sia mediante grattaggio che mediante pannelli sarà semestrale.

Data l'importanza di giungere ad una determinazione tassonomica fino al livello specie, si ritiene opportuno poter integrare l'analisi dei campioni basata su metodologie morfologiche tradizionali con strumenti molecolari.

3. Collegamento ai programmi di altre Direttive e/o accordi internazionali

Specificare se questo programma di monitoraggio contribuisce ad altre normative unionali, e/o accordi internazionali (incluso le Convenzioni regionali).

- Regolamento (UE) n. 1143/2014 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 22 ottobre 2014, recante disposizioni volte a prevenire e gestire l'introduzione e la diffusione delle specie esotiche invasive
- Regolamento (CE) N. 708/2007 del Consiglio dell'11 giugno 2007 relativo all'impiego in acquacoltura di specie esotiche e di specie localmente assenti
- UNEP MAP EcAp

4. Cooperazione regionale

La cooperazione regionale viene condotta in ambito Convenzione di Barcellona, Programma MAP dell'UNEP.

5. Intervallo temporale

2021-2026

6. Copertura spaziale

- ✓ "Acque costiere (WFD)"
- ✓ "Acque territoriali"

7. Marine Reporting Unit

ADRIATIC SEA subregion (MAD)
WESTERN MEDITERRANEAN SEA subregion (MWE)
IONIAN SEA AND CENTRAL MEDITERRANEAN SEA subregion (MIC)

8. Scopo del programma di monitoraggio

Lo scopo del programma di monitoraggio è l'acquisizione dei dati sulla presenza e abbondanza di specie non indigene in aree associate ai principali vettori di introduzione e si inquadra nelle seguenti tematiche:

- ✓ "Pressioni nell'ambiente marino"
- ✓ "Attività umane che causano le pressioni"
- ✓ "Efficacia delle misure"

9. Tipo di monitoraggio

- ✓ Campionamento *in situ* in aree portuali e impianti di molluscoltura

10 Metodo di monitoraggio

Il monitoraggio riguarda l'elemento "specie" criterio D2C1

Parametro monitorato

Elenco delle specie e abbondanza relativa

Protocollo di monitoraggio

In ciascuna stazione di campionamento vengono rilevati i dati di temperatura e salinità lungo la colonna d'acqua con l'utilizzo di sonda multiparametrica e il dato di trasparenza dell'acqua con il disco di Secchi. Contestualmente ai campionamenti di benthos viene determinata la granulometria con individuazione delle seguenti 4 classi: ghiaia, sabbia, silt e argilla.

Per la determinazione dell'elenco delle specie e della relativa abbondanza verranno effettuati campionamenti specifici per i diversi gruppi tassonomici: il fitoplancton tramite retino e bottiglia Niskin; il mesozooplancton attraverso pescate verticali tramite un retino con vuoto di maglia pari a 200 µm, a partire da un metro al di sopra del fondale fino alla superficie; il macrozooplancton tramite censimento visivo con osservazioni da bordo o da banchina. Il macrobenthos di substrato duro attraverso grattaggio di superfici e posizionamento di pannelli in alcune aree pilota; il macrobenthos di substrato mobile mediante l'impiego della benna lungo ogni transetto. L'epimegabenthos vagile attraverso l'utilizzo di nasse, previa autorizzazione da parte della capitaneria di porto.

La determinazione tassonomica deve prioritariamente raggiungere il livello di specie.

Frequenza di campionamento

- ✓ Bimestrale per la componente planctonica
- ✓ Semestrale per la componente bentonica di fondo duro rilevata tramite grattaggio e quella di fondo mobile, biennale per la componente bentonica associata ai pannelli

Controllo della qualità del dato

I dati di monitoraggio sono raccolti secondo standard informativi elaborati e condivisi con i soggetti attuatori che definiscono le informazioni da trasmettere in termini di formato (testo, numerico, data,...), valori ammissibili secondo liste predefinite (liste di contaminanti, specie, habitat, etc...), univocità dei codici utilizzati e relazione tra oggetti (stazioni/campioni, area/sito/transetto, etc...). Un primo livello di controllo formale della qualità del dato viene effettuato in automatico sul SIC – Sistema Informativo Centralizzato rispetto alla conformità dei dati forniti rispetto a quanto richiesto dallo standard informativo. Un secondo livello di controllo della qualità si avvale di strumenti di analisi statistica volti ad identificare eventuali valori anomali o fuori scala, rimettendo al giudizio esperto il controllo di qualità complessivo del dato. Nel secondo livello ci si avvale di criteri di valutazione condivisi con i soggetti attuatori.

