



**ISPRA**

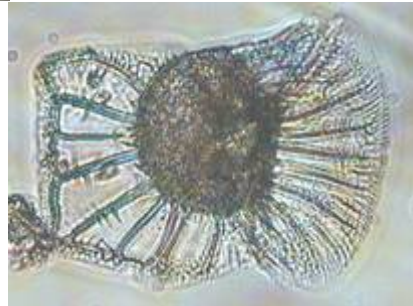
Istituto Superiore per la Protezione  
e la Ricerca Ambientale



**UNIVERSITÀ DEL SALENTO**

# **NUOVI APPROCCI METODOLOGICI PER LA CLASSIFICAZIONE DELLO STATO DI QUALITÀ DEGLI ECOSISTEMI ACQUATICI DI TRANSIZIONE**

---



**Metodologie per la determinazione della  
struttura dimensionale di fitoplancton e  
macroinvertebrati bentonici**

---

LABORATORIO DI ECOLOGIA – UNIVERSITÀ DEL SALENTO

ISPRA  
Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca  
Ambientale

**Metodologie per la determinazione della  
struttura dimensionale di fitoplancton e  
macroinvertebrati bentonici**

*A cura di:* A. Basset, F. Sangiorgio, L. Sabetta

Laboratorio di Ecologia, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed  
Ambientali, Università del Salento - Lecce

## **INFORMAZIONI LEGALI**

L'istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale (ISPRA) e le persone che agiscono per conto dell'Istituto non sono responsabili per l'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo Rapporto.

La Legge 133/2008 di conversione, con modificazioni, del Decreto Legge 25 giugno 2008, n. 112, pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale n. 195 del 21 agosto 2008, ha istituito l'ISPRA - Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale. L'ISPRA svolge le funzioni che erano proprie dell'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (ex APAT), dell'Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica (ex INFS) e dell'Istituto Centrale per la Ricerca scientifica e tecnologica Applicata al Mare (ex ICRAM). La presente pubblicazione fa riferimento ad attività svolte in un periodo antecedente l'accorpamento delle tre Istituzioni e quindi riporta ancora, al suo interno, richiami e denominazioni relativi ai tre Enti soppressi.

**ISPRA** – Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale  
Via Vitaliano Brancati, 48  
00144 Roma  
www.apat.gov.it  
ISPRA, 01/2009

**Laboratorio di Ecologia** – Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali,  
Università del Salento  
SP. Lecce-Monteroni  
73100 Lecce

ISBN 978-88-448-0379-7

Riproduzione autorizzata citando la fonte

**Elaborazione grafica**  
ISPRA

**Grafica di copertina:** Franca Sangiorgio

**Foto di copertina:** Alto: *Dictyocha* sp., E. Stanca; *Lekanesphaera hookeri* (Leach), S. Maci;  
Centro: *Asellus aquaticus* (Linneo), E. Barbone; *Ornithocercus* sp., A. Fiocca; *Gammarus* sp., A. Calimero; Basso: *Bithynia tentaculata* (Linneo), I. Rosati; *Cladopyxis* sp., A. Fiocca.

**Coordinamento tipografico:**  
Daria Mazzella e Simonetta Turco  
**ISPRA** - Settore Editoria

**Amministrazione:**  
Olimpia Girolamo  
**ISPRA** - Settore Editoria

**Distribuzione:**  
Michelina Porcarelli  
**ISPRA** - Settore Editoria

**FEBBRAIO 2009**

Questo manuale è un prodotto del Progetto ISPRA (ex APAT)/MATT PR1/A “*Metodologie per il rilevamento e la classificazione dello stato di qualità ecologico e chimico delle acque, con particolare riferimento all’applicazione del decreto legislativo 152*” che è stato realizzato con il coordinamento di Claudio Fabiani, Gianna Casazza e Cecilia Silvestri.

