



ARPA SICILIA – Agenzia Regionale per la protezione dell'ambiente

Struttura Territoriale di Catania

U.O. monitoraggi ambientali - Laboratorio di biologia ambientale

PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

Campionamento del perifiton dei corsi d'acqua e analisi della comunità delle Diatomee bentoniche (rif. Metodi Biologici per le acque superficiali interne – Manuali e linee guida ISPRA n.111/2014).

LINEE GUIDA REGIONALI

La presente procedura è parzialmente tratta dal Metodo illustrato in Manuali e linee guida ISPRA “MLG Metodi Biologici_111_2014”; le modifiche apportate, come variazioni, aggiunte, sottrazioni, sono state effettuate per le ragioni che seguono:

- La procedura comprende anche la parte analitica, consistente nel trattamento del campione, lettura del preparato microscopico, calcolo degli indici diatomici e dell'EQR per la classificazione dei corpi idrici ai sensi del DM 260/2010, non sufficientemente dettagliata su MLG 111_2014, con adattamenti alla UNI EN 14407:2004.
- Adattamenti all'idrologia dei corpi idrici di acque correnti superficiali nel territorio siciliano.

INTRODUZIONE

Il perifiton è la complessa comunità di microrganismi che vivono aderenti a substrati sommersi di diversa natura, costituita da alghe, funghi, batteri e protozoi e microinvertebrati; tra le Alghe del perifiton una parte rilevante è costituita dalle Diatomee.

Le diatomee sono una componente importante degli ecosistemi acquatici e costituiscono uno strumento per il monitoraggio della qualità dell'acqua sia nei casi in cui l'obiettivo principale è la misura dello stato qualitativo generale sia quando l'obiettivo è la misura di specifici impatti (e.g. eutrofizzazione, acidificazione). L'utilizzo di questa comunità biologica per il monitoraggio dei corpi idrici è in linea con le richieste della Direttiva 2000/60/CE [1].

L'impiego delle diatomee come indicatori di qualità dei corsi d'acqua è ampiamente accettato in Europa e negli USA. La metodologia si basa sull'osservazione che tutte le specie di diatomee presentano limiti di tolleranza e valori ottimali rispetto alle condizioni dell'ambiente acquatico, quali la concentrazione di nutrienti, l'inquinamento organico e il livello di acidità. Le acque maggiormente inquinate tendono ad ospitare un maggior numero di specie con preferenze per elevate concentrazioni di inquinanti. Al contrario, alcune specie sono intolleranti ad elevati livelli di uno o più inquinanti, mentre altre ancora possono essere presenti in ambienti con stato qualitativo ampiamente variabile.

Le diatomee bentoniche vengono suddivise a seconda del substrato che colonizzano in:

1. epilittiche (su substrati duri naturali o artificiali quali ciottoli, sassi o pilastri);
2. epifitiche (su macrofite, muschi, altre alghe);
3. epipeliche (su detrito più fine quale limo o argilla);
4. epipsammiche (su sabbia);
5. epizoiche (su animali, e.g. copepodi).

1. SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo documento definisce le modalità per il campionamento delle diatomee bentoniche in linea con le richieste della Direttiva 2000/60/CE, del D.Lgs. n.152/2006 [2] e dei decreti attuativi (DM n. 131/2008, DM

n. 56/2009 e DM n. 260/2010 [3, 4, 5]) ai fini del monitoraggio e della valutazione dello stato ecologico dei corsi d'acqua guadabili, utilizzando tali organismi come elementi di qualità biologica.

2. RIFERIMENTI

UNI EN 13946:2005. Qualità dell'acqua – Norma guida per il campionamento di routine ed il pretrattamento di diatomee bentoniche da fiumi.

UNI EN 14996:2006. Qualità dell'acqua – Linea guida per assicurare la qualità delle valutazioni biologiche ed ecologiche nell'ambiente acquatico.

UNI EN 14407:2004 Qualità dell'acqua - Linea guida per l'identificazione, il conteggio e la classificazione di campioni di diatomee bentoniche da acque correnti

3. TERMINI E DEFINIZIONI

Ciottolo: substrato minerale con un diametro compreso tra 64 e 256 mm.

Diatomee bentoniche: diatomee che vivono su substrati, invece che nella colonna d'acqua.

Frustulo: parete cellulare delle diatomee, composta da silice e costituita da due valve legate da due o più bande connettivali

Substrato: materiale naturale o non-naturale su cui vengono campionate le diatomee

Substrato artificiale: substrato introdotto nel fiume dall'operatore specificatamente per permettere la colonizzazione delle diatomee

Valva: componente strutturale del frustulo delle diatomee

4. STRUMENTAZIONE E ATTREZZATURA

4.1 In campo

- Ricevitore GPS
- Stivali di gomma o neoprene tutta coscia e/o stivali di gomma o neoprene a salopette
- guanti di gomma spessa o neoprene a manica lunga (circa 60 cm), con dita zigrinate e palmo rinforzato e/o guanti in gomma con manichetta
- guanti in lattice o nitrile
- spazzolino con setole dure (buono quello da denti o strumento simile per raggiungere anfratti e piccole cavità) o coltellino;
- contenitori in plastica da circa 50 mL con tappo a tenuta, preferibili a fondo conico;
- contenitori in plastica da 1 L circa, con apertura larga o sacchetti di plastica (dimensioni 30x40 cm circa) e forbici, per eventuale campionamento su macrofite (solo per campionamento su questo substrato);
- retino a maglia fine con manico (fig.4, solo per campionamento su superfici verticali);
- vaschetta in plastica (dimensioni circa 20x30 cm o maggiori);

- pennarello indelebile;
- matita e gomma da cancellare;
- scheda di campo (Mod.1-bis)
- modello di verbale di sopralluogo e campionamento fiumi (Mod. 3)
- acqua distillata;
- borsa frigo per campioni;
- substrati artificiali (laddove risultassero indispensabili);
- boe (per segnalare eventuale presenza di substrati artificiali);
- corde e pesi di zavorra (per substrati artificiali);

4.2 In laboratorio

4.2.1. Conservazione del campione

Conservanti

- **Etanolo (C_2H_5OH)**. È il liquido conservante consigliato da aggiungere al campione in quantità tale da raggiungere una concentrazione finale del 70%.

4.2.2. Trattamento del campione e pulizia dei frustuli

- setaccio (per l'eliminazione del materiale vegetale grossolano);
- centrifuga e tubi da centrifuga (non obbligatori) resistenti all'attacco di agenti ossidanti (es.Falcon in PE);
- pipette graduate (da 5-10 ml)
- pinzette;
- piastra riscaldante
- beakers da 100 ml resistenti alle alte temperature e alle sostanze ossidanti e acide (pyrex);
- pipette Pasteur;
- occhiali trasparenti da laboratorio con protezione laterale

Reagenti

- soluzione di perossido di idrogeno (H_2O_2) al 40% (130 volumi);
- acido cloridrico diluito (HCl) 1M.

4.2.3. Preparazione dei vetrini permanenti

- provette;
- vetrini portaoggetto (preferibilmente con etichetta laterale);
- vetrini coprioggetto (preferibilmente circolari, di 11-15 mm di diametro);
- resina per il montaggio con indice di rifrazione $> 1,6$ (es. Naphrax);

4.2.4. Identificazione e conteggio

- microscopio ottico, con carrello mobile con obbiettivi 20X, 40X e obiettivo ad alto ingrandimento per immersione ad olio (100 x). E' utile l'utilizzo del contrasto di fase.

I microscopi utilizzati presso i laboratori di Arpa Sicilia che effettuano l'analisi delle comunità sono dotati di un dispositivo per l'acquisizione/archiviazione di immagini e sono collegati ad un personal computer provvisto di un software di analisi di immagine (LAS di Leica Microsystem) che consente di visualizzare/archiviare le immagini e di effettuare le misure utili alla determinazione sistematica delle diatomee. Annualmente viene eseguita la taratura del sistema di misura; utilizzando l'apposita funzione del LAS, viene effettuata la misura reale di 40 e 10 μm indicati da un vetrino micrometrico. Considerando che le misure delle varie specie, nei documenti di riferimento, non vengono mai fornite come assolute, ma con dei range di valori (una stessa specie, nei campioni, si presenta spesso con dimensioni differenti, secondo il momento del ciclo vitale e riproduttivo) è accettabile una precisione con tolleranza massima del 3%.