11 Indicatore associato al programma di monitoraggio

Numero di specie non indigene di nuova introduzione in aree associate ai principali vettori di introduzione

12 Accesso ai dati

<http://www.db-strategiamarina.isprambiente.it/app/#/>

SCHEDA METODOLOGICA/PROTOCOLLO MAD-IT-D2-01, MWE-IT-D2-01, MIC-IT-D2-01

Scelta delle aree di indagine¹

Le aree di indagine per il monitoraggio delle specie non indigene sono quelle potenzialmente a rischio di introduzione di specie non indigene, ossia:

- terminali portuali di categoria 2, classe 1 (ossia i porti marittimi nazionali di rilevanza internazionale)
- impianti di molluschicoltura

Aree portuali

Al fine di valutare il rischio di nuove introduzioni si rende necessaria un'indagine sul traffico portuale dei principali porti italiani di categoria 2, classe 1 che tenga conto delle rotte del traffico navale e del numero di navi e viaggi per ogni rotta (dati disponibili presso le Autorità Portuali), anche sulla base dei dati AIS (Automatic Identification System) e attraverso la compilazione del Ballast Water Reporting Form.

Sulla base dei dati provenienti dal primo ciclo di monitoraggio della strategia marina, si ritiene opportuno, in linea di massima, proseguire i campionamenti nei porti precedentemente considerati al fine di consentire un confronto tra i diversi cicli di monitoraggio.

Nei terminali portuali di categoria 2 classe 1 selezionati deve essere individuato un numero di stazioni di campionamento che sarà stabilito in funzione delle dimensioni della struttura. All'interno di ciascuna area portuale, il campionamento deve essere eseguito in almeno 2 stazioni ove si ritiene sia presente la pressione dovuta alle specie non indigene (NIS).

Le stazioni di campionamento devono essere individuate tenendo in considerazione la posizione delle zone interessate dalle operazioni navali che possono essere connesse al rischio di introduzione di NIS, in particolare:

- Zone di attracco dove avviene il carico e lo scarico delle merci;
- Aree dove le acque di zavorra vengono scaricate.

Il posizionamento delle stazioni di indagine deve avvenire tenendo conto anche delle seguenti informazioni:

- caratteristiche del traffico portuale (disponibili presso le Autorità Portuali);
- inquadramento ambientale dell'area in esame;

¹ Per area di indagine si intende un porto o un impianto di molluschicoltura ove effettuare il campionamento per il rilevamento delle specie non indigene. All'interno dell'area di indagine vanno individuate le stazioni di campionamento.

- condizioni idrodinamiche rilevate all'interno del porto e lo scambio di acqua fra porto e aree circostanti. Nel caso in cui in un porto vengano campionate soltanto due stazioni, è auspicabile che una stazione sia interna e l'altra esterna in un'area limitrofa al porto.

Le stazioni di campionamento devono essere posizionate, in via preferenziale, nei punti in cui, sulla base delle suddette informazioni, vi sia la massima probabilità di rinvenire specie non indigene.

Impianti di molluschicoltura

Al fine di selezionare in modo opportuno gli impianti di molluschicoltura da monitorare, in particolare relativamente alla mitilicoltura, si rende necessario acquisire i dati relativi alle importazioni e alle movimentazioni dei lotti di allevamento, in assenza di tali informazioni la selezione degli impianti potrà essere fatta sulla base della produzione degli impianti.

E' opportuno selezionare gli impianti di mitilicoltura in aree sufficientemente distanti da aree portuali per facilitare l'assegnazione delle NIS al vettore.

E' auspicabile la scelta di almeno 2 impianti per sottoregione; per ogni impianto devono essere monitorate almeno 2 stazioni ove si ritiene sia presente la pressione dovuta alle NIS in corrispondenza del modulo di allevamento tenendo conto delle condizioni trofiche dell'area (ad es. evitando zone di anossia).

