



## LIFE+ 2008

LIFE+ Programme (European Commission)  
**LIFE+ Environment Policy and Governance**

### **Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413**

*Local hydro-morphology, habitat and RBMPs: new measures to improve ecological quality in South European rivers and lakes*

#### **ACTION GROUP D1: Demonstration actions on classification and uncertainty**

- Action D1\_IRSA (month 20-36): Demonstration actions on classification and uncertainty by IRSA
- Action D1\_ISE (month 20-36): Demonstration actions on classification and uncertainty by ISE
- Action D1\_PI (month 20-36): Demonstration actions on classification and uncertainty by ARPA Piemonte
- Action D1\_SA (month 20-36): Demonstration actions on classification and uncertainty by RAS

### **Deliverable I3d3**

Rapporto tecnico - Ciclo dei nutrienti e stato ecologico buono: proposta di nuove misure basate sulle caratteristiche di habitat e idromorfologiche locali degli ambienti acquatici e possibilità di up-scaling

*Nutrient cycling and good ecological status: proposal of new measures based on local hydro-morphological/habitat features of aquatic environments and large scale concern*

CNR-IRSA - Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque,  
U.O.S. Brugherio, Via del Mulino 19, 20861, Brugherio (MB)

CNR-ISE - Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto per lo Studio degli Ecosistemi,  
Largo Tonolli 50, 28922 Verbania Pallanza (VB)

ARPA Piemonte - Arpa Piemonte - Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale,  
Qualità delle acque - Asti, Piazza Vittorio Alfieri 33, 14100 Asti

Regione Sardegna - Regione Autonoma della Sardegna, Direzione Generale Agenzia  
Regionale Distretto Idrografico della Sardegna, Servizio Tutela e Gestione  
delle Risorse Idriche, Vigilanza sui Servizi Idrici e Gestione delle Siccità. Via  
Roma 80, 09123 Cagliari





## **LIFE+ 2008**

LIFE+ Programme (European Commission)  
**LIFE+ Environment Policy and Governance**

### **Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413**

*Local hydro-morphology, habitat and RBMPs: new measures to improve ecological quality in South European rivers and lakes*

**ACTION GROUP D1: Demonstration actions on classification and uncertainty**

### **Deliverable I3d3**

Rapporto tecnico - Ciclo dei nutrienti e stato ecologico buono: proposta di nuove misure basate sulle caratteristiche di habitat e idromorfologiche locali degli ambienti acquatici e possibilità di up-scaling

*Nutrient cycling and good ecological status: proposal of new measures based on local hydro-morphological/habitat features of aquatic environments and large scale concern*

A cura di Balestrini Raffaella, Delconte Carlo, Biazzì Daniele, Marcello Cazzola, Erba Stefania,  
Palumbo Maria Teresa, Mingazzini Marina, Buffagni Andrea

CNR-IRSA - Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque, U.O.S. Brugherio, Via del Mulino 19, 20861, Brugherio (MB)

Brugherio, 13 dicembre 2013



**SOMMARIO**

RIASSUNTO ..... 6

EXTENDED ABSTRACT ..... 7

I3d3.1 – Ciclo dei nutrienti e stato ecologico buono: proposta di nuove misure basate sulle  
caratteristiche di habitat e idromorfologiche locali degli ambienti acquatici e possibilità di up-scaling ..8

I3d3.2 – Studio della trofia di acque fluviali mediante conduzione di saggi di Algal Growth Potential  
(AGP) ..... 23

## RIASSUNTO

Nonostante gli enormi sforzi compiuti in anni recenti per affrontare la problematica relativa all'alterazione dei cicli dei nutrienti, sia in termini scientifici che gestionali, si è ancora lontani da efficaci risoluzioni e i flussi di N e P che transitano attraverso i bacini fluviali continuano ad essere molto elevati. In Europa l'ottenimento dello stato ecologico buono previsto dalla WFD entro 2015 richiede la rapida applicazione di misure efficaci e verificabili per la riduzione del carico dei nutrienti alle acque superficiali e sotterranee. A tale scopo, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse nei riguardi dei processi che avvengono naturalmente in porzioni dell'ecosistema fluviale e/o direttamente in alveo in grado di modulare le concentrazioni e le forme dei nutrienti esportati a valle. Per questi motivi, nell'ambito del progetto INHABIT, è stato condotto uno studio volto ad approfondire le conoscenze relative ai fattori che controllano le trasformazioni dei nutrienti nei sistemi fluviali, con particolare attenzione alle caratteristiche idromorfologiche e di habitat. Alcune metriche di ritenzione dei nutrienti sono state stimate grazie ad esperimenti di aggiunta di nutrienti in alcuni siti fluviali selezionati in Sardegna e Piemonte sulla base delle caratteristiche idromorfologiche e di habitat in modo da coprirne un gradiente di alterazione, da siti reference fino a siti notevolmente alterati.

I risultati evidenziano l'importanza delle zone di "transient storage", (As) nel determinare l'efficienza di ritenzione di NH<sub>4</sub> e PO<sub>4</sub>, espressa dai valori di "uptake length", in entrambe le regioni. Inoltre si è osservata una relazione molto significativa tra l'ampiezza delle As e il rapporto tra la larghezza dell'alveo bagnato e la profondità (w/d), dopo aver separato i tratti fluviali con alvei naturali da quelli con alveo rizezionato. Queste relazioni emerse tra dinamica dei nutrienti e caratteristiche

idromorfologiche e di habitat sono state utilizzate per suggerire alcune misure da adottare nei Piani di gestione dei bacini fluviali.

Con l'obiettivo di effettuare la caratterizzazione trofica delle acque e in particolare, di fornire un inquadramento dei livelli di produttività potenziale e delle condizioni di limitazione nutrizionale, è stato condotto un saggio di crescita algale alle acque fluviali prelevati in alcuni siti dove sono stati condotti gli esperimenti di aggiunta di nutrienti.

I risultati, basati sulle risposte di crescita dell'alga test *Selenastrum capricornutum*, hanno permesso di effettuare la caratterizzazione trofica delle acque fluviali, differenziando livelli di produttività compresa tra moderata ed alta, e individuando nel P il fattore primario limitante la produttività stessa. Nel caso dei test condotti sulle prove di arricchimento in N e P effettuate in campo, è stato possibile quantificare l'incremento dei livelli trofici, con produttività da moderato-alta fino a molto alta, quale effetto del trattamento. Sulla base della biodisponibilità di nutrienti misurata sui campioni trattati, è stata in alcuni casi rilevata la variazione della limitazione nutrizionale da P a N, interpretata quale effetto aggiuntivo, conseguenza delle eccessive concentrazioni di P addizionate

## **EXTENDED ABSTRACT**

Despite the enormous efforts made in recent years to face the problems relating to the alteration of nutrient cycles, both in scientific and management terms, we are still far from effective resolutions and fluxes of nitrogen (N) and phosphorus (P) through river basins continue to be very high.

In Europe, the achievement of good ecological status, required by the WFD before 2015, necessitates rapid uptake of effective and verifiable measures to reduce nutrient loading to surface waters and groundwater. Over the last decade there has been increasing evidence that biogeochemical processes occurring naturally in portions of the river ecosystem (buffer strips) and / or in the riverbed where are able to modulate the concentrations of nutrients exported downstream.

For these reasons, within INHABIT project, we performed an investigation aimed to deepen the knowledge of the factors controlling the transformations of nutrients in river systems, with particular attention to the hydro-morphological features and habitats. Some nutrient retention metrics have been estimated through experiments of nutrient additions in some selected river sites in Sardinia and Piedmont (Italy).

The results highlight the importance of the areas of "transient storage" (As) in regulating the efficiency of NH<sub>4</sub> and PO<sub>4</sub> retention, expressed by the values of "uptake length" in both regions. Moreover we observed a highly significant relationship between As (normalized for the river section) and the ratio between width and the depth (w / d) of the channel, after having separated the river stretches in natural and resectioned channels.

In order to assess the trophic status and, specifically to provide the potential productivity levels and the nutritional limitation, an algal

growth assay has been performed to some Sardinian river waters.

The Algal Growth Potential assay, as a valuable tool for the study and management of the trophic status of water bodies, was applied to the Sardinian river waters, sampled during the INHABIT field survey performed on March 2013. Based on the growth responses of the test alga *Selenastrum capricornutum*, the results enabled to characterize the trophic status of the waters, discriminating between moderate and high productivity levels, and to identify P as the primary factor limiting the productivity. It was possible to quantify the increase of the productivity, leading to higher levels, which were ranging from moderately-high to very high, as effect of the field-treatment of nutrient addition. In particular, based on the nutrient bioavailability, the transition from P to N limitation was detected in some of the samples, as an additional effect, likely due to the undue concentration of the added P.

### **13D3.1 - CICLO DEI NUTRIENTI E STATO ECOLOGICO BUONO: PROPOSTA DI NUOVE MISURE BASATE SULLE CARATTERISTICHE DI HABITAT E IDROMORFOLOGICHE LOCALI DEGLI AMBIENTI ACQUATICI E POSSIBILITÀ DI UP-SCALING**

Balestrini R., C. Delconte, D. Biazzi, S. Erba, M. Cazzola, A. Buffagni A.

*CNR-IRSA, Istituto di Ricerca Sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche, via del Mulino 19, 20861 Brugherio (MB)*

#### **1. INTRODUZIONE**

Le attività umane hanno profondamente alterato il ciclo di azoto (N) e fosforo (P) nella biosfera a livello locale, regionale e globale. L'incremento della popolazione umana e quindi la crescente richiesta di cibo ha rivoluzionato le pratiche agricole promuovendo un passaggio da un'agricoltura a conduzione familiare verso un'agricoltura industrializzata. Il crescente e massiccio utilizzo di fertilizzanti accanto ad un aumento dell'allevamento del bestiame ha più che triplicato il flusso globale di P rispetto ai livelli preindustriali, causando un accumulo di P nei suoli agricoli (Smil, 2000). Nel caso dell'N, non solo l'agricoltura ma anche l'utilizzo di combustibili fossili a scopo energetico ha determinato un aumento globale dell'azoto reattivo (che include tutte le forme biologiche di N), dal XIX al XX secolo, di un ordine di grandezza (Galloway et al., 2004). L'eccesso di nutrienti che non viene consumato dalle comunità biologiche negli ecosistemi terrestri raggiunge le acque superficiali e infine quelle costiere creando in molti casi gravi alterazioni della funzionalità ecosistemica come l'eutrofizzazione. Un esempio molto noto è l'ipossia stagionale del golfo del Messico causata dai carichi di N e P veicolati dal Mississippi nell'Oceano Atlantico (Alexander et al. 2008). A livello nazionale, invece,

l'eutrofizzazione dell' Adriatico nord-occidentale costituisce probabilmente il più grave ed esteso problema di inquinamento del nostro Paese ed uno dei più gravi di tutto il Mediterraneo. Le analisi condotte nell'ultimo decennio confermano il ruolo determinante del fiume Po nel generare le condizioni di eutrofia attraverso l'apporto di sali nutritivi alla fascia marina costiera. L'agricoltura rappresenta la sorgente di generazione principale contribuendo con il 47 e 65% al carico rispettivo di P e N (Piano di gestione del distretto idrografico del fiume Po, 2010).

In Europa l'ottenimento dello stato ecologico buono previsto dalla WFD entro 2015 richiede la rapida applicazione di misure efficaci e verificabili per la riduzione del carico dei nutrienti alle acque superficiali e sotterranee. Per quanto riguarda l'inquinamento da sorgenti diffuse le misure sono orientate da un lato allo sviluppo di tecnologie e metodi per ridurre le perdite dall'agricoltura e dall'altro allo sviluppo di procedure e/o regolamenti per incoraggiare gli agricoltori ad adottare tali metodi.

Negli ultimi anni è però cresciuto l'interesse anche nei riguardi dei processi che avvengono naturalmente in porzioni dell'ecosistema fluviale e/o direttamente in alveo in grado di modulare le concentrazioni e le forme dei nutrienti esportati a valle. Alcuni studi hanno stimato che dal 50 al 75% del carico di N di bacini fluviali non alterati può essere rimosso attraverso i passaggi nel reticolo idrografico in particolare nei fiumi di ordine minore (Alexander et al., 2000; Seitzinger et al., 2002; Peterson et al., 2001). Mulholland (2004) ha dimostrato come il 30% dell' input di P reattivo in un piccolo fiume in un bacino forestato del Tennessee (USA) veniva ritenuto grazie a processi "in-stream".

Queste ricerche hanno contribuito quindi a superare la concezione dei fiumi come delle condotte inerti che trasportano i soluti dalla terra al mare, dove solo la diluizione può influenzare le concentrazioni degli inquinanti



presenti. Processi microbici come la denitrificazione, l'assimilazione da parte delle comunità biologiche, l'adsorbimento ai sedimenti, il sequestro nei sedimenti attraverso la sostanza organica etc. possono rimuovere parte dei nutrienti nel reticoli idrografici e quindi attenuare il carico che dai fiumi viene veicolato al mare.

Per questi motivi, nell'ambito del progetto INHABIT, è stato condotto uno studio volto ad approfondire le conoscenze relative ai fattori che controllano le trasformazioni dei nutrienti nei sistemi fluviali, con particolare attenzione alle caratteristiche idromorfologiche e di habitat.

La ritenzione dei nutrienti può essere vista come il risultato delle interazioni tra proprietà idrologiche, chimiche e biologiche (Valett et al. 1996). La ritenzione idrologica dipende dalle caratteristiche idromorfologiche del tratto, quali ad esempio la portata, le "transient storage areas" (presenza di pool, acque stagnanti, sbarramenti, dighe di detrito), il substrato, la sezione, etc, capaci di aumentare il tempo di residenza dell'acqua. In generale, l'idromorfologia controlla le condizioni generali perché i processi possano avvenire, mentre l'attività biologica determina l'efficienza di rimozione. Qualsiasi alterazione nell'idromorfologia potrebbe influenzare gli scambi tra il sedimento e l'acqua superficiale attraverso modifiche nelle connessioni longitudinali e verticali che possono condurre ad una minore efficienza di ritenzione.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Area di studio

Le attività sperimentali per lo studio delle relazioni tra ritenzione dei nutrienti e caratteristiche idromorfologiche, di habitat e comunità biologiche, condotte all'interno del progetto INHABIT, hanno riguardato 6 siti fluviali in Piemonte, appartenenti alla categoria "piccoli fiumi di pianura", e 23 in Sardegna,

tipicamente a regime temporaneo. Tali siti sono stati selezionati sulla base delle caratteristiche e delle alterazioni idromorfologiche e di habitat in modo da coprire un buon gradiente, ovvero da siti naturali ("reference") fino a siti pesantemente alterati. Le aree di studio sono state descritte in dettaglio in altri deliverables quali Pd2 (Erba et al., 2010), I1d1(Erba et al., 2011) e I2d1 (Balestrini et al. 2012 a).

Nell'ambito dell'ultima campagna sperimentale condotta in Sardegna nel marzo 2013 sono stati inseriti nuovi siti appartenenti allo stesso tipo fluviale dei quali si riportano alcune caratteristiche generali in tabella 1

### 2.2 Piano sperimentale

Il metodo sperimentale utilizzato per la stima delle metriche di ritenzione dei nutrienti si basa sulla conduzione di esperimenti di aggiunta a flusso costante di una soluzione arricchita di sali di ammonio e di fosforo insieme a un tracciante conservativo, il cloruro di sodio.

L'approccio sperimentale consiste nell'aumentare la concentrazione ambientale di nutriente per valutarne la sua potenziale diminuzione durante lo scorrere verso valle in un tratto fluviale di circa 100 metri. Tale metodo consente la misura della lunghezza di assorbimento o "uptake length,  $S_w$ " dalla quale vengono poi derivate altre due metriche di ritenzione: il tasso di assorbimento dei nutrienti, "uptake rate,  $U$ " e il coefficiente di trasferimento di massa, "uptake velocity,  $V_f$ "). Per una descrizione esauriente della metodologia utilizzata si rimanda ai deliverables Pd4 (Balestrini et al. 2011) e I2d2 (Balestrini et al. 2012A).

Tab.1 – Siti fluviali della seconda campagna sperimentale in Sardegna (marzo 2013).

