



IMPRECO



IMPRECO

**Common strategies and best practices to IMprove the
transnational PProtection of ECOsystem integrity and
services**

DELIVERABLE T1.2.2

**SIMPLIFIED JOINT MONITORING
PROTOCOL FOR AQUATINA DI FRIGOLE**

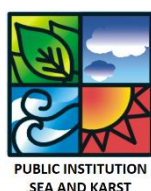
Author(s): UniSalento for the protected area of Aquatina di Frigole

Date: 31/10/2018



**UNIVERSITÀ
DEL SALENTO**

IMPRECO



Project acronym: IMPRECO
Project full title: Common strategies and best practices to IMProve the transnational PROtection of ECOsystem integrity and services
Project Number: 450
Partner responsible: PP3, University of Salento - Department of Biological and Environmental Science and Technologies (DiSTeBA)
Editors: Maurizio Pinna, Gabriele Marini, Francesca Giannotta, Valeria Specchia
Communication level: Public



Table of Contents

1	PRESENTATION OF IMPRECO PROJECT	4
2	PRESENTATION OF IMPRECO OBJECTIVES	4
3	INTRODUCTION TO THE ESS APPROACH	4
4	INTRODUCTION TO THE IMPRECO COMMUNITY BASED MANAGEMENT SYSTEM	5
5	THE LOCAL ACTIVITIES AND THE INVOLVEMENT OF LOCAL STAKEHOLDERS	5
6	PROTOCOLLO SEMPLIFICATO PER L'AREA PROTETTA DI AQUATINA DI FRIGOLE	6
6.1	Obiettivi del monitoraggio semplificato (It.)	6
6.2	Specie monitorate (It.)	6
6.3	Metodologie adottate	7
6.3.1	Macroinvertebrati bentonici (It.)	7
6.3.2	<i>Pinna nobilis</i> (Linnaeus 1758) (It.).....	18
6.3.3	Specie aliene (It.).....	20
6.4	Gruppi di interesse (It.)	22
6.5	Training dei gruppi di interesse (It.)	22
6.6	Bibliografia (It.)	23
7	SIMPLIFIED MONITORING PROTOCOL FOR THE PROTECTED AREA OF AQUATINA DI FRIGOLE	24
7.1	Simplified monitoring objectives (En.)	24

IMPRECO



7.2	Monitoring species	24
7.3	Methodologies adopted	25
7.3.1	Benthic macroinvertebrates (En.).....	25
7.3.2	<i>Pinna nobilis</i> (Linnaeus 1758) (En.).....	35
7.3.3	Alien species (En.).....	37
7.4	Target groups involved (En).....	40
7.5	Training of the target groups (En)	40
7.6	References (En.)	40



1 PRESENTATION OF IMPRECO PROJECT

IMPRECO is a territorial cooperation project funded under the 1st call of the INTERREG VB ADRION 2014-2020 Program, «Sustainable region» priority

IMPRECO - general information

- 7 project partners (Municipality of Staranzano, Veneto Agriculture, University of Salento, DOPPS - Birdlife Slovenia, Sea and Karts, Albanian Development Fund, Region of Crete)
- 7 protected areas involved (Foce dell'Isonzo Nature Reserve, Bosco Nordio Integral Reserve, Aquatina di Frigole, Val Stagnon Natural Reserve, Pakleni Islands, Lake Skutari and Buna Delta, North Eastern Peninsula of Crete)
- Duration: 30 months (01/2018 - 06/2020)
- Budget: € 1,142,165.50

2 PRESENTATION OF IMPRECO OBJECTIVES

HUMAN AND NATURAL PRESSURES, such as pollution, waste disposal, land use, over-exploitation of natural resources, climate change, loss of biodiversity, etc. are compromising the health of ECOSYSTEMS and, consequently, their ability to provide services (so-called ECOSYSTEM SERVICES) that are fundamental for our well-being, our security and our prosperity.

PROTECTED AREAS are key players in the protection, conservation and connectivity of ecosystems as well as joint points of flows between ecosystems and society ...

... the IMPRECO MAIN OBJECTIVE is therefore to:

"Improve the protection of ecosystem services and tackle their environmental vulnerability by strengthening the potential of protected areas in the conservation of biodiversity and ecosystems through transnational networking"

3 INTRODUCTION TO THE ESS APPROACH

Protecting ecosystems is only an interest of Protected Areas? Ecosystems offer free and daily services (defined precisely ecosystem services) that are the essential basis of economic processes, development and well-being of human societies: this extraordinary richness is our NATURAL CAPITAL and it should be considered AT THE CORE OF OUR SUSTAINABLE DEVELOPMENT MODELS. This is called the ECOSYSTEM SERVICES APPROACH which seeks to incorporate into decision-making the value of these benefits provided to people by nature for their conservation and valorisation.



Project approach: Actively include Protected Areas in local sustainable development strategies and integrate the Ecosystem Services Approach into the decision-making processes and management/development plans of our local communities.

4 INTRODUCTION TO THE IMPRECO COMMUNITY BASED MANAGEMENT SYSTEM

Is it possible for Protected Areas to achieve such an ambitious objective by themselves? Sustainable development becomes a social practice only when the DIFFERENT STAKEHOLDERS embrace local development processes generating the market and social demand/supply: to do this it is necessary to establish a strong relationship between the various interests in the decision-making process through a COMMUNITY BASED PLANNING AND MANAGEMENT APPROACH that proposes concrete solutions both for the benefit of local population and the conservation of protected areas in the long term

Project approach:

- **Development and application of an integrated management system of Protected Areas.** Thanks to the participatory approach and pilot projects, 105 organizations are involved in IMPRECO ecosystem management strategies;
- **Improve the skills / abilities of all stakeholders in the protection, conservation and enhancement of ecosystems and related services**

5 THE LOCAL ACTIVITIES AND THE INVOLVEMENT OF LOCAL STAKEHOLDERS

1. **MAPPING OF ECOSYSTEMS AND ECOSYSTEMS SERVICES OF THE NORTHEASTERN EDGE OF CRETE and IDENTIFICATION OF KEY RELATIONSHIPS BETWEEN LOCAL ECOSYSTEMS AND STAKEHOLDERS:** The University of Salento (PP3) has mapped out the local ecosystems and identified/classified the various services supporting the community. Subsequently, he connected local actors, ecosystems and related services, studying their relationships in terms of involvement, benefits, impacts and conflicts. This preliminary study not only qualifies the relationship between the protected area of Aquatina di Frigole and the territory, but also highlights who are the most important stakeholders for the integrated management of the protected area and the ecosystem services on which to concentrate the protection and enhancement.
2. **DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A BIODIVERSITY MONITORING PROTOCOL:** The University of Salento (PP3) developed a monitoring protocol on some target species or habitats able to act as quality level indicators of the health status and conservation of local ecosystems. In this way, the protected area of Aquatina di Frigole, in its



institutional activity of collecting data on biodiversity, can play the role of observatory on the functionality of the ecosystems present therein. To do this, a transnational biodiversity monitoring campaign on such species has been launched to improve the assessment on ecosystems and ecosystems services.

- 3. DEVELOPMENT AND APPLICATION OF A SIMPLIFIED BIODIVERSITY MONITORING PROTOCOL** The protocol has been developed in a simplified form to allow its application also by volunteers and end-users of the protected area in order to enlarge the quantity of data while prompting the community based management system foreseen by the project. The Simplified Joint Monitoring Protocol contains methods to obtain useful and reliable information on target species/habitats (or some of them): University of Salento (PP3) identified the best methodology and tools for its implementation, which are transferred to the volunteers thanks to a dedicated training session.

6 PROTOCOLLO SEMPLIFICATO PER L'AREA PROTETTA DI AQUATINA DI FRIGOLE

6.1 Obiettivi del monitoraggio semplificato (It.)

Il presente *deliverable* ha lo scopo di definire un protocollo di monitoraggio semplificato per le specie target selezionate mediante criteri comuni nel *Joint monitoring protocol for species, habitats, ES functions and ESS* (DT1.2.1), da fornire a volontari, studenti ed associazioni ambientaliste e sportive per il loro coinvolgimento nella raccolta dei dati. Questo *deliverable* rappresenta un 2° livello di implementazione a partire dal *Joint Monitoring Protocol*, che coinvolge i volontari per aumentare la quantità di dati ed informazioni disponibili riducendo il tempo di lavoro e i costi del monitoraggio.

6.2 Specie monitorate (It)

Le specie target, le guild selezionate per il monitoraggio ed i metodi di campionamento sono elencati nella tabella sottostante:

Specie/Guild	Metodi di Campionamento
Macroinvertebrati Bentonici	Grab/Box corer (Sangiorgio et al., 2009)
<i>Pinna nobilis</i>	Line transect (ISPRA 2006) and biometry (Marocco et al., 2018)
Specie Aliene	Presence/Absence criteria

IMPRECOC



Il protocollo di monitoraggio semplificato potrebbe anche permettere di ottenere nuove informazioni per le specie coinvolte (e.g., presenza di nuove specie aliene, nuove aree di nursery per la *Pinna nobilis*, distribuzione spaziale per la guild dei macroinvertebrati bentonici etc.).