## INDICE GENERALE

### PRESENTAZIONE

*A cura di:* G. Boeri

### PREMESSA

*A cura di:* A. Basset

### CAPITOLO 1 – FITOPLANCTON

*A cura di:* A. Fiocca, M. R. Vadrucci

- |   |         |
|---|---------|
| <b>1.1</b> Introduzione   | pag. 1  |
| <b>1.2</b> Campionamento del fitoplancton   | pag. 9  |
| 1.2.1 Campionamento con retino  |         |
| 1.2.2 Campionamento con bottiglia di profondità   |         |
| 1.2.3 Altri campionatori per il fitoplancton  |         |
| <b>1.3</b> Conservazione e fissazione dei campioni di fitoplancton  | pag. 16 |
| 1.3.1 Tipi di fissativi utilizzati: vantaggi e svantaggi  |         |
| 1.3.2 Campioni non fissati  |         |
| <b>1.4</b> Preparazione dei campioni per la lettura al microscopio  | pag. 20 |
| 1.4.1 Metodo di Utermöhl  |         |
| 1.4.2 Allestimento delle camere di sedimentazione   |         |
| <b>1.5</b> Analisi microscopica dei campioni  | pag. 25 |
| 1.5.1 Aspetti preliminari dell'analisi microscopica dei campioni  |         |
| - Ingrandimento   |         |
| - Scelta della dimensione del campione  |         |
| 1.5.2 Conteggio degli organismi   |         |
| - Conteggio dei singoli individui algali  |         |
| - Conteggio degli organismi coloniali   |         |
| - Metodi di conteggio   |         |
| 1.5.3 Identificazione degli organismi algali  |         |
| 1.5.4 Determinazione della densità cellulare dei campioni   |         |
| <b>1.6</b> Determinazione della forma e misura delle caratteristiche morfometriche associate: il biovolume, l'area superficiale e la biomassa fitoplanctonica | pag. 45 |
| 1.6.1 Identificazione della forma geometrica più idonea   |         |
| 1.6.2 Identificazione dell'unità tassonomica di applicazione  |         |
| 1.6.3 Identificazione delle unità di conteggio  |         |

1.6.4	Stima delle dimensioni lineari al microscopio	
1.6.5	Calcolo del biovolume	
1.6.6	Dal biovolume alla biomassa	
1.7	Intercalibrazione	pag. 55

## **CAPITOLO 2 – MACROINVERTEBRATI BENTONICI**

*A cura di:* F. Sangiorgio, M. Pinna, L. Gravili

2.1	Introduzione	pag. 64
2.2	Campionamento dei macroinvertebrati bentonici	pag. 65
2.3	Prelievo di unità di sedimento di fondo molle in cui sono noti la superficie e/o il volume	pag. 66
2.3.1	Scelta degli strumenti di campionamento	
2.3.2	Prelievo di sedimento con box corer	
2.3.3	Vagliatura dei campioni	
2.3.4	Lavaggio e sorting dei campioni	
2.4	Campionamento dei macroinvertebrati bentonici con trappole trofiche e substrati artificiali	pag. 74
2.4.1	Substrati artificiali costituiti da trappole trofiche	
2.4.2	Allestimento ed immissione in natura delle trappole trofiche	
	- Raccolta del materiale fogliare	
	- Stoccaggio	
	- Trattamento in stufa termostata	
	- Preparazione dei pacchi fogliari	
	- Immissione in natura	
2.4.3	Prelievo delle trappole trofiche	
2.4.4	Sorting dei campioni	
2.5	Fissazione e conservazione dei campioni	pag. 85
2.6	Determinazione della biomassa individuale	pag. 88
2.6.1	Misura diretta del peso individuale	
	- Peso secco	
	- Contenuto in ceneri	
	- Biomassa	
2.6.2	Stima della biomassa attraverso relazioni allometriche lunghezza-peso	
	- Misura di una dimensione lineare	
	- Relazioni lunghezza peso	

## **CAPITOLO 3 – DESCRIPTORI LEGATI ALLA TAGLIA**

*A cura di:* L. Sabetta

<b>3.1</b> Distribuzione in classi di taglia: introduzione	pag. 98
<b>3.2</b> Organizzazione tabulare dei dati	pag. 98
<b>3.3</b> Definizione delle classi di taglia	pag. 99
<b>3.4</b> Costruzione delle distribuzioni in classi di taglia	pag.100
<b>3.5</b> Descrizione quantitativa delle distribuzioni e derivazione dei descrittori	pag.103
3.5.1 Misure di tendenza centrale	
3.5.2 Misure di dispersione	
3.5.3 Indici di forma	

## **BIBLIOGRAFIA**

## **PRESENTAZIONE**

*G. Boeri*

Nell'ambito delle attività di formazione su: "Nuovi approcci metodologici per la classificazione dello stato di qualità delle acque ai sensi del Decreto Legislativo 152/99 e sue integrazioni e modifiche" e nella prospettiva del recepimento della Direttiva Comunitaria 2000/60/CE, è stato realizzato il seminario ed esercitazioni "Bioindicazione per la qualità ecologica degli ecosistemi acquatici di transizione e marino-costieri" tenutosi presso l'Università del Salento (già Università degli Studi di Lecce) dal 20 al 22 giugno 2005.

