



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA APPLICATA E MEDICINA
SPERIMENTALE**

CURRICULUM IN SCIENZE BIOLOGICHE ED AMBIENTALI

XXXVI CICLO

SSD BIO/07

**BioSANE: Biodiversità della fauna acquatica e
Sostenibilità Ambientale nel Parco dei Nebrodi**

Candidato:

Claudio Gervasi



Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Nunziacarla Spanò



Coordinatore: Chiar.ma Prof.ssa Nunziacarla Spanò

Anno Accademico 2022/2023

Sommario

INTRODUZIONE	1
Capitolo 1 ARGOMENTO DI RICERCA	3
La biodiversità.....	3
La fauna d'acqua dolce italiana	7
Declino della biodiversità nelle acque interne	10
Il Parco dei Nebrodi.....	13
Le acque interne del Parco dei Nebrodi	16
Capitolo 2 METODOLOGIA	21
2.1 Area di studio	21
2.2 Tecniche di campionamento	25
2.2.1 Campionamento per lo studio del DNA ambientale	25
2.2.2 Prelievo per la analisi chimiche, microbiologiche e per la ricerca di microplastiche	26
2.2.3 Campionamento degli organismi	28
2.2.3.1 Cattura dei Teleostei	28
2.2.3.2 Campionamento mediante benna Van Veen.....	29
2.2.3.3 Prelievo mediante retino	30
2.2.3.4 Campionamento dello zooplancton	31
2.2.4 Visual census	32
Capitolo 3 STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ DELLE ACQUE INTERNE	33
3.1. Introduzione	33
3.2 Materiali e Metodi	39
3.2.1 Studio sul DNA ambientale	39
3.2.1.1 Fase di filtrazione	39
3.2.1.2 Estrazione del DNA genomico	39
3.2.1.3 Amplificazione della regione COI.....	40
3.2.1.4 Amplificazione del gene 16s RNA e analisi bioinformatica	42
3.2.2 Identificazione morfologica degli organismi campionati e analisi dei dati	42
3.3 Risultati	45
3.3.1 DNA ambientale	45
3.3.1 Lista specie degli organismi campionati	62
3.3.1.1 Assemblaggio faunistico degli organismi acquatici	74
3.3.1.2 Assemblaggio faunistico ambiente terrestre	80
3.4 Discussioni	86
Capitolo 4 ANALISI DEI PARAMETRI AMBIENTALI	93
4.1 Introduzione	93
4.2 Materiali e metodi	96
4.2.1 Analisi chimico fisica.....	96
4.2.1.1 Determinazione di anioni e cationi nelle acque naturali	96
4.2.1.2 Determinazione del mercurio nei sedimenti e nella componente biologica	97
4.2.2 Analisi microbiologiche	98

4.2.2.1	Rilevazione di E. coli, Enterococchi, Coliformi totali e Vibrio sp.....	98
4.2.2.2	Ricerca delle spore di Clostridi solfito-riduttori	99
4.2.2.3	Rilevazione di Salmonella	100
4.2.3	Ricerca delle microplastiche in acqua	100
4.2.3.1	Preparazione dei campioni	100
4.2.3.2	Ricerca delle microplastiche	101
4.3	Risultati	102
4.3.1	Informazioni generali	102
4.3.2	Risultati analisi chimiche	104
4.3.3	Indicatori microbiologici	124
4.3.4	Inquinamento da microplastiche	126
4.3.5	Analisi statistica	129
4.4	Discussioni.....	130
Capitolo 5 HEALTH MONITORING E DATA ANALYSIS DELL'ITTIOFAUNA.....		133
5.1	Introduzione	133
5.2	Materiali e metodi	139
5.2.1	Esame autoptico.....	139
5.2.2	Indagini istopatologiche	140
5.2.3	Malattie infettive	141
5.2.3.1	Coltivazione e isolamento delle colonie	141
5.2.3.2	Identificazione molecolare.....	141
5.2.4	Studio delle parassitosi.....	142
5.3	Risultati	144
5.3.1	Indagini istopatologiche	144
5.3.2	Malattie infettive	145
5.3.3	Parassitosi.....	145
5.4	Discussioni.....	147
CONCLUSIONI.....		152
BIBLIOGRAFIA		154

INTRODUZIONE

La biodiversità costituisce uno dei principali fattori di resilienza degli ecosistemi rispetto all'incidenza di elementi perturbativi esterni. Nel quadro attuale, caratterizzato a vari livelli dal crescente fenomeno del surriscaldamento globale, il tema della diversità biologica assume una nuova centralità ed evidenzia una contestuale necessità di declinazione specifica.

L'obiettivo del presente studio è orientato alla definizione della biodiversità specifica ed ecosistemica delle acque interne del parco naturale dei Nebrodi, nell'ottica di valutarne il grado di resilienza rispetto agli effetti dell'innalzamento dei livelli di CO₂ nell'atmosfera e delle temperature.

L'area presa in esame, benché finora oggetto di limitato interesse rispetto ad altre zone del contesto regionale, si caratterizza come un ecosistema di rilevante interesse scientifico, in quanto presenta un elevato tasso di diversità biologica in termini di specie.

Lo studio si articola in 5 capitoli complessivi. Nel primo vengono analizzati in chiave sistemica gli elementi di fondo caratterizzanti il contesto delle acque interne in relazione al tema della biodiversità. Il quadro di riferimento assunto comprende la disamina degli ambiti mondiale, nazionale, regionale e specifico del Parco dei Nebrodi. La ricchezza della diversità biologica dell'area oggetto di studio è emersa quale elemento significativo.

Il secondo capitolo illustra le metodiche utilizzate nel corso della presente attività di ricerca, descrivendo dettagliatamente le procedure seguite nelle diverse fasi.

Nel terzo capitolo si determinano le due diverse procedure analitiche messe in atto: la prima è strutturata secondo le tradizionali tecniche di cattura e identificazione; la seconda presenta un contenuto maggiormente innovativo da un punto di vista scientifico, in quanto prevede l'analisi di frammenti di eDNA al fine di individuare e definire la presenza di organismi. È stato possibile rilevare la presenza nel lago Biviere di alcuni organismi bioindicatori - sia artropodi che batteri - mettendola in relazione con dinamiche potenzialmente indotte dall'innalzamento dei livelli di CO₂ nell'atmosfera e dal surriscaldamento climatico.

Nel quarto capitolo si è proceduto allo studio dei principali parametri ambientali caratterizzanti l'area di riferimento, ossia quelli chimici, fisici e biologici. Si è approfondita inoltre l'analisi dell'impatto delle microplastiche nell'area in oggetto. Da tale studio è emerso come nel lago Biviere si registrino rilevanti livelli di acidificazione. A livello generale, tale fenomeno è stato annoverato tra gli effetti deleteri dell'innalzamento dei livelli di CO₂ nell'atmosfera e del surriscaldamento climatico.

Il quinto capitolo prende in esame le evidenze delle analisi istologiche, batteriologiche e parassitologiche della fauna ittica rilevata.

Nelle conclusioni si è proceduto ad inquadrare quanto emerso in una prospettiva di sintesi in grado di individuare e delineare una tendenza potenzialmente in atto. Benché infatti si sia riscontrata una significativa ricchezza in termini di diversità biologica, l'evidenza di indicatori sentinella quali l'assenza di Helophoridae nel lago Biviere e il rilevamento nello stesso di indici di pH bassi - corredato dal contestuale rilevamento di Acidobatteri e Alphaproteobatteri - sembrerebbe compatibile con un modello interpretativo recente che pone in relazione l'incremento del tasso di acidità delle acque interne - fattore ad incidenza molto negativa per la biodiversità – con gli strutturali effetti negativi del surriscaldamento climatico e degli elevati livelli di CO₂ nell'atmosfera.

Capitolo 1 ARGOMENTO DI RICERCA

La biodiversità

Una delle più complete definizioni del concetto di biodiversità, o diversità biologica, è stata elaborata dalla Conferenza dell'ONU su ambiente e sviluppo tenutasi a Rio de Janeiro nel 1992 (art. 2 della Convenzione sulla Diversità Biologica) e recita: "ogni tipo di variabilità tra gli organismi viventi, compresi, tra gli altri, gli ecosistemi terrestri, marini e altri acquatici e i complessi ecologici di cui essi sono parte; essa comprende la diversità entro specie, tra specie e tra ecosistemi".

Secondo i dati riportati dall'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (Ispra), esistono dai 4 ai 100 milioni di organismi viventi e di questi soltanto una piccola parte è oggi nota.

Nell'area del Mediterraneo il nostro paese rappresenta una parte fondamentale dell'hotspot di biodiversità, in quanto presenta una grande abbondanza di specie endemiche e una vasta variabilità ecologica e ambientale, che risulta però spesso minacciata da fattori antropici. Circa la metà delle specie animali e vegetali endemiche italiane e quasi un terzo degli habitat risultano a rischio estinzione. Il monitoraggio, il ripristino e valorizzazione della biodiversità degli ecosistemi terrestri, delle acque dolci e delle aree urbane rappresentano, dunque, elementi fondamentali nell'ambito delle direttive comunitarie che prevedono, entro il 2030, decremento del 30% del processo di riduzione della biodiversità e del 15% dei trend di squilibrio degli ecosistemi (Agenzia per la coesione territoriale, 2015), attraverso l'implementazione di azioni mirate, orientate alla promozione del ripristino ecologico degli habitat.

Quanto all'importante ambito delle acque interne, l'acqua dolce costituisce il 3% dell'acqua del pianeta, ed il 67% della stessa è "intrappolata" nei ghiacciai e nelle calotte polari. Laghi, stagni e ruscelli (esclusi quelli sotterranei) costituiscono circa il 6,5% delle acque dolci, e rappresentano meno dello 0,2% delle acque terrestri e lo 0,8% della loro superficie. Tuttavia, oltre ad assicurare il sostentamento di miliardi di persone, le acque interne garantiscono la sopravvivenza di 100.000/126.000 specie animali, ossia di una quota compresa tra il 6 e il 9,5% del totale del mondo animale globalmente inteso (Dudgeon et al., 2006). In particolare, 15.000 delle 30.000 specie di pesci conosciute abitano le acque dolci, così come 20.000 specie di vertebrati, ossia più del 35% del totale (Chadwick 2010; Dudgeon et al. 2006; Strayer and Dudgeon 2010). Per fare un confronto, le acque interne ospitano una specie di pesci ogni 15 km³, mentre in mare si trova più o meno una specie ogni 100.000 km³. Queste stime non includono inoltre la biodiversità sotterranea (26,5% delle acque

dolci globali), che si stima sia composta da circa 500.000/100.0000 specie (Chadwick 2010), sebbene ancora poco indagata a livello italiano e mondiale.

Le acque interne, che comprendono laghi, fiumi e zone umide, rappresentano ecosistemi vitali che supportano, dunque, una notevole varietà di specie. Bisogna considerare in aggiunta che le acque interne ospitano oltre un terzo dei vertebrati, quasi tutti gli anfibi e metà dei pesci (Carrete Vega and Wiens, 2012; Dudgeon et al., 2006). Sebbene le conoscenze sugli invertebrati siano al momento parziali, molti gamberi, gasteropodi e bivalvi periferi risultano attualmente in serio pericolo di estinzione oppure già estinti (Lopes-Lima et al., 2018; Richman et al., 2015).

La comprensione e l'identificazione della vasta gamma di organismi che popolano questi ambienti d'acqua dolce ha un'importanza fondamentale, in quanto non solo favorisce l'acquisizione di conoscenze sulla biodiversità stessa, ma svolge anche un ruolo cruciale nella valutazione degli ecosistemi, nella gestione delle risorse e nella conservazione dell'ambiente. Eppure, solo recentemente queste attività sono state oggetto di un'attenzione e di un'implementazione crescente (Gonçalves and Hermoso, 2022; Juffe-Bignoli et al., 2016). È infatti maturata a vari livelli istituzionali la consapevolezza del fatto che le acque interne costituiscono un importante hotspot di biodiversità in pericolo (Tickner et al., 2020).

Tra il 1970 e il 2018 si è registrata a livello globale una diminuzione dell'83% (mediamente compresa tra il 74% e l'89% a seconda delle aree geografiche) dell'abbondanza media di oltre 6.000 popolazioni di animali d'acqua dolce (Fig. 1), più del doppio del tasso di declino osservato nelle loro controparti marine o terrestri (WWF 2022).

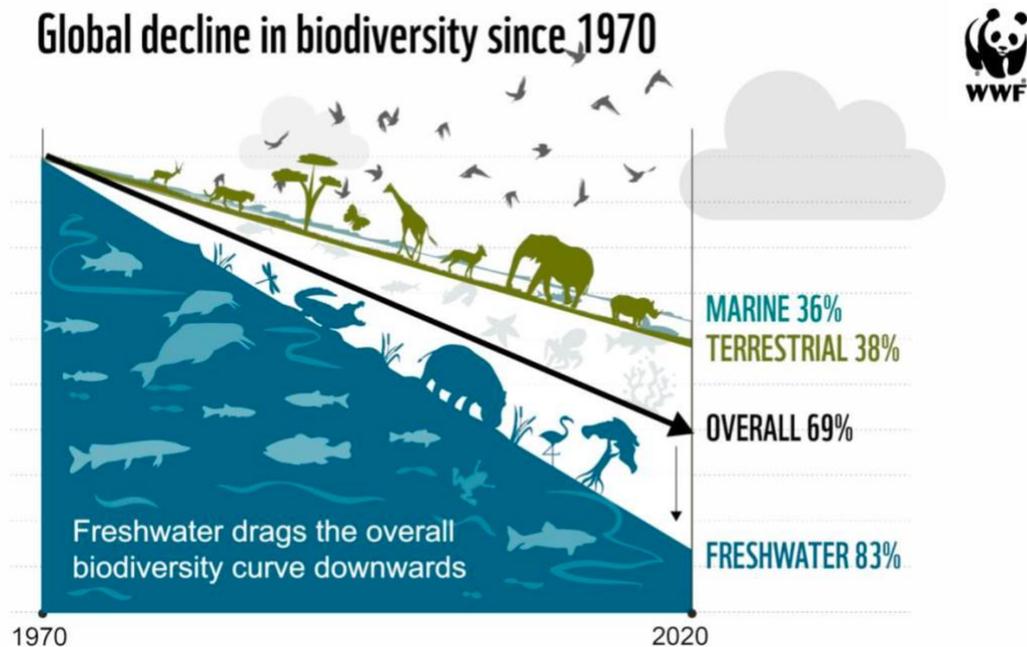


Figura 1 Riassunto del Living Planet Index, mostra che la biodiversità d'acqua dolce associata agli ecosistemi delle acque interne è diminuita in modo più marcato rispetto a quella terrestre o marina, sebbene siano evidenti riduzioni significative in tutti gli ambienti
Fonte: WWF 2022

Nello stesso periodo le popolazioni di pesci migratori, che vivono in parte o esclusivamente in acque dolci, sono diminuite del 76% (Deinet et al., 2020); il declino delle specie d'acqua dolce più grandi (> 30 kg di massa corporea) è stato ancora più elevato (99% e 97% nei regni Indomalaya e Palearctico, rispettivamente (He et al., 2019). I dati della Lista Rossa IUCN (www.redlist.org) indicano che oltre un terzo delle specie di determinati taxa di animali d'acqua dolce è attualmente minacciato, e nell'ambito di questo 33% gli storioni (27 specie) sono ritenuti il gruppo di animali più a rischio del pianeta.

Numerosi recenti studi scientifici hanno evidenziato il ruolo enorme dell'identificazione delle specie nel chiarire l'intricata rete di vita degli ecosistemi d'acqua dolce (Chadd and Extence, 2004; Darwall and Vié, 2005; Higgins et al., 2005; Power et al., 1996). Ogni specie, indipendentemente dalle sue dimensioni o dalla sua importanza, svolge infatti ruoli e funzioni ecologiche specifiche, plasmando il delicato equilibrio di questi ecosistemi (Balian et al., 2008). Identificando e classificando le specie presenti, i ricercatori possono approfondire le intricate interdipendenze e interazioni che sono alla base del funzionamento delle acque interne.

Inoltre, lo studio delle specie che abitano le acque interne ha profonde implicazioni per la gestione e la conservazione efficaci degli ecosistemi, mentre l'identificazione e il monitoraggio delle popolazioni di specie facilitano la valutazione della salute dell'ecosistema, consentendo agli scienziati di rilevare cambiamenti indicativi di perturbazioni e impatti ambientali, come l'inquinamento, il degrado degli habitat, la perdita di connettività dovuta a dighe e altre infrastrutture, l'alterazione dei flussi causata dall'aumento dell'estrazione di acqua per usi agricoli, industriali e domestici (Dudgeon et al., 2006; Jaureguiberry et al., 2022) e anche la presenza di specie invasive (Marshall, 2018; Ricciardi and Rasmussen, 1999).

Questi cambiamenti possono avere conseguenze di vasta portata, potenzialmente destabilizzando interi ecosistemi e compromettendo i servizi che essi forniscono alle società umane. Comprendendo e rispondendo a questi cambiamenti è possibile ideare e attuare strategie di conservazione per mitigare gli impatti negativi e ripristinare l'equilibrio degli ecosistemi d'acqua dolce. Molte specie presenti in questi ecosistemi hanno un'importanza economica diretta o indiretta, dalle specie ittiche di valore commerciale agli organismi indicatori utilizzati nella valutazione della qualità dell'acqua. L'identificazione e il monitoraggio accurati di queste specie sono essenziali per promuovere una gestione responsabile delle risorse, sostenere la pesca e supportare le economie locali che dipendono dalle risorse d'acqua dolce.

Inoltre, riconoscere le specie che popolano le acque interne è fondamentale per salvaguardare la salute umana. Alcuni organismi presenti in questi ecosistemi possono infatti rappresentare un rischio per il benessere umano, agendo come portatori di malattie trasmesse dall'acqua o indicandone i livelli di contaminazione (Butchart et al., 2010). Identificando e monitorando queste specie è dunque possibile adottare misure proattive per proteggere la salute pubblica, garantendo la sicurezza delle risorse idriche utilizzate per scopi potabili, ricreativi e agricoli. In conclusione, l'importanza di studiare le specie che popolano le acque interne non può essere sottovalutata, poiché fornisce informazioni preziose sulle dinamiche degli ecosistemi, consente l'attuazione di strategie di gestione e conservazione efficaci, favorisce l'utilizzo sostenibile delle risorse e consente di tutelare la salute umana. Rispetto a tali obiettivi, i processi di identificazione e di comprensione approfondita delle specie rappresentano un impegno collettivo volto a preservare il delicato equilibrio degli ecosistemi d'acqua dolce e garantirne la vitalità per le generazioni future.

La fauna d'acqua dolce italiana

Nell'ambito del contesto d'area italiano, secondo la check-list pubblicata da Fochetti (2012) sono presenti 5.496 specie animali d'acqua dolce su un totale mondiale di 55.732, ovvero circa il 10% dello spettro complessivo.

In questo quadro, il 57% delle specie che contribuiscono alla biodiversità delle acque dolci italiane sono costituite da insetti. Sulla base di quanto emerso dallo studio condotto da Fochetti (2012), il 56% è rappresentato dai Ditteri, che ammontano a 1750 specie, ossia a circa il 30% della diversità biologica complessiva delle acque dolci italiane, e che costituiscono uno dei gruppi tassonomici meno esplorati sia dal punto di vista sistematico che biologico, come evidenziato nelle Figure di seguito (Fig. 2; Fig. 3).

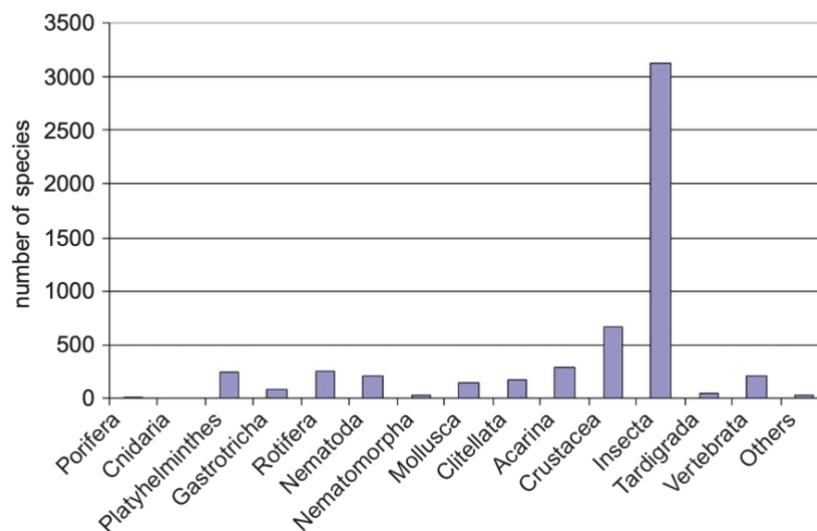


Figura 2 Diversità delle acque dolci italiane suddivise nelle principali categorie tassonomiche. Fonte: Fochetti, 2012

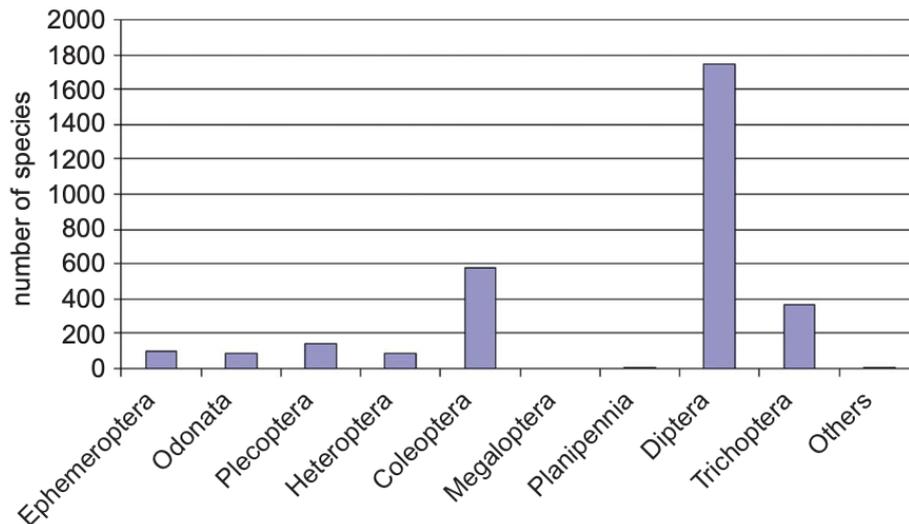


Figura 3 Numero degli ordini di insetti delle acque dolci italiane. Fonte Fochetti, 2012

In Italia sono presenti 5.845 specie animali endemiche, corrispondenti a oltre il 10% del totale delle specie mondiali. Anche se non si ha una stima specifica per le specie di acqua dolce italiane, è ragionevole ipotizzare che molte delle specie appartenenti agli ordini tipici delle acque interne possano mostrare un alto grado di endemismo.

Ad esempio, all'interno delle diverse famiglie di insetti delle acque dolci italiane l'endemismo varia notevolmente: nel caso dei plecoteri il 30% delle specie (144 specie) sono endemiche, mentre nei tricoteri il 25% (367 specie) mostra questa caratteristica, così come il 20% degli efemerotteri (94 specie). Nei Ditteri, le percentuali di endemismo vanno dal 25% dei Simuliidae (70 specie) al 30% dei Rhagionidae (38 specie) e dei Thaumaleidae (11 specie), fino al 50% dei Blephariceridae (13 specie). Tuttavia, non sono noti Chironomidi (426 specie) endemici in Italia.

Nel caso dei Coleotteri le percentuali di endemismo variano dal 20% per gli Hydraenidae (145 specie) al 4% per i Dytiscidae (193 specie) e gli Haliplidae (21 specie), arrivando allo 0% per gli Helophoridae (25 specie) e gli Hydrophilidae (47 specie). Considerato che questi taxa rappresentano circa il 30% dell'intera fauna di acqua dolce (1.604 specie su 5.496), si può supporre che la percentuale complessiva di specie endemiche italiane possa superare il 10%.

Per quanto concerne i pesci d'acqua dolce italiani, molte delle 17 specie endemiche sono concentrate nel bacino del fiume Po (11 specie su 17) (Smith and Darwall, 2006). Questo livello di endemismo è raro nella regione mediterranea e si riscontra solo in poche altre località come nel basso Oriente, nel sud-ovest della Turchia, nel lago Kinneret in Israele e nel basso Guadiana nel sud della Spagna.

La definizione più semplice in ambito scientifico di "hotspot" fa riferimento a un'area caratterizzata da una notevole ricchezza di specie, che spesso necessita di interventi di conservazione (Stoch F., 2008; Stoch, 2000). Nell'ambito del progetto CKmap Italiano (Ruffo and Stoch, 2005), che ha realizzato l'analisi dei dati di distribuzione di circa 10.000 specie animali in Italia, sono state individuate le regioni italiane con la maggiore densità di specie, denominate "hotspot generali italiani" (Stoch F., 2008). Tra queste rientrano le zone alpine e prealpine, gli Appennini in Liguria, Toscana ed Emilia, nonché Abruzzo e Lazio. Tuttavia, è importante notare come siano stati evidenziati dubbi circa l'utilità degli hotspot quali elementi "predittori" delle caratteristiche di fondo della biodiversità (Balletto et al., 2010).

Al contrario, si è registrata una minore ricchezza di specie nelle regioni più meridionali, probabilmente imputabile alla limitata ricerca faunistica e a possibili ricadute della condizione di insularità (Stoch F., 2008).

Secondo una revisione sulla biodiversità delle acque dolci nel mondo (Dudgeon et al., 2006), le minacce alla biodiversità globale delle acque dolci possono essere raggruppate in cinque principali categorie interagenti: sovrasfruttamento; inquinamento dell'acqua; modifiche al flusso; distruzione o degrado dell'habitat; invasione da specie esotiche. Inoltre, si devono aggiungere a queste categorie di minacce il riscaldamento globale, il deposito di azoto e i cambiamenti nei modelli di precipitazioni e deflusso, che agiscono a livello mondiale (Fenoglio et al., 2010). L'entità globale delle alterazioni umane può essere illustrata con un esempio riguardante la costruzione di dighe: oltre la metà (172 su 292) dei fiumi più grandi del mondo è condizionata dalle dighe, compresi gli otto più biogeograficamente diversificati (Nilsson and Berggren, 2000). Le dighe trattengono circa 10.000 km³ di acqua, ossia l'equivalente di cinque volte il volume di tutti i fiumi del mondo. Secondo Chao (1995), l'accumulo d'acqua da parte delle dighe nell'emisfero settentrionale è talmente grande da causare cambiamenti geodinamici misurabili nella rotazione terrestre e nel campo gravitazionale.

Le zone umide mediterranee e italiane evidenziano gli stessi fattori di minaccia: eutrofizzazione dovuta a scarichi urbani e deflusso agricolo; inquinamento industriale; bonifica per irrigazione e approvvigionamento idrico; costruzione di dighe che limita il flusso di sedimenti e nutrienti verso le foci dei fiumi e influisce sulle migrazioni delle specie e sulla produttività della pesca; sovrasfruttamento dei laghi e delle lagune; introduzione di specie esotiche (sia pianificate che accidentali). A questo proposito si possono citare esempi ben noti come il granchio di palude rosso *Procambarus clarkii* (Girard, 1852), la tartaruga dalle orecchie rosse *Trachemys scripta elegans*

(Wied-Neuwied, 1839), la chioccia neozelandese *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843), il cobite *Misgurnus anguillicaudatus* (Cantor, 1842), tutti introdotti in Italia e in competizione con le specie endemiche.

Declino della biodiversità nelle acque interne

Le invasioni biologiche, ovvero l'insediamento con successo di specie non indigene indicate con l'acronimo NIS (non-indigenous species) in un determinato ambiente, sono considerate una delle minacce più gravi per la conservazione della biodiversità, sia a livello locale che globale (Gherardi, 2007; Havel et al., 2015). Le specie invasive, in particolar modo se opportuniste, minacciano la sopravvivenza delle popolazioni e delle comunità autoctone attraverso l'ibridazione, la competizione, il parassitismo e la predazione, finendo per causare cambiamenti radicali alle comunità autoctone degli habitat invasi (Ehrenfeld, 2010; Simberloff et al., 2013; Strayer, 2010). Altri problemi da non sottovalutare sono rappresentati dagli impatti negativi che possono causare alle attività economiche e dalla compromissione della salute umana (Pimentel, 2008).

A causa delle minacce elencate, gli ecosistemi d'acqua dolce stanno affrontando una massiccia perdita di biodiversità su scala globale. Le stime suggeriscono che almeno 10.000-20.000 specie di acqua dolce sono estinte o a rischio, con tassi di perdita che potrebbero essere paragonabili a quelli di transizioni precedenti tra epoche geologiche come il Pleistocene all'Olocene (Vörösmarty et al., 2010). Nel 2008, 510 specie di pesci d'acqua dolce sono state incluse nella relativa lista rossa, mentre nel 2009 il numero è aumentato a 3.120 (Douglas H. Chadwick, 2010). Basandosi su un insieme combinato di dati relativi a molluschi unionidi, crostacei, pesci e anfibi, Ricciardi and Rasmussen (1999) hanno calcolato che il tasso di estinzione degli animali d'acqua dolce in Nord America potrebbe essere fino al 4% per decennio, cinque volte superiore alle perdite di specie calcolate in qualsiasi altro habitat terrestre. Nessun altro gruppo principale di specie ed ecosistemi ha subito declini così rapidi e massicci. Ad esempio, per quanto riguarda i vertebrati, solo cinque specie marine sono considerate estinte dal 1700: il pinguino imperiale (*Pinguinus impennis* Linnaeus, 1758), la foca monaca dei Caraibi (*Monachus tropicalis* Gray, 1850), la mucca marina di (Steller *Hydrodamalis gigas* Zimmermann, 1780), l'anatra del Labrador (*Camptorynchus labradorius* Gmelin, 1789) e il cormorano dagli occhiali (*Phalacrocorax perspicillatus* Pallas, 1811), mentre nel medesimo periodo si sono verificate almeno 13 estinzioni di specie d'acqua dolce (12 specie di pesci e 1 lampreda), tra cui *Romanogobio antipai* (Banareescu, 1953), *Alburnus danubicus* (Antipa, 1909), *Gasterosteus*

crenobiontus (Bacescu & Mayer, 1956), *Coregonus oxyrinchus* (Linnaeus, 1758), *Coregonus bezola*, (Fatio, 1888), *Coregonus fera* (Jurine, 1825), *Coregonus hiemalis*, (Jurine, 1825), *Coregonus restrictus* (Fatio, 1885), *Coregonus gutturosus* (Gmelin, 1818), *Salmo schieffermuelleri* (Bloch, 1784), *Salvelinus neocomensis* (Freyhof & Kottelat, 2005), *Salvelinus profundus* (Schillinger, 1901) e la lampreda *Eudontomyzon sp.* (Kottelat and Freyhof, 2007). Secondo gli stessi autori, circa una specie di pesce d'acqua dolce europeo su tre è minacciata di estinzione (per un totale di 200 specie in pericolo), mentre 62 specie sono considerate a rischio critico. Tra le specie minacciate vi è l'anguilla europea (*Anguilla anguilla*, Linnaeus 1758), una volta molto comune, il cui rilevamento nei ruscelli e nei fiumi è diminuito del 95/99%. Questa specie è stata recentemente inclusa nell'Appendice II della Convenzione di Washington (C.I.T.E.S. 2007, in vigore dal 13 marzo 2009). In Italia il 20% delle specie di pesci risulta minacciato, e all'interno di questa stima percentuale molte delle quali risultano endemiche (Smith and Darwall, 2006).

Purtroppo, non vi sono dati rilevanti relativi allo stato di conservazione delle specie di invertebrati d'acqua dolce, sebbene sia noto che alcune specie siano di fatto estinte, come la *Margaritifera auricularia*, che attualmente sopravvive in Europa solo in un sito nel bacino dell'Ebro e in tre siti in Francia (Prie V., 2010). Non si ha tuttavia una visione generale chiara in relazione a questo tema. Quanto allo studio delle estinzioni di insetti, sia terrestri che acquatici, si tratta di un ambito particolarmente trascurato in passato. Risultano documentate solo 70 estinzioni di insetti, mentre, secondo una recente stima approssimativa, potrebbero essere avvenute più di 44.000 estinzioni di insetti negli ultimi 600 anni (Dunn, 2005). In Italia è difficile valutare lo stato di conservazione e le tendenze degli insetti acquatici a causa della mancanza di una adeguata attenzione da parte della ricerca scientifica. Ad ogni modo, l'analisi di alcuni taxa selezionati sembra delineare una situazione critica: per quanto riguarda i plecoteri, ad esempio, 5 specie non endemiche su 160 si sono estinte negli ultimi decenni, 22 sono attualmente minacciate di estinzione (molte di esse sono endemiche e conosciute solo per il sito tipo) (Fochetti and De Figueroa, 2006). Una situazione simile riguarda gli efemeroteri italiani, con 3 specie su 107 estinte, 10 minacciate di estinzione e 20 considerate rare, e i coleotteri idraenidi (Hydraenidae) con 12 specie minacciate di estinzione (su un totale di 168 conosciute per l'Italia, di cui 8 endemiche), 6 specie estinte localmente (in bacini idrografici o ampie aree) e una perdita generale di diversità rispetto agli anni '80 (Fochetti, 2012).

Le acque interne sono state interessate solo recentemente dalle politiche e interventi di conservazione, e solo una parte limitata della loro fauna è coinvolta in misure di preservazione.

Anche la legislazione europea appare carente: pochissime specie d'acqua dolce, principalmente vertebrati, sono incluse negli Allegati II e IV della DIRETTIVA 92/43/CEE DEL CONSIGLIO concernente la conservazione degli habitat naturali e della flora e della fauna selvatiche.

È possibile quindi affermare come le politiche di protezione riguardanti gli animali d'acqua dolce siano da ritenersi insufficienti. Come si può osservare nella Figura 4, il 64% delle specie di vertebrati europei (986 specie) è incluso in una direttiva di protezione europea o mondiale. Del totale degli uccelli europei, il 100% (533 specie) è in qualche modo protetto, così come il 66,2% degli anfibi (51 specie) e il 53,2% dei rettili (82 specie). Allo stato attuale, solo lo 0,1% degli invertebrati europei risulta oggetto di specifica tutela (154 specie). In Italia, su 841 specie protette, solo 100 sono quelle d'acqua dolce e 15 sono quelle di invertebrati (Ministero dell'Ambiente).

<i>Group</i>	No. of species listed in European directives	% of the European fauna	No. of species listed in Italian or European directives	% of the Italian fauna	No. of Italian freshwater species listed in directives
Mammals	95	37.4	115	97.4	3
Birds	533	100	475	100	—
Reptiles	82	53.2	61	100	7
Amphibians	51	66.2	43	100	33
Fish	225	44.8	55	9.7	42
Lepidoptera	46	0.5	20	0.4	—
Coleoptera	36	0.1	11	0.09	2
Other insects	28	0.05	9	0.04	8
Mollusca	37	1.2	23	1.07	3
Other invertebrates	7	0.02	29	0.2	2
All vertebrates	986	64.8	749	59.7	85
All invertebrates	154	0.1	92	0.16	15

Figura 4 Numero di specie elencate nelle direttive di tutela europee e italiane Fonte: Fochetti, 2012

Nonostante ospiti una fauna d'acqua dolce molto particolare, il nostro paese ne tutela solo una piccola parte. Settantatré aree - corsi d'acqua, fiumi, laghi - sono protette nella veste di parchi regionali o riserve, a cui si aggiungono altre 46 zone umide protette in misura diversa. La media per le 20 regioni italiane è di circa 6 aree protette per regione, ma si deve considerare che in 7 regioni non vi sono corsi d'acqua o laghi protetti, in 5 regioni non esistono zone umide protette e che 3 regioni non proteggono nemmeno un metro quadrato delle loro acque interne (www.parks.it).

La conservazione degli ecosistemi acquatici richiede strategie specifiche, diverse da quelle adottate per gli habitat terrestri. La strategia di preservare aree di alta qualità delimitandole e proteggendole non è adatta per le acque dolci ed è probabile che sia persino controproducente (Dunn, 2003). La protezione della componente biotica acquatica (delle acque correnti o stagne) implica la protezione

del sistema di drenaggio a monte (i corsi d'acqua di montagna senza pesci sono indissolubilmente legati ai fiumi con pesci a valle) (Naiman and Latterell, 2005), o anche a valle se sono coinvolte specie migratorie (Dudgeon et al., 2006), e dovrebbe includere anche la parte terrestre, poiché la produttività dell'habitat acquatico è interconnessa da scambi reciproci di materiale (Naiman and Latterell, 2005). Una soluzione ideale sarebbe la protezione a livello di bacino idrografico.

Pertanto, considerando che qualsiasi misura di conservazione dovrebbe essere valutata a livello di bacino idrografico, il primo passo per proteggere gli ecosistemi acquatici è colmare il vuoto di conoscenza riguardo alla biodiversità che rappresentano. La nostra capacità di mitigare gli effetti delle interferenze umane sulle acque interne è proporzionale alla nostra capacità di comprendere l'ecologia di questi ecosistemi. Purtroppo, la conoscenza della biodiversità d'acqua dolce italiana è in gran parte incompleta, anche per quanto riguarda gruppi chiave, come ad esempio i Ditteri, o persino per quanto riguarda le specie ittiche, che contribuiscono direttamente alla produttività economica attraverso la pesca. Da evidenziare come il nostro paese (Minelli A., Ruffo S., and La Posta S., 1993) e l'Europa (vedi www.faunaeur.org) abbiano recentemente provveduto a redigere un inventario faunistico delle acque dolci, quale passaggio propedeutico alla necessaria elaborazione di piani nazionali a lungo termine, supportati dall'attività di esperti tassonomici e faunistici (Fochetti 2012).

Il Parco dei Nebrodi

La sezione europea della Regione Biogeografica Mediterranea occupa circa 1.200.000 km² rappresentando approssimativamente l'11 % del continente Europeo. Questa comprende gran parte della penisola iberica (centro e sud del Portogallo, centro e sud della Spagna), il "Midi" della Francia, il sud e gran parte del centro Italia, le coste della penisola balcanica, la penisola dell'Anatolia e le isole di Malta e di Cipro. Questa porzione europea si estende quindi per più di 4.000 km in longitudine da Lisbona in Portogallo fino a Adana nel sud Turchia.

La parte europea del bacino del Mediterraneo è caratterizzata dalla presenza di quattro penisole principali: iberica, italiana, balcanica e anatolica. Innumerevoli isole, alcune con ampia superficie (Baleari, Corsica, Sardegna, Sicilia, Creta, Cipro), più o meno distanti dalla terraferma, sono disseminate per tutta la sua lunghezza. Il suo perimetro europeo è circondato da montagne. Le altitudini maggiori si ritrovano nella Sierra Nevada in Spagna e nelle isole più grandi come la Sicilia, la Sardegna, la Corsica, Creta e Cipro.

Il clima mediterraneo è principalmente caratterizzato da un forte contrasto stagionale tra il periodo estivo, contraddistinto da alte temperature e un'accentuata aridità, e una stagione invernale caratterizzata da temperature relativamente moderate, con gelate sporadiche e dalla presenza di piogge e nevicate alle altitudini maggiori. Inoltre, in alcune stagioni è soggetto a fluttuazioni diurne della temperatura, violenti venti, brevi ma potenti rovesci temporaleschi e periodi di eccezionale siccità prolungata (Blondel and Aronson, 1999; Grove A. T. and Rackham O., 2001).

Nello scenario mediterraneo la Sicilia rappresenta l'isola più grande (25.708 km²) con 1.039 km di costa ed è circondata dalle isole satelliti degli arcipelaghi delle Eolie, delle Egadi e delle Pelagie.

Grazie alla sua posizione centrale nel Mar Mediterraneo l'isola è sempre stata un ponte naturale tra l'Europa e l'Africa, e questo si riflette inevitabilmente nella grande biodiversità che la caratterizza.

I monti Nebrodi (o Caronie) insieme ai Peloritani ad Est ed alle Madonie ad Ovest costituiscono l'Appennino Siculo, che si estende nelle tre province di Messina, Catania ed Enna.

Questo è inoltre delimitato a Nord dal mar Tirreno, a Sud da un braccio dell'alto corso del Simeto, ad Ovest dal fiume Pollina.

Le vette più importanti sono: Monte Soro (1847 m.), Serra del Re (1754 m.), Pizzu u Fau (1686 m.), Serra Pignataro (1661 m.), Monte Trearie (1600 m.), Monte Castelli (1566m) e Monte Sambuchetti (1558m). Alcuni dei numerosi fiumi che nascono dalle pendici di questi monti scorrono sul versante Sud e sfociano nel mar Jonio, altri, più brevi e a carattere torrentizio, scorrono verso Nord e sfociano nel mar Tirreno.

Quanto all'istituzione dei parchi naturali, questa rappresenta storicamente uno dei principali strumenti di tutela e preservazione del territorio e dell'ecosistema. I primi parchi naturali sono stati istituiti nella prima metà del XIX secolo negli Stati Uniti d'America, parallelamente alla crescita rapida delle principali città americane. Tale decisione è derivata dalla necessità di proteggere alcune aree di grande valore naturalistico-ambientale dagli impatti negativi dell'urbanizzazione in rapida espansione. In questo contesto, si può rilevare come la conservazione attraverso la creazione di parchi pubblici implicasse comunque una trasformazione attiva, e non costituisse mai un atto passivo: la salvaguardia e la valorizzazione del paesaggio erano percepite come obiettivi interconnessi.

In Europa, solo agli inizi degli anni '70 del secolo scorso, ci si cominciò a occupare in modo organico e sistematico della "tutela ambientale", attraverso i primi programmi d'azione promossi dalla Comunità Europea. In questo stesso periodo, in Italia furono istituiti i primi parchi regionali,

inizialmente concepiti come strumenti di protezione paesaggistica, simili a "musei della natura". Tuttavia, questa visione limitata fu superata alla fine degli anni '70 grazie alle nuove normative riguardanti le aree protette, che iniziarono a considerare il parco come un possibile modello di sviluppo economico in armonia con la salvaguardia ambientale.

Con le sentenze n. 210 e n. 641 del 1987 la Corte Costituzionale ha definito l'ambiente "un bene giuridico riconosciuto e tutelato da norme" e la sua protezione un "diritto fondamentale della persona umana", oltre che un "valore costituzionale primario" assieme a quello alla salute individuale e collettiva.

Un importante strumento normativo che articola i principi fondamentali dell'istituzione e della gestione delle aree protette, e stabilisce lo "speciale regime di tutela e gestione" cui deve essere soggetto il patrimonio naturale sul territorio nazionale, è la L.394/91.

In accordo con i principi europei e delle Nazioni Unite, Stato e regioni si sono dotati di strumenti di gestione per la tutela e conservazione del patrimonio naturale.

Più recentemente - a livello globale - i principali obiettivi di sviluppo rintracciati nell'Agenda 2030 per lo Sviluppo Sostenibile - un programma d'azione per le persone, il pianeta e la prosperità, sottoscritto nel 2015 dai governi dei 193 Paesi membri delle Nazioni Unite e approvato dall'Assemblea Generale dell'ONU - risultano orientati anche al rispetto e alla tutela della vita sott'acqua (obiettivo 14), oltre che alla vita sulla terra (obiettivo 15). Tali obiettivi hanno come fine quello di proteggere, ripristinare e favorire un uso sostenibile dell'ecosistema terrestre, rilevando, in maniera trasversale, il tema della protezione della biodiversità, nonché della tutela della flora e della fauna negli ecosistemi (Agenzia per la Coesione territoriale 2015).

A livello regionale siciliano, il concetto di parco quale strumento capace di bilanciare la conservazione della natura con la pianificazione dello sviluppo delle economie locali è stato ampiamente abbracciato dal Parco dei Nebrodi.

Il Parco Regionale dei Nebrodi, istituito il 4 agosto 1993, è la più estesa area naturale protetta della Sicilia, in quanto copre una superficie di 86.000 ettari. All'interno della stessa sono state definite quattro zone con specifici divieti e limitazioni, a seconda delle caratteristiche naturalistiche e degli obiettivi di conservazione e valorizzazione delle risorse che costituiscono il patrimonio dell'area protetta.

La presenza di vasti complessi forestali ha un impatto significativo sul clima dell'area dei Nebrodi, che si distingue per inverni prolungati e rigidi ed estati calde ma non eccessivamente torride,

contrariamente alla costa e al resto della Sicilia. Le temperature nelle zone interne, pur variando in base alla posizione geografica, generalmente oscillano tra i 10 e i 12 °C nelle regioni di media e alta montagna. La quantità di precipitazioni, strettamente legata all'altitudine e all'esposizione delle pendici, varia da un minimo di 600 mm a un massimo di 1400 mm. Eventi meteorologici come neve e nebbia sono comuni e contribuiscono a creare le condizioni di umidità necessarie per la sopravvivenza di specifiche tipologie di foreste. Il Parco dei Nebrodi è inoltre caratterizzato da un'abbondante presenza di aree umide rappresentate da laghi naturali, invasi, pozze temporanee e sorgenti, che lo rendono un ecosistema di notevole interesse scientifico grazie all'alto tasso di biodiversità in termini di specie che popolano queste zone.

Le acque interne del Parco dei Nebrodi

All'interno del Parco dei Nebrodi sono presenti circa 7 laghi, di cui uno - il Biviere di Cesarò - di origine naturale e sei costituiti da bacini artificiali.



Figura 5 Biviere di Cesarò

Il Biviere di Cesarò (Fig. 5) è una complessa area di studio situata nell'ambito di una catena montuosa nel cuore della Sicilia settentrionale. È collocato ad un'altitudine di circa 1.278 metri sopra il livello del mare (s.l.m), in una posizione che conferisce all'area un clima fresco e delle condizioni uniche

nel suo genere. Il Biviere, alimentato principalmente da sorgenti d'acqua dolce, ha una superficie di circa 18 ettari e costituisce la zona umida d'alta quota di maggior valore naturalistico della Sicilia, soprattutto per la gli organismi vegetali ed animali che lo popolano. La presenza di acqua in una zona montana coperta da foreste di faggio rappresenta, inoltre, un punto di riferimento privilegiato per la vita di numerose specie di uccelli acquatici e per la sosta degli uccelli di passo durante le grandi trasvolate migratorie.

Il Biviere di Cesarò, insieme al lago di Pergusa e al Biviere di Gela, è stato identificato come significativo corpo idrico lacustre di origine naturale dal Piano di Gestione del Distretto Idrografico della Sicilia (PdG) del I ciclo di pianificazione (2009-2015), approvato con DPCM 07/08/2015.

Dal punto di vista ecologico, il Lago Biviere di Cesarò è noto per la sua biodiversità unica, che comprende una varietà di specie ittiche e una ricca avifauna, acque circondate da una vegetazione rigogliosa, boschi di faggi, querce e conifere, e una fauna selvatica diversificata.

Questo ecosistema di alta quota costituisce un soggetto interessante al fine di condurre indagini sulla diversità biologica sia nello specifico contesto regionale che in riferimento al più generale ambito mediterraneo, nonché per valutare gli effetti del cambiamento climatico su un ecosistema di acqua dolce situato in un contesto di montagna.

Inoltre, un elemento di interesse aggiuntivo è rappresentato dal fatto che il Biviere di Cesarò rappresenta un apprezzato sito turistico.



Figura 6 Lago Maulazzo

Contestualmente, il lago Maulazzo (Fig.6) rappresenta il corpo d'acqua di maggiore altitudine – di origine artificiale - presente in Sicilia, ad un'altezza di 1.400m s.l.m (coordinate 37°56'28.5"N 14°40'18.6"E). Tale lago, di dimensioni approssimativamente pari a 5 ettari, è situato nella parte centrale del Parco dei Nebrodi, circondato da una faggeta denominata Sollazzo Verde, sulle pendici del Monte Soro, che con i suoi 1847 s.l.m. rappresenta la vetta più alta del Parco. La sua costruzione, avvenuta intorno al 1980, è stata opera del Corpo forestale della Regione Sicilia. In quanto bacino artificiale è dunque tecnicamente definito invaso: ha una forma allungata e le sue acque si caratterizzano per la loro limpidezza, che evidenzia una tonalità verde/blu. La fauna che popola la zona circostante il lago comprende piccoli mammiferi, rapaci diurni e segnala la presenza di grifoni e aquile reali.

Il lago Maulazzo, al pari del Biviere, è una destinazione turistica molto frequentata ed è apprezzata meta di campeggi, attività di trekking ed escursioni in fuoristrada.

Il Lago Ancipa è stato creato tra il 1950 e il 1952 attraverso la costruzione della diga di San Teodoro al fine di generare energia elettrica, a valle del torrente Troina, ed è localizzato a 944 s.l.m. Tale

progetto, finanziato dall'ESE (Ente per lo Sviluppo Economico), ha portato alla formazione di un bacino con una capacità massima di 30 milioni di metri cubi d'acqua.

Il lago svolge un ruolo fondamentale come risorsa idrica per l'approvvigionamento di acqua potabile di 13 comuni della provincia di Enna, compresa la città capoluogo, oltre che per altre località nelle province di Caltanissetta e Catania. Le acque del lago vengono trattate in un impianto di potabilizzazione prima di essere distribuite attraverso gli acquedotti delle città servite.

Nel 2012 sono state avviate le centrali idroelettriche ottenendo un'alta produzione di energia (50GWh).

Il Lago Trearie, trovandosi a un'altitudine di 1.435 metri sopra il livello del mare, costituisce insieme al Lago Maulazzo la conca d'acqua di maggior altitudine in Sicilia. Situato tra la cresta dei Nebrodi e quella dell'Etna, questo lago è circondato da tre rilievi principali: il Monte Trearie, il Monte Solazzo e il Poggio Cartolari.

Il Torrente Saracena, uno dei più significativi affluenti del fiume Simeto, trae origine da questo lago, il che lo rende una riserva importante per il deflusso delle acque. Il lago Trearie, inizialmente di origine naturale, è stato successivamente ampliato mediante la costruzione di una diga di cemento, posizionata all'imbocco del suo emissario. Questa espansione artificiale ha purtroppo causato la scomparsa di tutta la vegetazione originaria, influenzando negativamente anche sulla biodiversità.

Il lago Cartolari, situato a un'altitudine di 1390 metri sopra il livello del mare, si trova nel territorio del comune di Tortorici, nella provincia di Messina. Questo lago è un piccolo bacino artificiale circondato da pascoli e foreste di faggio e querce. Lungo le sue sponde è possibile trovare un'ampia varietà di specie di funghi. La fauna che popola la zona del lago Cartolari offre l'opportunità di osservare diverse specie di uccelli, tra cui poiane, gheppi, il falco pellegrino, il merlo acquaiolo, il martin pescatore, germani reali, aironi, folaghe e beccaccini.

Il lago Quattrocchi è di forma circolare ed è situato nel territorio del comune di Mistretta, alle pendici del Monte Castelli. Esso è delimitato da una recinzione in legno ed è circondato da un'area attrezzata che lo rende una meta molto apprezzata dai visitatori. In questa zona non sono rari gli avvistamenti di uccelli acquatici, rettili (come la Testuggine palustre), nonché di piccoli mammiferi che abitano nei boschi circostanti.

In ultimo, il Lago Pisciotto costituisce un piccolo specchio d'acqua nel territorio del comune di Tortorici, sito in un'area di pascoli d'alta quota ai piedi del monte del Moro o Pojummoru (1.433

m.s.l.m.). Noto anche con il nome di Lago Badessa è ricco di variegata vegetazione igrofila, nella quale trovano rifugio uccelli acquatici, anfibi e svariate specie di artropodi.

Capitolo 2 METODOLOGIA

2.1 Area di studio

Lo studio in questione è stato condotto presso il Parco Naturale dei Nebrodi focalizzando l'attenzione su due laghi dell'area: il lago Maulazzo e il Biviere di Cesarò. Nelle tabelle di seguito sono riportate le informazioni generali dei due ambienti (Tab. 1; Tab. 2).

Tabella 1 Descrizione caratteristiche generali lago Maulazzo

Nome del Lago	Maulazzo
Provincia	Messina
Bacino Idrografico	Simeto
Altitudine massima del bacino	3.274m s.l.m.
Altitudine media del lago	1.400m s.l.m.
Tipologia lago	Invaso
Area del lago	0,05 km ²
Profondità massima	4m
Volume medio annuo	0,1 Mmc

Tabella 2 Informazioni generali Biviere di Cesarò

Nome del Lago	Biviere di Cesarò
Provincia	Messina
Bacino Idrografico	Simeto
Altitudine massima del bacino	3.274m s.l.m.
Altitudine media del lago	1.278m s.l.m.
Tipologia lago	Naturale
Area del lago	0,18 km ²
Profondità massima	3m
Volume medio annuo	0,1 Mmc

Le Stazioni di campionamento sono state stabilite in ragione delle diverse tipologie di analisi da effettuare e ciascuna di esse è stata denominata con una determinata sigla.

La scelta dei punti di campionamento per la matrice acquosa, inoltre, è stata effettuata sulla base di quanto disposto dalle direttive del D. lgs. 152/99. Per il prelievo dell'acqua sono stati identificati tre punti per il lago Maulazzo - indicati come MAU-A1, MAU-A2 ed MAU-A3 - e due punti per il Biviere di Cesarò, indicati come BIV-A1 e BIV-A2. Nella Tabella 3 sono riportati i punti e le relative coordinate geografiche.

Tabella 3 Punti di prelievo di acqua, codice della stazione e coordinate geografiche.

Lago	Stazione	Latitudine	Longitudine
Lago Maulazzo	MAU-A1	37°56'25"N	14°40'16"E
Lago Maulazzo	MAU-A2	37°56'32"N	14°40'19"E
Lago Maulazzo	MAU-A3	37°56'28"N	14°40'18"E
Biviere di Cesarò	BIV-A1	37°56'59"N	14°43'02" E
Biviere di Cesarò	BIV-A2	37°57'14"N	14°43'04"E

Il prelievo dei sedimenti è stato realizzato in 4 punti per ogni lago, al fine di ottenere informazioni esaustive ed ottenere uniformità nei risultati. In ragione della natura artificiale del lago Maulazzo, le cui sponde risultano composte di calcestruzzo, è stato necessario effettuare un sopralluogo avente lo scopo di individuare con precisione le zone caratterizzate dalla presenza di fondo mobile. Le stazioni considerate per le indagini sui sedimenti nel lago Maulazzo sono: la MAU-S1, in prossimità della zona di pesca; la MAU-S2, in prossimità di un affluente; la MAU-S3, individuata quale terzo punto di riferimento in zona di fondo mobile; la MAU-S4, nella quale è stata individuata una sorgente sotterranea.

Quanto al Biviere di Cesarò, in esso sono stati individuati 4 punti lungo il perimetro del lago, di seguito identificati come BIV-S1, BIV-S2, BIV-S3, BIV-S4. Nella tabella 4 sono riportati i punti con le rispettive coordinate geografiche.

Tabella 4 Punti di campionamento del sedimento, codice stazione e coordinate geografiche

Lago	Stazione	Latitudine	Longitudine
Lago Maulazzo	MAU-S1	37°56'27"N	14°40'15"E
Lago Maulazzo	MAU-S2	37°56'29"N	14°40'22"E
Lago Maulazzo	MAU-S3	37°56'25"N	14°40'19"E

Lago Maulazzo	MAU-S4	37°56'22"N	14°40'17"E
Biviere di Cesarò	BIV-S1	37°56'53"N	14°43'03"E
Biviere di Cesarò	BIV-S2	37°57'15"N	14°42'58"E
Biviere di Cesarò	BIV-S3	37°57'17"N	14°42'40"E
Biviere di Cesarò	BIV-ST	37°57'09"N	14°42'51"E

Nelle figure 7 e 8 sono riportate le stazioni di campionamento rispettivamente per il Lago Maulazzo e il Biviere di Cesarò, evidenziando in blu i punti di prelievo di acqua e in arancione i punti per il prelievo dei sedimenti.