Prima del monitoraggio PP3 organizzerà un training per i volontari e gli studenti coinvolti nel campionamento al fine di trasferire i criteri del protocollo del monitoraggio semplificato delle specie target. La formazione sarà gestita da ricercatori coinvolti nel progetto, a conoscenza delle tecniche di campionamento per il monitoraggio delle specie target.

Tutti i volontari saranno ben addestrati all'uso delle attrezzature e alle tecniche di analisi del campione stabilite nel protocollo di campionamento, nell'identificazione dei macroinvertebrati bentonici e nella conoscenza delle specie aliene.

I metodi e le tecniche più complesse potranno includere la formazione pratica, come ad esempio: campionamento sul campo che include la raccolta dei campioni, l'elaborazione dei campioni e l'identificazione delle specie in laboratorio.

Il campionamento delle specie target nella laguna di Acquatina sarà effettuato nella stagione estiva tra maggio e luglio. In questo periodo, infatti, è massima la presenza di alcune specie aliene e l'abbondanza e la ricchezza in specie dei macroinvertebrati bentonici.

6.3 Metodologie adottate

6.3.1 Macroinvertebrati bentonici (It.)

I macroinvertebrati bentonici sono piccoli organismi visibili ad occhio nudo con dimensioni non inferiori ad 0,5 mm che vivono in prossimità del sedimento (epibenthos) o infossati nel sedimento (endobenthos), e possono essere sessili o mobili. Fanno parte di questa comunità numerosi taxa appartenenti al regno animale, come crostacei, nematodi, platelminti, molluschi, irudinei, oligocheti e varie specie di insetti (figura 1).

I macroinvertebrati occupano tutti i livelli dei consumatori nella struttura trofica degli ambienti acquatici, appartenendo alle categorie degli erbivori, dei carnivori e dei detritivori, presentando una vasta gamma di meccanismi di nutrizione per sfruttare al massimo le risorse trofiche disponibili. I macroinvertebrati bentonici risentono delle varie forme di inquinamento e delle pressioni antropiche con modificazioni del proprio stato naturale. Queste modificazioni riguardano variazioni nell'abbondanza, nella composizione e ricchezza tassonomica, nella biomassa e nei tratti biologici. Pertanto, essi sono considerati degli ottimi bioindicatori ampiamente utilizzati, nel biomonitoraggio e assieme ad altri elementi di qualità biologica, sono utilizzati per la valutazione dello stato di qualità ecologica degli ambienti acquatici. AMBI, M-AMBI, BENTIX, BITS, BO2A, STAR-ICMI sono solo alcuni degli indicatori ecologici più utilizzati nei piani di biomonitoraggio per gli ecosistemi acquatici in accordo alla Direttiva Quadro sulle Acque (WFD, 2000/60 EC).

IMPRECO

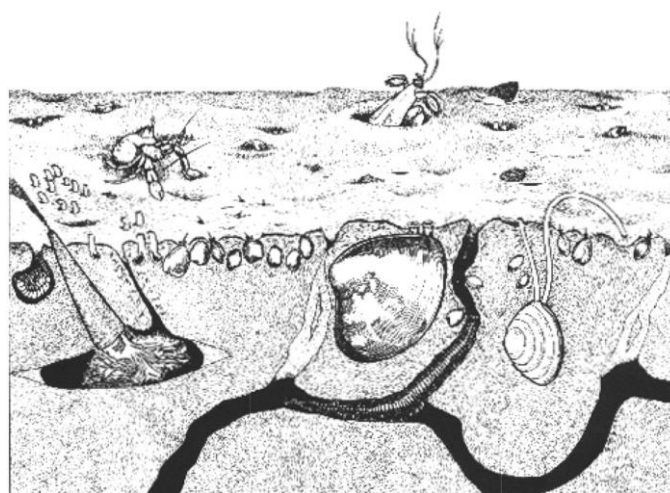


Figura 1 - Rappresentazione di una biocenosi bentonica tipica di fondo molle.

6.3.1.1 Campionamento semplificato dei Macroinvertebrati Benthici (It.)

Il campionamento della comunità dei macroinvertebrati bentonici è legato alle caratteristiche strutturali degli ecosistemi e la scelta dello strumento risulta pertanto condizionata dal tipo di substrato da campionare. I fondi mobili come quello di Aquatina di Frigole, possono essere nudi o ricoperti da vegetazione, sia sommersa che emergente, e costituiscono un'ampia varietà di habitat per la guild di macroinvertebrati bentonici che li colonizzano. Su queste superfici, i macroinvertebrati hanno la capacità di penetrare nel sedimento e, in relazione alla composizione/granulometria del substrato e agli adattamenti specifici, possono raggiungere anche una profondità di 15-20 cm costruendo un intreccio di canali e gallerie che favoriscono l'ossigenazione del sedimento stesso.

6.3.1.2 Metodiche di campionamento del sedimento mediante benna/box corer e trattamento dei campioni (It.)

Tecniche di campionamento e misura in campo

Il sedimento mobile contenente i macroinvertebrati è prelevato tramite benna tipo Ekman Birge o box corer, strumenti particolarmente adatti a studi di tipo quantitativo; essi consentono, infatti, di prelevare più o meno facilmente quantità ben definite di sedimento e, quindi, di ottenere una notevole riproducibilità del campione. Questi strumenti permettono, inoltre, di ottenere informazioni più precise sulla distribuzione degli organismi e, campionando esemplari più integri, permettono anche una valutazione più accurata della biomassa individuale. L'uso del box corer (figura 2) può presentare alcuni vantaggi rispetto alle benne in quanto non provoca un significativo disturbo del substrato ed il dilavamento del materiale è relativamente limitato; tale strumento è inoltre, in grado di mantenere inalterata la stratificazione presente nel campione, al contrario di quanto si verifica con le benne.



Figura 2 - Sequenza delle fasi con cui viene utilizzato un box corer manuale.

Sforzo di campionamento

Il campionamento nell'area protetta di Aquatina di Frigole sarà effettuato in sei siti posizionati in relazione alla prossimità al mare aperto e al gradiente di salinità (figura 3). Per ciascun sito di campionamento saranno eseguite tre repliche con il box corer. Per la vagliatura del sedimento sarà utilizzato un setaccio di 2 mm di maglia L'attività di monitoraggio è prevista nel periodo che intercorre tra Maggio e Luglio.



Figura 3 - Mappa della laguna di Aquatina con indicazione dei siti di campionamento e delle coordinate geografiche.



Metodiche di trattamento del campione

Il campione di sedimento sarà vagliato su di un setaccio con aperture quadrate e vuoto di maglia di 1 mm (Retsch® GmbH, Germany, 40cm Ø; DIN ISO 3310/1) per separare i macroinvertebrati bentonici dal resto del materiale campionato ed evitare la perdita di organismi (figura 4). Si potrà utilizzare in questo caso il setaccio con maglie da 2 mm per rendere le successive fasi di campionamento più semplici per i volontari. Il setaccio con maglie da 2 mm, infatti, trattiene organismi più grandi pertanto più veloci da smistare e più semplici da identificare, riducendo i tempi, i costi e lo sforzo. Al termine di questa fase di vagliatura e pulitura del campione dal materiale più finemente particolato, il materiale raccolto sarà trasferito in barattoli o sacchetti di plastica rigida o meno mantenuti refrigerati a 4-6°C fino all'arrivo in laboratorio. Possono essere utilizzati, ad esempio, contenitori o sacchetti con un volume di 1000 ml in plastica semitrasparente in modo da poterne osservare il contenuto. Il contenitore deve essere etichettato prima di essere trasferito nel luogo di stoccaggio. L'etichetta deve riportare in modo sintetico tutte le indicazioni relative al sito e data di campionamento, nome della stazione, numero di replica e nome degli operatori che hanno effettuato il campionamento.



Figura 4 - Operazione di vagliatura e pulitura in campo del campione di sedimento.

Parametri da determinare

I parametri che dovranno essere determinati sono:

IMPRECO



- Riconoscimento tassonomico fino al raggiungimento del livello di specie ove possibile;
- Abbondanza (ind/m²) e ricchezza specifica, necessari per l'applicazione degli indici biologici AMBI, M-AMBI (Muxika et al., 2007) e BITS (Mistri e Munari, 2008), indicatori previsti dalla normativa italiana per la classificazione dello stato ecologico delle lagune italiane, e altri indici per la descrizione della comunità (es. indice di diversità di Shannon, indice di ricchezza di Margalef, indice di equitabilità di Pielou e indice di dominanza di Simpson).

Parametri opzionali: Dimensioni corporee; Biomassa.

Metodo di analisi

In laboratorio, i campioni di macroinvertebrati bentonici, saranno sottoposti a sorting, cioè a separazione della frazione morta (tanatocenosi) dalla frazione viva, e quest'ultima suddivisa nei principali gruppi tassonomici (molluschi, crostacei, policheti, ecc.). Gli organismi individuati, saranno conservati in alcol etilico al 70 % o altra soluzione conservante a bassa tossicità, fino alla successiva fase di identificazione delle specie mediante stereomicroscopio/microscopio ottico e chiavi dicotomiche disponibili in letteratura (figura 5). Successivamente si procederà alla determinazione delle dimensioni corporee delle specie di macroinvertebrati bentonici con l'uso di un sistema di analisi immagine applicato allo stereomicroscopio.