Al seminario hanno partecipato 37 tra tecnici e ricercatori appartenenti alla maggior parte delle ARPA italiane delle regioni costiere (12 su 15). L'attività seminariale ha sottolineato lo stato delle conoscenze sul funzionamento degli ecosistemi costieri e di transizione, approfondendo la discussione su alcuni strumenti innovativi per il monitoraggio sviluppati da CoNISMa/URL, Università Politecnica delle Marche, ENEA BIOTEC/AMB, Stazione Zoologica A. Dohrn di Napoli ed Università di Lecce-DiSTeBA in specifici sottoprogetti del programma ISPRA (ex APAT)/MATT PR1/A. Ai fini della massima diffusione dei risultati, tutte le attività svolte all'interno del seminario e la descrizione dettagliata delle metodologie sono state riprodotte in un DVD consegnato ai partecipanti al termine dei lavori.

Le giornate hanno messo in evidenza i vantaggi derivanti da una stretta collaborazione tra mondo scientifico e mondo istituzionale-operativo verso il comune obiettivo di migliorare l'efficacia nella salvaguardia e conservazione di tali ecosistemi e proponendo a tale scopo di costituire gruppi di lavoro specifici sulle tematiche sviluppate nel seminario allo scopo di proseguire l'iniziativa. I gruppi di ricerca degli istituti scientifici coinvolti hanno assicurato la loro collaborazione con le agenzie regionali per un efficace attuazione dei gruppi di lavoro proposti.

L'integrazione realizzata nelle giornate di lavoro tra partecipanti e docenti ha suggerito di dare uno sviluppo temporale a questa attività di formazione attivando un processo di implementazione continuo per l'aggiornamento e l'attuazione delle innovazioni scientifico-metodologiche nelle attività istituzionali di controllo e monitoraggio.



E' inoltre stato creato un forum dedicato <http://www.ecologia.ricerca.unile.it/TWTypology> (nei giorni 5 e 6 luglio 2005) nel quale le ARPA hanno avuto modo di continuare la discussione attraverso una conferenza on-line.

ISPRA si è assunta il compito di diffondere i risultati di queste attività nei contesti nazionali ed internazionali appropriati coordinando le successive fasi di implementazione ed integrazione. A seguito di ciò il Laboratorio di Ecologia, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali dell'Università del Salento-Lecce ha elaborato questo manuale, che viene pubblicato con il contributo di ISPRA e che si ritiene possa essere di grande ausilio agli esperti di settore.

Il Direttore del Dipartimento Acque Interne e Marine

Giancarlo Boeri

## **PREMESSA**

### *A. Basset*

Descrivere la natura ha sempre costituito un elemento di interesse per le società umane. Pittori e scrittori hanno iniziato a descrivere il paesaggio degli ecosistemi prima che questi suscitassero l'interesse dei naturalisti e successivamente degli ecologi, cogliendone anche quegli aspetti dinamici regolari legati a variazioni altrettanto regolari nel mondo fisico. Queste forme di arte descrivono bene le modificazioni indotte negli elementi del paesaggio dalla alternanza delle stagioni, dalla posizione geografica, l'orografia e la litologia

Capire la natura è sempre stato compito della scienza, attraverso la descrizione quantitativa del sistema costituito dalle forze e dalle interazioni tra forze che hanno come risultato forme e fenomeni che caratterizzano la biosfera su qualsiasi livello di scala, dal microcosmo di un cm<sup>3</sup> di acqua all'universo. La scienza spiega il funzionamento dei sistemi e le sue basi intrinseche, collegando ai descrittori di stato, tipici della pittura, descrittori di cambiamento. La scienza procede attraverso osservazione ed astrazione, creando un mondo immaginario di relazioni che, quando è in grado di riprodurre il mondo reale, fornisce una spiegazione ai fenomeni osservati ritenuta vera fino a prova contraria.

L'ecologia è una branca, relativamente recente, delle scienze naturali che ha come sistema di riferimento l'ecosistema.

Negli ultimi decenni, l'uomo ha acquisito un ruolo predominante nel funzionamento della maggior parte degli ecosistemi nella biosfera; in modo diretto o indiretto, noi utilizziamo circa il 30% di tutto ciò che annualmente è prodotto nella biosfera e circa il 50% di quello che viene prodotto negli ecosistemi terrestri.