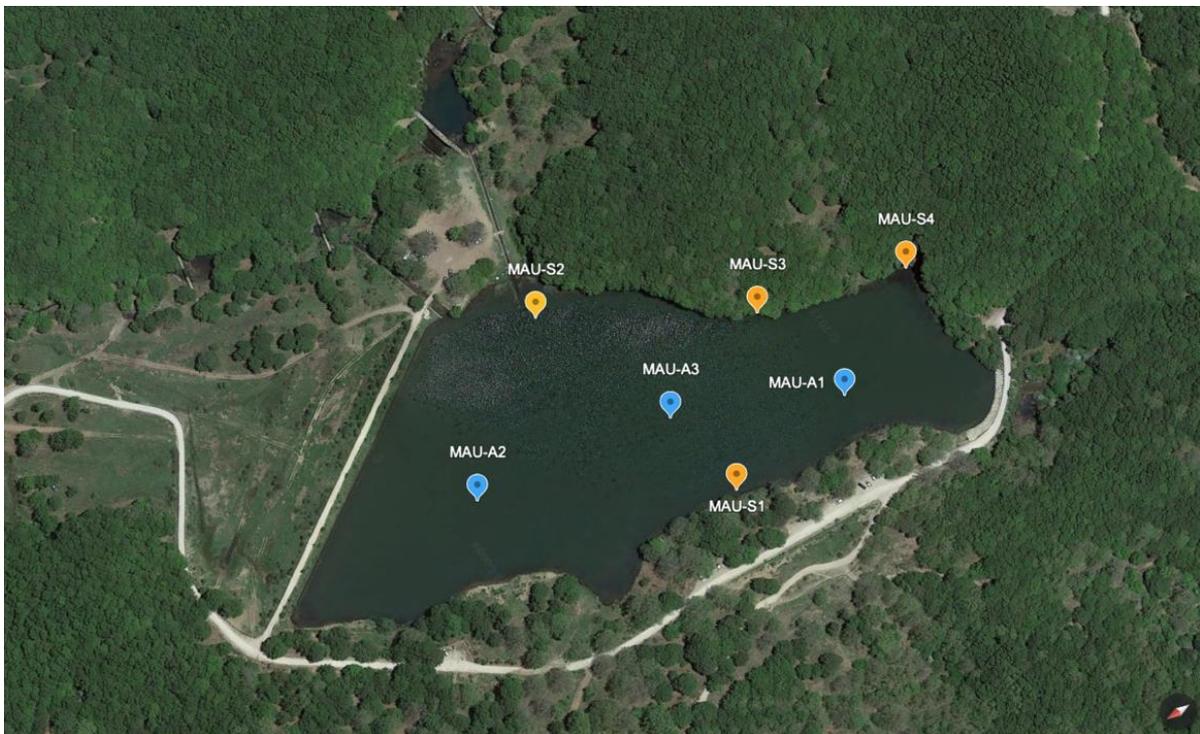


Figura 7 Immagine satellitare dei punti di campionamento Lago Maulazzo, in giallo punti di prelievo di sedimenti e in blu le stazioni di campionamento dell'acqua



Figura 8 Immagine satellitare dei punti di campionamento Biviere di Cesarò in giallo punti di prelievo di sedimento e in blu le stazioni di campionamento dell'acqua

2.2 Tecniche di campionamento

Le attività di campionamento relative a tale progetto sono state effettuate previa comunicazione e autorizzazione dell'ente Parco dei Nebrodi.

2.2.1 Campionamento per lo studio del DNA ambientale

Nell'ambito degli interventi per il rilevamento di DNA ambientale negli ambienti acquatici, risulta di basilare importanza osservare delle modalità d'azione atte a prevenire possibili fonti di contaminazione, tra cui: l'utilizzo di materiali monouso che non siano stati in contatto con DNA ad alta concentrazione, come ambienti e strumenti di laboratorio post-PCR; l'utilizzo di strumenti di campionamento previa disinfezione con una soluzione di candeggina diluita 1:10 (Goldberg et al., 2015).

I campioni di acqua sono stati prelevati durante la stagione estiva mediante l'ausilio di un kayak (Fig. 9). I campionamenti sono stati effettuati presso le stazioni MAU-A1 MAU-A2 del lago Maulazzo e le stazioni BIV-A1 BIV-A2 nel Biviere di Cesarò. Il campionamento dell'acqua è stato effettuato attraverso l'utilizzo di una bottiglia Niskin, che consente il campionamento verticale dell'acqua alla profondità desiderata. Una volta armata, la bottiglia Niskin è stata fatta scendere alla profondità idonea per il campionamento ed è stato inviato il messaggero, ovvero un contrappeso fatto scorrere lungo il cavo collegato alla bottiglia, il quale - urtando la bottiglia - ha azionato un meccanismo che ha permesso di chiudere i tappi e ottenere il campione di acqua alla profondità richiesta.

Raggiunto il punto di campionamento è stata registrata la posizione mediante un gps e sono iniziate le procedure di prelievo di acqua, sia superficiale che profonda. Dopo il prelievo l'acqua è stata dispensata in contenitori sterili da 1L, ed etichettata indicando il codice della stazione, la batimetria e la data. Prima di iniziare le operazioni, nonché tra un prelievo e l'altro, la bottiglia Niskin è stata sottoposta a lavaggi con candeggina diluita 1:10 e risciacquata con acqua deionizzata, al fine di evitare la contaminazione con altro DNA.

I campioni sono stati conservati a 4°C, trasportati presso il Dipartimento di Scienze Chimiche Biologiche Farmaceutiche ed Ambientali dell'Università degli Studi di Messina (Chibiofaram), e filtrati entro le 24h.

I campioni di sedimento sono stati prelevati in prevalenza nei punti in prossimità dei margini dei due laghi, a una profondità di circa 1m. Il sedimento raccolto mediante l'ausilio di contenitori sterili è

stato etichettato indicando la stazione e la data del prelievo, trasportato presso i laboratori del Dipartimento Chibiofaram e conservato in un freezer a -80°C per essere processato.



Figura 9 Fase di campionamento in kayak presso il Biviere di Cesarò

2.2.2 Prelievo per la analisi chimiche, microbiologiche e per la ricerca di microplastiche

Il campionamento di acqua per le analisi microbiologiche è stato effettuato in due diversi periodi dell'anno, quali dicembre 2022 e giugno 2023. Il prelievo per l'analisi chimica è stato viceversa effettuato nel mese di giugno 2023. Tutti i campionamenti sono stati effettuati mediante l'ausilio di un kayak (Fig. 10). Per ogni punto si è proceduto a registrare i seguenti parametri: Profondità, rilevata per mezzo di una cima metrata; Trasparenza (cm), valutata mediante del disco di Secchi; Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), pH, Ossigeno Disciolto ($\% \text{O}_2$), Potenziale Redox (mV) e Conducibilità ($\mu\text{s}/\text{cm}$), i quali sono stati misurati con una sonda multiparametrica HI9829 (Hanna instruments)



Figura 10 Fase di campionamento in kayak presso il Lago Maulazzo

Le stazioni per il prelievo dei campioni destinati all'analisi chimica sono state scelte sulla base delle linee guida illustrate dal D. lgs. 157/99, che prevede una stazione di campionamento per i corpi idrici inferiore a 80Km² e due stazioni per corpi idrici che presentano una superficie maggiore di 80Km², oppure che presentino una forma irregolare; inoltre, per laghi con una profondità inferiore a 5m sono stati indicati campionamenti di acqua superficiale e profonda.

Per effettuare i campionamenti dell'acqua è stata nuovamente utilizzata una bottiglia Niskin, mediante la procedura di utilizzo illustrata in precedenza. Mediante essa sono state campionate diverse aliquote di acqua superficiale e di acqua profonda; i campioni destinati alle analisi microbiologiche sono stati conservati in bottiglie sterili, stoccati immediatamente a 4 °C e analizzati entro le 24 ore dalla raccolta. L'acqua per le analisi chimiche è stata invece divisa e trattata in diversi contenitori a seconda delle sostanze da analizzare.

Relativamente al campionamento dell'acqua utilizzata per la valutazione dell'inquinamento da microplastiche, sono stati osservati diversi specifici accorgimenti, quali l'utilizzo di attrezzature in vetro e metallo, al fine di ridurre al minimo l'eventualità di contaminazione accidentale dei campioni. I campioni sono stati raccolti in un punto prestabilito per ognuno dei due laghi alle due batimetrie, superficiale e profonda. L'acqua rilevata è stata etichettata indicando la stazione e la data di campionamento, conservata a 4°C e analizzata entro le 48 ore.

Nella tabella 5 sono riportate le stazioni di campionamento dell'acqua e le analisi a cui è stato destinato il campione.

Tabella 5 Stazioni di campionamento e analisi effettuate

Lago	Stazione	Analisi Microbiologica	Analisi Chimica	Ricerca Microplastiche
Lago Maulazzo	MA1	X		
Lago Maulazzo	MA2	X		
Lago Maulazzo	MA3		X	X
Biviere di Cesarò	BA1	X	X	
Biviere di Cesarò	BA2	X	X	X

I campioni di sedimento sono stati prelevati nelle stazioni MAU-S1, MAU-S4, BIV-S3 e BIV-S4, in prossimità dei margini dei due laghi a una profondità di circa 1m. Il sedimento raccolto mediante l'ausilio di contenitori sterili è stato etichettato indicando la stazione e la data del prelievo, e successivamente trasportato presso i laboratori del Dipartimento Chibiofaram e utilizzato per le indagini chimiche.

2.2.3 Campionamento degli organismi

2.2.3.1 Cattura dei Teleostei

I teleostei appartenenti a diverse specie sono stati campionati in due differenti periodi dell'anno, ossia dicembre 2022 e giugno-luglio 2023, mediante l'utilizzo di lenze e ami (questi ultimi privati dell'ardiglione). Nell'ambito di tale tipologia di interventi sono state seguite delle modalità d'azione atte a ridurre al minimo la sofferenza dell'animale. Questa tecnica di pesca è stata considerata - tra le varie possibili - la meno impattante, e dunque preferita all'uso di elettrostorditori o reti. Contestualmente si è proceduto ad effettuare un campionamento di pesci mediante l'ausilio di nasse posizionate sul fondo del lago con all'interno esche attrattive, al fine di riuscire a catturare anche le specie ittiche difficili da prelevare con il metodo sopra citato.

Gli esemplari pescati (Fig. 11) sono stati sacrificati secondo metodo umanitario, ossia tramite eutanasia provocata da un'overdose di MS222 Tricaina Metan-Sulfonato. Dopo conferma dello stato

di morte i teleostei sono stati conservati e trasportati presso la sala necroscopica del Dipartimento Chibiofaram dell'Università degli Studi di Messina.



Figura 11 Esemplare di *C. carpio*

2.2.3.2 Campionamento mediante benna Van Veen

Il censimento della fauna macrozoobentonica è stato eseguito mediante la tecnica della bennata, utilizzando una benna di tipo Van Veen da 5 litri con apertura da 0,053 m². Questo tipo di benna ha consentito di prelevare un campione superficiale, approssimativamente relativo ai primi 5-10 cm di spessore. La benna impiegata presenta un sistema di apertura a sportello che permette il prelievo del sedimento prima dell'estrusione dalla benna stessa.

Per le analisi del macrozoobenthos sono stati prelevati 8 campioni di fondo mobile (due repliche di campionamento per ogni stazione di prelievo). Una volta posizionato il kayak nel punto di campionamento, sono state registrate le condizioni meteorologiche, la trasparenza dell'acqua e la presenza di eventuali ostruzioni superficiali che potessero in qualche misura influire negativamente sull'esito delle operazioni.

Successivamente alla raccolta, ogni campione è stato conservato in contenitori etichettati indicando la data, la stazione di prelievo e la replica. Il sedimento è stato setacciato su setacci con maglie di 0,5 mm di diametro e lavato per la separazione degli organismi. Questi ultimi sono stati trasferiti in appositi contenitori e fissati. Per fissare i campioni *in situ* è stata utilizzata una soluzione a base di etanolo al 70% e, come previsto dalle schede metodologiche dei programmi di monitoraggio della Strategia Marittima (art. 11, D.Lgs. 190/2010), sono stati aggiunti i seguenti additivi: fenossietanolo propilenico e glicerolo propilenico (al 3%). L'alcol etilico risulta ampiamente riconosciuto come una

valida alternativa alla formaldeide, in ragione dei tempi di ritenzione brevi stabiliti dagli standard di riferimento ISO per le indagini tassonomiche.

Oltre alle questioni inerenti alla tutela dell'ambiente e della salute degli operatori, l'impiego di alcol etilico presenta una sostenibilità etica maggiore rispetto a quello della formaldeide, in quanto provoca un effetto anestetico sugli animali. L'utilizzo di alcol, nonché la definizione del suo volume percentuale, è stato dunque opportunamente calibrato al fine di massimizzare l'efficienza e ridurre al minimo la sofferenza degli animali. I campioni così fissati sono stati conservati in un ambiente buio fino alla consegna in laboratorio – avvenuta entro le 12 ore - per la successiva determinazione tassonomica degli organismi presenti. Tali rilievi di campionamento sono stati processati entro 240 ore (10 giorni) dal ricevimento.

Per quanto concerne la metodologia di campionamento e i metodi analitici applicati, si è fatto riferimento alla normativa vigente, al Manuale APAT 46/2007, ai manuali ISPRA e ICRAM, e alle indicazioni del Ministero della Transizione Ecologica.

2.2.3.3 Prelievo mediante retino

Un'ulteriore tipologia di campionamento adottata prevede la ricerca e il prelievo di macroinvertebrati mediante l'utilizzo di un retino immanicato. Questo modello di retino viene utilizzato nel caso di *habitat* caratterizzati da profondità inferiori a 1-0,5 m, con substrati costituiti da fondo duro quali roccia, massi, ciottoli, ghiaia e cemento, nonché nel caso di fondali in cui la presenza di fango e la copertura di macrofite risultino preponderanti (Frost et al. 1971; Storey et al. 1991).

Il retino in oggetto è costituito da una struttura metallica a semicerchio, con un bordo inferiore piatto che consente il contatto con il substrato. Alla rete è fissato un contenitore forato con maglie delle stesse dimensioni della rete, quale strumento utile per campionare gli organismi.

Le dimensioni corrispondono ad un'imboccatura di 25 x 22 cm. La rete connessa al telaio, con maglie di 250 µm e profondità di 60 cm, rappresenta la componente cruciale dell'attrezzo.

Il processo di campionamento mediante retino immanicato è avvenuto smuovendo il fondo attraverso l'utilizzo di piedi (kick sampling) e mani, mentre il manico è stato mantenuto in posizione verticale. Il substrato è stato valutato in entrambe le direzioni, incluso quello ricompreso tra le grandi pietre e all'interno della vegetazione. Gli organismi rimasti intrappolati all'interno sono stati prelevati manualmente e aggiunti al campione. Tra una stazione di raccolta e l'altra, la rete è stata

lavata accuratamente, sciacquata abbondantemente ed esaminata con attenzione per evitare possibili contaminazioni dei campioni successivi.

Per questa indagine sono state effettuate attività di campionamento - di artropodi terrestri - lungo le sponde del lago mediante un retino.

Una volta prelevati, i campioni sono stati adeguatamente fissati nel luogo di campionamento utilizzando una soluzione composta da etanolo al 70%, al quale sono state aggiunte proporzioni di fenossietanolo propilenico e glicerolo propilenico al 3%. I campioni così fissati sono stati conservati in un ambiente buio fino alla consegna al laboratorio per la successiva determinazione tassonomica degli organismi presenti. I contenitori utilizzati per la conservazione dei campioni sono stati etichettati come descritto nel paragrafo precedente, trasportati presso i laboratori dell'Università di Messina entro le 12 ore dalla raccolta, e sottoposti a processi di analisi entro 240 ore (10 giorni) dal momento della ricezione.

2.2.3.4 Campionamento dello zooplancton

Al fine di indagare la presenza di organismi zooplanctonici che popolano la colonna d'acqua sono state effettuate attività di prelievo presso i due laghi presi in esame. Questa tipologia di indagine è stata eseguita mediante l'utilizzo di una rete WP2 con una larghezza di maglia di 200 μm , e un diametro dell'apertura di 45 cm. All'estremità della rete è stata fissata una coppa di raccolta che permette il prelievo degli organismi catturati durante le fasi di campionamento.

Con l'obiettivo di garantire un processo sicuro ed efficace, è stato effettuato un controllo preventivo di sicurezza e di funzionamento delle attrezzature e dei materiali utilizzati. Una volta posizionato il kayak nel punto di campionamento, sono state infatti verificate le condizioni meteorologiche, la trasparenza dell'acqua e la presenza di possibili ostacoli superficiali che potessero in qualche misura interferire con le operazioni di campionamento.

L'attività di campionamento nei due laghi è stata effettuata seguendo il transetto prestabilito.

Una volta completato il filtraggio lungo il transetto, la coppa di raccolta è stata svuotata e gli organismi di zooplancton così campionati sono stati conservati in contenitori appositamente etichettati, riempiti con una soluzione composta da etanolo al 70%, alla quale sono state aggiunte proporzioni di fenossietanolo propilenico e glicerolo propilenico al 3%. Le etichette contenevano tutte le informazioni necessarie per una corretta identificazione del campione, come la data e il luogo di campionamento, nonché altre informazioni rilevanti per il contesto dello studio.

2.2.4 Visual census

Il "visual census," o censimento visivo, è una tecnica utilizzata per ricavare dati sulle popolazioni di organismi in un determinato ambiente. Questa tecnica consiste nell'osservazione diretta, in un'area specifica, di organismi acquatici e non, al fine di valutarne la composizione, l'abbondanza e la distribuzione. L'efficacia di questa tecnica nel contesto degli ambienti acquatici è fortemente influenzata dalle condizioni ambientali, in quanto la trasparenza dell'acqua assume un rilievo fondamentale.

La metodologia in questione è stata adottata nel lago Maulazzo e nel Biviere di Cesarò (Fig. 12), ed il censimento visivo della fauna è stato effettuato mediante l'ausilio di un kayak, percorrendo i transetti designati lungo tutto lago. L'operatore ha registrato le specie osservate, il numero di individui e l'area geografica.



Figura 12 Avannotti di A. melas avvistati presso il Biviere di Cesarò

Capitolo 3 STUDIO DELLA BIODIVERSITÀ DELLE ACQUE INTERNE

3.1. Introduzione

Lo studio della biodiversità costituisce un imprescindibile elemento preliminare rispetto alla definizione di politiche ed interventi orientati alla gestione e alla conservazione delle risorse naturali e degli ecosistemi.

I dati analitici ottenuti dallo studio della biodiversità e delle risorse naturali (biologiche minerali ed energetiche), così come la valutazione delle loro alterazioni – quali ad esempio quelle causate dai cambiamenti climatici in atto – risultano infatti di notevole importanza per la realizzazione di interventi di salvaguardia dei diversi *habitat* (Danielsen et al., 2005, 2003; Teder et al., 2007).

Poiché la biodiversità rappresenta un'importante riserva di risorse e costituisce un rilevante fattore di resilienza degli ecosistemi, in particolare rispetto all'impatto negativo del *climate change*, l'analisi della sua riduzione nell'ambito di differenti archi temporali costituisce uno strumento fondamentale per definire lo stato di salute di un determinato ambiente (Stork et al., 1996; Vreugdenhil et al., 2003).

Tale studio può essere condotto utilizzando diversi approcci, quali: il monitoraggio scientifico (Elzinga et al., 2001); il monitoraggio governativo da parte di ranger o funzionari (Gray and Kalpers 2005); il monitoraggio comunitario (Danielsen et al. 2000, 2005).

Di norma, il monitoraggio scientifico della diversità biologica è condotto attraverso l'analisi di specie e popolazioni che vengono selezionate in base all'interesse, e al fine di ottenere informazioni sullo stato di salute di uno specifico ecosistema. Questa analisi si sviluppa attraverso un'attenta e minuziosa progettazione del campionamento con repliche, set di controllo e sviluppo di indicatori, nonché con tecniche avanzate di *data analysis*, compresa l'applicazione di indici di diversità delle specie. Da ciò scaturisce lo sviluppo di un piano programmatico da eseguire (Feinsinger, 2001; Katzner et al., 2007; Kéry and Schmid, 2004; McGeoch et al., 2006).

Uno dei principali obiettivi dello studio della diversità biologica è costituito dalla valutazione della presenza di specie alloctone, e della loro eventuale capacità di invasione, insediamento e distribuzione. Tale parametro, infatti, rappresenta una delle principali cause di alterazione nell'ecosistema.

Nel presente capitolo si fa riferimento a due diversi approcci analitici che sono stati seguiti nel corso della ricerca in oggetto.

Il primo è quello basato sull'analisi del DNA ambientale di acqua e sedimento, nell'ambito del quale sono stati oggetto di studio sia gli organismi procarioti che quelli eucarioti. La seconda metodica di analisi è stata condotta mediante tecniche tradizionali, ovvero attraverso l'identificazione morfologica a livello tassonomico e la stesura di una lista delle specie campionate, eseguite in seguito alla cattura degli organismi.

Da considerare come, negli ultimi decenni, lo studio della biodiversità è stato prevalentemente condotto attraverso metodiche molecolari.

Il DNA ambientale, noto come "eDNA", dall'espressione inglese "environmental DNA", è il DNA prelevato da un campione ambientale (acqua, suolo, aria) senza che prima sia stato effettuato alcun isolamento di organismi bersaglio (Taberlet et al., 2012).

Il termine "DNA ambientale", in particolare, si riferisce a una complessa miscela di frammenti di molecole di DNA presenti in varie tipologie di campioni ambientali, come acqua, aria e suolo. Tale DNA proviene da diversi di organismi che rilasciano DNA nell'ambiente e/o dai loro processi di decadimento (Taberlet et al., 2012). Nello specifico, il DNA ambientale può comprendere il DNA cellulare proveniente da cellule o organismi viventi, nonché il DNA extracellulare derivato dalla morte naturale delle cellule e dalla conseguente disgregazione delle strutture cellulari (Levy-Booth et al., 2007; Pietramellara et al., 2009).

Il DNA ambientale va solitamente incontro a fenomeni di degradazione, sebbene i frammenti che derivano da tali processi possano permanere nell'ambiente. Conseguentemente, l'analisi di questi rende possibile la determinazione dell'insieme di specie che popolano una certa area (Mandrioli, 2017).

La degradazione del DNA rilasciato nell'ambiente dagli organismi è un processo che spesso avviene molto rapidamente (Thomsen et al., 2012) ed è influenzato da forze meccaniche, attività microbiche e reazioni chimiche spontanee (Lindahl, 1993; Nielsen et al., 2007).

L'analisi e il sequenziamento del DNA ambientale, tramite l'impiego di tecniche avanzate di sequenziamento di seconda generazione, è un approccio efficace e rapido per rilevare simultaneamente diverse specie negli ecosistemi naturali e per stimarne l'abbondanza (Creer et al., 2016).

Le procedure di analisi del DNA ambientale includono una fase di campionamento seguita dall'estrazione del DNA. Il DNA estratto viene successivamente amplificato attraverso la PCR, e

purificato e sottoposto a sequenziamento mediante moderne metodologie di Next Generation Sequencing (NGS).

Il punto di forza di questa metodologia risiede nella possibilità di analizzare contemporaneamente il DNA proveniente da varie specie e organismi diversi, riducendo i tempi e i costi necessari per le procedure di campionamento e le analisi. Inoltre, questa metodologia rende possibile l'individuazione delle specie rare e di microrganismi non coltivabili (Mandrioli, 2017), (Mathon et al., 2021).

Tale approccio, inoltre, permette di ottenere dati analitici precisi e di ridurre notevolmente i costi delle indagini ecologiche classiche (Mandrioli, 2017).

Tuttavia, nonostante l'interesse significativo verso questa tecnica, l'utilizzo del DNA ambientale presenta una serie di limitazioni (Barnes and Turner, 2015).

L'analisi del DNA ambientale nell'ambito degli ambienti acquatici, ad esempio, non offre sempre informazioni relativamente alla presenza delle specie individuate, in quanto il DNA può essere trasportato lungo i corsi d'acqua dalle correnti (Barnes and Turner, 2015) e dunque decontestualizzato in modo tale da rendere necessaria l'integrazione con altre informazioni (ad esempio, rilevamenti passati inequivocabili della specie) al fine di ottenere conclusioni ecologiche coerenti, come evidenziato da Karahan e colleghi (2017) e Aglieri e colleghi (2021).

Un'ulteriore importante criticità propria di questa metodologia è che il DNA ambientale è spesso degradato e scarsamente concentrato. Pertanto, la sua analisi richiede l'ottimizzazione di protocolli specifici per i diversi ambienti e la scelta di regioni bersaglio di piccole dimensioni, preferibilmente conservate, per agevolare l'amplificazione simultanea di diverse specie attraverso l'uso di primer universali (Taberlet et al., 2018).

Il DNA ambientale in acqua è di norma presente in concentrazioni basse (<200 pg/L) e può essere distribuito in modo non omogeneo (Pilliod et al., 2013; Takahara et al., 2012). Pertanto, l'estrazione di DNA ambientale da campioni di acqua dipende dall'efficacia dei metodi di campionamento, dalla metodica di estrazione utilizzata e dalla precisione delle analisi successive a queste fasi (Goldberg, et al. 2015). Oltre a questi fattori, l'eDNA prevede la creazione un *database* di riferimento adeguato, costruito in funzione dello studio condotto (Taberlet et al., 2018). Tuttavia, nonostante tali criticità, il DNA ambientale risulta essere la più efficace tecnica di analisi per l'identificazione delle di specie ittiche e il monitoraggio della biodiversità (Aglieri et al. 2021).

L' eDNA può essere inoltre utilizzato per l'identificazione di specie specifiche, per la rilevazione di tutti i taxa compresi in un gruppo definito e per l'approfondimento delle caratteristiche funzionali dei genomi (Simon and Daniel, 2011).

Sebbene lo studio dell'eDNA risulti ad oggi un approccio analitico utile ai fini del biomonitoraggio, non esiste ancora una standardizzazione dell'analisi ecologica, soprattutto nell'ambito dell'ambiente acquatico (Aglieri et al. 2021). Tra gli studi applicativi del eDNA più promettenti figurano quelli finalizzati all'identificazione delle singole specie presenti in un dato ambiente (Doi et al., 2017), ma anche quelli che permettono la valutazione della taglia di una popolazione (Takahara et al., 2012) e l'analisi genetica delle popolazioni stesse (Barnes and Turner, 2015). La determinazione della presenza di specie che possono essere invasive e che dunque rappresentano una minaccia per l'ecosistema, è fondamentale per una tempestiva gestione dell'“invasione” (Lodge et al., 2006) e per il ripristino dell'ecosistema stesso.

Sebbene, l'applicazione principale dell'eDNA consista nella stima della presenza o dell'assenza delle diverse specie - elemento fondamentale per lo studio della distribuzione delle stesse - diversi studi condotti in precedenza hanno rilevato una correlazione statisticamente significativa tra la concentrazione di eDNA, il numero di individui e la biomassa di quella specie.

La possibilità di stimare la biomassa degli organismi acquatici dalla misurazione delle copie di eDNA è possibile in quanto i vertebrati acquatici rilasciano un quantitativo di eDNA nell'acqua (attraverso feci, secrezioni o tessuti) che è direttamente proporzionale alla loro biomassa (Takahara et al. 2012). Tuttavia, la stima della biomassa risulta spesso un'operazione complessa, soprattutto per gli organismi acquatici come i pesci (Begon and Townsend, 2020). In essi, infatti, l'intera superficie del corpo è in contatto diretto con l'ambiente esterno, il DNA è rilasciato nell'ambiente (Hansen et al., 2018) ed il loro tasso metabolico risulta essere proporzionale alla loro massa. Ne consegue che, in relazione esclusivamente alla massa, gli organismi più piccoli avranno un tasso metabolico maggiore rispetto a quelli più grandi, (Maruyama et al., 2014), e questo si traduce in una maggiore quantità di DNA rilasciata nell'acqua. Tuttavia, per alcune specie di pesci, soprattutto negli stadi giovanili e larvali, la correlazione tra taglia e tasso metabolico è indipendente dalla massa, e ciò rappresenta una criticità per la quantificazione della relazione tra scarto metabolico (incluso l'eDNA) e il numero degli individui o la taglia dei pesci (Post and Lee 1996).

Risulta pertanto difficile stabilire una precisa relazione, sia spaziale che temporale, tra il DNA individuato in ambienti acquatici e i dati di monitoraggio qualitativi/quantitativi, senza considerare

gli effetti ambientali nella produzione, nella persistenza e nel trasporto del DNA (Sassoubre et al. 2016).

Sebbene la maggior parte del DNA contenuto in un campione ambientale derivi dal luogo stesso in cui il campione è stato raccolto, esiste la possibilità che il DNA venga trasportato da siti vicini attraverso la dispersione attiva o passiva di organismi, oppure tramite il trasporto passivo di DNA extracellulare nell'acqua, in virtù dei molteplici movimenti della stessa. Molteplici studi hanno dimostrato che l'eDNA dei pesci e degli invertebrati può essere rilevato in campioni d'acqua o sedimenti raccolti anche a decine di chilometri dalla fonte di origine, a causa dell'immissione dei fiumi nello specchio d'acqua (Deiner and Altermatt, 2014; Jane et al., 2015).

In tale contesto, inoltre, risultano notevolmente rilevanti gli effetti dell'ambiente sulla produzione, la persistenza e il trasporto dell'eDNA. Dunque, alla luce di tutti questi fattori, è complesso stabilire relazioni temporali e spaziali affidabili tra l'individuazione del DNA e i relativi dati qualitativi e quantitativi di riferimento (Sassoubre et al., 2016). Ad esempio, variazioni nei livelli di ossigeno nell'acqua (Herbert and Steffensen, 2005) o nelle temperature (Schurmann and Steffensen, 1997) rappresentano fattori che possono indurre cambiamenti fisiologici e influenzare il rilascio e/o la degradazione di DNA nell'ambiente (Hansen et al. 2018).

Pertanto, pur tenendo conto di quanto finora evidenziato, l'analisi del DNA ambientale di acqua e sedimento rappresenta uno strumento senz'altro utile per il monitoraggio delle specie aliene, e si rivela quindi fondamentale ai fini della gestione e protezione della biodiversità, nonché per la salvaguardia degli ecosistemi, *habitat*, specie e geni.

Le specie aliene, che possono rivelarsi invasive, sono organismi vegetali o animali che sono stati introdotti dall'uomo, sia accidentalmente che intenzionalmente, in ambienti e in luoghi in cui normalmente non sono presenti (Early et al., 2016). Le specie aliene hanno spesso un impatto negativo sulla biodiversità del nuovo *habitat*, che mette a rischio le specie autoctone e causa notevoli danni ambientali ed economici. La loro diffusione può essere favorita dai meccanismi dell'evoluzione biologica, che possono in qualche modo essere alterati dall'intervento umano (Early et al. 2016).

Di norma, le specie si espandono naturalmente nella loro area di distribuzione, ma spesso questa espansione è ostacolata da barriere ambientali come montagne, mari o dalla presenza di concorrenti e predatori. Tuttavia, l'attività umana può eliminare queste barriere in modo volontario o involontario, offrendo a queste specie nuovi territori ricchi di risorse alimentari e privi di concorrenti e predatori, che ne rendono possibile la rapida e incontrastata espansione (Early et al. 2016).

Considerando il crescente numero di specie invasive rilevate negli ultimi decenni, è divenuta essenziale la costante programmazione e attuazione di attività di monitoraggio e studio della biodiversità. Sebbene le tradizionali metodologie di campionamento ed analisi non sempre rendano possibile la rilevazione delle specie invasive, l'utilizzo dell'eDNA in combinazione con le moderne tecniche di sequenziamento si è dimostrato funzionale a tale scopo (Hatzenbuehler et al., 2017).

Un esempio efficace di utilizzo del eDNA per il monitoraggio del possibile insediamento di specie invasive è stato recentemente pubblicato da Schneider et al. (2016). In questo studio è stato documentato l'utilizzo dell'eDNA per l'identificazione – accurata e sensibile - di diverse tipologie di zanzare negli specchi d'acqua presi in esame.

In un periodo in cui l'attività di ricerca condotta sul campo dagli entomologi registra una contrazione evidente, l'uso di strumenti molecolari come l'analisi del DNA ambientale può rappresentare un rilevante ausilio, in quanto questa tecnica permette di segnalare rapidamente nuove specie e di processare un gran numero di campioni, anche in aree in cui non esistono programmi specifici di monitoraggio. Questa metodologia può dunque efficacemente contribuire al complesso processo di ricerca delle specie invasive (Mandrioli, 2017), sebbene la validità di tale approccio risulti fortemente influenzata dalla stesura di piano di campionamento adeguato. Nella fattispecie, per quanto riguarda il DNA ambientale non esiste un approccio universale e la strategia di campionamento deve essere adattata in base al tipo di ambiente oggetto dello studio. Inoltre, la raccolta dei campioni deve essere pianificata con l'obiettivo di consentire confronti significativi. Se l'obiettivo della ricerca implica una variabile temporale, è fondamentale prelevare i campioni in momenti diversi nello stesso anno o nello stesso periodo stagionale per anni differenti. Se invece l'obiettivo è la valutazione della variazione del DNA ambientale in diverse aree, è fondamentale la scelta e la selezione dei siti di campionamento.

Nell'attività di ricerca oggetto del presente elaborato è stato condotto uno studio del DNA ambientale mediante un approccio basato sulla definizione di gruppi tassonomici.

3.2 Materiali e Metodi

3.2.1 Studio sul DNA ambientale

3.2.1.1 Fase di filtrazione

1L di acqua per ogni campione destinato allo studio del DNA ambientale è stato filtrato entro le 24 ore dal campionamento. La filtrazione è stata effettuata utilizzando un filtro di acetato di cellulosa (SartoriusTM) con maglia 0.45 μm e con diametro di 47 mm. Per ogni campionamento e per ogni sito sono stati prodotti anche dei bianchi di filtrazione, ovvero dei filtri nei quali è stata filtrata solo acqua deionizzata sterile. I filtri sono stati successivamente conservati al buio in piastre Petri sterili, in un freezer a -80°C . In tabella 6 viene indicato il numero di campioni filtrati

Tabella 6 Stazioni di campionamento, profondità e codice del filtro

Lago	Stazione	Profondità	Filtro
Lago Maulazzo	MAU-A1	0m	MA1-S
Lago Maulazzo	MAU-A1	4m	MA1-F
Lago Maulazzo	MAU-A2	0m	MA2-S
Lago Maulazzo	MAU-A2	4m	MA2-F
Biviere di Cesarò	BIV-A1	0	BA1-S
Biviere di Cesarò	BIV-A1	3	BA1-F
Biviere di Cesarò	BIV-A2	0	BA2-S
Biviere di Cesarò	BIV-A2	3	BA2-F

3.2.1.2 Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto da 8 filtri mediante l'utilizzo del DNeasy PowerWater Kit (Quiagen), introducendo alcune modifiche al procedimento standard. Ogni filtro è stato suddiviso in piccoli frammenti mediante forbici sterili, i quali sono stati in seguito inseriti nei tubi contenenti le microbiglie fornite dal kit. Successivamente sono state seguite le indicazioni del protocollo fino al punto 15. Nella fase rappresentata dal punto 15 del protocollo, per ogni stazione sono stati combinati i prodotti derivanti dalle fasi di estrazioni dei campioni - di superficie e di fondo - in una singola MB Spin Column, al fine di ottenere un risultato omogeneo rappresentativo delle singole stazioni. In seguito a questa modifica si è proseguito riprendendo le indicazioni del protocollo fino

alla fase di eluizione, che è stata viceversa condotta con un volume di 100µl, al fine di concentrare il campione. Per la fase di lisi ci si è avvalsi dell'uso di un agitatore orizzontale (Eppendorf), mentre le fasi che richiedono centrifugazione sono state eseguite mediante una centrifuga 5804 R (Eppendorf). Per la fase di estrazione del DNA genomico dai campioni di sedimento è stato utilizzato il DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen). Il sedimento utilizzato per le estrazioni del DNA genomico rilevava un peso compreso tra i 250 e i 600 mg, come indicato dal kit. Sono state seguite le istruzioni standard riportate nel protocollo, ad eccezione dell'eluizione che è stata condotta utilizzando un volume di 100µl al fine di concentrare ulteriormente il campione.

Durante ogni estrazione sono stati sempre inclusi due bianchi di estrazione, corrispondenti a campioni processati nello stesso modo. L'esito dell'estrazione è stato valutato attraverso la quantificazione utilizzando un Implen N50 NanoPhotometer (Westlake Village, USA). Gli estratti ottenuti sono stati successivamente conservati a una temperatura di -20°C fino al momento dell'analisi.

Nei campioni di DNA estratti dai filtri, la concentrazione di DNA prevista è risultata relativamente bassa. Al fine di prevenire la possibile contaminazione dei campioni con il DNA di altre specie analizzate in laboratorio, tutte le estrazioni sono state condotte in una stanza separata dal laboratorio principale. Tale stanza è stata destinata esclusivamente all'estrazione di campioni per l'analisi dell'eDNA.

Durante le operazioni sono stati utilizzati camici, guanti e mascherine chirurgiche per garantire la massima precauzione. Prima dell'inizio e dopo la conclusione di ciascuna giornata di lavoro, la stanza è stata accuratamente pulita con una soluzione di candeggina diluita 1:10 e carta pulita. L'attività di disinfezione ha riguardato anche i mobili di arredo presenti nella stanza, come armadi e sedie. La stessa completa procedura di pulizia è stata ripetuta anche tra un'estrazione e l'altra.

Contestualmente sono stati trattati con candeggina tutti gli strumenti utilizzati per l'estrazione, come il termomixer, la centrifuga e le pipette. Gli strumenti mobili quali forbici, pinze e rack sono stati lasciati sotto una cappa a raggi UV per almeno 30 minuti prima di ogni estrazione. Durante tutto il corso degli esperimenti sono stati utilizzati esclusivamente puntali sterili dotati di filtro.

3.2.1.3 Amplificazione della regione COI

Per l'analisi del DNA ambientale è stata selezionata l'amplificazione di una breve sezione del gene mitocondriale citocromo ossidasi subunità I (COI), che costituisce un sistema bioidentificativo utile

al riconoscimento tassonomico di tutte le specie animali. Più precisamente, per l'amplificazione degli estratti è stata impiegata una coppia di primer - BF2 e BR2 - appositamente progettata da Elbrecht and Leese (2017) per permettere l'identificazione degli organismi invertebrati e vertebrati delle acque interne.

La regione COI è stata amplificata in una reazione di PCR utilizzando il kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega Madison, Wisconsin, USA). Il mix della reazione era composto da: 12,5µL di Taq; 1µL di ciascun primer, 10µM (Eurofins); 50 ng di DNA; H₂O per un volume totale di 25µL. Il programma di PCR indicato, realizzato con un termociclatore QIAamplifier 96 (Qiagen), prevedeva una fase iniziale di attivazione della polimerasi a 94°C per 180 s, 35 cicli di denaturazione a 94°C per 30 s, annealing a 50°C per 30 s ed estensione a 65°C per 150 s, e una fase finale a 65°C per 5 min che consentiva l'appaiamento dei due filamenti di DNA. Il set di primer usati BF1 e BR1, progettato da Elbrecht e Leese (2017) con un'alta degenerazione di basi, è stato modificato aggiungendo una determinata sequenza di adattatori (Tab. 7). I primer modificati sono stati forniti dalla ditta Eurofins Genomics Europe (Kostanz, Germania).

Tabella 7 Nomi dei primer, regione amplificata, sequenze dei primer e sequenze degli adaptor

Primer	Regione target	Sequenza 5'-3'
BF2 (Foward)	COI	GCHCCHGAYATRGCHTTYCC
BR2 (Reverse)	COI	TCDGGRTGNCCRAARAAYCA
Adaptor	Sequenza 5'-3'	
Foward	ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCT	
Reverse	GACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT	

L'amplificato della PCR è stato valutato su 5µL di prodotto amplificato, effettuando elettroforesi su gel di agarosio al 2% (w/v); la concentrazione e la purezza sono state verificate con un Implen N50 NanoPhotometer (Westlake Village, USA).

La fase di purificazione è stata eseguita al fine di rimuovere dalla soluzione contenente il frammento amplificato eventuali altre molecole che avrebbero potuto interferire con il processo di sequenziamento, come residui del GoTaq® Colorless Master Mix (Promega) e vari buffer di amplificazione. Per questa operazione è stato utilizzato il QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), seguendo il protocollo fornito dal produttore. Il prodotto purificato è stato quindi analizzato

mediante elettroforesi su gel al 2% utilizzando un transilluminatore per verificare il successo della purificazione.

I campioni purificati sono stati quantificati utilizzando l'Implen N50 NanoPhotometer (Westlake Village, USA), e gli ampliconi purificati sono stati inviati a Eurofins Genomics Europe (Kostanz, Germania).

Gli ampliconi di dimensioni comprese tra 421 e 428 paia di basi sono stati sottoposti a una seconda fase di PCR in cui sono stati introdotti gli adattatori di sequenziamento indicizzati, necessari per la separazione dei campioni e per il sequenziamento in pool. Il sequenziamento è stato eseguito su Illumina MiSeq (modalità PE300). Per ogni amplicone, Eurofins Genomics ha garantito 60.000 letture.

L'analisi bioinformatica dei dati ha garantito l'assegnazione tassonomica e la stima dell'abbondanza di letture per tutte le OTU rilevate fino al livello di specie.

3.2.1.4 Amplificazione del gene 16s RNA e analisi bioinformatica

Per la ricerca e la caratterizzazione del microbioma in campioni di acqua e sedimento è stata utilizzata la regione 16s ribosomiale RNA.

Gli ampliconi sono stati preparati e sequenziati da Eurofins Genomics (Constance, Germany) INVIEW Microbiome product (Next Generation Sequencing - Powered by Innovation & Expertise (eurofinsgenomics.eu)). Questo servizio ha incluso l'amplificazione per il gene 16S rRNA e, in particolare, la regione V1-V3, utilizzando il seguente set di primer fwd: AGAGTTTGATCATGGCTCAG e rev: GTATTACCGCGGCTGCTG (Leser et al., 2002; Weisburg et al., 1991); il multiplexing con doppi indici unici e il sequenziamento sono stati effettuati con Illumina MiSeq (PE300).

Per ogni amplicone Eurofins Genomics ha garantito 60.000 letture.

L'analisi bioinformatica dei dati ha garantito l'assegnazione tassonomica e la stima dell'abbondanza di letture per tutte le OTU rilevate fino al livello di specie.

3.2.2 Identificazione morfologica degli organismi campionati e analisi dei dati

Successivamente all'arrivo delle specie ittiche campionate in laboratorio si è proceduto con il rilievo delle biometrie - lunghezza e peso - procedendo poi con l'identificazione su base morfologica, utilizzando le linee guida riportate in FishBase (www.fishbase.org).

In particolare, per l'identificazione sono state analizzate e valutate diverse strutture come: forma delle scaglie; numero e forma delle pinne; forma del corpo; colore.

Per quanto riguarda lo studio dei macroinvertebrati, i campioni sono stati trattati in laboratorio secondo la seguente procedura:

- sorting e suddivisione degli organismi per grandi taxa;
- determinazione sistematica fino al più basso livello tassonomico;

Sulla base delle determinazioni tassonomiche effettuate è stata stilata una lista di specie completa. Dopo aver trasferito i campioni nel laboratorio è stato eseguito un primo processo di selezione allo scopo di classificare gli organismi macroinvertebrati in base alle principali categorie tassonomiche. Il campione è stato quindi sottoposto a un processo di lavaggio e selezione all'interno del laboratorio, utilizzando acqua corrente e un setaccio con una maglia di 500µm. Questo passo aveva due obiettivi: recuperare tutto il materiale trattenuto dal setaccio utilizzato sul campo e, allo stesso tempo, rimuovere il sedimento ancora presente. Dopo un accurato lavaggio, il materiale raccolto dal setaccio è stato esaminato in piccole quantità mediante uno stereo-microscopio, utilizzando una capsula di Petri come contenitore. Ciascun organismo o frammento è stato identificato e prelevato con l'ausilio di pinzette, suddiviso nelle diverse categorie tassonomiche (se presenti) e, infine, conservato in una soluzione a base di etanolo al 70% in attesa dell'identificazione sistematica. Durante il processo di identificazione è stato possibile classificare ogni esemplare al livello tassonomico più dettagliato possibile (LPT, ovvero il Lowest Possible Taxon), anche se ciò non sempre coincideva con il livello di specie. Questa differenza è stata determinata principalmente dallo stato di conservazione e dal grado di maturità degli organismi presenti nei campioni. Per alcune specie, quando necessario, è stato utilizzato un microscopio ottico con ingrandimenti di 10x, 20x e 40x. La lista delle specie è stata compilata attraverso un confronto dei risultati ottenuti con quanto riportato nella checklist della fauna acquatica italiana.

Per la determinazione sono state utilizzate le "Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane" (Belfiore 1983; Carchini 1983; Girod, Bianchi, and Mariani 1980; Giusti and Pezzoli 1980; Minelli 1977; Pirisinu 1981; Rivosecchi 1984). La gran parte dei campioni di artropodi è stata identificata grazie alla collaborazione con tassonomi esperti.

Relativamente ai campioni di zooplancton non sono risultate necessarie le operazioni di lavaggio del campione; quindi si è proceduto direttamente esaminando piccole quantità di campione prelevate mediante l'ausilio di pipette e analizzate sotto uno stereo-microscopio, utilizzando piastre Petri come contenitore. Gli organismi sono stati divisi in diverse categorie tassonomiche e conservati in attesa dell'identificazione sistematica.

La valutazione dell'endemismo degli organismi campionati è stata effettuata comparando i risultati ottenuti con la checklist e con la distribuzione della fauna italiana (Ruffo and Stoch, 2005). Per le ricerche sulla corologia delle specie sono stati consultati i due lavori di (Vigna et al., 1999, 1992). L'assemblaggio faunistico, sia in ambiente acquatico che terrestre, è stato analizzato, prendendo in considerazione l'abbondanza della macrofauna (individui/Km²), il numero di taxa (S), l'indice di uniformità di Pielou (J') e l'indice di diversità delle specie di Shannon-Wiener (H'). Questi parametri biologici sono stati calcolati per ogni stazione e per ogni stagione utilizzando PRIMER V.6. Le differenze stagionali e spaziali dei dati di abbondanza sono state testate attraverso l'analisi di Kruskal Wallis (non parametrica), eseguendo un test di Dunn post-hoc nel caso in cui sono emerse differenze significative ($p < 0,05$) (Prism V.8).

3.3 Risultati

3.3.1 DNA ambientale

Di seguito sono riportati i risultati relativi all'analisi di eDNA eseguite sui campioni di acqua e di sedimento. Le analisi del DNA ambientale presente in acqua, relative ai campioni MA1 e MA2 prelevati nelle due stazioni designate per le analisi del lago Maulazzo, hanno evidenziato problematiche inerenti sia al processo di estrazione, in quanto si sono ottenute bassissime concentrazioni di DNA genomico, sia al processo di riamplicazione e di costruzione delle librerie effettuato da Eurofins Genomics (Constance, Germany). Non è stato possibile dunque registrare risultati esaustivi sulla caratterizzazione degli organismi che popola le acque del lago Maulazzo. In figura 13 sono riportati i principali phyla, relativi ai diversi punti di campionamento, registrati mediante l'amplificazione della regione COI. In figura 14 è riportato il grafico, e la legenda, delle specie registrate nelle diverse stazioni di campionamento.

Figura 13 Grafico dei principali phyla registrati con l'amplificazione della regione COI

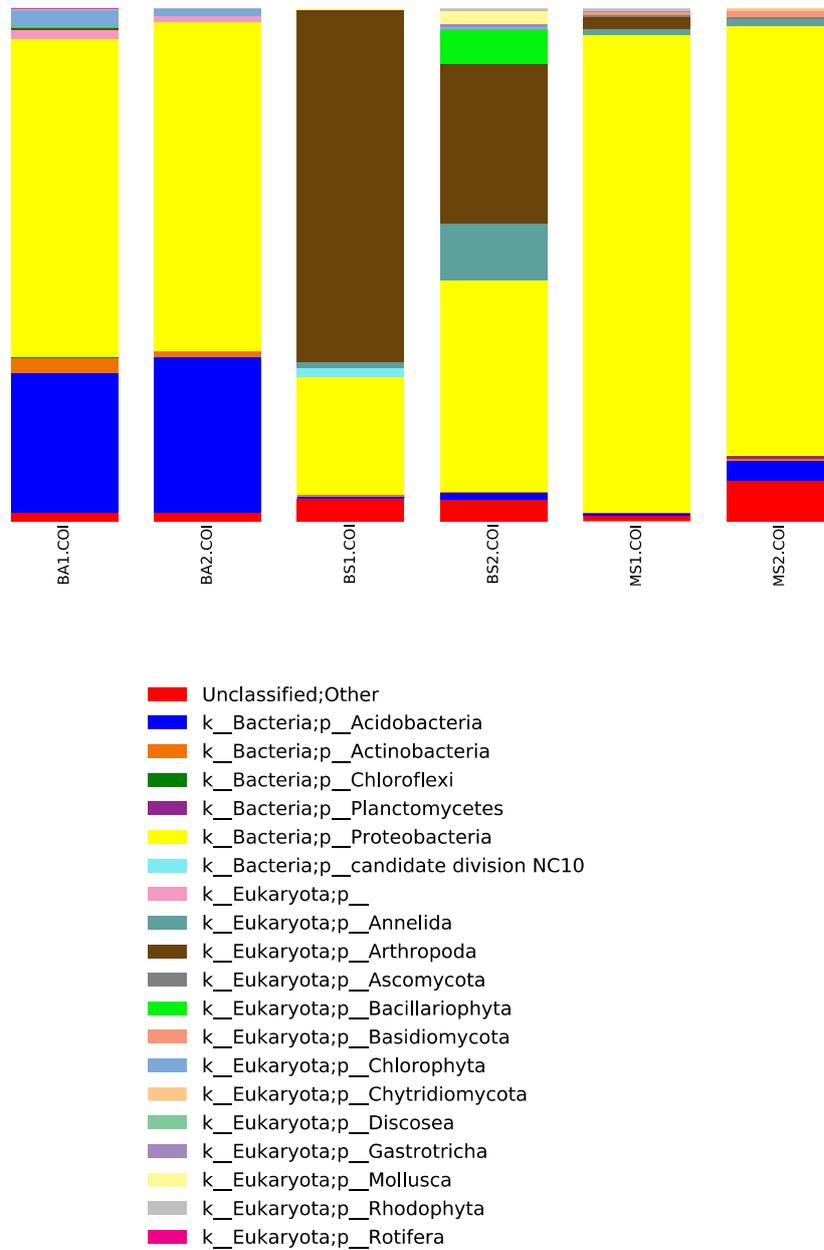
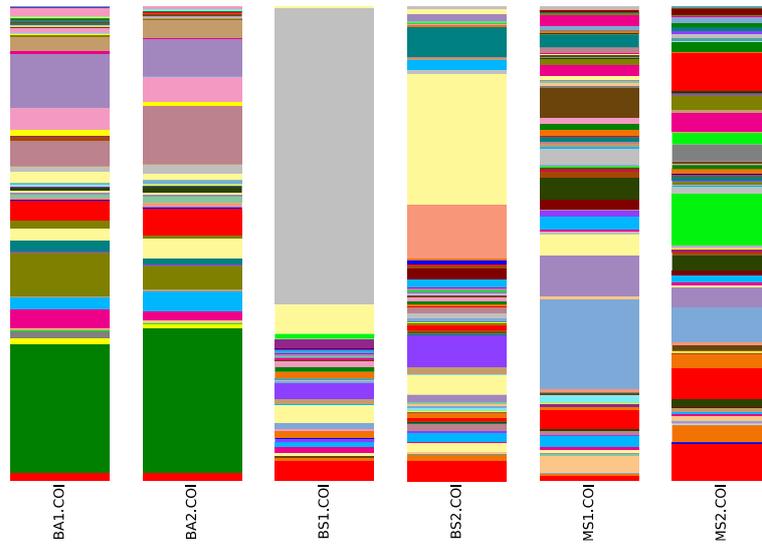


Figura 14 Grafico delle specie registrate con l'amplificazione della regione COI



■ Unclassified;Other;Other;Other;Other;Other;Other
■ k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Acidobacteriia;o_Acidobacteriales;f_Acidobacteriaceae;g_Candidatus Koribacter;s_versatilis
■ k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Acidobacteriia;o_Bryobacteriales;f_Solibacteraceae;g_Candidatus Solibacter;s_usitatus
■ k_Bacteria;p_Acidobacteria;c_Vicinamibacteria;o_f_Vicinamibacteraceae;g_Luteitalea;s_pratensis
■ k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Candidatus Nanopelagiales;f_Candidatus Nanopelagicaceae;g_Candidatus Planktophila;s_lacus
■ k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Candidatus Nanopelagiales;f_Candidatus Nanopelagicaceae;g_Candidatus Planktophila;s_vernalis
■ k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Corynebacteriales;f_Mycobacteriaceae;g_s_
■ k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Corynebacteriales;f_Mycobacteriaceae;g_Mycobacterium;s_sp. WY10
■ k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Corynebacteriales;f_Mycobacteriaceae;g_Mycolicibacterium;s_litorale
■ k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Micrococcales;f_Bogoriellaceae;g_Georgenia;s_sp. ZLJ0423
■ k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Micrococcales;f_Microbacteriaceae;g_Rhodoluna;s_limnophila
■ k_Bacteria;p_Actinobacteria;c_Actinobacteria;o_Streptosporangiales;f_Thermomonosporaceae;g_Actinomadura;s_amylyolytica
■ k_Bacteria;p_Chloroflexi;c_Chloroflexia;o_Chloroflexales;f_Roseiflexaceae;g_Roseiflexus;s_castenholzii
■ k_Bacteria;p_Planctomycetes;c_Planctomycetia;o_Pirellulales;f_Lacipirellulaceae;g_Lacipirellula;s_parvula
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_f_g_s_
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_f_g_Candidatus Puniceispirillum;s_marinum
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_f_g_Micavibrio;s_aeruginosavorus
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_f_g_Phreatobacter;s_cathodiphilus
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_f_g_Phreatobacter;s_sp. NMCR1094
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_f_g_Phreatobacter;s_stygius
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_f_g_Polymorphum;s_gilvum
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Caulobacteriales;f_Caulobacteraceae;g_Caulobacter;s_flavus
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Pelagibacteriales;f_g_Candidatus Fonsibacter;s_ubiquis
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_g_s_
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_g_Methyloceanibacter;s_sp. wino2
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Beijerinckiaceae;g_Methylocella;s_silvestris
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_s_
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Afipia;s_sp. GAS231
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bosea;s_vaviloviae
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_betae
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_erythrophlei
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_oligotrophicum
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_paxllaeri
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_sp.
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_sp. 58S1
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_sp. ORS 285
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_sp. SK17
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_vignae
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Bradyrhizobium;s_zhanjiangensis
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Nitrobacter;s_hamburgensis
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Ollgotropha;s_carboxidovorans
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Rhodopseudomonas;s_palustris
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Tardiphaga;s_
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Bradyrhizobiaceae;g_Variibacter;s_gotjawalensis
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Chelatococcaceae;g_Chelatococcus;s_sp. CO-6
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Cohaesibacteraceae;g_Breoghania;s_sp. L-A4
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Hyphomicrobiaceae;g_Hyphomicrobium;s_sp. MC1
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Hyphomicrobiaceae;g_Hyphomicrobium;s_sp. ghe19
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Hyphomicrobiaceae;g_Rhodoplanes;s_sp. Z2-YC6860
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Hyphomicrobiaceae;g_Youhaiella;s_tibetensis
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Methylocystaceae;g_Methylocystis;s_parvus
■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phyllobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_