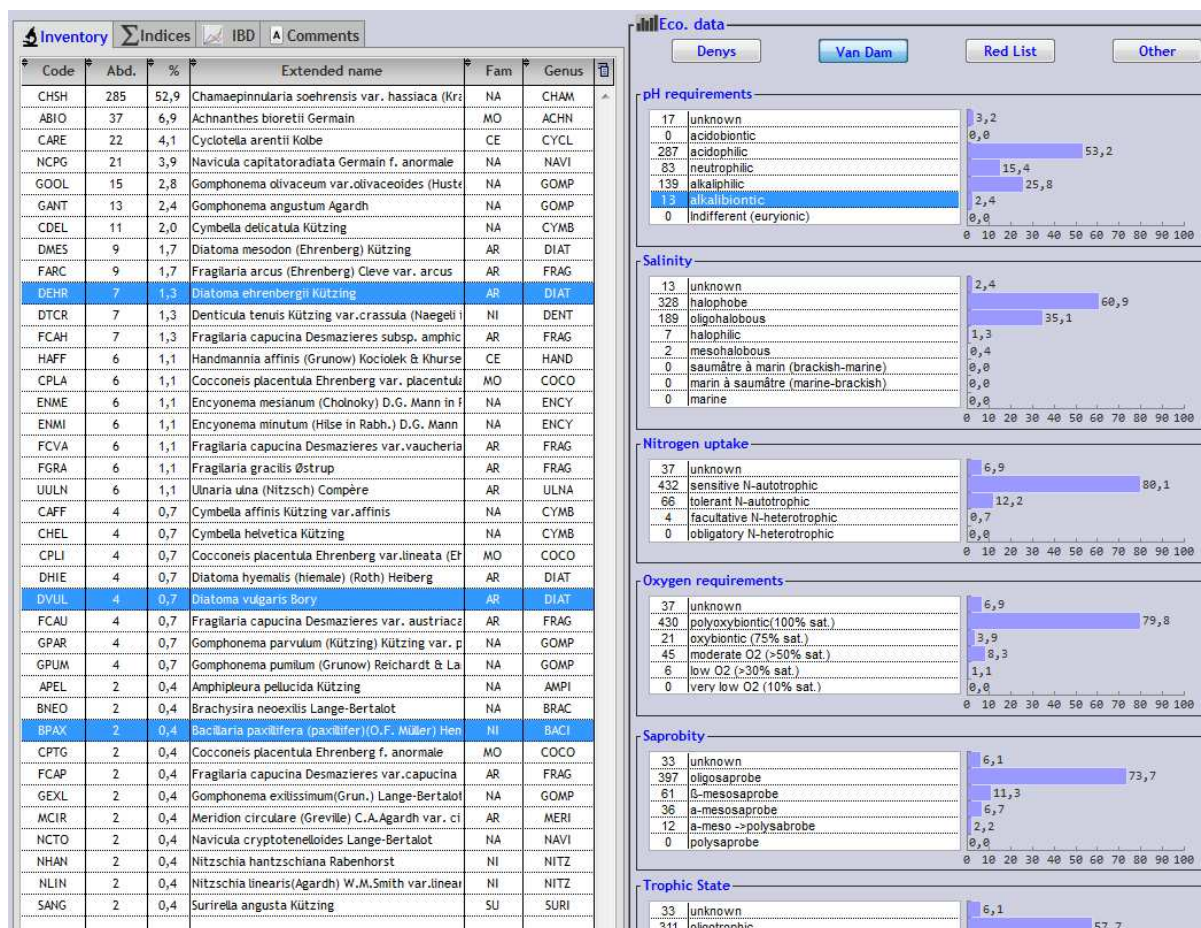
- vetrino micrometrico con scala 1mm, divisione 0,01mm
- guide di identificazione e iconografie (elencate da x a y in bibliografia) come riferimento;
- olio ad immersione;
- foglio di lavoro per registrare i dati durante il conteggio (MODULO 2);
- Foglio di calcolo (le istruzioni per l'utilizzo sono dettagliate al paragrafo 10)
- Registro di laboratorio (MODULO 6)
- software OMNIDIA aggiornato alla versione 6. Questo possiede due funzioni, BANCA DATI e INVENTARIO.

La BANCA DATI contiene le informazioni relative alla tassonomia e all'autoecologia di più di 21.000 **specie e sinonimi**, tra cui 720 generi; la stessa, aggiornata di frequente, al momento si avvale di 5700 **pubblicazioni di riferimento**.

Gli operatori esperti utilizzano questa funzione per:

- Verificare l'attualità delle informazioni contenute nei manuali cartacei ormai datati e non aggiornati ed eventualmente integrarle in sede di lettura dei campioni.
- Rivedere il foglio di calcolo degli indici, predisposto dalla ST di Catania di ARPA Sicilia su Microsoft Excel, apportando eventuali aggiornamenti relativi a tassonomia, nomenclatura, valori indicatori per il calcolo degli indici, ogni volta che è disponibile l'aggiornamento online della banca dati di OMNIDIA.
- Ottenere informazioni sull'autoecologia delle specie per verificare, eventualmente, la congruità tra una specie e il contesto ambientale in cui la stessa viene trovata, nonché la coerenza tra le indicazioni ecologiche fornite dalla specie stessa e dalla sua abbondanza, con l'intera comunità riscontrata.

La funzione INVENTARIO permette il calcolo, a partire da una lista floristica quali/quantitativa, di 18 diversi indici diatomici ed è in grado di effettuare delle statistiche ecologiche. Questa funzione



Phys. description

	MIN	MAX
Length or diameter (µm)	5	25
Width (µm)	3	4
Striae count (per 10 µm, at centre)	30	32
Minimum fibulae count (or ribs) per 10 µm (back striae count per 10 µm for Cymbelloideae)	26	28
Aeolae count per 10 µm		
Biovolume (µm³)	76	

Fig.0 – Alcune funzioni di OMNIDIA 6

viene utilizzata solo saltuariamente dagli operatori di ARPA Sicilia per effettuare confronti o per ottenere informazioni aggiuntive fornite da altri indici diatomici; il calcolo degli indici previsti dal DM 260/2010, TI ed IPS, e dell' ICMi per la classificazione viene invece effettuato esclusivamente con il foglio di calcolo.

5. PERSONALE

Il gruppo di lavoro che esegue il campionamento deve essere composto da un numero minimo di due persone, anche in relazione ai possibili rischi connessi con l'attività di campo.

Il personale coinvolto nelle attività di monitoraggio biologico deve essere qualificato sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento, esperienza e/o comprovata abilità.

In particolare, l'operatore che esegue il campionamento deve possedere adeguata e documentata preparazione (diploma di laurea) in campo ecologico, idrobiologico e deve aver compiuto un percorso di apprendimento in affiancamento ad operatori esperti o frequentando un apposito corso di formazione.

Gli operatori che eseguiranno le analisi di laboratorio (preparazione del campione e lettura dei preparati microscopici) devono inoltre possedere una formazione specifica nel campo tassonomico e sistematico delle diatomee oltre ad una fase di affiancamento ad operatori esperti o alla frequenza di specifico corso di formazione.

6. AVVERTENZE e PRECAUZIONI

Gli operatori che utilizzeranno questo protocollo dovranno avere la sufficiente formazione per le normali pratiche di attività di campo.

Il metodo contempla un'attività in campo che prevede l'attraversamento dell'alveo bagnato per un tratto di corso d'acqua non inferiore a 10 metri di lunghezza.

Questa attività può presentare rischi per l'operatore dovuti alla possibilità di cadere durante l'effettuazione del prelievo e riportare traumi o di venire a contatto con l'acqua e con l'ambiente dell'alveo esponendosi a rischi sanitari.

Nella scelta dei siti di campionamento devono essere evitati tratti ai quali non è possibile accedere in completa sicurezza.

Evitare accessi che presentino rive molto ripide, evitare di scendere in alveo attraverso terreni scivolosi che possono compromettere la risalita sulle sponde, evitare di attraversare acque profonde o ad elevata velocità di corrente o tratti ad elevata deposizione di limo o argilla; nel caso di accessi che presentino pendenze molto elevate gli operatori che entrano in acqua devono indossare una imbracatura con corda di sicurezza che consenta, con l'aiuto di un terzo operatore, di risalire la sponda.

In caso di siti di monitoraggio posti a valle di dighe e perciò soggetti a fluttuazioni di portate improvvise determinate da rilasci, è opportuno avere contatti diretti con enti gestori per accertarsi dell'assenza di manovre nella giornata di campionamento.

Il campionamento può prevedere il sollevamento di substrati con diametro superiore ai 26 cm. Lo spostamento o sollevamento di questi massi deve essere sempre eseguito con manovre che prevedano il carico delle gambe ed evitino quelli della colonna vertebrale.

Il campionamento deve essere eseguito indossando i guanti.

Il gruppo di lavoro che esegue il campionamento deve essere composto da due operatori, di cui almeno uno esperto, ed eventualmente un terzo operatore se le condizioni di logistica e di sicurezza lo richiedessero.

E' consigliabile lavare e disinfettare le mani alla fine di ogni operazione di campionamento.

E' consigliabile sanificare, al rientro o almeno periodicamente, tutti gli strumenti utilizzati durante le attività di campo.

Nei casi in cui si debba campionare in un sito in cui il corso d'acqua sia a rischio elevato di contaminazione fecale, dovrà essere rispettato quanto previsto nella Istruzione operativa " Norme igienico sanitarie per campionamenti biologici a rischio sui corsi d'acqua: Diatomee bentoniche"

7. ATTIVITA' DI CAMPO

7.1 Generalità

Le modalità descritte in questo protocollo sono specificatamente volte a soddisfare le richieste della Direttiva 2000/60/CE per la valutazione dello stato ecologico dei corpi idrici.

Il campionamento può essere condotto in modo diverso per obiettivi ad esempio di ricerca.

Per quanto concerne gli obbiettivi del DM 260/2010 è preferibile campionare sempre su substrati duri, per avere la possibilità di effettuare eventuali confronti sulle comunità "epilitiche" e solo dove non presenti detti substrati ripiegare sul substrato "macrofite acquatiche".

7.2 Periodo di campionamento

Dato che le comunità di diatomee, più o meno ricche in specie, sono presenti in ogni periodo dell'anno, i campionamenti si possono effettuare in tutte le stagioni, ma esistono dei periodi più adatti a seconda della idroecoregione.

Va comunque sempre evitato il campionamento nei periodi successivi alle piene; si consiglia di attendere almeno 4 settimane per consentire la completa ricolonizzazione dei substrati.

La maggiore diversità di specie si riscontra nei mesi di maggio-giugno e di settembre-ottobre, periodi con alta intensità luminosa e temperatura mite.

Il DM 260/2010 prevede che il campionamento delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua venga effettuato in coincidenza con il campionamento dei macroinvertebrati.

Nella Zona mediterranea, ed in Sicilia in particolare, si consiglia di effettuare le due campagne di campionamento previste dal DM 260/2010:

nei corsi d'acqua perenni → primavera per la morbida e fine estate/inizio autunno per la magra (in coincidenza con la prima e la terza tornata di campionamento dei macroinvertebrati)

nei corsi d'acqua temporanei → inizio primavera per la morbida e inizio estate – massimo primi di luglio – per la magra (prima della fase asciutta, in coincidenza con le due tornate di campionamento dei macroinvertebrati).

7.3 Scelta della stazione

Il sito di campionamento (stazione) è la porzione di corpo idrico in cui viene effettuata la raccolta del campione biologico. Esso deve essere rappresentativo, in termini di caratteristiche ambientali e di pressioni, del corpo idrico e non deve risentire di alterazioni molto localizzate.

Deve essere selezionato un tratto di corpo idrico, di norma coincidente con quello selezionato per il campionamento dei macroinvertebrati, che presenti habitat e substrati di campionamento idonei, in particolare è opportuno campionare nei tratti di raschio (riffles). La lunghezza deve essere di almeno 10 m ed essere almeno pari alla larghezza dell'alveo bagnato.