Distruzione e frammentazione degli habitat sono effetti evidenti dell'azione dell'uomo negli ecosistemi terrestri; negli ecosistemi acquatici a questa azione diretta, evidente nella maggior parte degli ecosistemi acquatici di transizione del Mediterraneo, si somma una forte azione indiretta sulla qualità chimica delle acque e, conseguentemente, sulle popolazioni e corporazioni di piante ed animali che le colonizzano. Tutte le attività dell'uomo si riflettono, infatti, nella qualità delle acque di fiumi, laghi, lagune e bacini marino-costieri che ne drenano le acque ricevendone i prodotti del metabolismo, minacciandone beni e servizi essenziali per le società, quali ciclizzazione dei nutrienti, depurazione delle acque, produzione di risorse alimentari.

Gli ecosistemi acquatici forniscono beni e servizi essenziali alle società umane che sono attualmente minacciati dai prodotti metabolici delle attività umane. Su queste basi è chiaro come sia particolarmente importante saper riconoscere in modo quantitativo i limiti entro cui le nostre attività sono compatibili con la conservazione di beni e servizi degli ecosistemi da cui noi dipendiamo, evitando di mettere a rischio o rendere negativo il bilancio netto delle attività antropiche. A tal fine, e per intervenire con sistemi di controllo ed atti normativi di conservazione prima che lo stato di salute degli ecosistemi sia danneggiato, è necessario poter distinguere tra le variazioni nelle caratteristiche strutturali e funzionali degli ecosistemi che si verificano indipendentemente dalle attività umane e quelle che si verificano come risposta alle stesse.

Alla scienza ecologica è, quindi, chiesto di comprendere funzionamento ed organizzazione degli ecosistemi acquatici in modo tale da poter identificare quelle componenti di struttura e processo in grado di descriverne lo stato di salute ed il cambiamento di stato conseguente alle pressioni derivanti dalle attività dell'uomo. La Direttiva Quadro Acqua (Water Framework Directive, WFD 2000/60/CE) ha contribuito in modo specifico ad approfondire le richieste di conoscenza e comprensione su funzionamento ed organizzazione degli ecosistemi acquatici, volendo confrontare lo stato ecologico degli ecosistemi presenti entro ampie EcoRegioni attraverso descrittori semplici di stato e di cambiamento. In questo contesto, l'astrazione caratteristica del pensiero scientifico può prescindere dalla conoscenza delle specie presenti, concentrandosi sui tratti funzionali, specie-indipendenti, degli individui; tra questi, la mole corporea degli individui riveste particolare importanza, costituendo un tratto fenotipico sintetico le cui profonde implicazioni in campo ecologico sono state sottolineate da numerosi testi di riferimento negli ultimi 30 anni (Peters, 1983; Brown e West, 2000). Strumenti specie-indipendenti, o non tassonomici, di descrizione del funzionamento e della organizzazione degli ecosistemi possono rappresentare strumenti utili nella analisi di fenomeni potenziali di inquinamento dovuti alle attività dell'uomo, minimizzando l'influenza di risposte specie specifiche all'inquinamento. In altri termini, nella composizione tassonomica di comunità e corporazioni, la variazione indotta dalla risposta all'inquinamento si somma con quella caratteristica nella distribuzione di migliaia/decine di migliaia di specie, potenzialmente in grado, a scala EcoRegionale, di colonizzare gli ecosistemi acquatici considerati (*pool di specie regionale*), tra singoli ecosistemi, ciascuno dei quali, per dimensioni e

flusso energetico, può sostenere solo una piccola frazione delle specie in grado di colonizzarli stabilmente (*pool di specie locale*). Per alcuni tratti funzionali questo effetto additivo si riduce molto quando sia possibile descrivere a livello teorico i modelli di variazione attesi in rapporto alle forzanti abiotiche imposte dalle attività dell'uomo. Conseguentemente, negli ultimi anni sono stati sviluppati molti approcci teorici all'uso dei tratti funzionali per comprendere organizzazione e funzionamento di comunità e corporazioni (McGill *et al.*, 2006) ed alla applicazione nella 'bio-indicazione' attraverso descrittori 'non tassonomici' dello stato ecologico degli ecosistemi acquatici molto informativi (Mouillot *et al.*, 2006). Negli ecosistemi acquatici di transizione, oggetto particolare di questo manuale metodologico, la rilevanza di descrittori non tassonomici dello stato ecologico è sottolineata dall'esistenza di forti gradienti abiotici, che determinano filtri ambientali selettivi per i tratti fenotipici funzionali delle specie.