■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_ciceri
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_japonicum
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_oceanicum
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_opportunism
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_sp. M2A.F.Ca.ET.046.03.2.1
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_sp. M7A.F.Ce.TU.012.03.2.1
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_sp. M7D.F.Ca.US.005.01.1.1
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_sp. Pch-S
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Mesorhizobium;s_terrae
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Phylobacteriaceae;g_Roseitalea;s_porphyridii
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Rhizobiales;g_Georrhizobium;s_profundi
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Rhodobiaceae;g_Candidatus Phaeomarinobacter;s_ectocarpi
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Rhodobiaceae;g_Parvibaculum;s_lavamentivorans
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Xanthobacteraceae;g_Azorhizobium;s_caulinodans
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Xanthobacteraceae;g_Labrys;s_neptuniae
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhizobiales;f_Xanthobacteraceae;g_Pseudolabrys;s_sp. FHR47
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacterales;f_Hyphomonadaceae;g_Maricaulis;s_maris
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacterales;f_Rhodobacteraceae;g_Brevirhabdus;s_pacifica
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacterales;f_Rhodobacteraceae;g_Confluentimicrobium;s_sp. EMB200-NS6
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacterales;f_Rhodobacteraceae;g_Gemmobacter;s_sp. HYN0069
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacterales;f_Rhodobacteraceae;g_Ketogulonicigenium;s_vulgare
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacterales;f_Rhodobacteraceae;g_Leisingera;s_aquaeimixtae
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacterales;f_Rhodobacteraceae;g_Stappia;s_indica
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodobacterales;f_Rhodobacteraceae;g_Tabrizicola;s_piscis
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Acetobacteraceae;g_Acidibrevibacterium;s_fodinaquatile
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Acetobacteraceae;g_Acidiphilium;s_multivorum
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Acetobacteraceae;g_Granulibacter;s_bethesdensis
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Acetobacteraceae;g_Roseomonas;s_gilardii
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Acetobacteraceae;g_Roseomonas;s_mucosa
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Acetobacteraceae;g_Stella;s_humosa
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Acetobacteraceae;g_Stella;s_vacuolata
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_s_
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Azospirillum;s_humicireducens
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Azospirillum;s_thermophilum
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Azospirillum;s_thiophilum
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Hypericibacter;s_adhaerens
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Hypericibacter;s_terrae
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Indioceanicola;s_profundi
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Nitrospirillum;s_amazonense
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Rhodospirillum;s_centenum
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rhodospirillales;f_Rhodospirillaceae;g_Skermanella;s_pratensis
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Rickettsiales;f_Anaplasmataceae;g_Anaplasma;s_phagocytophilum
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_g_;s_
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Erythrobacteraceae;g_Altererythrobacter;s_dongtanensis
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Erythrobacteraceae;g_Altererythrobacter;s_mangrovi
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Erythrobacteraceae;g_Croceicoccus;s_naphthovorans
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Erythrobacteraceae;g_Porphyrbacter;s_sp. YT40
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Erythrobacteraceae;g_Qipengyuania;s_sediminis
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_s_
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Citromicrobium;s_sp. JL477
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Novosphingobium;s_
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Novosphingobium;s_aromaticivorans
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Novosphingobium;s_ginsenosidimitans
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Novosphingobium;s_pentaromativorans
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Novosphingobium;s_sp. ABRDHK2

■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Novosphingobium;s_sp. Gsoil 351
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Novosphingobium;s_sp. P6W
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Novosphingobium;s_sp. THN1
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingobium;s_ _
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingobium;s_ _japonicum
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingobium;s_sp. CAP-1
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingobium;s_ _yanoikuyae
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingomonas;s_ _ginsengisoli An et al. 2013
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingomonas;s_ _sanxanigenens
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingomonas;s_sp. AAP5
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingomonas;s_sp. AE3
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingomonas;s_sp. C33
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingomonas;s_sp. IC081
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingomonas;s_ _taxi
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Alphaproteobacteria;o_Sphingomonadales;f_Sphingomonadaceae;g_Sphingorhabdus;s_ _lacus
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_ _;f_ _;g_ _;s_ _
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_ _;g_ _Leptothrix;s_ _cholodnii
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_ _Alcaligenaceae;g_ _Pigmentiphaga;s_ _sp. H8
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_ _Burkholderiaceae;g_ _Burkholderia;s_ _sp. Bp17605
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_ _Burkholderiaceae;g_ _Cupriavidus;s_ _gilardii
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_ _Comamonadaceae;g_ _Curvibacter;s_ _putative symbiont of Hydra magnipapillata
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_ _Comamonadaceae;g_ _Variovorax;s_ _paradoxus
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_ _Comamonadaceae;g_ _Variovorax;s_sp. PBL-H6
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Burkholderiales;f_ _Oxalobacteraceae;g_ _Collimonas;s_ _arenae
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_ _;g_ _;s_ _
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_ _Chromobacteriaceae;g_ _Chromobacterium;s_sp. ATCC 53434
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_ _Chromobacteriaceae;g_ _Microvirgula;s_ _aerodentrificans
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Neisseriales;f_ _Chromobacteriaceae;g_ _Pseudogulbenkiania;s_sp. NH8B
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Nitrosomonadales;f_ _Methylophilaceae;g_ _Candidatus Methylophilum;s_ _universalis
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Nitrosomonadales;f_ _Methylophilaceae;g_ _Methylotenera;s_ _versatilis
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Nitrosomonadales;f_ _Nitrosomonadaceae;g_ _Nitrosospira;s_ _lacus
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Nitrosomonadales;f_ _Thiobacillaceae;g_ _Sulfuritortus;s_ _calidifontis
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_ _Rhodocyclaceae;g_ _Oryzomicrobium;s_ _terrae
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_ _Zoogloeaceae;g_ _;s_ _
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_ _Zoogloeaceae;g_ _Azoarcus;s_ _
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_ _Zoogloeaceae;g_ _Azoarcus;s_ _olearius
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_ _Zoogloeaceae;g_ _Azoarcus;s_sp. CIB
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_ _Zoogloeaceae;g_ _Azoarcus;s_sp. DD4
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Betaproteobacteria;o_Rhodocyclales;f_ _Zoogloeaceae;g_ _Thauera;s_ _chlorobenzoica
 ■ k_Bacteria;p_Proteobacteria;c_Gammaproteobacteria;o_Nevskiales;f_ _Sinobacteraceae;g_ _Solimonas;s_sp. K1W22B-7
 ■ k_Bacteria;p_candidate division NC10;c_ _;o_ _;f_ _;g_ _Candidatus Methylophilum;s_ _oxyfera
 ■ k_Eukaryota;p_ _;c_Chrysophyceae;o_Chromulinales;f_Chromulinaceae;g_Pedospumella;s_sp.
 ■ k_Eukaryota;p_ _;c_Chrysophyceae;o_Chromulinales;f_Dinobryaceae;g_Dinobryon;s_ _pediforme
 ■ k_Eukaryota;p_ _;c_Eustigmatophyceae;o_Goniochloridales;f_ _;g_ _Trachydiscus;s_ _minutus
 ■ k_Eukaryota;p_ _;c_Glaucocystophyceae;o_ _;f_ _Cyanophoraceae;g_Cyanophora;s_ _tetracyanea
 ■ k_Eukaryota;p_ _;c_Oomycota;o_Anisopldiales;f_Anisopldiaceae;g_Anisopldium;s_ _ectocarpii
 ■ k_Eukaryota;p_Annelida;c_Clitellata;o_Haplotaxida;f_Naididae;g_Limnodrilus;s_ _claparedianus
 ■ k_Eukaryota;p_Annelida;c_Clitellata;o_Haplotaxida;f_Naididae;g_Limnodrilus;s_ _hoffmeisteri
 ■ k_Eukaryota;p_Annelida;c_Clitellata;o_Haplotaxida;f_Naididae;g_Tubifex;s_ _tubifex
 ■ k_Eukaryota;p_Annelida;c_Polychaeta;o_Sabellida;f_Serpulidae;g_Spirorbis;s_sp. CMC02
 ■ k_Eukaryota;p_Arthropoda;c_Branchiopoda;o_Diplostraca;f_Bosminidae;g_Eubosmina;s_ _coregoni
 ■ k_Eukaryota;p_Arthropoda;c_Hexanauplia;o_Cyclopoida;f_Cyclopidae;g_Mesocyclops;s_ _pehpeiensis
 ■ k_Eukaryota;p_Arthropoda;c_Insecta;o_Diptera;f_Chironomidae;g_Cricotopus;s_sp. 24E5
 ■ k_Eukaryota;p_Arthropoda;c_Insecta;o_Diptera;f_Simuliidae;g_Simulium;s_ _venustum
 ■ k_Eukaryota;p_Arthropoda;c_Insecta;o_Ephemeroptera;f_Caenidae;g_Caenis;s_ _luctuosa
 ■ k_Eukaryota;p_Arthropoda;c_Insecta;o_Odonata;f_Epiophlebiidae;g_Epiophlebia;s_ _superstes

k_Eukaryota;p_Arthropoda;c_Ostracoda;o_Podocopida;f_Candonidae;g_Candona;s_candida
 k_Eukaryota;p_Arthropoda;c_Ostracoda;o_Podocopida;f_Cyprididae;g_Eucypris;s_virens
 k_Eukaryota;p_Ascomycota;c_Leotiomycetes;o_;f_;g_Leohumicola;s_verrucosa
 k_Eukaryota;p_Bacillariophyta;c_Bacillariophyceae;o_Naviculales;f_Pinnulariaceae;g_Pinnularia;s_viridiformis
 k_Eukaryota;p_Bacillariophyta;c_Bacillariophyceae;o_Naviculales;f_Sellaphoraceae;g_Sellaphora;s_pupula
 k_Eukaryota;p_Bacillariophyta;c_Mediophyceae;o_Triceratiales;f_Plagiogrammaceae;g_Psammoneis;s_japonica
 k_Eukaryota;p_Basidiomycota;c_Tremellomycetes;o_Tremellales;f_Cryptococcaceae;g_Cryptococcus;s_gattii VGI
 k_Eukaryota;p_Chlorophyta;c_o_;f_;g;s_
 k_Eukaryota;p_Chlorophyta;c_Chlorodendrophyceae;o_Chlorodendrales;f_Chlorodendraceae;g_Tetraselmis;s_subcordiformis
 k_Eukaryota;p_Chlorophyta;c_Chlorophyceae;o_Chlamydomonadales;f_Chlamydomonadaceae;g_Chlamydomonas;s_sp. UWO 241
 k_Eukaryota;p_Chlorophyta;c_Chlorophyceae;o_Chlamydomonadales;f_Volvocaceae;g_Gonium;s_pectorale
 k_Eukaryota;p_Chlorophyta;c_Chlorophyceae;o_Sphaeropleales;f_Scenedesmaceae;g_Pectinodesmus;s_pectinatus
 k_Eukaryota;p_Chlorophyta;c_Chloropicophyceae;o_Chloropicales;f_Chloropicaceae;g_Chloropicon;s_mariensis
 k_Eukaryota;p_Chlorophyta;c_Nephroselmidophyceae;o_Nephroselmidales;f_Nephroselmidaceae;g_Nephroselmis;s_olivacea
 k_Eukaryota;p_Chlorophyta;c_Pyramimonadophyceae;o_Pyramimonadales;f_Pyramimonadaceae;g_Cymbomonas;s_tetramitiformis
 k_Eukaryota;p_Chlorophyta;c_Trebouxiophyceae;o_;f_;g_Botryococcus;s_braunii
 k_Eukaryota;p_Chlorophyta;c_Trebouxiophyceae;o_Chlorellales;f_Chlorellaceae;g_Chlorella;s_sp.
 k_Eukaryota;p_Chytridiomycota;c_Monoblepharidomycetes;o_Monoblepharidales;f_Harpochytriaceae;g_Harpochytrium;s_sp. JEL105
 k_Eukaryota;p_Chytridiomycota;c_Monoblepharidomycetes;o_Monoblepharidales;f_Harpochytriaceae;g_Harpochytrium;s_sp. JEL94
 k_Eukaryota;p_Discosea;c_Flabellinia;o_;f_Vannellidae;g_Ripella;s_tribonemae
 k_Eukaryota;p_Gastrotricha;c_o_;o_Chaetonotida;f_Chaetonotidae;g_Chaetonotus;s_aemilianus
 k_Eukaryota;p_Gastrotricha;c_o_;o_Chaetonotida;f_Chaetonotidae;g_Chaetonotus;s_cf. sphagnophilus TK91
 k_Eukaryota;p_Gastrotricha;c_o_;o_Chaetonotida;f_Chaetonotidae;g_Chaetonotus;s_heideri
 k_Eukaryota;p_Gastrotricha;c_o_;o_Chaetonotida;f_Chaetonotidae;g_Chaetonotus;s_heterocanthus
 k_Eukaryota;p_Gastrotricha;c_o_;o_Chaetonotida;f_Chaetonotidae;g_Chaetonotus;s_sp. A MK-2019
 k_Eukaryota;p_Mollusca;c_Gastropoda;o_;f_Pachychilidae;g_Sulcospira;s_paludiformis
 k_Eukaryota;p_Mollusca;c_Gastropoda;o_Trochida;f_Trochidae;g_Phorcus;s_lineatus
 k_Eukaryota;p_Rhodophyta;c_Florideophyceae;o_Ceramiales;f_Rhodomelaceae;g_Vertebrata;s_thuyoides
 k_Eukaryota;p_Rhodophyta;c_Florideophyceae;o_Gigartinales;f_Peyssonneliaceae;g_Peyssonnelia;s_sp. 4clathrata
 k_Eukaryota;p_Rotifera;c_Monogononta;o_Flosculariaceae;f_Hexarthridae;g_Hexarthra;s_sp. WM-2017a

In figura 13 sono riportati i principali phyla, relativi ai diversi punti di campionamento, registrati mediante l'amplificazione della regione COI.

Nella tabella 8 sono riportate le principali specie – con le corrispondenti abbondanze - relative ai diversi punti di campionamento, registrate mediante l'amplificazione della regione COI.

Tabella 8 Lista delle specie e abbondanza nelle diverse stazioni prese in esame

Sample Name (read counts)		Taxonomic Unit	Fraction
Taxonomic Level	Taxonomic Unit		
BA1.COI (41 949 reads)			
S		Luteitalea pratensis (47 OTUs with 70-71% identity in 444-446bp to: Luteitalea pratensis)	27.7%
S		Collimonas arenae (26 OTUs with 81-82% identity in 413bp to: Collimonas arenae)	11.7%
S		Candidatus Fonsibacter ubiqvis (45 OTUs with 84-86% identity in 435-437bp to: Candidatus Fonsibacter ubiqvis)	9.5%
S		Novosphingobium sp. THN1 (16 OTUs with 89-90% identity in 433-434bp to: Novosphingobium sp. THN1)	5.5%
S		Sphingorhabdus lacus (15 OTUs with 80-82% identity in 426-431bp to: Sphingorhabdus lacus)	4.7%
S		Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1 (17 OTUs with 86-87% identity in 433-436bp to: Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1)	4.4%
S		Phreatobacter stygius (10 OTUs with 81-83% identity in 433-434bp to: Phreatobacter stygius)	4.0%
S		Candidatus Methylopusillus universalis (13 OTUs with 99-100% identity in 414-415bp to: Candidatus Methylopusillus universalis)	2.9%
S		Polymorphum gilvum (8 OTUs with 86-88% identity in 432-434bp to: Polymorphum gilvum)	2.5%
S		Breoghania sp. L-A4 (5 OTUs with 85% identity in 434-435bp to: Breoghania sp. L-A4)	2.5%
G		Novosphingobium (6 OTUs with 86-87% identity in 430-431bp to: Novosphingobium aromaticivorans, Novosphingobium sp. ABRDHK2)	2.5%
S		Methylocella silvestris (11 OTUs with 84-86% identity in 436-438bp to: Methylocella silvestris)	2.4%
S		Chlorella sp. (4 OTUs with 79-82% identity in 420-424bp to: Chlorella sp.)	1.7%
S		Methylocystis parvus (9 OTUs with 79-86% identity in 429-436bp to: Methylocystis parvus)	1.7%
S		Rhodoluna limnophila (9 OTUs with 85% identity in 420bp to: Rhodoluna limnophila)	1.5%
S		Candidatus Planktophila vernalis (9 OTUs with 80-81% identity in 414-420bp to: Candidatus Planktophila vernalis)	1.3%
S		Sphingomonas sp. IC081 (4 OTUs with 81-87% identity in 433-434bp to: Sphingomonas sp. IC081)	1.3%
S		Trachydiscus minutus (6 OTUs with 89-90% identity in 415-421bp to: Trachydiscus minutus)	1.0%
S		Novosphingobium aromaticivorans (4 OTUs with 87% identity in 430-431bp to: Novosphingobium aromaticivorans)	1.0%
S		Sphingobium yanoikuyae (3 OTUs with 83-84% identity in 430-431bp to: Sphingobium yanoikuyae)	0.8%
F		Rhodospirillaceae (4 OTUs with 82-83% identity in 422-424bp to: Azospirillum thiophilum, Indioceanicola profundum)	0.7%
S		Microvirgula aerodenitrificans (4 OTUs with 81-83% identity in 415-416bp to: Microvirgula aerodenitrificans)	0.7%
S		Gemmobacter sp. HYN0069 (4 OTUs with 90-91% identity in 434-440bp to: Gemmobacter sp. HYN0069)	0.7%
S		Chloropicon mariensis (2 OTUs with 79% identity in 422-423bp to: Chloropicon mariensis)	0.6%
S		Methylotenera versatilis (3 OTUs with 74-82% identity in 417-430bp to: Methylotenera versatilis)	0.5%
S		Leisingera aquaemixtae (3 OTUs with 83% identity in 425bp to: Leisingera aquaemixtae)	0.4%

S	Anisopidium ectocarpii (3 OTUs with 81% identity in 415-421bp to: Anisopidium ectocarpii)	0.4%
S	Ketogulonicigenium vulgare (3 OTUs with 81% identity in 429-430bp to: Ketogulonicigenium vulgare)	0.3%
S	Rhodospirillum centenum (1 OTU with 86% identity in 422bp to: Rhodospirillum centenum)	0.3%
S	Eubosmina coregoni (1 OTU with 94% identity in 420bp to: Eubosmina coregoni)	0.3%
S	Maricaulis maris (3 OTUs with 77-80% identity in 432bp to: Maricaulis maris)	0.3%
S	Porphyrobacter sp. YT40 (1 OTU with 84% identity in 430bp to: Porphyrobacter sp. YT40)	0.3%
S	Botryococcus braunii (2 OTUs with 86% identity in 421-422bp to: Botryococcus braunii)	0.3%
S	Mesorhizobium sp. M7A.F.Ce.TU.012.03.2.1 (1 OTU with 86% identity in 436bp to: Mesorhizobium sp. M7A.F.Ce.TU.012.03.2.1)	0.3%
S	Tetraselmis subcordiformis (2 OTUs with 79% identity in 421bp to: Tetraselmis subcordiformis)	0.2%
S	Pedospumella sp. (1 OTU with 82% identity in 411bp to: Pedospumella sp.)	0.2%
S	Actinomadura amylyolytica (2 OTUs with 78% identity in 423bp to: Actinomadura amylyolytica)	0.2%
S	Caulobacter flavus (1 OTU with 86% identity in 430bp to: Caulobacter flavus)	0.2%
S	Psammoneis japonica (1 OTU with 79% identity in 414bp to: Psammoneis japonica)	0.2%
S	Nephroselmis olivacea (1 OTU with 82% identity in 421bp to: Nephroselmis olivacea)	0.2%
S	Roseiflexus castenholzii (1 OTU with 71% identity in 383bp to: Roseiflexus castenholzii)	0.2%
C	Alphaproteobacteria (2 OTUs with 81-87% identity in 433bp to: 4 unclassified Tardiphaga strains, Breoghania sp. L-A4, Labrenzia sp. VG12, Polymorphum gilvum)	0.2%
S	Sphingomonas sp. C33 (2 OTUs with 86% identity in 429bp to: Sphingomonas sp. C33)	0.2%
S	Hexarthra sp. WM-2017a (1 OTU with 79% identity in 424bp to: Hexarthra sp. WM-2017a)	0.2%
O	Rhizobiales (1 OTU with 87% identity in 433bp to: Breoghania sp. L-A4, Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1)	0.2%
S	Dinobryon pediforme (1 OTU with 74% identity in 345bp to: Dinobryon pediforme)	0.2%
S	Gonium pectorale (2 OTUs with 83-84% identity in 409bp to: Gonium pectorale)	0.2%
S	Mesocyclops pehpeiensis (1 OTU with 87% identity in 421bp to: Mesocyclops pehpeiensis)	0.1%
S	Indioceanicola profundi (1 OTU with 85% identity in 421bp to: Indioceanicola profundi)	0.1%
P	Chlorophyta (1 OTU with 79% identity in 423bp to: Chlorella sp., Cymbomonas tetramitiformis)	0.1%
	Other (10 OTUs with 0.8%)	0.8%
	Unclassified (709 reads)	
	Filtered (0 reads)	

BA2.COI (51 242 reads)

S	Luteitalea pratensis (45 OTUs with 70% identity in 444bp to: Luteitalea pratensis)	31.0%
S	Novosphingobium sp. THN1 (22 OTUs with 89-90% identity in 433-434bp to: Novosphingobium sp. THN1)	12.4%
S	Collimonas arenae (17 OTUs with 81% identity in 413bp to: Collimonas arenae)	7.9%
S	Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1 (17 OTUs with 86-87% identity in 433-436bp to: Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1)	5.7%
S	Sphingorhabdus lacus (19 OTUs with 81-82% identity in 426-431bp to: Sphingorhabdus lacus)	5.5%
S	Candidatus Fonsibacter ubiquis (25 OTUs with 84-86% identity in 435-437bp to: Candidatus Fonsibacter ubiquis)	5.2%
S	Breoghania sp. L-A4 (7 OTUs with 85-87% identity in 434-435bp to: Breoghania sp. L-A4)	4.5%
S	Polymorphum gilvum (15 OTUs with 85-88% identity in 432-434bp to: Polymorphum gilvum)	4.1%
S	Candidatus Methylopumilus universalis (15 OTUs with 99-100% identity in 414-416bp to: Candidatus Methylopumilus universalis)	3.6%
S	Phreatobacter stygius (5 OTUs with 81-82% identity in 433-434bp to: Phreatobacter stygius)	2.0%
S	Novosphingobium aromaticivorans (5 OTUs with 87% identity in 430-431bp to: Novosphingobium aromaticivorans)	1.7%
G	Novosphingobium (3 OTUs with 86-87% identity in 430-431bp to: Novosphingobium aromaticivorans, Novosphingobium sp. ABRDHK2)	1.4%
f	Rhodospirillaceae (6 OTUs with 82-83% identity in 422-424bp to: Azospirillum thiophilum, Indioceanicola profundi)	1.4%

S	Gemmobacter sp. HYN0069 (5 OTUs with 90-91% identity in 434-440bp to: Gemmobacter sp. HYN0069)	1.3%
S	Methylocella silvestris (5 OTUs with 85-86% identity in 437-438bp to: Methylocella silvestris)	1.1%
S	Maricaulis maris (6 OTUs with 77-80% identity in 432bp to: Maricaulis maris)	0.9%
C	Alphaproteobacteria (3 OTUs with 81-87% identity in 433-434bp to: 4 unclassified Tardiphaga strains, Breoghanian sp. L-A4, Labrenzia sp. VG12, Polymorphum gilvum)	0.9%
S	Candidatus Planktophila vernalis (4 OTUs with 81% identity in 420bp to: Candidatus Planktophila vernalis)	0.8%
S	Sphingomonas sp. IC081 (3 OTUs with 81-87% identity in 433-434bp to: Sphingomonas sp. IC081)	0.7%
S	Porphyrobacter sp. YT40 (4 OTUs with 84-89% identity in 430-431bp to: Porphyrobacter sp. YT40)	0.7%
S	Chlorella sp. (2 OTUs with 79% identity in 423-424bp to: Chlorella sp.)	0.6%
S	Methylocystis parvus (3 OTUs with 79% identity in 429bp to: Methylocystis parvus)	0.5%
S	Anisolpidium ectocarpii (3 OTUs with 81% identity in 415-421bp to: Anisolpidium ectocarpii)	0.5%
S	Chlamydomonas sp. UWO 241 (3 OTUs with 78% identity in 410-411bp to: Chlamydomonas sp. UWO 241)	0.5%
S	Caulobacter flavus (2 OTUs with 86% identity in 430-431bp to: Caulobacter flavus)	0.4%
S	Ketogulonicigenium vulgare (3 OTUs with 81% identity in 429-430bp to: Ketogulonicigenium vulgare)	0.4%
S	Leisingera aquaemixtae (2 OTUs with 83% identity in 425bp to: Leisingera aquaemixtae)	0.4%
S	Methylotenera versatilis (2 OTUs with 74-80% identity in 417-430bp to: Methylotenera versatilis)	0.4%
S	Trachydiscus minutus (2 OTUs with 90-92% identity in 419-420bp to: Trachydiscus minutus)	0.4%
S	Botryococcus braunii (2 OTUs with 86% identity in 421-422bp to: Botryococcus braunii)	0.4%
S	Mesorhizobium sp. M7A.F.Ce.TU.012.03.2.1 (2 OTUs with 86% identity in 436-437bp to: Mesorhizobium sp. M7A.F.Ce.TU.012.03.2.1)	0.4%
S	Microvirgula aerodenitrificans (3 OTUs with 81-83% identity in 415bp to: Microvirgula aerodenitrificans)	0.3%
S	Rhodospirillum centenum (1 OTU with 86% identity in 422bp to: Rhodospirillum centenum)	0.3%
O	Rhizobiales (1 OTU with 87% identity in 433bp to: Breoghanian sp. L-A4, Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1)	0.2%
S	Curvibacter putative symbiont of Hydra magnipapillata (2 OTUs with 82% identity in 413-414bp to: Curvibacter putative symbiont of Hydra magnipapillata)	0.2%
S	Cyanophora tetracyanea (1 OTU with 80% identity in 418bp to: Cyanophora tetracyanea)	0.2%
S	Novosphingobium ginsenosidimutans (1 OTU with 90% identity in 430bp to: Novosphingobium ginsenosidimutans)	0.2%
S	Chloropicon mariensis (1 OTU with 79% identity in 422bp to: Chloropicon mariensis)	0.1%
S	Novosphingobium sp. ABRDHK2 (1 OTU with 88% identity in 430bp to: Novosphingobium sp. ABRDHK2)	0.1%
S	Indioceanicola profundii (1 OTU with 85% identity in 421bp to: Indioceanicola profundii)	0.1%
S	Actinomadura amylyolytica (1 OTU with 78% identity in 423bp to: Actinomadura amylyolytica)	0.1%
S	Sphingobium yanoikuyae (1 OTU with 83% identity in 430bp to: Sphingobium yanoikuyae)	0.1%
S	Confluentimicrobium sp. EMB200-NS6 (1 OTU with 88% identity in 423bp to: Confluentimicrobium sp. EMB200-NS6)	0.1%
	Other (5 OTUs with 0.4%)	0.4%
	Unclassified (865 reads)	
	Filtered (0 reads)	

BS1.COI (17 515 reads)

S	Caenis luctuosa (51 OTUs with 86-87% identity in 416-419bp to: Caenis luctuosa)	65.5%
S	Simulium venustum (9 OTUs with 74-75% identity in 418-420bp to: Simulium venustum)	6.4%
S	Breoghanian sp. L-A4 (12 OTUs with 85-88% identity in 433-436bp to: Breoghanian sp. L-A4)	4.0%
g	Mesorhizobium (2 OTUs with 82% identity in 434-435bp to: 2 unclassified Mesorhizobium strains)	3.3%
S	Candidatus Methylomirabilis oxyfera (2 OTUs with 72% identity in 429bp to: Candidatus Methylomirabilis oxyfera)	2.0%
S	Hypericibacter adhaerens (5 OTUs with 83-86% identity in 417-422bp to: Hypericibacter adhaerens)	1.5%
S	Bradyrhizobium erythrophlei (3 OTUs with 78-79% identity in 433-434bp to: Bradyrhizobium erythrophlei)	1.4%

S	Skermanella pratensis (4 OTUs with 78-83% identity in 407-410bp to: <i>Skermanella pratensis</i>)	1.3%
S	Phreatobacter stygius (3 OTUs with 85-86% identity in 433bp to: <i>Phreatobacter stygius</i>)	1.3%
S	Rhodopseudomonas palustris (2 OTUs with 82% identity in 436bp to: <i>Rhodopseudomonas palustris</i>)	1.2%
S	Youhaiella tibetensis (3 OTUs with 86% identity in 433-434bp to: <i>Youhaiella tibetensis</i>)	1.2%
S	Limnodrilus hoffmeisteri (3 OTUs with 100% identity in 420-422bp to: <i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>)	1.2%
S	Hypericibacter terrae (3 OTUs with 78% identity in 414-423bp to: <i>Hypericibacter terrae</i>)	1.1%
S	Polymorphum gilvum (2 OTUs with 87% identity in 433bp to: <i>Polymorphum gilvum</i>)	1.0%
S	Pseudogulbenkiania sp. NH8B (3 OTUs with 78-82% identity in 414-415bp to: <i>Pseudogulbenkiania sp. NH8B</i>)	0.8%
S	Phreatobacter cathodiphilus (1 OTU with 86% identity in 436bp to: <i>Phreatobacter cathodiphilus</i>)	0.7%
O	Rhizobiales (2 OTUs with 81-86% identity in 433bp to: 2 unclassified <i>Bradyrhizobium</i> strains, <i>Breoghania sp. L-A4</i> , <i>Parvibaculum lavamentivorans</i> , <i>Rhodoplanes sp. Z2-YC6860</i> , <i>Youhaiella tibetensis</i>)	0.7%
S	Bradyrhizobium sp. ORS 285 (2 OTUs with 83% identity in 433-436bp to: <i>Bradyrhizobium sp. ORS 285</i>)	0.7%
S	Brevirhabdus pacifica (1 OTU with 86% identity in 430bp to: <i>Brevirhabdus pacifica</i>)	0.6%
S	Georgenia sp. ZLJ0423 (1 OTU with 70% identity in 377bp to: <i>Georgenia sp. ZLJ0423</i>)	0.5%
S	Candidatus Solibacter usitatus (2 OTUs with 70-71% identity in 471-472bp to: <i>Candidatus Solibacter usitatus</i>)	0.5%
S	Variovorax sp. PBL-H6 (1 OTU with 70% identity in 410bp to: <i>Variovorax sp. PBL-H6</i>)	0.4%
S	Novosphingobium ginsenosidimutans (1 OTU with 86% identity in 433bp to: <i>Novosphingobium ginsenosidimutans</i>)	0.4%
S	Bradyrhizobium betae (1 OTU with 82% identity in 433bp to: <i>Bradyrhizobium betae</i>)	0.4%
S	Rhodoplanes sp. Z2-YC6860 (1 OTU with 87% identity in 433bp to: <i>Rhodoplanes sp. Z2-YC6860</i>)	0.3%
S	Collimonas arenae (1 OTU with 81% identity in 413bp to: <i>Collimonas arenae</i>)	0.3%
S	Acidibrevibacterium fodinaquatile (1 OTU with 80% identity in 420bp to: <i>Acidibrevibacterium fodinaquatile</i>)	0.3%
S	Azoarcus sp. DD4 (1 OTU with 86% identity in 415bp to: <i>Azoarcus sp. DD4</i>)	0.3%
S	Phorcus lineatus (1 OTU with 75% identity in 419bp to: <i>Phorcus lineatus</i>)	0.2%
S	Microvirgula aerodenitrificans (1 OTU with 86% identity in 415bp to: <i>Microvirgula aerodenitrificans</i>)	0.2%
C	Betaproteobacteria (1 OTU with 84% identity in 408bp to: <i>Oryzomicrobium terrae</i> , <i>Sulfuritortus calidfontis</i>)	0.2%
O	Sphingomonadales (1 OTU with 87% identity in 434bp to: <i>Altererythrobacter dongtanensis</i> , <i>Novosphingobium resinovorum</i> , <i>Qipengyuania sediminis</i>)	0.2%
S	Azoarcus sp. CIB (1 OTU with 81% identity in 415bp to: <i>Azoarcus sp. CIB</i>)	0.2%
	Other (1 OTU with 0.1%)	0.1%
	Unclassified (802 reads)	
	Filtered (0 reads)	

BS2.COI (35 677 reads)

S	Simulium venustum (22 OTUs with 74-75% identity in 418-421bp to: <i>Simulium venustum</i>)	28.7%
S	Tubifex tubifex (21 OTUs with 83-84% identity in 416-421bp to: <i>Tubifex tubifex</i>)	11.6%
g	Mesorhizobium (15 OTUs with 82-83% identity in 434-436bp to: 2 unclassified <i>Mesorhizobium</i> strains)	7.1%
S	Psammoneis japonica (9 OTUs with 79% identity in 414bp to: <i>Psammoneis japonica</i>)	6.8%
S	Breoghania sp. L-A4 (22 OTUs with 85-88% identity in 433-436bp to: <i>Breoghania sp. L-A4</i>)	4.4%
f	Zoogloeaceae (6 OTUs with 82-84% identity in 415-416bp to: <i>Azoarcus olearius</i> , <i>Thauera chlorobenzoica</i> , <i>Thauera sp. K11</i>)	2.5%
S	Candona candida (6 OTUs with 81-82% identity in 420-421bp to: <i>Candona candida</i>)	2.3%
S	Polymorphum gilvum (7 OTUs with 81-87% identity in 433-434bp to: <i>Polymorphum gilvum</i>)	2.0%
S	Phreatobacter cathodiphilus (4 OTUs with 86% identity in 436-437bp to: <i>Phreatobacter cathodiphilus</i>)	1.8%
S	Pseudogulbenkiania sp. NH8B (3 OTUs with 78-82% identity in 414-415bp to: <i>Pseudogulbenkiania sp. NH8B</i>)	1.7%
S	Chelatococcus sp. CO-6 (3 OTUs with 82% identity in 431-432bp to: <i>Chelatococcus sp. CO-6</i>)	1.6%
S	Sulcospira paludiformis (4 OTUs with 79% identity in 414-421bp to: <i>Sulcospira paludiformis</i>)	1.5%

S	Youhaiella tibetensis (4 OTUs with 86% identity in 433-434bp to: <i>Youhaiella tibetensis</i>)	1.4%
S	Methyloceanibacter sp. wino2 (3 OTUs with 81% identity in 432bp to: <i>Methyloceanibacter sp. wino2</i>)	1.4%
S	Candidatus Solibacter usitatus (5 OTUs with 70-86% identity in 464-477bp to: <i>Candidatus Solibacter usitatus</i>)	1.2%
S	Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1 (6 OTUs with 85-87% identity in 433-435bp to: <i>Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1</i>)	1.2%
S	Roseomonas mucosa (5 OTUs with 79-80% identity in 421-422bp to: <i>Roseomonas mucosa</i>)	1.1%
S	Bradyrhizobium erythrophlei (6 OTUs with 77-94% identity in 433-434bp to: <i>Bradyrhizobium erythrophlei</i>)	1.1%
S	Phorcus lineatus (4 OTUs with 74-75% identity in 419-422bp to: <i>Phorcus lineatus</i>)	1.1%
S	Stappia indica (4 OTUs with 81-82% identity in 433-434bp to: <i>Stappia indica</i>)	0.9%
S	Azoarcus sp. DD4 (4 OTUs with 81-86% identity in 414-416bp to: <i>Azoarcus sp. DD4</i>)	0.9%
S	Skermanella pratensis (3 OTUs with 78-79% identity in 407-425bp to: <i>Skermanella pratensis</i>)	0.8%
S	Caenis luctuosa (4 OTUs with 87% identity in 416-419bp to: <i>Caenis luctuosa</i>)	0.8%
S	Bradyrhizobium sp. 58S1 (3 OTUs with 78-79% identity in 428-433bp to: <i>Bradyrhizobium sp. 58S1</i>)	0.7%
S	Brevirhabdus pacifica (2 OTUs with 86-87% identity in 430-431bp to: <i>Brevirhabdus pacifica</i>)	0.7%
g	Bradyrhizobium (3 OTUs with 77-95% identity in 433-437bp to: 3 unclassified <i>Bradyrhizobium</i> strains, <i>Bradyrhizobium ottawaense</i>)	0.7%
S	Vertebrata thuyoides (2 OTUs with 71% identity in 409bp to: <i>Vertebrata thuyoides</i>)	0.6%
S	Hypericibacter terrae (2 OTUs with 78% identity in 415-423bp to: <i>Hypericibacter terrae</i>)	0.6%
C	Alphaproteobacteria (3 OTUs with 86% identity in 433bp to: <i>Breoghania sp. L-A4</i> , <i>Polymorphum gilvum</i>)	0.5%
S	Azoarcus olearius (3 OTUs with 85-86% identity in 415-416bp to: <i>Azoarcus olearius</i>)	0.5%
g	Tardiphaga (2 OTUs with 85% identity in 436-437bp to: 4 unclassified <i>Tardiphaga</i> strains)	0.5%
S	Thauera chlorobenzoica (2 OTUs with 83% identity in 415-418bp to: <i>Thauera chlorobenzoica</i>)	0.5%
S	Hypericibacter adhaerens (4 OTUs with 78-85% identity in 421-431bp to: <i>Hypericibacter adhaerens</i>)	0.5%
O	Rhizobiales (2 OTUs with 82-86% identity in 433-436bp to: <i>Bradyrhizobium sp. 58S1</i> , <i>Breoghania sp. L-A4</i> , <i>Parvibaculum lavamentivorans</i> , <i>Youhaiella tibetensis</i>)	0.5%
S	Mesorhizobium sp. M2A.F.Ca.ET.046.03.2.1 (1 OTU with 82% identity in 434bp to: <i>Mesorhizobium sp. M2A.F.Ca.ET.046.03.2.1</i>)	0.4%
S	Variibacter gotjawalensis (1 OTU with 76% identity in 431bp to: <i>Variibacter gotjawalensis</i>)	0.4%
S	Azospirillum thermophilum (2 OTUs with 81% identity in 421-422bp to: <i>Azospirillum thermophilum</i>)	0.4%
S	Azoarcus sp. CIB (2 OTUs with 81% identity in 415-416bp to: <i>Azoarcus sp. CIB</i>)	0.4%
S	Rhodopseudomonas palustris (2 OTUs with 82-86% identity in 435-436bp to: <i>Rhodopseudomonas palustris</i>)	0.3%
S	Mesorhizobium opportunistum (1 OTU with 82% identity in 435bp to: <i>Mesorhizobium opportunistum</i>)	0.3%
O	Sphingomonadales (1 OTU with 87% identity in 434bp to: <i>Altererythrobacter dongtanensis</i> , <i>Novosphingobium resinovorum</i> , <i>Qipengyuania sediminis</i>)	0.3%
S	Pectinodesmus pectinatus (2 OTUs with 81% identity in 414bp to: <i>Pectinodesmus pectinatus</i>)	0.3%
S	Eucypris virens (1 OTU with 82% identity in 420bp to: <i>Eucypris virens</i>)	0.3%
S	Chaetonotus sp. A MK-2019 (1 OTU with 91% identity in 379bp to: <i>Chaetonotus sp. A MK-2019</i>)	0.3%
S	Microvirgula aerodenitrificans (2 OTUs with 86-87% identity in 415-416bp to: <i>Microvirgula aerodenitrificans</i>)	0.3%
S	Labrys neptuniae (1 OTU with 81% identity in 442bp to: <i>Labrys neptuniae</i>)	0.3%
C	Betaproteobacteria (1 OTU with 84% identity in 408bp to: <i>Oryzomicrobium terrae</i> , <i>Sulfuritortus caldifontis</i>)	0.3%
S	Bradyrhizobium paxllaeri (2 OTUs with 90-94% identity in 433bp to: <i>Bradyrhizobium paxllaeri</i>)	0.3%
S	Collimonas arenae (1 OTU with 81% identity in 413bp to: <i>Collimonas arenae</i>)	0.3%
S	Sphingorhabdus lacus (1 OTU with 82% identity in 430bp to: <i>Sphingorhabdus lacus</i>)	0.2%
S	Mesorhizobium sp. M7D.F.Ca.US.005.01.1.1 (1 OTU with 82% identity in 276bp to: <i>Mesorhizobium sp. M7D.F.Ca.US.005.01.1.1</i>)	0.2%
S	Phreatobacter stygius (2 OTUs with 82-87% identity in 433-436bp to: <i>Phreatobacter stygius</i>)	0.2%

S	Roseitalea porphyridii (1 OTU with 84% identity in 437bp to: <i>Roseitalea porphyridii</i>)	0.2%
f	Bradyrhizobiaceae (1 OTU with 86% identity in 433bp to: <i>Afipia</i> sp. GAS231, <i>Bradyrhizobium lablabi</i> , <i>Bradyrhizobium ottawaense</i>)	0.2%
S	Sphingomonas taxi (1 OTU with 77% identity in 421bp to: <i>Sphingomonas taxi</i>)	0.2%
S	Rhodoplanes sp. Z2-YC6860 (2 OTUs with 87% identity in 433bp to: <i>Rhodoplanes</i> sp. Z2-YC6860)	0.2%
S	Cricotopus sp. 24ES (2 OTUs with 75% identity in 416bp to: <i>Cricotopus</i> sp. 24ES)	0.2%
S	Luteitalea pratensis (1 OTU with 74% identity in 447bp to: <i>Luteitalea pratensis</i>)	0.2%
S	Afipia sp. GAS231 (1 OTU with 90% identity in 434bp to: <i>Afipia</i> sp. GAS231)	0.2%
S	Mesorhizobium japonicum (1 OTU with 80% identity in 434bp to: <i>Mesorhizobium japonicum</i>)	0.2%
S	Cupriavidus gilardii (1 OTU with 82% identity in 420bp to: <i>Cupriavidus gilardii</i>)	0.2%
S	Phreatobacter sp. NMCR1094 (1 OTU with 83% identity in 436bp to: <i>Phreatobacter</i> sp. NMCR1094)	0.2%
S	Novosphingobium ginsenosidimutans (1 OTU with 86% identity in 433bp to: <i>Novosphingobium ginsenosidimutans</i>)	0.2%
S	Mycolicibacterium litorale (1 OTU with 90% identity in 421bp to: <i>Mycolicibacterium litorale</i>)	0.1%
S	Methylocella silvestris (1 OTU with 81% identity in 437bp to: <i>Methylocella silvestris</i>)	0.1%
S	Mesorhizobium sp. Pch-S (1 OTU with 83% identity in 434bp to: <i>Mesorhizobium</i> sp. Pch-S)	0.1%
S	Chaetonotus heideri (1 OTU with 82% identity in 420bp to: <i>Chaetonotus heideri</i>)	0.1%
S	Chaetonotus aemilianus (1 OTU with 85% identity in 421bp to: <i>Chaetonotus aemilianus</i>)	0.1%
S	Bosea vaviloviae (1 OTU with 84% identity in 434bp to: <i>Bosea vaviloviae</i>)	0.1%
S	Pigmentiphaga sp. H8 (1 OTU with 84% identity in 415bp to: <i>Pigmentiphaga</i> sp. H8)	0.1%
S	Chlorella sp. (1 OTU with 79% identity in 423bp to: <i>Chlorella</i> sp.)	0.1%
S	Tabrizicola piscis (1 OTU with 90% identity in 439bp to: <i>Tabrizicola piscis</i>)	0.1%
S	Pinnularia viridiformis (1 OTU with 92% identity in 414bp to: <i>Pinnularia viridiformis</i>)	0.1%
S	Chaetonotus heterocanthus (1 OTU with 78% identity in 421bp to: <i>Chaetonotus heterocanthus</i>)	0.1%
	Other (7 OTUs with 0.6%)	0.6%
	Unclassified (1 574 reads)	
	Filtered (0 reads)	

MS1.COI (22 007 reads)

S	Rhodopseudomonas palustris (35 OTUs with 81-85% identity in 432-439bp to: <i>Rhodopseudomonas palustris</i>)	19.3%
S	Chelatococcus sp. CO-6 (10 OTUs with 81-82% identity in 431-432bp to: <i>Chelatococcus</i> sp. CO-6)	8.6%
O	Sphingomonadales (5 OTUs with 84-87% identity in 433-435bp to: <i>Altererythrobacter dongtanensis</i> , <i>Novosphingobium ginsenosidimutans</i> , <i>Novosphingobium resinovororum</i> , <i>Qipengyuania sediminis</i>)	6.3%
S	Mesorhizobium opportunistum (8 OTUs with 82-83% identity in 428-434bp to: <i>Mesorhizobium opportunistum</i>)	4.8%
S	Breoghanian sp. L-A4 (14 OTUs with 79-87% identity in 433-439bp to: <i>Breoghanian</i> sp. L-A4)	4.3%
g	Bradyrhizobium (9 OTUs with 77-95% identity in 433-437bp to: 5 unclassified <i>Bradyrhizobium</i> strains, <i>Bradyrhizobium diazoefficiens</i> , <i>Bradyrhizobium erythrophlei</i> , <i>Bradyrhizobium lablabi</i> , <i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> , <i>Bradyrhizobium ottawaense</i> , <i>Bradyrhizobium pax-laeri</i>)	4.1%
C	Alphaproteobacteria (9 OTUs with 84-87% identity in 433-434bp to: <i>Breoghanian</i> sp. L-A4, <i>Mesorhizobium oceanicum</i> , <i>Mesorhizobium</i> sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1, <i>Phreatobacter cathodiphilus</i> , <i>Polymorphum gilvum</i> , <i>Stappia indica</i>)	3.7%
S	Stappia indica (4 OTUs with 82-87% identity in 433-434bp to: <i>Stappia indica</i>)	3.5%
S	Rhodoplanes sp. Z2-YC6860 (12 OTUs with 78-89% identity in 432-436bp to: <i>Rhodoplanes</i> sp. Z2-YC6860)	2.8%
S	Oryzomicrobium terrae (12 OTUs with 81-84% identity in 408-416bp to: <i>Oryzomicrobium terrae</i>)	2.7%
S	Epiophlebia superstes (5 OTUs with 82-84% identity in 429-432bp to: <i>Epiophlebia superstes</i>)	2.5%
S	Novosphingobium ginsenosidimutans (7 OTUs with 84-94% identity in 430-434bp to: <i>Novosphingobium ginsenosidimutans</i>)	2.4%
S	Polymorphum gilvum (9 OTUs with 82-87% identity in 431-433bp to: <i>Polymorphum gilvum</i>)	2.1%
S	Mesorhizobium oceanicum (4 OTUs with 79% identity in 441-447bp to: <i>Mesorhizobium oceanicum</i>)	2.0%

S	Bradyrhizobium sp. 58S1 (6 OTUs with 78-79% identity in 427-433bp to: <i>Bradyrhizobium sp. 58S1</i>)	1.5%
S	Novosphingobium sp. Gsoil 351 (5 OTUs with 85-87% identity in 433-435bp to: <i>Novosphingobium sp. Gsoil 351</i>)	1.3%
G	Mesorhizobium (4 OTUs with 80-85% identity in 433-434bp to: 3 unclassified <i>Mesorhizobium</i> strains, <i>Mesorhizobium huakuii</i> , <i>Mesorhizobium japonicum</i> , <i>Mesorhizobium opportunistum</i>)	1.3%
S	Hypericibacter terrae (2 OTUs with 78% identity in 415-423bp to: <i>Hypericibacter terrae</i>)	1.3%
S	Hypericibacter adhaerens (7 OTUs with 83-86% identity in 421-422bp to: <i>Hypericibacter adhaerens</i>)	1.2%
S	Mesorhizobium sp. M2A.F.Ca.ET.046.03.2.1 (6 OTUs with 81-86% identity in 433-435bp to: <i>Mesorhizobium sp. M2A.F.Ca.ET.046.03.2.1</i>)	1.2%
S	Sulfuritortus calidifontis (2 OTUs with 83-84% identity in 409-417bp to: <i>Sulfuritortus calidifontis</i>)	1.1%
S	Skermanella pratensis (4 OTUs with 78% identity in 420-443bp to: <i>Skermanella pratensis</i>)	1.1%
S	Stella humosa (6 OTUs with 83-85% identity in 421bp to: <i>Stella humosa</i>)	1.0%
S	Spirorbis sp. CMC02 (2 OTUs with 77% identity in 418bp to: <i>Spirorbis sp. CMC02</i>)	0.8%
S	Methyloceanibacter sp. wino2 (3 OTUs with 81% identity in 432bp to: <i>Methyloceanibacter sp. wino2</i>)	0.8%
G	Novosphingobium (2 OTUs with 90% identity in 430-431bp to: <i>Novosphingobium resinovorum</i> , <i>Novosphingobium sp. ABRDHK2</i>)	0.8%
S	Hyphomicrobium sp. MC1 (4 OTUs with 82-87% identity in 429-436bp to: <i>Hyphomicrobium sp. MC1</i>)	0.8%
S	Acidiphilium multivorum (2 OTUs with 81% identity in 424bp to: <i>Acidiphilium multivorum</i>)	0.7%
S	Phreatobacter stygius (3 OTUs with 84-86% identity in 433-434bp to: <i>Phreatobacter stygius</i>)	0.7%
S	Bradyrhizobium paxllaeri (3 OTUs with 84-94% identity in 433bp to: <i>Bradyrhizobium paxllaeri</i>)	0.7%
G	Tardiphaga (3 OTUs with 81-84% identity in 435-436bp to: 4 unclassified <i>Tardiphaga</i> strains)	0.7%
S	Phreatobacter cathodiphilus (3 OTUs with 87-88% identity in 436-437bp to: <i>Phreatobacter cathodiphilus</i>)	0.6%
S	Oligotropha carboxidovorans (2 OTUs with 83-84% identity in 434bp to: <i>Oligotropha carboxidovorans</i>)	0.6%
S	Altererythrobacter dongtanensis (3 OTUs with 86-88% identity in 436bp to: <i>Altererythrobacter dongtanensis</i>)	0.6%
S	Vertebrata thuyoides (2 OTUs with 71% identity in 409bp to: <i>Vertebrata thuyoides</i>)	0.5%
S	Qipengyuania sediminis (3 OTUs with 85-87% identity in 434-436bp to: <i>Qipengyuania sediminis</i>)	0.5%
S	Bradyrhizobium erythrophlei (3 OTUs with 83-93% identity in 432-436bp to: <i>Bradyrhizobium erythrophlei</i>)	0.5%
F	Sphingomonadaceae (2 OTUs with 85-87% identity in 430bp to: 2 unclassified <i>Sphingomonas</i> strains, <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> , <i>Rhizorhabdus dicambivorans</i> , <i>Sphingobium sp. PAMC28499</i> , <i>Sphingomonas ginsengisoli</i> An et al. 2013)	0.5%
S	Afipia sp. GAS231 (1 OTU with 90% identity in 434bp to: <i>Afipia sp. GAS231</i>)	0.5%
S	Cryptococcus gattii VGII (2 OTUs with 82% identity in 420bp to: <i>Cryptococcus gattii VGII</i>)	0.4%
S	Candidatus Puniceispirillum marinum (1 OTU with 73% identity in 421bp to: <i>Candidatus Puniceispirillum marinum</i>)	0.4%
C	Betaproteobacteria (2 OTUs with 80% identity in 415-416bp to: <i>Azoarcus olearius</i> , <i>Microvirgula aerodenitrificans</i> , <i>Pseudogulbenkiania sp. NH8B</i>)	0.4%
S	Roseomonas mucosa (2 OTUs with 80-83% identity in 421bp to: <i>Roseomonas mucosa</i>)	0.4%
S	Microvirgula aerodenitrificans (2 OTUs with 79-85% identity in 415bp to: <i>Microvirgula aerodenitrificans</i>)	0.4%
S	Thauera chlorobenzoica (2 OTUs with 78-79% identity in 414-415bp to: <i>Thauera chlorobenzoica</i>)	0.4%
S	Hyphomicrobium sp. ghe19 (1 OTU with 84% identity in 436bp to: <i>Hyphomicrobium sp. ghe19</i>)	0.4%
S	Bradyrhizobium vignae (2 OTUs with 84% identity in 441-442bp to: <i>Bradyrhizobium vignae</i>)	0.4%
S	Acidibrevibacterium fodinaquatile (2 OTUs with 81% identity in 420bp to: <i>Acidibrevibacterium fodinaquatile</i>)	0.3%
S	Bradyrhizobium sp. (1 OTU with 83% identity in 433bp to: <i>Bradyrhizobium sp.</i>)	0.3%
G	Azoarcus (1 OTU with 81% identity in 415bp to: 2 unclassified <i>Azoarcus</i> strains)	0.3%
S	Mesorhizobium ciceri (1 OTU with 81% identity in 438bp to: <i>Mesorhizobium ciceri</i>)	0.3%
S	Azospirillum thermophilum (2 OTUs with 80-81% identity in 421-424bp to: <i>Azospirillum thermophilum</i>)	0.3%
S	Brevirhabdus pacifica (1 OTU with 86% identity in 430bp to: <i>Brevirhabdus pacifica</i>)	0.3%
S	Leohumicola verrucosa (1 OTU with 91% identity in 421bp to: <i>Leohumicola verrucosa</i>)	0.3%

O	Rhizobiales (1 OTU with 85% identity in 435bp to: Breoghania sp. L-A4, Mesorhizobium huakuii)	0.3%
S	Azorhizobium caulinodans (1 OTU with 72% identity in 440bp to: Azorhizobium caulinodans)	0.3%
S	Candidatus Solibacter usitatus (1 OTU with 83% identity in 467bp to: Candidatus Solibacter usitatus)	0.2%
S	Chaetonotus cf. sphagnophilus TK91 (1 OTU with 77% identity in 422bp to: Chaetonotus cf. sphagnophilus TK91)	0.2%
S	Leptothrix cholodnii (1 OTU with 83% identity in 418bp to: Leptothrix cholodnii)	0.2%
S	Bradyrhizobium zhanjiangense (1 OTU with 78% identity in 433bp to: Bradyrhizobium zhanjiangense)	0.2%
S	Pseudolabrys sp. FHR47 (1 OTU with 90% identity in 426bp to: Pseudolabrys sp. FHR47)	0.2%
S	Lacipirellula parvula (1 OTU with 80% identity in 413bp to: Lacipirellula parvula)	0.2%
O	Neisseriales (1 OTU with 78% identity in 414bp to: Chitinolytic bacter meiyuanensis, Microvirgula aerodentrificans)	0.2%
S	Mesorhizobium terrae (1 OTU with 81% identity in 439bp to: Mesorhizobium terrae)	0.2%
S	Citromicrobium sp. JL477 (2 OTUs with 90% identity in 431bp to: Citromicrobium sp. JL477)	0.2%
S	Limnodrilus claparedianus (1 OTU with 98% identity in 421bp to: Limnodrilus claparedianus)	0.2%
S	Psammonais japonica (1 OTU with 79% identity in 414bp to: Psammonais japonica)	0.2%
S	Micavibrio aeruginosavorus (1 OTU with 74% identity in 422bp to: Micavibrio aeruginosavorus)	0.2%
S	Phreatobacter sp. NMCR1094 (1 OTU with 86% identity in 438bp to: Phreatobacter sp. NMCR1094)	0.2%
S	Bradyrhizobium sp. SK17 (1 OTU with 82% identity in 433bp to: Bradyrhizobium sp. SK17)	0.2%
S	Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1 (1 OTU with 86% identity in 435bp to: Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1)	0.2%
S	Nitrospirillum amazonense (1 OTU with 75% identity in 420bp to: Nitrospirillum amazonense)	0.1%
S	Mesorhizobium sp. Pch-S (1 OTU with 85% identity in 435bp to: Mesorhizobium sp. Pch-S)	0.1%
S	Maricaulis maris (1 OTU with 81% identity in 434bp to: Maricaulis maris)	0.1%
S	Sphingobium sp. CAP-1 (1 OTU with 82% identity in 430bp to: Sphingobium sp. CAP-1)	0.1%
S	Azoarcus olearius (1 OTU with 86% identity in 415bp to: Azoarcus olearius)	0.1%
	Other (1 OTU with 0.1%)	0.1%
	Unclassified (268 reads)	
	Filtered (0 reads)	

MS2.COI (22 744 reads)