Strategia di campionamento nell'area di indagine

Il presente protocollo di monitoraggio è pianificato per valutare il buono stato ecologico per il D2 che viene raggiunto quando "È ridotto al minimo il numero di specie non indigene di nuova introduzione in aree associate ai principali vettori di introduzione", attraverso l'analisi delle componenti planctonica e bentonica. I dati che si otterranno attraverso il monitoraggio saranno inoltre utili ai fini delle azioni di "early warning" contemplate nel T 2.1 (Entro il 2020 tutti i porti ed i terminali di categoria 2 classe 1 sono dotati di un sistema di "early warning" per la tempestiva rilevazione della presenza di specie non indigene invasive e la segnalazione di allarme alle autorità competenti) e per il raggiungimento del T 2.4 (Sono ridotte le lacune conoscitive in merito alle principali vie di introduzione e vettori).

Frequenza di campionamento

Per la componente planctonica (Fitoplancton, Mesozooplancton, Macrozooplancton) il monitoraggio dovrà essere effettuato con cadenza bimestrale.²

² la componente planctonica potrebbe essere esclusa dai campionamenti nelle aree di indagine in mare aperto (es. impianti di mitilicoltura off-shore) poiché di difficile attribuzione al vettore

Per la componente bentonica (Macrobenthos di fondo mobile, Epimegabenthos) il monitoraggio dovrà essere effettuato con cadenza semestrale, considerando quali stagioni la primavera e l'autunno.

Per quanto riguarda il monitoraggio dei fondi duri è auspicabile un monitoraggio all'inizio dell'estate e dell'autunno al fine di aumentare la probabilità di campionare specie non indigene solitamente termofile che reclutano nei periodi più caldi. Le periodicità dei grattaggi e della messa in posa/raccolta dei pannelli è suggerita nella seguente tabella:

Metodica	Messa in posa	1° campionamento (T1)	2° campionamento (T2)
Grattaggio	-	metà luglio	metà ottobre
Pannelli	metà aprile (6 moduli)	metà luglio (3 moduli)	metà ottobre (3 moduli)

Strumenti di campionamento e indagine

	Parametro	Strumento di indagine	Metodologia di riferimento
Variabili chimico-fisiche	Temperatura	Sonda multiparametrica	Metodo come da DM 260/2010: Metodologie analitiche di riferimento ICRAM-MATTM per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001-2003)
	Salinità		
	Trasparenza	Disco di Secchi	
	Granulometria	Granulometro/setaccio	

Composizione quantitativa delle comunità fitoplanctoniche	quali-delle	Elenco delle specie e abbondanza relativa	Microscopio ottico invertito. Eventuale integrazione con approccio molecolare	
Composizione quantitativa delle comunità mesozooplanctoniche			Stereomicroscopio/ Microscopio ottico Eventuale integrazione con approccio molecolare	
Composizione quantitativa delle comunità macrozooplanctoniche	quali-delle	Elenco delle specie e abbondanza stimata	Visual census/ GPS. Eventuale integrazione con approccio molecolare	
Composizione quantitativa delle comunità macrobentoniche	quali-delle	Elenco delle specie e abbondanza relativa	Stereomicroscopio e/o Microscopio ottico. Eventuale integrazione con approccio molecolare	
Composizione quantitativa delle comunità epimegabentoniche			Stereomicroscopio/ Microscopio ottico. Eventuale integrazione con approccio molecolare	

Metodo di campionamento

RILEVAMENTO DEI PARAMETRI NELLE STAZIONI DI CAMPIONAMENTO

Parametri abiotici

In ciascuna stazione di campionamento devono essere rilevati i dati di temperatura e salinità lungo la colonna d'acqua, acquisiti con l'utilizzo di sonda multiparametrica e il dato di trasparenza dell'acqua valutato con il disco di Secchi. La granulometria, per i campionamenti di benthos, verrà valutata attraverso l'individuazione delle seguenti 4 classi: ghiaia, sabbia, silt e argilla.

DETERMINAZIONE TASSONOMICA DELLE COMUNITÀ

Campionamento

Fitoplancton

Il campionamento della componente fitoplanctonica viene effettuato in ogni stazione sia con retino sia utilizzando la bottiglia Niskin.

Retino.

Per la retinata viene utilizzato un retino con vuoto di maglia pari a 20 μm . Nella stazione viene effettuata una calata verticale dal fondo alla superficie. Il retino deve essere sciacquato con acqua di mare al fine di recuperare tutto il campione.