Fiumi	Siti	Provincia	Latitudine L s <sup>-1</sup>	Longitudine m	Altitudine m
Campu E'Spina	Valle culvert	Ogliastra	40°02'45.12"N	09°31'00.71"E	303
Campu E'Spina	Monte culvert	Ogliastra	40°02'45.80"N	09°30'58.10"E	320
Cialdeniddu	Cialdineddu	Olbia-Tempio	41°07'02.17"N	09°13'03.90"E	118
Barrastoni	Monte	Olbia-Tempio	41°06'36.64"N	09°13'43.83"E	105
Barrastoni	Valle ponte	Olbia-Tempio	41°07'15.91"N	09°13'30.60"E	118
Monte Pecore	Reference	Ogliastra	39°56'28.60"N	09°34'47.10"E	92
Tricarai	Reference	Ogliastra	39°57'10.27"N	09°36'12.79"E	44
Tricarai	Valle ponte	Ogliastra	39°57'05.84"N	09°36'16.91"E	54
Pantaleo	Valle	Olbia-Tempio	41°02'03.78"N	09°26'30.95"E	41
Pantaleo	Monte	Olbia-Tempio	41°02'05.28"N	09°26'51.37"E	46

### 3. RISULTATI

La descrizione dettagliata dei risultati ottenuti sia in termini di caratterizzazione chimica che di habitat e di idromorfologia è riportata nel deliverable I2d1 (Balestrini et al. 2012a). Per quanto riguarda le metriche di ritenzione e i risultati preliminari relativi alle relazioni tra efficienza di ritenzione dei nutrienti e le caratteristiche idromorfologiche e di habitat si rimanda ai deliverables I2d2 e I2d3 (Balestrini et al. 2012b e c). Di seguito si riportano i risultati ottenuti nella più recente campagna sperimentale in Sardegna.

#### 3.1 Integrazione dei risultati della campagna marzo 2013 in Sardegna

Con l'obiettivo di consolidare i risultati ottenuti con le campagne sperimentali del 2011 è stata condotta una seconda campagna di misure in Sardegna nel marzo 2013. Gli esperimenti di aggiunta dei nutrienti sono stati condotti in 10

siti, tra i quali alcuni nuovi e altri in tratti diversi, ma sui medesimi fiumi studiati nel 2011. In alcuni casi sono stati scelti due tratti a monte e a valle di un'alterazione morfologica come ad esempio un culvert (Campu e spina) o un ponte (Tricarai).

Tab. 2 – Caratteristiche idrologiche e morfologiche dei siti indagati

Siti	Q L s <sup>-1</sup>	Vel m	Width m	Depth m
CampuespinaV	24.2	0.156	2.1	0.11
CampuespinaM	25.0	0.160	2.3	0.11
Cialdineddu	100.8	0.122	1.9	0.40
BarrastoniM	126.2	0.253	2.1	0.27
BarrastoniV	311.2	0.324	2.4	0.46
MontePecore	62.9	0.194	2.7	0.25
TricaraiRef	113.5	0.190	3.0	0.34
TricaraiVP	95.6	0.233	3.3	0.24
PantaleoV	97.3	0.227	1.9	0.25
PantaleoM	92.1	0.179	3.0	0.21

Come si può osservare dalla tabella 2 in cui vengono riportate alcune caratteristiche idrologiche e morfologiche dei siti 2013, le portate erano comprese tra 24 e 311 l s<sup>-1</sup> con una media di 105 l s<sup>-1</sup> quindi decisamente comparabili a quelle misurate nel 2011. In tutti i tratti fluviali studiati le concentrazioni di NH<sub>4</sub> e PO<sub>4</sub> erano molto basse con medie rispettivamente di 11 e 9 µg l<sup>-1</sup>.

Le metriche di ritenzione calcolate sia per NH<sub>4</sub> che per PO<sub>4</sub> sono riportate in tabella 2. In due siti non è stato possibile ottenere una misura della lunghezza di assorbimento sia di NH<sub>4</sub> che di PO<sub>4</sub> perché non si è osservata alcuna diminuzione delle concentrazioni dei due nutrienti durante l'esperimento di aggiunta. In altre parole, alle condizioni a cui è stato effettuato l'esperimento, non si è riscontrata rimozione.

Questi due siti sono situati entrambi sul fiume Barrastoni e sono stati campionati dopo un periodo molto piovoso che ha causato un innalzamento della portata fino a 300 l s<sup>-1</sup> (nel sito più a valle).

Un regime così veloce e turbolento riduce moltissimo i tempi dell'esperimento e crea delle condizioni inadatte all'applicazione del

metodo. Anche nel sito a monte dove la portata era intorno ai 120 l s<sup>-1</sup>, la velocità era molto alta essendo il canale molto stretto, inciso e profondo e ciò ha influito negativamente sulla possibilità di poter registrare qualche variazione nelle concentrazioni dei nutrienti in un tratto di 100 m. Nel caso del PO<sub>4</sub> anche nel sito Monte Pecore non è stato possibile stimare un valore di lunghezza di assorbimento. Una possibile spiegazione di questo risultato è probabilmente da individuare in un eccessivo innalzamento delle concentrazioni di base di PO<sub>4</sub> durante l'esperimento, nella fase di plateau, che potrebbe aver creato una condizione di saturazione. In questo sito infatti abbiamo misurato i più alti valori di background di PO<sub>4</sub>, circa 35 µg l<sup>-1</sup> a fronte di una concentrazione di NH<sub>4</sub> di 12 µg l<sup>-1</sup> e, come suggerito dal metodo, abbiamo quindi cercato di mantenere lo stesso rapporto N/P anche durante l'aggiunta.

I valori di lunghezza di assorbimento stimati sono compresi tra 244 e 900 m per l'NH<sub>4</sub> e 323 - 837 m per il PO<sub>4</sub>, e sono complessivamente leggermente più alti rispetto alla campagna precedente.

Tab. 3 – Metriche di ritenzione misurate per NH<sub>4</sub> e PO<sub>4</sub> nei siti sardi durante la campagna 2013.

Siti	SwNH <sub>4</sub> m	SwPO <sub>4</sub> m	U_NH <sub>4</sub> mg m <sup>2</sup> min <sup>-1</sup>	U_PO <sub>4</sub> mg m <sup>2</sup> min <sup>-1</sup>	Vf_NH <sub>4</sub> mm s <sup>-1</sup>	Vf_PO <sub>4</sub> mm s <sup>-1</sup>
CampuespinaV	722	643	0.001	0.004	0.024	0.027
CampuespinaM	756	837	0.002	0.002	0.023	0.021
Cialdineddu	797	439	0.063	0.014	0.062	0.112
MontePecore	455		0.036		0.107	
TricaraiRef	909	714	0.030	0.035	0.070	0.089
TricaraiVP	244	455	0.051	0.035	0.231	0.124
PantaleoV	303	323	0.109	0.028	0.184	0.173
PantaleoM	385	385	0.082	0.014	0.099	0.099

I risultati dell'applicazione del modello OTIS per la stima delle "transient storage area" (As) sono presentati in figura 1. L'ampiezza di tali aree, normalizzate per le aree trasversali o sezioni (As/A) dei vari corsi d'acqua studiati, variano da 0.04 a 0.185 risultando quindi inferiori a quelle della campagna precedente.

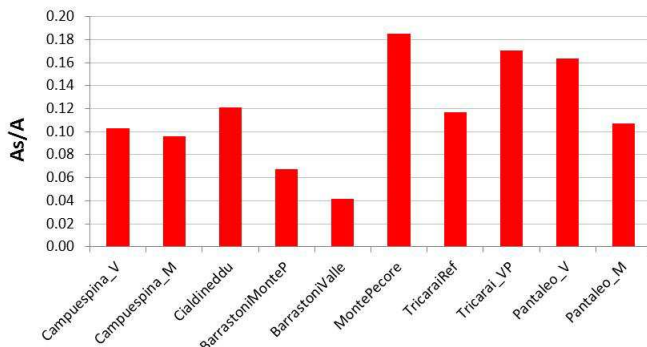


Fig. 1 – Area delle "transient storage" (As) normalizzate rispetto alla sezione trasversale misurate nei siti della campagna 2013.

## 4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

### 4.1 Importanza delle aree di "transient storage" nella ritenzione dei nutrienti

Le "transient storage" sono aree fluviali dove i soluti vengono temporaneamente sequestrati, cioè delle zone stazionarie rispetto alla porzione centrale del canale dove l'acqua si muove più velocemente (Runkell, 1998). In altri termini possono essere definite come porzioni del corso d'acqua in cui si verifica una riduzione locale della velocità di corrente, rispetto alla velocità media nel canale. Esempi di "transient storage zones" sono le piccole pool o pozze profonde dove l'acqua può ristagnare, le zone dove si creano mulinelli o piccoli vortici, i canali laterali, le zone con irregolarità nel letto fluviale, le "back waters", cioè le zone all'interno di una barra in cui si ha risalita verso monte dell'acqua del fiume, le dighe di detrito, gli sbarramenti (ad esempio i tronchi caduti in acqua) e i tratti con pendenza ridotta. Le

transient storage comprendono anche il sistema iporreico cioè il comparto saturo situato tra acqua superficiale e acqua sotterranea sede di complessi scambi sia fisici che biologici occur (Triska et al., 1989; Morrice et al., 1997; Butturini and Sabater, 1999). Anche i sedimenti possono influenzare le dimensioni delle transient storage se si considera ad es. che il tempo di residenza dei soluti quando attraversano zone con sedimenti porosi (e.g ghiaia, sabbia) all'interno del canale o in prossimità delle rive può essere significativamente più lungo di quello dei soluti che viaggiano all'interno della colonna d'acqua. Per la stima delle transient storage è stato utilizzato uno dei metodi più semplici e comuni che comporta l'utilizzo di un tracciante conservativo, nel nostro caso cloruro di sodio. Analogamente alla procedura utilizzata per la stima della lunghezza di assorbimento, il metodo consiste nell'aggiungere il tracciante nel fiume e nell'analisi della curva della conducibilità in funzione del tempo (break-through curve) ottenuta durante l'esperimento. I parametri utili per stimare le "transient storage zones" si ricavano dal confronto tra i valori osservati (a partire dalle misure in continuo di conducibilità) e quelli simulati da modelli di trasporto che considerano la ripartizione dei soluti tra il canale principale e le transient storage. Nello specifico è stato utilizzato il modello OTIS (One-Dimensional Transport with Inflow and Storage - Runkel, 1998) la cui applicazione, nella versione più semplice, prevede l'inserimento di alcuni parametri, ovvero coefficiente di dispersione ( $D$ ,  $m^2 s^{-1}$ ), "transient storage cross sectional area" ( $A_s$ ,  $m^2$ ) e "transient storage exchange coefficient" ( $\alpha$ ,  $s^{-1}$ ) che vengono modificati iterativamente fino ad ottenere una curva il più confrontabile possibile con quella reale.

Tra i risultati ottenuti attraverso le campagne sperimentali di aggiunta di nutrienti il più importante si riferisce alla relazione osservata

tra "uptake length" e "transient storage". L'efficienza di ritenzione aumenta al crescere delle transient storage perché, come previsto concettualmente, la presenza di tali zone aumenta il tempo di contatto tra l'acqua e le superfici biologicamente attivi, in primis i sedimenti.

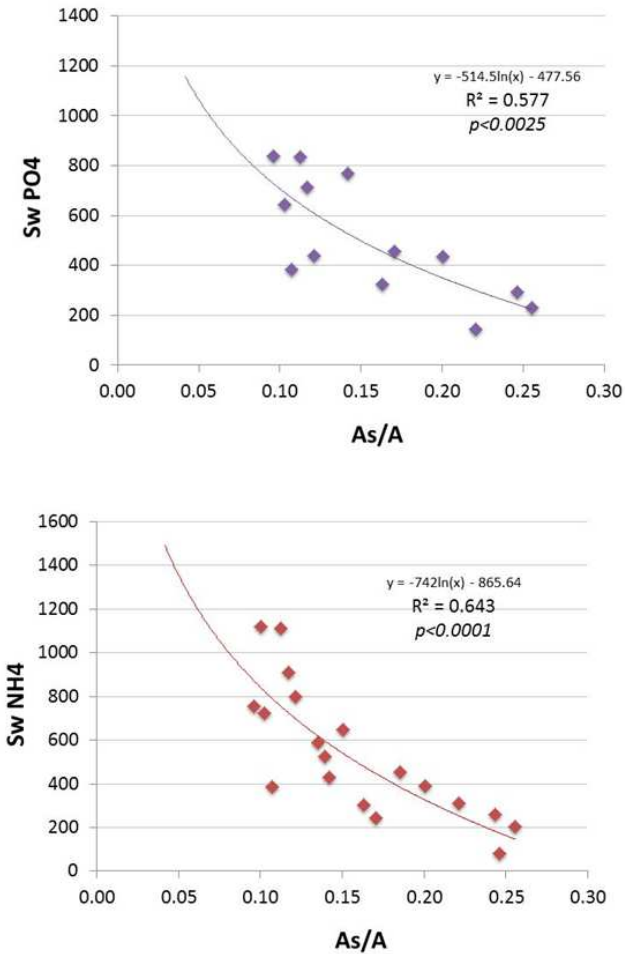


Fig 2 – Relazione tra le "storage zones" (As/A) e l'uptake length (Sw) del PO<sub>4</sub> e dell'NH<sub>4</sub> nei siti sardi.

Come si può osservare dai grafici di figura 2, la relazione per i siti della Sardegna è altamente significativa dal punto di vista statistico, sia per NH<sub>4</sub> che per PO<sub>4</sub>. Per i siti piemontesi la significatività è più bassa anche per il numero inferiore di dati a disposizione (Fig. 3).

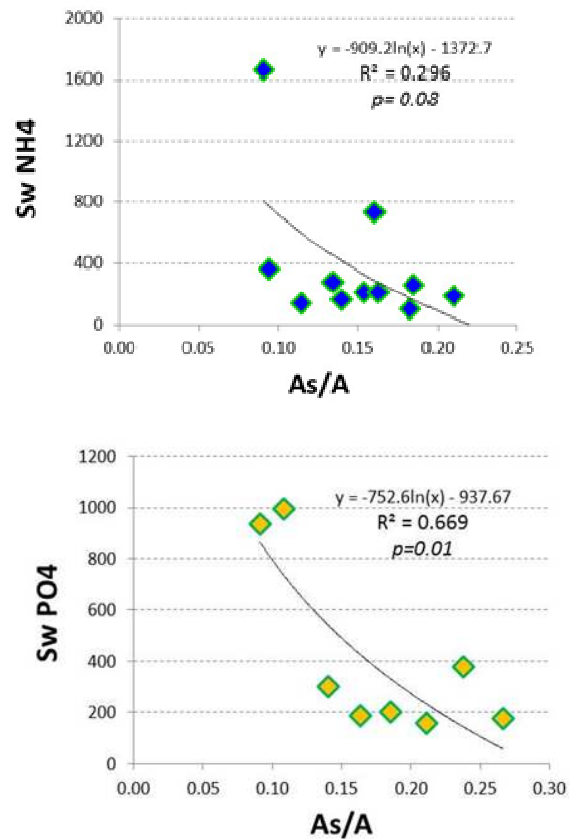


Fig 3 – Relazione tra le "storage zones" (As/A) e l'uptake length (Sw) del PO<sub>4</sub> e dell'NH<sub>4</sub> nei siti piemontesi.

In letteratura vengono riportati molti studi sperimentali nei quali viene analizzata la relazione tra efficienza di ritenzione e presenza delle transient storage, ma i risultati sono piuttosto controversi. Valett e colleghi (1996) riportarono una relazione lineare molto significativa tra l'"uptake length" (Sw) del nitrato e As/A riunendo i risultati di 6 "long term additions" (10 giorni) condotte in tre diversi siti. Mulholland e colleghi (1997) suggerirono che un aumento nelle proporzioni delle "transient storage" era correlato ad una diminuzione dell'"uptake length" dei nutrienti, al contrario, As/A sembrava non avere alcun effetto sull'"uptake length" di N e P nel Sycamore Creek, in Arizona, nonostante l'ampio gradiente di As/S misurato dopo un evento di piena (Martì et al., 1997). Hall e colleghi (2002), elaborando i risultati ottenuti

da esperimenti di addizione di ammonio e fosforo insieme ad un tracciante conservativo in 13 fiumi per un totale di 37 esperimenti, trovarono che le “transient storage” non avevano nessuna relazione con l’uptake del  $PO_4$  e spiegavano solo il 14 % della variazione di  $V_f$  (mass transfer coefficient) dell’ $NH_4$ . Lautz & Siegel (2007) analizzando un set di dati caratterizzato da un ampio gradiente relativo all’ “uptake length” del nitrato e alle “transient storage” non trovarono nessuna relazione lineare significativa tra le metriche di ritenzione e quelle idrologiche derivanti dall’applicazione di OTIS-P. Applicando invece un modello di regressione multipla solo su siti con caratteristiche idrologiche molto differenti riuscirono a spiegare circa il 50% della variabilità della  $Sw$  del  $NO_3$  con la portata specifica e  $As$ .