7.4 Scelta del substrato

Le diatomee possono crescere sulla maggior parte delle superfici sommerse; tuttavia, la composizione della comunità varia in funzione del substrato prescelto per il campionamento. L'ideale sarebbe utilizzare un solo tipo di substrato per tutte le stazioni considerate in una campagna di monitoraggio.

Per la scelta del substrato si deve comunque **dare la preferenza ai substrati duri naturali movibili, ossia ai ciottoli (dimensioni da 64 mm a 256 mm) ed ai massi (diametro > 256 mm)**. I ciottoli sono preferibili perché le loro dimensioni consentono da un lato un agevole prelievo e dall'altro sono abbastanza stabili da permettere l'insediamento di una comunità di diatomee rappresentativa.

In mancanza di tale tipologia di substrato si può scegliere fra i seguenti, disposti secondo l'ordine di preferenza (Fig. 1):

- superfici artificiali *in situ*: manufatti, piloni, ...;
- substrati artificiali: retina contenente ciottoli, mattoni, piastrelle, altro.....(mai su superfici legnose perché selezionano alcune specie rispetto ad altre);
- vegetazione acquatica: macrofite emergenti o sommerse

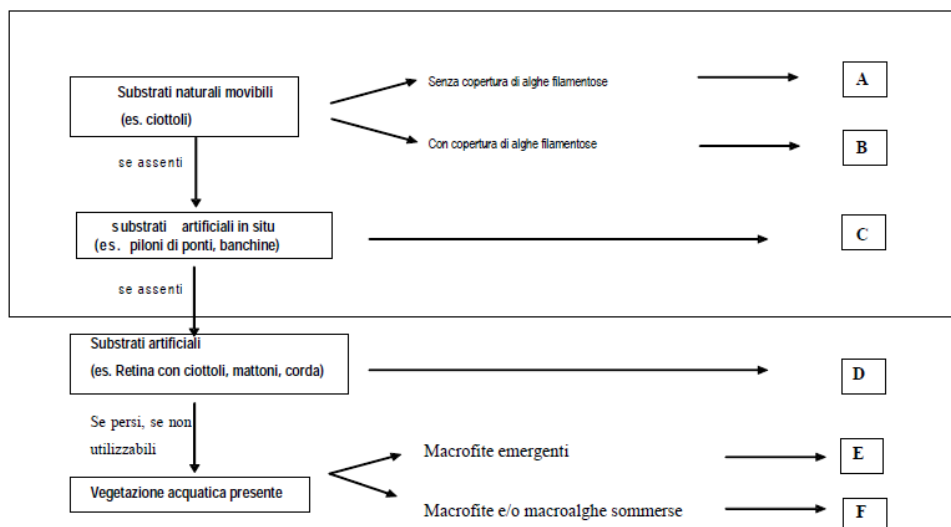


Figura 1 – Schema relativo alla scelta del substrato da campionare; le lettere indicano l'ordine di preferenza.

In riferimento alla scelta dei microhabitat nella stazione, occorre tenere presente che:

- devono essere evitate zone del corso d'acqua con elevato grado di ombreggiamento e quelle troppo vicine alla riva;
- nel caso di corsi d'acqua profondi, si devono considerare i substrati presenti nella zona eufotica;
- i campioni dovrebbero essere raccolti all'interno del flusso principale del corso d'acqua;
- occorre evitare zone di corrente molto lenta (con velocità < 20 cm/s), poiché in questo caso le diatomee risultano poco adese al substrato e si possono formare depositi di limo e altri detriti.

In generale devono essere campionati substrati stabilmente colonizzati e sempre sommersi. Un periodo di almeno quattro settimane può essere ritenuto sufficiente per assicurare che le comunità di diatomee siano in equilibrio con l'ambiente acquatico.

7.5 Campionamento

Vengono di seguito riportate le tipologie di substrato campionabili, in ordine decrescente di preferenza.

A. Campionamento di superfici mobili dure naturali senza alghe filamentose

1. Raccogliere, nel filone centrale della corrente, almeno 5 ciottoli in vari punti della stazione. Se i ciottoli non fossero disponibili, raccogliere 5 piccoli massi o 10 ciottoli di minori dimensioni; al termine della raccolta, la superficie totale campionata deve essere di almeno 100 cm²; negli ambienti oligotrofi è richiesto maggior sforzo di campionamento, in termini di accuratezza nel prelievo del film diatomico dal substrato (eventualmente raccogliere il campione da una superficie maggiore).

2. Sciacquare delicatamente i ciottoli con l'acqua del fiume, al fine di eliminare il materiale inorganico depositato su di essi o gli eventuali invertebrati adesi.

3. Grattare con uno spazzolino (preferibilmente) o con la lama di un coltello la superficie superiore e/o laterale dei ciottoli e risciacquare lo spazzolino o la lama in una vaschetta in cui sia stata posta una minima quantità di acqua. Ciò allo scopo di concentrare il campione in un piccolo volume, semplificando le operazioni successive in laboratorio (Fig. 2).
4. Trasferire il campione in un contenitore ermetico, preferibilmente in una provetta a fondo conico da 50 ml provvista di tappo a vite (tipo Falcon); in alternativa è possibile sciacquare lo spazzolino o la lama direttamente nell'acqua distillata all'interno del contenitore, trasferendo direttamente il campione.



Figura 2 - Sequenza delle operazioni in caso di campionamento di ciottoli.

B. Campionamento di superfici movibili dure naturali con alghe filamentose

Se più del 75% dei substrati fosse coperto da alghe filamentose, tali substrati saranno oggetto di campionamento, con le modalità indicate ai precedenti punti 3 e 4, ma solo dopo aver rimosso i filamenti (Fig. 3).



Figura 3 - Se il ciottolo è coperto da alghe filamentose, queste vanno rimosse prima di campionare le diatomee

C. Superfici artificiali in situ (manufatti)

1. Grattare la superficie colonizzata con una lama affilata inserita all'estremità di un manico come supporto. In alternativa utilizzare campionatori idonei (esempi in Fig. 4), costituiti da un telaio metallico, eventualmente con manico, su cui è fissato un retino con maglie di $<60 \mu\text{m}$. Alla fine del retino è inserita una bottiglia svitabile per la raccolta ed il recupero delle diatomee campionate.

2. Campionare un'area di almeno 100 cm².
3. Rimuovere il film che è rimasto adesivo alla lama/bordo del telaio direttamente nel contenitore per campioni.

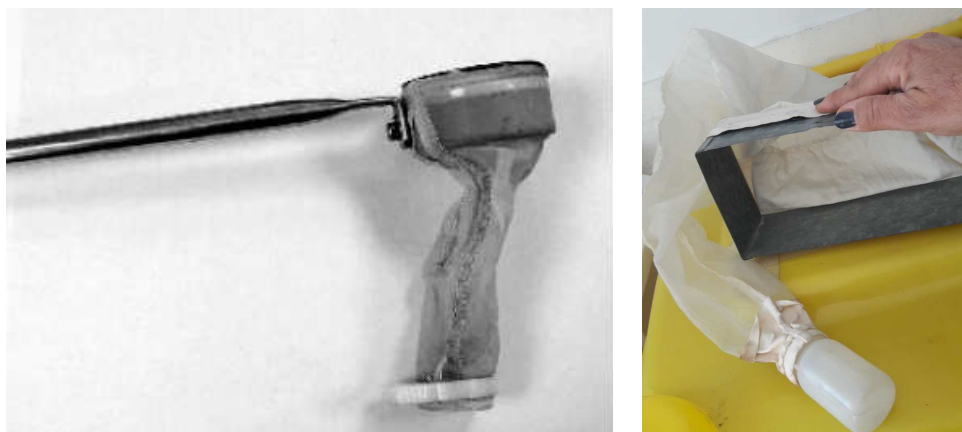


Figura 4 - Esempi di campionatore per superfici artificiali verticali

D. Substrati artificiali

È necessario posizionare, nella zona eufotica del corso d'acqua, dei substrati con superficie rugosa. I più indicati sono i ciottoli raccolti nella zona della stazione di monitoraggio, opportunamente lavati e posizionati in sacchetti a rete con maglia di almeno 2 cm. In alternativa sono comunque utilizzabili piastrelle (superficie 100 cm²), mattoncini o tegole. Tali substrati dovrebbero essere lasciati immersi per almeno quattro settimane nella zona eufotica, in modo da permetterne la colonizzazione da parte delle diatomee. In casi particolari, quali basse temperature dell'acqua od oligotrofia dell'ambiente da esaminare, i substrati devono essere esposti per tempi più lunghi (almeno 6 settimane). Substrati con superfici eterogenee (ad esempio piastrelle ruvide, corda in polipropilene sfilacciata) sono preferite rispetto substrati con superfici lisce (ad esempio lastre di vetro). In ogni caso la scelta del materiale va effettuata in base alla tipologia di corpo idrico selezionato.

I substrati esposti (ciottoli, mattoncini o tegole) vengono poi campionati seguendo la procedura utilizzata per i substrati duri (A).

Per effettuare studi comparativi in fiumi non guadabili è opportuno utilizzare lo stesso tipo di supporto e sottoporre i substrati alle identiche condizioni ambientali, per gli stessi periodi di esposizione.

E. Vegetazione acquatica - macrofite emergenti

I campioni dovrebbero essere raccolti dalle macrofite emergenti solo se vengono campionate parti che rimangono permanentemente sommerse e che non sono contaminate dai sedimenti di fondo. Procedere nel seguente modo:

- tagliare con una forbice o una lama affilata 5-6 steli (parte sommersa);

- mettere gli steli in un contenitore con poca acqua distillata;
- in laboratorio staccare le diatomee agitando il contenitore o grattando delicatamente gli steli.

Se il film di diatomee fosse particolarmente delicato, procedere nel seguente modo:

- tagliare gli steli fino al livello dell'acqua;
- posizionare sopra di essi un contenitore rovesciato;
- tagliare gli steli alla base;
- rivoltare il contenitore;
- in laboratorio staccare le diatomee agitando il contenitore o grattando delicatamente gli steli.

F. Vegetazione acquatica - macrofite e macroalghe sommerse

- raccogliere 5 piante intere;
- metterle in un sacchetto di plastica per il trasferimento in laboratorio;
- in laboratorio mettere le macrofite in un beaker capiente, aggiungere una piccola quantità di acqua distillata e scuotere, per favorire il distacco delle diatomee;
- rimuovere le macrofite;
- lasciare sedimentare ed eliminare il surnatante.