Figura 5 - Identificazione dei macroinvertebrati allo stereomicroscopio e sistema di analisi immagine.

Testi e chiavi dicotomiche per l'identificazione tassonomica dei macroinvertebrati bentonici.

Bellan-Santini, D., Karaman, G., Krapp-Schickel, G., Ledoyer, M., Ruffo, S. 1993. The Amphipoda of the Mediterranean. Part 3: Gammaridea (Melphidippidae to Talitridae), Ingolfiellidea, Caprellidea. Mémoires de l'Institut océanographique, Monaco, no.13. Institut Océanographique: Monaco. ISBN 2-7260-0160-2. 813 pp.

IMPRECO



Campaioli S., Ghetti P.F., Minelli A., Ruffo S. 1994. Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane. Volume I, Provincia Autonoma di Trento, 357 pp.

Campaioli S., Ghetto P.F., Minelli A., Ruffo S. 1999. Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane. Volume II. Provincia Autonoma di Trento, 484 pp.

Sansoni G. 1988. Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d'acqua italiani. Provincia Autonoma di Trento, 191 pp.

Sconfinetti R. 2004. Chiave di riconoscimento visuale dei più comuni peracaridi (Crustacea, Peracarida) lagunari italiani. Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol., 81: 79-89.

Tabella 1 - Elenco dei macroinvertebrati bentonici osservati nella laguna di Aquatina.

<i>Abra alba</i>	<i>Heteromastus filiformis</i>	<i>Rimostrombidium sphaericum</i>
<i>Acanthocardia tuberculata</i>	<i>Homalopoma sanguineum</i>	<i>Rissoa variabilis</i>
<i>Amphorella amphora</i>	<i>Laboea strobila</i>	<i>Rissoa ventricosa</i>
<i>Armandia cirrhosa</i>	<i>Loripes orbiculatus</i>	<i>Ruditapes decussatus</i>
<i>Bittium reticulatum</i>	<i>Lumbrineris latreilli</i>	<i>Spio decorata</i>
<i>Brania arminii</i>	<i>Lumbrineris</i> sp.	<i>Stenosemella nivalis</i>
<i>Carcinus aestuarii</i>	<i>Monocorophium acherusicum</i>	<i>Stenosemella ventricosa</i>
<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Murex</i> sp.	<i>Strombidium acutum</i>
<i>Ceriagrion tenellum</i>	<i>Myosotella myosotis</i>	<i>Strombidium capitatum</i>
<i>Cerithium vulgatum</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Strombidium conicum</i>
<i>Chamelea gallina</i>	<i>Naineris laevigata</i>	<i>Syllides japonicus</i>
<i>Chiton olivaceus</i>	<i>Nassarius</i> sp.	<i>Terebella lapidaria</i>
<i>Cirriiformia tentaculata</i>	<i>Neanthes acuminata</i>	<i>Tintinnopsis baltica</i>
<i>Cirrophorus furcata</i>	<i>Noctiluca scintillans</i>	<i>Tintinnopsis beroidea</i>
<i>Clanculus jussieui</i>	<i>Notomastus latericeus</i>	<i>Tintinnopsis cylindrica</i>
<i>Clanculus cruciatus</i>	<i>Oligochaeta</i>	<i>Tintinnopsis karajacensis</i>
<i>Codonellopsis schabi</i>	<i>Paracartia latisetosa</i>	<i>Tintinnopsis levigata</i>
<i>Coenagrion mercuriale</i>	<i>Pelagostrobilidium spirale</i>	<i>Tintinnopsis lobiancoi</i>
<i>Dorvillea rubrovittata</i>	<i>Perkinsyllis anophthalma</i>	<i>Tintinnopsis minuta</i>
<i>Ecrobia ventrosa</i>	<i>Peronidia albicans</i>	<i>Tintinnopsis nana</i>
<i>Eutintinnus apertus</i>	<i>Petaloproctus terricolus</i>	<i>Tintinnopsis parvula</i>
<i>Eutintinnus fraknoi</i>	<i>Petalotricha ampulla</i>	<i>Tintinnopsis radix</i>
<i>Exogone meridionalis</i>	<i>Phoronida</i>	<i>Tritia neritea</i>
<i>Exogone naidina</i>	<i>Pinna nobilis</i>	<i>Tritia nitida</i>
<i>Ficopomatus enigmaticus</i>	<i>Podocorynoides minima</i>	<i>Tritia pellucida</i>
<i>Gammarus aequicauda</i>	<i>Podon polyphemoides</i>	<i>Truncatella subcylindrica</i>
<i>Gibbula albida</i>	<i>Protorhabdonella simplex</i>	<i>Venerupis corrugata</i>



6.3.1.3 Metodiche di campionamento mediante substrati artificiali e trattamento dei campioni (It.)

Tecniche di campionamento e misura in campo

Il campionamento di macroinvertebrati bentonici con substrati artificiali si basa sulla costruzione ed introduzione in natura di substrati di detrito vegetale che formano superfici colonizzabili da parte dei macroinvertebrati bentonici. Le trappole trofiche rappresentano le strutture più utilizzate, costituite da “pacchi” di detrito vegetale immesso all’interno di sacchetti a rete in nylon che vengono depositati sul fondo dell’ecosistema acquatico. I pacchi di foglie, immessi in acqua, simulano il naturale accumulo di materia organica morta (i.e., detrito) che si realizza negli ambienti acquatici (ad esempio estuari, fiumi, laghi e lagune) principalmente a partire dalla stagione tardo-estiva ed inizio-autunnale (Petersen e Cummins, 1974). Le trappole trofiche di detrito sono generalmente costituite dalle specie vegetali più rappresentative dell’ecosistema in studio in quanto esse costituiscono il maggior input detritico per le comunità bentoniche presenti. La specie più frequentemente utilizzata nella costruzione di pacchi di detrito vegetale è la *Phragmites australis* in quanto ubiquitaria nel bacino del Mediterraneo ed anche risorsa trofica preferenzialmente utilizzata dai macroinvertebrati.

Il campionamento dei macroinvertebrati bentonici con trappole trofiche prevede tre fasi di lavoro: 1. allestimento ed immissione in natura dei pacchi di detrito fogliare, 2. prelievo in campo e 3. trattamento dei campioni in laboratorio.

1. allestimento ed immissione in natura dei pacchi di detrito fogliare:

- la raccolta del materiale fogliare in campo (foglie di *P. australis*)
- lo stoccaggio in laboratorio
- il trattamento in stufa termostata
- la preparazione dei pacchi fogliari
- la sistemazione in campo.

Le foglie di *Phragmites australis* vengono raccolte nel periodo tardo-estivo o inizio-autunnale, quando sono prossime all’abscissione. Il materiale raccolto in campo viene, quindi, accumulato e trasferito in laboratorio per le successive fasi di lavoro. In laboratorio, le foglie devono essere lasciate per qualche tempo, almeno una settimana, in ambiente luminoso ed areato perché possa completarsi il processo di essiccazione. Quando le foglie sono ben asciutte ed essiccate, per renderle più omogenee devono essere spuntate della parte apicale e della guaina basale che, avendo una differente consistenza ed una maggiore durezza rispetto alla restante parte della foglia, risultano più difficilmente utilizzabili dai macroinvertebrati bentonici. Per facilitare la preparazione delle trappole trofiche (i.e., pacchi fogliari), è preferibile tagliare le foglie in frammenti più o meno pari a circa 10 cm. Le foglie tagliate in frammenti, vengono riposte in stufa termostata, per circa 72 ore a 60°C, in modo tale da permettere la perdita completa dell’acqua di idratazione dalla guaina fogliare o meglio il raggiungimento di un peso costante (figura 6).

IMPRECO



Figura 6 - Stufa termostata.

➤ **Preparazione dei pacchi fogliari**

Le foglie tagliate ed essiccate sono pesate su di una bilancia analitica con precisione $\pm 0,001$ g ed accuratezza della pesata $\pm 0,050$ g; in questo modo si potrà disporre di repliche di campioni confrontabili tra loro. Il peso secco standardizzato di ciascun pacco dovrà essere di 3,000 g (figura 7). Ciascun gruppo di foglie di peso noto, viene riposto all'interno di un sacchetto a rete in nylon, precedentemente annodato ad una estremità e successivamente chiuso alla stessa maniera all'altra estremità. Preferibilmente, i sacchetti vengono realizzati con rete di maglia 0.5 x 0.5 cm di luce che permette il passaggio di macroinvertebrati bentonici all'interno delle trappole trofiche ed allo stesso tempo limita la perdita di frammenti fogliari. Prima del trasferimento in campo, i pacchi di detrito devono essere sistemati in file di almeno tre pacchi, utilizzando una corda in nylon e avendo cura di lasciare alle due estremità una lunghezza di corda tale da permettere l'ancoraggio a supporti immessi in acqua. I pacchi di ciascuna fila costituiscono le repliche di campionatori per i macroinvertebrati bentonici per ciascuna stazione di campionamento. Ad ogni fila di pacchi è consigliabile legare un piccolo galleggiante per l'identificazione della stazione di campionamento ed una zavorra ad ogni estremità, che permetta ai pacchi di portarsi sul fondo (figura 8).