I risultati ottenuti acquistano quindi una notevole rilevanza nel mondo scientifico indicando come le transient storage arrivino a spiegare più del 60 % della variabilità dell’uptake length nei siti selezionati nel progetto INHABIT. Possiamo quindi considerare le transient storage dei buoni predittori dell’efficienza di ritenzione di ammonio e ortofosfato nei tipi fluviali indagati, cioè piccoli fiumi temporanei e piccoli fiumi di pianura.

#### **4.2 Importanza di alcune caratteristiche morfologiche: ampiezza e profondità dell’alveo**

La preliminare relazione tra uptake length dell’ $NH_4$  e profondità, riportata nel deliverable I2d3 (Balestrini et al. 2012c), non è stata confermata successivamente all’ampliamento del data set successivo alla seconda campagna sperimentale del 2013. Le analisi realizzate con un maggior numero di dati ha invece evidenziato una relazione molto significativa tra ampiezza delle “transient storage” ( $As/A$ ) e il rapporto tra la larghezza e la profondità dell’alveo bagnato ( $w/d$ ) nei siti della Sardegna. Come si può osservare dal grafico di figura 4, all’aumentare di tale rapporto aumenta anche la porzione di canale occupato dalle storage, ma la relazione è emersa solo dopo aver separato i tratti fluviali con alvei naturali, in particolare i siti reference, da quelli con alveo risezionato. Nei tratti naturali,  $w/d$  varia da circa 4 a 14, mentre in quelli risezionati da 14 a 43. Quindi i primi raggiungono i valori massimi di ampiezza delle storage (circa 0.25) a parità di valori di  $w/d$  per i quali nel caso dei fiumi risezionati si registra il minimo di ampiezza delle storage (0.10). Dalla differenza tra le due curve si può dedurre che per i fiumi con alveo naturale ci siano più fattori che concorrono nel determinare la relazione  $w/d$  vs  $As/a$ . Possiamo quindi ipotizzare che nei tratti fluviali naturali la maggiore ricchezza di habitat crea delle condizioni già di per sé favorevoli alla formazione di aree con flusso lento dove i soluti permangono più a lungo. Una minore profondità del canale, a parità di larghezza, favorisce ulteriormente le condizioni per un rallentamento del flusso.

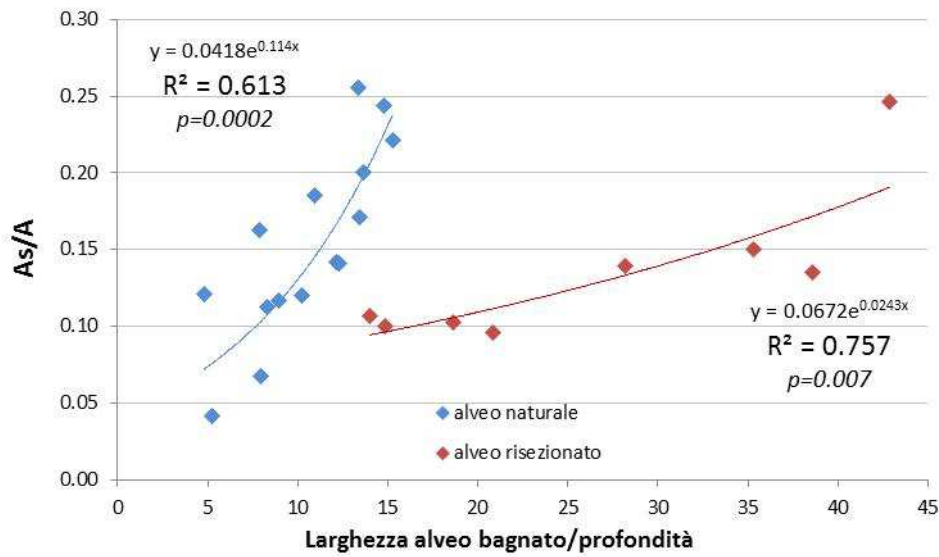


Fig 4 – Relazione tra il rapporto tra la larghezza e la profondità dell'alveo bagnato (w/d) e le aree di storage (As/A) nei siti sardi

Come mostrato nel grafico di figura 5 si è osservata una relazione negativa significativa tra l'indice Habitat Quality Assessment (HQA) e il rapporto Rlp: a valori di HQA più elevati che corrispondono ad una maggiore numero di habitat presenti nel tratto, si registrano valori minimi di w/d.

Nei siti con alveo risezionato, che coincidono in parte con quei tratti in cui erano presenti altre alterazioni idro-morfologiche, la minore profondità può rappresentare l'unico fattore in grado di favorire, in generale, una maggiore diversificazione e, nello specifico, la creazione di habitat con flusso più lento.

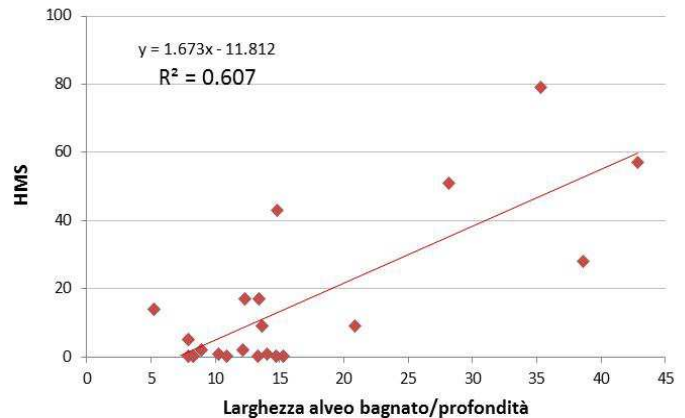
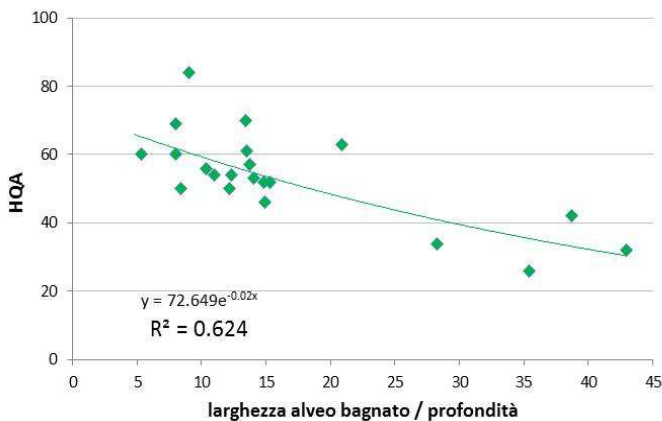


Fig. 5 – Relazione tra il rapporto larghezza dell'alveo bagnato vs profondità dell'acqua (w/d) e l'indice HQA (Habitat Quality Assessment) e l'indice HMS (Habitat Modification Score) nei siti sardi.

In figura 6 viene riportato come esempio il caso del Rio Lorana che presenta una zona a

monte con elevate caratteristiche di naturalità (HQA= 52, HMS=0) mentre più a valle è

sottoposto a notevoli alterazioni idromorfologiche con presenza di guadi

cementificati e diversi culvert (HQA=46, HMS=43).



Fig. 6 – Rio Lorana a monte (a) e a valle (b) di una serie di culvert e guadi cementati.

Dal momento che le storage sono risultate fortemente correlate alla lunghezza di assorbimento dei nutrienti abbiamo ottenuto un risultato positivo anche plottando direttamente il rapporto w/d verso la  $S_w$  dell'ammonio. Come mostrato in figura 7 la relazione è statisticamente significativa sia per i tratti naturali che per quelli risezionati, dove però abbiamo dovuto escludere un sito che presentava caratteristiche intermedie di alterazione.

Ciò indica che all'aumentare del rapporto w/d diminuisce la lunghezza di assorbimento dell' $NH_4$  cioè aumenta l'efficienza di ritenzione di questo nutriente. All'incremento di w/d corrisponde un aumento della superficie di contatto acqua/sedimenti e quindi aumentano le possibilità che la molecola di nutriente possa venire a contatto con le comunità biologiche in grado di trasformare, assimilare e ritenere i nutrienti.

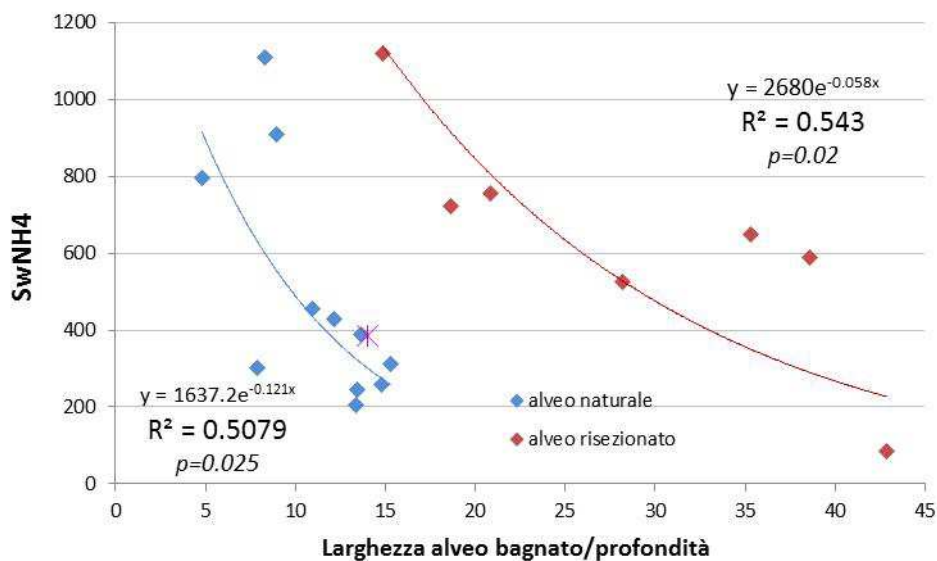


Fig. 7 - Relazione tra il rapporto larghezza vs profondità dell'alveo bagnato (w/d) e l'uptake length dell' $NH_4$  ( $S_w NH_4$ ) nei siti sardi.



Questo risultato riveste una notevole importanza nell'ambito del presente progetto perché caratteristiche morfologiche quali la larghezza dell'alveo bagnato e la profondità media sono facilmente misurabili e rientrano nelle caratteristiche rilevate all'interno del Caravaggio. Al contrario la stima delle transient storage richiede l'utilizzo di un tracciante in un esperimento di campo e la successiva applicazione modellistica ed è quindi relativamente improponibile come misura di routine alle agenzie che si occupano di monitoraggio e gestione.

L'importanza delle caratteristiche morfologiche e idrauliche sulle metriche di ritenzione dei nutrienti è stata evidenziata in diversi studi disponibili in letteratura.

In particolare, in analogia con i risultati di INHABIT, Peterson et al. (2001), nell'ambito del progetto LINX (Lotic Intersite Nitrogen eXperiment) attribuiscono la maggior parte della variazione nell'uptake length dell' $\text{NH}_4$ , misurata in diversi biomi, alla velocità di corrente e alla profondità. Più recentemente, Baker et al. (2012) analizzando le relazioni esistenti tra una serie di parametri geomorfologici (e.g. numero di Reynolds, indice di scabrezza) e le metriche di ritenzione sottolineano come la profondità del canale possa influire sull'efficienza di ritenzione del nitrato. Nei fiumi i processi di assimilazione e rimozione dei nutrienti avvengono principalmente a livello dei sedimenti o delle superfici sommerse coperte da biofilm epilitici. L' $\text{NH}_4$  per esempio viene rimosso principalmente attraverso l'assimilazione ad opera di alghe e batteri eterotrofi e per adsorbimento ai sedimenti. Di conseguenza basse profondità ed elevati rapporti tra superficie e volume, caratteristiche tipiche dei piccoli fiumi, favoriscono l'efficienza di ritenzione dei nutrienti.

Alexander et al. (2000) in uno studio sul trasporto dell'azoto nel bacino del Mississippi, nel quale sono stati monitorate più di 300

stazioni comprese alcune sui tributari maggiori, hanno dimostrato come la velocità di rimozione dell'N fosse dipendente dalla dimensione dell'alveo fluviale. Facendo riferimento a una cinetica di primo grado, il coefficiente di rimozione (frazione di N rimosso nell'unità di tempo) variava da 0.45 d<sup>-1</sup> per i piccoli fiumi a 0.005 d<sup>-1</sup> per il Mississippi, indicando come all'aumento della dimensione del canale diminuiva progressivamente l'efficacia dei processi di rimozione "in-stream". La relazione inversa tra rimozione dell'azoto e dimensioni del canale veniva spiegata considerando l'influenza della profondità del canale, cioè del volume d'acqua disponibile per i processi per unità di superficie del sedimento. Ad es. la rimozione dell'N per denitrificazione e per sedimentazione generalmente diminuisce nei canali profondi dove è minore il contatto e lo scambio tra l'acqua e i sedimenti.

Seitzinger et al (2002) hanno sviluppato un modello di regressione in grado di prevedere la rimozione dell'azoto nei fiumi in funzione del rapporto tra profondità e tempo di residenza. Secondo gli Autori, questa proprietà idraulica, che è risultata il miglior descrittore della ritenzione di N rispetto ad altre 5 variabili esaminate (e.g. ordine dei fiumi, portata, uso del suolo, carico di N e tempo di residenza dell'acqua), fornisce una misura del tempo necessario alle forme azotate, sia particolate che disciolte, per reagire con i sedimenti. Le variazioni nel tempo di contatto possono rappresentare il risultato delle proprietà naturali di un fiume in relazione alle caratteristiche del canale (e.g. profondità, velocità, etc). L'applicazione del modello a 16 bacini idrografici in USA ha fornito stime di rimozione dell'N variabili da 37 a 76% dell'input, durante il trasporto attraverso il reticolo idrografico. Analogamente, Alexander et al. (2009) hanno applicato un modello di trasporto dinamico allo scopo di valutare l'effetto delle componenti biogeochimiche e idrologiche sulla rimozione dell'N per

denitrificazione, a scala di reticolo idrografico. I loro risultati evidenziano come, tra gli aspetti fisici, la profondità dell'acqua, più che la velocità, sia il più importante fattore idrologico in grado di spiegare le variazioni nella rimozione del nitrato in ogni bacino indagato.

### **4.3 Strategie di risanamento fluviale per la riduzione del carico dei nutrienti**

Il termine "ritenzione" dei nutrienti viene usato per indicare l'insieme dei processi responsabili dell'accumulo, trasformazione e rimozione dei nutrienti. La ritenzione rappresenta quindi una importante proprietà funzionale dell'ecosistema fluviale che può influenzare lo stato ecologico di un fiume e che può essere utilizzata come indicatore delle condizioni ecologiche. La quantificazione dei processi di ritenzione dei nutrienti, l'identificazione delle unità funzionali dell'ecosistema fluviale dove i processi sono più attivi e l'individuazione dei fattori ambientali limitanti i processi sono cruciali nello sviluppo di strategie gestionali per la protezione degli ecosistemi acquatici.

Nell'ambito del progetto INHABIT abbiamo focalizzato l'attenzione sugli aspetti legati all'habitat e all'idromorfologia e sul loro ruolo nella ritenzione dei nutrienti.

I risultati ottenuti evidenziano in maniera molto chiara l'importanza delle transient storage cioè degli habitat specifici del fiume che vengono identificati con un caratteristica fisica, cioè la velocità, ma che racchiudono in sé molteplici attributi sia fisici che biologici. In altri termini è evidente come moltissime caratteristiche che definiscono gli habitat fluviali possono rappresentare dei fattori cruciali in grado di controllare l'estensione delle transient storage. Le caratteristiche dell'habitat sembrano quindi influenzare profondamente non solo le comunità biologiche ma anche le dinamiche dei nutrienti e in particolare l'efficienza di

ritenzione di NH<sub>4</sub> e PO<sub>4</sub>. Tratti fluviali con un'elevata diversificazione e ricchezza di habitat sono di per sé favoriti perché in essi aumenta la possibilità che siano presenti anche quelli specifici che vanno ad influire sulle "storage". Nei tratti fluviali impoveriti a seguito degli interventi umani, l'efficienza di rimozione dei nutrienti può essere incrementata favorendo una gestione degli alvei fluviali che determini un aumento della loro complessità topografica, del rapporto superficie/volume (tra colonna d'acqua e sedimenti) e la ritenzione idraulica, così da consentire un maggiore contatto tra acqua e organismi bentonici.