Anche le operazioni descritte ai punti E ed F possono essere svolte in campo, avendo l'accortezza di utilizzare una minima quantità di acqua distillata per il lavaggio.

Per studi comparativi tra corpi idrici sarebbe opportuno riferirsi a campioni prelevati da macrofite della stessa specie o da un gruppo comprendente specie morfologicamente simili.

Particolare attenzione va dedicata ad evitare la contaminazione del campione che si sta per raccogliere con diatomee di altre stazioni o con diatomee non rappresentative della stazione.

A tal fine si suggerisce:

- di campionare procedendo lungo il corso d'acqua da valle verso monte;
- di utilizzare uno spazzolino nuovo per ogni campionamento; per ragioni di economia, per il secondo campionamento di una stessa stazione della campagna di monitoraggio, potrebbe essere utilizzato uno stesso spazzolino ben lavato tra un utilizzo e l'altro. In tal caso lo spazzolino dovrà essere contrassegnato in maniera evidente durante il periodo di conservazione tra il primo ed il secondo campionamento.
- di utilizzare acqua distillata, non acqua di fiume, nella vaschetta ove risciacquare lo spazzolino o la lama, al fine di evitare la contaminazione del campione, in particolare nei corsi d'acqua più lenti, con diatomee planctoniche;
- di sciacquare accuratamente il materiale utilizzato (lama del coltello, vaschetta, ecc) con l'acqua del corso d'acqua all'inizio ed al termine di ogni operazione di campionamento;

- di pulire accuratamente gli stivali per non diffondere specie invasive.

7.6 Etichettatura

Ciascun campione deve essere correttamente e univocamente identificato mediante un'etichetta. A tal fine sul contenitore può essere riportato, con pennarello indelebile o a matita su una etichetta adesiva, ad esempio: il nome del fiume, il codice del corpo idrico, il nome del sito, la data di campionamento.

Trasportare il campione in laboratorio in borsa frigo refrigerata.

7.7 Scheda di campionamento

Tutte le informazioni utili relative al campionamento devono essere annotate su un'apposita scheda. La scheda di campo, per le Strutture Territoriali che effettuano **sia l'analisi delle Diatomee che il monitoraggio per gli altri EQB**, sarà quella semplificata riportata nel **Modulo 1-bis** che prevede la registrazione delle informazioni utili all'inquadramento del sito. Nella parte generale vanno indicati i dati anagrafici, la data di campionamento, il nominativo degli operatori che effettuano il campionamento; più avanti la scheda si presenta semplificata, rispetto a quella prevista per le SSTT che effettuano il solo campionamento e non le analisi, per evitare inutili ridondanze; ciò in quanto chi effettua l'analisi, in questo caso, dispone già tutti i dati morfologici ed ecologici della stazione che sono direttamente desumibili dalla scheda di campo prevista per i Macroinvertebrati campionati contestualmente alle diatomee. I valori relativi ad alcuni parametri fortemente condizionanti la distribuzione e la composizione delle comunità diatomiche, quali la temperatura dell'acqua, il pH, l'ossigeno disciolto, la velocità della corrente, la torbidità, etc.. sono già contenuti nel verbale di campionamento dell'acqua effettuato in pari data mentre i dati relativi ai nutrienti possono essere consultati sui rapporti di prova del laboratorio di chimica della stessa ST.

Qualora nella stagione di campionamento sia in corso un programma di monitoraggio di qualità chimico-fisica dell'acqua, i dati relativi ai parametri chimico-fisici possono essere derivati da quelli reperiti durante le attività di monitoraggio chimico-fisico nello stesso periodo di campionamento.

8. ATTIVITA' DI LABORATORIO PRESSO LA ST DI APPARTENENZA

8.1 Registrazione del Campione

ARPA SICILIA non ha attivato al momento una procedura informatizzata univoca per l'accettazione dei campioni di perifiton per la determinazione delle diatomee bentoniche. Pertanto, all'arrivo presso la ST di appartenenza, viene seguita una procedura interna per l'ufficializzazione del campione.

- Il Verbale di sopralluogo e campionamento fiumi (Mod. 2), con eventuali relazioni allegate, viene consegnato in segreteria per l'accettazione e registrato nel sistema IRIDE. Se l'attività ha compreso anche il prelievo di campioni d'acqua, questi ultimi verranno registrati nel sistema LIMS.

- Lo stesso Verbale viene registrato anche sul Registro interno verbali sopralluogo (Mod. 4) e gli viene assegnato un numero progressivo, a fianco del quale viene trascritto il numero IRIDE, la stazione campionata, il tipo di attività ed il nome degli operatori che l'hanno effettuata. Il campione viene invece registrato sul Registro interno campioni Monitoraggio acque DM 260/2010 (Mod.5) assegnandogli un NUMERO INTERNO CAMPIONE (progressivo), a fianco del quale viene riportato il numero interno di verbale, data, stazione e tipologia del campione conferito.

8.2 Conservazione del campione

In laboratorio si procede alle seguenti operazioni.

1. Eliminazione dei residui di grandi dimensioni o materiale vegetale grossolano (eventualmente con l'ausilio di un setaccio).
2. Ove possibile effettuare una osservazione microscopica preliminare di una piccola aliquota di campione vivo, annotando qualsiasi particolare insolito (es. numero elevato di frustuli vuoti).
3. Qualora non si possa procedere subito alla preparazione del campione, lo stesso può essere lasciato a sedimentare, all'interno di una provetta a fondo conico, in frigorifero a +4°C per una notte. Dopo 24 ore il materiale in sospensione è sedimentato sul fondo del contenitore ed il surnatante limpido può essere tolto con cautela. In alternativa la provetta con il campione può essere centrifugata per 10 minuti a circa 700 giri/minuto. Poi eliminare delicatamente il surnatante con una pipetta Pasteur (lasciando circa 10 ml di campione) e aggiungere alcool come descritto appresso, allo scopo di interrompere il processo di divisione cellulare e di decomposizione della materia organica.
4. Procedimento per la fissazione del campione: eliminare delicatamente il surnatante dopo la sedimentazione/centrifugazione lasciando circa 10 ml di campione e poi aggiungere circa 25 ml di alcool etilico assoluto o circa 30 ml di alcool etilico 96°. Eventualmente aumentare di poco il volume di alcool per essere certi che la concentrazione finale dell'alcool sia compresa tra 70 e 80%.

8.3 Preparazione del campione. Pulizia dei frustuli

Nella fase di pulizia delle diatomee occorre prestare particolare attenzione a non contaminare i campioni fra loro. Si dovrà pertanto utilizzare, per ogni campione, materiale distinto e separato. In particolare per ciascuno dovrà essere utilizzato un beaker, una provetta di centrifugazione, una pipetta Pasteur, che devono essere opportunamente contrassegnati.

Preparazione da campione senza conservante (fresco)

1. Omogeneizzare il campione agitando.
2. Prelevare una piccola quantità del campione (5-10 mL).
3. Mettere nel beaker.
4. Procedere con l'ossidazione secondo il metodo indicato.

Preparazione da campione conservato

1. Omogeneizzare il campione agitando.
2. Prelevare una piccola quantità di campione (5-10 mL).
3. Mettere il campione prelevato in una provetta per centrifuga.
4. Eliminare il conservante centrifugando a 700 RPM per 10 minuti ed eliminando il surnatante. Ripetere l'operazione altre due volte aggiungendo ogni volta acqua distillata per lavare il campione. Alla fine dei lavaggi, seguiti da centrifugazione, lasciare 5-10 ml della sospensione concentrata in acqua distillata.
5. Mettere in un beaker.
6. Procedere con l'ossidazione con perossido di idrogeno a freddo (Metodo 1) o a caldo (Metodo 2).

Se non fosse disponibile la centrifuga, è possibile ricorrere alla sedimentazione, in frigorifero in caso di campione fresco, tenendo conto dei tempi più lunghi che questo sistema comporta.

Si raccomanda di conservare una aliquota del campione fissata in alcool, sia per l'eventuale archiviazione, sia per disporre di altra quantità di campione nel caso vi siano problemi durante la preparazione.

Metodo 1 per l'ossidazione della materia organica: perossido di idrogeno a freddo

1. Aggiungere 9 parti circa di perossido di idrogeno ad 1 parte di campione. Deve essere usata cautela mentre si versa il perossido di idrogeno concentrato nel materiale ricco di sostanza organica. Nei primi momenti dell'ossidazione si formerà una schiuma densa: è necessario evitare di farla tracimare, continuando a mescolare il campione con una bacchetta di vetro per alcuni minuti.
2. Quando la schiuma scompare, coprire bene il beaker con parafilm e lasciarlo per diversi giorni esposto alla luce. L'esposizione alla luce diretta del sole o ad una lampada UV accelerano l'ossidazione, tuttavia, se non vengono richiesti tempi ristretti per l'analisi, può essere preferibile esporre i campioni alla luce ordinaria in un luogo posto al riparo da urti ed eventuali rovesciamenti dei contenitori, fino allo schiarimento della sospensione.

Tutte le operazioni che comportano l'uso del perossido di idrogeno devono essere svolte indossando guanti da laboratorio e occhiali protettivi o effettuate sotto cappa con il vetro anteriore abbassato.

Nei campioni particolarmente ricchi di sostanza organica i tempi di ossidazione possono aumentare notevolmente.

3. Una volta completata la fase di ossidazione, aggiungere alcune gocce di acido cloridrico al fine di rimuovere il perossido di idrogeno in eccesso ed i carbonati e successivamente lavare le pareti del beaker con acqua distillata o demineralizzata. L'aggiunta di acido cloridrico può essere evitata se il campione è stato prelevato in una zona dove è improbabile la presenza di carbonati.