Un subcampione della retinata del volume pari a 250 ml deve essere trasferito in una bottiglia di vetro scura opportunamente etichettata e conservato a bassa temperatura.

Bottiglia Niskin

Il prelievo con bottiglia Niskin viene eseguito alla profondità di -0,5 m e un subcampione viene trasferito successivamente in una bottiglia di vetro scura opportunamente etichettata e conservato a bassa temperatura.

Mesozooplancton

Il campionamento viene effettuato attraverso pesche verticali tramite un retino con vuoto di maglia pari a 200 μm , a partire da un metro al di sopra del fondale fino alla superficie. La velocità di recupero del retino deve essere approssimativamente 1 m/s.

Macrozooplancton

Il campionamento del macrozooplancton (cnidari, ctenofori e taliacei) dovrà essere condotto tramite censimento visivo con osservazioni da bordo o da banchina, identificando e conteggiando gli esemplari avvistati e registrandone le coordinate geografiche.

Il rilevamento del macrozooplankton può essere effettuato in qualsiasi momento contestualmente ai campionamenti delle altre componenti, registrando le coordinate del punto fisso di avvistamento o del transetto e stimandone l'abbondanza.

Macrobenthos di substrato duro

Il campionamento di macrobenthos di substrato duro sarà effettuato attraverso grattaggio di superfici e posizionamento di pannelli.

Grattaggio di superfici

In ciascuna area di indagine il campionamento deve essere effettuato lungo 3 transetti verticali, distanti tra loro approssimativamente 15 metri, su strutture preesistenti opportunamente identificate (ormeggi, pontili, piloni, banchine).

In corrispondenza di ogni transetto devono essere posizionate 2 stazioni di campionamento poste a diverse profondità. Il campionamento viene realizzato tramite l'impiego di un operatore subacqueo, utilizzando la tecnica del grattaggio. Tale tecnica consiste nel rimuovere accuratamente tutti gli organismi presenti, sia macrozoobentonici sia macroalgali all'interno del quadrato di campionamento di superficie pari a 0.1 m² per mezzo di una piccozza e/o di uno scalpello e un mazzuolo e/o di una spatola.

Gli organismi rimossi da ciascun quadrato vanno raccolti in un sacchetto e costituiscono il campione da sottoporre ad analisi quali-quantitativa.

Posizionamento di pannelli

L'uso di pannelli in PVC può essere considerato in ambito di attività pilota nelle aree portuali (almeno un'area per sottoregione). Negli impianti di molluschicoltura va considerato l'uso di pannelli nell'impossibilità di campionare su substrato duro.

Sarà necessaria la costruzione di moduli da immergere come illustrato nella figura 1

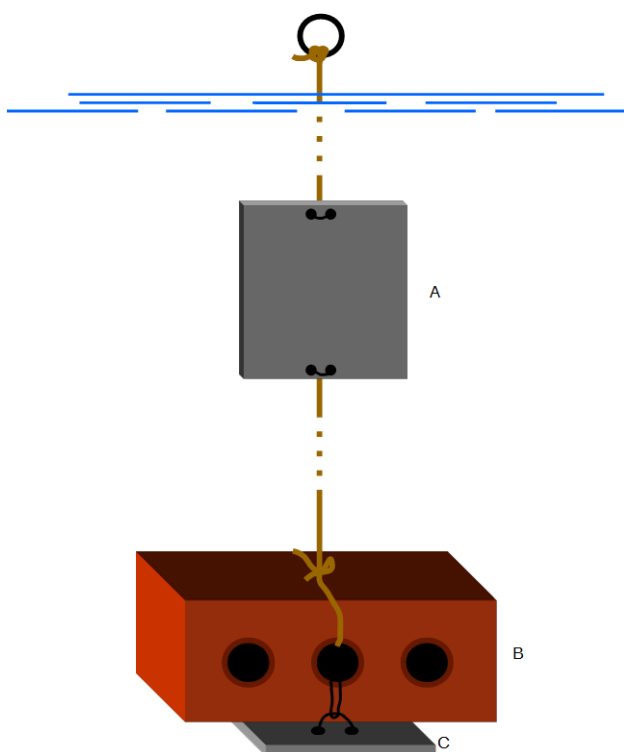


Figura 1: modulo per il monitoraggio mediante pannelli

DESCRIZIONE DEL MODULO

Ogni modulo è costituito da un mattone di zavorra (B), sotto il quale dovrà essere posizionato un pannello in PVC (15 x 15 cm) (C), la cui faccia rivolta verso il basso dovrà essere analizzata. La zavorra sarà legata mediante una cima alla banchina/pontile. Lungo la stessa cima sarà posizionato un ulteriore pannello (A). La distanza fra (A) e (B) dovrà essere di 50 cm, mentre la distanza tra (C) e il fondo potrà variare in funzione dei siti.