S	Pseudolabrys sp. FHR47 (11 OTUs with 85-86% identity in 426-434bp to: Pseudolabrys sp. FHR47)	12.0%
S	Sphingomonas ginsengisoli An et al. 2013 (12 OTUs with 83-88% identity in 430-431bp to: Sphingomonas ginsengisoli An et al. 2013)	8.5%
S	Rhodopseudomonas palustris (12 OTUs with 81-82% identity in 436bp to: Rhodopseudomonas palustris)	8.0%
g	Bradyrhizobium (12 OTUs with 79-92% identity in 432-437bp to: 4 unclassified Bradyrhizobium strains, Bradyrhizobium diazoefficiens, Bradyrhizobium erythrophlei, Bradyrhizobium lablabi, Bradyrhizobium ottawaense, Bradyrhizobium paxllaeri)	7.1%
S	Chelatococcus sp. CO-6 (6 OTUs with 82% identity in 431-432bp to: Chelatococcus sp. CO-6)	4.5%
S	Novosphingobium ginsenosidimutans (2 OTUs with 84% identity in 433-434bp to: Novosphingobium ginsenosidimutans)	4.3%
S	Altererythrobacter dongtanensis (7 OTUs with 86% identity in 435-438bp to: Altererythrobacter dongtanensis)	4.0%
S	Candidatus Solibacter usitatus (8 OTUs with 70-72% identity in 470-475bp to: Candidatus Solibacter usitatus)	3.9%
S	Mesorhizobium opportunistum (5 OTUs with 82-83% identity in 428-434bp to: Mesorhizobium opportunistum)	3.6%
S	Novosphingobium sp. Gsoil 351 (11 OTUs with 85-90% identity in 430-435bp to: Novosphingobium sp. Gsoil 351)	3.5%
S	Bradyrhizobium erythrophlei (9 OTUs with 81-93% identity in 432-438bp to: Bradyrhizobium erythrophlei)	3.2%
S	Altererythrobacter mangrovi (3 OTUs with 87% identity in 433-434bp to: Altererythrobacter mangrovi)	2.7%
S	Sphingomonas sp. AE3 (5 OTUs with 87% identity in 430-431bp to: Sphingomonas sp. AE3)	2.2%
S	Afipia sp. GAS231 (4 OTUs with 80-95% identity in 433-435bp to: Afipia sp. GAS231)	1.7%
S	Stappia indica (2 OTUs with 82% identity in 433-434bp to: Stappia indica)	1.5%

S	Rhodoplanes sp. Z2-YC6860 (4 OTUs with 84-89% identity in 432-433bp to: Rhodoplanes sp. Z2-YC6860)	1.5%
S	Spirorbis sp. CMC02 (3 OTUs with 77% identity in 408-418bp to: Spirorbis sp. CMC02)	1.5%
S	Cryptococcus gattii VGII (2 OTUs with 82% identity in 420bp to: Cryptococcus gattii VGII)	1.4%
S	Bradyrhizobium vignae (2 OTUs with 84% identity in 441-442bp to: Bradyrhizobium vignae)	1.4%
S	Oryzomicrobium terrae (5 OTUs with 81-84% identity in 408-418bp to: Oryzomicrobium terrae)	1.1%
S	Hypericibacter adhaerens (3 OTUs with 84-86% identity in 421-422bp to: Hypericibacter adhaerens)	1.0%
C	Alphaproteobacteria (2 OTUs with 86% identity in 433bp to: Breoghania sp. L-A4, Polymorphum gilvum)	1.0%
S	Mesorhizobium oceanicum (2 OTUs with 79% identity in 441bp to: Mesorhizobium oceanicum)	0.9%
S	Hypericibacter terrae (2 OTUs with 78% identity in 415-423bp to: Hypericibacter terrae)	0.9%
S	Stella humosa (2 OTUs with 83-84% identity in 421bp to: Stella humosa)	0.8%
S	Caulobacter flavus (3 OTUs with 85% identity in 429-430bp to: Caulobacter flavus)	0.8%
S	Chromobacterium sp. ATCC 53434 (3 OTUs with 76% identity in 416-417bp to: Chromobacterium sp. ATCC 53434)	0.8%
S	Hyphomicrobium sp. ghe19 (1 OTU with 84% identity in 436bp to: Hyphomicrobium sp. ghe19)	0.8%
S	Solimonas sp. K1W22B-7 (3 OTUs with 79-80% identity in 415bp to: Solimonas sp. K1W22B-7)	0.8%
S	Granulibacter bethesdensis (2 OTUs with 80-81% identity in 419bp to: Granulibacter bethesdensis)	0.7%
S	Lacipirellula parvula (2 OTUs with 80% identity in 413bp to: Lacipirellula parvula)	0.6%
S	Nitrosospira lacus (2 OTUs with 76% identity in 415bp to: Nitrosospira lacus)	0.6%
C	Betaproteobacteria (2 OTUs with 80-81% identity in 415bp to: Azoarcus olearius, Burkholderia sp. Bp7605, Microvirgula aerodenitrificans, Pseudogulbenkiania sp. NH8B)	0.6%
S	Polymorphum gilvum (3 OTUs with 85-87% identity in 433bp to: Polymorphum gilvum)	0.6%
S	Oligotropha carboxidovorans (2 OTUs with 84% identity in 434-435bp to: Oligotropha carboxidovorans)	0.6%
O	Sphingomonadales (2 OTUs with 84-85% identity in 433bp to: Altererythrobacter dongtanensis, Novosphingobium ginsenosidimutans)	0.5%
S	Bradyrhizobium sp. (1 OTU with 84% identity in 433bp to: Bradyrhizobium sp.)	0.5%
S	Mesorhizobium sp. M2A.F.Ca.ET.046.03.2.1 (1 OTU with 81% identity in 434bp to: Mesorhizobium sp. M2A.F.Ca.ET.046.03.2.1)	0.5%
S	Novosphingobium sp. ABRDHK2 (2 OTUs with 88-89% identity in 430bp to: Novosphingobium sp. ABRDHK2)	0.5%
S	Mesorhizobium terrae (2 OTUs with 85-86% identity in 435-436bp to: Mesorhizobium terrae)	0.5%
S	Phreatobacter stygius (2 OTUs with 84-85% identity in 433-436bp to: Phreatobacter stygius)	0.4%
S	Azospirillum humicireducens (1 OTU with 85% identity in 420bp to: Azospirillum humicireducens)	0.4%
S	Breoghania sp. L-A4 (2 OTUs with 80-86% identity in 435-439bp to: Breoghania sp. L-A4)	0.4%
S	Acidibrevibacterium fodinaquatile (1 OTU with 81% identity in 420bp to: Acidibrevibacterium fodinaquatile)	0.4%
S	Sphingomonas taxi (1 OTU with 79% identity in 417bp to: Sphingomonas taxi)	0.4%
S	Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1 (1 OTU with 75% identity in 376bp to: Mesorhizobium sp. M4B.F.Ca.ET.058.02.1.1)	0.3%
S	Candidatus Koribacter versatilis (2 OTUs with 75-76% identity in 469-470bp to: Candidatus Koribacter versatilis)	0.3%
S	Sphingobium sp. CAP-1 (1 OTU with 82% identity in 430bp to: Sphingobium sp. CAP-1)	0.3%
S	Harpochytrium sp. JEL94 (1 OTU with 76% identity in 359bp to: Harpochytrium sp. JEL94)	0.3%
S	Mycobacterium sp. WY10 (1 OTU with 95% identity in 420bp to: Mycobacterium sp. WY10)	0.3%
S	Georhizobium profundum (1 OTU with 78% identity in 437bp to: Georhizobium profundum)	0.3%
S	Azospirillum thiophilum (1 OTU with 86% identity in 421bp to: Azospirillum thiophilum)	0.3%
S	Novosphingobium sp. P6W (1 OTU with 88% identity in 430bp to: Novosphingobium sp. P6W)	0.3%
S	Leohumicola verrucosa (1 OTU with 91% identity in 421bp to: Leohumicola verrucosa)	0.3%
S	Sphingomonas sp. AAP5 (1 OTU with 87% identity in 415bp to: Sphingomonas sp. AAP5)	0.2%

S	Candidatus Phaeomarinobacter ectocarpi (1 OTU with 78% identity in 437bp to: Candidatus Phaeomarinobacter ectocarpi)	0.2%
S	Skermanella pratensis (1 OTU with 78% identity in 420bp to: Skermanella pratensis)	0.2%
S	Roseomonas gilardii (1 OTU with 79% identity in 420bp to: Roseomonas gilardii)	0.2%
S	Roseitalea porphyridii (1 OTU with 84% identity in 437bp to: Roseitalea porphyridii)	0.2%
f	Bradyrhizobiaceae (1 OTU with 83% identity in 436bp to: 2 unclassified Bradyrhizobium strains, Afipia sp. GAS231, Bradyrhizobium lablabi, Bradyrhizobium ottawaense)	0.2%
S	Harpochytrium sp. JEL105 (1 OTU with 91% identity in 420bp to: Harpochytrium sp. JEL105)	0.2%
g	Mesorhizobium (1 OTU with 85% identity in 433bp to: Mesorhizobium huakuii, Mesorhizobium japonicum)	0.2%
S	Sphingobium japonicum (1 OTU with 83% identity in 430bp to: Sphingobium japonicum)	0.2%
S	Epiophlebia superstes (1 OTU with 77% identity in 435bp to: Epiophlebia superstes)	0.2%
g	Sphingobium (1 OTU with 88% identity in 430bp to: Sphingobium chlorophenicum, Sphingobium japonicum)	0.2%
S	Sphingomonas sanxanigenens (1 OTU with 85% identity in 429bp to: Sphingomonas sanxanigenens)	0.2%
f	Mycobacteriaceae (1 OTU with 87% identity in 421bp to: Mycobacterium sp. VKM Ac-1817D, Mycolicibacterium fortuitum)	0.2%
S	Croceicoccus naphthovorans (1 OTU with 85% identity in 431bp to: Croceicoccus naphthovorans)	0.2%
S	Bosea vaviloviae (1 OTU with 84% identity in 438bp to: Bosea vaviloviae)	0.2%
S	Bradyrhizobium paxllaeri (1 OTU with 84% identity in 433bp to: Bradyrhizobium paxllaeri)	0.1%
g	Tardiphaga (1 OTU with 82% identity in 438bp to: 4 unclassified Tardiphaga strains)	0.1%
S	Roseomonas mucosa (1 OTU with 83% identity in 421bp to: Roseomonas mucosa)	0.1%
S	Acidiphilium multivorum (1 OTU with 81% identity in 424bp to: Acidiphilium multivorum)	0.1%
	Other (2 OTUs with 0.2%)	0.2%
	Unclassified (1 943 reads)	
	Filtered (0 reads)	

3.3.1 Lista specie degli organismi campionati

Completate le operazioni di campionamento e cattura della fauna ittica si è proceduto con l'identificazione, con il rilevamento delle biometrie e con la stesura di una lista delle specie ittiche presenti nel lago Maulazzo (Fig. 15). I risultati delle specie ittiche si riferiscono esclusivamente alla stagione estiva, in quanto durante i campionamenti invernali non si è ritenuto di effettuare catture. Nel lago Bievriere, viceversa, è stato impossibile procedere alla cattura di specie ittiche a causa della specifica forma del lago e della particolare presenza di vegetazione, che non permetteva il raggiungimento di spot di pesca idonei. L'elevata presenza di macrofite che ricoprivano il fondale, inoltre, non ha consentito una buona riuscita dell'azione di pesca. Nel Biviere di Cesarò sono state effettuate diverse prove per la cattura di teleostei mediante l'utilizzo di nasse da fondo, anche queste rivelatesi infruttuose. Nel lago in questione è stato possibile effettuare il prelievo solo di esemplari di *Gambusia holbrooki*, mediante l'utilizzo di un retino. Nella tabella 9 sono riportate le biometrie dei pesci campionati nel lago Maulazzo e nella Figura 16 è indicata la percentuale dei teleostei catturati.

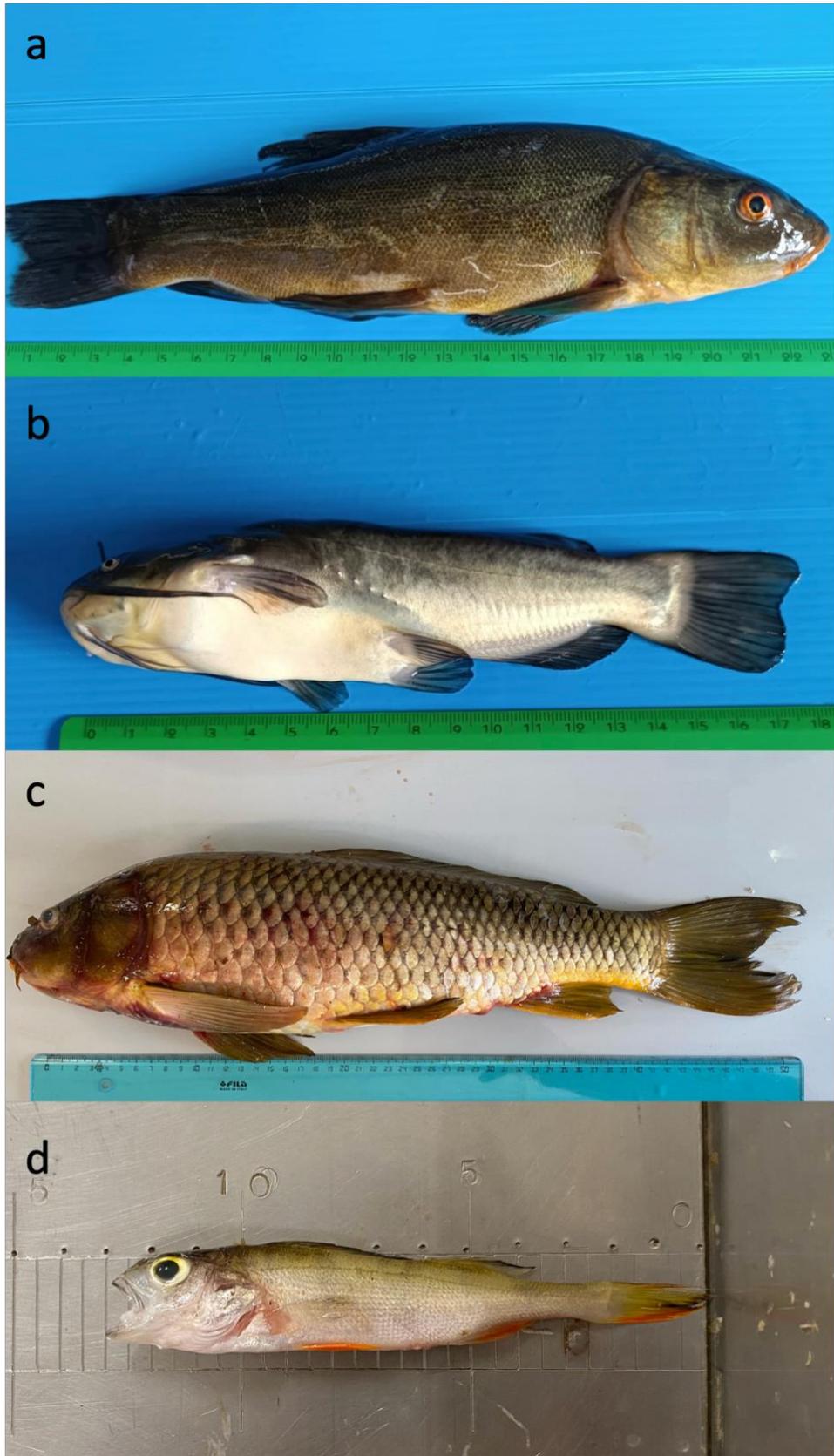


Figura 15 Identificazione e rilevamento delle biometrie di: a) *T. tinca*; b) *A. melas*; c) *C. carpio*; d) *P. fluviatilis*

Tabella 9 Specie di teleostei, numero di catturate effettuate, lunghezza e peso espresso media \pm SD.

Specie	N. di individui	Lunghezza totale	Peso totale
<i>Cyprinus carpio</i>	12	47,875 \pm 16,006	1617,83 \pm 753,491
<i>Ameiurus melas</i>	41	14,48 \pm 13,217	55,1405 \pm 44,963
<i>Tinca tinca</i>	6	21,166 \pm 1,366	122,891 \pm 14,698
<i>Perca fluviatilis</i>	4	12,75 \pm 1,443	18,25 \pm 7,762



Figura 16 Percentuali di teleostei catturati presso il lago Maulazzo

A causa della non effettuata cattura di organismi nel Biviere di Cesarò sono state condotte indagini approfondite di *visual census*. I risultati delle catture vive dei teleostei sono riportati in Figura 17. È importante sottolineare come nel Biviere si sia osservato un comportamento dei pesci tale da fare ritenere probabile la presenza massiccia di predatori; campionamenti successivi hanno permesso di confermare la presenza di diversi esemplari di *Esox lucius*. Tra le specie di teleostei osservati figurano: esemplari adulti di *Tinca tinca*; avannotti di *Ameiurus melas*; esemplari adulti di *Perca fluviatilis* e *Gambusia holbrooki*.

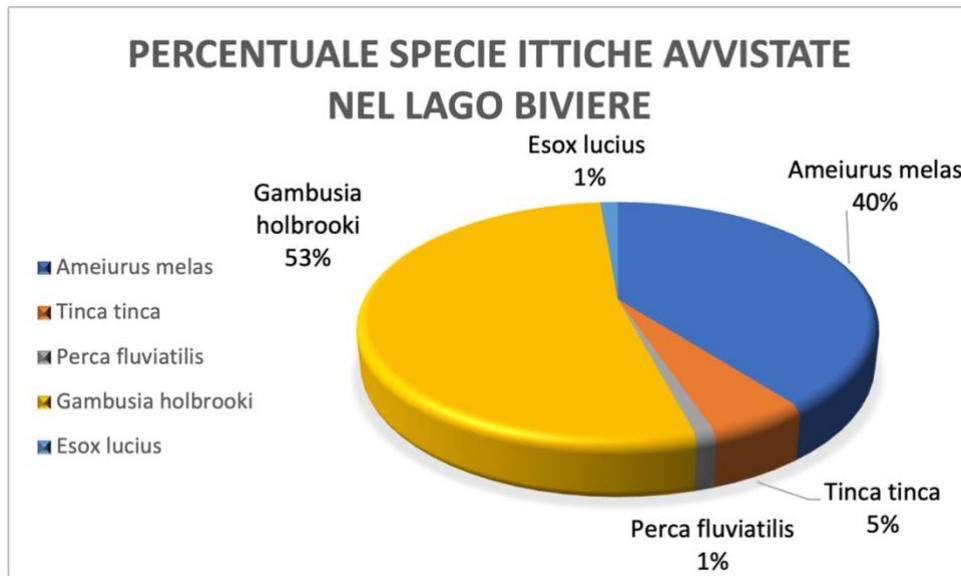


Figura 17 Percentuali di teleostei osservati presso il Biviere di Cesarò

In entrambi i laghi studiati non sono mancati diversi avvistamenti di specie di rettili, come numerosi serpenti appartenenti alla specie *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758), tartarughe appartenenti alla specie *Emys orbicularis* e *Trachemys scripta elegans*, anfibi come *Hyla intermedia* e *Bufo boulengeri siculus* (Stöck et al., 2008).

I risultati dei campionamenti degli organismi macroinvertebrati effettuati con la tecnica della bennata non risultano esaustivi, in quanto sono state campionate poche forme larvali appartenenti al Phylum Artropoda e, più nello specifico, alla famiglia Chironomidae (Newman, 1836) e Athericidae (Nowicki, 1873).

Al contrario, il campionamento effettuato per mezzo del retino si è rivelato quello più corretto ed esaustivo in termini di diversità in numero di specie campionate.

L'identificazione dello zooplancton si è conclusa con la suddivisione degli organismi nei principali taxa e con una preliminare identificazione che ha permesso di identificare: Copepodi appartenenti al genere *Cyclops* (Montfort, 1810); Cladocera (Latreille, 1829) apparenti a diverse specie, tra cui *Bosmina longirostris* (O.F. Müller, 1785).

Nella tabella 10 è riportato un elenco che comprende sia le specie catturate che quelle osservate nelle due diverse aree di studio.

Tabella 10, Lista delle specie campionate nei due laghi, specie riportate nell'area dei Nebrodi, specie endemiche per la Sicilia e categoria corologica

Famiglia	Specie	Biviere	Maulazzo	Riportato	Endemico per la Sicilia
CHORDATA					
OSTEICHTHYES					
Ciprinidae	<i>Cyprinus carpio</i> (Linnaeus, 1758)		x	[16]	NO
	<i>Tinca tinca</i> (Linnaeus 1758)	X	x	[16]	NO
Ictaluridae	<i>Ameiurus melas</i> (Rafinesque, 1820)	x	x	[16]	NO
Percidae	<i>Perca fluviatilis</i> (Linnaeus, 1758)	x	x	[16]	NO
Poeciliidae	<i>Gambusia holbrooki</i> (Girard, 1859)	x		[16]	NO
Esocidae	<i>Esox lucius</i> (Linnaeus, 1758)	x		-	NO
REPTILIA					
Emydidae	<i>Trachemys scripta elegans</i> (Wied-Neuwied, 1839)		x	-	NO
	<i>Emys orbicularis</i> (Fritz et al, 2005)	x	x	-	SI
Testudinidae	<i>Testudo hermanni</i> (Gmelin, 1789)	x	x	[17]	SI
Natricidae	<i>Natrix natrix</i> (Linnaeus, 1758)	x	x	-	NO
Colubridae	<i>Hierophis viridiflavus</i> (Lacépède, 1789)	x		-	NO
AMPHIBIA					
Hylidae	<i>Hyla intermedia</i> (Boulenger, 1882)	x	x	-	NO
Bufo	<i>Bufo boulengeri siculus</i> (Stöck et al., 2008)	x	x	-	SI
MOLLUSCA					
GASTROPODA					
Planorbidae	<i>Planorbis moquini</i> (Requien, 1848)	x	x	[16]	NO
	<i>Planorbis planorbis</i> (Linnaeus, 1758)	x	x	[16]	NO
BIVALVIA					
Pisidiidae	<i>Physa acuta</i> (Draparnaud, 1805)	x	x	[16]	NO
Pisidiidae	<i>Physa fontinalis</i> (Linnaeus, 1758)	x	x	-	NO
ARTHROPODA					
COLEOPTERA					
Bothriidae	<i>Bothrioderes bipunctatus</i> (Gmelin in Linnaeus, 1790)	x		[1]	NO
Buprestidae	<i>Agrilus olivicolor</i> (Kiesenwetter, 1857)	x		[2]	NO
Carabidae	<i>Cicindela campestris</i> (Linné, 1758)	x		[3]	NO
	<i>Calathus (Calathus) montivagus</i> (Dejean,1831)	x		[3]	NO
	<i>Carabus (Macrothorax) planatus</i> (Chaudoir,1843)	x		[3]	SI
	<i>Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei</i> (Dejean,1826)	x		[3]	NO
	<i>Platyderus canaliculatus</i> (Chaudoir,1843)	x		[3]	NO
	<i>Brachinus (Brachynoaptinus) italicus</i> (Dejean,1831)	x		[3]	NO
	<i>Polistichus fasciolatus</i> (Rossi, 1790)	x		[4]	NO
	<i>Anthracus transversalis</i> (Schaum, 1862)	x		[1]	NO
Cerambicidae	<i>Stictoleptura (Stictoleptura) cordigera</i> (Fuessly, 1775)		x	[5]	NO
	<i>Rutpela maculata</i> (Poda, 1761)	x		[5]	NO
	<i>Pseudovadonia livida</i> (Fabricius, 1777)	x		[5]	NO

	<i>Grammoptera ruficornis</i> (Fabricius, 1781)	x		[5]	NO
	<i>Paracorymbia fulva</i> (De Geer, 1775)	x		[5]	NO
	<i>Stictoleptura (Melanoleptura) scutellata</i> (Fabricius, 1781)	x		[5]	NO
	<i>Stictoleptura (Stictoleptura) oblongomaculata</i> (Buquet, 1840)	x		[5]	NO
	<i>Prionus coriarius</i> (Linnaeus, 1758)	x		[5]	NO
	<i>Aegosoma scabricorne</i> (Scopoli, 1763)	x		[5]	NO
	<i>Stictoleptura (Melanoleptura) scutellata</i> (Fabricius, 1781)		x	[14]	NO
Cholevidae	<i>Catops marginicollis</i> (Lucas, 1846)	x		[6]	NO
	<i>Dreposcia umbrina</i> (Erichson, 1837)	x		[6]	NO
	<i>Choleva (Choleva) sturmi</i> (Brisout, 1863)	x		[6]	NO
	<i>Ptomaphagus (Ptomaphagus) tenuicornis mauritanicus</i> (Rosenhauer, 1856)	x		[6]	NO
Chrysomelidae	<i>Chrysolina (Ovosoma) vernalis</i> (Brullé, 1836)	x		[3]	NO
	<i>Luperus biraghii</i> (Ragusa, 1871)	x		[3]	NO
	<i>Pachybrachis exclusus</i> (Rey, 1883)	x		[3]	SI
	<i>Timarcha (Timarcha) pimelioides</i> (Herrich-Schaeffer, 1838)	x		[3]	NO
	<i>Galerucella solarii</i> (Burlini, 1942)	x		[1]	NO
	<i>Pachybrachis exclusus</i> (Weise, 1886)	x	x	[7]	SI
	<i>Cassida deflorata</i> (Suffrian, 1844)	x	x	[7]	NO
	<i>Cassida rubiginosa</i> (O.F. Müller, 1776)	x		[7]	NO
	<i>Cassida vittata</i> (Villers, 1789)	x		[7]	NO
	<i>Cryptocephalus (Burlinius) scapularis</i> (Suffrian, 1848)	x		[7]	NO
	<i>Cassida margaritacea</i> (Schaller, 1783)	x		[7]	NO
	<i>Cryptocephalus (Cryptocephalus) moraei</i> (Linné, 1758)	x		[7]	NO
	<i>Hispa atra</i> (Linné, 1767)	x		[7]	NO
	<i>Cryptocephalus (Burlinius) fulvus</i> (Goeze, 1777)	x		[7]	NO
	<i>Cryptocephalus (Cryptocephalus) rugicollis</i> (Linné, 1758)	x		[7]	NO
	<i>Longitarsus lycopi</i> (Foudras, 1860)	x		[8]	NO
	<i>Longitarsus juncicola</i> (Foudras, 1860)	x		[8]	NO
	<i>Longitarsus anchusae</i> (Paykull, 1793)	x		[8]	NO
	<i>Chaetocnema hortensis</i> (Geoffroy, 1785)	x		[8]	NO
	<i>Batophila aerata</i> (Marsham, 1802)	x		[8]	NO
	<i>Aphthona herbigrada</i> (Curtis, 1837)	x		[9]	NO
	<i>Phyllotreta corrugata</i> (Reiche, 1858)	x		[9]	NO
	<i>Phyllotreta consobrina</i> (Curtis, 1837)	x		[9]	NO
	<i>Crepidodera aurata</i> (Marsham, 1802)	x		[9]	NO
	<i>Chaetocnema obesa</i> (Boieldieu, 1859)	x		[9]	NO
	<i>Chaetocnema concinna</i> (Marsham, 1802)	x		[9]	NO
	<i>Chaetocnema arida</i> (Foudras, 1860)	x		[9]	NO
	<i>Aphthona venustula</i> (Kutschera, 1861)	x		[9]	NO
	<i>Aphthona pygmaea</i> (Kutschera, 1861)	x		[9]	NO

	<i>Aphthona nonstriata</i> (Goeze, 1777)	x		[9]	NO
	<i>Aphthona flaviceps</i> (Allard, 1859)	x		[9]	NO
	<i>Crepidodera aurea</i> (Geoffroy, 1785)	x		[9]	NO
	<i>Longitarsus anacardius</i> (Allard, 1866)	x		[9]	NO
	<i>Longitarsus linnaei</i> (Duftschmid, 1825)	x		[9]	NO
	<i>Longitarsus parvulus</i> (Paykull, 1799)	x		[9]	NO
	<i>Aphthona ovata</i> (Foudras, 1860)	x		[9]	NO
	<i>Gonioctena (Spartoxena) theae</i> (Baviera, 2007)		x	[10]	NO
	<i>Cryptocephalus (Burlinius) macellus</i> (Suffrian, 1860)		x	[7]	NO
	<i>Longitarsus pellucidus</i> (Foudras, 1860)		x	[9]	NO
Curculionidae	<i>Phyllobius (Parnemoicus) subdentatus</i> (Boheman, 1843)	x		[3]	NO
	<i>Phyllobius (Phyllobius) reicheidius</i> (Desbrochers, 1873)	x		[3]	NO
	<i>Rutera bellieri</i> (Reiche, 1860)	x		[3]	NO
	<i>Phyllobius argentatus</i> (Linné, 1758)	x		[1]	NO
	<i>Curculio (Curculio) venosus venosus</i> (Gravenhorst, 1807)	x		[2]	NO
	<i>Tychius (Tychius) cuprifer</i> (Panzer, 1799)	x	x	[11]	NO
	<i>Tychius (Tychius) cupriferoides</i> (Ragusa, 1922)	x	x	[11]	NO
	<i>Orchestes (Orchestes) pilosus</i> (Fabricius, 1781)	x		[11]	NO
	<i>Tychius (Tychius) meliloti</i> (Stephens, 1831)	x		[11]	NO
	<i>Tychius (Tychius) polylineatus</i> (Germar, 1823)	x		[11]	NO
	<i>Smicronyx (Smicronyx) jungermanniae</i> (Reich, 1797)	x		[11]	NO
	<i>Tychius (Tychius) tibialis</i> (Boheman, 1843)	x		[11]	NO
	<i>Curculio (Curculio) glandium</i> (Marsham, 1802)	x		[11]	NO
	<i>Orchestes (Orchestes) fagi</i> (Linnaeus, 1758)	x		[11]	NO
	<i>Mecinus circulatus</i> (Marsham, 1802)	x		[11]	NO
	Dytiscidae	<i>Rhamphus oxyacanthae</i> (Marsham, 1802)		x	[11]
<i>Mecinus pyraster</i> (Herbst, 1795)			x	[11]	NO
<i>Acilius sulcatus</i> (Linné, 1758)				[16]	NO
<i>Agabus biguttatus</i> (Olivier, 1795)			x	[17]	NO
<i>Agabus bipustulatus</i> (Linné, 1767)				[16]	NO
<i>Agabus nebulosus</i> (Forster, 1771)				[16]	NO
<i>Copelatus atriceps</i> (Sharp, 1882)				[16]	NO
<i>Dytiscus marginalis</i> (Linné, 1758)		x		[16]	NO
<i>Hydroporus palustris</i> (Linné, 1761)				[16]	NO
<i>Hydroporus pubescens</i> (Gyllenhal, 1808)		x	x	[16]	NO
<i>Hydroporus memnonius</i> (Nicolai 1822)		x	x	[16]	NO
<i>Hydroporus tessellatus</i> (Drapiez, 1819)			x	[16]	NO
<i>Laccophilus hyalinus</i> (De Greer 1774)		x			NO
<i>Laccophilus minutus</i> (Linne, 1758)			[16]	NO	
<i>Porhydrus obliquesignatus</i> (Bielz, 1852)				NO	
Gyrinidae	<i>Gyrinus substriatus</i> (Stephens, 1828)	x	x	[16]	NO
Haliplidae	<i>Haliplus lineatocollis</i> (Marsham, 1802)	x	x		NO

Helophoridae	<i>Helophorus flavipes</i> (Fabricius, 1792)			[16]	NO
	<i>Helophorus brevipalpis</i> (Bedel, 1881)		x	[16]	NO
	<i>Helophorus alternans</i> (Gené, 1836)		x	[16]	NO
Hydraeneidae	<i>Hydraena assimilis</i> (Rey, 1885)	x	x		SI
	<i>Hydraena sicula</i> (Kiesenwetter, 1849)	x	x		SI
	<i>Hydraena similis</i> (D'Orchymont, 1930)		x		SI
	<i>Hydraena subimpressa</i> (Rey, 1885)	x	x		SI
	<i>Limnebius furcatus</i> (Baudi, 1872)		x		SI
	<i>Limnebius simplex</i> (Baudi, 1882)	x	x		SI
	<i>Ochthebius crenulatus</i> (Mulsant & Rey, 1850)		x		NO
Hydrochidae	-	x	x	[16]	-
Hydrophilidae	<i>Anacaena limbata</i> (Fabricius, 1792)		x	[16]	NO
	<i>Anacaena lutescens</i> (Stephens, 1829)	x	x		NO
	<i>Anacaena bipustulata</i> (Marsham, 1802)	x	x		NO
	<i>Berosus affinis</i> (Brulle, 1855)	x		[16]	NO
	<i>Enocrus nigrinus</i> (Sharp, 1872)			[16]	NO
	<i>Helocares lividus</i> (Forster, 1771)	x	x	[16]	NO
	<i>Enochrus quadripunctatus</i> (Herbst, 1797)		x	[16]	NO
	<i>Limnoxenus niger</i> (Gmelin, 1790)			[16]	NO
	<i>Laccobius neapolitanus</i> (Rottenberg, 1874)	x	x	[16]	NO
Hygrobiidae	<i>Hygrobia hermanni</i> (Fabricius, 1775)			[16]	NO
Histeridae	<i>Athous (Haplathous) cachecticus</i> (Candèze, 1860)	x	x	[3]	SI
	<i>Plegaderus (Plegaderus) dissectus</i> (Erichson, 1839)	x		[4]	NO
	<i>Abraeus (Abraeus) perpusillus</i> (Marsham, 1802)	x		[4]	NO
	<i>Margarinotus (Paralister) purpurascens</i> (Herbst, 1792)	x		[4]	NO
	<i>Platysoma (Cylister) elongatum elongatum</i> (Thunberg, 1787)	x		[1]	NO
Lucanidae	<i>Lucanus tetraodon sicilianus</i> (Thunberg, 1806)	x		[3]	SI
Melolontidae	<i>Rhizotrogus romanoi</i> (Sabatinelli, 1975)	x		[3]	SI
	<i>Aplidia massai</i> (Baraud, 1975)	x		[3]	SI
	<i>Osmoderma cristinae</i> (Sparacio, 1994)	x		[3]	SI
Nitidulidae	<i>Nitidula flavomaculata</i> (Rossi, 1790)	x		[12]	NO
	<i>Meligethes flavimanus</i> (Stephens, 1830)	x		[13]	NO
	<i>Epuraea marseuli</i> (Reitter, 1872)			[13]	NO
	<i>Acanthogethes fuscus</i> (Olivier, 1790)			[12]	NO
	<i>Pocadius adustus</i> (Reitter, 1888)			[12]	NO
Noteridae	<i>Noterus leavis</i>	x			NO
Pyrochroidae	<i>Pyrochroa serraticornis kiesenwetteri</i> (Fairmaire, 1849)	x		[3]	NO
Staphilinidae	<i>Anthophagus fauveli fauveli</i> (Luze, 1902)	x	x	[3]	SI
	<i>Tychus hennensis</i> (Sabella & Poggi, 1986)	x		[3]	SI
	<i>Tychus alicatai</i> (Sabella, 1992)	x	x	[3]	SI
	<i>Pselaphogenius peloritanus</i> (Holdhaus, 1910)	x		[3]	SI

	<i>Bryaxis marinae</i> (Sabella, 1989)	x	x	[3]	SI
	<i>Quedius andreinii</i> (Gridelli, 1924)	x		[3]	NO
	<i>Ocypus globulifer sicanus</i> (Fourcroy, 1785)	x		[3]	SI
	<i>Ocypus aethiops luigionii</i> (Waltl, 1835)	x		[3]	SI
Tenebrionidae	<i>Neatus noctivagus</i> (Mulsant & Rey, 1854)	x		[15]	NO
	<i>Pedinus (Pedinulus) ragusae</i> (Baudi, 1875)	x		[3]	NO
ODONATA					
Coenagrionidae	<i>Coenagrion puella</i> (Linnaeus, 1758)			[16]	NO
	<i>Coenagrion scitulum</i> (Rambur, 1842)		x	[16]	NO
	<i>Enallagma cyathigerum</i> (Charpentier, 1840)	x		[16]	NO
	<i>Pyrrhosoma nymphula</i> (Sulzer, 1776)		x	[16]	NO
	<i>Ischnura genei</i> (Rambur, 1842)	x		[16]	NO
Lestidae	<i>Lestes dryas</i> (Kirby, 1890)	x	x	[16]	NO
	<i>Lestes virens virens</i> (Charpentier, 1825)			[16]	NO
Aeshnidae	<i>Aeshna cyanea</i> (Muller, 1764)		x	[16]	NO
	<i>Aeshma affinis</i> (Van der Linden, 1820)			[16]	NO
Libellulidae	<i>Libellula depressa</i> (Linnaeus, 1758)	x	x	[16]	NO
	<i>Orthetrum anceps</i> (Schneider, 1845)			[16]	NO
	<i>Sympetrum sanguineum</i> (Muller, 1764)			[16]	NO
PLECOPTERA					
Nemouridae	<i>Nemoura cinerea</i> (Retzius, 1783)			[16]	NO
	<i>Protonemura</i> sp.	x		[16]	-
Taeniopterygidae	<i>Brachyptera</i> sp.	x		[16]	-
TEROPTERA					
Corixidae	<i>Corixa punctata</i> (Illiger, 1783)		x	[16]	NO
	<i>Hesperocorixa linnaei</i> (Fieber, 1848)			[16]	NO
	<i>Hesperocorixa moesta</i> (Fieber, 1848)		x	[16] [17]	NO
Naucoridae	<i>Naucoris maculatus conspersus</i> (Stal, 1876)	x		[16]	NO
Nepidae	<i>Nepa cinerea</i> (Linnaeus, 1758)	x		[16] [17]	NO
Notonectidae	<i>Anisops sardeus</i> (Herrich-Schaffer, 1849)			[16]	NO
	<i>Notonecta viridis</i> (Dclcourt, 1909)		x	[16]	NO
	<i>Notonecta meridionalis</i> (Poisson, 1926)	x	x	[16]	NO
	<i>Notonecta glauca</i> (Linnaeus, 1758)	x	x	[16]	NO
Pleidae	<i>Plea minutissima</i> (Leach, 1817)			[16]	NO
DIPTERA					
Chaoboridae	<i>Chaoborus flavicans</i> (Meigen, 1830)			[16]	NO
Chironomidae	<i>Procladius choreus</i> (Meigen, 1830)			[16]	NO
	<i>Polypedilum nubeculosum</i> (Meigen, 1830)			[16]	NO
	<i>Polypedilum laetum</i> (Meigen, 1830)			[16]	NO
	<i>Zavrelimyia</i> sp.			[16]	
	<i>Psectrotanypus</i> sp.			[16]	
	<i>Chironomus</i> sp.			[16]	

Athericidae	-			[16]	
Ceratopogonidae	-			[16]	
Culicidae	-			[16]	
Empididae	-			[16]	
Limoniidae	-			[16]	
Psychodidae	-			[16]	
Simuliidae	-			[16]	
Syrphidae	-			[16]	
Tabanidae	-			[16]	
TRICHOPTERA					
Limnephilidae	<i>Limnephilus flavicrnis</i> (Fabricius, 1789)	x	x	[16] [17]	NO
	<i>Limnephilus vittatus</i> (Fabricius, 1789)	x		[16]	NO
	<i>Limnephilus italicus</i> (McLachlan, 1884)	x		[16]	NO
	<i>Limnephilus bipunctatus</i> (Curtis, 1834)			[16]	NO
	<i>Grammotaulius nigropunctatus</i> (Retzius, 1783)		x	[16]	NO
Polycentropodidae	<i>Plectrocnemia sp.</i>			[16]	
EPHEMEROPTERA					
Baetidae	<i>Baetis rhodani</i> (Pictet, 1843)	x		[16]	NO
	<i>Cloeon dipterum</i> (Linné, 1761)	x		[16]	NO
Caenidae	<i>Caenis luctuosa</i> (Burmeister, 1839)		x	[16]	NO
CRUSTACEA					
Bosminidae	<i>Bosmina (Bosmina) longirostris</i> (O.F. Müller, 1785)	x	x	[17]	NO
	<i>Bosmina sp.</i>	x	x	[17]	-
Cyclopinidae	<i>Cyclops sp.</i>	x	x	-	-
ANELLIDAE					
Erpobdellidae	<i>Dina lineata</i> (O.F. Müller, 1776)			[16]	NO
Glossiphoniidae	<i>Batracobdella cfr algira</i> (Moquin-Tandon, 1846)	x	x	[16]	-
	<i>Glossiphonia cfr. paludosa</i> (Carena, 1824)	x	x	[16]	-

[1] (Baviera, 2006); [2] (Baviera and Sparacio, 2002); [3] (Baviera 2011); [4] (Baviera 2009); [5] (Baviera et al. 2017); [6] (Giachino et al., 2011); [7] (Baviera and Sassi, 2020); [8] (Biondi, 2005); [9] (Baviera and Biondi, 2015); [10] (Baviera, 2007); [11] (Baviera and Caldara, 2020); [12] (Baviera and Audisio, 2014); [13] (Audisio et al., 2005); [14] (Contarini, 2007); [15] (Baviera 2023); [16] (Sorgi et al., 2011); [17] (Ruffo and Stoch 2005).

Nell'area di studio sono state riportate in totale di 215 taxa, di cui 145 specie determinate presso il Biviere di Cesarò e 74 specie presso il lago Maulazzo.

In entrambi i laghi indagati gli artropodi rappresentano il *phylum* che domina qualitativamente la fauna, con 131 taxa determinati presso il Biviere e 59 determinati per il lago Maulazzo. Numeri molto più ridotti si sono registrati nel caso degli osteitti - di cui sono stati rilevati 5 taxa in entrambi i laghi - dei molluschi e degli anellidi (Fig. 18).

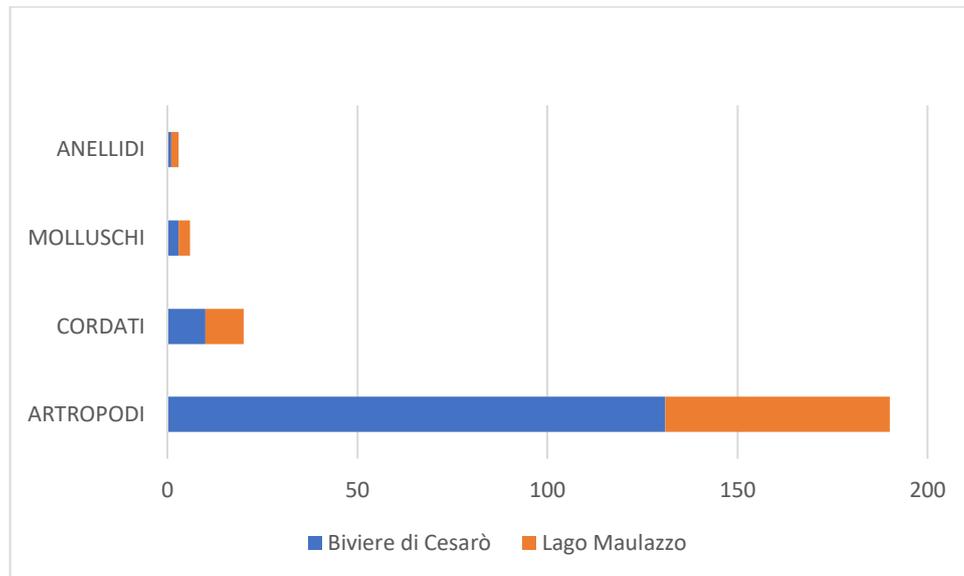


Figura 18 Prevalenza dei Phyla nelle aree di studio

Per gli artropodi la maggior parte dei taxa è risultata composta da Coleotteri, 112 specie per il Biviere e 37 per il lago Maulazzo, con a seguire Diretteri, Eterotteri, Efemerotteri e Plecotteri.

Numerose specie presentano distribuzione amplissima: 5 hanno distribuzione olartica, 7 paleartica, di cui 3 sono ditiscidi. Gran parte delle specie restanti ha un'ampia distribuzione: 8 Palearctica occidentale, in gran parte coleotteri; 9 Sibirico europee; 3 specie a distribuzione Centroasiatico-Europeo-Mediterraneo (Corotipo di specie distribuite dal deserto di Gobi alla depressione caspica, Iran, Medio Oriente, Anatolia, Caucaso, Europa centromeridionale, Nord Africa). Si sono rilevate anche 9 specie di categoria corologica Turanico-Europeo-Mediterraneo, distribuite in Europa (per lo più centromeridionale), Nord Africa, Medio Oriente, Anatolia.

Le altre specie individuate presentano una distribuzione confinate con l'area Europea-Mediterranea, tra cui: 11 ad ampia distribuzione europea; 11 a distribuzione mediterranea ristretta.

Gli esemplari di teleostei campionati risultano appartenere tutti a specie non indigene: due specie *C. carpio* e *P. fluviatilis* sono originari dell'Eurasia; la *T. tinca* è di origine Europea; le specie *A. melas* e *G. holbrooki* sono originarie del Nord – America.

3.3.1.1 Assemblaggio faunistico degli organismi acquatici

Di seguito è riportato un elenco delle specie osservate, così come la matrice dell'abbondanza (tabelle 11 e 12).

Tabella 11 Elenco e numero degli organismi acquatici campionati e osservati

Specie	Biviere Inverno	Maulazzo inverno	Biviere estate	Maulazzo estate
Cyprinus carpio	0	0	0	12
Tinca tinca	0	0	20	6
Ameiurus melas	0	0	150	41
Perca fluviatilis	0	0	4	4
Gambusia holbrooki	0	0	200	0
Esox lucius	0	0	5	0
Trachemys scripta elegans	0	0	0	1
Emys trinacris	0	0	2	1
Natrix natrix	0	0	20	5
Hyla intermedia	0	0	200	150
Bufo boulengeri siculus	0	0	20	10
Planorbis moquini	2	2	10	6
Planorbis planorbis	2	1	5	7
Physa acuta	3	1	4	5
Physa fontinalis	2	1	5	7
Acilius sulcatus	3	0	15	0
Agabus biguttatus	0	2	0	8
Agabus bipustulatus	0	0	7	0
Agabus nebulosus	2	0	6	0
Copelatus atriceps	0	1	0	3
Dytiscus marginalis	2	1	8	8
Hydroporus palustris	0	0	0	3
Hydroporus pubescens	1	2	2	4
Hydroporus memnonius	2	1	3	3
Hydroporus tessellatus	0	3	12	4
Laccophilus hyalinus	1	0	9	0
Laccophilus minutus	1	0	3	0
Porhydrus obliquesignatus	0	3	0	9
Gyrinus substriatus	0	0	0	1
Haliphus lineatocollis	1	0	6	4
Helophorus lavipes	0	3	0	7
Helophorus brevipalpis	0	2	0	7
Helophorus alternans	0	5	0	10
Hydraena assimilis	0	3	0	3
Hydraena sicula	0	4	0	7

Hydraena similis	0	2	0	9
Hydraena subimpressa	0	0	0	8
Limnebius furcatus	0	0	0	6
Limnebius simplex	2	0	8	3
Ochthebius crenulatus	0	2	0	2
Anacaena limbata	0	0	0	3
Anacaena lutescens	0	0	3	8
Anacaena bipustulata	2	1	5	3
Berosus affinis	2	0	8	0
Helocares lividus	1	0	3	4
Laccobius neapolitanus	0	0	2	2
Noterus leavis	2	0	7	0
Lestes dryas	0	0	13	7
Aeshna cyanea	0	0	0	10
Libellula depressa	0	0	16	18
Coenagrion scitulum	0	0	0	3
Enallagma cyathigerum	0	0	7	0
Pyrrhosoma nymphula	0	0	0	6
Ischnura genei	0	0	5	0
Nemoura cinerea	0	0	0	3
Protonemura sp.	0	0	2	1
Brachyptera sp.	0	0	3	2
Corixa punctata	0	0	0	4
Hesperocorixa linneaei	0	1	0	6
Hesperocorixa moesta	0	0	0	1
Naucoris maculatus conspersus	0	0	1	1
Nepa cinerea	2	1	3	3
Notonecta viridis	0	3	0	22
Notonecta meridionalis	0	2	10	6
Notonecta glauca	0	0	5	5
Plea minutissima	0	0	0	9
Chaoborus flavicans	0	0	0	3
Chironomus sp	0	0	32	22
Polypedilum laetum	0	0	0	9
Limnephilus flavicrnis	0	0	3	2
Limnephilus vittatus	0	0	2	0
Limnephilus italicus	0	0	1	0
Grammotaulius nigropunctatus	0	0	0	2
Baetis rhodani	0	0	4	0
Cloeon dipterum	0	0	2	0
Caenis luctuosa	0	1	0	12
Bosmina (Bosmina) longirostris	10	44	30	100
Bosmina	22	82	66	221

Cyclops	42	9	130	20
Batracobdella cfr algira	12	9	0	0
Glossiphonia cfr. paludosa	15	8	0	0

Tabella 12 Matrice di abbondanza degli organismi acquatici

Specie	Biviere Inverno	Maulazzo inverno	Biviere estate	Maulazzo estate
Cyprinus carpio	0	0	0	24,24242424
Tinca tinca	0	0	12,99923564	12,12121212
Ameiurus melas	0	0	97,49426734	82,82828283
Perca fluviatilis	0	0	2,599847129	8,080808081
Gambusia holbrooki	0	0	129,9923564	0
Esox lucius	0	0	3,249808911	0
Trachemys scripta elegans	0	0	0	2,02020202
Emys trinacris	0	0	1,299923564	2,02020202
Natrix natrix	0	0	12,99923564	10,1010101
Hyla intermedia	0	0	129,9923564	303,030303
Bufo boulengeri siculus	0	0	12,99923564	20,2020202
Planorbis moquini	1,299923564	4,04040404	6,499617822	12,12121212
Planorbis planorbis	1,299923564	2,02020202	3,249808911	14,14141414
Physa acuta	1,949885347	2,02020202	2,599847129	10,1010101
Physa fontinalis	1,299923564	2,02020202	3,249808911	14,14141414
Acilius sulcatus	1,949885347	0	9,749426734	0
Agabus biguttatus	0	4,04040404	0	16,16161616
Agabus bipustulatus	0	0	4,549732476	0
Agabus nebulosus	1,299923564	0	3,899770693	0
Copelatus atriceps	0	2,02020202	0	6,060606061
Dytiscus marginalis	1,299923564	2,02020202	5,199694258	16,16161616
Hydroporus palustris	0	0	0	6,060606061
Hydroporus pubescens	0,649961782	4,04040404	1,299923564	8,080808081
Hydroporus memnonius	1,299923564	2,02020202	1,949885347	6,060606061
Hydroporus tessellatus	0	6,060606061	7,799541387	8,080808081
Laccophilus hyalinus	0,649961782	0	5,84965604	0
Laccophilus minutus	0,649961782	0	1,949885347	0
Porhydrus obliquesignatus	0	6,060606061	0	18,18181818
Gyrinus substriatus	0	0	0	2,02020202
Halipus lineatocollis	0,649961782	0	3,899770693	8,080808081
Helophorus lavipes	0	6,060606061	0	14,14141414
Helophorus brevipalpis	0	4,04040404	0	14,14141414
Helophorus alternans	0	10,1010101	0	20,2020202

Hydraena assimilis	0	6,060606061	0	6,060606061
Hydraena sicula	0	8,080808081	0	14,14141414
Hydraena similis	0	4,04040404	0	18,18181818
Hydraena subimpressa	0	0	0	16,16161616
Limnebius furcatus	0	0	0	12,12121212
Limnebius simplex	1,299923564	0	5,199694258	6,060606061
Ochthebius crenulatus	0	4,04040404	0	4,04040404
Anacaena limbata	0	0	0	6,060606061
Anacaena lutescens	0	0	1,949885347	16,16161616
Anacaena bipustulata	1,299923564	2,02020202	3,249808911	6,060606061
Berosus affinis	1,299923564	0	5,199694258	0
Helocares lividus	0,649961782	0	1,949885347	8,080808081
Laccobius neapolitanus	0	0	1,299923564	4,04040404
Noterus leavis	1,299923564	0	4,549732476	0
Lestes dryas	0	0	8,449503169	14,14141414
Aeshna cyanea	0	0	0	20,2020202
Libellula depressa	0	0	10,39938852	36,36363636
Coenagrion scitulum	0	0	0	6,060606061
Enallagma cyathigerum	0	0	4,549732476	0
Pyrrhosoma nymphula	0	0	0	12,12121212
Ischnura genei	0	0	3,249808911	0
Nemoura cinerea	0	0	0	6,060606061
Protonemura sp.	0	0	1,299923564	2,02020202
Brachyptera sp.	0	0	1,949885347	4,04040404
Corixa punctata	0	0	0	8,080808081
Hesperocorixa linneaei	0	2,02020202	0	12,12121212
Hesperocorixa moesta	0	0	0	2,02020202
Naucoris maculatus conspersus	0	0	0,649961782	2,02020202
Nepa cinerea	1,299923564	2,02020202	1,949885347	6,060606061
Notonecta viridis	0	6,060606061	0	44,44444444
Notonecta meridionalis	0	4,04040404	6,499617822	12,12121212
Notonecta glauca	0	0	3,249808911	10,1010101
Plea minutissima	0	0	0	18,18181818
Chaoborus flavicans	0	0	0	6,060606061
Chironomus sp	0	0	20,79877703	44,44444444
Polypedilum laetum	0	0	0	18,18181818
Limnephilus flavicrnis	0	0	1,949885347	4,04040404
Limnephilus vittatus	0	0	1,299923564	0
Limnephilus italicus	0	0	0,649961782	0
Grammotaulius nigropunctatus	0	0	0	4,04040404
Baetis rhodani	0	0	2,599847129	0
Cloeon dipterum	0	0	1,299923564	0
Caenis luctuosa	0	2,02020202	0	24,24242424

Bosmina (Bosmina) longirostris	6,499617822	88,88888889	19,49885347	202,020202
Bosmina	14,29915921	165,6565657	42,89747763	446,4646465
Cyclops	27,29839485	18,18181818	84,49503169	40,4040404
Batracobdella cfr algira	7,799541387	18,18181818	0	0
Glossiphonia cfr. paludosa	9,749426734	16,16161616	0	0

Durante le fasi di campionamento presso il lago Mulazzo sono stati censiti complessivamente 1082 esemplari appartenenti a 12 diversi taxa. Gli organismi campionati sono appartenenti ai 4 Phyla: Chordata (230), Arthropoda (804), Mollusca (40), Anellida (17).

Nell'area del Biviere di Cesarò sono stati censiti complessivamente 1221 organismi, come nel Maulazzo appartenenti a 12 diversi taxa - Osteitti, Anfibi, Rettili, Molluschi, Insetti, Crostacei e Anellidi – attribuibili ai 4 Phyla: Chordata (621), Arthropoda (570), Mollusca (33), Anellida (27).

I risultati ottenuti attraverso il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn applicato alla matrice di abbondanza sono riportati nella tabella 13.

Tabella 13 Risultati del test di Dunn ottenuti confrontando i dati di abbondanza degli organismi acquatici provenienti dal Biviere di Cesarò e dal lago di Maulazzo, durante il periodo estivo e invernale

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Biviere Inverno vs. Maulazzo inverno	-23,46	No	ns	0,5371
Biviere Inverno vs. Biviere estate	-58,42	Yes	***	0,0001
Biviere Inverno vs. Maulazzo estate	-116,9	Yes	****	<0,0001
Maulazzo inverno vs. Biviere estate	-34,96	No	ns	0,0685
Maulazzo inverno vs. Maulazzo estate	-93,4	Yes	****	<0,0001
Biviere estate vs. Maulazzo estate	-58,44	Yes	***	0,0001

Il Biviere di Cesarò ha mostrato evidenti differenze nell'abbondanza faunistica tra l'inverno e l'estate, e una tendenza simile è stata osservata per il lago Maulazzo (rispettivamente $p=0,0001$ e $p<0,0001$).

Durante il periodo invernale non sono state rilevate differenze nei dati di abbondanza tra i due siti di campionamento indagati, mentre differenze marcate sono state osservate durante l'estate.

Le tendenze stagionali e spaziali dei descrittori ecologici N, S, J', H' sono mostrate in figura 19.