Tralasciando l'iporreico, che rappresenta un sistema molto complesso, anche la semplice presenza di strutture superficiali all'interno del canale può contribuire alle transient storage. Ad esempio le dighe di detrito (meglio note con il termine inglese "debris dam"), il detrito legnoso di piccole e grandi dimensioni, ma anche lettiere di foglie contribuiscono ad aumentare localmente il tempo di residenza dell'acqua favorendo non solo la ritenzione idrologica ma anche il contatto con le comunità biologiche e quindi l'assimilazione e/o la trasformazione dei nutrienti. Lautz et al., (2006) confrontando tratti differenti di uno stesso fiume ha osservato come gli scambi con il sistema iporreico e il tempo di residenza dell'acqua erano favoriti dalla presenza di "debris dams" mentre in Algerich et al. (2008) è stato dimostrato il ruolo del contributo stagionale della lettiera di foglie nell'aumentare la ritenzione di PO<sub>4</sub> e NH<sub>4</sub> grazie ad un aumento delle transient storage e ad una maggiore consumo di nutrienti da parte dei batteri.

Alcuni esperimenti di manipolazione del substrato di canali irrigui attraverso l'introduzione di deflettori costituiti da differenti substrati (limo, sabbia e ciottoli) colonizzati hanno dimostrato una diminuzione della velocità dell'acqua e un incremento delle

storage (Argerich et al., 2011). Inoltre si è osservato come i coefficienti di uptake sia di  $\text{NH}_4$  che di  $\text{PO}_4$  variassero in funzione del tipo di materiale utilizzato e ciò con notevoli implicazioni nei progetti di risanamento finalizzati a modificare la morfologia del canale. Altri Autori (Kasahara & Hill, 2006) hanno sottolineato l'importanza delle sequenze riffle-pool o step-pool nell'aumentare la ritenzione idrologica. La creazione artificiale di questi ambienti che rallentano la velocità dell'acqua è una procedura adottata in alcuni progetti di rinaturalizzazione fluviale nel bacino della baia di Chesapeake, lungo la costa orientale degli Stati Uniti, dove il problema di un eccessivo carico di N è oggetto di studio da molti anni (Craig et al. 2008).

Bukaveckas (2007) riporta interessanti risultati relativi agli effetti di una rinaturalizzazione di un fiume rettificato e inciso sui meccanismi di ritenzione di nutrienti. Tra gli effetti rilevati dal confronto pre e post-risanamento si è osservato: i) la diminuzione della velocità dell'acqua, ii) l'incremento dei coefficienti di "uptake rate" di 30 volte per l'N e di 3 volte per il P, con una conseguente importante riduzione del trasporto di nutrienti verso valle. Quindi, questo studio suggerisce come il processo di rinaturalizzazione di un tratto fluviale di un 1 km di lunghezza abbia determinato un aumento dell'uptake dei nutrienti grazie alla riduzione della velocità del flusso.

L'importanza del tempo di residenza dell'acqua e del substrato dell'alveo fluviale viene evidenziata anche dai risultati ottenuti in uno dei siti sperimentali in Sardegna caratterizzato da gravi alterazioni morfologiche, il Canale Monte Depuratore (figura 8) che presentava argini e alveo cementificati, oltre alla presenza a monte di briglie in sequenza.

Ciò nonostante qui abbiamo misurato una notevole estensione delle storage ( $A_s/A=0.25$ ) e un'elevata efficienza di ritenzione per l'ammonio ( $S_w= 83$  m) e una buona ritenzione per l'ortofosfato (286 m). Abbiamo spiegato

questi risultati considerando che nel transetto la cementificazione non era continua per la presenza di fratture che hanno permesso una certa diversificazione del flusso e successivamente la creazione di alcuni piccoli isolotti e di "dead waters", ovvero acque relativamente ferme. Queste caratteristiche unite a condizioni particolarmente favorevoli, cioè bassa portata e temperature ottimali associate all'assenza di ombreggiamento, hanno sostenuto lo sviluppo massiccio di alghe e macrofite, verosimilmente, particolarmente efficienti nell'assimilare l'azoto e il fosforo fornito durante l'esperimento di aggiunta dei nutrienti. Questo è un esempio di come un corpo d'acqua profondamente alterato, tenda ad evolversi spontaneamente verso delle condizioni naturalità, in assenza di interventi antropici, e ciò comporta il ristabilirsi di una relativa funzionalità quale appunto la capacità di assimilare i nutrienti.



Fig. 8 – Canale Monte Depuratore (Sardegna).

Un risultato molto importante di INHABIT a fini gestionali, riguarda la relazione osservata tra l'efficienza di ritenzione dell' $\text{NH}_4$  e il rapporto ampiezza dell'alveo bagnato/profondità dell'acqua. L'ipotesi che caratteristiche dimensionali del tratto fluviale siano cruciali nella dinamica dei nutrienti è supportata da molti studi e ciò indica in maniera chiara il ruolo rivestito dai tratti sorgentizi e in generale dai

fiumi di piccoli ordine nell'attenuazione dei carichi di N e P (Alexander et al., 2000; Seitzinger et al., 2002, Peterson et al., 2001). In questi fiumi infatti la profondità dell'acqua generalmente scarsa e alti rapporti superficie/volume accentuano l'influenza dei processi biotici e abiotici sulla qualità dell'acqua.

Se comparati con i grandi fiumi, che vengono alimentati dal reticolo idrografico a monte e sono quindi sottoposti alle pressioni complessive che si generano in gran parte a monte, i piccoli fiumi con bacini limitati godono di un'elevata indipendenza idrologica e relativa autonomia anche dal punto di vista ecologico. In un'ottica di protezione e riqualificazione ambientale su larga scala i piccoli corsi d'acqua - spesso non attribuiti a corpi idrici per la WFD e, infine, non monitorati - e le sorgenti diventano le unità fondamentali da mantenere e proteggere prioritariamente per salvaguardare i servizi ecosistemici offerti dall'intero bacino idrografico. Molte evidenze scientifiche hanno dimostrato come la qualità ecologica e la biodiversità di un sistema fluviale dipendano dalle funzioni svolte dai piccoli fiumi che spesso vengono comparati ai capillari alveolari del sistema respiratorio umano (Lowe e Likens, 2005). Lo stretto legame tra superfici terrestri e acquatiche che si stabilisce in questi corsi d'acqua aumenta la possibilità per essi di entrare in contatto con input terrestri di nutrienti e sostanze tossiche e ciò li rende particolarmente sensibili ai cambiamenti naturali e antropici. Anche per questi motivi è cruciale la loro salvaguardia nell'ambito dei Piani di gestione dei bacini fluviali.

Infine occorre considerare che nonostante la ricca letteratura prodotta negli ultimi anni sulla ritenzione dei nutrienti nelle acque superficiali, si è ancora lontani dall'offrire ai gestori ambientali delle risposte adeguate per affrontare il problema di come ridurre i carichi di azoto e fosforo in chiusura di bacino.

L'efficacia dei progetti di risanamento ambientale viene comunemente valutata avendo come riferimento degli attributi biologici come ad es. indici relativi ai macroinvertebrati o ai pesci, oppure valutando la presenza di uccelli, anfibi, etc. Scarse sono invece le informazioni relative ai benefici che un risanamento può ottenere in relazione all'efficacia di ritenzione dei nutrienti. Anche negli Stati Uniti dove più del 30% dei progetti di risanamento sono finalizzati al miglioramento della qualità dell'acqua (Bernhardt et al. 2005), i dati relativi alla percentuali di riduzione dell'azoto associati a questi progetti, sono ancora in una fase iniziale di elaborazione (Craig et al., 2008). In ogni caso la sola riqualificazione dei fiumi non può certamente rappresentare una misura esaustiva per risolvere il problema dell'alterazione del ciclo dei nutrienti che deve essere affrontato con approcci che riguardano l'uso del suolo e le attività produttive.

## BIBLIOGRAFIA

ALEXANDER, R. B., B'OHLEKE, J. K., BOYER, E. W., DAVID, M. B., HARVEY, J. W., MULHOLLAND, P. J., SEITZINGER, S. P., TOBIAS, C. R., TONITTO, C. AND WOLLHEIM, W. M. 2009.. - Dynamic modeling of nitrogen losses in river networks unravels the coupled effects of hydrological and biogeochemical processes. *Biogeochemistry*, 93:91-116

ALEXANDER, R. B., SMITH, R. A., AND SCHWARZ, G. E. 2000. Effect of stream channel size on the delivery of nitrogen to the Gulf of Mexico. *Nature* 403, 758-761.

ALEXANDER, R. B., SMITH, R. A., SCHWARZ, G. E., BOYER, E. W., NOLAN, J. V., AND BRAKEBILL, J. W. 2008. Differences in phosphorus and nitrogen delivery to the Gulf of Mexico from the Mississippi River Basin. *Environmental Sciences and Technology* 42, 822-830.

ARESE C., BALESTRINI R., LOTTI A., 2011. Deliverable Pd4. Linee guida e protocolli operativi relativi alle attività di campo per la valutazione della capacità di rimozione dei nutrienti nei fiumi. Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413. 43 pp. [www.life-inhabit.it](http://www.life-inhabit.it)

ARGERICH A., MARTÍ E., SABATER F., HAGGERTY R., RIBOT, M. Influence of transient storage on stream nutrient uptake based on substrata manipulation *Aquat Sci* (2011) 73:365–376

ARGERICH, A., MARTÍ, E., SABATER, F., RIBOT, M., VON SCHILLER, D., AND RIERA, J. (2008). Combined effects of leaf litter inputs and a flood on nutrient retention in a Mediterranean mountain stream during fall. *Limnology and Oceanography* 53, 631-641.

BALESTRINI R. & BIAZZI D., 2012 (b). Deliverable I2d2. Rapporto tecnico – Lunghezza di assorbimento e relativi parametri nei siti fluviali studiati. Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413. 36 pp. [www.life-inhabit.it](http://www.life-inhabit.it)

BALESTRINI R., BIAZZI D., CAZZOLA M. & FERRERO T., 2012 (a). Deliverable I2d1. Rapporto tecnico - Caratterizzazione fisico-chimica e idromorfologica dei siti studiati. Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413. 43 pp. [www.life-inhabit.it](http://www.life-inhabit.it)

BALESTRINI R., BIAZZI D., CAZZOLA M., BUFFAGNI A., 2012 (c). Deliverable I2d3. Rapporto tecnico - Confronto tra ritenzione dei nutrienti e indicatori di habitat e idromorfologici. Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413. 37 pp. [www.life-inhabit.it](http://www.life-inhabit.it)

BERNHARDT, E. S, PALMER, M. A., ALLAN, J. D., ALEXANDER, G., BARNAS, K., BROOKS, S., CARR, J., CLAYTON, S., DAHM, C., FOLLSTAD-SHAH, J., GALAT, D., GLOSS, S., GOODWIN, P., HART,

D., HASSETT, B., JENKINSON, R., KATZ, S., KONDOLF, G. M., LAKE, P. S., LAVE, R., MEYER, J. L., O'DONNELL, T. K., PAGANO, L., POWELL, B., SUDDUTH, E. SYNTHESIZING U. S. river restoration efforts. *Science* 2005, 308, 636-637.

BUKAVECKAS PA. 2007. Effects of channel restoration on water velocity, transient storage, and nutrient uptake in a channelized stream. *Environ Sci Technol* 41: 1570–76.

BUTTURINI, A. AND SABATER, F. (1999). Importance of transient storage zones for ammonium and phosphate retention in a sandy-bottom mediterranean stream. *Freshwater Biology* 41, 593-603.

CRAIG, L.S., M.A. PALMER, D.C. RICHARDSON, S. FILOSO, E.S. BERNHARDT, B.P. BLEDSOE, M.W. DOYLE, P.M. GROFF MAN, B. HASSETT, S.S. KAUSHAL, P.M. MAYER, S.M. SMITH, AND P.R. WILCOCK. 2008. Stream restoration strategies for reducing river nitrogen loads. *Front. Ecol. Environ* 6:529–538.

ERBA S., ARESE C., BALESTRINI R., LOTTI A., MARZIALI L., PINTUS M., CASULA R. CONI M.; FERRERO T., FIORENZA A.; RAVIOLA M., SESIA E. & BUFFAGNI A., 2010. Deliverable Pd2. Tipizzazione e condizioni di riferimento in alcuni bacini fluviali italiani: approcci, metodi e selezione delle aree di studio. Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413. 231 pp.

ERBA S., DEMARTINI D., BALESTRINI R., CAZZOLA M., TENCHINI R., FIORENZA A., FERRERO T., CASULA R., PINTUS M. & BUFFAGNI A., 2011. Deliverable I1d1. Aree di studio, siti e strategie di campionamento, difficoltà complessive e sintesi dei principali risultati. Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413. 166 pp.

GALLOWAY, J. N., DENTENER, F. J., CAPONE, D. G., BOYER, E. W., HOWARTH, R. W.,

SEITZINGER, S. P., ASNER, G. P., CLEVELAND, C. C., GREEN, P. A., AND HOLLAND, E. A. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry* 70, 153-226.

KASAHARA T AND HILL AR. (2006). Effects of riffle-step restoration on hyporheic zone chemistry in N-rich lowland streams. *Can J Fish Aquat Sci* 63: 120-33.

LAUTZ LK, SIEGEL DI, BAUER RL. 2006. Impact of debris dams on hyporheic interaction along a semi-arid stream. *Hydrol. Process.* DOI: 10.1002/hyp.6569.

LOWE WH, LIKENS GE. 2005 Moving Headwater Streams to the Head of the Class, *BioScience*, 55(3):196-197. 2005.

MORRICE, J. A., VALETT, H. M., DAHM, C. N., AND CAMPANA, M. E. (1997). Alluvial characteristics, groundwater surface water exchange and hydrological retention in headwater streams. *Hydrological Processes* 11, 253-267.

MULHOLLAND, P. J. (2004). The importance of in-stream uptake for regulating stream concentrations and outputs of N and P from a forested watershed: evidence from long-term chemistry records for Walker Branch Watershed. *Biogeochemistry* 70, 403-426.

PETERSON, B. J., WOLLHEIM, W. M., MULHOLLAND, P. J., WEBSTER, J. R., MEYER, J. L., TANK, J. L., MARTÍ, E., BOWDEN, W. B., VALETT, H. M., HERSHEY, A. E., MCDOWELL, W. H., DODDS, W. K., HAMILTON, S. K., GREGORY, S., AND MORRALL, D. D. (2001). Control of nitrogen export from watersheds by headwater streams. *Science* 292, 86-90.

SEITZINGER, S. P., STYLES, R. V., BOYER, E. W., ALEXANDER, R. B., BILLEN, G., HOWARTH, R. W., MAYER, B., AND VAN BREEMEN, N. (2002).

Nitrogen retention in rivers: model development and application to watersheds in the northeastern USA. *Biogeochemistry* 57, 199-237.

SMIL V (2000) Phosphorus in the environment: Natural flows and human interferences. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 25:53-88.

TRISKA, F. J., KENNEDY, V. C., AVANZINO, R. J., ZELLWEGER, G. W., AND BENCALA, K. E. (1989). Retention and transport of nutrients in a third-order stream: channel processes. *Ecology* 70, 1877-1892.

VALETT H. M., MORRICE J.A., DAHM, NC, CAMPANA ME. 1996. Parent lithology, surface-groundwater exchange, and nitrate retention in headwater streams, *Limnol. Oceanogr.*, 41(2), 1996, 333-345.

## **I3D3.2 - STUDIO DELLA TROFIA DI ACQUE FLUVIALI MEDIANTE CONDUZIONE DI SAGGI DI ALGAL GROWTH POTENTIAL (AGP)**

A cura di:

Palumbo M.T., Mingazzini M.

*CNR-IRSA, Istituto di Ricerca Sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche, via del Mulino 19, 20047 Brugherio (MB)*

### **1. INTRODUZIONE**

#### **1.1 Validità del saggio di crescita algale per lo studio della trofia delle acque**

Le alghe, quali produttori primari, sono organismi rappresentativi della produttività dell'ecosistema acquatico. Mediante il processo fotosintetico infatti, le alghe sono in grado di trasformare i nutrienti inorganici in biomassa organica, che rappresenta la riserva energetica per i livelli trofici superiori. Benchè l'arricchimento delle acque in nutrienti favorisca la produzione primaria, quando gli apporti di nutrienti diventano eccessivi, si ha una sovrapproduzione di biomassa algale che può originare il fenomeno della eutrofizzazione, caratterizzata da tutta una serie di processi degenerativi dell'ambiente acquatico (Vollenweider, 1968; Marchetti, 1987; Smith, 1999).