PANNELLO A

Il pannello (A) sarà necessario per l'analisi della sola componente macroalgale, essendo esposto alla luce rispetto al pannello (C). Qui andranno classificate solo le macroalghe esprimendo l'abbondanza come percentuale di copertura.

PANNELLO C

Il pannello (C) sarà necessario per le analisi quali-quantitative di invertebrati sessili e vagili. Qui andrà classificata e contata l'intera comunità esprimendo l'abbondanza come percentuale di copertura per organismi coloniali, e numero di individui per organismi solitari (vedi paragrafo Analisi dei campioni).

POSIZIONAMENTO MODULI

Si consiglia di posizionare il modulo con il primo pannello a circa 50 cm dal limite minimo di marea.

I moduli verranno fissati su strutture preesistenti opportunamente identificate (ormeggi, pontili, piloni, banchine nelle aree portuali; sistemi di galleggiamento negli impianti di mitilicoltura) e soggette a condizioni ambientali differenti (i.e. esposizione correnti/luce). Un totale di 6 moduli verranno posizionati in tre siti (2 moduli per ogni sito), la distanza tra i 3 siti dovrà essere minimo di 15 metri.

RECUPERO MODULI

Dopo la tempistica prevista i pannelli dovranno essere recuperati in concomitanza del campionamento mediante grattaggio secondo la seguente periodicità

Metodica	Messa in posa	1° campionamento (T1)	2° campionamento (T2)
Grattaggio	-	metà luglio	metà ottobre
Pannelli	metà aprile (6 moduli)	metà luglio (recupero 3 moduli)	metà ottobre (recupero ultimi 3 moduli)

Il recupero del mattone (B) e del pannello ad esso legato (C) dovrà essere effettuato mediante retino con maglie da 0.5 mm, in modo da non perdere la fauna vagile associata, che dovrà essere poi identificata e conteggiata. Una volta recuperato il pannello (C), si procederà a staccarlo dalla zavorra ed a posizionarlo in vivo in una vaschetta piena di acqua di mare per effettuare foto ad alta risoluzione della faccia che dovrà essere analizzata. Dopo aver effettuato la foto, posizionare il pannello in un sacchetto/contenitore con il fissativo (e.g. EtOH al 80%, o formaldeide al 4-8 %, nel caso non sia possibile esaminare i campioni nei tempi su indicati, questi devono essere fissati secondo le modalità indicate nel Rapporto Ispra 278/2018 Sostanze ozono lesive e/o cancerogene in uso nei laboratori SNPA), ricordandosi di recuperare la fauna associata fuoriuscita dal pannello e rimasta nell'acqua della vaschetta anche tramite l'aiuto di un colino.

Il pannello (A) dovrà essere fotografato in vivo e fissato (e.g. EtOH al 80%, o formaldeide al 4-8 %, nel caso non sia possibile esaminare i campioni nei tempi su indicati, questi devono essere fissati secondo le modalità indicate nel Rapporto Ispra 278/2018 Sostanze ozono

lesive e/o cancerogene in uso nei laboratori SNPA) e sarà necessario per l'analisi della componente macroalgale.

Macrobenthos di substrato mobile

In ciascun sito, il campionamento deve essere effettuato lungo 3 transetti, disposti secondo il gradiente batimetrico, se presente, e posizionati ad una distanza reciproca compresa tra 15 e 30 metri. Lungo ogni transetto il campionamento deve essere effettuato, mediante l'impiego della benna, in 2 stazioni posizionate ad una distanza reciproca compresa tra 15 e 30 metri. In ogni stazione deve essere prelevato un campione di macrobenthos da sottoporre ad analisi quali-quantitativa. I dati andranno restituiti per singola stazione. Per gli impianti di molluschicoltura è necessario evitare le zone anossiche, normalmente presenti sotto i filari.