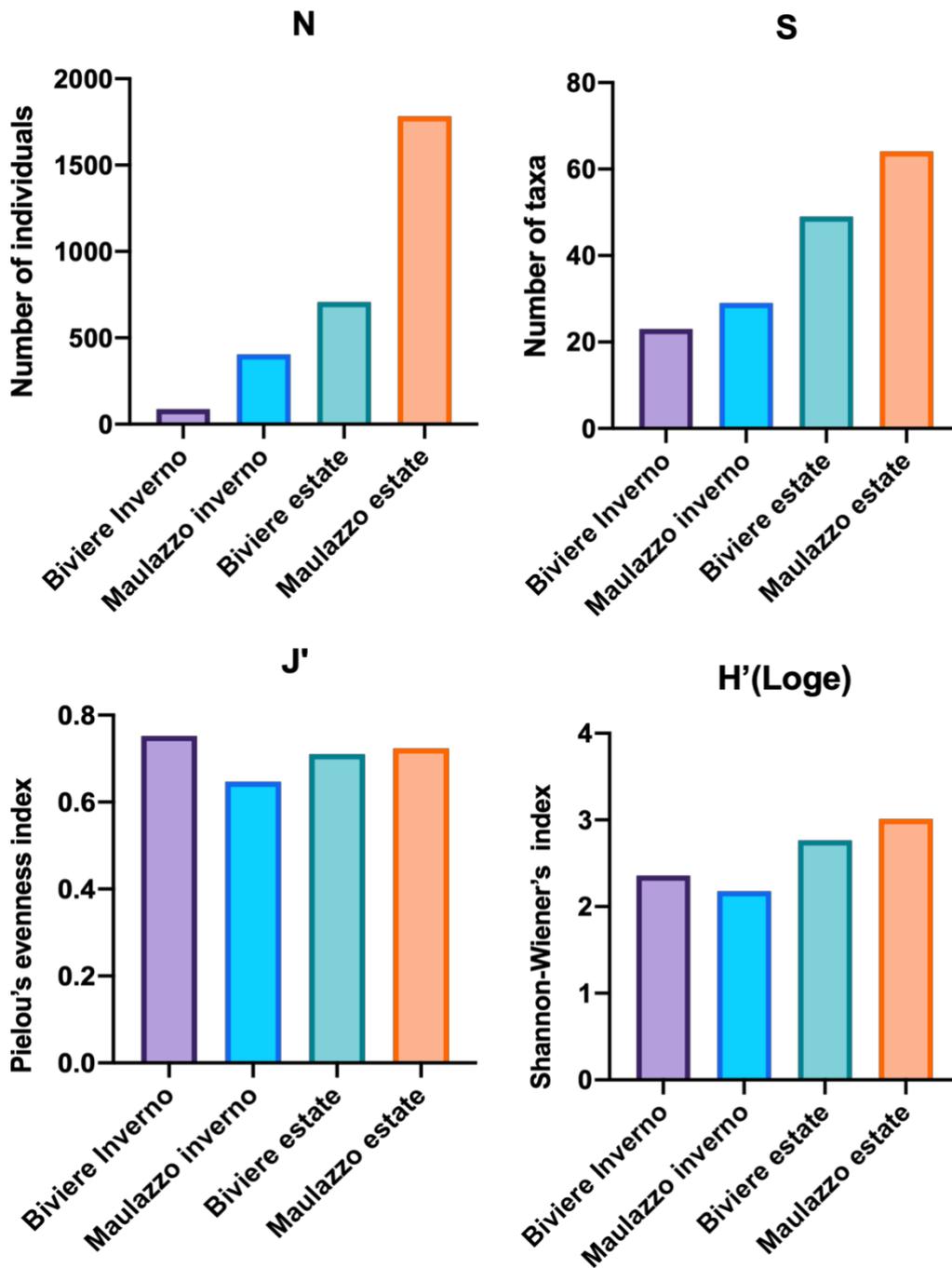


Figura 19 Tendenze stagionali e spaziali dei descrittori ecologici N, S, J', H'

3.3.1.2 Assemblaggio faunistico ambiente terrestre

Di seguito è riportato l'elenco delle specie osservate e la matrice di abbondanza relativa la fauna terrestre (tabelle 14 e 15).

Tabella 14 Elenco e numero degli organismi terrestri campionati e osservati

Specie	Biviere Inverno	Maulazzo inverno	Biviere estate	Maulazzo estate
Hierophis viridiflavus	0	0	4	0
Testudo hermanni	0	0	3	1
Aegosoma scabricorne (Scopoli, 1763)	0	0	3	0
Agrilus olivicolor	2	0	6	0
Anthracus transversalis	0	0	2	0
Bothrioderes bipunctatus	0	0	3	0
Brachinus (Brachynoptinus) italicus	1	0	6	0
Calathus (Calathus) montivagus	0	0	3	0
Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei	0	0	2	0
Carabus (Macrothorax) planatus	1	0	2	0
Cicindela campestris	2	0	7	0
Grammoptera ruficornis	1	0	4	0
Paracorymbia fulva	0	0	2	0
Platyderus canaliculatus	0	0	2	0
Polistichus fasciolatus	0	0	1	0
Prionus coriarius	0	0	1	0
Pseudovadonia livida	0	0	1	0
Rutpela maculata	0	0	2	0
Stictoleptura (Melanoleptura) scutellata	0	0	6	0
Stictoleptura (Melanoleptura) scutellata	2	0	2	0
Stictoleptura (Stictoleptura) cordigera	3	0	2	1
Stictoleptura (Stictoleptura) oblongomaculata	0	0	0	0
Catops marginicollis	0	0	1	0
Choleva (Choleva) sturmi	0	0	3	0
Dreposcia umbrina	0	0	4	0
Ptomaphagus (Ptomaphagus) tenuicornis mauritanicus	0	0	1	0
Aphthona flaviceps	0	0	4	0
Aphthona herbigrada	4	0	6	0
Aphthona nonstriata	3	0	3	0
Aphthona ovata	1	0	0	0
Aphthona pygmaea	0	0	3	0
Aphthona venustula	1	0	2	0
Batophila aerata	0	0	1	0
Cassida deflorata	2	0	7	2

Cassida margaritacea	3	0	7	0
Cassida rubiginosa	2	0	3	0
Cassida vittata	0	0	5	0
Chaetocnema arida	0	0	5	0
Chaetocnema concinna	0	0	7	0
Chaetocnema hortensis	0	0	2	0
Chaetocnema obesa	0	0	1	0
Chrysolina (Ovosoma) vernalis	2	0	1	0
Crepidodera aurata	0	0	3	0
Crepidodera aurea	3	0	1	0
Cryptocephalus (Burlinius) fulvus	1	0	6	0
Cryptocephalus (Burlinius) macellus	0	1	0	2
Cryptocephalus (Burlinius) scapularis	4	0	3	0
Cryptocephalus (Cryptocephalus) moraei	3	0	6	0
Cryptocephalus (Cryptocephalus) rugicollis	2	0	7	0
Galerucella solarii	0	0	1	0
Gonioctena (Spartoxena) theae	0	1	0	1
Hispa atra	0	0	1	0
Longitarsus anacardius	1	0	1	0
Longitarsus anchusae	1	0	1	0
Longitarsus juncicola	1	0	1	0
Longitarsus linnaei	1	0	6	0
Longitarsus lycopi	0	0	6	0
Longitarsus parvulus	3	0	0	0
Longitarsus pellucidus	0	1	0	0
Luperus biraghii	1	0	4	0
Pachybrachis exclusus	2	0	4	0
Pachybrachis exclusus	0	0	2	1
Phyllotreta consobrina	0	0	2	0
Phyllotreta corrugata	0	0	2	0
Timarcha (Timarcha) pimelioides	1	0	5	0
Curculio (Curculio) glandium	2	0	5	0
Curculio (Curculio) venosus venosus	0	0	7	0
Mecinus circulator	0	0	7	1
Mecinus pyraster	0	1	9	3
Orchestes (Orchestes) fagi	1	0	3	0
Orchestes (Orchestes) pilosus	3	0	3	0
Phyllobius (Parnemoicus) subdentatus	0	0	3	0
Phyllobius (Phyllobius) pyri reicheidius	3	0	2	0
Phyllobius argentatus	2	0	2	0
Rhamphus oxyacanthae	0	0	1	2
Ruteria bellieri	0	0	2	0
Smicronyx (Smicronyx) jungermanniae	0	0	2	0

Tychius (Tychius) cuprifer	0	0	5	1
Tychius (Tychius) cupriferoides	0	1	5	3
Tychius (Tychius) meliloti	0	0	3	0
Tychius (Tychius) polylineatus	0	0	3	0
Tychius (Tychius) tibialis	0	0	6	0
Lucanus tetraodon sicilianus	0	0	9	0
Aplidia massai	0	0	1	0
Osmoderma cristinae	0	0	2	0
Rhizotrogus romanoi	0	0	2	0
Nitidula flavomaculata	0	0	1	0
Meligethes flavimanus	0	0	1	0
Pyrochroa serraticornis kiesenwetteri	0	0	1	0
Neatus noctivagus	0	0	1	0
Pedinus (Pedinulus) ragusae	0	0	1	0
Abraeus (Abraeus) perpusillus	2	0	8	0
Athous (Haplathous) cachecticus	1	1	3	0
Margarinotus (Paralister) purpurascens	0	0	1	0
Platysoma (Cylister) elongatum elongatum	0	0	1	0
Plegaderus (Plegaderus) dissectus	0	0	1	0
Anthophagus fauveli fauveli	0	1	2	1
Bryaxis marinae	0	0	2	2
Ocypus aethiops luigionii	0	0	8	0
Ocypus globulifer sicanus	1	0	6	0
Pselaphogenius peloritanus	1	0	6	0
Quedius andreinii	0	0	5	0
Tychus alicatai	1	2	4	2
Tychus hennensis	0	0	2	0

Tabella 15 Matrice di abbondanza degli organismi terrestri

Specie	Biviere Inverno	Maulazzo inverno	Biviere estate	Maulazzo estate
Hierophis viridiflavus	0	0	2,599847129	0
Testudo hermanni	0	0	1,949885347	2,02020202
Aegosoma scabricorne (Scopoli, 1763)	0	0	1,949885347	0
Agrilus olivicolor	1,299923564	0	3,899770693	0
Anthraxus transversalis	0	0	1,299923564	0
Bothrideres bipunctatus	0	0	1,949885347	0
Brachinus (Brachynoaptinus) italicus	0,649961782	0	3,899770693	0
Calathus (Calathus) montivagus	0	0	1,949885347	0
Carabus (Chaetocarabus) lefebvrei	0	0	1,299923564	0
Carabus (Macrothorax) planatus	0,649961782	0	1,299923564	0
Cicindela campestris	1,299923564	0	4,549732476	0

Grammoptera ruficornis	0,649961782	0	2,599847129	0
Paracorymbia fulva	0	0	1,299923564	0
Platyderus canaliculatus	0	0	1,299923564	0
Polistichus fasciolatus	0	0	0,649961782	0
Prionus coriarius	0	0	0,649961782	0
Pseudovadonia livida	0	0	0,649961782	0
Rutpela maculata	0	0	1,299923564	0
Stictoleptura (Melanoleptura) scutellata	0	0	3,899770693	0
Stictoleptura (Melanoleptura) scutellata	1,299923564	0	1,299923564	0
Stictoleptura (Stictoleptura) cordigera	1,949885347	0	1,299923564	2,02020202
Catops marginicollis	0	0	0,649961782	0
Choleva (Choleva) sturmi	0	0	1,949885347	0
Dreposcia umbrina	0	0	2,599847129	0
Ptomaphagus (Ptomaphagus) tenuicornis mauritanicus	0	0	0,649961782	0
Aphthona flaviceps	0	0	2,599847129	0
Aphthona herbigrada	2,599847129	0	3,899770693	0
Aphthona nonstriata	1,949885347	0	1,949885347	0
Aphthona ovata	0,649961782	0	0	0
Aphthona pygmaea	0	0	1,949885347	0
Aphthona venustula	0,649961782	0	1,299923564	0
Batophila aerata	0	0	0,649961782	0
Cassida deflorata	1,299923564	0	4,549732476	4,04040404
Cassida margaritacea	1,949885347	0	4,549732476	0
Cassida rubiginosa	1,299923564	0	1,949885347	0
Cassida vittata	0	0	3,249808911	0
Chaetocnema arida	0	0	3,249808911	0
Chaetocnema concinna	0	0	4,549732476	0
Chaetocnema hortensis	0	0	1,299923564	0
Chaetocnema obesa	0	0	0,649961782	0
Chrysolina (Ovosoma) vernalis	1,299923564	0	0,649961782	0
Crepidodera aurata	0	0	1,949885347	0
Crepidodera aurea	1,949885347	0	0,649961782	0
Cryptocephalus (Burlinius) fulvus	0,649961782	0	3,899770693	0
Cryptocephalus (Burlinius) macellus	0	2,02020202	0	4,04040404
Cryptocephalus (Burlinius) scapularis	2,599847129	0	1,949885347	0
Cryptocephalus (Cryptocephalus) moraei	1,949885347	0	3,899770693	0
Cryptocephalus (Cryptocephalus) rugicollis	1,299923564	0	4,549732476	0
Galerucella solarii	0	0	0,649961782	0
Gonioctena (Spartoxena) theae	0	2,02020202	0	2,02020202
Hispa atra	0	0	0,649961782	0
Longitarsus anacardius	0,649961782	0	0,649961782	0
Longitarsus anchusae	0,649961782	0	0,649961782	0
Longitarsus juncicola	0,649961782	0	0,649961782	0

Longitarsus linnaei	0,649961782	0	3,899770693	0
Longitarsus lycopi	0	0	3,899770693	0
Longitarsus parvulus	1,949885347	0	0	0
Longitarsus pellucidus	0	2,02020202	0	0
Luperus biraghii	0,649961782	0	2,599847129	0
Pachybrachis exclusus	1,299923564	0	2,599847129	0
Pachybrachis exclusus	0	0	1,299923564	2,02020202
Phyllotreta consobrina	0	0	1,299923564	0
Phyllotreta corrugata	0	0	1,299923564	0
Timarcha (Timarcha) pimelioides	0,649961782	0	3,249808911	0
Curculio (Curculio) glandium	1,299923564	0	3,249808911	0
Curculio (Curculio) venosus venosus	0	0	4,549732476	0
Mecinus circulatus	0	0	4,549732476	2,02020202
Mecinus pyraster	0	2,02020202	5,84965604	6,060606061
Orchestes (Orchestes) fagi	0,649961782	0	1,949885347	0
Orchestes (Orchestes) pilosus	1,949885347	0	1,949885347	0
Phyllobius (Parnemoicus) subdentatus	0	0	1,949885347	0
Phyllobius (Phyllobius) pyri reicheidius	1,949885347	0	1,299923564	0
Phyllobius argentatus	1,299923564	0	1,299923564	0
Rhamphus oxyacanthae	0	0	0,649961782	4,04040404
Rutera bellieri	0	0	1,299923564	0
Smicronyx (Smicronyx) jungermanniae	0	0	1,299923564	0
Tychius (Tychius) cuprifer	0	0	3,249808911	2,02020202
Tychius (Tychius) cupriferoides	0	2,02020202	3,249808911	6,060606061
Tychius (Tychius) meliloti	0	0	1,949885347	0
Tychius (Tychius) polylineatus	0	0	1,949885347	0
Tychius (Tychius) tibialis	0	0	3,899770693	0
Lucanus tetraodon sicilianus	0	0	5,84965604	0
Aplidia massai	0	0	0,649961782	0
Osmoderma cristinae	0	0	1,299923564	0
Rhizotrogus romanoi	0	0	1,299923564	0
Nitidula flavomaculata	0	0	0,649961782	0
Meligethes flavimanus	0	0	0,649961782	0
Pyrochroa serraticornis kiesenwetteri	0	0	0,649961782	0
Neatus noctivagus	0	0	0,649961782	0
Pedinus (Pedinulus) ragusae	0	0	0,649961782	0
Abraeus (Abraeus) perpusillus	1,299923564	0	5,199694258	0
Athous (Haplathous) cachecticus	0,649961782	2,02020202	1,949885347	0
Margarinotus (Paralister) purpurascens	0	0	0,649961782	0
Platysoma (Cylister) elongatum elongatum	0	0	0,649961782	0
Plegaderus (Plegaderus) dissectus	0	0	0,649961782	0
Anthophagus fauveli fauveli	0	2,02020202	1,299923564	2,02020202
Bryaxis marinae	0	0	1,299923564	4,04040404

Ocypus aethiops luigionii	0	0	5,199694258	0
Ocypus globulifer sicanus	0,649961782	0	3,899770693	0
Pselaphogenius peloritanus	0,649961782	0	3,899770693	0
Quedius andreinii	0	0	3,249808911	0
Tychus alicatai	0,649961782	4,04040404	2,599847129	4,04040404
Tychus hennensis	0	0	1,299923564	0

Un totale di 399 esemplari appartenenti a 2 taxa diversi è stato censito presso il Biviere di Cesarò. Gli organismi campionati sono appartenevano a due Phyla: Chordata (7) e Arthropoda (392); presso il lago Maulazzo sono stati osservati 32 esemplari, appartenenti anche questi al Phylum Chordata (1) e al Phylum Arthropoda (32).

I risultati ottenuti attraverso il test di Kruskal-Wallis e il test post hoc di Dunn applicato alla matrice di abbondanza sono riportati nella tabella 16.

Tabella 16 Risultati del test di Dunn ottenuti confrontando i dati di abbondanza degli organismi terrestri provenienti dal Biviere di Cesarò e dal lago di Maulazzo, durante il periodo estivo e invernale

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Biviere Inverno vs. Maulazzo inverno	46,94	Yes	**	0,0073
Biviere Inverno vs. Biviere estate	-132,6	Yes	****	<0,0001
Biviere Inverno vs. Maulazzo estate	30,98	No	ns	0,196
Maulazzo inverno vs. Biviere estate	-179,6	Yes	****	<0,0001
Maulazzo inverno vs. Maulazzo estate	-15,96	No	ns	>0,9999
Biviere estate vs. Maulazzo estate	163,6	Yes	****	<0,0001

Il lago Biviere ha mostrato evidenti differenze nell'abbondanza faunistica tra l'inverno e l'estate, mentre non sono state osservate differenze stagionali nel lago Maulazzo (rispettivamente $p < 0,0001$ e $p > 0,05$).

Durante il periodo invernale sono state rilevate differenze significative nei dati di abbondanza tra i due siti di campionamento indagati ($p = 0,007$), e differenze marcate sono state osservate nel periodo estivo ($p < 0,0001$). Durante il periodo invernale sono state rilevate differenze significative tra i due siti di campionamento indagati ($p = 0,007$), e anche durante l'estate sono state marcate differenze significative ($p < 0,0001$).

Le tendenze stagionali e spaziali dei descrittori ecologici N, S, J', H' sono mostrate nella figura 20.

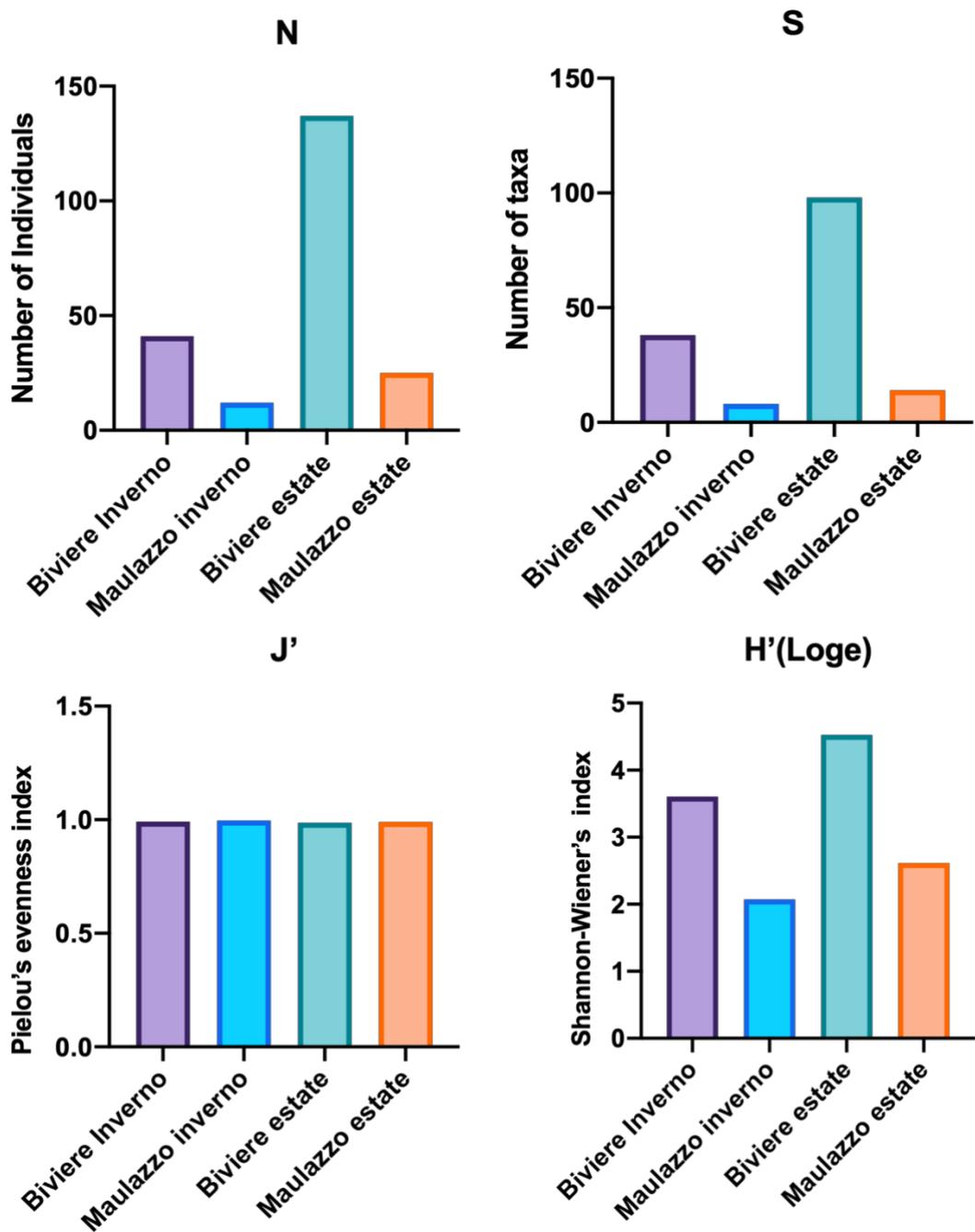


Figura 20 Tendenze stagionali e spaziali dei descrittori ecologici N, S, J', H'

3.4 Discussioni

Il presente studio ha registrato, quale elemento prevalente nell'ambito della caratterizzazione della biodiversità, un'ampia varietà di specie di Artropodi (80-85%), tra le quali si segnalano in particolare i Coleotteri.

I dati rilevati risultano sostanzialmente in linea con quanto ottenuto in diversi studi relativi alla caratterizzazione della biodiversità nelle acque interne (Bazzanti, Bella, and Seminara 2003; Della

Bella, Bazzanti, and Chiarotti 2005; Collinson et al. 1995; Miracle et al. 2010; Nicolet et al. 2004). Eyre et al. 1993; Fairchild et al. 2003; Luff, Eyre, and Rushton 1989)

Tali rilevazioni hanno consentito l'elaborazione di alcune importanti considerazioni in relazione alla presenza sia di specie non indigene (NIS) che di specie endemiche per la Sicilia.

Quanto alla componente ittica, è stato possibile dedurre come nessuna delle specie campionate sia da ritenersi endemica per l'area di studio. In generale, nel contesto siciliano la valutazione dei pesci ossei in termini di xenodiversità (componente della biodiversità costituita da specie alloctone) evidenzia attualmente una significativa insufficienza, in quanto, nonostante l'abbondante presenza di acque interne, sono stati oggetto di studio soltanto i corpi idrici interni della Sicilia sud-orientale (Duchi, 2004; Ferrito and Tignai, 1995) (Duchi, 2014; Russo et al., 1998).

Non sono dunque disponibili specifiche check-list aggiornate, mentre gli elenchi italiani includono spesso alcuni taxa la cui effettiva presenza nell'isola può essere ritenuta dubbia (Gherardi et al. 2008; Nocita and Zerunian 2007; Ruffo and Stoch 2005). Non sono state sufficientemente approfondite, infatti, le dinamiche che possono aver determinato nel tempo il trasferimento nelle acque interne della Sicilia di taxa autoctoni dell'Italia peninsulare (Bianco, 2014; Gherardi et al., 2008; Nocita and Zerunian, 2007).

Nella seconda metà del XX secolo in Sicilia sono stati costruiti numerosi corpi idrici artificiali, in quali, considerata la scarsa disponibilità di pesci d'acqua dolce autoctoni, sono stati popolati con specie di pesci non indigene per scopi ricreativi o utilitaristici (Faranda 1977; Naselli-Flores 1996).

Ad oggi circa il 70% delle specie ittiche presenti nelle acque interne siciliane (esclusi i taxa diadromi) sono specie non-indigene, indicate con l'acronimo NIS (non-indigenous species), introdotte nel corso del XX secolo (Gandolfi et al., 1991; Marrone and Naselli-Flores, 2015).

Ad esempio, l'introduzione massiccia e intenzionale di *Gambusia holbrooki*, avvenuta alla fine del secondo decennio del secolo scorso in seguito ad opere di bonifica, fu dovuta alla necessità di combattere la malaria (Consoli, 1928); questo Poeciliidae nordamericano è risultato infatti molto efficace nel contrasto alla diffusione delle larve di zanzara, per poi – tuttavia - divenire noto anche per il suo impatto dannoso sulla biodiversità autoctona (Margaritora et al., 2001; Vannini et al., 2018). Questo è stato introdotto nella maggior parte dei laghi agricoli e dei bacini di sbarramento ed è oggi tra i pesci alloctoni più diffusi nei corpi idrici siciliani.

Delle 5 specie ittiche campionate ed osservate, tutte possono essere catalogate come specie alloctone o parautoctone (specie introdotte in altre aree geografiche prima del 1.500 DC e successivamente diffuse attraverso fenomeni naturali di diffusione e dispersione).

Ad esempio, le due specie di ciprinidi presenti nell'area oggetto di studio – *C. carpio* e *T. tinca* - sono catalogate come parautoctone, in quanto introdotte prima del 1.500 DC. Tra i NIS riportati in Sicilia è stata documentata soltanto la *T. tinca*, la quale è stata probabilmente introdotta in epoca medievale come fonte di cibo (Duchi, 2018). Quanto alla carpa comune – *C. carpio* - si presume essere stata introdotta in epoca romana, anche se tale ipotesi è attualmente oggetto di dibattito.

Nell'ambito dell'analisi delle specie alloctone, una loro ulteriore introduzione si è registrata in seguito alle prime costruzioni di grandi dighe (la prima 32,8 Mm³), non più utilizzati successivamente al secondo dopoguerra (Alfonso et al., 2010).

In generale, poiché le specie di pesci endemiche della Sicilia necessitano di acque correnti e ben ossigenate, furono scelte altre specie alloctone in grado di sopravvivere nei nuovi *habitat* artificiali (Gandolfi et al., 1991).

In breve tempo, la maggior parte delle specie ittiche NIS introdotte (ad esempio *Rutilus rubilio*, *P. fluviatilis*, *A. melas*) si sono diffuse anche nella rete fluviale a monte, ampliando ulteriormente il loro areale di distribuzione nell'isola e prendendo il sopravvento sulle comunità biologiche insature e poco strutturate, caratterizzate da scarsa resistenza e resilienza nei confronti delle invasioni biologiche (Havel, Lee, and Zanden 2005). Un analogo meccanismo di diffusione si è determinato per i diversi gruppi di vertebrati alloctoni che, favoriti dalla maggiore disponibilità di corpi idrici rappresentata dai laghi e dagli stagni artificiali, hanno colonizzato le acque interne dell'isola. È stato rilevato come in queste aree, la dispersione realizzata sia stata più efficiente che in aree caratterizzate da una maggiore complessità degli *habitat* (Korn et al., 2010; Stoch et al., 2016).

È altamente probabile che l'introduzione di specie di pesci alloctoni abbia prodotto, come conseguenza, anche la diffusione di parassiti (*Neoergasilus japonicus*, *Anguillicola crassa*) e di alcuni invertebrati come *Daphnia spp.*, e *Acanthocyclops americanus* (Duggan and Pullan, 2017).

L'assenza di studi in merito risalente a prima degli anni '90 rende tuttavia arduo approdare ad una conclusione certa sul tema (Giannetto et al., n.d.; Marrone et al., 2005; Marrone and Naselli-Flores, 2015).

Un'ulteriore modalità di introduzione di specie alloctone in ambiente naturale da considerare per il suo impatto, è rappresentata dal rilascio di specie acquatiche NIS a fini ornamentali in acquariologia.

Si annoverano infatti numerosi casi documentati relativi a gasteropodi, cnidari e isopodi (Duggan et al., 2018; Patoka et al., 2016; Vecchioni et al., 2017), nonché a crostacei, rettili e anfibi (Faraone et al., 2017).

È opportuno tuttavia evidenziare come alcuni taxa di emididi appartenenti ai generi *Trachemys* e *Pseudemys* siano regolarmente presenti negli ecosistemi acquatici dell'isola, come ad esempio la *Trachemys scripta elegans*, la cui presenza è stata documentata anche nel presente studio. Sebbene non siano attualmente disponibili dati sull'effettiva presenza di eventi riproduttivi di successo in Sicilia, sono stati registrati eventi riproduttivi regolari di *Trachemys scripta* nell'Italia meridionale peninsulare (Crescente et al. 2014; Ficetola Thuiller and Padoa-Schioppa 2009).

Per quanto concerne la specie aliena di *Procambarus clarkii*, la cui pericolosa diffusione è stata ampiamente documentata nel contesto delle acque interne siciliane (Faraone et al., 2017), non ne è stata rilevata la presenza nelle aree oggetto del presente studio. Anche durante le analisi di sorting non sono state rinvenute parti di esoscheletro che potessero far ipotizzare la presenza di questa specie aliena altamente distruttiva per l'ecosistema. Diversamente da quanto emerso in altri studi e review sulle acque interne siciliane (Marrone and Naselli-Flores, 2015), la presente attività di ricerca ha evidenziato nelle aree in oggetto una forte prevalenza di taxa di invertebrati rispetto a quelli di vertebrati. Tale risultato è emerso sia dai campionamenti che dalle analisi dell'eDNA.

Quanto agli antropodi, il gruppo maggiormente presente è risultato essere rappresentato dalla famiglia dei carabidi, che in Italia, con circa 1.300 specie note, presenta una ricchezza di specie molto superiore a quella del nord e del centro Europa, sia sul piano qualitativo che su quello quantitativo. Nel genere *Carabus* rientrano tre specie steno endemiche di settori ristretti e una delle quali, il *C. planatus*, è stata campionata presso il Biviere di Cesarò.

Un altro gruppo di coleotteri rilevato in quantità significative è quello dei Cerambicidi, la cui presenza appare di importante interesse scientifico. Questa famiglia infatti, risentendo molto negativamente dell'incidenza di eventuali di fattori di disturbo e di alterazioni ambientali, può essere considerata come un significativo bioindicatore dello stato di conservazione della biodiversità. Relativamente a questa famiglia è stata documentata la presenza di *Prionus coriarius*, che indica un buono stato di salute del territorio prospiciente il corpo idrico (Ruffo and Stoch, 2005).

Tra le altre specie rilevate ve ne sono 5 appartenenti al genere *Tychius spp.* della famiglia dei Curculionoidi, che sono indicate tra le specie di interesse agrario.

Di particolare interesse è stata l'identificazione nel solo lago Maulazzo di 3 specie di coleotteri appartenenti al genere *Helophorus* sp., che vivono prevalentemente in acque ferme, anch'esse di norma considerate bioindicatori, in quanto riflettono quindi lo stato di salute dell'ambiente (Ruffo and Stoch, 2005; Sánchez-Fernández et al., 2006).

Gli Helophoridi passano la maggior parte del ciclo vitale in acqua, e di questi ne è stata campionata una specie nel lago Maulazzo.

Presso il Biviere di Cesarò è stato campionato la specie *Lucanus tetraodon sicilianus*, appartenente alla famiglia dei Lucanidi, sottospecie endemica della Sicilia, protetta da diverse normative nazionali e internazionali.

Relativamente alla famiglia Dytiscidae è stata campionata la specie *Copelatus atriceps*, originaria dell'ovest del Mediterraneo e classificata come vulnerabile e a distribuzione ristretta, ed è considerata rara per la Sicilia (Ruffo and Stoch, 2005), come pure la specie *Porhydrus obliquesignatus* campionata nel Maulazzo.

Come specie rare appartenenti alla famiglia Hydrophilidae è stata determinata la *Enrochus quadripunctatus*, la quale, benché considerata specie Europea viene indicata quale specie rara per la Sicilia (Ruffo and Stoch, 2005)

In conclusione, i risultati della lista specie effettuata in questo studio relativamente ai coleotteri acquatici ha permesso di registrare 12 specie appartenenti a quattro famiglie: *Gyrinus substriatus*, *Halipus lineatocollis*, *Helophorus brevivalpis*, *Hydraena assimilis*, *Hydraena sicula*, *Hydraena similis*, *Hydraena subimpressa*, *Limnebius furcatus*, *Limnebius simplex*, *Ochthebius crenulatus*, *Anacaena limbata*, *Anacaena bipustulata*, *Berosus affinis* e *Laccobius neapolitanus*. Esse sono tutte segnalate per la prima volta presso il lago Maulazzo, *Anacaena bipustulata* è segnalata per la prima volta per il Biviere di Cesarò.

Da evidenziare come la specie *Hygrobia hermanni*, riportata come rara da CKmap, e campionata nell'area di studio da Sorgi e colleghi nel 2011, non è stata di rilevata nella presente attività di ricerca.

Per quanto concerne il taxon dei Tricotteri, le due specie raccolte più interessanti sono il *Limnephilus italicus*, che presenta una distribuzione ristretta e rientra nella categoria corologica Alpino-Appenninica, e il *Grammotaulius nigropunctatus*, riportata come specie rara per la Sicilia e rientra nella categoria corologica Palearctica (Ruffo and Stoch, 2005).

In riferimento al gruppo degli etererotteri, la specie rilevata di *Naucoris maculatus cospersus* rientra tra quelle a distribuzione ristretta, corologicamente attribuita alla zona ovest del Mediterraneo Occidentale, mentre la *Hesperocoixa linnaei*, riportata come specie rara per la Sicilia, presenta un'ampia distribuzione geografica rientrando nella categoria corologica centro Asiatica-Europea.

Tra gli odonati ha evidenziato un particolare rilievo l'identificazione della specie *Lastes virens virens*, corologicamente attribuita al Mediterraneo, la quale presenta una distribuzione ristretta e viene descritta come specie rara per la Sicilia.

Tra gli irudeni è stata campionata la *Batracobdella algira*, della famiglia Glossifoniidi, una specie descritta come vulnerabile e segnalata per lo più in Sardegna (Sorgi et al., 2011). Le popolazioni di questa specie, che colonizzano preferibilmente le acque sotterranee, sono state descritte come parassiti degli anfibi del genere *Hydromantes*. Viceversa, gli irudinei delle famiglie Emopidi ed Erpobdellidi mostrano un comportamento predatorio e si nutrono soprattutto di larve di insetti o di crostacei.

Le specie di molluschi campionati nell'area in oggetto risultano ampiamente descritte per le acque interne Siciliane e Italiane (Sorgi et al., 2011).

Sebbene molte specie riportate non effettuino il ciclo vitale in acqua, mediante processi naturali (la caduta dell'organismo dalla vegetazione in acqua, spostamenti dovuti al forte vento, o spostamenti dovuti a cause antropiche) queste arrivano nel corpo idrico ed entrano a far parte della catena trofica dell'ecosistema del sistema acquatico.

Tra le specie batteriche identificate mediante le analisi dell'eDNA dei campioni di acqua prelevati dal Biviere, emerge una significativa molteplicità di classi batteriche – quali Alfraproteobatteri e Acidobatteri – che prediligono ambienti acidi per la crescita (Yun et al., 2016).

Di particolare interesse ai fini della presente ricerca è la discrasia riscontrata in relazione alla presenza degli Helophoridi tra i due laghi. Trattandosi infatti di un'importante famiglia comprendente specie bioindicatrici, che trascorre la maggior parte del proprio ciclo vitale in acqua, il suo mancato rilevamento nel lago Biviere, caratterizzato da un maggiore livello di acidificazione ed esposto a temperature più elevate, potrebbe essere riconducibile ad un effetto negativo sulla biodiversità provocato dagli elevati livelli di CO₂ nell'atmosfera e dal surriscaldamento climatico. È infatti scientificamente notorio come l'assorbimento da parte delle acque interne di elevati livelli di CO₂ determini un progressivo processo di acidificazione dovuto all'abbassamento del livello di pH e

come, contestualmente, l'incremento della temperatura dell'acqua favorisca la riduzione dei livelli di pH (Adrian et al., 2009; Moser et al., 2019; Pötter et al., 2021).

Capitolo 4 ANALISI DEI PARAMETRI AMBIENTALI

4.1 Introduzione

Il concetto di monitoraggio ambientale viene definito dalla European Environment Agency (EEA) come “la misurazione, valutazione e determinazione di parametri ambientali e/o di livelli di inquinamento, periodiche e/o continuate allo scopo di prevenire effetti negativi e dannosi verso l’ambiente”.

In tale ottica, esso rappresenta uno strumento preliminare fondamentale per la valutazione e la gestione delle problematiche ambientali, come la riduzione della biodiversità.

Nell’ambito del processo di valutazione ed elaborazione di politiche, piani e programmi ambientali, le attività delle reti di monitoraggio forniscono dati che le autorità competenti possono utilizzare per l’analisi della situazione presente e per la stima di futuri scenari di impatto.

Il monitoraggio dei corpi idrici (laghi e invasi) è attualmente realizzato ai sensi della Direttiva quadro europea sulle acque (2000/60/CE) - recepita in Italia dal D.Lgs. 152/2006 (dal DM 260/2010 e dal D.Lgs. 172/2015) – al fine di determinare lo stato di qualità dei corpi idrici sulla base di parametri e indicatori ecologici, idrologici e chimico-fisici.

Lo stato ecologico, che descrive la qualità della struttura e del funzionamento degli ecosistemi acquatici associati alle acque superficiali, è definito dagli Elementi di Qualità Biologica (EQB) e dagli elementi fisico-chimici e chimici, a sostegno degli elementi biologici.

Per una corretta valutazione dello Stato Ecologico degli invasi risulta necessario analizzare: l’elemento di qualità biologica (EQB) fitoplancton, attraverso il calcolo dell’indice complessivo per il fitoplancton (ICF o IPAM); i parametri chimico-fisici indicati nell’allegato 1 del DM 260/2010 (concentrazione del fosforo, ossigenazione delle acque di fondo e trasparenza dell’acqua), che si valutano attraverso il calcolo del livello trofico dei laghi (LTLecco); e le sostanze inquinanti non appartenenti all’elenco di priorità (tab. 1/B del DM 260/10 e del D.Lgs. 172/2015), in relazione alla conformità o meno agli Standard di Qualità Ambientale in termini di media annua (SQA-MA).

Tra gli obiettivi minimi di qualità ambientale, ai sensi della suddetta normativa, è previsto il raggiungimento per tutti i corpi idrici di un indice di qualità corrispondente allo stato di “buono” e il mantenimento dello stato di “elevato”, nei casi in cui sia stato raggiunto in precedenza.

Tabella 17 Classi di Stato Ecologico rappresentate da specifici colori

Elevato*	Blue
Buono	Green
Sufficiente	Yellow
Scarso	Orange
Cattivo	Red

La valutazione della qualità chimica ed ecologica di un corso d'acqua consente non soltanto di definire il livello di qualità ambientale, bensì anche di ottenere preziose informazioni relativamente all'indice di biodiversità dello stesso.

La qualità delle acque interne - quali fiumi, laghi e zone umide - può cambiare sulla base di una serie di fattori naturali o indotti da attività umane. Da un punto di vista chimico, la qualità dell'acqua può essere influenzata da una molteplicità di inquinanti, tra cui i nutrienti provenienti dal deflusso agricolo, dagli scarichi industriali e municipali, e dal deflusso delle acque meteoriche delle aree urbane. Un eccesso di nutrienti, come l'azoto e il fosforo, può causare fioriture algali che possono ridurre l'ossigeno disciolto nell'acqua e danneggiare la vita acquatica.

In un tale quadro di carattere generale, il presente studio ha inteso approfondire i parametri chimico-fisici e microbiologici maggiormente impattanti in relazione al preminente fattore della biodiversità. Da un punto di vista chimico, la qualità delle acque è generalmente determinata da vari fattori e parametri che riflettono la loro composizione e il loro potenziale di supporto alla vita acquatica e all'uso umano. Gli importanti aspetti chimici considerati nel presente lavoro sono i seguenti:

- Temperatura
- pH
- Ossigeno disciolto (DO)
- Torbidità
- Conducibilità
- Potenziale redox
- COD
- Clorofilla a
- Livelli di nutrienti
- Metalli pesanti e sostanze tossiche
- Pesticidi organoclorurati
- Clorobenzeni

- Composti alifatici clorurati cancerogeni
- Anioni

Dal punto di vista microbiologico, le acque interne possono essere generalmente contaminate da batteri, virus e protozoi che possono rappresentare un rischio per la salute dell'uomo e degli organismi acquatici, influenzando negativamente la biodiversità. La contaminazione può derivare da fonti quali gli scarichi fognari non trattati, il deflusso di rifiuti animali e il deflusso delle acque meteoriche delle aree urbane.

La qualità microbiologica delle acque interne è un aspetto essenziale al fine di stimarne la sicurezza e l'idoneità a vari usi.

I parametri microbiologici indagati nel presente studio sono: *Escherichia coli*, coliformi totali, vibriani, clostridi solfito-riduttori e salmonella.

Un ulteriore fattore perturbativo dell'equilibrio degli ecosistemi, attualmente oggetto di un'ampia attività di studio scientifico, è costituito dall'inquinamento provocato da microplastiche, ossia da minuscole particelle di plastica - di dimensioni comprese tra 0,1 mm e 5 mm - che rappresentano un sempre più diffuso inquinante di origine antropica (Phuong et al., 2016).

Di tali detriti antropogenici si è registrata l'attuale diffusione esponenziale negli ecosistemi, sia terrestri che acquatici, di tutto il mondo (Cózar et al., 2014; Phuong et al., 2016; Prata, 2018; Reisser et al., 2013) (Browne et al., 2011).

Nell'ambito del presente studio, le microplastiche rintracciate sono state classificate sulla base dei parametri di dimensione, forma e colore.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Analisi chimico fisica

I parametri chimico-fisici quali Temperatura dell'acqua, pH, Ossigeno Disciolto e Conducibilità Potenziale Redox sono stati misurati sul campo utilizzando una sonda multiparametrica HI9829 (Hanna instruments).

La torbidità è stata valutata mediante il disco di Secchi.

Con i dati relativi i parametri ambientali, è stata eseguita una statistica descrittiva e un'analisi della varianza a due vie (two-way ANOVA) al fine di valutare la variabilità spaziale e temporale.

4.2.1.1 Determinazione di anioni e cationi nelle acque naturali

La determinazione di anioni e cationi nelle acque naturali è stata effettuata mediante cromatografia ionica ad alte prestazioni (HPIC), utilizzando un metodo interno nei laboratori del dipartimento del Chibiofaram. Le analisi sono state eseguite utilizzando un cromatografo Dionex DXLAN 500 dotato di una pompa a gradiente quaternario (Dionex GP40) e di un rivelatore elettrochimico ED40 collegato a un rivelatore di conducibilità (CD20) accoppiato a un soppressore elettrolitico auto-rigenerante.

Per la determinazione qualitativa e quantitativa dei cationi (Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+}), il sistema cromatografico era dotato di una pre-colonna (Dionex Ion-Pac CS10, 4 x 50 mm) e di una colonna analitica (Dionex Ion-Pac CS10, 4 x 250 mm). Il solvente di eluizione era HCl (Riedel-deHaen; Seelze, Germany) 25 mmol L⁻¹, pompato a 1,0 ml/min; il sistema di iniezione era un Loop da 25 µL. La soppressione dell'eluente è stata effettuata mediante un soppressore elettrolitico auto-rigenerante (Dionex CSRSUltra 300 4mm).

Per la determinazione qualitativa e quantitativa degli anioni (F^- , Cl^- , NO_2^- , SO_4^{2-} , NO_3^- e PO_4^{3-}), il sistema era dotato di una precolonna (Dionex Ion-Pac AGIIHC, 4 x 50 mm) e di una colonna analitica (Dionex Ion-Pac ASIIHC, 4 x 250 mm). Il solvente di eluizione era NaOH (Riedel deHaen; Seelze, Germania) 10 mmol L⁻¹, pompato a 1,0 ml/min; il sistema di iniezione era un Loop da 25 µL. La soppressione dell'eluente è stata effettuata mediante un soppressore elettrolitico auto-rigenerante (Dionex ASRS-Ultra 300 4mm).

Le soluzioni standard sono state preparate pesando i solidi (Fluka®) di purezza analitica. I sali di NaCl e KCl sono stati precedentemente essiccati in forno a T = 383,15 K per 24 ore. NH₄Cl è stato tenuto

sottovuoto per almeno 24 ore e poi pesato. Le soluzioni standard di $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ sono state standardizzate con EDTA.

Le soluzioni standard per la preparazione delle curve di calibrazione degli anioni sono state preparate pesando i solidi: NaCl, $NaNO_3$, $NaNO_2$, NaF, Na_3PO_4 e Na_2SO_4 di sale (Fluka®) di purezza analitica, precedentemente essiccati in forno a $T = 383,15$ K per almeno 24 h.

Tutti i campioni sono stati preparati con acqua ultrapura per le analisi HPLC e filtrati con filtri a membrana MF Millipore® (dimensione dei pori $0,45 \mu m$) prima dell'iniezione nel sistema cromatografico. Il coefficiente di correlazione lineare delle curve di calibrazione (cationi e anioni) è sempre stato $>0,9980$. Ogni campione è stato diluito con acqua ultrapura per l'analisi HPLC in un rapporto di 1:1 e analizzato in triplicato. Le concentrazioni (in ppm) riportate nelle due tabelle sono i valori medi \pm Std. Dev.

4.2.1.2 Determinazione del mercurio nei sedimenti e nella componente biologica

Nel corso di questa fase dello studio, per la valutazione del mercurio nei sedimenti e nel tessuto muscolare dei teleostei è stata adottata la metodica della Spettrometria di Assorbimento Atomico con Generazione di Vapore Freddo (VC-AAS) al fine di determinare la concentrazione di mercurio nei campioni di sedimento prelevati.

La preparazione dei campioni è avvenuta attraverso il trattamento di campioni contenenti sali di mercurio con agenti riducenti quali l'acido cloridrico (HCl) e il cloruro stannoso ($SnCl_2$). Questi agenti riducenti hanno permesso la conversione dei sali di mercurio in mercurio elementare (Hg^0), una forma volatile del mercurio.

Successivamente, i campioni di mercurio elementare sono stati convogliati attraverso un sistema di trasporto appositamente progettato per separare i vapori di mercurio dalle altre componenti dei campioni e concentrarli in una cella di misura.

In questa cella di misura, i vapori di mercurio sono stati esposti a una radiazione ultravioletta (UV) emessa da una lampada al mercurio. L'irraggiamento con luce UV ha eccitato gli atomi di mercurio, portandoli a livelli energetici superiori.

L'assorbimento atomico è stato misurato attraverso l'analisi della radiazione emessa dagli atomi di mercurio quando ritornano ai loro livelli energetici originali. Questa fase è stata fondamentale per determinare la concentrazione di mercurio presente nei campioni. Prima dell'analisi, sono stati preparati campioni di riferimento con concentrazioni note di mercurio. Questi campioni sono stati

utilizzati per creare una curva di calibrazione che ha permesso di correlare l'assorbimento atomico con la concentrazione di mercurio. Durante l'analisi, sono stati inclusi campioni di controllo di qualità al fine di garantire l'accuratezza e la precisione delle misurazioni. I dati ottenuti dalla Spettrometria di Assorbimento Atomico con Generazione di Vapore Freddo sono stati elaborati utilizzando la curva di calibrazione precedentemente creata. Questa elaborazione ha consentito di determinare la concentrazione di mercurio nei campioni analizzati, espressa nelle unità di misura appropriate.

4.2.2 Analisi microbiologiche

Le analisi microbiologiche sono state effettuate utilizzando la tecnica delle membrane filtranti facendo riferimento alla normativa vigente, al Manuale APAT 46/2007, ai manuali ISPRA e ICRAM e alle indicazioni del Ministero della Transizione Ecologica.

Al fine di ottenere una comprensione migliore dello stato di salute degli ambienti presi in esame, i campionamenti per questo tipo di analisi sono stati effettuati sia nella stagione invernale che in quella estiva.

Gli indicatori di contaminazione microbiologica analizzati sono costituiti da enterococchi, *Escherichia coli*, coliformi totali, vibrioni, clostridi solfito-riduttori e salmonella

4.2.2.1 Rilevazione di *E. coli*, Enterococchi, Coliformi totali e *Vibrio sp.*

Le analisi per la rilevazione di *E. coli*, Enterococchi, Coliformi totali e *Vibrio sp.* sono state effettuate con il metodo delle membrane filtranti, utilizzando membrane con porosità di 0,45 µm. Dai quattro siti MA1, MA2 BA1 e BA2 sono state filtrate tre repliche di 100ml di acqua per ogni parametro ricercato, sia dell'acqua superficiale che di quella del fondo.

Dopo la filtrazione, le membrane sono state poste su piastre di Petri contenenti i terreni di coltura selettivi. I terreni di coltura selettivi utilizzati sono stati Chromogenic Coliforms Agar (CCA, OXOID) per la ricerca di *E. coli* (APAT 7030), le cui colonie si presentano di colore blu, e per quella dei Coliformi totali (APAT 7010), che si presentano di colore rosso/rosa. Per la ricerca di Enterococchi (APAT 7040) e *Visbrio sp* (APAT. 7090) sono stati utilizzati rispettivamente Medium Azide Nutrient Pad (Sartorius) e Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBS, OXOID).

Le piastre di CCA e TCBS Agar sono state incubate a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 24 ore, mentre quelle di Azide Nutrient Pad a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ per 48 ore.

Dopo l'incubazione su CCA sono state contate le colonie che mostravano una colorazione blu, presunte di *E. coli*, e quelle che mostravano una colorazione rosso/rosa, presunte di coliformi totali. Le colonie verdi che crescevano sul TCBS sono state identificate come *Vibrio sp.* Le colonie rosso-marrone scuro sviluppatesi su Azide Nutrient Pad sono state considerate ed enumerate come Enterococchi. I risultati mostrano i valori medi ottenuti da ogni replica ed espressi come Unità Formanti Colonie (UFC) sul volume di acqua analizzato. In ogni test sono stati eseguiti controlli positivi e negativi, e il 5% delle colonie è stato confermato da test biochimici utilizzando il sistema miniaturizzato API20E (biomérieux).

4.2.2.2 Ricerca delle spore di Clostridi solfito-riduttori

Per la ricerca in acqua delle spore di clostridi solfito-riduttori è stata utilizzata la tecnica delle membrane filtranti e quella dell'inclusione in agar (APAT 7060).

Tre aliquote da 100 ml di acqua delle quattro stazioni e delle due diverse profondità, sono state incubate a 70°C; i campioni d'acqua sono stati poi filtrati e i filtri sono stati posti in piastre Petri contenenti il terreno Sulphite Polymixium Sulphadiazene Agar (SPS, OXOID). In condizioni di asepsi sono stati posti sulla superficie delle membrane alcuni millilitri di terreno, mantenuto liquido a bagnomaria ad una temperatura di 50°C, per favorire la crescita dei microrganismi in condizioni di anaerobiosi. Dopo la solidificazione dello strato superficiale le piastre sono state incubate in condizioni di anaerobiosi.

L'incubazione avviene in anaerobiosi, ponendo le piastre in apposita giara (OXOID) in cui è stato posto un generatore di CO₂ (Anaerogen, OXOID). Le giare vengono messe ad incubare in una stufa termostata a 36±1 °C per 24 ore. Dopo il periodo di incubazione, è stata effettuata la conta diretta delle colonie caratterizzate da una colorazione grigio-nera, di dimensioni 3-5 mm di diametro. Le colonie, immerse nello spessore dell'agar, devono la loro caratteristica colorazione alla riduzione del solfito in solfuro, operata da tali microrganismi. Le colonie ben isolate sono state trasferite, mediante anse sterili, su terreno Tryprone Soya Agar (TSA, OXOID) ed incubate sempre in condizioni di anaerobiosi). Le colonie ben isolate sulle piastre di TSA, sono state trasferite in soluzione fisiologica sterile per essere sottoposte ai test biochimici per l'identificazione. In ogni prova è stato eseguito il controllo positivo e negativo, e solo il 5% delle colonie è stato sottoposto a identificazione biochimica (API20A).

4.2.2.3 Rilevazione di Salmonella

Le analisi per la rilevazione di Salmonella sono state eseguite applicando il metodo della filtrazione su membrana e della successiva semina in terreno selettivo (Met. 7080). Un campione di 1L è stato filtrato con una pompa ad acqua, utilizzando membrane con porosità di 0,45 µm. È seguito un pre-arricchimento in 100 ml di acqua peptonata e un'incubazione a 37°C per 24 ore. Dopo questo periodo, tre aliquote da 100 µl del brodo di pre-arricchimento sono state inoculate in tre provette contenenti 10 ml di un brodo di arricchimento, Rappaport Vassiliadis (RVS) (Merk), e incubate a 44°C per 24 ore. Dopo l'incubazione, con un'ansa sterile da 1µL, sono state seminate su piastre di agar McConkey (Merk), e incubate a 37°C per 24 ore. Dopo l'incubazione, l'identificazione è stata eseguita con il sistema miniaturizzato API20E (BioMerieux). In ogni test sono stati eseguiti controlli positivi e negativi. I risultati sono stati espressi come presenza-assenza in un litro di campione analizzato nelle tre repliche.

4.2.3 Ricerca delle microplastiche in acqua

La presenza delle microplastiche può essere valutata analizzando diverse matrici. In questo studio la ricerca di microplastiche è stata effettuata analizzando campioni di acqua ambientali, che rappresentano sostanzialmente una singola istantanea nel tempo.

4.2.3.1 Preparazione dei campioni

Prima delle procedure di estrazione, i campioni sono stati accuratamente trattati per ridurre al minimo la contaminazione aerea e crociata, seguendo il protocollo descritto da Savoca et al. (2021). Le fasi di filtrazione sono state svolte in locali ad accesso limitato o in una cabina a flusso laminare per evitare la contaminazione da fibre. Per l'intero processo di analisi sono state utilizzate attrezzature in vetro sterilizzate e gli strumenti di estrazione sono stati rigorosamente puliti con etanolo al 90% e lavati per due volte con acqua deionizzata filtrata. Terminata la fase di filtrazione, i filtri sono stati conservati in piastre Petri coperte. Inoltre, tutte le soluzioni utilizzate sono state pre-filtrate da un sistema di pompe da vuoto (Millipore) attraverso un filtro GF/F da 47 mm e 0,7µm (Whatman).

Al fine di verificare un'eventuale contaminazione atmosferica sono stati eseguiti controlli negativi, e dunque, nella fattispecie, i filtri in fibra di vetro nuovi sono stati posti in piastre Petri ed esposti all'aria come avveniva per i filtri utilizzati per la filtrazione.

Tutte le attrezzature utilizzate per l'analisi dei campioni sono state lavate con etanolo al 90% e sciacquate con acqua deionizzata filtrata prima dell'uso.

4.2.3.2 Ricerca delle microplastiche

Ogni campione d'acqua è stato filtrato entro 48 ore dalla raccolta. I volumi accurati di tre repliche di campioni d'acqua da 5 L sono stati misurati prima con cilindri di vetro e poi filtrati con sistema di pompa a vuoto (Millipore) attraverso l'utilizzo di filtri da 47 mm GF/F 0,7 μm (Whatman GF/F, UK). Tali filtri sono stati raccolti in singole piastre Petri sterili per la successiva ispezione visiva allo stereomicroscopio (Zeiss Stemi 508). I detriti antropici isolati sono stati fotografati (Axiocam 105 Color), contati e classificati in base alle dimensioni, alla forma (fibre, frammenti e pellet) e al colore come descritto da Justino et al., (2021).

4.3 Risultati

4.3.1 Informazioni generali

Le analisi delle acque sono state effettuate su campioni provenienti dal Biviere di Cesarò e da lago Maulazzo. Nelle tabelle di seguito sono riportate le informazioni generali dei punti di prelievo relativi ai due laghi per i campionamenti estivi e invernali.