4. Trasferire il contenuto del beaker in un tubo da centrifuga, portare a volume con acqua distillata o demineralizzata e centrifugare a bassa velocità (es. 700 giri/min) per 10 minuti. Eliminare il surnatante in eccesso, risospendere il contenuto con acqua distillata o demineralizzata e ripetere la centrifugazione. Il processo di lavaggio dovrebbe essere ripetuto almeno 3 volte, fino a che siano state rimosse tutte le tracce di perossido di idrogeno. In alternativa è possibile effettuare la decantazione naturale del campione, avendo l'accortezza di lasciarlo sedimentare per un tempo adeguato (almeno 8 ore).
5. Una volta che tutte le tracce di perossido di idrogeno sono state rimosse, mescolare il contenuto di diatomee in una piccola quantità di acqua distillata o demineralizzata e trasferire in una fialetta pulita di piccola capacità. Una parte di questa sospensione va utilizzata per l'allestimento dei vetrini permanenti; la parte rimanente può essere etichettata e conservata, per un tempo illimitato, aggiungendo alcune gocce di etanolo per prevenire la crescita fungina.

In generale l'uso della centrifuga consente di velocizzare le operazioni di pulizia dei campioni (sia dal conservante, sia dai vari reagenti impiegati nei processi di ossidazione). Questa metodica, se effettuata con tempi e velocità non adeguate, potrebbe portare alla rottura dei frustuli delle specie di dimensioni maggiori. Se si utilizza la centrifuga è probabile ottenere un campione nel quale sarà più elevata la presenza di valve e non di frustuli interi, mentre con la decantazione naturale, più dolce, la presenza di frustuli interi è maggiore. Se non si dovessero ottenere frustuli puliti, aggiungere perossido di idrogeno e lasciare agire per un altro giorno o ricorrere al metodo a caldo dopo il lavaggio.

Metodo 2 per l'ossidazione della materia organica: perossido di idrogeno a caldo

1. Vedi punto 1 del metodo a freddo.
2. Quando la schiuma scompare, procedere alla ossidazione e concentrazione del campione sulla piastra riscaldante, finché nel beaker non siano rimasti solo pochi mL di sospensione schiarita.
3. Togliere il beaker dalla piastra. Aggiungere alcune gocce di acido cloridrico al fine di rimuovere il perossido di idrogeno in eccesso ed i carbonati e lavare le pareti del beaker con acqua distillata o demineralizzata. Lasciare raffreddare. L'aggiunta di acido cloridrico può essere evitata se il campione è stato prelevato in una zona dove è improbabile la presenza di carbonati.
4. Proseguire dal punto 4 del precedente metodo di ossidazione a freddo

Tutte le operazioni che comportano l'uso del perossido di idrogeno devono essere svolte indossando guanti da laboratorio e occhiali protettivi o eseguite sotto cappa con il vetro anteriore abbassato .

NOTA. L'aggiunta di HCl può portare a reazioni esotermiche più o meno violente in base alla quantità di carbonati e materia inorganica presente nel campione. Nel caso si formi abbondante schiuma e si verifichino fenomeni di ebollizione, prestare attenzione e aggiungere acqua distillata per attenuare la reazione

8.4 Preparazione dei vetrini permanenti

- se non sono perfettamente puliti, detergere i vetrini portaoggetto con sapone con alcool etilico, asciugandoli bene;
- agitare la provetta contenente il preparato ossidato al fine di sospendere omogeneamente i frustuli;
- preparare una diluizione del campione, in modo da ottenere una sospensione che ad occhio nudo appaia lievemente lattescente o quasi limpida;
- identificare il vetrino portaoggetti mediante una scritta indicante il numero campione, il nome del corso d'acqua, la stazione e la data di prelievo; è consigliabile preparare più di un vetrino.
- porre il vetrino coprioggetto su di una superficie piana (può essere utile posizionarlo direttamente sul vetrino portaoggetto corrispondente o, più comodo, sul coperchio di una scatola Petri contrassegnata);



Figura - 5

- prelevare con una pipetta Pasteur una piccola quantità della sospensione diluita ed omogenizzata e porla su un vetrino coprioggetto ricoprendolo tutto, facendo però attenzione a non fare uscire la goccia dal bordo (Fig. 5); usare sempre pipette nuove per ogni campione;
- lasciare asciugare la goccia a temperatura ambiente e in un luogo al riparo dalla polvere, oppure sulla piastra riscaldante a bassa temperatura; in alternativa questa operazione può essere effettuata in stufa a non oltre 40°C (fig.. L'essiccamento veloce in stufa, a temperature più alte, potrebbe determinare la formazione di agglomerati di diatomee e va quindi evitato;

- posizionare sul vetrino portaoggetto, in corrispondenza del punto su cui andrà messo il coprioggetto, una goccia della resina ad alto potere di rifrazione; se si tratta di Naphrax, contenente toluene come solvente, si raccomanda di **lavorare sotto una cappa di aspirazione**;
- con una pinzetta prendere il coprioggetto e capovolgerlo sulla goccia, in modo che la superficie ricoperta dalle diatomee sia a contatto con la resina;
- porre il vetrino così preparato su una piastra riscaldante a circa 90-100°C, sempre **sotto cappa di aspirazione chimica**,
- lasciare scaldare fino a che il solvente della resina non evapori completamente: nell'evaporazione produrrà delle bolle che non si manifesteranno più a processo ultimato.

- togliere il vetrino dalla piastra ponendolo su una superficie piana ed esercitare una leggera pressione con la punta della pinzetta o con un tappo in gomma o silicone, con diametro inferiore rispetto a quello del coprioggetto, per migliorare l'adesione e consentire una distribuzione uniforme della resina prima che solidifichi;
- lasciare raffreddare completamente il vetrino;
- pulire il contorno del coprioggetto dalla resina in eccesso.

Per una lettura agevole del vetrino controllare che la concentrazione di valve o frustuli non sia troppo elevata: un'eccessiva sovrapposizione delle valve renderebbe molto complicata l'identificazione e la conta. Si consiglia di preparare, per ogni campione più di un vetrino, con quantità differenti di sospensione, al fine di ottenere concentrazioni diverse. I preparati dovrebbero avere indicativamente da 15 a 30 (tenendo conto delle dimensioni dei frustuli) valve per campo ad un ingrandimento 1000 X ; nel caso di campione troppo denso o troppo rado, ripetere la preparazione del vetrino. È preferibile, inoltre, una volta trovata la concentrazione ideale, preparare ulteriori repliche dei vetrini.

Si consiglia l'utilizzo di vetrini coprioggetto di forma rotonda (diametro 11-15 mm), che permettono una distribuzione più omogenea delle valve rispetto a quelli di forma rettangolare.

9. LETTURA DEI PREPARATI

Preliminarmente osservare i preparati a basso ingrandimento (100 e/o 400 ingrandimenti) per verificare l'omogeneità di distribuzione delle valve/frustuli e la presenza di individui di grandi dimensioni, annotandone la specie come presente.

- **Screening iniziale**

Osservare il preparato a 1000 ingrandimenti con olio ad immersione, procedendo a zigzag su tutto il preparato identificando le specie riscontrate e annotandole utilizzando i codici univoci riconosciuti a livello internazionale, **secondo la nomenclatura più recente**.

Detti codici sono indicati sul foglio di calcolo accanto al nome completo di ciascuna specie (fig. 6) o, se si trattasse di specie non ancora inserite in elenco, vengono ricavati dalla versione aggiornata del software OMNIDIA 6 (fig. 7) con le funzioni di ricerca.

codice	Specie
	NUOVA NOMENCLATURA
ACOA	<i>Achnanthes coarctata</i> (Brebisson) Grunow in Cl. & Grun.
AINF	<i>Achnanthes inflata</i> (Kützinger) Grunow
ACAF	<i>Achnantheidium affine</i> (Grunow) Czarnecki

Fig. 6 - esempio tratto dal foglio di calcolo

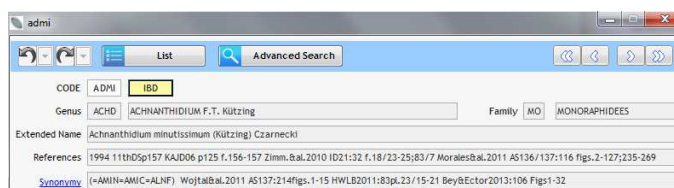


Fig. 7 – esempio di ricerca codici tratto da OMNIDIA 6

- Gli Indici di valutazione previsti dal DM 260/2010 prevedono l'identificazione delle diatomee al livello sistematico di specie; questa viene effettuata sulla base di caratteri morfometrici quali forma della valva, larghezza, lunghezza, densità delle strie o delle fibule/10 μm e loro disposizione, presenza o meno di stigmi o altre formazioni tipiche, ecc. Per questa operazione viene utilizzato il sistema di acquisizione di immagini digitali in dotazione al microscopio che, con l'ausilio del software LAS, permette di effettuare le osservazioni e le misure utili all'identificazione sistematica. Annualmente è necessario verificare la taratura del sistema con vetrino micrometrico; è accettato uno scostamento massimo del 2%; nei casi in cui venisse superato tale valore, dovrà essere ricavato un coefficiente di correzione. Come riferimento vengono utilizzati i manuali elencati in calce sotto il titolo "MANUALI ICONOGRAFICI DI RIFERIMENTO"; verificare eventualmente, attraverso la banca dati di OMNIDIA 6 o sul foglio di calcolo, se nome e codice delle specie identificate a partire dai manuali siano quelli aggiornati. Per documentare le forme rare o quelle più problematiche è importante archiviarne le immagini digitali.

Nel caso di dubbi nell'identificazione di alcune specie possono tornare utili i dati autoecologici ricavabili dalla banca dati del software OMNIDIA 6, che contiene anche gli aggiornamenti sistematici più recenti. E' utile confrontarsi con altri operatori esperti della stessa o di altra Struttura Territoriale; in quest'ultimo caso verranno inviate le immagini ricavate e tutti gli elementi utili rilevati o, in casi particolari, anche una copia del vetrino o un'aliquota del campione ossidato.

Alla fine della fase di screening si avrà l'elenco di tutte le specie riscontrate. Per redigere la lista delle specie su cui annotare successivamente le abbondanze, campo per campo, verrà utilizzato un foglio di lavoro (Modulo 2 "foglio di lavoro diatomee"). Inserire sul foglio di lavoro in versione digitale (excel) i dati anagrafici del campione in esame negli spazi predisposti e, nella **colonna 1**, i codici delle specie identificate; attivare sulla stessa colonna la funzione "ordina dalla A alla Z", ottenendo un elenco di codici in ordine alfabetico che, permettendo di rintracciare più facilmente, durante il successivo conteggio, le specie osservate, facilita l'inserimento rapido dei valori, specie per specie, rilevati in ogni campo microscopico. Qualora le specie osservate siano in numero superiore a quello delle righe predisposte, utilizzare un secondo foglio, avendo l'accortezza di specificare il numero di pagina (es. 1/2 e 2/2) in alto a destra. Stampare il/i foglio così compilato per ogni campione da processare con i conteggi. Nel caso in cui vengano individuate altre specie durante il conteggio, i relativi codici verranno aggiunti in coda all'elenco.