La metodologia di raccolta e analisi dei campioni di macrobenthos è riportata in *Metodologie analitiche di riferimento ICRAM-MATTM per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001-2003)*, come di seguito modificata:

- la benna per il campionamento deve essere una van Veen standard con superficie di presa pari a 0.1 m² e volume pari a 16 litri;

- la bennata deve raccogliere un volume minimo pari almeno al 50% del volume totale della benna per i campionamenti in corrispondenza di fondali con sedimenti sabbiosi e pari almeno al 75% del volume totale della benna per i campionamenti in corrispondenza di fondali fangosi;

- il setaccio per la separazione degli organismi macrozoobentonici dal sedimento deve avere maglia di 0,5 mm.

il campione deve essere preferibilmente fissato a bordo

Epimegabenthos vagile

I campionamenti di specie epibentoniche vagili possono essere effettuati, previa autorizzazione da parte delle capitanerie di porto, attraverso l'utilizzo di nasse posizionate durante le ore serali in punti opportunamente selezionati per un tempo ritenuto sufficiente, almeno 12 ore.

CAMPIONAMENTO PER LA DETERMINAZIONE TASSONOMICA DELLE COMUNITÀ TRAMITE ANALISI DEL DNA AMBIENTALE

Si ritiene strategico integrare il monitoraggio standard con una attività pilota che prevede l'analisi del DNA ambientale in un'area portuale di maggiore rilevanza per ciascuna macroarea. A tal fine può essere prevista la formazione del personale tecnico per la fase di raccolta, conservazione e spedizione del campione. Le successive analisi dei campioni, che consistono nel metabarcoding di ampi gruppi tassonomici possono essere affidate a un soggetto pubblico o privato dotato delle adeguate facilities e expertise (Next Generation Sequencing NGS e supporto bioinformatico).

Raccolta dei campioni per l'analisi dell'eDNA

Il campionamento prevede la filtrazione di campioni d'acqua in situ tramite l'utilizzo di filtri idonei (es. VigiDNA®Filter Kit) e siringhe sterili monouso e la raccolta di campioni di sedimento. Il numero di campioni e repliche può essere influenzato da vari fattori, la metodologia di seguito riportata è indicativa e la più comunemente utilizzata. In ciascuna area portuale il campione d'acqua viene preso da due o tre altezze della colonna d'acqua. Ogni campione d'acqua raccolto è di circa 500-1000 ml. I campioni vengono replicati in tre punti sufficientemente distanti dell'area portuale. I tre filtri ottenuti vengono conservati in una soluzione idonea (soluzione Longmire o contenuta nel kit di filtrazione) a temperatura ambiente. Inoltre verranno prelevati tre campioni di sedimento (10-20 g) da conservare in buste di plastica sterili in ghiaccio fino a 8 ore per poi essere trasferiti a -80C°.

Metodo di analisi dei campioni o di indagine

Fitoplancton

L'analisi della comunità fitoplanctonica deve essere effettuata utilizzando il metodo di Utermöhl. La determinazione tassonomica deve prioritariamente raggiungere il livello specifico.

Per le retinate l'analisi sarà solo qualitativa mentre per la bottiglia Niskin l'analisi sarà quali-quantitativa.

Mesozooplancton

L'analisi quali-quantitativa del mesozooplancton deve essere eseguita come riportato in "Metodologie analitiche di riferimento ICRAM-MATTM per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001-2003)".

Dopo aver mescolato delicatamente il campione totale (che dovrà essere compreso tra i 200 e 500 ml di volume) per distribuire uniformemente gli organismi, effettuare subcampioni da 5 ml in funzione del numero di individui. Per meglio considerare l'eterogeneità delle tre sottoregioni dovranno essere analizzati volumi di campione contenenti almeno 800-1000 individui per campioni raccolti in aree eutrofiche e mesotrofiche e non meno di 400 individui per campioni provenienti da aree oligotrofiche o in stagioni caratterizzate da un popolamento mesozooplanctonico poco abbondante.

Macrozooplancton

Per tale componente va restituita, se possibile, un'analisi quali-quantitativa. Ogni avvistamento va riportato in una scheda di rilevamento registrando l'identificazione degli esemplari, la stima dell'abbondanza per ogni specie, il tipo di aggregazione e la distanza tra gli individui, acquisendo documentazione fotografica laddove possibile.

In caso di dubbi sull'identificazione tassonomica a livello specifico, è auspicabile raccogliere un campione per la successiva classificazione.