Tabella 18 Dati del campionamento invernale effettuato presso il Biviere di Cesarò

BIVIERE DI CESARÒ INVERNO 2022				
Punto di campionamento	BIV-A1	BIV-A1	BIV-A2	BIV-A2
Superficie del lago	153.855,16 m ²			
Profondità del prelievo	3m	0m	3m	0m
Metodologia di campionamento	D. lgs. 152/99 e s.m.i. (bottiglia di Niskin)			
Denominazione del campione	BA1-F	BA1-S	BA2-F	BA2-S
Data	05/12/2022	05/12/2022	05/12/2022	05/12/2022
Ora	9:30	9:38	9:55	10:00
Analisi Chimica				
Analisi Microbiologica	X	X	X	X
Ricerca di microplastiche			X	X

Tabella 19 Dati del campionamento estivo effettuato presso il Biviere di Cesarò

BIVIERE DI CESARÒ ESTATE 2023				
Punto di campionamento	BIV-A1	BIV-A1	BIV-A2	BIV-A2
Superficie del lago	153.855,16 m ²			
Profondità del prelievo	3m	0m	3m	0m
Metodologia di campionamento	D. lgs. 152/99 e s.m.i. (bottiglia di Niskin)			
Denominazione del campione	BA1-F	BA1-S	BA2-F	BA2-S
Data	9/06/2023	9/06/2023	9/06/2023	9/06/2023
Ora	10:05	10:06	10:17	10:20
Analisi Chimica	X	X	X	X
Analisi Microbiologica	X	X	X	X

Ricerca di microplastiche			X	X
----------------------------------	--	--	---	---

Tabella 20 Dati del campionamento invernale effettuato presso il Lago Maulazzo

LAGO MAULAZZO INVERNO 2022						
Punto di campionamento	MAU-A1	MAU-A1	MAU-A2	MAU-A2	MAU-A3	MAU-A3
Superficie del lago	153.855,16 m2					
Profondità del prelievo	4m	0m	4m	0m	4m	0m
Metodologia di campionamento	D. lgs. 152/99 e s.m.i. (bottiglia di Niskin)					
Denominazione del campione	MA1-F	MA1-S	MA2-F	MA2-S	MA3-F	MA3-S
Data	5/12/2022	5/12/2022	5/12/2022	5/12/2022	5/12/2022	5/12/2022
Ora	13:22	13:30	13:50	13:56	14:10	14:18
Analisi Chimica						
Analisi Microbiologica	X	X	X	X		
Ricerca di microplastiche					X	X

Tabella 21 Dati del campionamento estivo effettuato presso il Lago Maulazzo

LAGO MAULAZZO ESTATE 2023						
Punto di campionamento	MAU-A1	MAU-A1	MAU-A2	MAU-A2	MAU-A3	MAU-A3
Superficie del lago	153.855,16 m2					
Profondità del prelievo	4m	0m	4m	0m	4m	0m
Metodologia di campionamento	D. lgs. 152/99 e s.m.i. (bottiglia di Niskin)					
Denominazione del campione	MA1-F	MA1-S	MA2-F	MA2-S	MA3-F	MA3-S
Data	9/06/2023	9/06/2023	9/06/2023	9/06/2023	5/06/2023	5/06/2023
Ora	14:20	14:22	14:40	14:44	13:21	13:22
Analisi Chimica					X	X

Analisi Microbiologica	X	X	X	X		
Ricerca di microplastiche					X	X

4.3.2 Risultati analisi chimiche

Nelle tabelle di seguito riportate (Tab. 16, 17, 18, 19, 20 e 21) sono elencati i risultati delle analisi chimiche effettuate nelle stazioni BA1, BA2 e MA3; per ogni stazione è stata analizzata l'acqua superficiale e l'acqua del fondo. Dai risultati non emergono valori superiori rispetto ai parametri stabiliti dal DM 260/10 e successive modifiche.

Sono state tuttavia registrate elevate concentrazioni di mercurio in tutte e tre le stazioni per entrambe le profondità indagate, sebbene nei campioni di acqua superficiale sia risultata una minore concentrazione rispetto ai campioni di acqua del fondo (Fig. 19).

Nel lago Maulazzo sono state riscontrate le concentrazioni maggiori di mercurio, arrivando a valori di 42,76 µg/L nei campioni di acqua del fondo e di 26,52 µg/L nei campioni di acqua superficiale.

Nel Biviere di Cesarò le concentrazioni più alte di mercurio sono state registrate nella stazione BA2, che presentava valori di 37,82 µg/L e 29,36 µg/L rispettivamente per lo strato di acqua profonda e per lo strato superficiale.

Di significativa rilevanza ai fini della presente attività di studio, è stato il rilevamento nelle acque del Biviere di Cesarò di un livello di pH più acido rispetto ai valori ottimali per la vita delle specie acquatiche. Sono stati registrati: valori di acidità che oscillavano tra i 6,12 e 6,51 rispettivamente per BA2 Fondo e BA2 Superficie; valori di acidità che oscillavano tra i 6,28 e 6,59 rispettivamente per BA1 Fondo e BA1 Superficie.

Nelle acque del Lago Mulazzo sono stati viceversa registrati valori di pH di 7,2 circa, un indice molto migliore per la vita delle specie acquatiche rispetto a quello riscontrato nel Biviere.

Relativamente alle analisi effettuate sul sedimento campionato presso il Biviere di Cesarò, queste hanno evidenziato concentrazioni di mercurio inferiori al limite di rivelabilità; nei sedimenti del lago Maulazzo sono stati rilevati bassi livelli di mercurio, compresi tra 0,056 e 0,060 µg/g.

Tabella 22 Risultati analisi dell'acqua di fondo della stazione BA1 del Biviere di Cesarò

BA1-FONDO					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
Analisi eseguite al prelievo					
POTENZIALE REDOX Sonda multiparametrica	148	mV	----	----	----
CONDUCIBILITA' Sonda multiparametrica	590	µS/cm	----	----	----
pH Sonda multiparametrica	6,59	Unità pH	----	----	----
TEMPERATURA Sonda multiparametrica	15,7	°C	----	----	----
OSSIGENO DISCIOLTO Sonda multiparametrica	81,2	%O ₂	----	----	----
TORBIDITA' Mediante disco di secchi	170	cm	----	----	----
Analisi eseguite in laboratorio					
COD Met: APAT 5130	9,29 ± 0,13	mg/L O ₂			-----
CLOROFILLA A Met: APAT 9020	2,78 ± 0,07	µg/l	>25	DL 152/06 All.1 TAB11	1,0
CADMIO Met: APAT 3120 B	0,04 ± 0,001	µg/L (come Cd)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,01
CALCIO Met: APAT 3030	10,80 ± 0,50	µg/L	----	-----	0,1
CROMO (Totale) Met: APAT 3150 B1	<LR	µg/L (come Cr Tot.)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
MAGNESIO Met: APAT 3030	2,25 ± 0,07	µg/L	----	-----	0,2
SODIO Met: APAT 3030	6,70 ± 0,10	µg/L	----	-----	0,1
POTASSIO Met: APAT 3030	0,65 ± 0,03	µg/L	----	-----	0,1
ALCALINITA' Met: APAT 2010	0,53 ± 0,1	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	----	-----	0,2
ACIDITA' Met: APAT 2010	0,11 ± 0,01	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	----	-----	0,2
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
MERCURIO Met: EPA 245.1 Rev.3-1994	17,23 ± 1,11	µg/L (come Hg)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,1
NICHEL Met: APAT 3220B	0,21 ± 0,02	µg/L (come Ni)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,3
PIOMBO Met: APAT 3230B	0,22 ± 0,01	µg/L (come Pb)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,05

RAME Met: APAT 3250 B	0,74 ± 0,09	µg/L (come Cu)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,5
ZINCO Met: EPA 289.2 1978 Met: APAT 3250	1,45 ± 0,12	µg/L (come Zn)	<3000	DL 152/06 All.1 TAB1	1,0
Azoto ammoniacale Met: APAT 4030 A1	0,39 ± 0,02	mg/L (come NH ⁺ ₄)	-----	-----	0,1
ANIONI Met: APAT 4020					
CLORURI	6,80 ± 0,10	mg/L (come Cl ⁻)	-----	-----	0,1
FLUORURI	0,16 ± 0,10	mg/L (come F ⁻)	-----	-----	0,2
NITRATI	0,06 ± 0,01	mg/L (come NO ₃ ⁻)	-----	-----	0,1
NITRITI	<LR	mg/L (come NO ₂ ⁻)	-----	-----	0,1
SOLFATI	3,30 ± 0,10	mg/L (come SO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
FOSFATI	<LR	mg/L (come PO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
COMPOSTI ALIFATICI CLORURATI CANCEROGENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260 C 2006					
CLOROFORMIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
1,2-DICLOROETANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
TETRACLORURO DI CARBONIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,07
TRICLOROETILENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,04
CLOROBENZENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260					
1,2,4-TRICLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
PESTICIDI ORGANOCLORURATI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8081					
ALDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
DIELDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,06
ENDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
ISODRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,08
DDT	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0005
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
ESACLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,005
ESACLOROCICLOESANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
ESACLOROBUTADIENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0001

TDS (APAT 2090 – Metodo A)	71,33 ± 6,15	mg/L	-----	-----	0,1
----------------------------	--------------	------	-------	-------	-----

*U.M. = Unità di misura; *LR = limite di rivelabilità; §ND = Non Determinato

Tabella 23 Risultati analisi dell'acqua superficiale della stazione BA1 del Biviere di Cesarò

BA1-SUPERFICIE					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
Analisi eseguite al prelievo					
POTENZIALE REDOX Mediante sonda multiparametrica	163	mV	----	----	----
CONDUCIBILITA' Mediante sonda multiparametrica	603	µS/cm	----	----	----
pH Mediante sonda multiparametrica	6,28	Unità pH	----	----	----
TEMPERATURA Mediante sonda multiparametrica	17,9	°C	----	----	----
OSSIGENO DISCIOLTO Mediante sonda multiparametrica	116,7	%O ₂	----	----	----
TORBIDITA' Mediante disco di secchi	170	cm	----	----	----
Analisi eseguite in laboratorio					
COD Met: APAT 5130	11,65 ± 0,24	mg/L O ₂			-----
CLOROFILLA A Met: APAT 9020	2,61 ± 0,09	µg/l	>25	DL 152/06 All.1 TAB11	1,0
CADMIO Met: APAT 3120 B	0,02 ± 0,002	µg/L (come Cd)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,01
CALCIO Met: APAT 3030	10,80 ± 0,20	µg/L	----	-----	0,1
CROMO (Totale) Met: APAT 3150 B1	0,59 ± 0,03	µg/L (come Cr Tot.)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
MAGNESIO Met: APAT 3030	2,20 ± 0,10	µg/L	----	-----	0,2
SODIO Met: APAT 3030	6,80 ± 0,10	µg/L	----	-----	0,1
POTASSIO Met: APAT 3030	0,70 ± 0,05	µg/L	----	-----	0,1
ALCALINITA' Met: APAT 2010	0,57 ± 0,1	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	----	-----	0,2
ACIDITA' Met: APAT 2010	0,1 ± 0,01	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	----	-----	0,2
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
MERCURIO Met: EPA 245.1 Rev.3-1994	7,73 ± 0,24	µg/L (come Hg)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,1
NICHEL Met: APAT 3220B	0,82 ± 0,12	µg/L (come Ni)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,3
PIOMBO Met: APAT 3230B	0,20 ± 0,01	µg/L (come Pb)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,05

RAME Met: APAT 3250 B	6,13 ± 0,19	µg/L (come Cu)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,5
ZINCO Met: EPA 289.2 1978 Met: APAT 3250	3,04 ± 0,22	µg/L (come Zn)	<3000	DL 152/06 All.1 TAB1	1,0
Azoto ammoniacale Met: APAT 4030 A1	0,33 ± 0,01	mg/L (come NH ₄ ⁺)	-----	-----	0,1
ANIONI Met: APAT 4020					
CLORURI	7,10 ± 0,10	mg/L (come Cl)	-----	-----	0,1
FLUORURI	0,17 ± 0,10	mg/L (come F)	-----	-----	0,2
NITRATI	0,04 ± 0,01	mg/L (come NO ₃ ⁻)	-----	-----	0,1
NITRITI	<LR	mg/L (come NO ₂ ⁻)	-----	-----	0,1
SOLFATI	3,10 ± 0,10	mg/L (come SO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
FOSFATI	<LR	mg/L (come PO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
COMPOSTI ALIFATICI CLORURATI CANCEROGENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260 C 2006					
CLOROFORMIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
1,2-DICLOROETANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
TETRACLORURO DI CARBONIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,07
TRICLOROETILENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,04
CLOROBENZENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260					
1,2,4-TRICLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
PESTICIDI ORGANOCLORURATI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8081					
ALDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
DIELDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,06
ENDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
ISODRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,08
DDT	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0005
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
ESACLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,005
ESACLOROCICLOESANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
ESACLOROBUTADIENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0001

TDS (APAT 2090 – Metodo A)	89,33 ± 6,15	mg/L	-----	-----	0,1
----------------------------	--------------	------	-------	-------	-----

*U.M. = Unità di misura; *LR = limite di rivelabilità; §ND = Non Determinato

Tabella 24 Risultati analisi dell'acqua di fondo della stazione BA2 del Biviere di Cesarò

BA2-FONDO					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
Analisi eseguite al prelievo					
POTENZIALE REDOX Mediante sonda multiparametrica	160	mV	----	----	----
CONDUCIBILITA' Mediante sonda multiparametrica	580	µS/cm	----	----	----
pH Mediante sonda multiparametrica	6,12	Unità pH	----	----	----
TEMPERATURA Mediante sonda multiparametrica	14,4	°C	----	----	----
OSSIGENO DISCIOLTO Mediante sonda multiparametrica	79,5	%O ₂	----	----	----
TORBIDITA' Mediante Disco di Secchi	190	cm	----	----	----
Analisi eseguite in laboratorio					
COD Met: APAT 5130	9,63 ± 0,10	mg/L O ₂			-----
CLOROFILLA A Met: APAT 9020	2,92 ± 0,03	µg/l	>25	DL 152/06 All.1 TAB11	1,0
CADMIO Met: APAT 3120 B	<LR	µg/L (come Cd)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,01
CALCIO Met: APAT 3030	10,20 ± 0,20	µg/L	----	-----	0,1
CROMO (Totale) Met: APAT 3150 B1	<LR	µg/L (come Cr Tot.)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
MAGNESIO Met: APAT 3030	2,10 ± 0,10	µg/L	----	-----	0,2
SODIO Met: APAT 3030	6,55 ± 0,07	µg/L	----	-----	0,1
POTASSIO Met: APAT 3030	0,60 ± 0,05	µg/L	----	-----	0,1
ALCALINITA' Met: APAT 2010	0,55 ± 0,1	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	-----	-----	0,2
ACIDITA' Met: APAT 2010	0,11 ± 0,01	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	-----	-----	0,2
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
MERCURIO Met: EPA 245.1 Rev.3-1994	37,82 ± 2,21	µg/L (come Hg)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,1
NICHEL Met: APAT 3220B	<LR	µg/L (come Ni)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,3
PIOMBO Met: APAT 3230B	0,12 ± 0,01	µg/L (come Pb)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,05

RAME Met: APAT 3250 B	2,68 ± 0,02	µg/L (come Cu)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,5
ZINCO Met: EPA 289.2 1978 Met: APAT 3250	8,70 ± 0,54	µg/L (come Zn)	<3000	DL 152/06 All.1 TAB1	1,0
Azoto ammoniacale Met: APAT 4030 A1	0,40 ± 0,02	mg/L (come NH ₄ ⁺)	-----	-----	0,1
ANIONI Met: APAT 4020					
CLORURI	7,20 ± 0,10	mg/L (come Cl ⁻)	-----	-----	0,1
FLUORURI	0,19 ± 0,10	mg/L (come F ⁻)	-----	-----	0,2
NITRATI	0,07 ± 0,01	mg/L (come NO ₃ ⁻)	-----	-----	0,1
NITRITI	<LR	mg/L (come NO ₂ ⁻)	-----	-----	0,1
SOLFATI	3,50 ± 0,10	mg/L (come SO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
FOSFATI	<LR	mg/L (come PO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
COMPOSTI ALIFATICI CLORURATI CANCEROGENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260 C 2006					
CLOROFORMIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
1,2-DICLOROETANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
TETRACLORURO DI CARBONIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,07
TRICLOROETILENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,04
CLOROBENZENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260					
1,2,4-TRICLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
PESTICIDI ORGANOCCLORURATI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8081					
ALDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
DIELDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,06
ENDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
ISODRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,08
DDT	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0005
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
ESACLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,005
ESACLOROCICLOESANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
ESACLOROBUTADIENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0001

TDS (APAT 2090 – Metodo A)	79,00 ± 3,35	mg/L	-----	-----	0,1
----------------------------	--------------	------	-------	-------	-----

*U.M. = Unità di misura; *LR = limite di rivelabilità; §ND = Non Determinato

Tabella 25 Risultati analisi dell'acqua superficiale della stazione BA1 del Biviere di Cesarò

BA2 - SUPERFICIE					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
Analisi eseguite al prelievo					
POTENZIALE REDOX Mediante sonda multiparametrica	149,6	mV	----	----	----
CONDUCIBILITA' Mediante sonda multiparametrica	596	µS/cm	----	----	----
pH Mediante sonda multiparametrica	6,51	Unità pH	----	----	----
TEMPERATURA Mediante sonda multiparametrica	18,21	°C	----	----	----
OSSIGENO DISCIOLTO Mediante sonda multiparametrica	116,3	%O ₂	----	----	----
TORBIDITA' Mediante disco di secchi	190	cm	----	----	----
Analisi eseguite in laboratorio					
COD Met: APAT 5130	9,97 ± 0,21	mg/L O ₂			-----
CLOROFILLA A Met: APAT 9020	2,95 ± 0,05	µg/l	>25	DL 152/06 All.1 TAB11	1,0
CADMIO Met: APAT 3120 B	0,01 ± 0,001	µg/L (come Cd)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,01
CALCIO Met: APAT 3030	11,65 ± 0,07	µg/L	----	-----	0,1
CROMO (Totale) Met: APAT 3150 B1	<LR	µg/L (come Cr Tot.)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
MAGNESIO Met: APAT 3030	2,20 ± 0,04	µg/L	----	-----	0,2
SODIO Met: APAT 3030	6,60 ± 0,10	µg/L	----	-----	0,1
POTASSIO Met: APAT 3030	0,60 ± 0,05	µg/L	----	-----	0,1
ALCALINITA' Met: APAT 2010	0,58 ± 0,1	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	-----	-----	0,2
ACIDITA' Met: APAT 2010	0,08 ± 0,01	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	-----	-----	0,2
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
MERCURIO Met: EPA 245.1 Rev.3-1994	29,36 ± 2,30	µg/L (come Hg)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,1
NICHEL Met: APAT 3220B	<LR	µg/L (come Ni)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,3
PIOMBO Met: APAT 3230B	0,12 ± 0,01	µg/L (come Pb)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,05

RAME Met: APAT 3250 B	2,93 ± 0,12	µg/L (come Cu)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,5
ZINCO Met: EPA 289.2 1978 Met: APAT 3250	1,69 ± 0,14	µg/L (come Zn)	<3000	DL 152/06 All.1 TAB1	1,0
Azoto ammoniacale Met: APAT 4030 A1	0,34 ± 0,01	mg/L (come NH ₄ ⁺)	-----	-----	0,1
ANIONI Met: APAT 4020					
CLORURI	7,00 ± 0,10	mg/L (come Cl ⁻)	-----	-----	0,1
FLUORURI	0,24 ± 0,10	mg/L (come F ⁻)	-----	-----	0,2
NITRATI	0,07 ± 0,01	mg/L (come NO ₃ ⁻)	-----	-----	0,1
NITRITI	<LR	mg/L (come NO ₂ ⁻)	-----	-----	0,1
SOLFATI	3,20 ± 0,10	mg/L (come SO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
FOSFATI	<LR	mg/L (come PO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
COMPOSTI ALIFATICI CLORURATI CANCEROGENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260 C 2006					
CLOROFORMIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
1,2-DICLOROETANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
TETRACLORURO DI CARBONIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,07
TRICLOROETILENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,04
CLOROBENZENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260					
1,2,4-TRICLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
PESTICIDI ORGANOCLORURATI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8081					
ALDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
DIELDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,06
ENDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
ISODRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,08
DDT	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0005
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
ESACLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,005
ESACLOROCICLOESANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
ESACLOROBUTADIENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0001

TDS (APAT 2090 – Metodo A)	92,00 ± 5,55	mg/L	-----	-----	0,1
----------------------------	--------------	------	-------	-------	-----

*U.M. = Unità di misura; *LR = limite di rivelabilità; §ND = Non Determinato

Tabella 26 Risultati analisi dell'acqua di fondo della stazione MA3 del Lago Maulazzo

MA3-FOMDO					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
Analisi eseguite al prelievo					
POTENZIALE REDOX Mediante sonda multiparametrica	151	mV	----	----	----
CONDUCIBILITA' Mediante sonda multiparametrica	550	µS/cm	----	----	----
pH Mediante sonda multiparametrica	7,19	Unità pH	----	----	----
TEMPERATURA Mediante sonda multiparametrica	16,8	°C	----	----	----
OSSIGENO DISCIOLTO Mediante sonda multiparametrica	98,6	%O ₂	----	----	----
TORBIDITA' Mediante disco di secchi	170	cm	----	----	----
Analisi eseguite in laboratorio					
COD Met: APAT 5130	6,76 ± 0,25	mg/L O ₂			-----
CLOROFILLA A Met: APAT 9020	29,04 ± 1,45	µg/l	>25	DL 152/06 All.1 TAB11	1,0
CADMIO Met: APAT 3120 B	0,024 ± 0,001	µg/L (come Cd)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,01
CALCIO Met: APAT 3030	14,20 ± 0,20	µg/L	----	-----	0,1
CROMO (Totale) Met: APAT 3150 B1	6,73 ± 0,08	µg/L (come Cr Tot.)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
MAGNESIO Met: APAT 3030	1,70 ± 0,05	µg/L	----	-----	0,2
SODIO Met: APAT 3030	5,90 ± 0,05	µg/L	----	-----	0,1
POTASSIO Met: APAT 3030	0,75 ± 0,07	µg/L	----	-----	0,1
ALCALINITA' Met: APAT 2010	0,59 ± 0,1	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	----	-----	0,2
ACIDITA' Met: APAT 2010	0,1 ± 0,01	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	----	-----	0,2
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
MERCURIO Met: EPA 245.1 Rev.3-1994	42,76 ± 2,05	µg/L (come Hg)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,1
NICHEL Met: APAT 3220B	12,66 ± 0,78	µg/L (come Ni)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,3
PIOMBO Met: APAT 3230B	<LR	µg/L (come Pb)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,05

RAME Met: APAT 3250 B	4,44 ± 0,25	µg/L (come Cu)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,5
ZINCO Met: EPA 289.2 1978 Met: APAT 3250	7,45 ± 0,21	µg/L (come Zn)	<3000	DL 152/06 All.1 TAB1	1,0
Azoto ammoniacale Met: APAT 4030 A1	0,52 ± 0,02	mg/L (come NH ⁺ ₄)	-----	-----	0,1
ANIONI Met: APAT 4020					
CLORURI	7,30 ± 0,10	mg/L (come Cl ⁻)	-----	-----	0,1
FLUORURI	0,16 ± 0,10	mg/L (come F ⁻)	-----	-----	0,2
NITRATI	0,17 ± 0,01	mg/L (come NO ₃ ⁻)	-----	-----	0,1
NITRITI	<LR	mg/L (come NO ₂ ⁻)	-----	-----	0,1
SOLFATI	3,00 ± 0,10	mg/L (come SO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
FOSFATI	<LR	mg/L (come PO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
COMPOSTI ALIFATICI CLORURATI CANCEROGENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260 C 2006					
CLOROFORMIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
1,2-DICLOROETANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
TETRACLORURO DI CARBONIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,07
TRICLOROETILENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,04
CLOROBENZENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260					
1,2,4-TRICLORO BENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
PESTICIDI ORGANOCCLORURATI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8081					
ALDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
DIELDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,06
ENDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
ISODRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,08
DDT	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0005
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
ESACLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,005
ESACLOROCICLOESANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
ESACLOROBUTADIENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0001
TDS (APAT 2090 – Metodo A)	73,67 ± 3,35	mg/L	-----	-----	0,1

*U.M. = Unità di misura; **LR = limite di rivelabilità; [§]ND = Non Determinato

Tabella 27 Risultati analisi dell'acqua superficiale della stazione MA3 del Lago Maulazzo

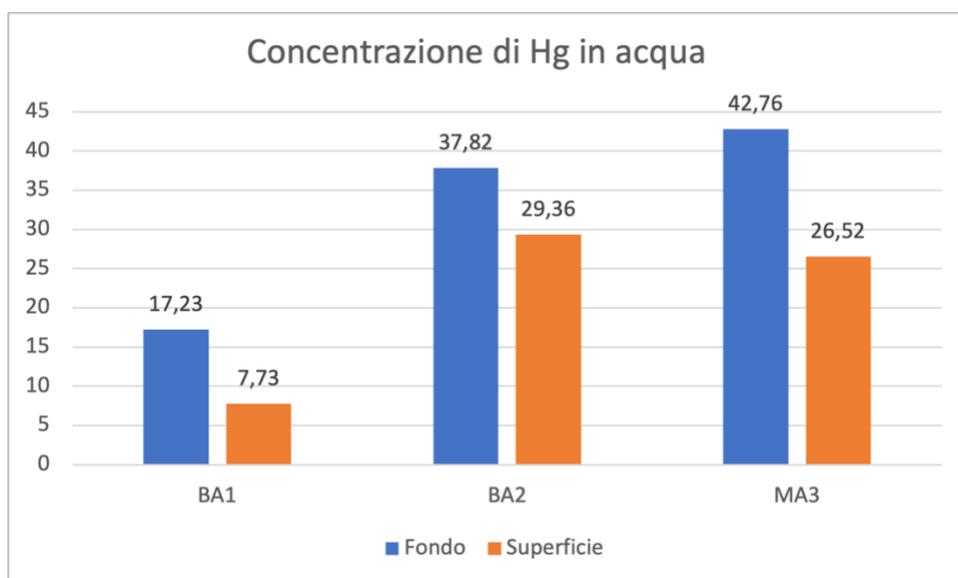
MA3-SUPERFICIE					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
Analisi eseguite al prelievo					
POTENZIALE REDOX Mediante sonda multiparametrica	149,8	mV	----	----	----
CONDUCIBILITA' Mediante sonda multiparametrica	612	µS/cm	----	----	----
pH Mediante sonda multiparametrica	7,22	Unità pH	----	----	----
TEMPERATURA Mediante sonda multiparametrica	18,26	°C	----	----	----
OSSIGENO DISCIOLTO Mediante sonda multiparametrica	116,3	%O ₂	----	----	----
TORBIDITA' Mediante disco di secchi	170	cm	----	----	----
Analisi eseguite in laboratorio					
COD Met: APAT 5130	10,30 ± 0,35	mg/L O ₂			-----
CLOROFILLA A Met: APAT 9020	11,10 ± 0,65	µg/l	>25	DL 152/06 All.1 TAB11	1,0
CADMIO Met: APAT 3120 B	26,52 ± 1,12	µg/L (come Cd)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,01
CALCIO Met: APAT 3030	14,30 ± 0,20	µg/L	----	-----	0,1
CROMO (Totale) Met: APAT 3150 B1	0,23 ± 0,02	µg/L (come Cr Tot.)	----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
MAGNESIO Met: APAT 3030	1,65 ± 0,07	µg/L	----	-----	0,2
SODIO Met: APAT 3030	6,05 ± 0,07	µg/L	----	-----	0,1
POTASSIO Met: APAT 3030	0,60 ± 0,05	µg/L	----	-----	0,1
ALCALINITA' Met: APAT 2010	0,60 ± 0,1	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	----	-----	0,2
ACIDITA' Met: APAT 2010	0,1 ± 0,01	meq L ⁻¹ (come mg CaCO ₃)	----	-----	0,2
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
MERCURIO Met: EPA 245.1 Rev.3-1994	26,52 ± 1,35	µg/L (come Hg)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,1
NICHEL Met: APAT 3220B	1,59 ± 0,52	µg/L (come Ni)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,3
PIOMBO Met: APAT 3230B	1,07 ± 0,02	µg/L (come Pb)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,05

RAME Met: APAT 3250 B	6,29 ± 0,15	µg/L (come Cu)	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,5
ZINCO Met: EPA 289.2 1978 Met: APAT 3250	55,15 ± 2,12	µg/L (come Zn)	<3000	DL 152/06 All.1 TAB1	1,0
Azoto ammoniacale Met: APAT 4030 A1	0,41 ± 0,02	mg/L (come NH ₄ ⁺)	-----	-----	0,1
ANIONI Met: APAT 4020					
CLORURI	6,80 ± 0,10	mg/L (come Cl ⁻)	-----	-----	0,1
FLUORURI	0,18 ± 0,10	mg/L (come F ⁻)	-----	-----	0,2
NITRATI	0,21 ± 0,01	mg/L (come NO ₃ ⁻)	-----	-----	0,1
NITRITI	<LR	mg/L (come NO ₂ ⁻)	-----	-----	0,1
SOLFATI	3,20 ± 0,10	mg/L (come SO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
FOSFATI	<LR	mg/L (come PO ₄ ⁻)	-----	-----	0,1
COMPOSTI ALIFATICI CLORURATI CANCEROGENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260 C 2006					
CLOROFORMIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
1,2-DICLOROETANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
TETRACLORURO DI CARBONIO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,07
TRICLOROETILENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,04
CLOROBENZENI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8260					
1,2,4-TRICLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,2
PESTICIDI ORGANOCLORURATI Met.: EPA 5030 C 2003 + EPA 8081					
ALDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
DIELDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,06
ENDRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,02
ISODRIN	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,08
DDT	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0005
RISULTATI ANALITICI					
Parametri	Valore/Incertezza	U.M.*	Valori di riferimento	Riferimenti	LR**
ESACLOROBENZENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,005
ESACLOROCICLOESANO	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,03
ESACLOROBUTADIENE	<LR	µg/L	-----	DL 152/06 All.1 TAB1	0,0001

TDS (APAT 2090 – Metodo A)	93,00 ± 5,05	mg/L	-----	-----	0,1
----------------------------	--------------	------	-------	-------	-----

* U.M. = Unità di misura; **LR = limite di rivelabilità; §ND = Non Determinato

Figura 21 Grafico dell'andamento delle concentrazioni di mercurio nelle diverse stazioni di campionamento



Nelle successive tabelle sono riportate le concentrazioni di mercurio determinate nei sedimenti (Tab 28) e i valori misurati nella componente biologica, in particolare nel tessuto muscolare dei pesci (Tab 29). I risultati sono espressi come media \pm SD di tre analisi indipendenti.

Tabella 28 Determinazione del mercurio in campioni di sedimento mediante VC-AAS

Lago	Stazione	HG ($\mu\text{g/g}$)
Biviere di Cesarò	BIV-S1	<LR*
Biviere di Cesarò	BIV-S3	<LR*
Lago Maulazzo	MAU-S2	0,056 \pm 0,003
Lago Maulazzo	MAU-S4	0,060 \pm 0,002

*Inferiore al limite di rivelabilità

Tabella 29 Determinazione del mercurio in campioni di tessuto muscolare di 4 diverse specie ittiche mediante VC-AAS.

Provenienza	Specie ittica	HG ($\mu\text{g/g}$)
Lago Maulazzo	<i>Ameiurus melas</i>	<LR*
Lago Maulazzo	<i>Cyprinus carpio</i>	0,039 \pm 0,005
Lago Maulazzo	<i>Perca Fluviatilis</i>	0,018 \pm 0,002
Biviere di Cesarò	<i>Gambusia holbrooki</i>	0,015 \pm 0,001

*Inferiore al limite di rivelabilità

4.3.3 Indicatori microbiologici

I risultati delle analisi microbiologiche del lago Maulazzo e del Biviere di Cesarò sono riportati nella seguente tabella (Tab. 30). I dati sono illustrati come CFU/100ml e riportati come media delle tre repliche effettuate. I risultati relativi alla ricerca di salmonella sono espressi in termini di presenza/assenza.

Tabella 30 Risultati analisi microbiologiche

BA1 – SUPERFICIE			
Indicatori	Inverno 2022	Estate 2023	Metodo
<i>E. coli</i>	16,5	3	APAT 7030
Coliformi tot.	70,5	208	APAT 7010
<i>Vibrio sp.</i>	9	74	APAT 7090
Enterococchi	11,5	13	APAT 7040
Clostridi	45	11,5	APAT 7060
Salmonella	Assente	Assente	APAT 7080
BA1 - FONDO			
Indicatori	Inverno 2022	Estate 2023	Metodo
<i>E. coli</i>	15	22	APAT 7030
Coliformi tot.	50	400	APAT 7010
<i>Vibrio sp.</i>	3	400	APAT 7090
Enterococchi	9	15	APAT 7040
Clostridi	90	89	APAT 7060
Salmonella	Assente	Assente	APAT 7080
BA2 - SUPERFICIE			
Indicatori	Inverno 2022	Estate 2023	Metodo
<i>E. coli</i>	8,5	0	APAT 7030
Coliformi tot.	98,5	102	APAT 7010
<i>Vibrio sp.</i>	4	24,5	APAT 7090
Enterococchi	175	1	APAT 7040
Clostridi	33	10	APAT 7060
Salmonella	Assente	Assente	APAT 7080
BA2 - FONDO			
Indicatori	Inverno 2022	Estate 2023	Metodo

E. coli	10	80	APAT 7030
Coliformi tot.	78,5	300	APAT 7010
Vibrio sp.	6	83	APAT 7090
Enterococchi	167,5	3	APAT 7040
Clostridi	67,5	77,5	APAT 7060
Salmonella	Assente	Assente	APAT 7080
MA1 – SUPERFICIE			
Indicatori	Inverno 2022	Estate 2023	Metodo
E. coli	5,5	2	APAT 7030
Coliformi tot.	71	66	APAT 7010
Vibrio sp.	9	20	APAT 7090
Enterococchi	180	180	APAT 7040
Clostridi	22	6	APAT 7060
Salmonella	Assente	Assente	APAT 7080
MA1 – FONDO			
Indicatori	Inverno 2022	Estate 2023	Metodo
E. coli	28,5	30	APAT 7030
Coliformi tot.	150	140	APAT 7010
Vibrio sp.	7	20	APAT 7090
Enterococchi	120	2	APAT 7040
Clostridi	37,5	88	APAT 7060
Salmonella	Assente	Assente	APAT 7080
MA2 – SUPERFICIE			
Indicatori	Inverno 2022	Estate 2023	Metodo
E. coli	7	12	APAT 7030
Coliformi tot.	200	128	APAT 7010
Vibrio sp.	36,5	26	APAT 7090
Enterococchi	34,5	100	APAT 7040
Clostridi	30	20	APAT 7060
Salmonella	Assente	Assente	APAT 7080
MA2 – FONDO			
Indicatori	Inverno 2022	Estate 2023	Metodo
E. coli	33	17	APAT 7030

Coliformi tot.	249	110	APAT 7010
Vibrio sp.	22	20	APAT 7090
Enterococchi	70	6	APAT 7040
Clostridi	38	70	APAT 7060
Salmonella	Assente	Assente	APAT 7080

4.3.4 Inquinamento da microplastiche

Nelle tabelle seguenti sono riportati i risultati della classificazione dei detriti di origine antropica rinvenuti durante i campionamenti dei laghi Biviere e Maulazzo. La quantificazione dei detriti di origine antropica per lago è stata effettuata dividendo i campioni per periodo dell'anno (estate e inverno) e profondità (superficie e fondo).

Nei campioni d'acqua sono stati riscontrati 230 detriti di origine antropica di dimensioni comprese tra 0.01 e 4.0 mm, provenienti da entrambe le due aree di studio. Inoltre, è stata rilevata una lunghezza media dei detriti di origine antropica maggiore nel Lago Biviere 0.82 ± 0.48 mm rispetto a quella dei detriti ritrovati nel Lago Maulazzo 0.77 ± 0.61 mm. Il range di lunghezza di detriti antropogenici maggiormente riscontrato nel Lago Biviere è compreso tra 0.5-1.0 mm, mentre nel Lago Maulazzo tra 0.1 e 0.5 mm (Fig. 22).

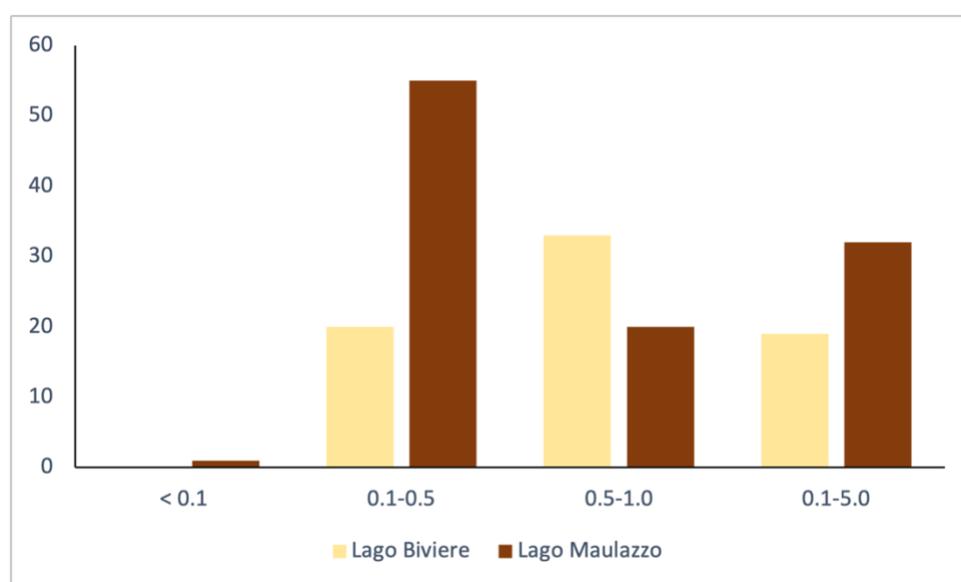


Figura 22 Numero di detriti antropogenici rilevati divisi per classe di taglia

La quantità di detriti di origine antropica più elevata è stata osservata nel Lago Maulazzo con una media di 23.5 ± 19.0 particelle per L (media \pm deviazione standard). Inoltre, sono state osservate differenze tra stagioni e profondità. In inverno, il fondo è stato il sito con la più alta quantità di detriti di origine antropica, ossia 33.5 ± 20.3 particelle per L. Nella stessa stagione in superficie è stata riscontrata una media 7.5 ± 5.2 particelle per L. In estate sono stati campionati in media un numero di detriti antropogenici per i siti di superficie e fondo rispettivamente di 21.7 ± 15.0 particelle per L e di 7.36 ± 5.1 particelle per L (Fig. 23).

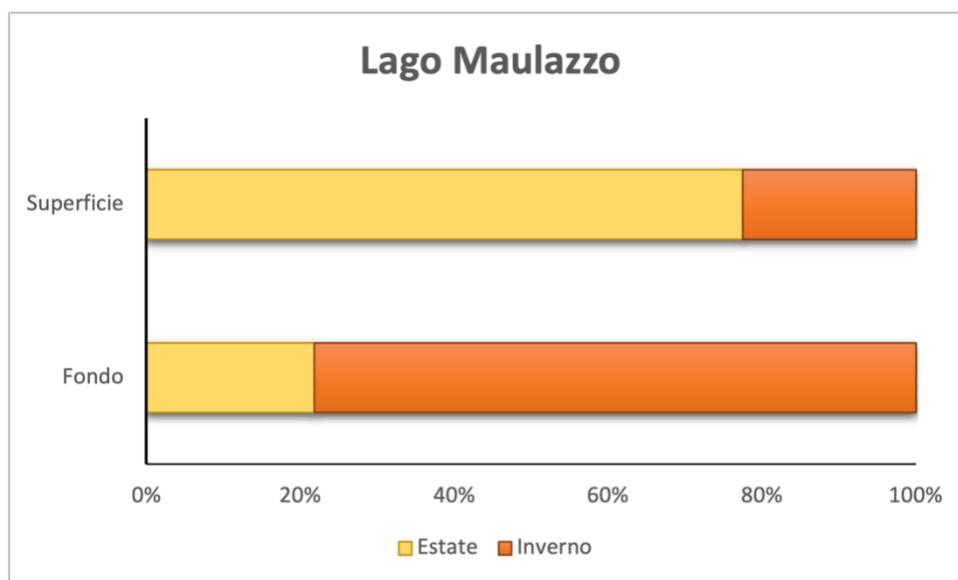


Figura 23 : Andamento stagionale delle percentuali di detriti antropogenici campionati nelle stazioni superficie e fondo al lago Maulazzo

Quasi tutti i detriti antropogenici contati erano fibre. È stato riscontrato un solo frammento trasparente con dimensioni di 0.028mm nei campioni d'acqua provenienti dal sito con profondità maggiore (fondo).

Sul totale delle particelle di origine antropica identificate presso il Biviere, il 63.9% era trasparente, il 13.9% blu, l'11.1% nero, l'8.3% bianco e il 2.8% viola; viceversa, sul totale di fibre identificate presso il Maulazzo, il 50.6% erano bianche, il 36.7% trasparenti, l'8.9% blu, l'1.9% nero e l'1.9% viola (Fig. 24).

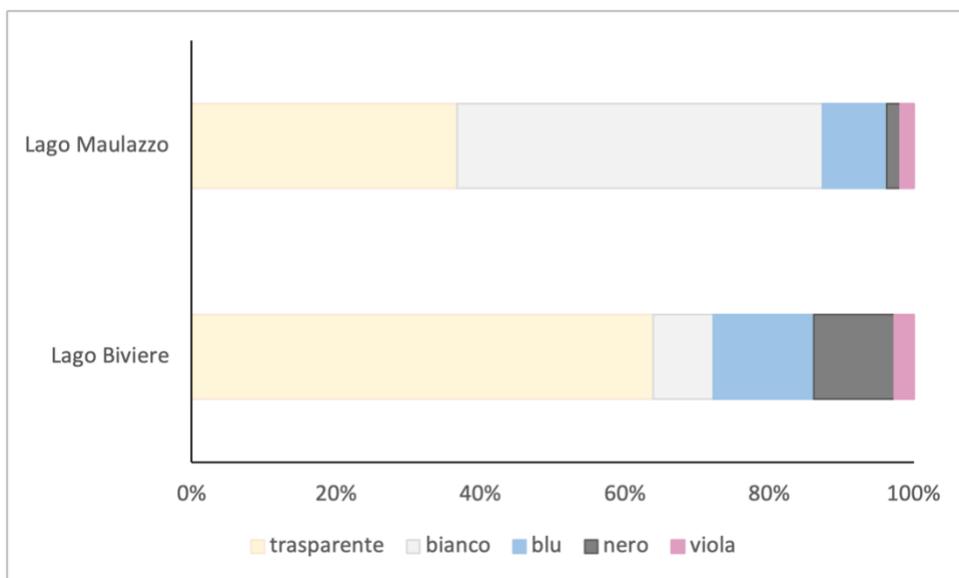


Figura 24 Percentuale dei differenti colori di detriti antropogenici campionati nei due laghi

In ultimo, sono state osservate differenze nei dati rilevati presso il Lago Biviere sia sulla base della stagione in cui è stato effettuato il campionamento che in relazione alla batimetria. In estate, il sito con la più alta quantità di detriti di origine antropica è stato la superficie con $23.1 \pm 14,7$ particelle per L. Nella stessa stagione nel sito fondo è stata riscontrata una media di 1.7 ± 1.6 particelle per L.; in inverno sono stati campionati in media un numero di detriti antropogenici per i siti di superficie e fondo rispettivamente di 4.5 ± 2.4 particelle per L e 4.5 ± 3.4 particelle per L (Fig. 25). Non è stato riscontrato alcun detrito antropogenico a forma di frammento.

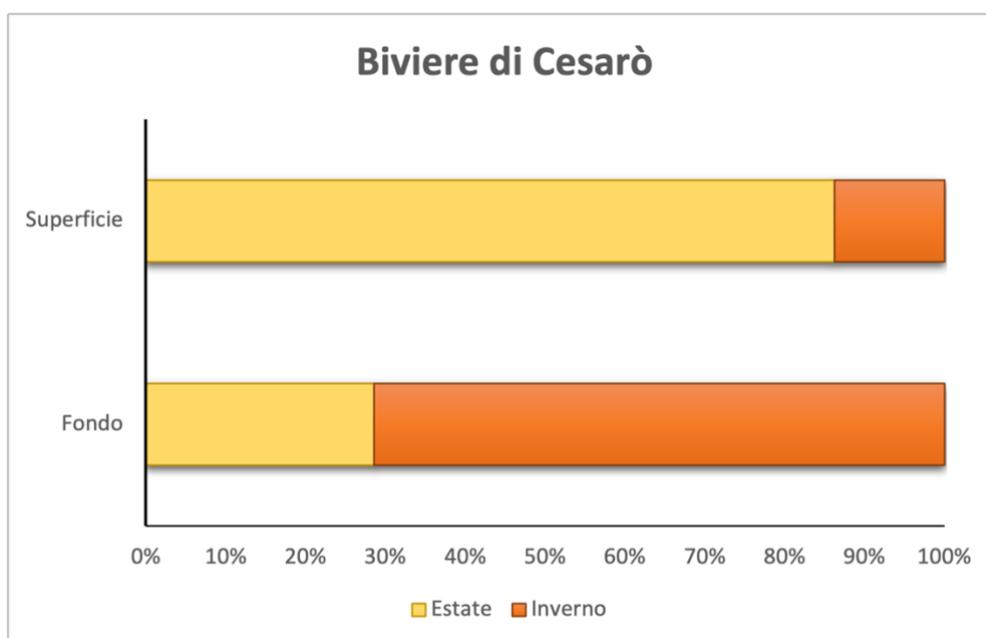


Figura 25 Andamento stagionale delle percentuali di detriti antropogenici campionati nelle stazioni superficie e fondo al Biviere

4.3.5 Analisi statistica

I risultati dei parametri ambientali sono riportati nella tabella 31.

Tab1

Tabella 31 Parametri ambiente acquatico raccolti nel lago Biviere e Maulazzo, durante la stagione invernale ed estiva. I dati sono riportati come media e deviazione standard (SD)

	Biviere Inverno		Maulazzo inverno		Biviere estate		Maulazzo estate	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Temperatura °C	8,95	0,07	8,65	0,07	16,55	0,07	17,15	0,49
pH	6,45	0,07	7,45	0,07	6,25	0,07	7,15	0,07
Torbidità cm	169,5	0,7	149,5	0,70	180	0	171	1,41
Potenziale redox mV	148	0	153	0	154,5	0,70	150,1	0,14
CoducibilitàµS/cm	600	0	597,5	0,70	592	0	580,5	0,70
%O ₂	97,55	0,63	95,15	0,21	98,15	0,07	106,35	0,21

I risultati ottenuti con l'analisi ANOVA a due vie (Two Way-ANOVA) sono riportati nella tabella 32

Tabella 32 Analisi Two Way-ANOVA

Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff,	95,00% CI of diff,	Significant?	Summary	Adjusted P Value
Temperatura °C					
Biviere Inverno vs. Maulazzo inverno	0,3	-1,232 to 1,832	No	ns	0,9411
Biviere Inverno vs. Biviere estate	-7,6	-9,132 to -6,068	Yes	****	<0,0001
Maulazzo inverno vs. Maulazzo estate	-8,5	-10,03 to -6,968	Yes	****	<0,0001
Biviere estate vs. Maulazzo estate	-0,6	-2,132 to 0,9317	No	ns	0,678
pH					
Biviere Inverno vs. Maulazzo inverno	-1	-2,532 to 0,5317	No	ns	0,2766
Biviere Inverno vs. Biviere estate	0,2	-1,332 to 1,732	No	ns	0,9811
Maulazzo inverno vs. Maulazzo estate	0,3	-1,232 to 1,832	No	ns	0,9411
Biviere estate vs. Maulazzo estate	-0,9	-2,432 to 0,6317	No	ns	0,3608
Torbidità cm					
Biviere Inverno vs. Maulazzo inverno	20	18,47 to 21,53	Yes	****	<0,0001
Biviere Inverno vs. Biviere estate	-10,5	-12,03 to -8,968	Yes	****	<0,0001
Maulazzo inverno vs. Maulazzo estate	-21,5	-23,03 to -19,97	Yes	****	<0,0001
Biviere estate vs. Maulazzo estate	9	7,468 to 10,53	Yes	****	<0,0001
Potenziale redox mV					
Biviere Inverno vs. Maulazzo inverno	-5	-6,532 to -3,468	Yes	****	<0,0001
Biviere Inverno vs. Biviere estate	-6,5	-8,032 to -4,968	Yes	****	<0,0001
Maulazzo inverno vs. Maulazzo estate	2,9	1,368 to 4,432	Yes	***	0,0003
Biviere estate vs. Maulazzo estate	4,4	2,868 to 5,932	Yes	****	<0,0001
CoducibilitàµS/cm					
Biviere Inverno vs. Maulazzo inverno	2,5	0,9683 to 4,032	Yes	**	0,0014
Biviere Inverno vs. Biviere estate	8	6,468 to 9,532	Yes	****	<0,0001

Maulazzo inverno vs. Maulazzo estate	17	15,47 to 18,53	Yes	****	<0,0001
Biviere estate vs. Maulazzo estate	11,5	9,968 to 13,03	Yes	****	<0,0001
%O ₂					
Biviere Inverno vs. Maulazzo inverno	2,4	0,8683 to 3,932	Yes	**	0,0021
Biviere Inverno vs. Biviere estate	-0,6	-2,132 to 0,9317	No	ns	0,678
Maulazzo inverno vs. Maulazzo estate	-11,2	-12,73 to -9,668	Yes	****	<0,0001
Biviere estate vs. Maulazzo estate	-8,2	-9,732 to -6,668	Yes	****	<0,0001

Le principali differenze significative sono state osservate in molti dei parametri indagati - torbidità, potenziale redox, conducibilità e %O₂ – sia mettendo a confronto i dati ottenuti dai prelievi effettuati nella stessa area in funzione della stagione, che confrontando le due diverse aree di studio in funzione anche del periodo stagionale.

È interessante notare che il pH non ha mostrato differenze significative tra i siti di campionamento e le stagioni ($p > 0,05$).

4.4 Discussioni

Un tema recentemente molto dibattuto riguarda il fenomeno dell'acidificazione degli oceani, un processo che causa un aumento dell'acidità delle acque dovuto all'assorbimento della CO₂ di origine antropica. L'oceano assorbe circa il 30% dell'anidride carbonica (CO₂) che viene rilasciata nell'atmosfera. Quando i livelli di CO₂ atmosferica aumentano si innesca una reazione a catena con un conseguente aumento delle temperature e un incremento dall'assorbimento di anidride carbonica da parte delle acque. Una volta assorbita, la CO₂ va incontro a una serie di reazioni chimiche che provocano un incremento della concentrazione di ioni idrogeno, influenzando quindi sull'aumento l'acidità (Raven et al., 2020).

Dall'epoca successiva alla prima rivoluzione industriale, la concentrazione di anidride carbonica nell'atmosfera è costantemente aumentata raggiungendo gli allarmanti livelli attuali e, di conseguenza, il pH delle acque oceaniche superficiali è diminuito di 0,1 unità di pH. Sebbene questo possa apparire come un valore residuale, poiché la scala del pH è logaritmica, tale cambiamento comporta di fatto un aumento di circa il 30% dell'acidità. Tale fenomeno non è tuttavia limitato agli oceani, in quanto il processo di acidificazione è stato riscontrato e osservato per la prima volta nei laghi e nei corsi d'acqua, ove presenta delle importanti specificità, e solo in un secondo momento in ambito oceanico (Pötter et al., 2021; Tranvik, 2021).

A questa dinamica è inoltre correlato un aumento della concentrazione di metalli nelle acque, sia superficiali che sotterranee, in quanto in soluzione acida i metalli tendono a solubilizzare (Tranvik 2021).

In relazione a tale rilevante processo di carattere globale, mentre nel Maulazzo sono stati registrati livelli di pH normali, compresi tra 7,19 e 7,22, nel Biviere si sono rilevati valori di pH compresi tra 6,12 e 6,59, che prefigurano un chiaro e rilevante trend discendente rispetto a quanto certificato dall' Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) nel 2005 e nel 2006. L'ARPA aveva infatti documentato range rispettivamente di 7,55 e 7,61, e di 7,45 e 7,46.

Tale rilievo appare di significativo interesse scientifico in quanto consente di ipotizzare la sussistenza di una dinamica perturbatoria dell'ecosistema indotta dagli effetti negativi dell'incremento della CO₂ nell'atmosfera e dal surriscaldamento globale. Rispetto al Maulazzo, infatti, il Biviere è maggiormente esposto al combinato disposto dei due fattori, in quanto è sito ad un'altezza inferiore. Quanto al meccanismo di azione ipotizzato, l'assorbimento da parte delle acque interne di elevati livelli di CO₂ potrebbe avere determinato un abbassamento del livello di pH - e dunque un progressivo processo di acidificazione – favorito anche dall'incremento della temperatura, nell'ambito di una interazione scientificamente nota (Moser et al., 2019; Sommaruga-Wögrath et al., 1997).

In riferimento ad altri differenti parametri, nel Biviere di Cesarò – questa volta in linea con quanto riscontrato dall' ARPA nel 2005 e 2006 - e nel Maulazzo è stata rilevata una maggiore percentuale di ossigeno disciolto nello strato superficiale rispetto a quello profondo. Questa differenza, anche se ridotta, è dovuta ad una maggiore attività fotosintetica in superficie e a processi di decomposizione a carico di batteri nello strato profondo. Tale rilievo risulta di notevole importanza in quanto evidenzia il buono stato di salute del corpo lacustre.

In relazione a parametri quali clorofilla, trasparenza e ossigeno disciolto, il Biviere di Cesarò presenta un indice di qualità che può essere considerato sufficiente, e risulta superiore a quello riscontrato per il lago Maulazzo. A completare il quadro dell'analisi chimica è emersa una preoccupante concentrazione di mercurio nelle acque campionate in entrambi i laghi. Viceversa, sia nei sedimenti e che nel tessuto muscolare dei pesci (parte edibile) non sono state riscontrate tracce rilevanti di mercurio, il che induce a presupporre la sussistenza, in entrambi i laghi, di un processo di inquinamento da mercurio estremamente recente.

Sulla base dei dati ottenuti dalle analisi microbiologiche effettuate – in riferimento ai parametri normativi stabiliti dal D.lgs 152/2009 – emerge per entrambi i laghi una soddisfacente qualità microbiologica, mentre l'attività di rilevamento di detriti antropogenici ha rivelato una significativa presenza di microplastiche. Quest'ultimo dato appare notevole soprattutto in considerazione della distanza intercorrente con i principali centri abitati.

In generale, le molteplici condizioni naturali e di derivazione antropica dei laghi costituiscono la funzione di processi a scala più ampia, tra i quali la temperatura, il tasso di precipitazioni, il flusso naturale di materia organica e inorganica, l'immissione di fertilizzanti agricoli e di sostanze chimiche. Pertanto, i laghi e le acque interne in genere non costituiscono soltanto preziosi ecosistemi e fonti di risorse naturali, ma rappresentano un importante soggetto sentinella per i mutamenti ambientali, al di là dei loro specifici confini (Williamson et al., 2008).

Capitolo 5 HEALTH MONITORING E DATA ANALYSIS DELL'ITTIOFAUNA

5.1 Introduzione

Nel contesto degli organismi acquatici, recenti rilevanze scientifiche hanno evidenziato un costante incremento delle malattie infettive, parassitarie, nonché delle lesioni di organi e tessuti attribuibili all'incidenza del fenomeno dal cambiamento climatico sull'ecosistema. ("Effects of global warming on fishes and fisheries," 2021; Slenning, 2010)

Il surriscaldamento climatico globale sta infatti determinando un crescente processo di "acidificazione" degli oceani e delle acque interne, ossia un decremento progressivo dei livelli medi di pH. Tale fenomeno, che incide negativamente sulla risposta immunitaria della fauna acquatica, congiuntamente all'incremento precipitazioni piovose e ai danni provocati dalle tempeste, viene individuato come responsabile della maggiore incidenza di patologie negli organismi acquatici e della riduzione della biodiversità (Agenzia per la coesione territoriale, 2015; Alfonso et al., 2021; Marcos-López et al., 2010).