In questo manuale verranno descritte metodologie e tecniche per l'applicazione di descrittori dello stato ecologico degli ecosistemi e delle variazioni di stato, derivati dall'analisi delle dimensioni degli individui e delle caratteristiche di strutture in taglia relative alle componenti biotiche degli ecosistemi. In particolare, si farà riferimento a due componenti che nella recente Direttiva Acqua vengono indicate col nome di elementi biologici di qualità: il fitoplancton e i macroinvertebrati bentonici.

Perché utilizzare la taglia per descrivere la risposta degli ecosistemi alle pressioni indotte dalle attività umane? I motivi sono essenzialmente tre. In primo luogo, 1) la taglia degli individui è generalmente una caratteristica facilmente determinabile in modo quantitativo, accurato e riproducibile ed i valori ottenuti nel quantificare le dimensioni degli individui sono confrontabili tra operatori e laboratori addetti ai controlli. Inoltre, 2) numerose caratteristiche comportamentali, energetiche e del ciclo biologico degli individui dipendono in modo noto e quantitativo dalle dimensioni individuali così come anche importanti caratteristiche delle comunità quali abbondanza di individui, ricchezza in specie e flusso di energia attraverso le specie. La Teoria Metabolica ha recentemente espresso in modo quantitativo tutte queste relazioni. Infine, 3) sulla base di una delle più comuni definizioni di stress e cioè "qualsiasi cosa influenzi il tasso con cui viene resa disponibile energia per la crescita degli individui", numerose delle componenti fisiologiche, energetiche e comportamentali a livello di individuo, popolazioni e comunità sono fortemente influenzate dalle dimensioni corporee degli individui. In altri termini, tali

componenti fisiologiche possono essere definite taglia-dipendenti. Sulla base di queste relazioni, la ricerca scientifica ha evidenziato modelli di variazione della forma (skewness), tendenza centrale (riduzione delle dimensioni medie) ed ampiezza delle distribuzioni (riduzione dell'ampiezza e delle grandezze collegate) al crescere dell'intensità delle pressioni perturbative derivanti dalle attività umane. Il presente manuale è finalizzato a fornire strumenti metodologici per lo sviluppo e la quantificazione di descrittori dello stato ecologico di corporazioni di fitoplancton e macroinvertebrati bentonici degli ecosistemi acquatici di transizione, partendo da dati sulle dimensioni corporee degli individui. Esso, è, pertanto, complementare alle manualistiche esistenti, finalizzate alla descrizione delle metodologie di analisi della composizione tassonomica delle corporazioni di fitoplancton e macroinvertebrati bentonici, con cui condivide le sezioni riguardanti le metodologie di campionamento. I seguenti testi possono essere considerati come riferimento per aspetti complementari: *Metodi nell'ecologia del plancton marino* (1990), *Metodologie analitiche di riferimento* (2001), *Manuale di metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo* (2003), *Protocolli per il campionamento e la determinazione degli elementi di qualità biologica e fisico-chimica nell'ambito dei programmi di monitoraggio ex 2000/60/CE delle acque di transizione* (2008). I descrittori legati alla taglia individuale oggetto del presente manuale, pur essendo derivati per gli ecosistemi acquatici di transizione, sono chiaramente applicabili a qualsiasi ecosistema acquatico poiché si basano su caratteristiche fondamentali del metabolismo individuale e di popolazione e su caratteristiche della organizzazione di comunità attraverso modelli di relazione e calcolo ormai consolidati nella letteratura scientifica.

Il manuale descrive, in modo sintetico ma esaustivo, tutte le fasi operative di un programma di monitoraggio, in modo da rappresentare uno strumento attuativo utile agli operatori. Per ciascuna delle due corporazioni considerate (fitoplancton e macroinvertebrati bentonici), il manuale descrive strumenti e modalità di campionamento, procedure di trattamento ed analisi dei campioni, procedure di analisi dei dati e modelli di calcolo dei descrittori. La descrizione relativa a strumenti e modalità di campionamento, trattamento ed analisi dei campioni è riportata separatamente per i due elementi biologici di qualità considerati (i.e., fitoplancton e macroinvertebrati bentonici) nei capitoli 1 e 2; l'analisi dei dati ed i modelli di calcolo dei descrittori sono descritti congiuntamente per i due elementi

biologici di qualità nel capitolo 3. La sezione relativa ad analisi dati e modelli di calcolo è generalizzabile ad elementi biologici di qualità diversi da quelli trattati nel presente manuale.