Macrobenthos

Per tale componente va restituita un'analisi quali-quantitativa come riportato in “Metodologie analitiche di riferimento ICRAM-MATTM per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001–2003)”.

La determinazione tassonomica della componente macrobentonica, sia di substrato duro sia di substrato mobile, comprensiva delle specie non-indigene deve arrivare al livello di specie ogni qualvolta sia possibile.

L'abbondanza delle macroalghe su substrato duro deve essere valutata come proiezione ortogonale di ogni specie ed espressa come percentuale di copertura rispetto al quadrato di campionamento, di superficie pari a 0.1 m². Nel caso di specie che mostrano percentuale di copertura <1%, l'abbondanza può essere espressa come 0.5%.

Per le specie macrozoobentoniche le abbondanze relative sono espresse come numero di individui per m², su fondo duro, e numero di individui rinvenuti nel campione su fondo mobile. L'abbondanza degli organismi coloniali (ad es. poriferi, idrozoi, briozoi, tunicati) va espressa come copertura percentuale. Nel caso di specie che mostrano percentuale di copertura <1%, l'abbondanza può essere espressa come 0.5%.

Indici o parametri da calcolare/rilevare:

elenco delle specie macroalgali e relative abbondanze

elenco delle specie macrozoobentoniche e relative abbondanze

Analisi dei campioni biologici raccolti dai pannelli

La determinazione tassonomica della componente macrobentonica al fine di individuare le specie non-indigene dovrà arrivare al livello di specie ogni qualvolta sia possibile.

Il pannello (C) prevede un'analisi quali quantitativa degli invertebrati sessili e vagili.

Le abbondanze relative verranno espresse come numero di individui per m². L'abbondanza degli organismi coloniali (ad es. poriferi, idrozoi, briozoi, tunicati coloniali) andrà espressa come percentuale di copertura rispetto a quella totale del pannello. A tal riguardo sarà utile l'utilizzo delle fotografie effettuate in vivo, grazie alle quali sarà possibile stimarne la copertura mediante l'utilizzo di software (i.e. opensource, ImageJ; freeware, Coral Point Count). Nel caso di specie che mostrano percentuale di copertura <1%, l'abbondanza può essere espressa come 0.5%.

Il pannello (A) prevede un'analisi quali quantitativa della componente macroalgale.

L'abbondanza delle macroalghe su substrato duro deve essere valutata come proiezione ortogonale di ogni specie ed espressa come percentuale di copertura rispetto al pannello. Nel

caso di specie che mostrano percentuale di copertura <1%, l'abbondanza può essere espressa come 0.5%.

Epimegabenthos

Per tale componente va restituita una analisi quali-quantitativa.

Metabarcoding - DNA ambientale

Le analisi possono essere condotte in laboratori specializzati in grado di minimizzare le possibili contaminazioni e prevedono i seguenti step:

- Estrazione del DNA tramite kit specifici per i campioni di filtro (es SXCAPSULE, Spens, et al. 2017) e per i campioni di sedimento (es. Qiagen DNeasy Powermax Soil Kit).
- Amplificazione del DNA con specifici primers in grado di amplificare frammenti nucleotidici idonei alla risoluzione tassonomica di ampi gruppi (es. COI mitocondriale e 18S nucleare per le comunità bentoniche)
- Sequenziamento dei frammenti tramite piattaforma NGS in grado di sequenziare simultaneamente numeri molto elevati di molecole di DNA. Tra le tecnologie che meglio rispondono a queste esigenze sono Ion Torrent (Deagle et al. 2013) e illumina (Kelly et al. 2014, Taberlet et al. 2012).
- Diversi pacchetti sono stati sviluppati per analizzare i dati restituiti dall'NGS: Qiime (Caporaso et al., 2010), OBITools (Coissac et al., 2012) e PRINSEQ (Schmieder and Edwards, 2011). Queste analisi richiedono una grande quantità di RAM e di Potenza CPU è dunque consigliabile analizzare questi dati su un server dedicato (UNIX systems per il personal computer). Una volta che l'output dell'NGS è stato analizzato, può essere confrontato con un database di riferimento per assegnare la sequenza a un taxon.

Trasporto e conservazione dei campioni

Per tutte le componenti monitorate (ad esclusione del fitoplancton) si ritiene opportuno che i campioni attribuiti a NIS di nuova introduzione e i campioni di dubbia classificazione vengano conservati in etanolo 70% per eventuali analisi molecolari.