Figura 7 - Fasi della preparazione dei pacchi fogliari. Bilancia analitica (a sinistra) e pacchi di foglie di *Phragmites australis* pronti per l'immissione in campo (a destra).



Figura 8 - Rete in nylon e foglie di *Phragmites australis* (in alto). Pacchi di foglie di *Phragmites australis* pronti per l'immissione in campo (in basso).

IMPRECO



➤ **Immissione in campo**

Per il trasferimento delle trappole di detrito fogliare in natura, è consigliabile riporre ciascuna corda ed i pacchi ad essa legati, all'interno di una busta in polietilene per evitare perdita di materiale fogliare e confusione tra file di pacchi. In campo, è preferibile effettuare le fasi di lavoro in collaborazione tra due operatori in modo tale da facilitare le operazioni di rilascio in acqua.

2. prelievo delle trappole trofiche

Durante il campionamento è necessario operare con la massima accuratezza in modo da evitare la perdita di macroinvertebrati che colonizzano il detrito fogliare. È conveniente che il campionamento sia effettuato da due operatori, muniti di buste in polietilene e forbici; un operatore procede al taglio della corda, mentre l'altro è pronto a far scivolare la busta sotto il pacco di foglie permettendo anche il passaggio di acqua all'interno fino a ricoprire il pacco stesso. Le buste devono essere richiuse in modo tale da lasciare all'interno la massima quantità di aria possibile. I campioni devono essere trasferiti in laboratorio preferibilmente ad una temperatura che sia abbastanza vicina a quella esterna, utilizzando un contenitore termostato. In laboratorio, i campioni possono essere riposti in camera termostata ad una temperatura costante per mantenere integra la componente animale. Prima di fare ciò, è necessario aprire le buste per evitare che si creino all'interno condizioni di ipossia; basta porre le buste una accanto all'altra in un grosso contenitore in plastica in modo tale che l'acqua non fuoriesca con il rischio di perdita degli animali (figura 9). Si può procedere, quindi, alla terza fase di lavoro che prevede l'analisi dei campioni in laboratorio attraverso il *sorting*.



Figura 9 - Pacchi di detrito fogliare di *Phragmites australis* dopo il campionamento (Sngiorgio et al., 2009).

3. *Sorting* dei campioni ed identificazione dei macroinvertebrati

IMPRECO



Ciascun campione, costituito dal pacco di detrito e dai macroinvertebrati bentonici ad esso associati, viene sottoposto in laboratorio alla procedura del *sorting* che consiste essenzialmente nella separazione della componente animale da quella vegetale e da eventuale sedimento. Si procede, quindi, all'apertura della busta e si versa il campione e l'acqua nel contenitore. Dopo aver grossolanamente separato i macroinvertebrati bentonici dalle foglie di detrito, si procede ad una pulizia più accurata delle foglie da piccoli invertebrati che rimangono sulla superficie. I macroinvertebrati vengono prelevati singolarmente per mezzo di pipette Pasteur in plastica trasparente, che possono essere tagliate all'estremità per facilitare il prelievo di individui con dimensioni più grandi, mentre gli individui poco mobili, quali ad esempio i gasteropodi, possono essere prelevati con pinzette con punta arrotondata. Tutti gli individui vengono riposti in contenitori in plastica opportunamente etichettati, separandoli per grandi raggruppamenti tassonomici ed avendo cura di riempire il contenitore con il materiale biologico non oltre la metà del volume complessivo. Al termine della fase di *sorting* si deve procedere ad un attento esame della vasca di raccolta per il prelievo degli individui più piccoli (figura 10). Su ciascuna etichetta si devono riportare informazioni relative a data, stazione di campionamento e numero di replica. Per la conservazione il campione può essere lasciato con etanolo al 70% e identificati a livello di specie ove possibile con stereomicroscopio/microscopio ottico e chiavi dicotomiche.

Sforzo di campionamento

Il campionamento con la tecnica dei pacchi fogliari, nell'area protetta di Acquatina di Frigole sarà effettuato in sei siti posizionati in relazione alla prossimità al mare aperto e al gradiente di salinità. Per ciascun sito di campionamento saranno eseguite tre repliche per un totale di 18 pacchi fogliari. Ciascuna replica è costituita da 3 pacchi di foglie. I pacchi fogliari saranno ritirati dopo circa 30 giorni dall'immissione in campo. L'attività di monitoraggio è prevista nel periodo che intercorre tra Maggio e Luglio.



Figura 10 - Fasi operative del *sorting* in laboratorio (Sangiorgio et al., 2009).



6.3.2 *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) (It.)

Il mollusco *Pinna nobilis*, è il più grande bivalve, endemico del Mediterraneo appartenente alla famiglia “Pinnidae”, comunemente chiamato cozza penna, nacchera o stura (figura 11). Si presenta di colore bruno esternamente e madreperlaceo all’interno e possiede un bisso robusto con cui aderisce al substrato (figura 12). La conchiglia può raggiungere i 15-35 cm di altezza, fino ad un massimo di 120 cm. *P. nobilis* è tipica del piano Infralitorale, dove è comune tra le praterie di fanerogame, in particolare di *Posidonia oceanica* o *Cymodocea nodosa*, ma anche su fondali ghiaiosi, sabbiosi e fangosi, fino a circa 60 m di profondità. Attualmente, è una specie sottoposta a regime di protezione dall’Unione Europea elencata nell’allegato IV della Direttiva Habitat 92/43/CEE e ss.mm. e dalla Convenzione di Barcellona nell’allegato II. Ciononostante, viene raccolta per scopi ornamentali e alimentari ed è esposta a numerose minacce di degrado dovute alla pesca illegale, ai cambiamenti climatici, agli ancoraggi delle imbarcazioni da turismo e all’azione di un protozoo parassita, denominato *Haplosporidium pinnae*, che gradualmente ne impedisce l’alimentazione e induce la morte degli organismi. Per quanto riguarda il suo ruolo ecologico, *P. nobilis* è una specie “filtratrice” e fornisce numerosi servizi ecosistemici: filtra dalla colonna d’acqua una grande quantità di materia organica e detriti sospesi contribuendo alla rimozione dei nutrienti e alla trasparenza dell’acqua; ospita altre specie determinando un aumento della biodiversità locale; attira subacquei e snorkelers favorendo le attività ricreative e di educazione ambientale. È provato scientificamente che questa specie è un bioindicatore di cambiamenti negli ecosistemi marini e costieri fornendo informazioni sulla risposta biotica alle pressioni antropiche.

Conseguentemente, *P. nobilis* è usata come indicatore nell’ambito dei Programmi di monitoraggio per la Strategia Marina (Direttiva MSFD 2008/56/EC) al fine di acquisire conoscenze adeguate su presenza, distribuzione, abbondanza e struttura demografica di *P. nobilis* in siti ritenuti rappresentativi per la specie.



Figura 11 - Individuo di *Pinna nobilis* nella laguna di Aquatina (Marocco et al., 2018).



Figura 12 - Visione interna (sopra) e visione esterna (sotto) di *Pinna nobilis* (foto Matteo De Luca).

6.3.2.1 Metodiche di campionamento e misura degli individui

Il monitoraggio e l'acquisizione di dati quantitativi di abbondanza e composizione di taglia degli individui avviene mediante censimenti visivi da parte di operatori subacquei in apnea. All'interno dell'area protetta pilota, Aquatina di Frigole, andranno allocati cinque siti di studio. All'interno dei siti scelti per il monitoraggio saranno eseguiti 3 transetti lineari (repliche) della lunghezza di 100 m ciascuno.

Per ciascun transetto saranno conteggiati tutti gli individui al fine di determinare la densità della specie (numero di individui/m²) e, per ciascun individuo, saranno acquisiti dati sullo stato di salute (vivo, morto o danneggiato) e dati biometrici circa la larghezza e l'orientamento in accordo al protocollo proposto da García-March and Vicente (2006).

Con un metro a nastro saranno determinate le seguenti misure biometriche (figura 13):

- altezza della conchiglia che fuoriesce dal substrato (UL);
- larghezza massima al punto di massima ampiezza dorso-ventrale della conchiglia (W);
- larghezza minima alla base (w).

e, con l'ausilio di una bussola sarà misurato l'orientamento (Or).

La lunghezza massima della conchiglia (Ht) e la lunghezza della parte sepolta (h) possono essere misurate rimuovendo l'individuo dal sedimento. Inoltre Ht può essere stimato applicando specifici modelli matematici (Garcia-March and Vicente 2006). Le attività di monitoraggio saranno condotte nell'area protetta Aquatina di Frigole nel periodo che va da Maggio a Luglio.