Il problema dell'eutrofizzazione degli ambienti acquatici è intensamente studiato già a partire dagli anni '60 e, dagli ecosistemi lacustri, si è diffuso anche negli ambienti fluviali (Behrendt 1993; Biggs 2000; Dodds, 2004). I risultati di diverse indagini riportano come l'aumento dei carichi di fosforo nelle acque fluviali possa stimolare la produzione primaria e determinare effetti a cascata nelle popolazioni dei consumatori (Hershey et al., 1988; Horner et

al., 1990). A seguito di variazioni trofiche, possono verificarsi importanti modificazioni nella struttura della comunità algale, planctonica e bentonica (Heiskary & Markus, 2001), che possono influenzare i livelli trofici superiori dell'ecosistema acquatico (Paerl et al. 1990, Ha et al. 1998). Ad esempio, l'aumento della biomassa algale filamentosa del fondo fluviale riduce la qualità degli habitat sia per la vita dei macroinvertebrati sia per la deposizione delle uova dei pesci (EPA, 1996). Mentre sono chiariti le cause e i meccanismi che regolano il fenomeno dell'eutrofizzazione (Smith, 2009) ed il concetto di limitazione nutrizionale è riconosciuto come punto chiave della ricerca nel campo dell'eutrofizzazione (Smith et al., 1999), permangono ancora difficoltà sulla discriminazione tra i fattori nutrizionali sui quali focalizzare gli sforzi gestionali (Conley, 2000; Tusseau-Vuillemin, 2001). L'identificazione del fattore nutrizionale limitante infatti è fondamentale per la selezione di misure di controllo appropriate nella gestione della trofia delle acque (Beardall et al., 2001). Inoltre, nonostante la ricerca sia orientata già dai primi anni 80 (OECD, 1982) verso un continuo sviluppo dei modelli predittivi (Van Straten, 1998), permangono difficoltà legate non solo alla capacità di identificazione delle fonti, sia puntuali che diffuse ed alla previsione dei carichi originati dalle stesse, ma soprattutto alla valutazione della biodisponibilità e della velocità di riciclo dei nutrienti (Ekholm & Krogerus, 2003). Rispetto a varie tecniche biologiche per studiare la biodisponibilità nutrizionale (Berge & Källqvist, 1998), il metodo ritenuto più valido è quello che prevede saggi di crescita algale in colture di laboratorio (Boström et al., 1998). Metodiche che prevedono misure dello sviluppo massimo di biomassa algale si sono dimostrate essenziali per determinare il potenziale trofico di acque naturali e di scarichi urbani ed industriali, cioè per valutare l'impatto dei nutrienti e delle variazioni dei loro carichi

sulla produttività primaria (Chiaudani & Vighi, 1974; ASTM, 2004). Il metodo di saggio di crescita algale (Algal Growth Potential = AGP), standardizzato dall'Environmental Protection Agency statunitense già negli anni '70 e descritto nel documento "Algal Assay Procedure: Bottle test" (EPA, 1971, 1978), è principalmente rivolto proprio alle problematiche di eutrofizzazione. Il saggio è un test di laboratorio che consiste nella misura sperimentale della quantità massima di biomassa, supportato da un campione d'acqua inoculato con un'alga test. La risposta di crescita dell'alga è proporzionale non solo alla concentrazione ma soprattutto alla reale biodisponibilità dei nutrienti presenti in forma disciolta nel campione. La biodisponibilità rappresenta la quantità di un nutriente realmente utilizzabile dai produttori primari ed è funzione sia della presenza del nutriente in forma disciolta, e cioè della sua accessibilità, sia della contemporanea presenza di tutti gli altri elementi, macro e micronutrienti, essenziali per sostenere la crescita algale e la produzione di biomassa. Il saggio di crescita algale rappresenta quindi un modello della produzione primaria di un campione d'acqua, che fornisce una risposta integrata dello stato nutrizionale del sistema. Il senso della misura biologica dello sviluppo algale potenziale sta proprio nel fatto che può esistere una differenza tra la concentrazione dei nutrienti presenti nel campione, determinabili mediante analisi chimica, e la quantità realmente utilizzabile, e cioè biodisponibile, per la crescita algale.

Il saggio AGP permette quindi di ottenere una stima del livello trofico delle acque molto più realistica rispetto a quella fornita dalle sole analisi chimiche, che invece si basano solo sulle concentrazioni dei singoli elementi. L'EPA addirittura sottolinea come le risposte di crescita algale possano essere utilizzate per una verifica degli stessi valori di concentrazione dei nutrienti determinati analiticamente (EPA,

1978). Il mancato raggiungimento dei valori di biomassa attesi sulla base delle concentrazioni analizzate può essere attribuito ad una delle seguenti cause: l'assenza di altri nutrienti essenziali per la crescita; l'imprecisione del dato analitico, o anche la presenza di composti tossici.

Inoltre, la procedura sperimentale, che prevede la singola o la contemporanea aggiunta di uno o più nutrienti nel campione saggiato, consente di stimare la sensibilità del sistema acquatico agli eventuali incrementi di N e P, prevedendo l'impatto delle variazioni dei nutrienti sulla produttività, e di definire il fattore nutrizionale di controllo della crescita algale e la sua reale biodisponibilità in ambiente naturale (Greene et al., 1976; Payne, 1976; EPA, 1978). I risultati ottenuti quindi sono particolarmente utili per guidare le operazioni di contenimento dei nutrienti nella gestione della trofia delle acque.

## 1.2 Obiettivi

Il saggio di crescita algale è stato applicato alle acque fluviali prelevate dai torrenti sardi studiati nell'ambito della campagna sperimentale del Progetto INHABIT con l'obiettivo di effettuare la caratterizzazione trofica delle acque. In particolare, la sperimentazione è stata mirata a fornire un inquadramento dei livelli di produttività potenziale e delle condizioni di limitazione nutrizionale.

La stessa procedura di saggio algale è stata inoltre adottata per valutare l'efficacia dei trattamenti di arricchimento in N e P, effettuati in campo nell'ambito dello studio della capacità di ritenzione dei nutrienti.

In particolare, oltre alla stima dell'incremento del potenziale trofico e di una possibile alterazione della limitazione nutrizionale, quale effetto dei trattamenti di arricchimento delle acque, le risposte di crescita algale sono state utilizzate per fornire una stima della biodisponibilità dei macronutrienti addizionati,



con l'obiettivo di valutare la reale possibilità di consumo da parte dei produttori primari.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 Siti di campionamento

Le acque da testare con i saggi di Algal Growth Potential sono state prelevate da sei torrenti durante la campagna sperimentale condotta in Sardegna nel marzo 2013. In particolare sono stati studiati otto tra i dieci siti considerati per gli esperimenti in campo finalizzati alla valutazione della capacità di ritenzione dei nutrienti dei corpi d'acqua, come descritto in: Balestrini et al., 2013 (Ciclo dei nutrienti e stato ecologico buono: proposta di nuove misure basate sulle caratteristiche di habitat e idromorfologiche locali degli ambienti acquatici e possibilità di up-scaling).

Nella Tab. 1 sono elencati i siti di prelievo individuati lungo i torrenti, unitamente alle relative coordinate geografiche e alle sigle adottate nei test algali

Tab. 1 - Siti di prelievo lungo i sei torrenti sardi, relative coordinate geografiche e sigle dei campioni.

Torrenti	Siti	Latitudine	Longitudine	Sigle campioni test
Campu E'Spina	Monte culvert	40°02'45.80"N	09°30'58.10"E	Campuespina M
Cialdeniddu	Cialdeniddu	41°07'02.17"N	09°13'03.90"E	Cialdeniddu
Monte Pecore	Monte Pecore	39°56'28.60"N	09°34'47.10"E	Monte Pecore
Tricarai	Reference	39°57'10.27"N	09°36'12.79"E	Tricarai Ref
Barrastoni	Monte ponte	41°06'36.64"N	09°13'43.83"E	Barrastoni M
	Valle ponte	41°07'15.91"N	09°13'30.60"E	Barrastoni V
Pantaleo	Monte	41°02'05.28"N	09°26'51.37"E	Pantaleo M
	Valle	41°02'03.78"N	09°26'30.95"E	Pantaleo V

Tutti i torrenti, localizzati tra le province di Olbia-Tempio e dell'Ogliastra, sono tipicamente a regime temporaneo. La maggior parte dei siti indagati sono descritti in modo più dettagliato in: Erba et al., 2010 (Pd2 - Tipizzazione e condizioni di riferimento in alcuni bacini fluviali

italiani: approcci, metodi e selezione delle aree di studio), Erba et al., 2011 (I1d1 - Aree di studio, siti e strategie di campionamento, difficoltà complessive e sintesi dei principali risultati), Balestrini et al., 2012 (I2d1 - Fiumi: Caratterizzazione fisico-chimica e idromorfologica dei siti studiati).

### 2.2 Condizione dei test algali

#### *Alga test Selenastrum capricornutum*

Come raccomandato dalle metodiche internazionali (EPA, 1978), la specie algale utilizzata come organismo test è la cloroficea *Pseudokirchneriella subcapitata*, più conosciuta come *Selenastrum capricornutum* (Fig. 1). In particolare è stato utilizzato il ceppo algale IRSA-Se 1, mantenuto in coltura nell'algoteca IRSA di Brugherio.

*S. capricornutum* è una specie planctonica, isolata agli inizi del '900 dalle acque nord europee dal Norwegian Institute for Water Research (NIVA) (Printz, 1914) ed utilizzata con successo nei biosaggi in Europa ancora prima della messa a punto del procollo standard dell'EPA statunitense.

È un organismo test ideale grazie alla caratteristica di essere una specie unicellulare, quindi facilmente contabile al contatore elettronico di particelle.



Fig. 1 - Morfologia caratteristica a mezzaluna della cloroficea *Selenastrum capricornutum*

Ha una fisiologia ben conosciuta ed una morfologia stabile, ed è facilmente coltivabile in laboratorio. Infine, il protocollo sperimentale è altamente standardizzato e questo garantisce una buona confrontabilità e ripetibilità delle risposte a livello internazionale.

#### *Allestimento dei test*

La conduzione del saggio AGP ha previsto un quadro sperimentale suddiviso in due fasi, come rappresentato nello schema di Figura 2. Nella prima fase, finalizzata alla caratterizzazione trofica delle acque, sono stati testati i campioni naturali prelevati dagli 8 siti fluviali, nel seguito denominati "Originali". Nella seconda fase sono state testate le acque fluviali a seguito dei trattamenti di arricchimento in N ammoniacale e P ortofosfato effettuati in campo, lungo un tratto fluviale di 100 metri, secondo le procedure previste dalle parallele attività per le misure di ritenzione dei nutrienti nei fiumi (Mulholland et al., 1990; Dodds et al., 2000; Payn et al., 2005; Arese et al., 2010). In questo caso il saggio

algale è stato utilizzato proprio per valutare sia gli effetti degli arricchimenti in campo sulla trofia delle acque, sia l'efficacia dei trattamenti stessi. Per il test sono stati utilizzati i campioni arricchiti prelevati a completa miscelazione dei nutrienti aggiunti. I campioni testati nella seconda fase saranno nel seguito denominati "Arricchiti in campo".

Tutti i campioni, sia Originali che Arricchiti in campo, sono stati filtrati con filtri a maglia 0.45 μm, per rimuovere le specie algali indigene e per eliminare qualsiasi contaminante biologico eventualmente presente che potrebbe invalidare le risposte di crescita dell'organismo test.

Nella fase 1, i campioni filtrati sono stati saggiati come non trattati (n.t.) per la determinazione del potenziale trofico delle acque. Su una parte dei campioni filtrati, per lo studio della limitazione nutrizionale, sono stati effettuati, in laboratorio, trattamenti di aggiunta di P, in forma di ortofosfato, totalmente biodisponibile, alla concentrazione di 50μg/L (+P).

Nella fase 2 sono stati testati 5 torrenti "Arricchiti in campo". In questo caso, i campioni filtrati (n.t.), sono stati testati parallelamente ai campioni trattati oltre che con aggiunta di P, anche con aggiunte singole di N, in forma di nitrato, rispettivamente alla concentrazione di 50μg/L (+P) e di 1 mg/L (+N).

Oltre agli spikes singoli, su due campioni selezionati, Barrastoni M e Tricarai Ref, sono state fatte anche aggiunte combinate dei due elementi (+NP) alle medesime concentrazioni di 50μg/L e 1 mg/L.

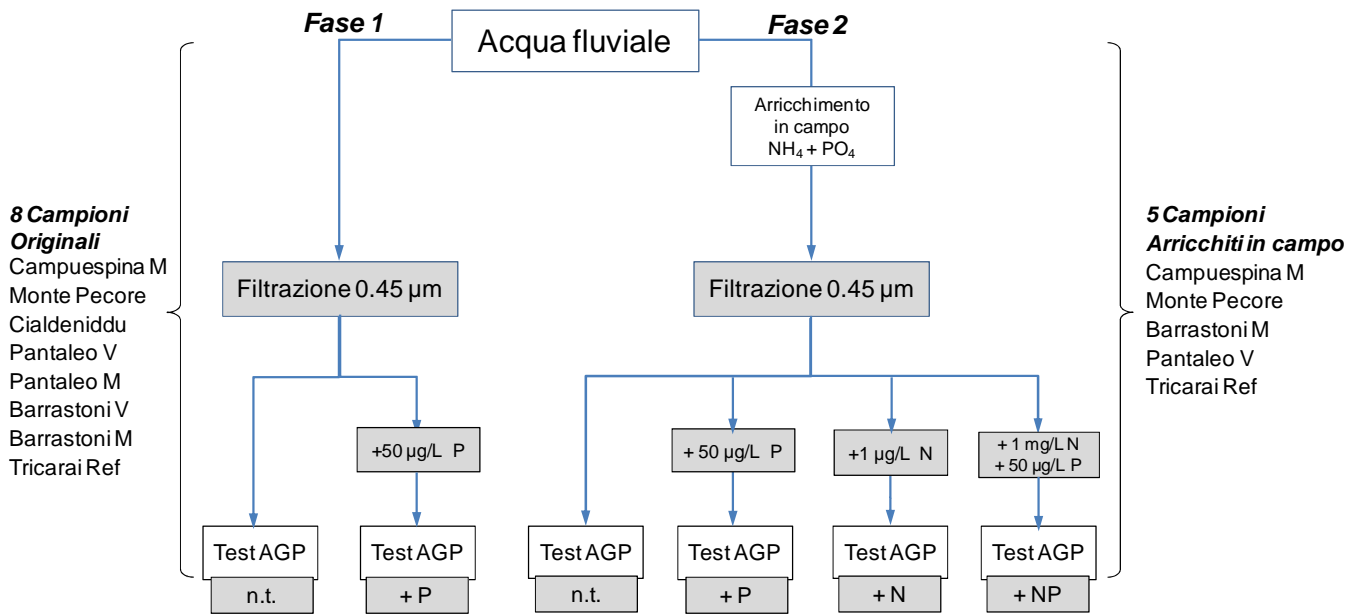


Fig. 2 - Disegno sperimentale adottato per i test di Algal Growth Potential. Le caselle a sfondo grigio indicano i trattamenti del campione effettuati in laboratorio e le sigle dei relativi sub-campioni ottenuti.

Come controllo del potenziale sviluppo in assenza di limitazione nutrizionale, sono stati parallelamente testati due mezzi colturali standard preparati alle stesse concentrazioni di P e di N utilizzate per gli spikes nei campioni fluviali.

Un'aliquota di sospensione algale (10,000 cell/mL), proveniente da una coltura madre di *Selenastrum capricornutum* appositamente preparata in modo che la cellule fossero prive di riserve nutrizionali intracellulari, è stata inoculata in tutti i campioni non trattati, trattati con gli spikes e nei controlli, tutti preparati in tre repliche. L'inoculo è stato effettuato anche in un campione bianco (acqua "ultrapure" filtrata a 0,22 µm tamponata con NaHCO<sub>3</sub>), la cui funzione è quella di fornire una verifica che le alghe inoculate abbiano esaurito le loro sostanze di riserva; normalmente si osserva una crescita cellulare minima che raramente eccede il doppio dell'inoculo iniziale. Il valore di densità cellulare misurato nel bianco è stato sottratto come "background" al valore di densità massima sviluppata da ogni campione, in modo

da esprimere il reale potenziale trofico del campione stesso.

I campioni sono stati quindi incubati in condizioni controllate di temperatura (22±1 °C), luce (4000 lux) ed agitazione continua (100 o.p.m.), per tutto il tempo necessario al completamento della crescita.