Negli ultimi 30 anni, osservando alcuni taxa marini Ward e Lafferty, (2004) hanno rilevato una crescente incidenza di malattie nelle specie marine, correlandola all'aumento della temperatura globale degli oceani. Sulla medesima falsariga Bally e Garrabou (2007) hanno osservato come le temperature più calde delle acque sembrano favorire i batteri rispetto ai loro ospiti invertebrati marini, determinando una maggiore incidenza di patologie. Si è infatti ipotizzato che lo stress fisiologico mediato dal clima possa compromettere la resistenza degli organismi nell'ambito degli ecosistemi marini (Alborali, 2006; Altekruze et al., 2000; Gubbins, 2006; Harvell et al., 1999a; Lafferty et al., 2004a). Sebbene l'impatto dei mutamenti climatici sulle malattie degli animali d'acqua dolce sia stato relativamente poco studiato, appare probabile che conclusioni simili possano applicarsi anche a tali ecosistemi (Marcos-López et al., 2010).

I pesci, infatti, sono poichilotermi e dunque la loro fisiologia, inclusa la risposta immunitaria, è direttamente influenzata dalla temperatura dell'ambiente (Bowden et al., 2007).

Per molte malattie che colpiscono i teleostei la temperatura è un fattore determinante per stabilire se l'infezione provoca malattia, mortalità o immunità e guarigione. È quindi molto probabile che il cambiamento climatico possa colpire i pesci in modo più grave e precoce rispetto agli animali omeotermi. Inoltre, l'aumento della temperatura dell'acqua dolce può favorire l'insediamento di specie animali acquatiche non autoctone e di agenti patogeni esotici, originari di regioni con temperature ambientali più elevate.

Similmente agli altri organismi animali, i pesci possono contrarre malattie principalmente da microrganismi, parassiti e funghi, che colpiscono sinergicamente in modo significativo gli allevamenti intensivi e gli ambienti confinati.

La malattia, dunque, appare come il risultato dell'interazione tra l'ospite, l'agente patogeno e l'ambiente (Martin et al., 1987). La temperatura dell'acqua ambientale influenza tutti e tre gli elementi della triade della malattia. In aggiunta a ciò, anche le interazioni tra la risposta immunitaria e la replicazione dei patogeni dipendono dalla temperatura.

Queste affezioni patologiche dei pesci hanno un impatto negativo rilevante sull'industria della pesca e dell'acquicoltura, comportando ingenti perdite economiche per il settore. La stragrande maggioranza di tali malattie risultano contagiose, fattore che rende necessaria l'adozione di precauzioni specifiche, trattamenti mirati e misure di controllo preventive al fine di evitarne la diffusione.

L'incidenza delle malattie nelle dinamiche degli ecosistemi d'acqua dolce è stata indagata in misura relativamente limitata rispetto a quanto fatto in relazione agli ambienti marini e terrestri (come evidenziato, tra gli altri, da Harvell et al. 1999, 2002; Lafferty, Porter, and Ford 2004; Ostfeld, Keesing, and Eviner V.T. 2008). Ad eccezione delle malattie a trasmissione acquatica che colpiscono gli esseri umani, come il colera, o di quelle veicolate da vettori, come la malaria (Cotruvo et al., 2004; Resh V.H., 2009) risultano attualmente scarse le revisioni sistematiche che hanno approfondito in modo esaustivo i modelli di malattia prevalenti nelle acque dolci. Una valutazione analoga appare attualmente estendibile al tema delle malattie che colpiscono la fauna selvatica in ambienti d'acqua dolce. È importante, inoltre, evidenziare come le valutazioni delle emergenti minacce alla biodiversità degli ecosistemi d'acqua dolce tendano ad attribuire una scarsa importanza alle malattie infettive o addirittura a trascurarle del tutto (Dudgeon et al. 2006).

Di contro, gli studi epidemiologici hanno rilevato numerosi casi documentati di gravi malattie e di eventi di mortalità di massa nelle acque dolci. Esempi come la Cyprinid Herpes Virus 3 nei pesci d'acqua dolce, la chitridiomicosi negli anfibi, il botulismo di tipo E negli uccelli acquatici e la peste dei gamberi di fiume sono tutti indicatori di episodi significativi. Tuttavia, se tali esempi riflettano effettivamente un modello più ampio di emergenza delle malattie negli ecosistemi d'acqua dolce rimane al momento una questione che necessita di ulteriore approfondimento.

Negli ultimi 150 anni, i sistemi acquatici di tutto il mondo hanno subito l'impatto di molteplici fattori antropici, come ampiamente documentato da diversi studi (Dynesius and Nilsson, 1994; Falkenmark

and Allard, 1991; Rahel, 2000). Le attività umane hanno infatti la capacità di alterare i processi fisici, chimici e biologici associati alle risorse idriche, con conseguenti ricadute sulle comunità biologiche che vi risiedono. Karr (1991) ha identificato cinque principali categorie di fattori ambientali che, se influenzati dalle attività umane, possono portare al degrado degli ecosistemi acquatici:

- Fonti di cibo/energia: Questi fattori includono il tipo, la quantità e le dimensioni delle particelle di materiale organico, così come le variazioni stagionali nell'energia disponibile.
- Qualità dell'acqua: Questa categoria comprende parametri come l'ossigeno disciolto, i nutrienti e le sostanze chimiche presenti nell'acqua.
- Struttura dell'*habitat*: Questi fattori riguardano aspetti come il tipo di substrato, la sinuosità del corso d'acqua e la morfologia del canale, oltre alla connettività tra diversi ambienti.
- Regime di flusso: Questa categoria considera la distribuzione temporale delle piene e delle basse portate nel corso d'acqua.
- Interazioni biotiche: Questi fattori includono dinamiche come la competizione tra le specie e il parassitismo.

Nella maggior parte dei casi, le comunità biologiche agiscono come indicatori affidabili e precisi dello stato di salute del sistema acquatico, poiché riflettono l'insieme di influenze chimiche e fisiche, compresi gli effetti additivi e sinergici. In questo contesto, i pesci svolgono un ruolo cruciale come bioindicatori nella gestione delle risorse idriche e nella ricerca limnologica applicata. La loro presenza, abbondanza, composizione e stato di salute possono fornire preziose informazioni per valutare l'ecosistema acquatico e l'impatto delle attività umane su di esso.

La definizione di bioindicatore fornita da (Markert, 1994) sottolinea che un bioindicatore è un organismo (o parte di esso o una comunità di organismi) che conserva informazioni sulla qualità dell'ambiente circostante. Di conseguenza, l'impiego di bioindicatori mira a fornire una descrizione dell'ambiente naturale, a rilevare e valutare gli impatti delle attività umane e a valutare l'efficacia di misure di ripristino o bonifica. In tutti questi contesti, i pesci sono comunemente impiegati come bioindicatori.

Un approccio tradizionale all'impiego dei pesci come bioindicatori include l'osservazione dei cambiamenti spaziali nelle comunità ittiche lungo i corsi d'acqua nei sistemi fluviali. Inoltre, i modelli di zonazione dei pesci sono utilizzati per classificare i fiumi in base alla loro qualità ambientale. (Chovanec et al., 2003). I pesci sono stati storicamente utilizzati per classificare vari tipi di ecosistemi acquatici stagnanti. La composizione della fauna ittica in tali ambienti riflette una serie di parametri,

tra cui la forma del corpo d'acqua, lo stato nutrizionale, la distribuzione termica e di ossigeno, nonché l'estensione delle zone costiere. Di conseguenza, l'uso dei pesci come bioindicatori offre un quadro importante per valutare la salute e l'integrità degli ecosistemi acquatici e la risposta agli impatti antropici.

Nonostante gli sforzi crescenti di molti Stati e istituzioni internazionali per ridurre le emissioni di sostanze tossiche derivanti da scarichi industriali e veicoli a motore, nonché per trattare le acque reflue industriali e comunali, gli ecosistemi dei paesi altamente industrializzati contengono concentrazioni dannose di un numero sempre maggiore di sostanze chimiche. Queste sostanze tendono ad accumularsi nei suoli e nei sedimenti, dove possono essere liberate nuovamente dopo aver alterato le condizioni fisico-chimiche del substrato. Molte di queste sostanze persistono nell'ambiente per decenni, come nel caso del DDT e dei PCB. Le concentrazioni di metalli pesanti nei sedimenti possono superare notevolmente quelle dell'acqua soprastante, spesso con un divario che varia da uno a diecimila volte (Chovanec et al., 2003). Anche regioni remote, come le zone di alta montagna e le regioni artiche, sono esposte a quantità significative di inquinanti a causa della deposizione atmosferica dopo il trasporto su lunghe distanze. In questi ecosistemi altamente vulnerabili, anche piccole quantità di sostanze tossiche possono rappresentare una minaccia significativa (Chovanec et al., 2003).

I pesci d'acqua dolce, a causa del loro stile di vita acquatico e delle loro abitudini alimentari, rappresentano una categoria di organismi particolarmente vulnerabile e altamente esposta all'inquinamento ambientale. Questa elevata vulnerabilità deriva dal fatto che i pesci, soprattutto se stanziali, non possono sfuggire agli effetti nocivi degli inquinanti, essendo costantemente immersi nell'ambiente acquatico (Mahboob et al., 2014; Saleh and Marie, 2015; Yarsan and Yipel, 2013). Inoltre, i pesci sono più sensibili a molti agenti tossici rispetto agli invertebrati, rendendoli eccellenti indicatori della salute degli ecosistemi acquatici (Abumourad et al., 2014; Authman, 2011, 2007; Authman et al., 2013, 2012; Gaber et al., 2014; Zaki et al., 2014) I metalli pesanti sono una classe di inquinanti derivati da una varietà di fonti, comprese sia fonti naturali che attività antropiche (Bauvais et al., 2015) Nelle zone acquatiche, l'inquinamento da metalli pesanti può derivare da diverse fonti, tra cui la deposizione diretta dall'atmosfera, l'erosione geologica e lo scarico di rifiuti agricoli, domestici, urbani e industriali. Questi inquinanti possono anche essere introdotti negli ambienti acquatici attraverso gli impianti di trattamento delle acque reflue (Campos-Garcia et al., 2015; Dhanakumar et al., 2015; Maier et al., 2015). In sintesi, la sensibilità dei pesci agli inquinanti e la loro

possibilità di bio-accumularli, li rende una risorsa preziosa per la valutazione della qualità ambientale e per la comprensione degli effetti dell'inquinamento sugli ecosistemi acquatici. La presenza e le concentrazioni di questi inquinanti nei tessuti dei pesci possono fornire importanti indicazioni sullo stato di salute degli ambienti acquatici e sull'efficacia delle misure di gestione e controllo.

La contaminazione da metalli pesanti e metalloidi in concentrazioni elevate nelle acque e nei sedimenti costituisce una seria minaccia in ragione della loro intrinseca potenziale tossicità, della loro perdurante presenza nell'ambiente, nonché della loro capacità di bioaccumulo e biomagnificazione lungo le catene alimentari (Has-Schön et al., 2006). Tra gli organismi acquatici, i pesci occupano un'importante posizione come indicatori primari della presenza di metalli pesanti (Rashed, 2001). Essi presentano diverse caratteristiche che li rendono strumenti di notevole utilità nell'analisi dell'inquinamento da metalli negli ecosistemi, oltre a fornire importanti contributi nella comprensione delle dinamiche naturali degli ecosistemi acquatici e nella valutazione dei cambiamenti ambientali (Lamas et al. 2007). È essenziale notare che alcuni pesci, trovandosi in cima alla catena alimentare acquatica, manifestano la propensione ad accumulare maggiori quantità di metalli pesanti nei loro tessuti corporei. Questi metalli possono essere quindi trasmessi all'uomo attraverso il consumo di pesce, potenzialmente evocando condizioni patologiche (Al-Yousuf et al., 2000).

Ricerche condotte sia sul campo che in laboratorio hanno accertato che l'accumulo di metalli pesanti nei tessuti dei pesci è principalmente modulato dalle concentrazioni dei metalli stessi nell'acqua, nonché dal periodo di esposizione. Tuttavia, è fondamentale rilevare che ulteriori variabili ambientali quali la temperatura dell'acqua, la concentrazione di ossigeno, il pH, la durezza dell'acqua, la salinità, l'alcalinità e il tenore di carbonio organico disciolto possono altresì esercitare un ruolo rilevante nell'influenzare sia l'accumulo che la tossicità dei metalli per i pesci (Has-Schön et al., 2006; Jitar et al., 2015; Sassi et al., 2010). Pertanto, l'impiego dei pesci come indicatori ambientali rappresenta un valido strumento per ottenere una visione completa degli impatti dei metalli pesanti nei sistemi acquatici.

L'indicatore evidente di acque fortemente inquinate, ovvero la presenza di pesci morti, è facilmente riconoscibile, ma l'effetto sub-letale dell'inquinamento potrebbe causare solo una condizione di salute non ottimale nei pesci. Livelli molto bassi di inquinamento potrebbero non avere un impatto evidente sul pesce stesso, il quale non mostrerebbe segni evidenti di malattia, ma potrebbero ad esempio diminuire la fecondità delle popolazioni di pesci, portando a un declino a lungo termine e

alla possibile estinzione di questa importante risorsa naturale (Dupuy et al., 2015; Krishnani et al., 2003). Inoltre, è noto che i metalli pesanti possono indurre stress ossidativo e/o carcinogenesi agendo come mediatori di radicali liberi/specie reattive dell'ossigeno (Javed et al. 2015).

L'incremento dei livelli di proteine legate allo stress e l'attivazione di specifici sistemi di disintossicazione sono risposte comuni degli organismi all'esposizione a sostanze tossiche, che riflettono la loro capacità di adattamento. Le modifiche a livello molecolare si verificano rapidamente e non implicano necessariamente un deterioramento delle funzioni cellulari. D'altra parte, le alterazioni a livello strutturale indicano un graduale impatto sul metabolismo, spaziando dalle risposte di adattamento a quelle degenerative, che possono avere gravi conseguenze sulla sopravvivenza dei pesci.

È stato abbondantemente dimostrato che le sostanze tossiche come i metalli pesanti inducono modelli altamente specifici di alterazioni cellulari (Hussain et al., 2021; Jabeen et al., 2018; Kaur et al., 2018; Mahboob et al., 2020). È importante notare che la nostra comprensione di queste risposte è basata principalmente su un numero limitato di sostanze tossiche studiate. Negli ecosistemi naturali, in cui gli organismi possono essere esposti a una gamma diversificata di sostanze tossiche che spesso agiscono contemporaneamente, la situazione diventa notevolmente più complessa.

Le indagini sanitarie, come le analisi istopatologiche rappresentano un ottimo strumento per lo studio dello stato di salute di un ecosistema, in quanto, gli effetti dannosi di un determinato squilibrio ambientale si manifestano prima a livello cellulare o tissutale, per poi tradursi in cambiamenti significativi nell'organismo o nella popolazione (Carlson and Zelikoff, 2008).

5.2 Materiali e metodi

5.2.1 Esame autoptico

Durante l'esame autoptico, gli esemplari campionati sono stati collocati sui tavoli da dissezione in posizione laterale, con la testa rivolta a sinistra rispetto all'operatore.

Si è quindi proceduto effettuando un'analisi esterna del corpo dell'animale al fine di individuare possibili deformità, malattie congenite o acquisite, come deviazioni della colonna vertebrale, problemi nutrizionali, segni di malnutrizione o malattie debilitanti. Sono state ricercate le possibili lesioni scaturite in seguito a malattie infettive, fungine e parassitarie, come ulcere, emorragie e lesioni nodulari.

Le pinne, come anche le branchie sono state osservate utilizzando uno stereo microscopio, per verificare possibili erosioni, emorragie o ulcere sulla superficie, attenzionando anche la possibile presenza di parassiti. Sono stati effettuati controlli oculari per valutare la presenza di esoftalmi, è stata ispezionata la cavità orale per individuare lesioni cutanee o la presenza di parassiti. In generale si cercava di escludere la presenza di lesioni cutanee e branchiali ascrivibili a Cyprinid Herpes Virus 3.

Dopo aver adeguatamente valutato la superficie esterna, si procedeva con l'ispezione della cavità addominale. All'apertura della cavità addominale (Fig. 26), è stata valutata la presenza di eventuali liquidi di varia natura, come liquido sieroso o emorragico. Successivamente, è stato effettuato il prelievo renale per lo screening microbiologico e, infine, si esaminavano gli organi celomatici alla ricerca di possibili lesioni attribuibili a malattie infettive e parassitarie.



Figura 26 Esame autoptico su esemplari di: a) *A. melas*; b) *T. tinca*

5.2.2 Indagini istopatologiche

Le analisi per la valutazione di lesioni istopatologiche sono state effettuate su 12 esemplari di *Cyprinus carpio*, 6 di *Tinca tinca*, 23 esemplari di *Ameiurus melas*, 4 esemplari di *Perca fluviatilis* e 6 di *Gambusia holbrooki*.

Per l'esame istologico, sono stati ottenuti campioni da sezioni sia trasversali che longitudinali di vari organi come pelle, branchie, fegato, milza, cuore, rene, tratto gastroenterico e di tessuto muscolare. I campioni sono stati fissati in una soluzione di formalina tamponata al 10% e dopo la fissazione sono stati disidratati attraverso una serie di alcoli crescenti, diafanizzati con xilolo e inclusi in paraffina. Le sezioni sottili, con uno spessore di 4-5 μ m, ottenute utilizzando un microtomo sono state colorate con diverse tecniche come Ematossilina-Eosina, Diff-Quik, Giemsa, PAS e tricromiche di Azan e di Masson modificata Goldner e Zielh Nielsen. Le sezioni colorate sono state quindi osservate al microscopio ottico a ingrandimenti compresi tra 10x e 100x.

L'esame istopatologico ha consentito di valutare lo stato di salute dei teleostei campionati, analizzando l'aspetto microscopico dei tessuti e degli organi prelevati.

5.2.3 Malattie infettive

Esemplari di teleostei catturati nel lago Maulazzo sono stati utilizzati per effettuare screening batteriologici al fine di migliorare le conoscenze relative la presenza di specie patogene presenti nell'organismo.

5.2.3.1 Coltivazione e isolamento delle colonie

Sono stati condotti screening batteriologici su 5 esemplari di *C. carpio*, 5 esemplari di *A. melas*, 4 di *T. tinca* e 4 di *P. fluviatilis*, provenienti dal lago Maulazzo. I teleostei, trasportati in buste sterili presso il Dipartimento Chibiofaram dell'Università degli Studi di Messina, dove sono stati identificati su base morfologica e sottoposti ad esame autoptico, durante il quale sono stati prelevati campioni asettici dal rene cefalico e caudale al fine di indagare la presenza di eventuali batteri patogeni. Brevemente si è proceduto mediante una disinfezione con etanolo 70%; dopo l'ispezione della cavità addominale si è proceduto al prelievo del campione disinfettando la superficie esterna del celoma rivestente l'organo ed effettuando il prelievo con ansa sterile.

I campioni prelevati sono stati seminati su terreni di coltura come Blood Agar (BA) e Tryptic Soy Agar (TSA), dopo la semina le piastre sono state incubate a una temperatura di 30°C in un termostato (ICN 35 PLUS, Argo Lab). Passate 24/48 ore dall'incubazione, le colonie batteriche cresciute sono state isolate, è stata effettuata la colorazione di Gram e sono state sottoposte a studi molecolari per ottenere un'identificazione a livello di specie della comunità microbica presente. Questo approccio permette di identificare la frazione coltivabile dei microorganismi presenti nel sistema circolatorio e di valutare la presenza di eventuali specie di batteri patogeni.

Le colonie isolate in seguito all'identificazione sono state conservate in eppendorf (Protect Multi-purpose cryobeads, KAIROSafe) e conservate a -80°C.

5.2.3.2 Identificazione molecolare

Il DNA genomico delle colonie isolate è stato estratto da una coltura liquida mediante l'utilizzo del Kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) seguendo le indicazioni del produttore. È rilevante sottolineare che l'eluizione è stata eseguita utilizzando un volume di 100µl,

con l'obiettivo di concentrare ulteriormente il campione, il DNA estratto è stato conservato a -20°C per le future analisi. L'identificazione molecolare degli isolati (3 colonie) è stata effettuata studiando il gene 16S DNA. La PCR è stata effettuata utilizzando la GoTaq® Colorless Master Mix (Promega Madison, Wisconsin, USA), lavorando con un volume di 50µl. La PCR è stata effettuata utilizzando la coppia di primer di sequenziamento 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3').

Le condizioni della PCR erano le seguenti: una denaturazione iniziale a 95°C per 5 minuti, seguita da 35 cicli di denaturazione a 95°C per 45 s, annealing per 45 s a 55°C, allungamento a 72°C per 60 s e la fase finale di estensione è stata impostata a 72°C per 5 minuti. L'amplicone atteso di 1500 bp è stato valutato su gel di agarosio al 2% (w/v) ed estratto con il kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. La concentrazione e la purezza sono state verificate utilizzando un Implen N50 NanoPhotometer (Westlake Village, USA).

Il sequenziamento dei frammenti di DNA purificati è stato eseguito da Genechron (Roma, Italia) in entrambe le direzioni, forward e reverse, utilizzando gli stessi primer usati per l'amplificazione. Gli allineamenti delle sequenze sono stati eseguiti con l'algoritmo ClustalW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>). Le sequenze sono state analizzate utilizzando il Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) per la ricerca di similarità con il database del National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per calcolare la significatività statistica delle corrispondenze.

5.2.4 Studio delle parassitosi

Nell'ambito delle ricerche condotte su soggetti campionati durante le stagioni primavera/estate, sono state attuate approfondite indagini parassitologiche per identificare possibili ecto ed endoparassiti su pool di 4 esemplari per specie campionata nel lago Maulazzo (*C. carpio*, *A. melas*, di *T. tinca* e *P. fluviatilis*). In particolare, è stata eseguita un'analisi approfondita delle branchie e della pelle al fine di individuare ectoparassiti. Questa valutazione è stata effettuata attraverso un esame macroscopico e microscopico che includeva scraping cutanei e biopsie branchiali.

In parallelo, la valutazione degli organi è stata condotta seguendo il protocollo proposto da [Shokoofeh Shamsi 2016], con alcune modifiche apportate in base alle esigenze specifiche dell'indagine. Per analizzare il tratto gastrointestinale (GI), si è proceduto ad aprirlo con l'ausilio di

forbici. Successivamente, la mucosa gastrica e intestinale è stata delicatamente raschiata utilizzando un vetrino da microscopio. Gli organi sono stati trattati separatamente per una valutazione accurata. Il contenuto gastrointestinale e la mucosa sono stati trasferiti in becher conici graduati da 1 litro, poi riempiti con soluzione salina per la fase successiva di sedimentazione. Durante questa fase, il surnatante è stato sostituito a intervalli regolari, generalmente ogni ora, al fine di chiarificare il sedimento. Dopo aver effettuato da 2 a 3 cambi d'acqua, a seconda della limpidezza del surnatante, il sedimento è stato trasferito in una piastra di Petri e sottoposto a monitoraggio utilizzando uno stereomicroscopio (SteREO Discovery.V12 Zeiss, Jena, Germania).

Tutti i campioni di parassiti raccolti durante questa fase sono stati conservati in etanolo al 70% al fine di garantirne l'integrità fino alla successiva fase di identificazione morfologica. Gli altri esemplari non destinati all'analisi immediata sono stati conservati a temperature di -80°C per consentire ulteriori analisi di natura molecolare.

L'identificazione dei campioni è stata effettuata mediante la diafanizzazione degli esemplari, un processo che prevede l'immersione in glicerina per un periodo di 24 ore. Successivamente, i campioni sono stati montati e analizzati utilizzando chiavi morfologiche specifiche (Petter and Morand, 1988).

L'analisi morfologica è stata condotta attraverso un microscopio ottico (Axioskop 2 plus, Zeiss, Jena, Germania), con tutte le immagini catturate utilizzando una fotocamera digitale (AxioCam Mrc, Zeiss, Jena, Germania) supportata da un sistema digitale (Axiovision, Zeiss, Jena, Germania).

5.3 Risultati

5.3.1 Indagini istopatologiche

Dai rilievi anatomico-istopatologici dei teleostei provenienti dal lago Maulazzo non sono emersi quadri riferibili a malattie infettive insistenti sul sito. Dall'osservazioni delle sezioni al microscopio ottico è risultato un quadro non patologico, non sono state osservate particolari lesioni su organi e tessuti e non sono state apprezzate neanche alterazioni cellulari.

Solo su un esemplare maschio di *C. carpio* (2200 g) è stata documentata un'alterazione all'interno della gonade maschile.

Nel vetrino della gonade maschile della carpa in questione è stata documentata la presenza di una struttura ovoide, circondata da tessuto gonadico fisiologico (Fig. 27 A). Inoltre, sono stati osservati accumuli di macrofagi sia sparsi nel tessuto gonadico che in torno ai vasi sanguigni (Fig. 27 B) Nella figura 27-A si può osservare detta struttura circondata da tubuli seminiferi repleti di spermatozoi maturi.

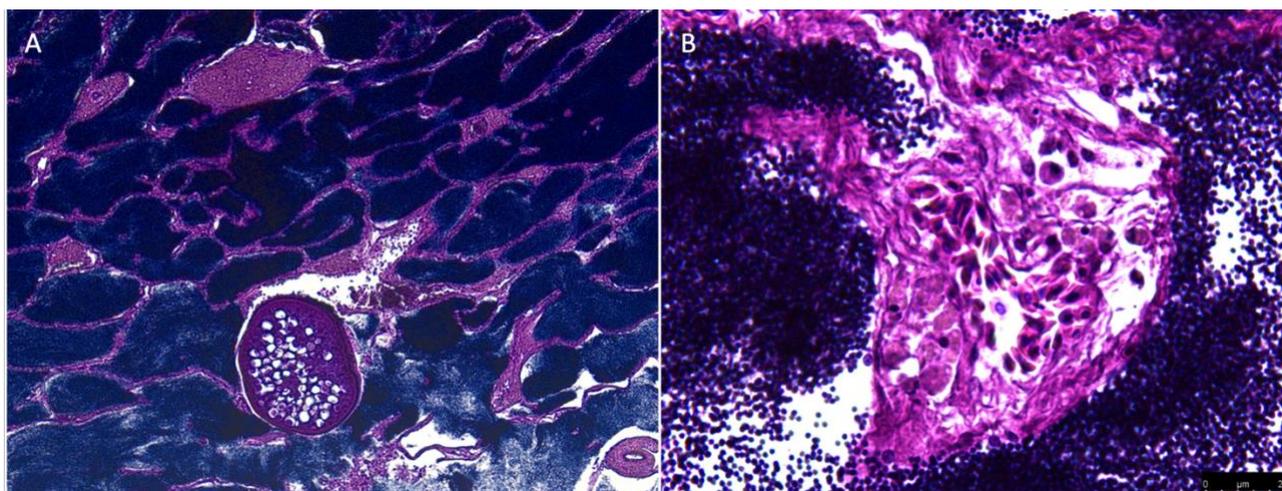


Figura 27 A) struttura ovoide, circondata da tessuto gonadico osservata a ingrandimento 5x; B) accumuli di macrofagi sia sparsi nel tessuto gonadico osservati a ingrandimento 20x.

Dalle osservazioni dei preparati istologici effettuati su 5 esemplari di *G. holbrooki* provenienti dal Biviere di Cesarò, è emersa la presenza di organismi unicellulari flagellati - probabilmente riconducibili al genere *Oodinium* (Chatton, 1912) - sulle lamelle secondarie delle branchie. La presenza di questi parassiti è stata osservata su tre esemplari.

Le branchie infettate dai parassiti flagellati mostrano un'iperplasia delle lamelle secondarie, causata dalla presenza di cisti parassitarie tra le lamelle secondarie stesse.

5.3.2 Malattie infettive

Le analisi della sequenza ottenute sono state effettuate mediante la piattaforma BLAST (NCBI) e ha permesso di identificare e documentare la presenza di specie batteriche potenzialmente patogene sia per i pesci che per l'uomo.

Sugli esemplari di *C. carpio*, *A. melas* e *T. tinca* sono stati isolati diversi ceppi patogeni, la specie isolata più frequentemente da tutti e tre i teleostei è stata *Aeromonas veronii*, ma sono stati isolati altri patogeni come *Kosakonia cowanii*, *Micrococcus lateus*, *Plesiomonas shigelloides*, *Yokenella regensburgei*, nella tabella 33 sono riportata una lista dei batteri isolati sono riportate inoltre le percentuali di identità e l'*accession number* ottenuto dall'analisi delle sequenze sulla piattaforma BLAST. Dalle colture renali effettuate su esemplari di *P. fluviatilis* non sono emersi batteri patogeni.

Tabella 33 Ceppi isolati dai teleostei campionati, percentuale di identità e Accession number.

Sp. ceppi isolato	<i>C. carpio</i>	<i>T. tinca</i>	<i>A. melas</i>	% ID	Accession number
<i>Aeromonas veronii</i>	x	x	x	99,86%	MF716690.1
<i>Kosakonia cowanii</i>	x			99,30%	OL795994.1
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	x		x	99,02%	OP861019.1
<i>Hafnia paralvei</i>		x		99,36%	OP755969.1
<i>Priestia flexia</i>			x	99,32%	HQ143585.1
<i>Lactococcus lactis</i>	x		x	99,51%	OP432220.1
<i>Yokenella regensburgei</i>	x			99,31%	LC383918.1
<i>Shewanella spp.</i>		x	x	98,64%	AP025014.1
<i>Micrococcus lateus</i>		x	x	99,56%	CP041689.1

5.3.3 Parassitosi

Le indagini effettuate non hanno evidenziato la presenza di ectoparassiti branchiali e cutanei; in due soggetti adulti di carpa comune (*C. carpio*) è stato possibile documentare la presenza di forme larvali di nematodi, sia libere nel lume intestinale, sia incistate a livello delle sierose. Le prime indagini effettuate hanno permesso di identificare i parassiti come *Contracaecum rudolphii* (Hartwich, 1964) sulla base della micrometria e della descrizione morfologica dell'estremità anteriore (Fig. 28).

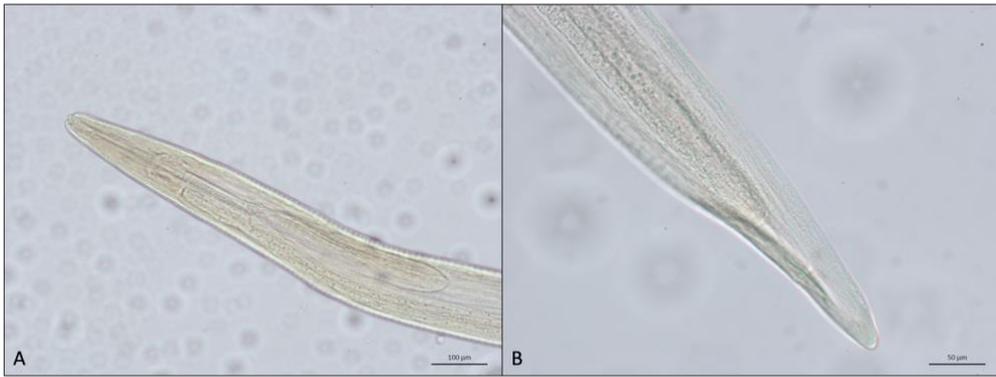


Figura 28 Estremità anteriore del parassita *Contracaecum rudolphii*.

5.4 Discussioni

I pesci sono il gruppo dei Vertebrati più rappresentativo negli ecosistemi acquatici e sono particolarmente sensibili alla presenza d'inquinanti nelle acque, con le quali vengono in diretto contatto attraverso le branchie e la superficie corporea. Per questi motivi hanno assunto un ruolo prioritario nelle valutazioni di rischio ambientale derivante dall'inquinamento dei corpi idrici (Tancioni, Scardi, and Cataudella 2006)

Insieme alle analisi dei singoli organi, le indagini sul tessuto gonadico stanno assumendo un ruolo importante per la valutazione delle alterazioni fisiologiche, istopatologiche e genetiche al fine di ottenere una valutazione degli effetti dell'inquinamento negli ecosistemi acquatici.

La struttura ovoide repertata nel testicolo di una carpa potrebbe essere riconducibile ad una infezione parassitaria riconducibile a protozoi microsporidi o ad una sindrome di femminilizzazione.

Il fenomeno di inversione di sesso, definito come la presenza di tessuto testicolare e ovarico nella stessa gonade (Bahamonde et al., 2013; Hecker et al., 2006), è un'alterazione ampiamente riportata soprattutto in specie di Ciprinidi. Questa alterazione fisiologica viene riscontrata principalmente negli individui maschili manifestandosi con la presenza di ovociti a sviluppo differente sparsi nel tessuto testicolare. Solitamente questi disturbi sono causati da un interferente endocrino ambientale, definito dall'USEPA (1997) come un agente esogeno che interferisce con la sintesi, la secrezione, il trasporto, l'azione legante o l'eliminazione degli ormoni naturali nell'organismo, che sono responsabili del mantenimento dell'omeostasi, della riproduzione, dello sviluppo e del comportamento. Una alterazione endocrina nei teleostei può portare a fenomeni di femminilizzazione (o demascolinizzazione) dei degli organismi di sesso maschile o a eventi di mascolinizzazione (o defemminilizzazione) degli organismi di sesso femminile, con effetti che si ripercuotono nelle popolazioni che occupano quell'ecosistema (USEPA, 1997).

Centinaia, di sostanze chimiche di sintesi sono state identificate come potenzialmente dannose per il sistema endocrino degli organismi terrestri e acquatici (L., 1997; USEPA, 1997), ma i meccanismi con cui questi contaminanti agiscono (aumentando o inibendo le concentrazioni di ormoni steroidei o di VTG nel plasma) sono difficilmente identificabili perché possono influenzare una o più sedi o vie all'interno dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi-fegato (Monosson, 2000). A complicare le questioni relative all'alterazione del sistema endocrino nelle popolazioni di pesci selvatici è la scarsità di informazioni sulle numerose sostanze chimiche di sintesi che possono: agire come estrogeni, antiestrogeni, androgeni o antiandrogeni nei pesci maschi o femmine della stessa specie; avere

effetti diversi su specie diverse, agire in modo sinergico o antagonista in combinazione con altri contaminanti ambientali (Kime, 1998; USEPA, 1997).

La diversità e la versatilità delle modalità attraverso cui si determina la differenziazione sessuale nelle specie ittiche comportano una notevole suscettibilità dell'apparato riproduttore di numerosi organismi acquatici, all'effetto perturbante dei contaminanti ambientali, in particolare degli EDCs (endocrine disrupting compounds, inquinanti interferenti endocrini). L'insorgenza di caratteristiche sessuali intermedie in specie originariamente a sessi separati è attualmente considerata il segno più affidabile della presenza di EDCs in un ecosistema acquatico. In diversi studi è stato riscontrato che sostanze come il Mercurio e i PCB sono possibili interferenti endocrini che possono promuovere, bloccare o ridurre l'attività di androgeni ed estrogeni nelle specie ittiche di entrambi i sessi (Friedmann et al., 2002; Monosson, 2000; Wiener and Spry, 1996).

Nel caso del presente studio, l'osservazione dell'istologico del tessuto gonadico di un esemplare maschio di *C. carpio*, che ha rivelato la presenza di una struttura ovoidale. Lo sviluppo di questo possibile ovocita potrebbe essere collegato all'elevata concentrazione di mercurio riscontrata nelle acque del Lago Maulazzo.

Sebbene confrontando i risultati con quelli ottenuti dalle ricerche Baldigo e colleghi (2006), in cui nei teleostei prelevati dal Hudson River di New York erano stati osservati fenomeni di inversione di sesso, nel loro caso di studio oltre al mercurio furono riscontrati alti livelli di PCB, anche questo considerato un interferente endocrino; i parametri relativi ai PCB non sono stati presi in esame nel presente studio.

Un'ulteriore differenza tra i due studi è rappresentata dal numero di organismi su cui sono stati condotte le ricerche, 142 esemplari di *C. carpio* per le ricerche di (Baldigo et al., 2006), in cui è stata osservata una percentuale di inversione di sesso del 10% per le carpe di sesso maschile; di contro il numero di esemplari presi in esame nel lago Maulazzo sono 12 carpe, le quali presentavano una percentuale di inversione di sesso del 16% delle carpe. Il basso numero di organismi utilizzato per le ricerche è dettato dall'area di studio, che rientra nel Parco Naturale, e presenta un'area di circa 0,05 km²; di conseguenza prelevare un numero elevato di organismi si tradurrebbe in un disturbo della popolazione che potrebbe causare un'alterazione degli equilibri.

Il caso riportato dal presente studio testimonia la presenza di una sola cellula uovo all'interno del tessuto gametico, a differenza di altri studi che descrivono un quadro istologico diverso, riportando la presenza di diverse cellule uovo a diverso stadio di sviluppo sparse, non è sufficiente per poter

determinare né un effetto né una causa. Pertanto, ulteriori approfondimenti risultano indispensabili per comprendere la natura e l'estensione del fenomeno.

Le indagini istologiche condotte su 41 esemplari di *A. melas*, 6 di *T. tinca*, 12 di *C. carpio* e 6 esemplari di *P. fluviatilis* hanno mostrato un quadro esaustivo dello stato della fauna ittica, che considerata la completa assenza di alterazioni istopatologiche riscontrabili su organi e tessuti (rene, milza, fegato, cuore, gonadi, tessuto muscolare e tessuto nervoso) si può definire in buono stato di salute.

Ulteriori indagini effettuate per valutare lo stato di salute degli organismi ittici sono gli screening batteriologici, mediante i quali è stato possibile avere informazioni sull'eventuale presenza di batteri patogeni e che, in caso di fattori di stress, possono sviluppare patogenicità. In questo studio, sono stati isolati batteri opportunisti patogeni come *A. veronii*, *K. cowani*, *M. luteus*, *P. shigelloides*, e *Y. regensburgei* da diverse specie di pesci d'acqua dolce che si presentavano apparentemente sani all'esame esterno, tra cui *C. carpio*, *A. melas* e *T. tinca*. I batteri sono stati identificati attraverso la colorazione batterica, le caratteristiche della coltura e la sequenza del gene 16S rDNA.

I batteri appartenenti al genere *Aeromonas* spp. sono ubiquitari e quindi possono essere presenti in un'ampia gamma di ambienti acquatici, tra cui acque dolci, estuari, acque costiere, e si trovano persino nell'acqua potabile e nelle acque di scarico clorate (Monfort and Baleux, 1990).

Nel presente caso di studio è stato isolato *Aeromonas veronii*, un importante patogeno che può causare sepsi e sindrome ulcerosa in teleostei d'acqua dolce, riportato come agente eziologico di importanti patologie che possono colpire pesci d'acqua dolce, anfibi, uccelli e animali a carne rossa, causando di conseguenza gravi perdite dell'acquicoltura e minacciando soprattutto la sicurezza alimentare (Ghenghesh et al., 1999). *A. veronii* è stato descritto come agente zoonotico capace di provocare sepsi, gastroenteriti e altre malattie, in soggetti anziani o in bambini con basse difese immunitarie (Chen et al., 2015; Pablos et al., 2011; Roberts et al., 2006) inoltre recenti rapporti suggeriscono che anche in individui con una funzione immunitaria sana possono essere infettati (Wu et al., 2007).

I risultati ottenuti confermano la presenza di *A. veronii* in tre specie di teleostei campionati su 4 (*C. carpio*, *A. melas* e *T. tinca*), considerato che le specie campionate sono considerate commestibili in molti paesi del mondo come in Cina, Vietnam Bangladesh e America (Engle et al., 2016), questa indagine sulla presenza di *A. veronii* è di grande importanza per la salute pubblica. Il consumo di questi prodotti ittici senza un'adeguata disinfezione/cottura porta può portare a intossicazioni alimentari, il che giustifica il monitoraggio dell'infezione da *A. veronii* nei prodotti acquatici. Tuttavia,

dalle indagini istopatologiche condotte sugli esemplari risultati positivi alla presenza di *A. veronii* non è stato documentato alcun quadro patologico (Li et al., 2020).

Un altro batterio patogeno di rilevanza per le acque dolci è *Plesiomonas shigelloides*, microorganismo gram-negativo appartenente alla famiglia Vibrionaceae, ampiamente distribuito nell'ambiente acquatico ed è considerato un nuovo agente patogeno che causa infiammazioni del tratto digestivo, testa leggermente fluttuante, nuoto lento e alimentazione ridotta, in molte specie di teleostei di acqua dolce, causando quindi ingenti danni soprattutto nel settore dell'acquicoltura. Ha distribuzione globale, viene rilevato prevalentemente in periodi estivi, in quanto raggiunge il suo optimum di crescita con le alte temperature. I pesci colpiti da infezioni causate da *P. shigelloides* solitamente presentano un accumulo di liquidi nella cavità addominale (ascite), il fegato si presenta gonfio, con macchie gialle chiare e rosse irregolari distribuite su di esso (Chen et al., 2022) Gli studi sull'isolamento e l'identificazione delle specie batteriche sono essenziali per comprendere l'esatta incidenza di una malattia in una determinata regione e per pianificare studi epidemiologici e programmi di controllo ed eradicazione (Gürtler and Stanisich, 1996). Nel presente studio *P. shigelloides* è stato isolato dal rene di due specie, *C. carpio* e *A. melas* i quali non presentavano alcun segno patognomiconico della malattia.

Un altro batterio patogeno, isolato da esemplari di *T. tinca* e *A. melas* che mostravano un quadro istologico non alterato, era *Micrococcus luteus*, patogeno di specie ittiche opportunistico emergente. Descritto da diversi autori come causa di infezione in esemplari giovani di *O. niloticus*, i quali mostravano un'eccessiva pigmentazione della pelle, perdita di squame, emorragie e ulcere sul corpo, congestione e marciume delle pinne, opacità corneale ed esoftalmia (Saleh et al., 2021; Sharma and Bansi, 2013) , segni non riscontrati negli esemplari oggetto di studio della presente indagine

Un patogeno, considerato pericoloso agente zoonotico emergente è rappresentato dal genere *Shewanella* spp (Janda, 2014), appartenente alla famiglia delle Alteromonadaceae, diffusi sia ambienti marini che d'acqua dolce (Buller, 2014). In ricerche recenti sono stati isolati ceppi differenti di *Shewanella* sp. da pesci sani, come testimonia il caso di studio, che da pesci che mostravano segni clinici di una malattia (Cocchi et al., 2018; Esteve et al., 2017; Jung-Schroers et al., 2018; Kim et al., 2006; Pakingking et al., 2015).

Ad oggi non sono presenti in letteratura studi su infezioni di patogeni sopra citati in Sicilia, questa è la prima indagine testimonia la presenza di batteri opportunisti potenzialmente patogeni in teleostei di origine selvatica che popolano le acque interne siciliane.

Risulta comunque molto importante continuare ad effettuare dei monitoraggi sanitari ad intervalli regolari così da poter monitorare lo stato di salute della fauna e, in sinergia con le diverse tipologie di analisi poter tenere sotto controllo lo stato di salute dell'intero ecosistema.

CONCLUSIONI

L'obiettivo della presente attività studio è quello di determinare una articolata definizione della biodiversità specifica ed ecosistemica delle acque interne del parco naturale dei Nebrodi, anche al fine di valutarne il grado di resilienza rispetto agli effetti degli elevati livelli di CO₂ nell'atmosfera e dell'attuale fenomeno globale dell'innalzamento delle temperature. L'intento è quindi quello di porre in relazione un interesse specifico di approfondimento con l'analisi dell'incidenza di dinamiche più generali, il cui impatto rappresenta oggi il principale fattore di minaccia per l'equilibrio degli ecosistemi. Di particolare interesse è anche la valutazione delle caratteristiche di tale livello di impatto nell'ambito di sistemi chiusi, quali quelli delle acque interne, che risultano differenti rispetto a quelli aperti, come quelli marini. Quanto emerso dalla presente attività consente di ipotizzare l'insistenza di una tendenza perturbativa, di cui sarà necessario verificare la sussistenza nel breve-medio periodo nonché il suo futuro livello di incidenza sulla biodiversità dell'area. Contestualmente, qualora la tendenza ipotizzata venisse confermata, si avrebbe anche la possibilità di stimare l'effettivo livello di resilienza nel breve-medio periodo dello specifico ecosistema in oggetto. Sebbene i dati rilevati ed elaborati nel presente lavoro abbiano documentato una significativa ricchezza in termini di diversità biologica nell'area di riferimento, infatti, l'individuazione e l'analisi di alcuni indicatori sentinella sembrerebbe aver delineato lo sviluppo di una dinamica potenzialmente perturbativa della stessa. I livelli bassi di pH riscontrati nel lago Biviere - quello collocato ad un'altezza inferiore tra i due presi in esame – potrebbero essere provocati da un fenomeno riconducibile all'incremento dei livelli di CO₂ nell'atmosfera e agli effetti del surriscaldamento climatico. È noto, infatti, come l'assorbimento da parte delle acque interne di elevati livelli di CO₂ determini un progressivo processo di acidificazione dovuto all'abbassamento del livello di pH e come, contestualmente, l'incremento della temperatura dell'acqua favorisca la riduzione dei livelli di pH (Adrian et al., 2009; Moser et al., 2019; Sommaruga-Wögrath et al., 1997).

I dati rilevati dall'ARPA per il Lago Biviere evidenziavano un livello di pH compreso tra 7,55 e 7,62 nel 2005, e valori tra 7,45 e 7,46 nel 2006. Tali risultati, raffrontati all'attuale rilevamento di un pH compreso tra 6,12 e 6,59, offrono pertanto un riferimento utile, benché limitato, per ipotizzare l'esistenza di uno specifico trend discendente. Contestualmente, è realistico ritenere che l'incremento del livello di acidità dell'acqua, indicato anche dalla presenza delle specie batteriche quali Alfabroteobatteri e Acidobatteri, potrebbe avere determinato la scomparsa dei Helophoridi, la cui presenza è di norma considerata un fattore indicativo della buona salute del contesto di

riferimento. Tale assenza potrebbe dunque rappresentare un primo importante elemento indice di un processo di alterazione dell'ecosistema preso in esame.

In conclusione, il presente studio ha inteso elaborare un'analisi della struttura della biodiversità dell'area in oggetto, offrendo allo stesso tempo degli elementi utili a sviluppare future – e necessarie – attività di monitoraggio e di ricerca.

BIBLIOGRAFIA

- Abumourad, I.M.K., Abbas, W.T., Authman, M.M.N., Girgis, S.M., 2014. Environmental impact of heavy metal pollution on metallothionein expression in Nile tilapia. *Res J Pharm Biol Chem Sci* 5, 998–1005.
- Adrian, R., O'Reilly, C.M., Zagarese, H., Baines, S.B., Hessen, D.O., Keller, W., Livingstone, D.M., Sommaruga, R., Straile, D., Van Donk, E., Weyhenmeyer, G.A., Winder, M., 2009. Lakes as sentinels of climate change. *Limnol Oceanogr* 54, 2283–2297.
https://doi.org/10.4319/LO.2009.54.6_PART_2.2283
- Agenzia per la coesione territoriale, 2015. Agenda 2030 per lo sviluppo sostenibile [WWW Document]. URL <https://www.agenziacoesione.gov.it/comunicazione/agenda-2030-per-lo-sviluppo-sostenibile/> (accessed 10.8.23).
- Aglieri, G., Baillie, C., Mariani, S., Cattano, C., Calò, A., Turco, G., Spatafora, D., Di Franco, A., Di Lorenzo, M., Guidetti, P., Milazzo, M., 2021. Environmental DNA effectively captures functional diversity of coastal fish communities. *Mol Ecol* 30, 3127–3139.
<https://doi.org/10.1111/MEC.15661>
- Alborali, L., 2006. Climatic variations related to fish diseases and production. *Vet Res Commun* 30, 93–97. <https://doi.org/10.1007/S11259-006-0019-7>
- Alfonso, G., Belmonte, G., Marrone, F., Naselli-Flores, L., 2010. Does lake age affect zooplankton diversity in Mediterranean lakes and reservoirs? A case study from Southern Italy. *Hydrobiologia* 653, 149–164. <https://doi.org/10.1007/S10750-010-0350-4/METRICS>
- Alfonso, S., Gesto, M., Sadoul, B., 2021. Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. *J Fish Biol* 98, 1496–1508.
<https://doi.org/10.1111/JFB.14599>
- Altekruse, S.F., Bishop, R.D., Baldy, L.M., Thompson, S.G., Wilson, S.A., Ray, B.J., Griffin, P.M., 2000. *Vibrio gastroenteritis* in the US Gulf of Mexico region: the role of raw oysters. *Epidemiol Infect* 124, 489–495. <https://doi.org/10.1017/S0950268899003714>
- Al-Yousuf, M.H., El-Shahawi, M.S., Al-Ghais, S.M., 2000. Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus lentjan* fish species in relation to body length and sex. *Science of The Total Environment* 256, 87–94. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00363-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00363-0)
- Aree protette in Italia. [WWW Document], n.d. . Available: <http://www.parks.it>.
- Audisio, P., De Biase, A., Antonini, G., Mancini, E., Özbek, H., Gultekin, L., Audisio Alessio Biase Gloria Antonini Emiliano Mancini, P. DE, Üniversitesi, A., Fakültesi, Z., Koruma Bölümü, B., 2005. Redescription and natural history of *Meligethes longulus* Schilsky, 1894, and provisional revision of the *M. coracinus* species-complex (Coleoptera, Nitidulidae, Meligethinae). *Italian Journal of Zoology* 72, 73–85. <https://doi.org/10.1080/11250000509356655>
- Authman, M.M.N., 2011. Environmental and experimental studies of aluminium toxicity on the liver of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fish. *Life Sci J* 8, 1097–8135.
- Authman, M.M.N., 2007. Accumulation and Distribution of Copper and Zinc in Both Water and Some Vital Tissues of Two Fish Species (*Tilapia zillii* and *Mugil cephalus*) of Lake Qarun, Fayoum Province, Egypt. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.2106.2122>
- Authman, M.M.N., Abbas, H.H., Abbas, W.T., 2013. Assessment of metal status in drainage canal water and their bioaccumulation in *Oreochromis niloticus* fish in relation to human health. *Environ Monit Assess* 185, 891–907. <https://doi.org/10.1007/S10661-012-2599-8/METRICS>
- Authman, M.M.N., Abbas, W.T., Gaafar, A.Y., 2012. Metals concentrations in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* () from illegal fish farm in Al-Minufiya Province, Egypt, and their effects

- on some tissues structures. *Ecotoxicol Environ Saf* 84, 163–172.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2012.07.005>
- Bahamonde, P.A., Munkittrick, K.R., Martyniuk, C.J., 2013. Intersex in teleost fish: Are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena? *Gen Comp Endocrinol* 192, 25–35. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2013.04.005>
- Baldigo, B.P., Sloan, R.J., Smith, S.B., Denslow, N.D., Blazer, V.S., Gross, T.S., 2006. Polychlorinated biphenyls, mercury, and potential endocrine disruption in fish from the Hudson River, New York, USA. *Aquat Sci* 68, 206–228. <https://doi.org/10.1007/S00027-006-0831-8/METRICS>
- Balian, E. V., Segers, H., Lévêque, C., Martens, K., 2008. The Freshwater Animal Diversity Assessment: An overview of the results. *Hydrobiologia* 595, 627–637.
<https://doi.org/10.1007/S10750-007-9246-3>
- Balletto, E., Bonelli, S., Borghesio, L., Casale, A., Brandmayr, P., Vigna Taglianti, A., 2010. Hotspots of biodiversity and conservation priorities: A methodological approach. *Italian Journal of Zoology* 77, 2–13. <https://doi.org/10.1080/11250000902758923>
- Bally, M., Garrabou, J., 2007. Thermodependent bacterial pathogens and mass mortalities in temperate benthic communities: a new case of emerging disease linked to climate change. *Glob Chang Biol* 13, 2078–2088. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2486.2007.01423.X>
- Barnes, M.A., Turner, C.R., 2015. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics* 2015 17:1 17, 1–17.
<https://doi.org/10.1007/S10592-015-0775-4>
- Bauvais, C., Zirah, S., Piette, L., Chaspoul, F., Domart-Coulon, I., Chapon, V., Gallice, P., Rebuffat, S., Pérez, T., Bourguet-Kondracki, M.L., 2015. Sponging up metals: Bacteria associated with the marine sponge *Spongia officinalis*. *Mar Environ Res* 104, 20–30.
<https://doi.org/10.1016/J.MARENRES.2014.12.005>
- Baviera, C., 2011. Nuovi dati sulla biodiversita' della Sicilia Nord-Orientale: la coleotterofauna endemica. *Biogeographia*. <https://doi.org/10.21426/B630110590>
- Baviera, C., 2009. Coleotteri nuovi o poco noti di Sicilia IV. *NATURALISTA SICILIANO S. IV, XXXIII*, 149–156.
- Baviera, C., 2007. First record of *Gonioctena* (Coleoptera Chrysomelidae, Chrysomelinae) in Sicily, with the description of *Gonioctena theae* n. sp. *Italian Journal of Zoology* 74, 389–393.
<https://doi.org/10.1080/11250000701650719>
- Baviera, C., 2006. Coleotteri nuovi o poco noti di Sicilia III. *NATURALISTA SICILIANO S. IV, XXX (1)*, 21–28.
- Baviera, C., Audisio, P., 2014. The Nitidulidae and Kateretidae (Coleoptera: Cucujoidea) of Sicily: Recent records and updated checklist. *AAPP - 92, 1*. <https://doi.org/10.1478/AAPP.922A1>
- Baviera, C., Bellavista, M., Altadonna, G., Turrisi, G.F., Bella, S., Muscarella, C., Sparacio, I., 2017. The Cerambycidae (Coleoptera: Chrysomeloidea) of Sicily: Recent records and updated checklist. *Atti della Accademia Peloritana dei Pericolanti - Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali* 95, 2. <https://doi.org/10.1478/AAPP.951A2>
- Baviera, C., Biondi, M., 2015. The Alticini (Coleoptera: Chrysomelidae, Galerucinae) of Sicily: Recent records and updated checklist. *AAPP - PHYSICAL, MATHEMATICAL, AND NATURAL SCIENCES* 93, 2. <https://doi.org/10.1478/AAPP.932A2>
- Baviera, C., Caldara, R., 2020. THE CURCULIONINAE (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE) OF SICILY: RECENT RECORDS AND UPDATED CATALOGUE. *AAPP* 98. <https://doi.org/10.1478/AAPP.981A1>
- Baviera, C., Sassi, D., 2020. The Cassidinae and Cryptocephalini (Coleoptera Chrysomelidae) of Sicily: recent records and updated checklist . *AAPP*.