IMPRECOC

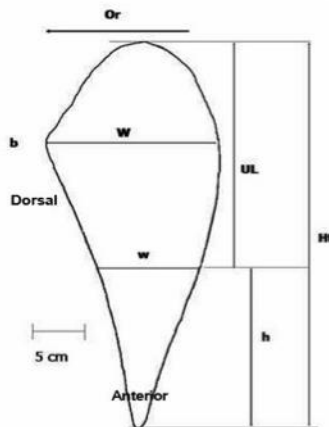


Figura 13 - Orientamento e misure biometriche rilevabili in situ sugli esemplari di *Pinna nobilis* (da García-March and Vicente 2006).

6.3.3 Specie aliene (It.)

Le specie aliene (o alloctone) sono quegli organismi animali e vegetali introdotti dall'uomo, in modo volontario o accidentale, al di fuori delle proprie aree di origine. Alcune specie aliene sono considerate "invasive" in quanto causano danni agli habitat, alle attività dell'uomo (agricoltura, pesca, allevamento, ecc.) e alla sua salute. Le specie aliene sono presenti in tutti gli habitat terrestri e acquatici e costituiscono la prima causa di estinzione di piante e animali al mondo.

La conoscenza e la potenziale distribuzione delle specie aliene presenti nell'area protetta di Aquatina di Frigole rimane ancora piuttosto critica. Pertanto, il campionamento relativamente alla presenza di specie aliene nell'area perimetrale della laguna di Aquatina sarà effettuata mediante criteri di presenza/assenza. La presenza di specie aliene potrà essere segnalata mediante foto da fotocamera o *smartphone* e *tablet* indicando la specie osservata, la data di avvistamento e le coordinate geografiche. Le foto o segnalazioni saranno inviate tramite *whatsapp* ai numeri di telefono dei referenti del progetto per l'Università del Salento. Le segnalazioni una volta validate saranno pubblicate sul sito web del progetto.

Le specie aliene acquatiche osservate nell'area protetta di Aquatina di Frigole sono: *Acanthophora nayadiformis*, *Caulerpa cylindracea*, *Beroe ovata*, *Callinectes sapidus*, *Ficopomatus enigmaticus*, *Terebella lapidaria*, *Hydroides dianthus*, *Hydroides elegans*, *Mnemiopsis leidyi*.

Per la consultazione delle specie invasive i volontari potrebbero fare riferimento alle foto presenti in questo documento o ai principali servizi di informazione sulle specie aliene presenti in rete come:

- European Alien Species Information Network (EASIN): <https://easin.jrc.ec.europa.eu/>
- Invasive species compendium (ISC), CABI: <http://www.cabi.org>

IMPRECO



- Delivering Alien invasive species Inventory for Europe, Daisy: <http://www.europe-aliens.org>





6.4 Gruppi di interesse (It.)

I gruppi di interesse coinvolti nell'attività di monitoraggio semplificato saranno composti da volontari, membri di associazioni ambientaliste e sportive, e studenti anche stranieri. I gruppi saranno composti da un massimo di 10 elementi. Solo le persone precedentemente formate saranno introdotte all'attività di monitoraggio semplificato.

6.5 Training dei gruppi di interesse (It.)

La formazione dei gruppi di interesse sarà condotta dai ricercatori coinvolti nel progetto ed esperti, che padroneggiano le tecniche di campionamento e di analisi dei campioni relativi alle specie target. Tutti i volontari e gli studenti saranno adeguatamente formati all'uso delle attrezzature e delle tecniche di misura stabilite nel protocollo di campionamento, all'identificazione dei macroinvertebrati bentonici, della biometria della *Pinna nobilis* e all'identificazione delle specie aliene. Il training completo includerà una fase di formazione in aula seguita da una fase pratica relativa a: 1. campionamento sul campo, che comprende la raccolta e l'elaborazione dei campioni; 2. identificazione delle specie in laboratorio; 3. sistematizzazione ed analisi dei dati. Il campionamento nell'area protetta di Aquatina di Frigole

IMPRECOC



verrà effettuato nella stagione primavera-estate, tra maggio e luglio. In questo periodo, la presenza di specie aliene, l'abbondanza e la ricchezza di macroinvertebrati bentonici sono particolarmente elevate.

6.6 Bibliografia (It.)

Macroinvertebrati Bentonici

- Borja, A., Franco, J., Perez, V., 2000. A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 1100-1140.
- Mistri M., Munari C. 2008. BITS: a SMART indicator for soft-bottom, non-tidal lagoons. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 580-606.
- Muxika, I., Borja, A., Bald, J., 2007. Using historical data, expert judgment and multivariate analysis in assessing reference conditions and benthic ecological status, according to the European Water Framework Directive. *Mar. Pollut. Bull.* 55, 16-29.
- Petersen R. C., Cummins K. W. (1974) Leaf processing in a woodland stream. *Freshwater Biology* 4: 343-368.
- Pinna, M., Marini, G., Rosati, I., Neto, J.M., Patrício, J., Marques, J.C., Basset, A., 2013. The usefulness of large body-size macroinvertebrates in the rapid ecological assessment of Mediterranean lagoons. *Ecol. Indic.* 29, 48-61.
- Rosenberg, D.M., Resh, V.H., 1993. *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman & Hall, New York.
- Sangiorgio F., Pinna M., Gravili L., 2009. Macroinvertebrati bentonici, pag. 64-97. In: Nuovi approcci metodologici per la classificazione dello stato di qualità degli ecosistemi acquatici di transizione - Metodologie per la determinazione della struttura dimensionale di fitoplancton e macroinvertebrati bentonici. Editors: Basset A., Sangiorgio F., Sabetta L., pag. 132. ISPRA, Roma, Italia. ISBN: 978-88-448-0379-7.

Pinna nobilis

- Basso L., Vazquez-Luis M., Garcia-March J.R., Deudero S., Alvarez E., Vicente N., Duarte C.M., Hendriks E. 2015. The pen shell, *Pinna nobilis*: a review of population status and recommended research priorities in the Mediterranean Sea. *Advances in Marine Biology* 71, 109-160.
- García-March J.R., Vicente N. 2006. Protocol to study and monitor *Pinna nobilis* populations within marine protected areas. MedPAN-Interreg IIIC-project. Malta Environment and Planning Authority (MEPA), 78 pp.
- Marrocco V., Sicuro A., Zangaro F., Pinna M. 2018. First record of the protected species *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) in the Aquatina Lagoon (NATURA 2000 site IT9150003, South-East Italian coastline). *Nature Conservation* 28, 51-59.

Specie Aliene

- Galil B.S., 2011. The alien crustaceans in the Mediterranean Sea: an historical review. In: Galil, B.S., Clark, P.F., Carlton, J.T. (Eds.), *In the Wrong Place e Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts*. Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg, pp. 377-401.

IMPRECOC



- Millikin M.R., Williams A.B., 1984. Synopsis of biological data on blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. FAO Fisheries Synopsis 38.
- Nehring S., 2011. Invasion history and success of the American blue crab *Callinectes sapidus* in European and adjacent waters. In: Galil, B.S., Clark, P.F., Carlton, J.T. (Eds.), In the Wrong Place e Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts. Springer, Netherlands, pp. 607-624.
- Streftaris, N., Zenetos, A., 2006. Alien marine species in the Mediterranean - the 100 'Worst Invasives' and their impact. Mediterranean Marine Science 7, 87-117.
- Sturdivant, S.K., Clark, K.L., 2011. An evaluation of the effects of blue crab (*Callinectes sapidus*) behavior on the efficacy of crab pots as a tool for estimating population abundance. Fishery Bulletin 109, 48-55.

7 SIMPLIFIED MONITORING PROTOCOL FOR THE PROTECTED AREA OF AQUATINA DI FRIGOLE

7.1 Simplified monitoring objectives (En.)

The present deliverable aims to define a simplified monitoring protocol for the target species selected through common criteria in the *Joint monitoring protocol for species, habitats, ES functions and ESS* (DT1.2.1), to be transmitted to volunteers, students and environmental or sports associations for their involvement in data collection. This document represents a second level of implementation starting from the *Joint monitoring protocol*, which involves volunteers to increase the amount of biodiversity information available while reducing time and costs of the monitoring.

7.2 Monitoring species

The selected target species/guilds and the related monitoring methods for the protected area of Aquatina di Frigole are listed in the table below.

Specie/Guild	Sampling methods
Benthic macroinvertebrates	Grab/Box corer (Sangiorgio et al., 2009)
<i>Pinna nobilis</i>	Line transect (ISPRA 2006) and biometry (Marocco et al., 2018)
Alien species	Presence/Absence criteria

IMPRECO



The simplified monitoring protocol could also allow obtaining new information about the species involved (e.g., presence of new alien species, new nursery areas for *Pinna nobilis*, spatial distribution of guilds of benthic macroinvertebrates etc.).

Before the monitoring, PP3 will organize a training session for volunteers to transfer the protocol criteria of the simplified monitoring of the target species before involving them in sampling activities in the field. The researchers involved in the project, who master the sampling techniques for the involved species, will manage the training. All volunteers will be properly trained in the use of the equipment and the measurement techniques set out in the sampling protocol, in the identification of benthic macroinvertebrates and alien species.