Questo manuale è il risultato di oltre 10 anni di ricerca svolta dal Laboratorio di Ecologia dell'Università del Salento in ecosistemi d'acqua dolce ed in ecosistemi acquatici di transizione; ricerca che è stata finalizzata con la partecipazione al progetto ISPRA (ex APAT)/MATT PR1/A “*Metodologie per il rilevamento e la classificazione dello stato di qualità ecologico e chimico delle acque, con particolare riferimento all'applicazione del decreto legislativo 152*”. Tutti gli studenti, laureandi, dottorandi e post-doc che in questi anni hanno frequentato il laboratorio hanno contribuito al patrimonio di idee, studi e ricerche che hanno prodotto questo risultato. In particolare, gli autori ringraziano Enrico Barbone, Paola Cacciatore, Alessandro Calimero, Serena Corvino, Laura Fedele, Alessio Fonnesu, Nicola Galuppo, Andrea Leopizzi Stefano Maci, Raffaella Resta, Ilaria Rosati, Elena Stanca, per l'entusiasmo da loro mostrato durante tutte le fasi di realizzazione di questo manuale. Nello sviluppo di un approccio allo studio dello stato ecologico degli ecosistemi acquatici abbiamo avuto il contributo di discussione di molti colleghi. In particolare ringraziamo Claudio Fabiani, Gianna Casazza e Cecilia Silvestri, che ci hanno incoraggiato a sviluppare questa tematica nell'ambito del progetto PR/1A “*Metodologie per il rilevamento e la classificazione dello stato di qualità ecologico e chimico delle acque, con particolare riferimento all'applicazione del decreto legislativo 152*”, Floriana Aleffi, Gian Carlo Carrada, Alberto Castelli, Carla Rita Ferrari, Anna Occhipinti, Vincenzo Saggiomo, per i loro commenti ad una precedente versione del presente manoscritto, Marco Abbiati, Serena Fonda, Lucian Georgescu, Drosos Koutsoubas, Snejana Moncheva, Artemis Nicolaidou, Sotiris Orfanidis, Sofia Reizopoulou e tutti gli altri partner del progetto TWReferenceNET che hanno contribuito allo sviluppo di test sperimentali sulla sensibilità ed accuratezza dei descrittori legati alla taglia. Per le fotografie riportate nel manuale, gli autori ringraziano A. Fiocca per i disegni in figg. 1.2 e 1.16, per le foto in figg. 1.3-1.8 e figg. 1.14, 1.17, 1.1, 1.21; E. Stanca per le foto in figg. 1.13, 1.15, 1.18, 1.20; M. Pinna per le foto in figg. 2.1-2.5 e fig. 2.17; F. Sangiorgio per le foto in figg. 2.6-2.16.

## CAPITOLO 1 – FITOPLANCTON

A. Fiocca, M. R. Vadrucci

### 1.1 Introduzione

Il fitoplancton rappresenta l'insieme degli organismi autotrofi fotosintetici presenti nel plancton. Il termine *plancton* deriva dal termine greco “planctos”, che letteralmente significa “vagare” ed è stato utilizzato per la prima volta in campo bio-ecologico dal biologo Hensen nel 1887, il quale ha definito con questo termine “*tutte le particelle di natura organica che galleggiano liberamente ed involontariamente in acque aperte*”. Oltre al fitoplancton, quasi esclusivamente autotrofo, nel plancton è presente anche una componente eterotrofa rappresentata da virus, batteri e organismi animali (*zooplancton*); tutti adattati a vivere in sospensione sia in mare che in acqua dolce ed ad essere soggetti a movimenti passivi indotti da correnti e venti. Questa distinzione tra componente autotrofa ed eterotrofa non è tuttavia netta; la maggior parte delle specie fitoplanctoniche è in grado di utilizzare anche composti organici, in particolare vitamine, presenti in soluzione in acqua (questa proprietà viene definita *auxotrofia*) ed alcune specie sono in grado di utilizzare la materia organica disciolta anche come fonte energetica (questa proprietà è definita come *mixotrofia* o *eterotrofia*). Nonostante questa plasticità metabolica, la funzione fotosintetica rappresenta la principale forma di approvvigionamento energetico per il fitoplancton, come gruppo, e queste specie microscopiche (dimensioni comprese tra 0.2  $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$  di diametro) costituiscono i principali produttori primari in una gran parte degli ecosistemi acquatici.

Il fitoplancton svolge un ruolo fondamentale nelle strutture trofiche degli ambienti acquatici, poiché esso rappresenta la via attraverso la quale l'energia fluisce ai livelli trofici superiori. Si può affermare, che il fitoplancton costituisce negli ambienti acquatici, l'equivalente dell'abbondante vegetazione terrestre che rappresenta il supporto fondamentale per la vita degli animali, compreso l'uomo. Nell'ambiente marino, più del 90% della produzione primaria annuale è a carico di organismi appartenenti al fitoplancton che, pertanto, assumono un ruolo fondamentale nei meccanismi di riciclo del carbonio, dei nutrienti (in particolare N e P) e dell'ossigeno sia a livello ecosistemico che a livello globale.