- Baviera, C., Sparacio, I., 2002. Descrizione di una nuova specie di Buprestis Linnaeus della Sicilia. *NATURALISTA SICILIANO* S. IV, XXVI (1-2), 93–99.
- Bazzanti, M., Bella, V. Della, Seminara, M., 2003. Factors Affecting Macroinvertebrate Communities in Astatic Ponds in Central Italy. *J Freshw Ecol* 18, 537–548.
<https://doi.org/10.1080/02705060.2003.9663994>
- Begon, M., Townsend, C.R., 2020. *Ecology: From Individuals to Ecosystems* .
- Belfiore, C., 1983. Efemerotteri (Ephemeroptera). Guide per li riconoscimento dele specie animali delle acque interne italiane, 24. C.N.R. Verona 113.
- Bianco, P.G., 2014. An update on the status of native and exotic freshwater fishes of Italy. *Journal of Applied Ichthyology* 30, 62–77. <https://doi.org/10.1111/JAI.12291>
- Biondi, M., 2005. “Coleoptera: Chrysomelidae Galerucinae Alticini”. In: *Fauna Europaea* version 2.4. [WWW Document]. <http://www.faunaeur.org>.
- Blondel, J., Aronson, J., 1999. *Biology and wildlife of the Mediterranean region. Biology and wildlife of the Mediterranean region.*
- Bowden, T.J., Thompson, K.D., Morgan, A.L., Gratacap, R.M.L., Nikoskelainen, S., 2007. Seasonal variation and the immune response: A fish perspective. *Fish Shellfish Immunol* 22, 695–706.
<https://doi.org/10.1016/J.FSI.2006.08.016>
- Browne, M.A., Crump, P., Niven, S.J., Teuten, E., Tonkin, A., Galloway, T., Thompson, R., 2011. Accumulation of microplastic on shorelines woldwide: Sources and sinks. *Environ Sci Technol* 45, 9175–9179. https://doi.org/10.1021/ES201811S/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2011-01811S_0002.JPEG
- Buller, N., 2014. *Shewanella* (Chapter 1.10.6). In N. B. Buller (Ed.), *Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: A practical identification manual* (2nd ed., pp. 168–176).
- Butchart, S.H.M., Walpole, M., Collen, B., Van Strien, A., Scharlemann, J.P.W., Almond, R.E.A., Baillie, J.E.M., Bomhard, B., Brown, C., Bruno, J., Carpenter, K.E., Carr, G.M., Chanson, J., Chenery, A.M., Csirke, J., Davidson, N.C., Dentener, F., Foster, M., Galli, A., Galloway, J.N., Genovesi, P., Gregory, R.D., Hockings, M., Kapos, V., Lamarque, J.F., Leverington, F., Loh, J., McGeoch, M.A., McRae, L., Minasyan, A., Morcillo, M.H., Oldfield, T.E.E., Pauly, D., Quader, S., Revenga, C., Sauer, J.R., Skolnik, B., Spear, D., Stanwell-Smith, D., Stuart, S.N., Symes, A., Tierney, M., Tyrrell, T.D., Vié, J.C., Watson, R., 2010. Global biodiversity: Indicators of recent declines. *Science* (1979) 328, 1164–1168.
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1187512/SUPPL_FILE/BUTCHART_SOM.PDF
- Campos-Garcia, J., Martinez, D.S.T., Alves, O.L., Leonardo, A.F.G., Barbieri, E., 2015. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: Nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 111, 131–137.
<https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2014.10.005>
- CARCHINI, G., 1983. Odonati (Odonata) Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane 21 by Carchini, G. C.N.R. Verona.
- Carlson, E., Zelikoff, J., 2008. The Immune System of Fish: A target organ of toxicity. In: R. Di Guillo, & D. Hinton, *The toxicology of fishes*, CRC Press.
- Carrete Vega, G., Wiens, J.J., 2012. Why are there so few fish in the sea? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279, 2323–2329. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2012.0075>
- Chadd, R., Extence, C., 2004. The conservation of freshwater macroinvertebrate populations: a community-based classification scheme. *Aquat Conserv* 14, 597–624.
<https://doi.org/10.1002/AQC.630>
- Chao, B.F., 1995. Anthropogenic impact on global geodynamics due to reservoir water impoundment. *Geophys Res Lett* 22, 3529–3532. <https://doi.org/10.1029/95GL02664>

- Chen, H., Zhao, Y., Chen, K., Wei, Y., Luo, H., Li, Y., Liu, F., Zhu, Z., Hu, W., Luo, D., 2022. Isolation, Identification, and Investigation of Pathogenic Bacteria From Common Carp (*Cyprinus carpio*) Naturally Infected With *Plesiomonas shigelloides*. *Front Immunol* 13, 872896. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.872896/BIBTEX>
- Chen, P.L., Tsai, P.J., Chen, C.S., Lu, Y.C., Chen, H.M., Lee, N.Y., Lee, C.C., Li, C.W., Li, M.C., Wu, C.J., Ko, W.C., 2015. *Aeromonas* stool isolates from individuals with or without diarrhea in southern Taiwan: Predominance of *Aeromonas veronii*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 48, 618–624. <https://doi.org/10.1016/J.JMII.2014.08.007>
- Chovanec, A., Hofer, R., Schiemer, F., 2003. Chapter 18 Fish as bioindicators. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment* 6, 639–676. [https://doi.org/10.1016/S0927-5215\(03\)80148-0](https://doi.org/10.1016/S0927-5215(03)80148-0)
- Cocchi, M., De Zan, G., Di Giusto, T., Deotto, S., Pretto, T., Manfrin, A., Brunetta, R., Toffan, A., 2018. Systemic polymicrobial infection involving *Shewanella putrefaciens* group in koi. *J Fish Dis* 41, 1929–1931. <https://doi.org/10.1111/JFD.12892>
- Collinson, N.H., Biggs, J., Corfield, A., Hodson, M.J., Walker, D., Whitfield, M., Williams, P.J., 1995. Temporary and permanent ponds: An assessment of the effects of drying out on the conservation value of aquatic macroinvertebrate communities. *Biol Conserv* 74, 125–133. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(95\)00021-U](https://doi.org/10.1016/0006-3207(95)00021-U)
- Consoli, N., 1928. Gli interventi di piccola bonifica nella lotta contro la malaria in Sicilia. *Rivista Sanitaria Siciliana* 18, Francesco Sanzo e C., Industria Tipografica Editrice, Palermo 108.
- Contarini, E., 2007. Coleotteri Cerambicidi, Buprestidi e Lucanidi negli ambienti montani dei Nebrodi e dei Peloritani (Sicilia nord-orientale)(Insecta Coleoptera). *Naturalista siciliano*.
- Cotruvo, J.A., Dufour, A., Rees, G., Carr, J.B., Cliver, D.O., Craun, G.F., et al., 2004. Waterborne Zoonoses: Identification, Causes and Control.
- Cózar, A., Echevarría, F., González-Gordillo, J.I., Irigoien, X., Úbeda, B., Hernández-León, S., Palma, Á.T., Navarro, S., García-de-Lomas, J., Ruiz, A., Fernández-de-Puelles, M.L., Duarte, C.M., 2014. Plastic debris in the open ocean. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 10239–10244. https://doi.org/10.1073/PNAS.1314705111/SUPPL_FILE/PNAS.1314705111.SAPP.PDF
- Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W.K., Potter, C., Bik, H.M., 2016. The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods Ecol Evol* 7, 1008–1018. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>
- Crescente, A., Sperone, E., Paolillo, G., Bernabò, I., Brunelli, E., Tripepi, S., 2014. Nesting ecology of the exotic *Trachemys scripta elegans* in an area of Southern Italy (Angitola Lake, Calabria). *Amphibia-Reptilia* 35, 366–370. <https://doi.org/10.1163/15685381-00002955>
- Danielsen, F., Balet, D.S., Poulsen, M.K., Enghoff, M., Nozawa, C.M., Jensen, A.E., 2000. A simple system for monitoring biodiversity in protected areas of a developing country. *Biodivers Conserv* 9, 1671–1705. <https://doi.org/10.1023/A:1026505324342/METRICS>
- Danielsen, F., Burgess, N.D., Balmford, A., 2005. Monitoring matters: Examining the potential of locally-based approaches. *Biodivers Conserv* 14, 2507–2542. <https://doi.org/10.1007/S10531-005-8375-0/METRICS>
- Danielsen, F., Mendoza, M.M., Alviola, P., Balet, D.S., Enghoff, M., Poulsen, M.K., Jensen, A.E., Yoccoz, N.G., Nichols, J.D., Boulmier, T., Rodriguez, J.P., Tagtag, A., 2003. Biodiversity monitoring in developing countries: what are we trying to achieve? *Oryx* 37, 407–409. <https://doi.org/10.1017/S0030605303000735>
- Darwall, W.R.T., Vié, J.C., 2005. Identifying important sites for conservation of freshwater biodiversity: extending the species-based approach. *Fish Manag Ecol* 12, 287–293. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2400.2005.00449.X>

- Deiner, K., Altermatt, F., 2014. Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS One* 9, e88786. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0088786>
- Deinet, S., Scott-Gatty, K., Rotton, H., Twardek, W.M., Marconi, V., McRae, L., Baumgartner, L.J., Brink, K., Claussen, J.E., Cooke, S.J., Darwall, W., Eriksson, B.K., Leaniz, C.G. de, Hogan, Z., Royte, J., Silva, L.G.M., Thieme, M.L., Tickner, D., Waldman, J., Wanningsen, H., Weyl, O.L.F., Berkhuisen, A., 2020. The Living Planet Index (LPI) for migratory freshwater fish: Technical Report.
- Della Bella, V., Bazzanti, M., Chiarotti, F., 2005. Macroinvertebrate diversity and conservation status of Mediterranean ponds in Italy: water permanence and mesohabitat influence. *Aquat Conserv* 15, 583–600. <https://doi.org/10.1002/AQC.743>
- Dhanakumar, S., Solaraj, G., Mohanraj, R., 2015. Heavy metal partitioning in sediments and bioaccumulation in commercial fish species of three major reservoirs of river Cauvery delta region, India. *Ecotoxicol Environ Saf* 113, 145–151. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2014.11.032>
- Direttiva “Habitat” | Ministero dell’Ambiente e della Sicurezza Energetica [WWW Document], n.d. URL <https://www.mase.gov.it/pagina/direttiva-habitat#> (accessed 10.11.23).
- Doi, H., Katano, I., Sakata, Y., Souma, R., Kosuge, T., Nagano, M., Ikeda, K., Yano, K., Tojo, K., 2017. Detection of an endangered aquatic heteropteran using environmental DNA in a wetland ecosystem. *R Soc Open Sci* 4. <https://doi.org/10.1098/RSOS.170568>
- Douglas H. Chadwick, 2010. Silent streams. *National geographic*, ISSN 0027-9358, Vol. 217, N° 4, 2010, págs. 116-127 217, 116–127.
- Duchi, A., 2018. Indici di qualità ambientale ISECI e NISECI: proposta d’inserimento di Tinca tinca (Linnaeus, 1758) nelle comunità ittiche di riferimento della Sicilia. <https://doi.org/10.30463/ao181.005>
- Duchi, A., 2014. Ampliamento dell’areale della rovello (*Rutilus rubilio*, Bonaparte, 1837) in Sicilia: nuove segnalazioni nell’areale Ibleo ed in provincia di Trapani. *Italian Journal of Freshwater Ichthyology* 1, 220–224.
- Duchi, A., 2004. Distribuzione della fauna ittica nelle acque interne dell’areale ibleo: la provincia di Ragusa. *Biologia Ambientale Atti 10° Convegno Nazionale A.I.I.A.D., Montesilvano (PE), 2-3 aprile 2004*. A.I.I.A.D. 20, 291–294.
- Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.H., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A., 2006. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biol Rev Camb Philos Soc* 81, 163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Duggan, I.C., Champion, P.D., MacIsaac, H.J., 2018. Invertebrates associated with aquatic plants bought from aquarium stores in Canada and New Zealand. *Biol Invasions* 20, 3167–3178. <https://doi.org/10.1007/S10530-018-1766-4/METRICS>
- Duggan, I.C., Pullan, S.G., 2017. Do freshwater aquaculture facilities provide an invasion risk for zooplankton hitchhikers? *Biol Invasions* 19, 307–314. <https://doi.org/10.1007/S10530-016-1280-5/METRICS>
- Dunn, H., 2003. Can Conservation Assessment Criteria Developed for Terrestrial Systems be Applied to Riverine Systems? *Aquat Ecosyst Health Manag* 6, 81–95. <https://doi.org/10.1080/14634980301478>
- Dunn, R.R., 2005. Modern Insect Extinctions, the Neglected Majority. *Conservation Biology* 19, 1030–1036. <https://doi.org/10.1111/J.1523-1739.2005.00078.X>
- Dupuy, C., Galland, C., Pichereau, V., Sanchez, W., Riso, R., Labonne, M., Amara, R., Charrier, G., Fournier, M., Laroche, J., 2015. Assessment of the European flounder responses to chemical

- stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Mar Pollut Bull* 95, 634–645. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2014.11.033>
- Dynesius, M., Nilsson, C., 1994. Fragmentation and Flow Regulation of River Systems in the Northern Third of the World. *Science* (1979) 266, 753–762. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.266.5186.753>
- Early, R., Bradley, B.A., Dukes, J.S., Lawler, J.J., Olden, J.D., Blumenthal, D.M., Gonzalez, P., Grosholz, E.D., Ibañez, I., Miller, L.P., Sorte, C.J.B., Tatem, A.J., 2016. Global threats from invasive alien species in the twenty-first century and national response capacities. *Nature Communications* 2016 7:1 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms12485>
- Effects of global warming on fishes and fisheries, 2021. <https://doi.org/10.1111/jfb.14762>
- Ehrenfeld, J.G., 2010. Ecosystem Consequences of Biological Invasions. <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102209-144650> 41, 59–80. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ECOLSYS-102209-144650>
- Elbrecht, V., Leese, F., 2017. Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Front Environ Sci* 5, 237020. <https://doi.org/10.3389/FENVS.2017.00011/BIBTEX>
- Elzinga, C.L., Salzer, D., Willoughby, J.W., Gibbs, J., 2001. Monitoring plant and animal populations. Blackwell Science, Inc., Malden 360.
- Engle, C., Quagraine, K., Dey, M., 2016. Seafood and aquaculture marketing handbook.
- Esteve, C., Merchán, R., Alcaide, E., 2017. An outbreak of *Shewanella putrefaciens* group in wild eels *Anguilla anguilla* L. favoured by hypoxic aquatic environments. *J Fish Dis* 40, 929–939. <https://doi.org/10.1111/JFD.12574>
- Eyre, M.D., Pilkington, J.G., Carr, R., McBlane, R.P., Rushton, S.P., Foster, G.N., 1993. The running-water beetles (Coleoptera) of a river catchment in northern England. *Hydrobiologia* 264, 33–45. <https://doi.org/10.1007/BF00014662/METRICS>
- Fairchild, G.W., Cruz, J., Faulds, A.M., Short, A.E.Z., Matta, J.F., 2003. Microhabitat and landscape influences on aquatic beetle assemblages in a cluster of temporary and permanent ponds. <https://doi.org/10.2307/1467994> 22, 224–240. <https://doi.org/10.2307/1467994>
- Falkenmark, M., Allard, B., 1991. Water Quality Genesis and Disturbances of Natural Freshwaters. *Handbook of Environmental Chemistry* 5, 45–78. https://doi.org/10.1007/978-3-540-46685-7_2/COVER
- Faranda, F., 1977. Primo censimento delle aree destinabili ad acquacoltura in Sicilia. *Atti Società Peloritana Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali* 22, 1–113.
- Faraone, F.P., Giacalone, G., Canale, D.E., D'Angelo, S., Favaccio, G., Garozzo, V., Giancontieri, G.L., Isgrò, C., Melfi, R., Morello, B., Navarra, F., Russo, G., Tinnirello, V., Torre, A., Torre, D., Torre, G., Urso, G., Vinci, P., Zizzo, M.G., Marrone, F., 2017. Tracking the invasion of the red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (girard, 1852) (Decapoda Cambaridae) in sicily: A “citizen science” approach. *Biogeographia* 32, 25–29. <https://doi.org/10.21426/B632135512>
- Feinsinger, P., 2001. Designing field studies for biodiversity conservation. . Island Press, Washington. <https://doi.org/10.2307/3071997>
- Fenoglio, S., Bo, T., Cucco, M., Mercalli, L., Malacarne, G., 2010. Effects of global climate change on freshwater biota: A review with special emphasis on the Italian situation. *Italian Journal of Zoology* 77, 374–383. <https://doi.org/10.1080/11250000903176497>
- Ferrito, V., Tignai, C., 1995. The distribution of the ichthyofauna in the Simeto basin (Sicily). *Cybium* 187–198.

- Ficetola, G.F., Thuiller, W., Padoa-Schioppa, E., 2009. From introduction to the establishment of alien species: bioclimatic differences between presence and reproduction localities in the slider turtle. *Divers Distrib* 15, 108–116. <https://doi.org/10.1111/J.1472-4642.2008.00516.X>
- Fochetti, R., 2012. Italian freshwater biodiversity: status, threats and hints for its conservation. *Italian Journal of Zoology* 79, 2–8. <https://doi.org/10.1080/11250003.2011.620636>
- Fochetti, R., De Figueroa, J.M.T., 2006. Notes on diversity and conservation of the European fauna of Plecoptera (Insecta). *J Nat Hist* 40, 2361–2369. <https://doi.org/10.1080/00222930601051386>
- Friedmann, A.S., Kimble Costain, E., MacLatchy, D.L., Stansley, W., Washuta, E.J., 2002. Effect of Mercury on General and Reproductive Health of Largemouth Bass (*Micropterus salmoides*) from Three Lakes in New Jersey. *Ecotoxicol Environ Saf* 52, 117–122. <https://doi.org/10.1006/EESA.2002.2165>
- Frost, S., Huni, A., Kershaw, W.E., 1971. Evaluation of a kicking technique for sampling stream bottom fauna. *Can J Zool* 49, 167–173. <https://doi.org/10.1139/Z71-026>
- Gaber, H.S., Abbas, W.T., Authman, M.M.N., Gaber, S.A., 2014. Histological and biochemical studies on some organs of two fish species in Bardawil Lagoon, North Sinai, Egypt. *Glob Vet* 12, 1–11.
- Gandolfi, G., Zerunian, S., Torricelli, P., Marconato, A., 1991. I Pesci delle acque interne italiane.
- Ghenghesh, K.S., Abeid, S.S., Jaber, M.M., Ben-Taher, S.A., 1999. Isolation and haemolytic activity of *Aeromonas* species from domestic dogs and cats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 22, 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(98\)00134-9](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(98)00134-9)
- Gherardi, F., 2007. Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats. *Biological invaders in inland waters: Profiles, distribution, and threats.* <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6029-8>
- Gherardi, F., Bertolino, S., Bodon, M., Casellato, S., Cianfanelli, S., Ferraguti, M., Lori, E., Mura, G., Nocita, A., Riccardi, N., Rossetti, G., Rota, E., Scalera, R., Zerunian, S., Tricarico, E., 2008. Animal xenodiversity in Italian inland waters: Distribution, modes of arrival, and pathways. *Biol Invasions* 10, 435–454. <https://doi.org/10.1007/S10530-007-9142-9/TABLES/3>
- Giachino, P.M., Vailati, D., Baviera, C., 2011. I Coleotteri Colevidi della Sicilia: inventario, analisi faunistica e origine del popolamento. *Biogeographia.* <https://doi.org/10.21426/B630110549>
- Giannetto, S., Niutta, P., Fioravanti, M., Canestri Trotti, G., n.d. *Anguillicola crassus* in *Anguilla anguilla* in Calabria e Sicilia. XLIV Convegno della Società Italiana delle Scienze Veterinarie, Stresa 1225–1228.
- Girod, A., Bianchi, I., Mariani, M., 1980. Gasteropodi, 1(Gastropoda: Pulmonata Prosobranchia: Neritidae, Vi- viparidae, Bithyniidae, Valvatidae). Guide per li riconoscimento dele specie animali dele acque interne italiane, .7. C.N.R. Verona 86.
- Giusti, F., Pezzoli, E., 1980. Gasteropodi, 2(Gastropoda:Prosobranchia: Hydrobioidea,l'yriguloidea). Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane, 6. C.N.R.Verona, 67 pp. C.N.R. Verona 67.
- Goldberg, C.S., Strickler, K.M., Pilliod, D.S., 2015. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biol Conserv* 183, 1–3. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2014.11.040>
- Gonçalves, D. V., Hermoso, V., 2022. Global goals overlook freshwater conservation. *Science* 377, 380. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ADD6295>
- Gray, M., Kalpers, J., 2005. Ranger based monitoring in the Virunga-Bwindi region of East-Central Africa: A simple data collection tool for park management. *Biodivers Conserv* 14, 2723–2741. <https://doi.org/10.1007/S10531-005-8406-X/METRICS>

- Grove A. T., Rackham O., 2001. A. T. Grove and O. Rackham, The Nature of Mediterranean Europe. An Ecological History. New Haven and London: Yale University Press, 2001. Pp. 384, numerous illus. ISBN 0-300-08443-9. Cambridge University Press.
- Gubbins, M., 2006. Impacts of Climate Change on Aquaculture in Marine Climate Change Impacts Annual Report Card 2006. In: P. J. Buckley, S. R. Dye, and J. M. Baxter (eds), Online Summary Reports, MCCIP, Lowestoft, 15.
- Gürtler, V., Stanisich, V.A., 1996. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology (N Y)* 142, 3–16.
<https://doi.org/10.1099/13500872-142-1-3/CITE/REFWORKS>
- Hansen, B.K., Bekkevold, D., Clausen, L.W., Nielsen, E.E., 2018. The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish and Fisheries* 19, 751–768. <https://doi.org/10.1111/FAF.12286>
- Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D.M.E., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., Vasta, G.R., 1999a. Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. *Science* 285, 1505–1510. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.285.5433.1505>
- Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, D.J., Hofmann, E.E., Lipp, E.K., Osterhaus, A.D.M.E., Overstreet, R.M., Porter, J.W., Smith, G.W., Vasta, G.R., 1999b. Emerging marine diseases--climate links and anthropogenic factors. *Science* 285, 1505–1510. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.285.5433.1505>
- Harvell, C.D., Mitchell, C.E., Ward, J.R., Altizer, S., Dobson, A.P., Ostfeld, R.S., Samuel, M.D., 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* 296, 2158–2162. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1063699>
- Has-Schön, E., Bogut, I., Strelec, I., 2006. Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of river Neretva (Croatia). *Arch Environ Contam Toxicol* 50, 545–551. <https://doi.org/10.1007/S00244-005-0047-2/METRICS>
- Hatzenbuehler, C., Kelly, J.R., Martinson, J., Okum, S., Pilgrim, E., 2017. Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species. *Scientific Reports* 2017 7:1 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep46393>
- Havel, J.E., Kovalenko, K.E., Thomaz, S.M., Amalfitano, S., Kats, L.B., 2015. Aquatic invasive species: challenges for the future. *Hydrobiologia* 750, 147–170. <https://doi.org/10.1007/S10750-014-2166-0/FIGURES/1>
- HAVEL, J.E., LEE, C.E., ZANDEN, J. VANDER, 2005. Do Reservoirs Facilitate Invasions into Landscapes? Stasis and Speciation View project. *Bioscience*. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[0518:DRFIIL\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[0518:DRFIIL]2.0.CO;2)
- He, F., Zarfl, C., Bremerich, V., David, J.N.W., Hogan, Z., Kalinkat, G., Tockner, K., Jähnig, S.C., 2019. The global decline of freshwater megafauna. *Glob Chang Biol* 25, 3883–3892. <https://doi.org/10.1111/GCB.14753>
- Hecker, M., Murphy, M.B., Coady, K.K., Villeneuve, D.L., Jones, P.D., Carr, J.A., Solomon, K.R., Smith, E.E., Van der Kraak, G., Gross, T., Du Preez, L., Kendall, R.J., Giesy, J.P., 2006. Terminology of gonadal anomalies in fish and amphibians resulting from chemical exposures. *Rev Environ Contam Toxicol* 187, 103–131. https://doi.org/10.1007/0-387-32885-8_3/COVER
- Herbert, N.A., Steffensen, J.F., 2005. The response of Atlantic cod, *Gadus morhua*, to progressive hypoxia: Fish swimming speed and physiological stress. *Mar Biol* 147, 1403–1412. <https://doi.org/10.1007/S00227-005-0003-8/METRICS>

- Higgins, J. V., Bryer, M.T., Khoury, M.L., Fitzhugh, T.W., 2005. A Freshwater Classification Approach for Biodiversity Conservation Planning. *Conservation Biology* 19, 432–445. <https://doi.org/10.1111/J.1523-1739.2005.00504.X>
- Hussain, S., Sultana, T., Sultana, S., Hussain, B., Mahboob, S., Al-Ghanim, K.A., Riaz, M.N., 2021. Seasonal monitoring of River through heavy metal bioaccumulation and histopathological alterations in selected fish organs. *J King Saud Univ Sci* 33, 101626. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2021.101626>
- Jabeen, G., Manzoor, F., Javid, A., Azmat, H., Arshad, M., Fatima, S., 2018. Evaluation of Fish Health Status and Histopathology in Gills and Liver Due to Metal Contaminated Sediments Exposure. *Bull Environ Contam Toxicol* 100, 492–501. <https://doi.org/10.1007/S00128-018-2295-7/METRICS>
- Janda, J.M., 2014. *Shewanella*: a Marine Pathogen as an Emerging Cause of Human Disease. *Clin Microbiol Newsl* 36, 25–29. <https://doi.org/10.1016/J.CLINMICNEWS.2014.01.006>
- Jane, S.F., Wilcox, T.M., Mckelvey, K.S., Young, M.K., Schwartz, M.K., Lowe, W.H., Letcher, B.H., Whiteley, A.R., 2015. Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Mol Ecol Resour* 15, 216–227. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12285>
- Jaureguiberry, P., Titeux, N., Wiemers, M., Bowler, D.E., Coscieme, L., Golden, A.S., Guerra, C.A., Jacob, U., Takahashi, Y., Settele, J., Díaz, S., Molnár, Z., Purvis, A., 2022. The direct drivers of recent global anthropogenic biodiversity loss. *Sci Adv* 8, 9982. https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABM9982/SUPPL_FILE/SCIADV.ABM9982_DATA_S1.ZIP
- Javed, M., Usmani, N., Ahmad, I., Ahmad, M., 2015. Studies on the oxidative stress and gill histopathology in *Channa punctatus* of the canal receiving heavy metal-loaded effluent of Kasimpur Thermal Power Plant. *Environ Monit Assess* 187, 1–11. <https://doi.org/10.1007/S10661-014-4179-6/METRICS>
- Jitar, O., Teodosiu, C., Oros, A., Plavan, G., Nicoara, M., 2015. Bioaccumulation of heavy metals in marine organisms from the Romanian sector of the Black Sea. *N Biotechnol* 32, 369–378. <https://doi.org/10.1016/J.NBT.2014.11.004>
- Juffe-Bignoli, D., Harrison, I., Butchart, S.H.M., Flitcroft, R., Hermoso, V., Jonas, H., Lukasiewicz, A., Thieme, M., Turak, E., Bingham, H., Dalton, J., Darwall, W., Deguignet, M., Dudley, N., Gardner, R., Higgins, J., Kumar, R., Linke, S., Milton, G.R., Pittock, J., Smith, K.G., van Soesbergen, A., 2016. Achieving Aichi Biodiversity Target 11 to improve the performance of protected areas and conserve freshwater biodiversity. *Aquat Conserv* 26, 133–151. <https://doi.org/10.1002/AQC.2638>
- Jung-Schroers, V., Jung, A., Ryll, M., Bauer, J., Teitge, F., Steinhagen, D., 2018. Methods for identification and differentiation of different *Shewanella* spp. isolates for diagnostic use. *J Fish Dis* 41, 689–714. <https://doi.org/10.1111/JFD.12772>
- Karahan, A., Douek, J., Paz, G., Stern, N., Kideys, A.E., Shaish, L., Goren, M., Rinkevich, B., 2017. Employing DNA barcoding as taxonomy and conservation tools for fish species censuses at the southeastern Mediterranean, a hot-spot area for biological invasion. *J Nat Conserv* 36, 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.JNC.2017.01.004>
- Karr, J.R., 1991. Biological Integrity: A Long-Neglected Aspect of Water Resource Management. *Ecological Applications* 1, 66–84. <https://doi.org/10.2307/1941848>
- Katzner, T., Milner-Gulland, E.J., Bragin, E., 2007. Using Modeling to Improve Monitoring of Structured Populations: Are We Collecting the Right Data? *Conservation Biology* 21, 241–252. <https://doi.org/10.1111/J.1523-1739.2006.00561.X>

- Kaur, S., Singh Khera, K., Kaur Kondal, J., Saravpreet Kaur, C., 2018. Heavy metal induced histopathological alterations in liver, muscle and kidney of freshwater cyprinid, *Labeo rohita* (Hamilton). ~ 2137 ~ *Journal of Entomology and Zoology Studies* 6.
- Kéry, M., Schmid, H., 2004. Monitoring programs need to take into account imperfect species detectability. *Basic Appl Ecol* 5, 65–73. <https://doi.org/10.1078/1439-1791-00194>
- Kim, D.M., Kang, C.I., Lee, C.S., Kim, H. Bin, Kim, E.C., Kim, N.J., Oh, M.D., Choe, K.W., 2006. Treatment failure due to emergence of resistance to carbapenem during therapy for *Shewanella* algae bacteremia. *J Clin Microbiol* 44, 1172–1174. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.1172-1174.2006/ASSET/DOC9A0A1-F147-4844-94C6-EC71C03C613B/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0030662260001.JPEG>
- Kime, D.E., 1998. *Endocrine Disruption in Fish*. Kluwer Academic Press. Boston.
- Korn, M., Green, A.J., MacHado, M., García-De-Lomas, J., Cristo, M., Cancela Da Fonseca, L., Frisch, D., Pérez-Bote, J.L., Hundsdoerfer, A.K., 2010. Phylogeny, molecular ecology and taxonomy of southern Iberian lineages of *Triops mauritanicus* (Crustacea: Notostraca). *Org Divers Evol* 10, 409–440. <https://doi.org/10.1007/S13127-010-0026-Y/FIGURES/11>
- Kottelat, M., Freyhof, J., 2007. *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol 646.
- Krishnani, K.K., Azad, I.S., Kailasam, M., Thirunavukkarasu, A.R., Gupta, B.P., Joseph, K.O., Muralidhar, M., Abraham, M., 2003. Acute Toxicity of Some Heavy Metals to Lates calcarifer Fry with a Note on Its Histopathological Manifestations. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* 38, 645–655. <https://doi.org/10.1081/ESE-120016929>
- L., K., 1997. *Environmental Endocrine Disruptors. A Handbook of Property Data*.
- Lafferty, K.D., Porter, J.W., Ford, S.E., 2004a. Are diseases increasing in the ocean? *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35, 31–54. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.35.021103.105704>
- Lafferty, K.D., Porter, J.W., Ford, S.E., 2004b. Are diseases increasing in the ocean? *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35, 31–54. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ECOLSYS.35.021103.105704>
- Lamas, S., Fernández, J.A., Aboal, J.R., Carballeira, A., 2007. Testing the use of juvenile *Salmo trutta* L. as biomonitors of heavy metal pollution in freshwater. *Chemosphere* 67, 221–228. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2006.10.040>
- Leser, T.D., Boye, M., Amenuvor, J.Z., Jensen, T.K., Møller, K., 2002. Development of a microarray for structural analysis of pig gastrointestinal bacterial communities.
- Levy-Booth, D.J., Campbell, R.G., Gulden, R.H., Hart, M.M., Powell, J.R., Klironomos, J.N., Pauls, K.P., Swanton, C.J., Trevors, J.T., Dunfield, K.E., 2007. Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biol Biochem* 39, 2977–2991. <https://doi.org/10.1016/J.SOILBIO.2007.06.020>
- Li, T., Raza, S.H.A., Yang, B., Sun, Y., Wang, G., Sun, W., Qian, A., Wang, C., Kang, Y., Shan, X., 2020. *Aeromonas veronii* Infection in Commercial Freshwater Fish: A Potential Threat to Public Health. *Animals* 2020, Vol. 10, Page 608 10, 608. <https://doi.org/10.3390/ANI10040608>
- Lindahl, T., 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993 362:6422 362, 709–715. <https://doi.org/10.1038/362709a0>
- Lodge, D.M., Williams, S., Macisaac, H.J., Hayes, K.R., Leung, B., Reichard, S., Mack, R.N., Moyle, P.B., Smith, M., Andow, D.A., Carlton, J.T., Mcmichael, A., 2006. BIOLOGICAL INVASIONS: RECOMMENDATIONS FOR U.S. POLICY AND MANAGEMENT. *Ecological Applications* 16, 2035–2054. <https://doi.org/10.1890/1051-0761>
- Lopes-Lima, M., Burlakova, L.E., Karatayev, A.Y., Mehler, K., Seddon, M., Sousa, R., 2018. Conservation of freshwater bivalves at the global scale: diversity, threats and research needs. *Hydrobiologia* 810, 1–14. <https://doi.org/10.1007/S10750-017-3486-7>

- Luff, M.L., Eyre, M.D., Rushton, S.P., 1989. Classification and Ordination of Habitats of Ground Beetles (Coleoptera, Carabidae) in North-East England. *J Biogeogr* 16, 121. <https://doi.org/10.2307/2845086>
- Mahboob, S., Al-Balawi, H.F.A., Al-Misned, F., Al-Quraishy, S., Ahmad, Z., 2014. Tissue metal distribution and risk assessment for important fish species from Saudi Arabia. *Bull Environ Contam Toxicol* 92, 61–66. <https://doi.org/10.1007/S00128-013-1139-8/METRICS>
- Mahboob, S., Al-Ghanim, K.A., Al-Balawi, H.F., Al-Misned, F., Ahmed, Z., 2020. Toxicological effects of heavy metals on histological alterations in various organs in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from freshwater reservoir. *J King Saud Univ Sci* 32, 970–973. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2019.07.004>
- Maier, D., Blaha, L., Giesy, J.P., Henneberg, A., Köhler, H.R., Kuch, B., Osterauer, R., Peschke, K., Richter, D., Scheurer, M., Triebkorn, R., 2015. Biological plausibility as a tool to associate analytical data for micropollutants and effect potentials in wastewater, surface water, and sediments with effects in fishes. *Water Res* 72, 127–144. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2014.08.050>
- Mandrioli, M., 2017. Il DNA ambientale: un nuovo strumento molecolare per il monitoraggio della biodiversità presente e passata. *QUADERNI DEL MUSEO CIVICO DI STORIA NATURALE DI FERRARA* 5, 113–121.
- Marcos-López, M., Gale, P., Oidtmann, B.C., Peeler, E.J., 2010. Assessing the Impact of Climate Change on Disease Emergence in Freshwater Fish in the United Kingdom. *Transbound Emerg Dis* 57, 293–304. <https://doi.org/10.1111/J.1865-1682.2010.01150.X>
- Margaritora, F.G., Ferrara, O., Vagaggini, D., 2001. Predatory impact of the mosquitofish (*Gambusia holbrooki* Girard) on zooplanktonic populations in a pond at Tenuta di Castelporziano (Rome, Central Italy). *J Limnol* 60, 189–193. <https://doi.org/10.4081/JLIMNOL.2001.1.189>
- Markert, B., 1994. Biomonitoring-Quo Vadis. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 6, 145–149. <https://doi.org/10.1007/BF02937693/METRICS>
- Marrone, F., Barone, R., Naselli-Flores, L., 2005. Cladocera (Branchiopoda : Anomopoda, Ctenopoda, and Onychopoda) from Sicilian inland waters: An updated inventory 78, 1025–1039. <https://doi.org/10.1163/156854005775361043>
- Marrone, F., Naselli-Flores, L., 2015. A review on the animal xenodiversity in Sicilian inland waters (Italy). *Adv Oceanogr Limnol* 6, 2–12. <https://doi.org/10.4081/aiol.2015.5451>
- Marshall, B.E., 2018. Guilty as charged: Nile perch was the cause of the haplochromine decline in Lake Victoria. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 75, 1542–1559. <https://doi.org/10.1139/CJFAS-2017-0056/ASSET/IMAGES/CJFAS-2017-0056TAB11.GIF>
- Martin, S.W., Meek, A.H., Willeberg, P., 1987. *Veterinary epidemiology. Principles and methods.* Veterinary epidemiology. Principles and methods. 1–50.
- Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., Minamoto, T., 2014. The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. *PLoS One* 9, e114639. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0114639>
- Mathon, L., Valentini, A., Guérin, P.E., Normandeau, E., Noel, C., Lionnet, C., Boulanger, E., Thuiller, W., Bernatchez, L., Mouillot, D., Dejean, T., Manel, S., 2021. Benchmarking bioinformatic tools for fast and accurate eDNA metabarcoding species identification. *Mol Ecol Resour* 21, 2565–2579. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13430>
- McGeoch, M.A., Chown, S.L., Kalwij, J.M., 2006. A Global Indicator for Biological Invasion. *Conservation Biology* 20, 1635–1646. <https://doi.org/10.1111/J.1523-1739.2006.00579.X>
- Minelli, A., 1977. *Irudinei (Hirudinea) Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane* 1 by Minelli, A. C.N.R. Verona 43.

- Minelli A., Ruffo S., La Posta S., 1993. Checklist delle specie della fauna italiana. Bologna, Calderini. Ministero dell'Ambiente, n.d. Repertorio della fauna italiana protetta. [WWW Document]. Available: <http://www.minambiente.it>.
- Miracle, R., Oertli, B., Céréghino, R., Hull, A.P., 2010. Preface: conservation of european ponds-current knowledge and future needs.
- Monfort, P., Baleux, B., 1990. Dynamics of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae* in a sewage treatment pond. *Appl Environ Microbiol* 56, 1999–2006. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.7.1999-2006.1990>
- Monosson, E., 2000. Reproductive and developmental effects of PCBs in fish: a synthesis of laboratory and field studies. *Reviews in Toxicology* 43, 25–75.
- Moser, K.A., Baron, J.S., Brahney, J., Oleksy, I.A., Saros, J.E., Hundey, E.J., Sadro, S.A., Kopáček, J., Sommaruga, R., Kainz, M.J., Strecker, A.L., Chandra, S., Walters, D.M., Preston, D.L., Michelutti, N., Lepori, F., Spaulding, S.A., Christianson, K.R., Melack, J.M., Smol, J.P., 2019. Mountain lakes: Eyes on global environmental change. *Glob Planet Change* 178, 77–95. <https://doi.org/10.1016/J.GLOPLACHA.2019.04.001>
- Naiman, R.J., Latterell, J.J., 2005. Principles for linking fish habitat to fisheries management and conservation. *J Fish Biol* 67, 166–185. <https://doi.org/10.1111/J.0022-1112.2005.00921.X>
- Naselli-Flores, L., 1996. Limnological aspects of Sicilian reservoirs: a comparative, ecosystemic approach. In: Tundisi JG, Straškraba M (eds), *Theoretical reservoir limnology and its applications*. International Institute of Ecology, Backhuys Publishers, Leiden 238–311.
- Nicolet, P., Biggs, J., Fox, G., Hodson, M.J., Reynolds, C., Whitfield, M., Williams, P., 2004. The wetland plant and macroinvertebrate assemblages of temporary ponds in England and Wales. *Biol Conserv* 120, 261–278. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2004.03.010>
- Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., Bensasson, D., Daffonchio, D., 2007. Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res* 6, 37–53. <https://doi.org/10.1051/EBR:2007031>
- Nilsson, C., Berggren, K., 2000. Alterations of Riparian Ecosystems Caused by River Regulation. *Bioscience* 50, 783–792. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050)
- Nocita, A., Zerunian, S., 2007. L'ittiofauna aliena nei fiumi e nei laghi d'Italia-Alien fish fauna in Italian rivers and lakes.
- Ostfeld, R.S., Keesing, F., Eviner V.T., 2008. Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease on Ecosystems.
- Pablos, M., Huys, G., Cnockaert, M., Rodríguez-Calleja, J.M., Otero, A., Santos, J.A., García-López, M.L., 2011. Identification and epidemiological relationships of *Aeromonas* isolates from patients with diarrhea, drinking water and foods. *Int J Food Microbiol* 147, 203–210. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2011.04.006>
- Pakingking, R., Palma, P., Usero, R., 2015. Quantitative and qualitative analyses of the bacterial microbiota of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in earthen ponds in the Philippines. *World J Microbiol Biotechnol* 31, 265–275. <https://doi.org/10.1007/S11274-014-1758-1>
- Patoka, J., Bláha, M., Kalous, L., Vrabec, V., Buřič, M., Kouba, A., 2016. Potential pest transfer mediated by international ornamental plant trade. *Scientific Reports* 2016 6:1 6, 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep25896>
- Pdg. (2009-2015), n.d. Piano di gestione del distretto idrografico della sicilia - 1° ciclo di pianificazione (2009-2015) | Regione Siciliana [WWW Document]. URL <https://www.regione.sicilia.it/istituzioni/regione/strutture-regionali/presidenza-regione/autorita-bacino-distretto-idrografico-sicilia/piano-gestione-distretto-idrografico-sicilia-1deg-ciclo-pianificazione-2009-2015> (accessed 10.12.23).

- Petter, A., Morand, S., 1988. Nématodes de Poissons du Paraguay. IV. Redescription de *Spinitectus jamundensis* Thatcher et Padilha, 1977 (Cystidiocolidae, Nematoda). *Revue suisse de zoologie*. 95, 377–384. <https://doi.org/10.5962/BHL.PART.79657>
- Phuong, N.N., Zalouk-Vergnoux, A., Poirier, L., Kamari, A., Châtel, A., Mouneyrac, C., Lagarde, F., 2016. Is there any consistency between the microplastics found in the field and those used in laboratory experiments? *Environmental Pollution* 211, 111–123. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2015.12.035>
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M.T., Guerri, G., Nannipieri, P., 2009. Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Biol Fertil Soils* 45, 219–235. <https://doi.org/10.1007/S00374-008-0345-8/METRICS>
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S., Waits, L.P., 2013. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2013-0047> 70, 1123–1130. <https://doi.org/10.1139/CJFAS-2013-0047>
- Pimentel, D., 2008. Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Alien Plant, Animal, and Microbe Species. *Environmental Entomology*, Oxford Academic 37, 277.
- Pirisinu, Q., 1981. Palpicorni (Coleoptera: Hydraenidae, Helophoridae, Spercheidae, Hydrochidae, Hydrophilidae, Sphaeriidae) Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane 13 by Pirisinu, Q. C.N.R. Verona 97.
- Post, J.R., Lee, J.A., 1996. Metabolic ontogeny of teleost fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 910–923. <https://doi.org/10.1139/F95-278>
- Pötter, L., Tollrian, R., Wisotzky, F., Weiss, L.C., 2021. Determining freshwater pCO₂ based on geochemical calculation and modelling using PHREEQC. *MethodsX* 8, 101430. <https://doi.org/10.1016/J.MEX.2021.101430>
- Power, M.E., Tilman, D., Estes, J.A., Menge, B.A., Bond, W.J., Mills, L.S., Daily, G., Castilla, J.C., Lubchenco, J., Paine, R.T., 1996. Challenges in the quest for keystones: Identifying keystone species is difficult-but essential to understanding how loss of species will affect ecosystems. *Bioscience* 46, 609–620. <https://doi.org/10.2307/1312990/2/46-8-609.PDF.GIF>
- Prata, J.C., 2018. Airborne microplastics: Consequences to human health? *Environmental Pollution* 234, 115–126. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2017.11.043>
- Prie V., 2010. *Margaritifera auricularia*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. [WWW Document]. Version 2010.4. URL Available: <http://www.iucnredlist.org> (accessed 9.22.23).
- Rahel, F.J., 2000. Homogenization of fish faunas across the United States. *Science* (1979) 288, 854–856. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.288.5467.854/SUPPL_FILE/1047612.XHTML
- Rashed, M.N., 2001. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environ Int* 27, 27–33. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00050-2](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00050-2)
- Raven, J.A., Gobler, C.J., Hansen, P.J., 2020. Dynamic CO₂ and pH levels in coastal, estuarine, and inland waters: Theoretical and observed effects on harmful algal blooms. *Harmful Algae* 91, 101594. <https://doi.org/10.1016/J.HAL.2019.03.012>
- Reisser, J., Shaw, J., Wilcox, C., Hardesty, B.D., Proietti, M., Thums, M., Pattiaratchi, C., 2013. Marine Plastic Pollution in Waters around Australia: Characteristics, Concentrations, and Pathways. *PLoS One* 8, e80466. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0080466>
- Resh V.H., 2009. Vector-borne diseases of freshwater habitats. In: *Encyclopedia of Inland Waters*.
- Ricciardi, A., Rasmussen, J.B., 1999. Extinction Rates of North American Freshwater Fauna. *Conservation Biology* 13, 1220–1222. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1739.1999.98380.X>
- Richman, N.I., Böhm, M., Adams, S.B., Alvarez, F., Bergey, E.A., Bunn, J.J.S., Burnham, Q., Cordeiro, J., Coughran, J., Crandall, K.A., Dawkins, K.L., Distefano, R.J., Doran, N.E., Edsman, L., Eversole,

- A.G., Füreder, L., Furse, J.M., Gherardi, F., Hamr, P., Holdich, D.M., Horwitz, P., Johnston, K., Jones, C.M., Jones, J.P.G., Jones, R.L., Jones, T.G., Kawai, T., Lawler, S., López-Mejía, M., Miller, R.M., Pedraza-Lara, C., Richardson, A.M.M., Schultz, M.B., Schuster, G.A., Sibley, P.J., Souty-Grosset, C., Taylor, C.A., Thoma, R.F., Walls, J., Walsh, T.S., Collen, B., 2015. Multiple drivers of decline in the global status of freshwater crayfish (Decapoda: Astacidea). *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370, 1–11.
<https://doi.org/10.1098/RSTB.2014.0060>
- Rivosecchi, L., 1984. *Ditteri (Diptera) Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane* 28 by Rivosecchi, L. C.N.R. Verona 177.
- Roberts, M.T.M., Enoch, D.A., Harris, K.A., Karas, J.A., 2006. *Aeromonas veronii* biovar *sobria* bacteraemia with septic arthritis confirmed by 16S rDNA PCR in an immunocompetent adult. *J Med Microbiol* 55, 241–243. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.46295-0/CITE/REFWORKS>
- Ruffo, S., Stoch, F., 2005. Checklist e distribuzione della fauna italiana. *Memorie del Museo Civico di Storia Naturale di Verona. Sezione Scienze della Vita*.
- Russo, G., Violani, C., Zava, B., 1998. Observations on the dynamics of *Rutilus rubilio* Cyprinidae in a man-made hypertrophic basin (Arancio Lake, southwest Sicily). *Italian Journal of Zoology* 65, 549–551. <https://doi.org/10.1080/11250009809386883>
- Saleh, O.H., Mohamed, M.H., Abd, M., Ahmed, E.-A., El-Galil, A., Elkamel, A.A., Sayed, H.H., 2021. Isolation and Characterization of *Micrococcus luteus* from *Oreochromis niloticus* in Egypt. *Journal of Current Veterinary Research* 3, 16–23. <https://doi.org/10.21608/JCVR.2021.199412>
- Saleh, Y.S., Marie, M.A.S., 2015. Assessment of metal contamination in water, sediment, and tissues of *Arius thalassinus* fish from the Red Sea coast of Yemen and the potential human risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 5481–5490.
<https://doi.org/10.1007/S11356-014-3780-0/METRICS>
- Sánchez-Fernández, D., Abellán, P., Mellado, A., Velasco, J., Millán, A., 2006. Are water beetles good indicators of biodiversity in Mediterranean aquatic ecosystems? The case of the Segura river basin (SE Spain). *Biodivers Conserv* 15, 4507–4520. <https://doi.org/10.1007/S10531-005-5101-X>
- Sassi, A., Annabi, A., Kessabi, K., Kerkeni, A., Saïd, K., Messaoudi, I., 2010. Influence of high temperature on cadmium-induced skeletal deformities in juvenile mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Fish Physiol Biochem* 36, 403–409. <https://doi.org/10.1007/S10695-009-9307-9/METRICS>
- Sassoubre, L.M., Yamahara, K.M., Gardner, L.D., Block, B.A., Boehm, A.B., 2016. Quantification of Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates for Three Marine Fish. *Environ Sci Technol* 50, 10456–10464.
https://doi.org/10.1021/ACS.EST.6B03114/ASSET/IMAGES/LARGE/ES-2016-031148_0003.JPEG
- Schneider, J., Valentini, A., Dejean, T., Montarsi, F., Taberlet, P., Glaizot, O., Fumagalli, L., 2016. Detection of Invasive Mosquito Vectors Using Environmental DNA (eDNA) from Water Samples. *PLoS One* 11, e0162493. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0162493>
- Schurmann, H., Steffensen, J.F., 1997. Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod. *J Fish Biol* 50, 1166–1180.
<https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.1997.TB01645.X>
- Sharma, P., Bansi, C., 2013. Pathogenicity Test of Bacterial and Fungal Fish Pathogens in *Cirrihinus mrigala* Infected with EUS Disease. Article in *Pakistan Journal of Biological Sciences*.
<https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.1204.1207>

- Simberloff, D., Martin, J.L., Genovesi, P., Maris, V., Wardle, D.A., Aronson, J., Courchamp, F., Galil, B., García-Berthou, E., Pascal, M., Pyšek, P., Sousa, R., Tabacchi, E., Vilà, M., 2013. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. *Trends Ecol Evol* 28, 58–66. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2012.07.013>
- Simon, C., Daniel, R., 2011. Metagenomic analyses: Past and future trends. *Appl Environ Microbiol* 77, 1153–1161. <https://doi.org/10.1128/AEM.02345-10/ASSET/C1E302BD-8CC3-4054-B12D-95AB7C54848C/ASSETS/GRAPHIC/ZAM9991017850001.JPEG>
- Slenning, B.D., 2010. Global climate change and implications for disease emergence. *Vet Pathol* 47, 28–33. <https://doi.org/10.1177/0300985809354465>
- Smith, K.G., Darwall, W.R.T., 2006. The status and distribution of freshwater fish endemic to the Mediterranean basin. *The Status and Distribution of the Freshwater Fish Endemic to the Mediterranean Basin*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.CH.2006.MRA.1.EN>
- Sommaruga-Wögrath, S., Koinig, K.A., Schmidt, R., Sommaruga, R., Tessadri, R., Psenner, R., 1997. Temperature effects on the acidity of remote alpine lakes. *Nature* 1997 387:6628 387, 64–67. <https://doi.org/10.1038/387064a0>
- Sorgi, G., Di Pietro, R., Alicata, P., 2011. I macroinvertebrati degli stagni dei Nebrodi: diversità e problemi di conservazione. *Biogeographia* 30. <https://doi.org/10.21426/B630110593>
- Stoch F., 2008. The Italian fauna, from knowledge to conservation. Ministero dell' Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare. DPN Direzione per la Protezione della Natura 1–24.
- Stoch, F., Korn, M., Turki, S., Naselli-Flores, L., Marrone, F., 2016. The role of spatial environmental factors as determinants of large branchiopod distribution in Tunisian temporary ponds. *Hydrobiologia* 782, 37–51. <https://doi.org/10.1007/S10750-015-2637-Y/METRICS>
- Stoch, Fabio., 2000. How many endemic species? Species richness assessment and conservation priorities in Italy. *Belgian Journal of Entomology* 2.
- Storey, A.W., Edward, D.H.D., Gazey, P., 1991. Surber and kick sampling: a comparison for the assessment of macroinvertebrate community structure in streams of south-western Australia. *Hydrobiologia* 211, 111–121. <https://doi.org/10.1007/BF00037367/METRICS>
- Stork, N.E., Samways, M.J., Ewley, H.A.C., 1996. Inventorying and monitoring biodiversity. *Trends Ecol Evol* 11, 39–40.
- Strayer, D.L., 2010. Alien species in fresh waters: ecological effects, interactions with other stressors, and prospects for the future. *Freshw Biol* 55, 152–174. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2427.2009.02380.X>
- Strayer, D.L., Dudgeon, D., 2010. Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. <https://doi.org/10.1899/08-171.1> 29, 344–358. <https://doi.org/10.1899/08-171.1>
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., Coissac, E., 2018. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring .
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., Rieseberg, L.H., 2012. Environmental DNA. *Mol Ecol* 21, 1789–1793. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2012.05542.X>
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., Kawabata, Z., 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0035868>
- Tancioni, L., Scardi, M., Caudatella, S., 2006. Riverine fish assemblages in temperate rivers. In: Ziglio G, Siligardi M, Flaim G (eds), *Biological Monitoring of River: Applications and Perspectives*.
- Teder, T., Moora, M., Roosalu, E., Zobel, K., Pärtel, M., Kõljalg, U., Zobel, M., 2007. Monitoring of Biological Diversity: a Common-Ground Approach. *Conservation Biology* 21, 313–317. <https://doi.org/10.1111/J.1523-1739.2006.00575.X>

- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol Ecol* 21, 2565–2573. <https://doi.org/10.1111/J.1365-294X.2011.05418.X>
- Tickner, D., Opperman, J.J., Abell, R., Acreman, M., Arthington, A.H., Bunn, S.E., Cooke, S.J., Dalton, J., Darwall, W., Edwards, G., Harrison, I., Hughes, K., Jones, T., Leclère, D., Lynch, A.J., Leonard, P., McClain, M.E., Muruven, D., Olden, J.D., Ormerod, S.J., Robinson, J., Tharme, R.E., Thieme, M., Tockner, K., Wright, M., Young, L., 2020. Bending the Curve of Global Freshwater Biodiversity Loss: An Emergency Recovery Plan. *Bioscience* 70, 330–342. <https://doi.org/10.1093/BIOSCI/BIAA002>
- Tranvik, L.J., 2021. Acidification of inland waters: This article belongs to *Ambio's* 50th Anniversary Collection. Theme: Acidification. *Ambio* 50, 261–265. <https://doi.org/10.1007/S13280-020-01441-6/METRICS>
- USEPA, 1997. Special report on the environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. Final Report EPA- 630-R-96-012, . U.S. Environmental Protection Agency, Washington 116.
- Vannini, A., Bruni, G., Ricciardi, G., Platania, L., Mori, E., Tricarico, E., 2018. *Gambusia holbrooki*, the ‘tadpolefish’: The impact of its predatory behaviour on four protected species of European amphibians. *Aquat Conserv* 28, 476–484. <https://doi.org/10.1002/AQC.2880>
- Vecchioni, L., Marrone, F., Arculeo, M., Arizza, V., 2017. Are there autochthonous *Ferrissia* (Mollusca: Planorbidae) in the Palaearctic? Molecular evidence of a widespread North American invasion of the Old World. *Eur Zool J* 84, 411–419. <https://doi.org/10.1080/24750263.2017.1350759>
- Vigna, T., Audisio, A., Biondi, P.A., Bologna, M.A., Carpaneto, G.M., De Biase, A., Fattorini, S., Piattella, E., Sindaco, R., Venchi, A., Zapparoli, M., 1999. A proposal for a chorotype classification of the Near East fauna, in the framework of the Western Palearctic region. *Biogeographia* 20. <https://doi.org/10.21426/B6110172>
- Vigna, T., AUDISIO, P.A., BELFIORE, C., BIONDI, M., BOLOGNA, M.A., CARPANETO, G.M., DE BIASE, A., DE FELICI, S., PIATTELLA, E., RACHELI, T., ZAPPAROLI, M., Zoia, S., 1992. Riflessioni di gruppo sui corotipi fondamentali della fauna W-paleartica ed in particolare italiana. *Biogeographia* 16. <https://doi.org/10.21426/B616110375>
- Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., Davies, P.M., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 2010 467:7315 467, 555–561. <https://doi.org/10.1038/nature09440>
- Vreugdenhil, D., Terborgh, J., Cleef, A.M., Sinitsyn, M., Boere, G.C., Archaga, V.L., Prins, H.H.T. (Herbert H.T.), 2003. Comprehensive protected areas system composition and monitoring. WICE, Shepherdstown.
- Ward, J.R., Lafferty, K.D., 2004. The elusive baseline of marine disease: Are diseases in ocean ecosystems increasing? *PLoS Biol* 2, 0542–057. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PBIO.0020120>
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173, 697–703. <https://doi.org/10.1128/JB.173.2.697-703.1991>
- Wiener, J.G., Spry, D.J., 1996. Toxicological significance of mercury in freshwater fish.
- Williamson, C.E., Dodds, W., Kratz, T.K., Palmer, M.A., 2008. Lakes and streams as sentinels of environmental change in terrestrial and atmospheric processes. *Front Ecol Environ* 6, 247–254. <https://doi.org/10.1890/070140>

- Wu, C.J., Wu, J.J., Yan, J.J., Lee, H.C., Lee, N.Y., Chang, C.M., Hsin-I Shih, Wu, H.M., Wang, L.R., Ko, W.C., 2007. Clinical significance and distribution of putative virulence markers of 116 consecutive clinical *Aeromonas* isolates in southern Taiwan. *Journal of Infection* 54, 151–158. <https://doi.org/10.1016/J.JINF.2006.04.002>
- WWF (World Wildlife Fund)., 2022. Living Planet Report – Building a Nature-Positive society (R.E.A. Almond, M. Grooten, D. Juffe Bignoli, D. & T. Petersen, eds).
- www.redlist.org, n.d. IUCN Red List of Threatened Species [WWW Document]. URL <https://www.iucnredlist.org/> (accessed 10.14.23).
- Yarsan, E., Yipel, M., 2013. The Important Terms of Marine Pollution “Biomarkers and Biomonitoring, Bioaccumulation, Bioconcentration, Biomagnification.” Article in *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*. <https://doi.org/10.4172/2155-9929.S1-003>
- Yun, Y., Wang, H., Man, B., Xiang, X., Zhou, J., Qiu, X., Duan, Y., Engel, A.S., 2016. The relationship between pH and bacterial communities in a single karst ecosystem and its implication for soil acidification. *Front Microbiol* 7, 213262. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01955/BIBTEX>
- Zaki, M.S., Authman, M.M.N., Mohsen, A., Hammam, M., Shalaby, S.I., 2014. Aquatic Environmental Pollution in the Egyptian Countryside and Its Effect on Fish Production (Review). *Life Sci J* 11, 1097–8135.