More complex methods should include practical training related to: field sampling, which includes samples collection and processing; species identification in the laboratory.

The sampling in Aquatina will be carried out in the spring-summer season between May and July. In this period, the presence of alien species and the abundance and richness of benthic macroinvertebrates reach the maximum level.

7.3 Methodologies adopted

7.3.1 Benthic macroinvertebrates (En.)

Benthic macroinvertebrates are small organisms visible to the naked eye, with a linear dimension of more than 0.5 millimetres living in the sediments (endobenthos) or at the water-sediment interface (epibenthos), sessile or vagile (figure 14). Crustaceans, nematodes, platyhelminthes, molluscs, hirudina, oligochaetes and insects are part of this community.

Benthic macroinvertebrates occupy all levels of consumers in the trophic structure of water environments, belonging to the categories of herbivores, carnivores and detritivores and presenting a wide range of feeding mechanisms to make the most of the available trophic resources. Benthic macroinvertebrates are affected by environmental pollution and anthropogenic pressures responding with changes in abundance, taxonomic richness and composition, biomass, body size and biological traits (Pinna et al., 2013). Therefore, they are considered suitable bioindicators widely used in biomonitoring and in the assessment of the ecological quality of the water bodies. AMBI, M-AMBI, BENTIX, BITS, BO2A, STAR-ICMI, are just a few of the ecological indicators based on benthic macroinvertebrates largely used in biomonitoring plans of aquatic ecosystems (Borja et al., 2000; Muxika et al., 2007) in accordance to the Water Framework Directive (WFD, 2000/60 EC).

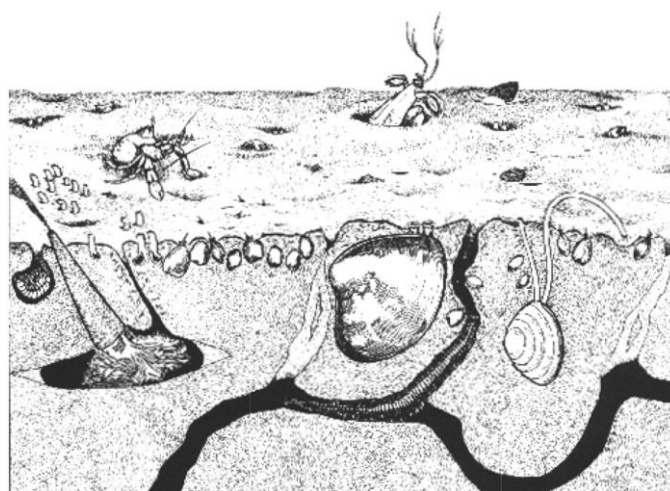


Figure 14 - Representation of a soft bottom macroinvertebrate guild.

7.3.1.1 Simplified sampling of benthic macroinvertebrates (En.)

The sampling of the benthic macroinvertebrates community is linked to the structural characteristics of the ecosystems, those the choice of the samplers used is linked primarily to the substrate to be sampled. Soft bottoms like Aquatina di Frigole can be bare or covered with vegetation, both submerged and emerging, and constitute a wide variety of habitats for the benthic macroinvertebrate guilds. On these substrates, macroinvertebrates have the ability to penetrate the sediment and, depending on the composition/granulometry of the substrate and specific adaptations, can reach a depth of 15-20 cm by constructing a network of canals and tunnels that promote oxygenation of the sediment itself.

7.3.1.2 Sediment sampling method with box corer/grab and sample processing (En.)

Sampling technique and field measurement

The sediment containing the macroinvertebrates will be taken using an Ekman Birge grab or a box corer instruments particularly suitable to quantitative studies; in fact, these instruments withdraw well-defined quantities of sediment more or less easily and, therefore, allow obtaining a remarkable reproducibility of the sample. Additionally, these instruments also allow obtaining more precise information on the distribution of organisms and a more accurate evaluation of the individual biomass without damaging the specimens. The use of the box corer (figure 15) also has some others advantages compared to the grab, as it does not cause a significant disturbance of the substrate and the leaching of the material is relatively limited; this instrument is also able to maintain the stratification of the sample unaltered, differently from what occurs with grabs.



Figure 15 - Phases of sediment sampling by means of the box corer (Sangiorgio et al., 2009).

Sampling effort

Sampling in the protected area of Aquatina di Frigole will be carried out in six sites selected according to the criteria of the proximity to the open sea and the gradient of salinity (figure 16). For each sampling site, three replicas will be performed using the box corer. The sediment samples will be sieved with a 2 mm mesh size sieve. The monitoring activity will be carried out in the period between May and July.



Figure 16 - Map of the Aquatina Lagoon and sampling sites. In the table the geographic coordinates are reported.



Sample treatment methods

The sediment samples will be sieved through a sieve with square openings and 1 mm mesh size (Retsch® GmbH, Germany, 40 cm Ø, DIN ISO 3310/1) in order to separate the benthic macroinvertebrates from the rest of the sampled material and avoid loss of significant organisms (figure 17). The 2 mm mesh sieve should be used instead of the 1 mm mesh sieve, so as to make the subsequent sampling phases easier for volunteers. In fact, the 2 mm sieve retains larger organisms, which are faster to sort and easier to identify, allowing reducing sampling time, costs and efforts.

At the end of the sieving and sample cleaning from the finest particulate material, the collected material will be transferred into bottles or plastic bags and taken back to the laboratory in a refrigerated portable cooler at 4-6 °C. For example, semi-transparent plastic bottles or bags with a volume of 1000 ml can be used, so that the material can be observed. The containers must be labelled before being transferred to the storage location. The label shall indicate the site and date of sampling, the name of the station, the number of replica and the name of the operators who carried out the sampling.



Figure 17 - Field-sieving operations.

Parameters measurement

The parameters to be determined are:

- Taxonomic identification until the lowest possible taxonomic level;

IMPRECO



- Abundance (ind/m²) and taxonomic richness, to be used to calculate the ecological indicators AMBI (Borja et al., 2000), M-AMBI (Muxika et al., 2007) and BITS (Mistri and Munari, 2008 and to classify the ecological status of the lagoon and other indices for the description of the community (e.g., Shannon diversity index, Margalef index, Pielou's equitability index and Simpson's dominance index).
- Optional parameters: Body size; Biomass.

Method of analysis

In the laboratory, samples of benthic macroinvertebrates will be subjected to sorting, that is, separation of the dead fraction (thanatocoenosis) from the living fraction, and the latter divided into the main taxonomic groups (molluscs, crustaceans, polychaetes, etc.). The identified organisms will be stored in 70% ethyl alcohol or other low toxicity preservative solution until the identification of the species by means of the stereomicroscope/optical microscope and dichotomous keys available in literature. Subsequently, you will proceed with the determination of the body size of the benthic macroinvertebrates by using an image analysis system applied to the stereomicroscope (figure 18).



Figure 18 - Taxonomic identification and image analysis system.

Books and dichotomous keys available in literature to identify benthic macroinvertebrates:

Bellan-Santini D., Karaman G., Krapp-Schickel G., Ledoyer M., Ruffo S. 1993. The Amphipoda of the Mediterranean. Part 3: Gammaridea (Melphidippidae to Talitridae), Ingolfiellidea, Caprellidea. Mémoires de l'Institut océanographique, Monaco, no.13. Institut Océanographique: Monaco. ISBN 2-7260-0160-2. 813 pp.

Campaioli S., Ghetti P.F., Minelli A., Ruffo S. 1994. Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane. Volume I, Provincia Autonoma di Trento, 357 pp.

IMPRECO



Campaioli S., Ghetto P.F., Minelli A., Ruffo S. 1999. Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane. Volume II. Provincia Autonoma di Trento, 484 pp.

Sansoni G. 1988. Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati bentonici dei corsi d'acqua italiani. Provincia Autonoma di Trento, 191 pp.

Sconfinetti R. 2004. Chiave di riconoscimento visuale dei più comuni peracaridi (Crustacea, Peracarida) lagunari italiani. Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol., 81: 79-89.

Table 2 - List of the benthic macroinvertebrates sampled in the Aquatina lagoon.