Fitoplancton

I campioni di fitoplancton devono essere conservati in bottiglie di vetro scuro opportunamente etichettate e trasportati in condizioni di bassa temperatura. I campioni devono essere fissati con soluzione di Lugol.

Mesozooplancton

Il campione deve essere fissato in etanolo al 70%, mantenuto in frigorifero a +4°C e preferibilmente analizzato entro due settimane.

Nel caso in cui sia necessario dover conservare il campione per più di due settimane, al campione in acqua di mare deve essere aggiunto un fissativo preferibilmente alternativo alla

formaldeide. L'utilizzo della formaldeide, qualora ritenuto necessario, deve avvenire in ambienti forniti delle dovute attrezzature di sicurezza (tanto sulle imbarcazioni quanto in laboratorio) previste a tutela dell'operatore e consiste in una soluzione acquosa di formaldeide 37-38% tamponata con tetraborato di sodio in modo da ottenere una soluzione al 4%. Dal momento che questi fissativi tendono generalmente a rendere più duro e fragile il corpo degli organismi devono essere aggiunti additivi come propilene fenossetolo e propilene glicerolo (dal 2 al 5 %). È buona norma riportare sull'etichetta applicata alla bottiglia campione anche i dati relativi ai fissativi utilizzati.

Macrozooplankton

I campioni prelevati per una corretta identificazione tassonomica devono essere studiati a fresco, fotografati e nel caso si voglia procedere ad analisi genetiche conservati in etanolo al 95%.

Macrobenthos

I campioni di macrobenthos devono essere conservati nella loro interezza in appositi contenitori etichettati e devono essere fissati con un fissativo preferibilmente alternativo alla formaldeide. L'utilizzo della formaldeide, qualora ritenuto necessario, deve avvenire in ambienti forniti delle dovute attrezzature di sicurezza (tanto sulle imbarcazioni quanto in laboratorio) previste a tutela dell'operatore e consiste in una soluzione acquosa di formaldeide 37-38% tamponata con tetraborato di sodio in modo da ottenere una soluzione al 4%.

In alternativa, per la sola componente macrozoobentonica, può essere utilizzato uno dei seguenti fissativi: etanolo al 70%, isopropanolo al 40%. Dal momento che questi fissativi tendono generalmente a rendere più duro e fragile il corpo degli organismi devono essere aggiunti additivi come propilene fenossetolo e propilene glicerolo (dal 2 al 5 %). È buona norma riportare sull'etichetta applicata alla bottiglia campione anche i dati relativi ai fissativi utilizzati.

Nell'impossibilità di fissare il campione appena questo sia stato raccolto lo stesso deve essere conservato in acqua di mare fino all'arrivo in laboratorio e comunque fissato entro poche ore.

Epimegabenthos vagile

I campioni prelevati per una corretta identificazione tassonomica devono essere fotografati e conservati in etanolo al 70% o congelati.

Raccolta e restituzione dei dati e delle informazioni

Caratterizzazione delle aree di indagine

Per ogni area portuale devono essere restituite le informazioni relative a intensità del traffico marittimo e rotte ricavate dai dati AIS e attraverso la compilazione del Ballast Water Reporting Form.

Per gli impianti di molluschicoltura devono essere restituite le informazioni relative alle importazioni e i movimenti dei lotti di molluschi o, in assenza di queste, le informazioni relative alla produzione dell'impianto.

Componenti monitorate

Devono essere restituiti i dati già indicati negli standard informativi relativi ai monitoraggi 2015-2017 per il Fitoplancton, Mesozooplancton e Macrobenthos, a cui vanno aggiunti i dati relativi a Macrozooplancton ed Epimegabenthos vagile. Sarebbe auspicabile che tutti gli organismi identificati come NIS venissero fotografati, mentre si ritiene necessario produrre documentazione fotografica sulle NIS di nuova introduzione (quindi le NIS che non erano state rilevate nei monitoraggi precedenti).

Metabarcoding – eDNA

Il risultato di tali analisi è un dato qualitativo e consiste in una lista di Unità Tassonomiche Operative (OTU). L'OTU è una definizione operativa usata per classificare gruppi di individui strettamente correlati spesso riferibili alla categoria tassonomica di specie.