- **Valutazione delle abbondanze**

Si procede alla stima delle abbondanze contando tutti gli individui presenti nei campi osservati che possono essere disposti lungo un percorso a zig-zag su tutto il vetrino (come esemplificato in Fig. 8), o lungo determinate direzioni orizzontali, verticali o oblique, oppure su campi casuali, senza **mai sovrapporre i campi** evitando così che qualche elemento venga contato più volte. E' necessario

contare circa 400-450 unità, segnando sulla lista i valori riscontrati accanto al codice identificativo di ciascuna specie, campo per campo. In questa fase verranno seguite le regole seguenti:

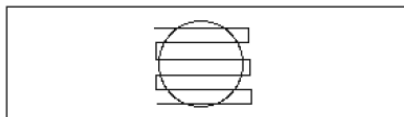


Fig. 8

- a) Contare senza distinzione tra singole valve e frustuli interi.
- b) Vanno presi in considerazione anche i frustuli/valve rotti o visibili parzialmente nel campo microscopico, purché se ne osservi più della metà, in modo da consentire l'identificazione certa della specie.
- c) Le diatomee non identificabili perché difficili da riconoscere perché si presentano in vista connettivale, per sovrapposizioni di materiale o per altre ragioni, dovrebbero essere indicate almeno con il nome del genere (es. "*Navicula* sp.") se riconoscibile. Il numero degli elementi non identificati non può superare il 12%.
- d) Le diatomee riscontrate in fase di screening ma non durante il conteggio vanno comunque segnate sul foglio di lavoro e quantificate come 0 (zero) a testimoniare comunque la loro presenza, anche se non avranno alcuna influenza nel calcolo dell'indice.

• **Caso particolare: conta stratificata**

Nei casi in cui nel campione venga riscontrata la presenza di una specie prevalente ($\geq 35\%$) o dominante ($\geq 50\%$), è opportuno continuare a contare su ulteriori campi microscopici fino a quando il numero di elementi contati riferito a tutte le specie, al di fuori di quella prevalente/dominante, raggiunge l'obiettivo di circa 400 elementi.

In alternativa può essere adottata una conta cosiddetta "stratificata" (UNI EN 14407): effettuata una prima conta a circa 400 valve/frustuli, viene calcolata e annotata la % di presenza del taxon prevalente/dominante rispetto al totale. A questo punto si continua a contare soltanto gli altri taxa tralasciando il dominante, di cui si conosce già la frequenza di riscontro, fino a raggiungere, solo per i taxa rimanenti, un totale di circa 400 valve/frustuli. I numeri del taxon prevalente/dominante sono successivamente aumentati rispettando la proporzione in base alla sua rappresentatività.

Il valore finale da attribuire alla specie prevalente sarà dato da:

$$(a * c / b) - c$$

a = numero totale elementi 1° conta (specie prevalente + altre)

b = solo altre 1° conta (esclusa specie prevalente)

c = numero totale altre (tra 1° e 2° conta)

Es: sono stati contati 432 elementi totali di cui 170 di una specie prevalente e 262 di altre specie. Nella successiva conta stratificata effettuata esclusivamente sulle altre specie si raggiunge il valore totale di 416;

$$(432 \cdot 416 / 262) - 416 = 270$$

Entrambi i sistemi permettono di ottenere numeri statisticamente significativi e rappresentativi di taxa non prevalenti/dominanti.

Nel caso in cui il numero dei campi sul foglio di lavoro risultassero insufficienti, utilizzare un secondo foglio riportando il nome del codice dei taxa e le relative conte, avendo cura di sommare i valori di tutti i campi al momento della registrazione finale dei dati.

9.2 REGISTRAZIONE ED ARCHIVIAZIONE DEI DATI

Sul "Registro campioni diatomee" (Mod.6) compilare la parte relativa ai dati anagrafici del campione. Nella tabella (esempio in fig. 9) successiva inserire i codici delle specie e la somma delle abbondanze (col.2); in caso di presenza di specie dominante indicare il numero trovato nella prima conta (col.1) e la % di presenza (col.3), in corrispondenza del codice relativo alla specie in questione, e in col.4 il totale per ogni specie come

	1	2	3	4
	↓	↓	↓	↓
CODICE	1° CONTA	% TAXON DOMINANTE	STRATIFICATA	
ADEU	5		11	
ADMI	221	52%	425	
CEUG	19		33	
GPAR	35		78	
NCPR	11		26	
ecc.....				
totale conta	425		SOMMA	

Fig. 9

contato (prima conta+strato non dominanti) e il valore della specie prevalente/dominante calcolato in proporzione a quanto riscontrato in prima conta, applicando la formula sopra riportata.

In seconda pagina del "Registro campioni diatomee" (Mod.6) inserire i parametri di campo ed i valori dei nutrienti; se il campione dell'acqua nella stazione è stato conferito da altra Struttura territoriale, questi ultimi saranno ricavabili dalla scheda di campionamento; diversamente, se è il laboratorio della stessa ST a determinare i nutrienti, ricavare i valori direttamente dal Rapporto di prova di analisi chimica dell'acqua.

E' previsto uno spazio per tutte le annotazioni eventuali. Subito sotto sono inserite le tabelle per la registrazione dei risultati:

- la prima per registrare quelli “ufficiali” da riportare nel Rapporto di prova, calcolati utilizzando i valori dell'unica conta o della conta stratificata, ove effettuata, utilizzando i valori di riferimento della macrotipologia ufficiale del corpo idrico indicata nel Piano di gestione;
- la seconda per una registrazione interna dei risultati ottenuti dalla conta stratificata, ove effettuata, escludendo il taxon dominante; ciò per una verifica interna sulla coerenza di indicazione fornita dall'intera comunità, valutata attraverso il valore degli indici TI ed IPS e dell' ICMi, con quella ottenuta escludendo dai calcoli il taxon prevalente/dominante
- la terza per eventuali simulazioni effettuate calcolando gli indici con i valori di riferimento della macrotipologia presunta nel caso in cui le osservazioni di campo siano discordanti rispetto alla tipizzazione ufficiale (es. M1 anziché M5).

10. CALCOLO DEGLI INDICI DIATOMICI E DELL'ICMi

Per il calcolo degli indici è stato predisposto un FILE EXCEL (“foglio di calcolo diatomee 2017.xls”) contenente tutte le informazioni e le formule necessarie. Lo stesso è costituito da 2 fogli di lavoro. In particolare:

10.1 FOGLIO “CALCOLO INDICI” (esempio in fig. 10)

- colonna A → sinonimie dei codici assegnati alle specie in tempi precedenti; sui manuali che risalgono ad anni passati molte specie sono individuate secondo la sistematica e la tassonomia dell'epoca.
- colonna B → altre sinonimie e note utili
- colonna C → codice aggiornato secondo la nuova nomenclatura (quello da indicare nel rapporto di prova)
- colonna D → nome aggiornato della specie
- colonna E → caselle in cui inserire il numero di valve/frustuli contati

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
				Affidabilità			Sensibilità			calcolo intermedio IPS		
		CODICE	Specie	a	IPS-I	IPS-s			TI-G	TI-W		
	Sinonimie		NUOVA NOMENCLATURA									
		CSOL	<i>Cymatopleura solea</i> (Brébisson in Bréb. & Godey) W.Smith var. solea		2	4	0	0	3	3,1	0	0
	CYLA	CSAP	<i>Cymatopleura solea</i> (Brébisson in Brébisson & Godey) W.Smith var. apiculata (W.Smith) Ralfs in Pritchard		2	4	0	0			0	0
		CAFF	<i>Cymbella affinis</i> Kützinger var. affinis		2	4	0	0	4	0,7	0	0
		CASP	<i>Cymbella aspera</i> (Ehrenberg) Peragallo		3	4	0	0	1	1,7	0	0
		CCPX	<i>Cymbella cesatii</i> (Rabh.) Grunow var. paradoxa Geitler				0	0			0	0
		CCIS	<i>Cymbella cistula</i> (Ehrenberg) Kirchner		3	4	0	0	1	2,3	0	0
CHCO		CCMP	<i>Cymbella compacta</i> Østrup		3	5	0	0	3	2,6	0	0
		CCYM	<i>Cymbella cymbiformis</i> Agardh		3	4	0	0	3	1,8	0	0
		CEAN	<i>Cymbella excisa</i> var. angusta Krammer				0	0			0	0
	ex CAFF	CAEX	<i>Cymbella excisa</i> Kützinger var. excisa		2	4	0	0			0	0
		CEPR	<i>Cymbella excisa</i> var. procera Krammer		1	4	0	0			0	0
		CESC	<i>Cymbella excisa</i> var. subcapitata Krammer				0	0			0	0
	ex CAFF	CEXF	<i>Cymbella excisiformis</i> Krammer var. excisiformis		1	5	0	0			0	0
		CHAN	<i>Cymbella hantzschiana</i> Krammer var. hantzschiana Krammer		3	5	0	0			0	0
		CHEL	<i>Cymbella helvetica</i> Kützinger		3	5	0	0	2	1,4	0	0
		CKPP	<i>Cymbella kappii</i> (Cholnoky) Cholnoky				0	0			0	0
		CLAE	<i>Cymbella laevis</i> Naegeli in Kützinger var. laevis		3	5	0	0	2	0,9	0	0
CTLA		CLTL	<i>Cymbella lancettula</i> (Krammer) Krammer		2	4	0	0	2	0,3	0	0
	ex OMIN	CLBE	<i>Cymbella lange-bertalotii</i> Krammer		3	5	0	0			0	0

Fig. 10

- colonne F e G → valori indicatori dell'indice IPS
- colonna J e K → valori indicatori dell'indice TI
- colonne H, I, L, M → calcoli intermedi degli indici IPS e TI

Una volta inseriti in colonna E i valori degli elementi contati per ogni specie individuata, in automatico verranno calcolati gli indici. Sono visibili tutti i calcoli intermedi. Utilizzando il filtro predisposto in cella **E6** e deselezionando "vuote" si visualizzano solo le specie presenti nel campione esaminato. In cella E812 viene eseguito il conteggio totale delle valve/frustuli.