<i>Abra alba</i>	<i>Heteromastus filiformis</i>	<i>Rimostrombidium sphaericum</i>
<i>Acanthocardia tuberculata</i>	<i>Homalopoma sanguineum</i>	<i>Rissoa variabilis</i>
<i>Amphorella amphora</i>	<i>Laboea strobila</i>	<i>Rissoa ventricosa</i>
<i>Armandia cirrhosa</i>	<i>Loripes orbiculatus</i>	<i>Ruditapes decussatus</i>
<i>Bittium reticulatum</i>	<i>Lumbrineris latreilli</i>	<i>Spio decorata</i>
<i>Brania arminii</i>	<i>Lumbrineris</i> sp.	<i>Stenosemella nivalis</i>
<i>Carcinus aestuarii</i>	<i>Monocorophium acherusicum</i>	<i>Stenosemella ventricosa</i>
<i>Cerastoderma edule</i>	<i>Murex</i> sp.	<i>Strombidium acutum</i>
<i>Ceriagrion tenellum</i>	<i>Myosotella myosotis</i>	<i>Strombidium capitatum</i>
<i>Cerithium vulgatum</i>	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Strombidium conicum</i>
<i>Chamelea gallina</i>	<i>Naineris laevigata</i>	<i>Syllides japonicus</i>
<i>Chiton olivaceus</i>	<i>Nassarius</i> sp.	<i>Terebella lapidaria</i>
<i>Cirriformia tentaculata</i>	<i>Neanthes acuminata</i>	<i>Tintinnopsis baltica</i>
<i>Cirrophorus furcata</i>	<i>Noctiluca scintillans</i>	<i>Tintinnopsis beroidea</i>
<i>Clanculus jussieui</i>	<i>Notomastus latericeus</i>	<i>Tintinnopsis cylindrica</i>
<i>Clanculus cruciatus</i>	<i>Oligochaeta</i>	<i>Tintinnopsis karajacensis</i>
<i>Codonellopsis schabi</i>	<i>Paracartia latisetosa</i>	<i>Tintinnopsis levigata</i>
<i>Coenagrion mercuriale</i>	<i>Pelagostrobilidium spirale</i>	<i>Tintinnopsis lobiancoi</i>
<i>Dorvillea rubrovittata</i>	<i>Perkinsyllis anophthalma</i>	<i>Tintinnopsis minuta</i>
<i>Ecrobia ventrosa</i>	<i>Peronidia albicans</i>	<i>Tintinnopsis nana</i>
<i>Eutintinnus apertus</i>	<i>Petaloproctus terricolus</i>	<i>Tintinnopsis parvula</i>
<i>Eutintinnus fraknoi</i>	<i>Petalotricha ampulla</i>	<i>Tintinnopsis radix</i>
<i>Exogone meridionalis</i>	<i>Phoronida</i>	<i>Tritia neritea</i>
<i>Exogone naidina</i>	<i>Pinna nobilis</i>	<i>Tritia nitida</i>
<i>Ficopomatus enigmaticus</i>	<i>Podocorynoides minima</i>	<i>Tritia pellucida</i>
<i>Gammarus aequicauda</i>	<i>Podon polyphemoides</i>	<i>Truncatella subcylindrica</i>
<i>Gibbula albida</i>	<i>Protorhabdonella simplex</i>	<i>Venerupis corrugata</i>



7.3.1.3 Sampling method with artificial substrate and sample processing (En.)

Sampling technique and measures

The sampling of benthic macroinvertebrates on artificial substrates is based on the construction and introduction in the field of vegetal debris substrates that form surfaces colonizable by benthic macroinvertebrates. These trophic traps represent the most widely used structures, consisting of "packs" of vegetable debris placed inside nylon mesh bags that are deposited on the bottom of the aquatic ecosystems. The packs, composed of leaves and placed in the water, simulate the natural accumulation of dead organic matter (i.e., debris) that occurs in aquatic environments (e.g., estuaries, rivers, lakes and lagoons) mainly between late summer and early autumn (Petersen and Cummins, 1974). The trophic traps are generally constituted by the most representative plant species of the ecosystem under study as they constitute the greatest detrital input for the benthic communities. The plant species most frequently used in the trophic packs is the *Phragmites australis* as being ubiquitous in the Mediterranean Sea and also a trophic resource preferentially consumed by macroinvertebrates.

The sampling of benthic macroinvertebrates with trophic traps involves three phases: 1. Setting up and placing the leaf debris packs in the field, 2. Field sampling, 3. Sample processing in the laboratory

1. Setting up and placing leaf packs in the field;

- collection of *P. australis* leaves material in the field
- storage in the laboratory
- treatment in a thermostatic oven
- preparation of leaf packs
- field accommodation.

The leaves of *Phragmites australis* are harvested between late summer and early autumn, when they are close to the abscission. The material collected is then accumulated and transferred to the laboratory for the following phases. Leaves should be left in the laboratory for at least one week, in a bright and ventilated environment, to complete the drying process. When the leaves are dried, the apical and the basal parts shall be cut off because, having them a different consistency and greater hardness than the remaining part of the leaf, they are more difficult to use by benthic macroinvertebrates. To facilitate the preparation of trophic traps (i.e., leaf packs), it is preferable to cut off the leaves into fragments of about 10 cm. The leaves cut into fragments are placed in a thermostatic oven for 72 hours at 60 °C, in order to allow the complete loss of the hydration water from the leaf sheath and to reach a constant weight (figure 19).



Figure 19 - Thermostatic oven.

➤ **Preparation of leaf packs**

The leaves cut and dried are weighed on an analytical balance having a precision of ± 0.001 g and a accuracy of ± 0.050 g; in order to have replicas of samples comparable to each other. The standardized dry weight of each leaf pack must be 3,000 g. Each group of leaves of a known weight is placed inside a nylon net bag, previously knotted at both ends. The bags are made with a 0.5 x 0.5 cm mesh net that allows the passage of benthic macroinvertebrates inside the trophic traps and, at the same time, limits the loss of leaf fragments. Before transferring to the field, the leaf packs must be placed in rows of at least three packs, using a nylon rope and making sure to leave a length of rope at both ends to allow anchoring to supports placed in the water. The packs in each row represent the replicas at each sampling station. For each row of packs it is advisable to tie a small float for the identification of the station and ballast, which allows the packs to reach the bottom (figures 20 and 21).



Figure 20 - Analytical balance (left) and leaf packs of *P. australis* leaves ready for field introduction (right).

IMPRECO



Figure 21 - Phases of the preparation of the leaf packs (Sangiorgio et al., 2009).

➤ **Placing the leaf packs in the field**

For the transfer of leaf packs in the field, it is advisable to put each row of leaf packs inside a plastic bag to avoid loss of leaf material and confusion between rows of packs. Once in the field, it is preferable to release the packs in the water in groups of two operators so as to facilitate the operations.

2. Collection of the leaf packs

During sampling, it is necessary to operate with great accuracy in order to avoid the loss of macroinvertebrates that have colonized the leaf packs. It is advisable that the sampling is carried out by two operators, provided with polyethylene bags and scissors: an operator proceeds to cut the rope, while the other place the bag underneath the pack of leaves, so as to maintain the water necessary to cover the pack. The bag must be closed immediately to keep as much air as possible inside. Samples should be transferred to the laboratory in a thermostatic container preferably at a temperature close enough to the outside one. In the laboratory, samples can be stored in a thermostatic chamber at a constant temperature to keep the animal component intact. Before doing this, the bags shall be opened to prevent hypoxia and placed next to each other in a large plastic container, being careful that the water does not come out with the risk of losing the animals (figure 22). The following phase involves the sorting and the analysis of samples in the laboratory.



Figure 22 –Leaf packs in the plastic bags after collection (Sangiorgio et al., 2009).

3. Sorting of samples and identification of macroinvertebrates

In the laboratory, each sample, which consists of the leaf pack and the benthic macroinvertebrates associated with it, is subjected to sorting. This procedure essentially consists in the separation of the animal component from the leaves and sediment. The first operation will be open the bags and pour the contents into the white container (see fig. 23). After having coarsely separated the benthic macroinvertebrates from the leaves, the latter need to be accurately cleaned from the small invertebrates remained on the surface. The macroinvertebrates are taken individually by means of Pasteur pipettes cut at the end to facilitate the removal of larger individuals, while those not very mobile, such as gastropods, can be taken with rounded tip tweezers. All the individuals are placed in labelled plastic containers separated by large taxonomic groups, ensuring to fill the containers with biological material up to no more than half of the total volume. At the end of the sorting, a careful examination of the plastic tray should be done to check whether there is any animal left (figure 23). Information on date, sampling station and number of replica must be indicated on each label. The samples are stored within 70% ethanol and identified at the “species” level, where possible, with stereomicroscope/optical microscope and dichotomous keys.

➤ **Sampling effort**

The sampling using the leaf pack technique in Aquatina di Frigole will be carried out in six sampling sites selected by the criteria of the proximity to the open sea and the gradient of salinity. For each sampling site three replicas will be carried out for a total of 18 leaf packs placed in the soft bottom. Each replica will be composed of three leaf packs placed in a row. Bags will be retrieved after 30 days. The suggested period for the monitoring activity is between May and July.



Figure 23 - Sorting of the leaf packs in the laboratory (Sangiorgio et al., 2009).

7.3.2 *Pinna nobilis* (Linnaeus 1758) (En.)