Gli organismi del fitoplancton hanno una struttura cellulare semplice e cicli vitali brevi nell'ordine di alcuni giorni; in condizioni ottimali si può osservare un turnover nelle corporazioni fitoplanctoniche anche superiore 6-8 volte al giorno (Platt e Filion, 1973). Per queste caratteristiche fisiologiche e metaboliche, a livello individuale essi sono in grado di rispondere rapidamente a diversi fattori fisici (luce, temperatura e turbolenza), con un metabolismo fortemente accoppiato alla disponibilità di nutrienti inorganici (principalmente N e P), ed a livello di popolazione e corporazione essi sono soggetti ad ampie oscillazioni su scale spazio-temporali anche relativamente ristrette.

Abbondanza, distribuzione e dinamica degli organismi fitoplanctonici dipendono da tre componenti essenziali degli individui, che costituiscono elementi importanti per la derivazione di descrittori dello stato ecologico del fitoplancton:

- appartenenza ad una specie biologica (componente tassonomica);
- possesso di una ben definita dimensione individuale;
- possesso di una ben definita morfologia delle cellule fitoplanctoniche.

La componente tassonomica sintetizza la maggior parte delle esigenze fisiologiche degli individui a livello qualitativo (la *nicchia potenziale*), dimensioni e forma influenzano profondamente i tassi di assorbimento di nutrienti e luce da parte degli individui, determinandone quantitativamente limitazione delle risorse e fitness competitiva. In questo paragrafo, in cui vengono descritti in modo sintetico gli aspetti principali delle corporazioni fitoplanctoniche, pur con una particolare attenzione al fitoplancton delle acque di transizione ed alla rilevanza della sua struttura dimensionale, le relazioni di dimensione e forma con i tassi di assorbimento di luce e nutrienti verranno trattate congiuntamente in una sezione sulla classificazione funzionale delle corporazioni fitoplanctoniche.

Componente tassonomica Il fitoplancton è composto da organismi procarioti (essenzialmente cianobatteri) e da microalghe eucariote appartenenti a diverse raggruppamenti tassonomici quali Bacillariophyceae, Dinophyceae, Chrysophyceae, Cryptophytaceae, Dictyochophyceae, Prymnesiophyceae, Raphidophyceae e Euglenophyceae, Prasinophyceae e Chlorophyceae. Tali raggruppamenti variano per dimensioni, morfologia, fisiologia ed ecologia. Il fitoplancton viene classificato soprattutto sulla base di alcune caratteristiche strutturali delle cellule, tuttavia negli ultimi anni, alcune caratteristiche



biochimiche, come natura e quantità di pigmenti fotosintetici, hanno consentito di effettuare significative revisioni nella classificazione ed un inquadramento più preciso della storia evolutiva del fitoplancton. Le differenze evolutive, infatti, possono essere riscontrate non solo dalla presenza e dalla struttura dei flagelli, dalla struttura del cloroplasto e dalla relazione tra il cloroplasto e l'involucro nucleare (Coombs e Greenwood, 1976), ma anche dalla presenza o meno di particolari pigmenti. Interessante, da questo punto di vista, è la revisione di Delwiche (1999), in cui vengono presentate le origini evolutive del fitoplancton e l'inquadramento delle specie attualmente presenti in due grandi linee filetiche: la linea rossa e la linea verde (figura 1.1), un ulteriore approfondimento su questi aspetti è stato anche effettuato da Baldauf, 2003.