#### Parametri di misura della crescita algale

Tra i parametri di misura della crescita algale l'EPA impone il peso secco della biomassa espresso in mg/L. Viene escluso invece il parametro della velocità di duplicazione cellulare misurata in fase esponenziale, in quanto solo indirettamente legata alle concentrazioni di nutrienti nel mezzo colturale. Alcuni Autori hanno utilizzato questo parametro per valutare la trofia di acque costiere (Vukić Lušić et al., 2008). Tuttavia, a differenza della biomassa massima, che permette di studiare la limitazione nutrizionale nel senso più classico del termine, cioè secondo la legge di Liebig, la misura della velocità di

crescita consente di studiare solo la cinetica della limitazione nutrizionale (Nyholm & Lyngby, 1988; Beardall et al., 2001).

Per la misura della biomassa, il metodo gravimetrico è considerato quello più preciso. Tuttavia, data la laboriosità ed i tempi lunghi che comporta questa procedura, sono ugualmente accettati metodi indiretti, che prevedono la misura di un parametro alternativo trasformato in biomassa attraverso fattori di conversione (BCF). In particolare il conteggio cellulare mediante analizzatore elettronico di particelle è ritenuto il metodo più sensibile ed anche il più veloce (ASTM, 2001).

La definizione del BCF, che è specie specifico, deve essere fatta mediante calibrazione del numero e del volume cellulare con le misure gravimetriche della biomassa. Il peso specifico cellulare ottenuto è utilizzato per calcolare indirettamente la biomassa, garantendo un valore più realistico, che non si otterrebbe per esempio se si considerasse solo il numero di cellule, in quanto le dimensioni cellulari presentano differenze significative nelle diverse fasi di crescita. L'utilizzo della biomassa quale parametro di crescita è quindi una condizione indispensabile per garantire la confrontabilità interspecifica dei risultati di resa per unità di supporto nutrizionale, soprattutto nel caso di valutazioni parallele su alghe che presentino dimensioni cellulari molto differenti.

Su tutti i campioni saggiati quindi, sono stati misurati quotidianamente la densità cellulare ed il biovolume, mediante analizzatore elettronico di particelle Multisizer 3 – Beckman Coulter, per 14 giorni o comunque fino al raggiungimento del livello massimo, Maximum Standing Crop (MSC), identificato con un incremento della crescita minore del 5% al giorno.

Mediante i fattori di conversione determinati per il ceppo Sele IRSA-1, è stato quindi calcolato il peso secco della biomassa algale massima, espresso in mg/L, corrispondente alla produttività potenziale delle acque saggiate.

Come previsto dal protocollo EPA, tutte le risposte di crescita sono state analizzate statisticamente per valutare il livello di significatività delle differenze. Nel documento EPA è' riportato il coefficiente di variazione (C.V.) per MSC ottenuti in 685 tests, con tre repliche per ciascuno, per una produzione che variava da un minimo di 0,01 mg ad un massimo di 130 mg di peso secco. Il C.V. decresce all'aumentare degli MSC. Le seguenti percentuali di variazione vengono proposte dall'EPA per verificare la significatività di una differenza tra repliche o tra trattamenti:

- ± 50% per MSC <1 mg peso secco
- ± 30% per 1 < MSC < 3 mg peso secco
- ± 20% per 3 < MSC < 10 mg peso secco
- ± 10% per MSC > 10 mg peso secco

L'utilizzo del peso secco della biomassa ha permesso di confrontare il potenziale trofico dei campioni saggiati e di classificare le acque dei torrenti sulla base dei livelli di produttività definiti dall'EPA (Tab. 2).

Tab. 2 - Classi di produttività proposte sulla base dei valori massimi di biomassa algale sviluppata (EPA, 1978).

Produttività	mg/L
bassa	0 - 0.1
moderata	0.11 - 0.8
moderato-alta	0.81 - 6
alta	6.1 - 20
molto alta	> 20

L'utilizzo della produttività potenziale per una classificazione trofica delle acque, proprio perché basata sulla reale biodisponibilità dei nutrienti, risulta essere il più rappresentativo rispetto ad altri parametri chimico-fisici (e.g. concentrazione totale dei N o P, trasparenza,

clorofilla a) generalmente utilizzati per descrivere lo stato trofico dei corpi d'acqua.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Crescite algali nei campioni fluviali Originali

I risultati relativi alla prima fase sperimentale sono riportati nelle Figure 3 e 4, che rappresentano rispettivamente le curve di crescita ottenute mediante conteggio cellulare quotidiano su tutti i campioni originali non trattati e sugli stessi campioni parallelamente addizionati in P in laboratorio. Per favorirne la leggibilità, in entrambe le Figure, i valori di densità cellulare sono riportati, in ordinata, su scala logaritmica.

Si può notare come tutti i campioni Originali non trattati (Fig. 3) raggiungano la fase di

crescita stazionaria tra 4 e 5 giorni, e completino la crescita entro 7 giorni di incubazione. Solamente per i due campioni Monte Pecore e Tricarai Ref sono stati necessari 12 giorni di incubazione. La densità cellulare massima sviluppata nel campione "bianco" è risultata di sole 15,000 cell/mL, a conferma della scarsa riserva nutrizionale delle cellule inoculate, che assicura una più accurata stima del reale stato trofico delle acque testate. I valori di MSC dei campioni, tutti più alti del bianco, sono risultati compresi entro un intervallo ristretto tra 31,000 e 54,000 cell/mL, misurati rispettivamente nel Pantaleo V e nel Tricarai Ref. Si differenzia solo il torrente Monte Pecore, che invece ha sviluppato densità cellulari di un ordine di grandezza superiori (ca. 620,000 cell/mL) rispetto al resto dei campioni.

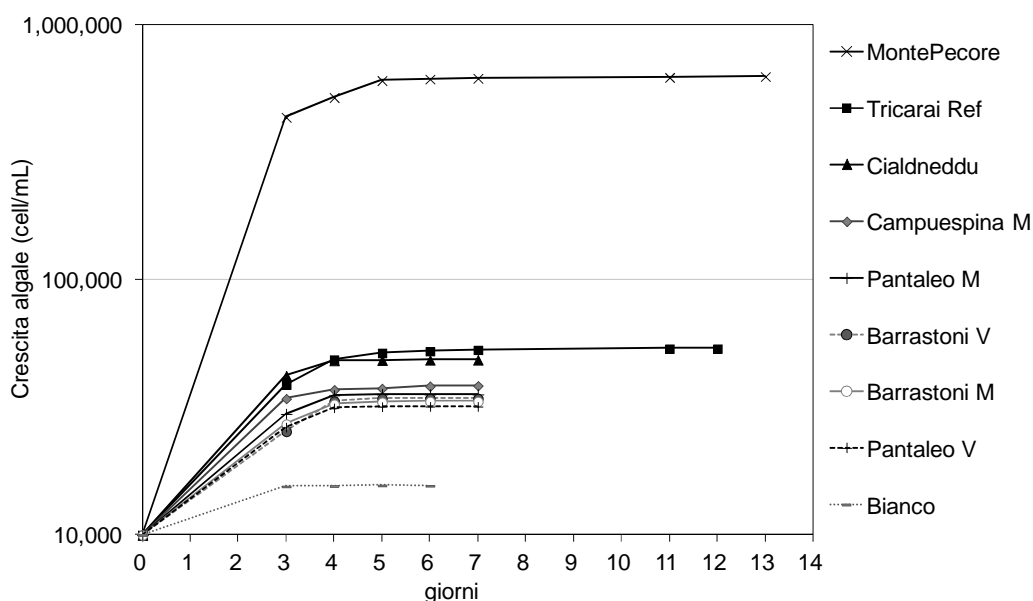


Fig. 3 - Monitoraggio delle crescite algali (cell/mL) negli otto campioni "Originali" non trattati.

Nella seguente Fig. 4 sono riportate le curve di crescita degli stessi otto campioni trattati in laboratorio con aggiunta sperimentale di P,

unitamente a quella del controllo in mezzo standard (50P in Figura). Dal confronto con la precedente Fig.3, si può osservare in tutti i casi

un sensibile incremento delle densità cellulari massime raggiunte a fine crescita, in risposta

all'aggiunta di P.

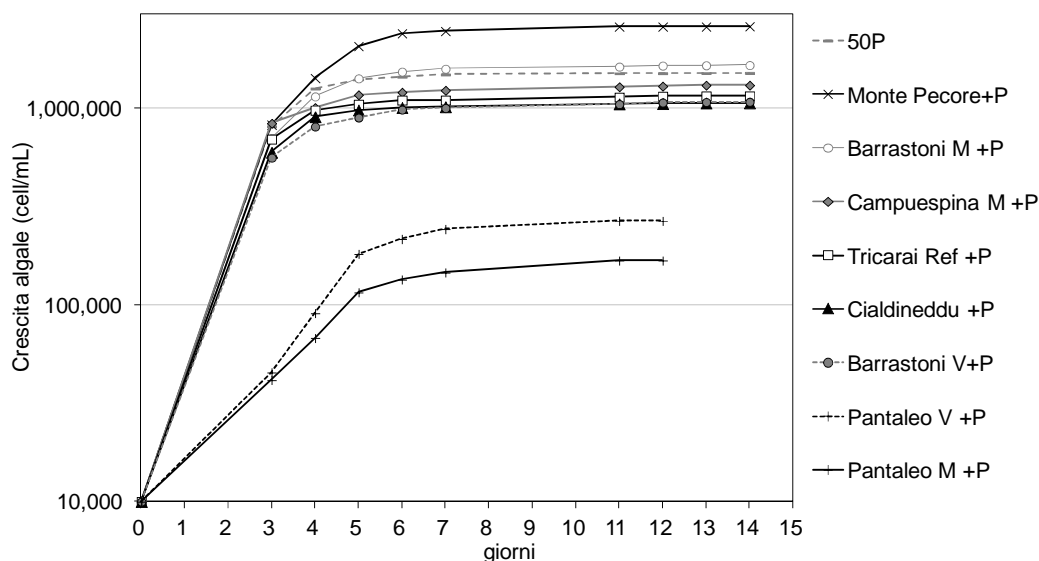


Fig. 4 - Monitoraggio delle crescite algali (cell/mL) negli otto campioni "Originali" addizionati con P in lab

### 3.2 Crescite algali nei campioni fluviali Arricchiti in campo

I risultati della misura delle crescite algali relativi alla seconda fase sperimentale, condotta sui campioni acquosi trattati in campo con aggiunte di sali di ammonio e di P, sono riportati nelle Fig. 5-9. Sono in particolare confrontate le crescite algali dei campioni filtrati rispetto a quelle degli stessi campioni addizionati in laboratorio con spikes di P ortofosfato e N nitrico. In tutti i casi si osservano chiare risposte di crescita a seguito degli spikes effettuati in laboratorio. In particolare, i tre campioni Monte Pecore (Fig.5), Campuespina M (Fig. 6) e Pantaleo V (Fig. 7) sembrano rispondere meglio al trattamento singolo di aggiunta di N, con incrementi della crescita algale rispettivamente di 1.5, 3 e 7 volte rispetto al non trattato.

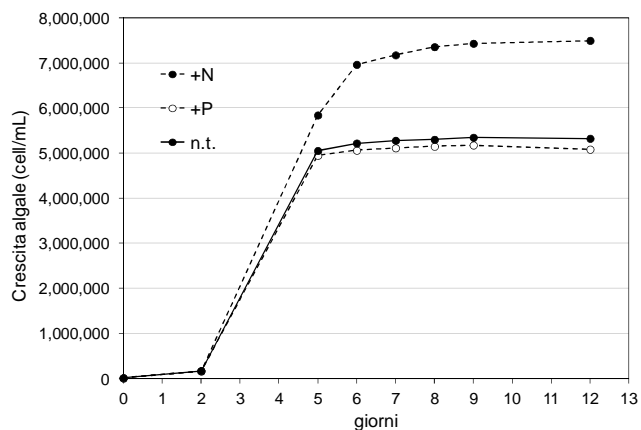


Fig. 5 - Crescite algali misurate nel campione Monte Pecore in risposta agli spikes di fosforo (+P) e di azoto (+N).

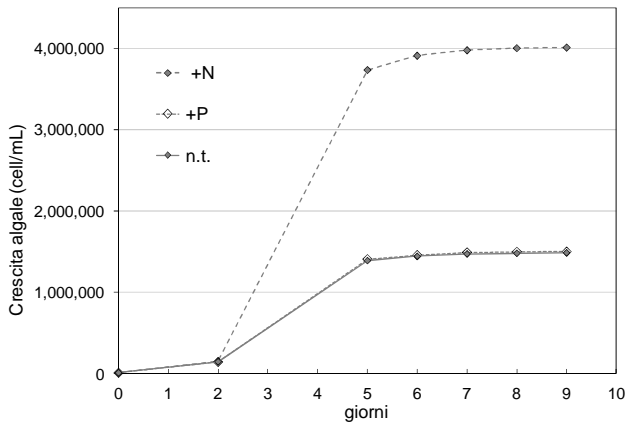


Fig. 6 - Crescite algali misurate nel campione Campuespina M in risposta agli spikes di fosforo (+P) e di azoto (+N).

Al contrario, in tutti e tre i casi, la curva di crescita del campione +P risulta sovrapposta a quella del campione n.t., indicando una totale assenza di risposte di crescita alle ulteriori aggiunte di P in laboratorio, oltre a quelle già effettuate in campo.

Risposte più differenziate sono state osservate invece nei due campioni Barrastoni M (Fig. 8) e Tricarai Ref (Fig. 9).

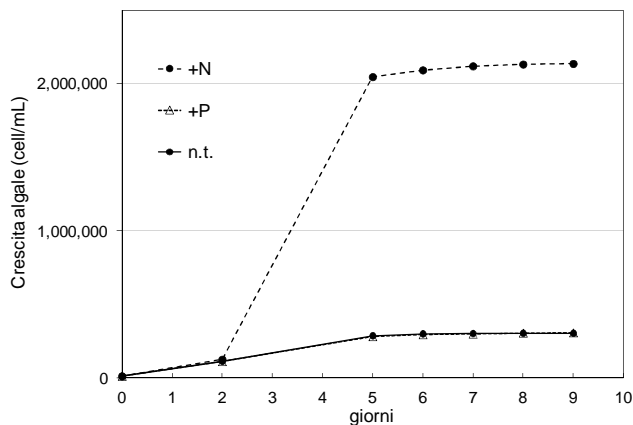


Fig. 7 - Crescite algali misurate nel campione Pantaleo V in risposta agli spikes di fosforo (+P) e di azoto (+N).

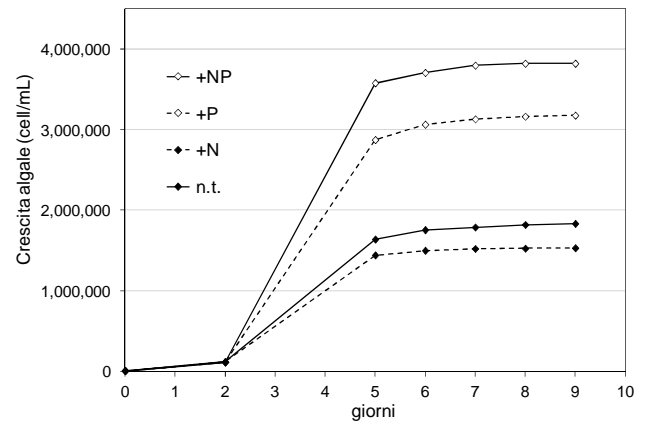


Fig. 8 - Crescite algali misurate nel campione Barrastoni M in risposta agli spikes singoli, (+P) e (+N), e combinati (+NP) di fosforo e di azoto.

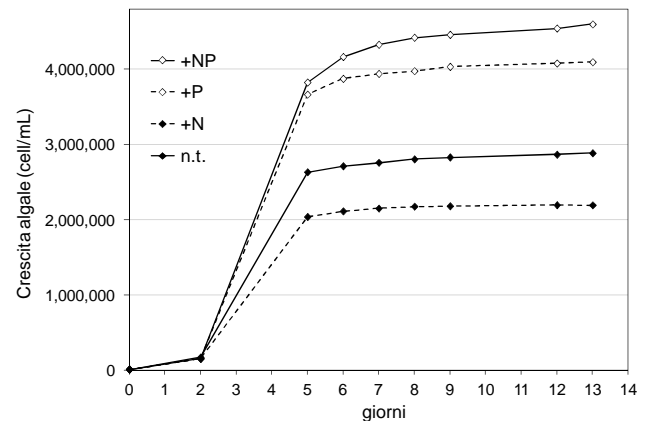


Fig. 9 - Crescite algali misurate nel campione Tricarai Ref in risposta agli spikes singoli, (+P) e (+N), e combinati (+NP) di fosforo e di azoto.