In cella **G818** viene calcolato il valore dell'indice IPS con scala 1-5 che viene convertito in cella **G819** in IPS con scala 1-20, come previsto dal metodo.

	F	G
	2403,1	
818	IPS ₅	4,09
819	IPS ₂₀	15,70

	L	M
	2026,2	
818	TI	2,59

Fig. 11

In cella **M818** viene calcolato il valore dell'indice TI.

All'interno del riquadro in basso, in coda all'elenco (esempio in fig. 12), vengono calcolati i valori di RQE_IPS, RQE_TI e il valore definitivo di ICMi per le varie macrotipologie fluviali, quest'ultimo con la classe di qualità evidenziata in automatico con il colore, nel rispetto dei limiti di classe indicati in fondo al riquadro per memoria; in alto a destra nel riquadro stesso sono riportati i valori di riferimento utilizzati per il calcolo degli indici.

Nella casella centrale in cui appare il valore di **ICMi** calcolato per la **macrotipologia del corpo idrico in esame**, applicare il colore relativo alla classe di qualità.

RQE_IPS	M1	0,64	ICMi 0,69		VALORI DI RIFERIMENTO		IPS	TI		
	M2	0,75			piccoli e molto piccoli (perenni)		17,15	1,2		
	M3	0,66			medi e grandi di pianura (perenni)		14,8	2,8		
	M4	0,62			molto grandi di pianura (perenni)		16,8	2,8		
	M5	0,65			medi di montagna (perenni)		17,8	1,7		
					temporanei		16,9	2		
RQE_TI	M1	0,51	ICMi 0,69		ICMi (M1)		0,58			
	M2	1,20			ICMi (M2)		0,97			
	M3	1,20			ICMi (M3)		0,93			
	M4	0,62			ICMi (M4)		0,62			
	M5	0,72			ICMi (M5)		0,69			
Limiti di classe per i diversi macrotipi fluviali										
MACROTIPI	ELEVATO		BUONO		SUFFICIENTE		SCARSO	CATTIVO		
	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Max	Min	
M1-M2-M3-M4		>0,80	0,80	0,79	0,61	0,60	0,51	0,50	0,24	<0,24
M5		>0,88	0,88	0,87	0,65	0,64	0,55	0,54	0,25	<0,25

Fig. 12

10.2 FOGLIO “RAPPORTO DI PROVA”

E' costituito da due pagine affiancate; nella prima inserire tutti i dati richiesti così come indicato nell'esempio in basso. Una volta inseriti i dati anagrafici nel foglio “**CALCOLO INDICI**”, sul foglio “**RAPPORTO DI PROVA**” si troveranno già ricopiati in automatico i dati stessi e i valori degli indici; inserire le informazioni mancanti nelle relative caselle. Per inserire la lista: sul foglio “**CALCOLO INDICI**” filtrare i dati dalla cella “**E6**”, selezionare le colonne C, D, E, dalla riga 6 fino alla riga 812; copiare la selezione. Sul foglio “**RAPPORTO DI PROVA**” puntare il mouse sulla cella L3 e incollare la lista sotto i dati anagrafici. Inserire eventualmente le note alla prova, data di fine analisi, nome dell'analista e la qualifica. Salvare come file excel denominandolo con un identificativo del campione, **senza modificare il file originario**. Si raccomanda di inserire i dati per ogni campione esaminato partendo sempre da questo file. Prima di lanciare la stampa del rapporto di prova in pdf verificare con la funzione “Visualizza anteprima interruzioni pagina” se l'area di stampa per ciascuna delle due pagine ricade all'interno del riquadro segnato; stampare infine su carta e firmare.

	ARPA Sicilia - Struttura Territoriale di	CATANIA	U.O. Monitoraggi	pag 1/2
---	--	---------	------------------	---------

Acque interne superficiali: corsi d'acqua

Verbale di sopralluogo IRIDE n. 85128/2013

Rapporto di prova analisi Diatomee bentoniche

CAMPIONE N.	72	DATA (ricezione campione)	10/04/2013	DEL REGISTRO DEI CAMPIONI
-------------	----	---------------------------	------------	---------------------------

Bacino idrografico:	ANAPÒ
---------------------	-------

Corso d'acqua:	FIUME ANAPÒ	C.I.	R190XXXX
----------------	-------------	------	----------

Stazione:	ANAPÒ 1	Tipo:	20IN7N
-----------	---------	-------	--------

Altitudine s.l.m.	m	250	Coord. Geografiche:	XX°YY'ZZ"	N	XX°YY'ZZ"	E
-------------------	---	-----	---------------------	-----------	---	-----------	---

Operatori:	Tizio, Caio, Filano, Martino
------------	------------------------------

Comune:	Sortino	Provincia:	Siracusa
---------	---------	------------	----------

Data:	07/05/2013	ora:	10.25
-------	------------	------	-------

Tipologia di substrato campionato:

Ciottoli o massi con alghe filamentose	x	copertura alghe filamentose	60%
--	---	-----------------------------	-----

Ciottoli o massi senza alghe filamentose		Substrati artificiali	
--	--	-----------------------	--

Macrofite emergenti (specificare)	
-----------------------------------	--

Macrofite o macroalghe sommerse (specificare)	
---	--

Trasparenza dell'acqua:	totale		parziale	x	nulla	
-------------------------	--------	--	----------	---	-------	--

Ombreggiamento alveo bagnato:	nullo	x	parziale	 %	Totale	
-------------------------------	-------	---	----------	---------	--------	--

NOTE: còpasioh jpaohnàhncvòàOFV SD

FIG. 13 – PAG.1 del RDP

CORSO D'ACQUA

FIUME ANAPO

macrotipo

M1

corpo idrico

R190XXXX

pag 2/2

STAZIONE

ANAPO 1

data

07/05/2013

campione n.

72

CODICE

Specie

a

ADDA

Achnanthidium daonense (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot Monnier & Ector

1

ADEU

Achnanthidium eutrophilum (Lange-Bertalot) Lange-Bertalot

3

ADMI

Achnanthidium minutissimum (Kützing) Czamecki

102

APED

Amphora pediculus (Kützing) Grunow

78

CEUG

Cocconeis euglypta Ehrenberg emend Romero & Jahn

25

CPED

Cocconeis pediculus Ehrenberg

24

CTWE

Conticribra weissflogii (Grunow) Stachura-Suchoples & Williams

1

CRCU

Craticula cuspidata (Kützing) Mann

1

CMEN

Cyclotella meneghiniana Kützing

1

DVUL

Diatoma vulgaris Bory

1

EARE

Ellerbeckia arenaria (Moore) Crawford

1

ECPM

Encyonopsis minuta Krammer e Reichardt

1

EQMI

Eolimna minima (Grunow) Lange-Bertalot

25

FMES

Fragilaria mesolepta Rabenhorst

1

GELG

Gomphonema elegantissimum Reichardt & Lange-Bertalot in Hofmann & al.

1

GMIN

Gomphonema minutum (Agardh) Agardh f. minutum

2

GOLI

Gomphonema olivaceum (Hornem.) Brébisson var. olivaceum

4

GPAR

Gomphonema parvulum (Kützing) Kützing var. parvulum f. parvulum

5

GYAT

Gyrosigma attenuatum (Kützing) Rabenhorst

1

MPMI

Mayamaea permissa (Hustedt) Bruder & Medlin

2

NCTE

Navicula cryptotenella Lange-Bertalot

94

NCTO

Navicula cryptotenelloides Lange-Bertalot

12

NGRE

Navicula gregaria Donkin

1

NMGL

Navicula margalithii Lange-Bertalot

7

NRCH

Navicula reichardtiana Lange-Bertalot

6

NTPT

Navicula tripunctata (O.F.Müller) Bory

63

NAMP

Nitzschia amphibia Grunow f. amphibia

1

NDIS

Nitzschia dissipata (Kützing) Grunow ssp.dissipata

5

NFON

Nitzschia fonticola Grunow in Van Heurck

1

NINC

Nitzschia inconspicua Grunow

3

NLIN

Nitzschia linearis (Agardh) W.M. Smith var. linearis

1

NPAD

Nitzschia palea (Kützing) W.Smith var.debilis(Kützing)Grunow in Cl. & Grun

1

PSBR

Pseudostaurosira brevistriata (Grun.in Van Heurck) Williams & Round

1

RABB

Rhoicosphenia abbreviata (Agardh) Lange-Bertalot

12

SCON

Staurosira construens Ehrenberg

1

489

RQE_IPS

M1

0,92

M2

1,06

M3

0,93

M4

0,88

M5

0,93

RQE_TI

M1

0,50

M2

1,18

M3

0,93

M4

0,61

M5

0,71

ICMi (M1)

0,71

ICMi (M2)

1,12

ICMi (M3)

1,06

ICMi (M4)

0,75

ICMi (M5)

0,82

ICMi

0,71

NOTE all' analisi:

DATA:

ANALISTA:

QUALIFICA

FIRMA

Fig. 14 – pag.2 del RDP

11. GARANZIA DI QUALITÀ

La qualità del campionamento e dei dati prodotti dall'analisi è assicurata dalla qualificazione del personale, sulla base di appropriata istruzione, formazione e addestramento e dall'esperienza acquisita in affiancamento a personale esperto.

11.1 Controlli di qualità

Per tenere sotto controllo la ripetibilità di lettura dei preparati e di composizione della lista floristica:

1. su un 10% dei campioni processati verranno effettuate:
 - una lettura in doppio da uno stesso operatore, a distanza di qualche giorno dalla prima lettura, sullo stesso preparato microscopico (**ripetibilità stretta**);
 - una lettura in doppio da uno stesso operatore su preparati microscopici diversi dello stesso campione (**ripetibilità stretta che include parzialmente anche la variabilità insita nella preparazione del campione**);
 - una lettura in doppio fra due operatori della stessa Struttura Territoriale, qualora presenti (**ripetibilità intermedia**);
2. almeno 1 volta in un anno **due preparati microscopici**, allestiti da uno stesso laboratorio, verranno letti da tutti gli operatori esperti di ARPA Sicilia (**ripetibilità interlaboratorio**) presso i rispettivi laboratori.

