# *SCHEDA METODOLOGICA/PROTOCOLLO*

# *MAD-IT-D2-01, MWE-IT-D2-01, MIC-IT-D2-01*

***Scelta delle aree di indagine[[1]](#footnote-1)***

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;
* 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]](#footnote-2)

Per la componente bentonica di fondo mobile il monitoraggio dovrà essere effettuato con cadenza semestrale, considerando quali stagioni la primavera e l’autunno. Per la componente epimegabentonica il monitoraggio verrà condotto due volte l’anno, preferibilmente primavera-inizio estate e 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 quali- quantitativa delle comunità fitoplanctoniche** | Elenco delle specie e abbondanza relativa | Microscopio ottico invertito.  Eventuale integrazione con approccio molecolare |  |
| **Composizione quali- quantitativa delle comunità mesozooplanctoniche** | Stereomicroscopio/ Microscopio ottico Eventuale integrazione con approccio molecolare |  |
| **Composizione quali- quantitativa delle comunità macrozooplanctoniche** | Elenco delle specie e abbondanza stimata | Visual census/ GPS.  Eventuale integrazione con approccio molecolare |  |
| **Composizione quali- quantitativa delle comunità macrobentoniche** | Elenco delle specie e abbondanza relativa | Stereomicroscopio e/o Microscopio ottico.  Eventuale integrazione con approccio molecolare |  |
| **Composizione quali- 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 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. 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 macrozooplancton 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

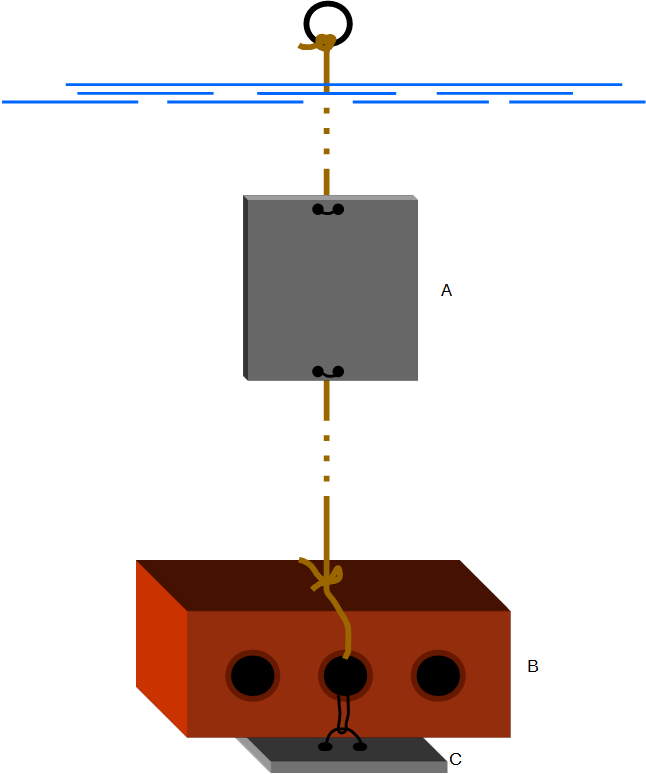


Figura 1: modulo per il monitoraggio mediante pannelli

*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.

**Macrozooplancton**

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.

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. [↑](#footnote-ref-1)
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 [↑](#footnote-ref-2)