In entrambi i casi si osserva un incremento delle crescite a seguito dell'aggiunta singola di P, ed un ulteriore incremento per effetto dell'aggiunta combinata dei due nutrienti P e N, suggerendo l'interazione tra i due elementi nel regolare la crescita massima di *S. capricornutum*.

Oltre che numero di cellule, proprio su questi due campioni, è importante sottolineare che sono state osservate significative differenze anche nel volume cellulare. In particolare, in entrambi i casi, nei trattamenti +P e +N, sono stati misurati volumi cellulari rispettivamente più bassi e più alti rispetto al non trattato. È stato indispensabile quindi esprimere tutti i risultati del saggio di AGP come peso secco

della biomassa, in modo da integrare i due parametri del numero e del volume cellulare e fornire una reale rappresentazione del potenziale trofico di tutti i campioni saggiati. Nei paragrafi seguenti tutti i risultati relativi alla caratterizzazione trofica dei campioni, oltre che allo studio di limitazione nutrizionale, sono espressi in peso secco della biomassa algale.

### 3.3 Caratterizzazione trofica e limitazione nutrizionale

La determinazione del potenziale di crescita algale (AGP), effettuata sui campioni originali non trattati, ha permesso di valutare la produttività potenziale delle acque degli otto campioni fluviali. Sulla base dei valori di AGP espressi come peso secco della biomassa (mg/L) prodotta dai campioni, le acque fluviali sono state classificate secondo i livelli trofici proposti dall'EPA (vedi Tab. 4) come illustrato nella Figura 10.

La produttività potenziale dei torrenti è risultata sempre inferiore a 1 mg/L, con valori compresi tra un minimo di 0.46 mg/L misurato

nel Pantaleo V ed un massimo di 0.77 mg/L nel Tricarai Ref. Fa eccezione il torrente Monte Pecore, dove sono stati raggiunti livelli significativamente più elevati di biomassa, prossimi a 14 mg/L. Per tutti i valori è rappresentata anche la barra di errore, corrispondente alla variabilità percentuale tra repliche, risultata sempre abbondantemente inferiore al 5%. Solo i tre campioni Tricarai Ref, Cialdeniddu e Monte Pecore sono risultati significativamente differenti.

In tutti i casi, secondo la classificazione trofica EPA, le acque sono risultate caratterizzate da livelli di produttività moderata, con l'unica eccezione del torrente Monte Pecore che invece rientra nella classe di produttività alta. Inoltre, sulla base dei valori di P utilizzato, quindi biodisponibile, per supportare la biomassa sviluppata nei campioni, le acque sono risultate tutte ultraoligotrofiche, ad eccezione delle acque del Monte Pecore risultate mesotrofiche, secondo le classi basate sul P totale, definite dall'OECD (OECD, 1982).

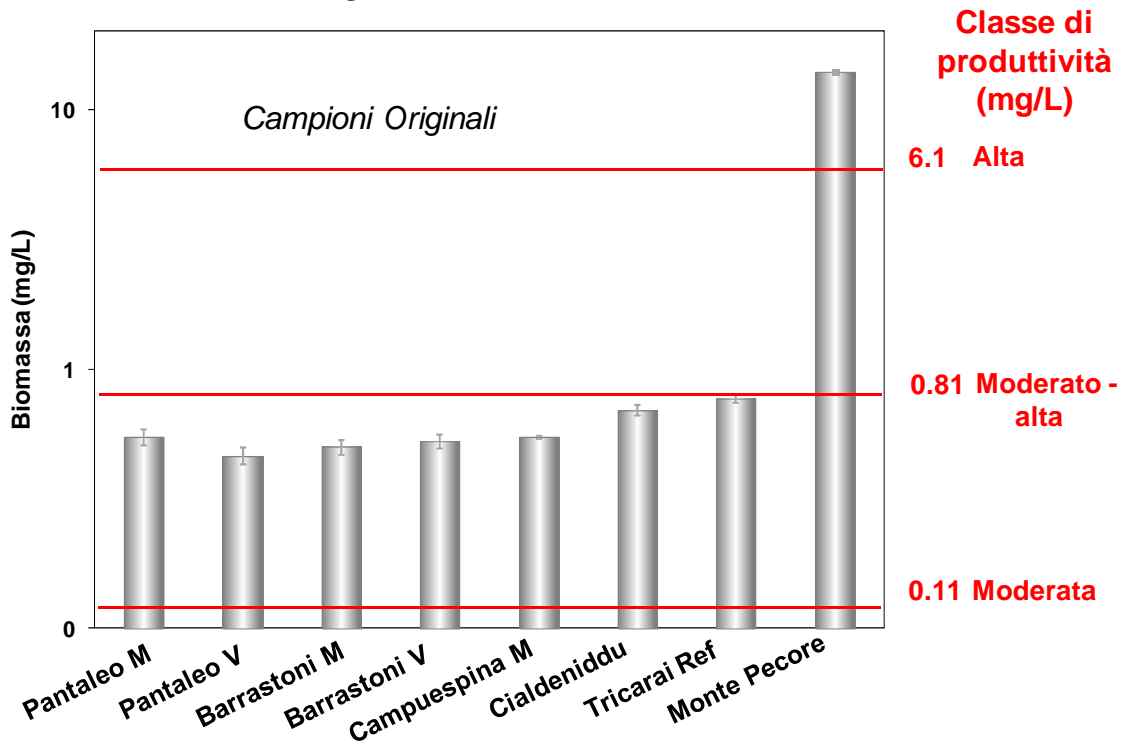


Fig. 10 - Caratterizzazione trofica delle acque dei torrenti sardi originali non trattati.



L'analisi dei risultati del saggio AGP, basato sulla misura sperimentale della biodisponibilità dei nutrienti, ad integrazione della determinazione analitica degli stessi, ha permesso di individuare ed approfondire il ruolo dei possibili fattori di controllo della trofia sulle acque fluviali indagate.

Nella Figura 11 sono riportate le risposte agli arricchimenti in P effettuati in laboratorio su tutti i campioni Originali prelevati nelle otto stazioni considerate. Gli incrementi di biomassa in risposta allo spike di P, mostrati in Figura, indicano una situazione di intensa P-limitazione in tutti i torrenti.

Si può notare come, a parità di concentrazione di P addizionato, l'incremento dei valori di biomassa sviluppata in tutti i campioni

raggiunge livelli molto simili, che si approssimano a quelli misurati nel controllo in acqua standard (non rappresentato in Figura). Questo a dimostrazione del fatto che tutto il P sperimentalmente addizionato sia stato completamente utilizzato e che in tutti i torrenti era presente una quantità sufficiente di N per garantirne il consumo.

Anche i due campioni Pantaleo monte e valle, pur raggiungendo livelli di biomassa inferiori, sono risultati P limitati. In questi due casi, i bassi livelli di biomassa supportati possono essere spiegati dalla presenza di basse concentrazioni di N nei campioni originali (0.02 e 0.01 mg/L TIN misurati rispettivamente nel Pantaleo monte e valle), non sufficienti per garantire un maggiore consumo di P.

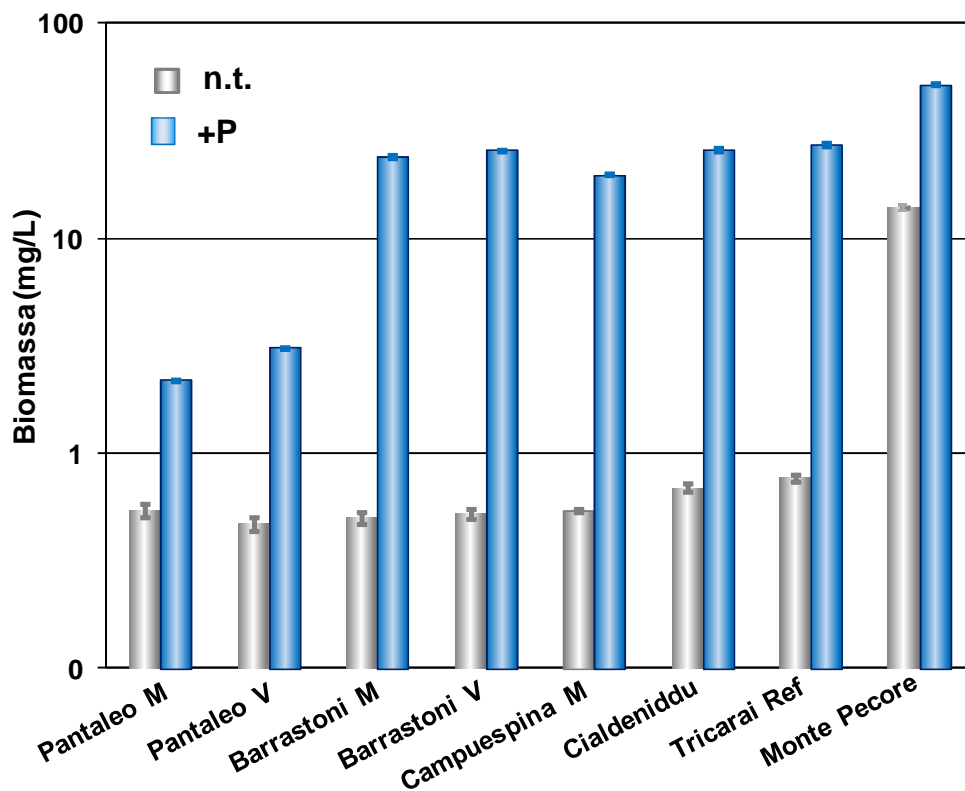


Fig. 11 - Risposte agli spikes singoli di fosforo (+P) misurate nelle acque dei torrenti sardi.

### 3.4 Effetto degli arricchimenti in campo

L'arricchimento nutrizionale effettuato in campo sui 5 torrenti selezionati ha prodotto

significative variazioni della produttività in tutti i campioni, come illustrato nella Figura 12.

In tutti i campioni considerati il livello trofico è aumentato in modo significativo, da circa 6 volte nel Monte Pecore, a 11 volte nel Pantaleo

V, a 43 volte nel campione Campuespina M, fino a 65 ed 80 volte rispettivamente nei torrenti Tricarai Ref e Barrastoni M. In particolare, nel Pantaleo V si è osservato il salto di una classe di produttività, da moderata a moderato alta.

Nei campioni Campuespina M, Barrastoni M e Tricarai Ref l'arricchimento nutrizionale ha determinato il salto di ben due livelli trofici, da moderato ad alto. Anche nel torrente Monte

Pecore, che già allo stato originale rientrava nella classe alta, è stato osservato un passaggio di classe, fino a produttività molto alta (83mg/L).

L'effetto dell'arricchimento nutrizionale in campo, oltre a determinare la variazione del livello trofico delle acque come precedentemente descritto, ha prodotto anche una variazione della condizione di limitazione nutrizionale in tutti i campioni.

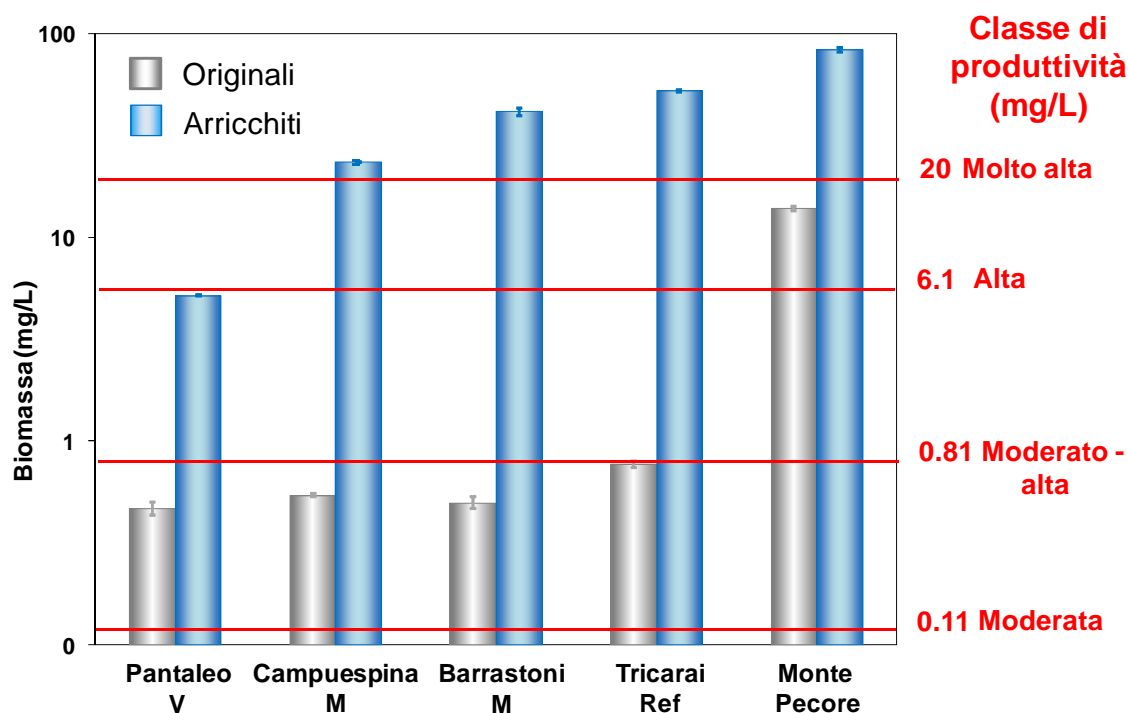


Fig. 12 - Caratterizzazione trofica delle acque dei 5 torrenti "Arricchiti in campo".

Come si può osservare nella Figura 13 infatti, nei campioni Pantaleo V, Campuespina M e Monte Pecore, solo lo spike di N ha determinato un forte incremento della biomassa rispetto al campione non trattato, mentre l'aggiunta di P in laboratorio non ha provocato alcuna variazione.

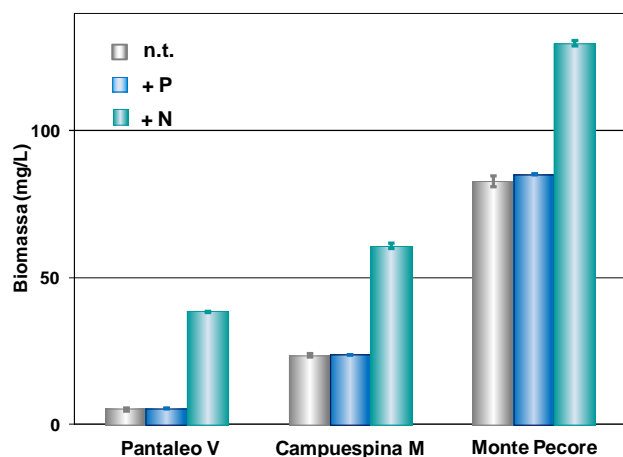


Fig. 13 - Risposte agli spikes singoli di fosforo (+P) e di azoto (+N) misurate nei campioni Pantaleo V, Campuespina M e Monte Pecore.

In particolare, è chiaramente visibile in Figura che la porzione di biomassa addizionale misurata nei trattamenti +N sia molto simile nei 3 campioni, con una media di 38.5 mg/L (12.5 CV%).

Tale valore risulta non significativamente diverso da quelli attesi sulla base della biomassa sviluppata nel controllo (5.2 CV%). Questo dimostra la intensa N-limitazione raggiunta dalle acque a seguito degli arricchimenti nutrizionali effettuati in campo. Nei campioni arricchiti era presente una quantità sufficiente di P tale da garantire il completo consumo dell'N addizionato in laboratorio.

A differenza dei precedenti, nei campioni Barrastoni M e Tricarai Ref le aggiunte singole di N non hanno determinato alcun effetto sull'incremento di biomassa rispetto al non trattato (Fig. 14).

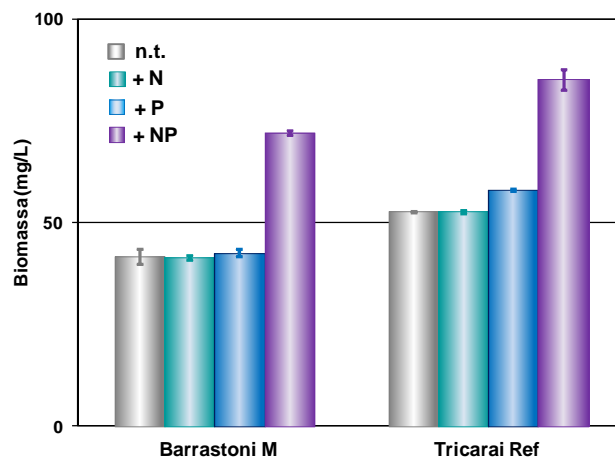


Fig. 14 - Risposte agli spikes singoli di fosforo (+P) e di azoto (+N) e combinati (+NP), misurate nei campioni Barrastoni M e Tricarai Ref.