Sulle comunità diatomiche individuate nelle letture intra e inter operatore verranno effettuati dei confronti a coppie, utilizzando due Indici di similarità: l'Indice di Bray Curtis e l'indice PTD.

- Bray-Curtis.

L'indice di Bray-Curtis permette, sulla base dei dati di composizione e abbondanza dei taxa, di misurare il livello di similarità di due liste di organismi ottenute indipendentemente da due operatori a partire dallo stesso campione. Esso può assumere valori da 0 (comunità completamente differenti) a 1 (comunità identiche).

$$\text{- Indice di Bray-Curtis} = 2 \times \frac{\sum \min(x_{ji}, x_{ki})}{\sum (x_{ji} + x_{ki})}$$

x_{ji} : taxon i-esimo del campione j
 x_{ki} : taxon i-esimo del campione k

In prima istanza si propone, per la verifica della ripetibilità i seguenti valori dell'Indice di Bray Curtis:

Valutazione ripetibilità	Bray-Curtis	
	ripetibilità stretta e intermedia	ripetibilità interlaboratorio
Soddisfacente	≥0,90	≥0,85
Discutibile	0,85-0,90	0,80-0,84
Insoddisfacente	<0,85	<0,80

Sul risultati del campione annuale di cui al superiore punto 4, la ripetibilità interlaboratorio sarà data dalla media dei valori dell'Indice di Bray Curtis ottenuti dai confronti di similarità fra tutte le possibili coppie di comunità risultanti.

Per tutte le letture effettuate nell'interlaboratorio verranno calcolati i valori di ICMi; questi ultimi risultati verranno elaborati per calcolare il valore di Incertezza di misura di ARPA Sicilia.

12. MODULI

Modulo 1BIS – SCHEDA DI CAMPO

Modulo 2 – FOGLIO DI LAVORO

Modulo 3 – VERBALE DI SOPRALLUOGO E CAMPIONAMENTO

Modulo 4 - REGISTRO INTERNO VERBALI SOPRALLUOGO

Modulo 5 - REGISTRO INTERNO CAMPIONI Monitoraggio acque DM 260/2010

Modulo 6 – REGISTRO DIATOMEI

13. RIFERIMENTO A DOCUMENTI INTERNI

Istruzione operativa “Norme igienico sanitarie per campionamenti biologici a rischio sui corsi d'acqua - Diatomee bentoniche”

14. RIFERIMENTI NORMATIVI E BIBLIOGRAFICI

➤ NORMATIVA

- DIRETTIVA 2000/60/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 23 ottobre 2000 che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee L 327/2, 22.12.2000: 1-71.
- Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n.152. Norme in materia ambientale. Gazzetta Ufficiale- Supplemento Ordinario n. 96 del 14 aprile 2006.
- Decreto Legislativo 11 Agosto 2008, n. 131. «Regolamento recante i criteri tecnici per la caratterizzazione dei corpi idrici (tipizzazione, individuazione dei corpi idrici, analisi delle pressioni) per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, recante : Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo». Gazzetta Ufficiale Supplemento Ordinario Serie generale n. 187 dell'11/8/2008.

- Decreto 14 Aprile 2009, n.56. Regolamento recante «Criteri tecnici per il monitoraggio dei corpi idrici e l'identificazione delle condizioni di riferimento per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n.152, recante Norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del decreto legislativo medesimo». Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario n. 83, 30 maggio 2009.
- Decreto 8 novembre 2010, n. 260. Regolamento recante « Criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del decreto legislativo 3 aprile 2006, n. 152, recante norme in materia ambientale, predisposto ai sensi dell'articolo 75, comma 3, del medesimo decreto legislativo». Gazzetta Ufficiale – Supplemento Ordinario n. 31, 7 febbraio 2011.

➤ MANUALI ICONOGRAFICI DI RIFERIMENTO

1. K. Kramer, H. Lange-Bertalot. Sußwasserflora von Mitteleuropa :
 - a. 1986 - Naviculaceae, 2/1, 876 pp.
 - b. 1988 - Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 2/2, 596 pp
 - c. 1991 - Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 2/3, 576 pp.
 - d. 1991 - Achnanthaceae, Kritische Ergänzungen zu Achnanthes s.l., Navicula s. str., Gomphonema Gesamtliteraturverzeichnis 2/4, 437 pp.
 - e. 2000 - Süßwasserflora von Mitteleuropa Bacillariophyceae English and French translation of the keys, 2/5 - 311 pp
2. 2000 - PRYGIEL J., COSTE M. - Guide méthodologique pour la mise en oeuvre de l'Indice Biologique Diatomées. N FT 90-354. Agence de l'Eau – Cemagref – Groupement de Bordeaux. Agence de l'eau, 134 pp.
3. 2013 – Falasco E., Piano E., Bona F.. Guida al riconoscimento e all'ecologia delle principali diatomee fluviali dell'Italia nord occidentale. Biologia Ambientale, 27 (1), 292 pp.
4. 1994 – Gaj-Levra P., Abate O.. Le diatomee d'acqua dolce in Italia. ENEA, Serie studi ambientali, 290 pp.
5. 2006 - TAYLOR J.C., ARCHIBALD C.G.M., HARDING W.R. 2006 - An Illustrated Guide to Some Common Diatom Species from South Africa. Report to the Water Research Commission by DH Environmental Consulting, 212 pp.
6. 2010 - Cardoso Soares Ribeiro L., Intertidal benthic diatoms of the Tagus estuary: Taxonomic composition and spatial-temporal variation, Doutoramento em Biologia Especialidade Biodiversidade, Università di Lisbona, Facoltà di Scienze, Dipartimento di Biologia Vegetale. Vol.1/2. 340 pp

7. 2010 - Cardoso Soares Ribeiro L., Intertidal benthic diatoms of the Tagus estuary: Taxonomic composition and spatial-temporal variation, Doutoramento em Biologia Especialidade Biodiversidade, Università di Lisbona, facoltà di Scienze, Dipartimento di Biologia Vegetale. Vol. 2/2 , 130 pp

➤ BIBLIOGRAFIA

- Mancini L, Sollazzo C (Ed.) 2009. Metodo per la valutazione dello stato ecologico delle acque correnti: comunità diatomiche. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 09/19).
- ISPRA - ARPA Sicilia. Linee guida per la valutazione del rischio da esposizione ad agenti chimici pericolosi e ad agenti cancerogeni e mutageni, 2011. [11] APAT. Progetto Benchmarking. Linee guida per la valutazione del rischio nelle attività territoriali delle Agenzie Ambientali. Roma, 2006
- Metodi Biologici per le acque superficiali interne – Manuali e linee guida ISPRA n.111/2014
- Cambra J., Ector L., Sabater S., 2005. Metodologia para el establecimiento del Estrado Ecologico segun la Directiva MARCO del Agua. Protocols de muestreo y analisis para Fitobenthos (Microalgas bentonicas). Ministerio de Medio Ambiente. Confederacion Hidrografica del Ebro. 43 pp.
- Diatoms for Assessing River Ecological Status (DARES project), 2004. Enumeration protocol. 13 pp.
- Diatoms for Assessing River Ecological Status (DARES project). Preparation protocol. 2 p.
- Diatoms for Assessing River Ecological Status (DARES project). Sampling protocol. 9 pp.
- Della Bella V., Pace G., Barile M.C., Zedde A., Puccinelli C., Ciadamidaro S., Danieli P.P., Belfiore C., Andreani P., Aulicino F.A. and Mancini L. Benthic diatom assemblages and their response to human stress in small sized volcanic-siliceous streams of central Italy (Mediterranean eco-region). Hydrobiologia 2012.
- Dell'Uomo A., 2004. L'indice diatamico di eutrofizzazione/polluzione (EPI-D) nel monitoraggio delle acque correnti. Linee guida. APAT Agenzia per la protezione dell'ambiente e per I servizi tecnici, Roma, 101 pp.
- Kelly M.G., A. Cazaubon, E. Coring, A. Dell'Uomo, L. Ector, B. Goldsmith, H. Guasch, J. Hürlimann, A. Jarlman, B. Kawecka, J. Kwadrans, R. Laugaste, E.A. Lindstrøm, M. Leitao, P. Marvan, J. Padisák, E. Pipp, J. Prygiel, E. Rott, S. Sabater, H. van Dam & J. Vizinet, 1998 - Recommendations for routine sampling of diatoms for water quality assessment in Europe. J. Appl. Phycol., 10: 215-224.
- Krammer K., Taylor J.C., de la Rey P.A., van Rensburg L., 2005. Recommendations for the collection, preparation and enumeration of diatoms from riverine habitats for the water quality monitoring in South Africa.
- Minciardi M.R., Rossi G.L., Azzollini R., Betta G., 2003. Linee guida per il biomonitoraggio dei corsi d'acqua in ambiente alpino. ENEA, Provincia di Torino, 63 pp.

- Schaumburg J., Schmedtje U., Schranz C., Köpf B., Schneider S., Meilinger P., Hofmann G., Gutowski A., Foerster J. 2005. Instruction Protocol for the ecological Assessment of Running Waters for Implementation of the EU Water Framework Directive: Macrophytes and Phytobenthos. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft. 89 pp.
- STAR, 2002. Sampling protocol and audit benthic diatoms. 14 pp.
- Puccinelli C., Marcheggiani S., Bernabei S., e Mancini L. 2012. Linea guida per l'analisi delle comunità diatomiche.
- Puccinelli C., Marcheggiani S., Scenati R. e Mancini L. 2012. An experimental approach on benthic diatom sampling using artificial substrates in deep water bodies.
- Finocchiaro M., Torrisi M., Ferlito F., Dell'Uomo A., Ector L. 2011. Biodiversità algale in Sicilia: diatomee rare o notevoli del bacino idrografico del fiume Simeto. 18 pp.
- Finocchiaro M., Torrisi M., Ferlito F., Caratterizzazione delle comunità di diatomee del bacino idrografico del fiume Simeto (Sicilia orientale) mediante applicazione dell'Indice Diatomico di Eutrofizzazione/Polluzione (EPI-D) 2009. 14 pp.