The clam *Pinna nobilis*, also commonly known in Italy as *cozza penna*, *nacchera* and *stura*, is the largest endemic Mediterranean bivalve belonging to the Pinnidae family (figure 24). It is brownish on the outside surface and pearly inside and has a sturdy byssus through which it adheres to the substrate (figure 25). The shells reach 15-35 cm in length, exceptionally up to 120 cm. *P. nobilis* is typical of the infralittoral bottom, where it is commonly found among the seagrass meadows, in particular of *Posidonia oceanica* or *Cymodocea nodosa*, but also on gravelly, sandy and muddy bottoms, up to about 60 m of depth. Currently, it is an endangered and protected species under the European Union, listed in the Annex IV of the Habitats Directive 92/43/EEC and subsequent amendments, and in the Annex II of Barcelona Convention. Nevertheless, it is harvested for ornamental and food purposes, and it is exposed to numerous threats of degradation due to illegal fishing, climate change, anchorage of tourist boats and the action of a parasite protozoan, called *Haplosporidium pinnae*, which gradually reduces the feeding of the individuals and finally kills them. *P. nobilis* is an important filter feeder providing many ecosystem services: by filtering organic and inorganic particles in impacted areas, it contributes to water clarity; by hosting many species, it contributes to the increase of the local biodiversity. Also, it attracts snorkelers and divers, with a consequent development of recreational activities and environmental education. There is scientific evidence that this benthic filter feeder is a good indicator of changes in marine and coastal ecosystems providing information of biotic response to anthropogenic pressures. Consequently, *P. nobilis* is used as an indicator in the Marine Strategy Monitoring Programs (MSFD Directive 2008/56/EC) in order to obtain suitable knowledge on the presence, distribution, abundance and demographic structure of *P. nobilis* in sites representative for the species.



Figure 25 - A specimen of *Pinna nobilis* in the Aquatina di Frigole (Marocco et al., 2018).



Figure 24 - Inside view (above) and external view (below) of *Pinna nobilis* (photo by Matteo De Luca).



7.3.2.1 Sampling method and measurements of the individuals

Monitoring survey and the assessment of the abundance and size composition of the individuals are carried out through underwater visual census in apnea. In the protect area of Aquatina, five monitoring sites will be allocated. Within the sites, 3 linear transects (replicas) of 100 m each will be performed to determine the density of the individuals (ind/m²) and to monitor the individual vitality (dead/alive or damaged), length size and orientation according to the protocol proposed by García-March and Vicente (2006).

In situ, all specimens within each transect will be counted in order to determine the density and the individual vitality for each specimen.

Information on biometry will be recorded with a measuring tape:

- unburied length (UL);
- maximum width (W);
- minimum width (w),

while gape orientation (Or) will be measured by compass (figure 26).

Maximum shell length (Ht) and length of the buried part (h) can be estimated by applying specific mathematical models (Garcia-March and Vicente 2006). The monitoring activities will be carried out in the protected area in the period between May and July.

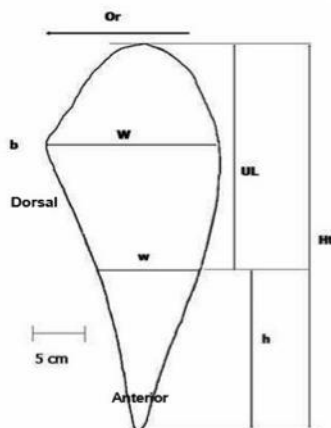


Figure 26 - Measurements of interest to estimate the orientation and body size of *Pinna nobilis*.

7.3.3 Alien species (En.)

The alien species are those animals and plants introduced voluntarily or accidentally by humans, outside their indigenous habitat. Some alien species are considered "invasive" because they cause damage to habitats, human activities (agriculture, fishing, breeding, etc.) and to their health. The alien species are present in all terrestrial and aquatic environments, and are the first cause of extinction of plants and animals in the world.



The knowledge and the potential distribution of the alien species in the protected area of Aquatina di Frigole still remain rather critical. Therefore, sampling in relation to the presence of alien species in the perimeter area of the Aquatina lagoon will be carried out by means of presence/absence criteria.

The presence of alien species can be reported by camera or smartphones indicating the observed species, the date of sighting and the geographical coordinates. Photos or reports will be sent via whatsapp to the contact numbers of the project responsible person for the University of Salento. Once validated, the reports will be published on the project website.

Alien species recorded in the protected area of Aquatina di Frigole are: *Acanthophora nayadiformis*, *Caulerpa cylindracea*, *Beroe ovate*, *Callinectes sapidus*, *Ficopomatus enigmaticus*, *Terebella lapidaria*, *Hydroides dianthus*, *Hydroides elegans*, *Mnemiopsis leidy*.

For information on alien species, volunteers should refer to the following major information services providers or consult the photos in this document:

- European Alien Species Information Network (EASIN): <https://easin.jrc.ec.europa.eu/>
- Invasive species compendium (ISC), CABI: <http://www.cabi.org>
- Delivering Alien invasive species Inventory for Europe, Daisy: <http://www.europe-aliens.org>



IMPRECO



7.4 Target groups involved (En)

The target groups involved in the simplified monitoring activity will be composed of volunteers, members of associations and students (also international). Each group will be composed of up to 10 people. Only those previously trained will be introduced to the simplified monitoring activity.

7.5 Training of the target groups (En)

The researchers involved in the project, who master the sampling techniques for the targeted species, will manage the training of the target groups. All volunteers and students will be adequately trained in the use of the equipment and measurement techniques established in the sampling protocol, in the identification of benthic macroinvertebrates, in the biometry of *Pinna nobilis* and in the identification of alien species. The full training will include a theory training session in class, followed by a practical session related to: 1. Sampling, which includes the collection and processing of samples; 2. Identification of species in the laboratory; 3. Data systematization and analysis. The sampling activity in the protected area of Aquatina di Frigole will be carried out during the spring-summer season, between May and July. In this period, either the presence of alien species and the biodiversity of benthic macroinvertebrates are particularly high.

7.6 References (En.)

Benthic macroinvertebrates

- Borja, A., Franco, J., Perez, V., 2000. A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 1100-1140.
- Mistri M., Munari C. 2008. BITS: a SMART indicator for soft-bottom, non-tidal lagoons. *Mar. Pollut. Bull.* 56, 580-606.
- Muxika, I., Borja, A., Bald, J., 2007. Using historical data, expert judgment and multivariate analysis in assessing reference conditions and benthic ecological status, according to the European Water Framework Directive. *Mar. Pollut. Bull.* 55, 16-29.
- Petersen R. C., Cummins K. W. (1974) Leaf processing in a woodland stream. *Freshwater Biology* 4: 343-368.
- Pinna, M., Marini, G., Rosati, I., Neto, J.M., Patrício, J., Marques, J.C., Basset, A., 2013. The usefulness of large body-size macroinvertebrates in the rapid ecological assessment of Mediterranean lagoons. *Ecol. Indic.* 29, 48-61.
- Rosenberg, D.M., Resh, V.H., 1993. *Freshwater Biomonitoring and Benthic Macroinvertebrates*. Chapman & Hall, New York.
- Sangiorgio F., Pinna M., Gravili L., 2009. Macroinvertebrati bentonici, pag. 64-97. In: *Nuovi approcci metodologici per la classificazione dello stato di qualità degli ecosistemi acquatici di transizione - Metodologie per la determinazione della struttura dimensionale di*



fitoplancton e macroinvertebrati bentonici. Editors: Basset A., Sangiorgio F., Sabetta L., pag. 132. ISPRA, Roma, Italia. ISBN: 978-88-448-0379-7.

Pinna nobilis

- Basso L., Vazquez-Luis M., Garcia-March J.R., Deudero S., Alvarez E., Vicente N., Duarte C.M., Hendriks E. 2015. The pen shell, *Pinna nobilis*: a review of population status and recommended research priorities in the Mediterranean Sea. *Advances in Marine Biology*, 71: 109-160.
- García-March J.R., Vicente N. 2006. Protocol to study and monitor *Pinna nobilis* populations within marine protected areas. MedPAN-Interreg IIIC-project. Malta Environment and Planning Authority (MEPA), 78 pp.
- Marrocco V., Sicuro A., Zangaro F., Pinna M. 2018. First record of the protected species *Pinna nobilis* (Linnaeus, 1758) in the Aquatina Lagoon (NATURA 2000 site IT9150003, South-East Italian coastline). *Nature Conservation* 28: 51-59.

Alien species

- Galil B.S., 2011. The alien crustaceans in the Mediterranean Sea: an historical review. In: Galil, B.S., Clark, P.F., Carlton, J.T. (Eds.), *In the Wrong Place e Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts*. Springer-Verlag, Berlin- Heidelberg, pp. 377-401.
- Millikin M.R., Williams A.B., 1984. Synopsis of biological data on blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. *FAO Fisheries Synopsis* 38.
- Nehring S., 2011. Invasion history and success of the American blue crab *Callinectes sapidus* in European and adjacent waters. In: Galil, B.S., Clark, P.F., Carlton, J.T. (Eds.), *In the Wrong Place e Alien Marine Crustaceans: Distribution, Biology and Impacts*. Springer, Netherlands, pp. 607-624.
- Streftaris, N., Zenetos, A., 2006. Alien marine species in the Mediterranean - the 100 'Worst Invasives' and their impact. *Mediterranean Marine Science* 7, 87-117.
- Sturdivant, S.K., Clark, K.L., 2011. An evaluation of the effects of blue crab (*Callinectes sapidus*) behavior on the efficacy of crab pots as a tool for estimating population abundance. *Fishery Bulletin* 109, 48-55.

“This document has been produced with the financial assistance of the European Union. The content of the document is the sole responsibility of UniSalento and can under no circumstances be regarded as reflecting the position of the European Union and/or ADRION programme authorities”.