In entrambi i casi infatti, i coefficienti di variazione calcolati tra i valori di biomassa dei campioni n.t. e +N, sono risultati inferiori allo 0.4%.

A differenza di quanto osservato dalle risposte di crescita basate solo sul numero di cellule nel paragrafo 3.2, dai dati espressi come peso secco della biomassa risulta che anche lo spike di P non ha determinato significative variazioni rispetto al non trattato. Solamente nel campione Tricarai Ref è stato osservato un leggero aumento a seguito dell'aggiunta singola di P.

In entrambi i campioni invece, è stato misurato un significativo ed elevato incremento della biomassa come conseguenza delle aggiunte combinate di N e P, a prova di una condizione di co-limitazione determinata dagli arricchimenti nutrizionali in campo.

### 3.5 Studio della biodisponibilità nutrizionale

L'analisi dell'utilizzo dei nutrienti effettuata sulla base delle rese in biomassa per unità di supporto nutrizionale specifiche per *S.capricornutum*, ha consentito di valutare su tutti i campioni "Arricchiti in campo" la

porzione di P e di N, rispetto alla quantità totale aggiunta in campo, potenzialmente utilizzabile per la crescita algale. Nella Fig. 15 è riportato il confronto delle concentrazioni analitiche di P rispetto alle quantità utilizzate nei 5 campioni.

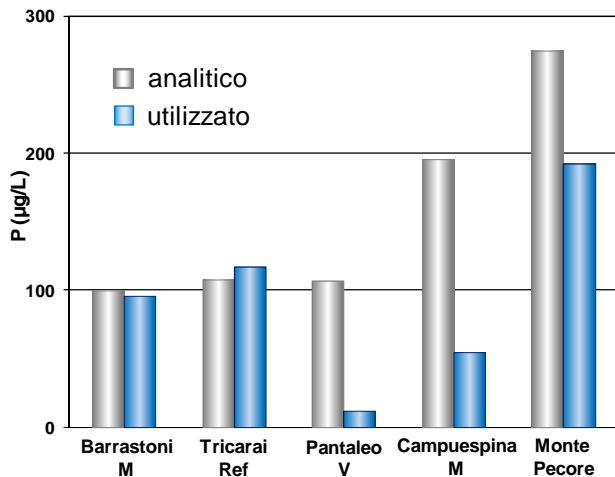


Fig. 15 - Confronto tra concentrazioni analitiche e quantità di P utilizzate nelle acque dei 5 torrenti.

È possibile osservare che nei due campioni Barrastoni M e Tricarai Ref le quantità di P, analitica e utilizzata, coincidano quasi perfettamente, a dimostrazione del fatto che tutto il P aggiunto sia stato completamente utilizzato. Al contrario, nei campioni Pantaleo V, Campuespina M e Monte Pecore, il P utilizzato rappresenta solo una piccola porzione rispetto alla quantità realmente presente. In questi tre torrenti la mancata biodisponibilità di P è attribuibile alla mancanza di una quantità sufficiente di N, che ne permettesse l'utilizzo da parte delle alghe. Nella Figura 16, che riporta il confronto tra quantità di N analitico ed utilizzato per la crescita algale, infatti, si può chiaramente osservare come tutto l'N presente, e determinato analiticamente nei tre campioni, sia stato completamente utilizzato ed esaurito. Le alghe hanno potuto consumare P finché l'assenza di N lo ha reso non biodisponibile.

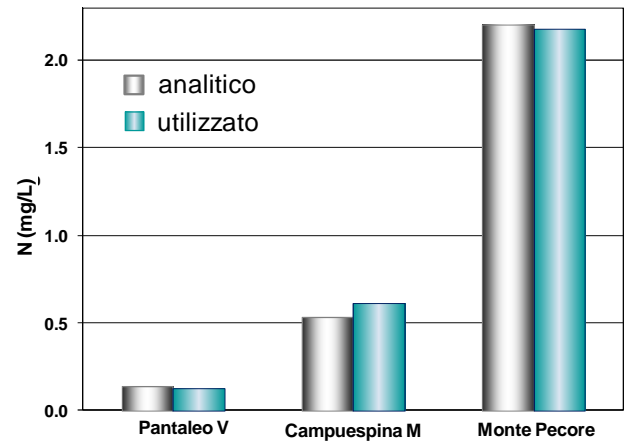


Fig. 16 - Confronto tra concentrazioni analitiche e quantità utilizzate di N nei campioni Pantaleo V, Campuespina M e Monte Pecore.

Gli stessi risultati, relativi alla quantità di nutrienti biodisponibile rispetto alla quantità analizzata, sono riportati nella Tabella 3 in termini di percentuali di utilizzo.

Tab. 3 - Percentuali di utilizzo di N e P nei campioni Arricchiti in campo rispetto alle concentrazioni analizzate.

Campioni Arricchiti	Quantità analitica		Quantità biodisponibile			
	P.PO4 µg/l	TIN mg/l	P Utilizzato µg/l	%	N Utilizzato mg/l	%
Barrastoni M	100	1.16	96	96	1.09	94
Tricarai Ref	108	1.46	117	109	1.33	91
Pantaleo V	107	0.14	11.6	10.8	0.13	91.9
Campuespina M	196	0.54	54	28	0.61	115
Monte Pecore	275	2.20	192	70	2.18	99

Dai valori riportati in Tabella si può osservare che nei due campioni Barrastoni M e Tricarai Ref le percentuali di utilizzo di entrambi gli elementi, P ed N, sono risultate molto prossime al 100%. Questo da una parte conferma la condizione di co-limitazione da P e N, determinata dalle aggiunte nutrizionali in campo e già descritta nel paragrafo precedente. Dall'altra indica che i due elementi

sono stati addizionati in un rapporto ottimale per garantirne il bilanciato utilizzo da parte delle alghe. Benchè la percentuale di utilizzo di N risulti prossima al 100%, anche negli altri 3 campioni, Pantaleo V, Campuespina M e Monte Pecore, la quantità di P biodisponibile risulta inferiore al 100%, in particolare nel Pantaleo V e nel Campuespina M, nei quali si raggiungono valori inferiori al 30%. Tali risultati evidenziano il forte sbilanciamento verso una condizione di N limitazione determinata dall'aggiunta di quantità eccessive di P in campo.

#### 4. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Sulla base delle risposte ottenute dai saggi di Algal Growth Potential sulle acque dei torrenti indagati, è stato rilevato che:

- la produttività delle acque fluviali è risultata in tutti i casi moderata con l'unica eccezione del livello di alta produttività, misurata nelle acque del torrente Monte Pecore;
- il fosforo è stato individuato in tutti i casi il fattore nutrizionale di controllo della produttività delle acque;
- l'arricchimento nutrizionale effettuato in campo ha prodotto variazioni significative di incremento del livello trofico, fino a raggiungere produttività molto alta in tutti i torrenti analizzati, ad esclusione del Pantaleo V, che passa da produttività moderata a moderato-alta;
- quale effetto dell'arricchimento in campo è stato anche rilevato il passaggio da intensa P-limitazione in tutti i casi, a NP-colimitazione in due casi, fino a N-limitazione in tre casi, e tra questi, particolarmente intensa nei due casi dei torrenti Pantaleo V, e Campuespina M.

In generale, è stata rilevata una elevata sensibilità del metodo adottato per caratterizzare lo stato trofico delle acque di tutti i torrenti testati. Tenendo conto di quanto

la limitazione nutrizionale in particolare possa influenzare non solo la biodisponibilità dei differenti nutrienti, ma anche la velocità di assunzione, i risultati di questa indagine sottolineano la scarsa confrontabilità dei torrenti sottoposti ad arricchimento sperimentale per lo studio della capacità di ritenzione dei nutrienti.

#### BIBLIOGRAFIA

ARESE C., BALESTRINI R. & LOTTI A., 2010. Deliverable Pd4. Linee guida e protocolli operativi relativi alle attività di campo per la valutazione della capacità di rimozione dei nutrienti nei fiumi. Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413. 53 pp.

ASTM, 2001. Standard test method for automated analyses of cells - the electrical sensing zone method of enumerating and sizing single cell suspensions. Designation F2149. ASTM International, West Conshohocken.

ASTM, 2004. Practice for Algal Growth Potential Testing with *Selenastrum capricornutum*. Standard D 3978-04. In: Annual Book of Standards. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides, West Conshohocken, PA.

BALESTRINI R., BIAZZI D., CAZZOLA M. & FERRERO T., 2012. Deliverable I2d1. Rapporto tecnico - Caratterizzazione fisico-chimica e idromorfologica dei siti studiati. Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413. 43 pp.

BALESTRINI R., et al., 2013. Ciclo dei nutrienti e stato ecologico buono: proposta di nuove misure basate sulle caratteristiche di habitat e idromorfologiche locali degli ambienti acquatici e possibilità di up-scaling

BEARDALL J., YOUNG E. & ROBERTS S., 2001. Approaches for determining phytoplankton nutrient limitation. *Aquatic Sciences*, 63: 44-69.

- BEHRENDT H., 1993. Point and diffuse loads of selected pollutants in the River Rhein and its main tributaries. International Institute for Applied Systems Analysis (IIASA) working paper, Index No RR-93-001, Laxenburg, Austria.
- BERGE D. & KÄLLQVIST T., 1998. Biological availability of various P-sources studied in different test systems. *Verhandlungen*, 26: 2401-2404.
- BIGGS B.J.F., 2000: Eutrophication of streams and rivers: dissolved nutrient-chlorophyll relationships for benthic algae. *Journal of the North American Benthological Society*, 19: 17-31.
- BOSTRÖM B., PERSSON G. & BROBERG, B., 1988. Bioavailability of different phosphorus forms in freshwater systems. *Hydrobiologia*, 170: 133-155.
- CHIAUDANI G. & VIGHI M., 1974. The N/P ratio and tests with *Selenastrum* to predict eutrophication in lakes. *Water Research*, 8: 1063-1069.
- CONLEY D.J., 2000. Biogeochemical nutrient cycles and nutrient management strategies. *Hydrobiologia*, 410: 87-96.
- DODDS W.K., 2006. Eutrophication and trophic state in rivers and streams. *Limnology and Oceanography*, 51, 671-680.
- DODDS W.K., EVANS-WHITE M.A., GERLANC M.N., GRAY L., GUDDER D.A., KEMP J.J., LOPEZ A.L., STAGLIANO D., STRAUSS E.A., TANK J.L., WHILES M.R. & WOLLHEIM W.M., 2000. Quantification of the nitrogen cycle in a prairie stream. *Ecosystems*, 3: 574-589.
- EKHOLM P. & KROGERUS K., 2003. Determining algal-available phosphorus of differing origin: routine phosphorus analyses versus algal bioassays. *Hydrobiologia*, 492: 29-42.
- EPA, 1971. Algal assay procedures: bottle test. National Eutrophication Research Program, Pacific Northwest Environmental Research Laboratory, Corvallis, Oregon, 82 pp.
- EPA, 1978. The *Selenastrum capricornutum* Printz algal assay bottle test. Experimental design, application and data interpretation protocol, EPA-600/9-78-018, Corvallis, Oregon: 126 pp.
- EPA, 1996. National Nutrient Assessment Workshop. Proceedings, December 1995. (US EPA 822-R-96-004) Office of Water, US Government Printing Office, Washington, D.C
- ERBA S., ARESE C., BALESTRINI R., LOTTI A., MARZIALI L., PINTUS M., CASULA R. CONI M.; FERRERO T., FIORENZA A.; RAVIOLA M., SESIA E. & BUFFAGNI A., 2010. Deliverable Pd2. Tipizzazione e condizioni di riferimento in alcuni bacini fluviali italiani: approcci, metodi e selezione delle aree di studio. Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413. 231 pp.
- ERBA S., DEMARTINI D., BALESTRINI R., CAZZOLA M., TENCHINI R. , FIORENZO A., FERRERO T., CASULA R., PINTUS M. & BUFFAGNI A., 2011. Deliverable I1d1. Aree di studio, siti e strategie di campionamento, difficoltà complessive e sintesi dei principali risultati. Project INHABIT - LIFE08 ENV/IT/000413. 166 pp.
- GREENE J.C., SOLTERO R.A., MILLER W.E., GASPERINO A.F. & SHIROYAMA T., 1976. The relationship of laboratory algal assays to measurements of indigenous phytoplankton in Long Lake, Washington. In: Middlebrooks, E.J., Falkenberg D.H. & Maloney T.E. (Eds), *Biostimulation and nutrient assessment*, Ann Arbor Science, 93-126.
- HA K., KIM H.W. & JOO G.J., 1998: The phytoplankton succession in the lower part of hypertrophic Nakdong River (Mulgum), South Korea. *Hydrobiologia*, 253: 1-11.
- HECKY R.E. & KILAM P., 1988. Nutrient limitation of phytoplankton in freshwater and marine environments: a review of recent evidence on the effects of enrichment. *Limnology and Oceanography*, 33: 796-822.

- HEISKARY S, MARKUS H., 2001: Establishing relationships among nutrient concentrations, phytoplankton abundance, and biochemical oxygen demand in Minnesota, USA, rivers. *Lake Reservoir Management*, 17: 251-262.
- HERSHEY A.E., HILTNER A.L., HULLAR M.A.J., MILLER M.C., VESTAL J.R., LOCK M.A., RUNDLE S., 1988. Nutrient influence on a stream grazer: *Orthocladius* microcommunities respond to nutrient input. *Ecology*, 69: 1383-1392.
- HORNER R.R., WELCH E.B., SEELEY M.R. & JACOBY J.M., 1990. Responses of periphyton to changes in current velocity, suspended sediment and phosphorus concentration. *Freshwater Biology*, 24: 215-232.
- MARCHETTI R., 1987. L'eutrofizzazione Un processo degenerativo delle acque. Franco. Angeli (Ed), Collana Scientifica, Milano, 319 pp.
- MULHOLLAND P.J., STEINMAN A.D. & ELWOOD J.W., 1990. Measurement of phosphorus uptake length in streams: Comparison of radiotracer and stable PO<sub>4</sub> releases. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47: 2351-2357.
- NYHOLM N. & LYNGBY J.E., 1988. Algal bioassays in eutrophication research – a discussion in the framework of a mathematical analysis. *Water Research*, 22: 1293-1300.
- OECD, 1982. Eutrophication of waters: monitoring, assessment and control. OECD, Paris, France, pp. 154.
- PAERL H.W., MALLIN M., RUDEK J. & BATES P., 1990: The potential for eutrophication and nuisance algal blooms in the lower Neuse River, NC. Albemarle-Pamlico Estuarine Study Report 90-15. North Carolina Natural Resources and Community Development, Raleigh, NC.
- PAYN R.A., WEBSTER J.R., MULHOLLAND P.J., VALETT H.M. & DODDS W.K., 2005. Estimation of stream nutrient uptake from nutrient addition experiments. *Limnology and Oceanography: Methods*, 3: 174–182.
- PAYNE A.G., 1976. Application of algal assays procedure in biostimulation and toxicity testing. In: Middlebrooks, E.J., Falkenberg, D.H. & Maloney, T.E. (Eds), *Biostimulation and nutrient assessment*, Ann Arbor Science, 3-28.
- PRINTZ H., 1914. Kristiania traktens Protococcoideer. J. Dybwad (Ed), Matematisk-Natur videnskabelig Klasse, Kristiania, Oslo, 123pp.
- SMITH V.H., TILMAN G.D. & NEKOLA J.C., 1999. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100: 179-196.
- SMITH V.H., 2009. Eutrophication. In: G.E. Likens (Ed), *Encyclopedia of Inland Waters*. Elsevier, Oxford, 61-73.
- TUSSEAU-VUILLEMIN M.E., 2001. Do food processing industries contribute to the eutrophication of aquatic systems?. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50: 143-152.
- VAN STRATEN G., 1998. Models for water quality management: the problem of structural change. *Water Science and Technology*, 37:103-112.
- VOLLENWEIDER R.A., 1968. Scientific fundamentals of lake and stream eutrophication, with particular reference to phosphorus and nitrogen as eutrophication factors. Technical Report DAS/ DSI/68.27, OECD, Paris, France.
- VUKIĆ LUŠIĆ D.V., PERSIC V., HORVA TIC J., VILICIC D., TRAVEN L., DAKOVAC T., MICOVIC V., 2008. Assessment of nutrient limitation in Rijeka Bay, NE Adriatic Sea, using miniaturized bioassay. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 358: 46-56.