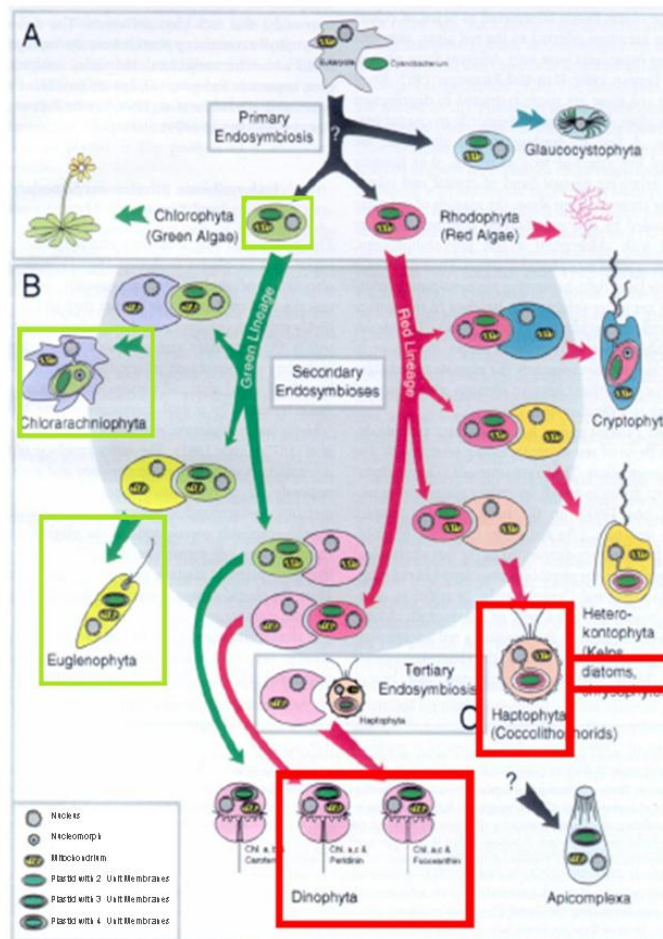


Figura 1.1 – Origine evolutiva del fitoplancton, Delwiche (1999).

Formalmente, nelle comunità acquatiche il fitoplancton può essere definito come una corporazione (i.e., insieme di specie molto diverse a livello tassonomico ma simili a livello funzionale, che fanno parte di una comunità [Root, 1967]). Il

termine corporazione sarà usato sempre in questa guida con il significato sopra citato.

La composizione tassonomica del fitoplancton fornisce indicazioni sulla selettività dell'ambiente alla presenza e allo sviluppo di particolari specie. Negli ambienti di transizione i principali fattori di controllo di biodiversità e dinamica delle specie fitoplanctoniche sono: il bilancio idrico, il tempo di residenza delle acque nel sistema, la profondità, la salinità, la luce e la concentrazione dei nutrienti. Questi fattori, contribuiscono sia alla determinazione della componente stocastica della diversità, attraverso processi di immigrazione/emigrazione delle specie dagli ambienti di input e output, sia alla componente deterministica attraverso la selezione delle specie che risultano meglio adattate o che presentano un vantaggio competitivo a particolari condizioni ambientali locali. Per esempio, Carstensen *et al.* (2007) sostengono che la specie *Planktothrix agardhii* (Gomont) sembra essere un potenziale indicatore di eutrofizzazione nei sistemi acquatici di transizione nella regione del Mar Baltico, poiché esiste una elevata probabilità che la sua densità aumenti all'aumentare del livello dei nutrienti. Il processo di selezione delle specie fitoplanctoniche in relazione ai gradienti ambientali presenti negli ecosistemi acquatici di transizione viene descritta attraverso il concetto di *niche filtering* (Zobel, 1997). In linea generale, negli ambienti acquatici di transizione una prevalenza di Bacillariophyceae indica condizioni abiotiche caratterizzate da elevata turbolenza e/o elevata concentrazione di nutrienti, mentre la presenza di Chlorophyceae è indice che il sistema riceve importanti apporti di acqua dolce.

Classificazione funzionale delle corporazioni fitoplanctoniche Nelle corporazioni fitoplanctoniche i tratti funzionali, quali dimensioni e forma (Weithoff, 2003), riflettono importanti processi fisiologici sia di crescita, come l'assimilazione di luce e di nutrienti, che di perdita, come sinking e grazing (Morabito *et al.*, 2007; Salmaso e Padisak, 2007; Litchman *et al.*, 2007).

In base alla dimensione il fitoplancton si può classificare in:

- picofitoplancton: con dimensioni  $< 2\mu\text{m}$ ;
- nanofitoplancton: con dimensioni che variano tra 2 e  $20\mu\text{m}$ ;
- microfitoplancton: con dimensioni  $>20\mu\text{m}$ .

Gli organismi fitoplanctonici in quanto autotrofi, necessitano di nutrienti inorganici che devono essere assorbiti dal mezzo circostante. Il processo di

assorbimento (qui di seguito indicato con il termine uptake) avviene contro gradiente di concentrazione secondo la prima legge di Fick (Cermeño *et al.*, 2006) e pertanto richiede un dispendio energetico ed è influenzato da: forma, dimensione, sinking, concentrazione del substrato e proprietà fisiche. Il trasporto di nutrienti attraverso lo strato limite, il sottile strato esterno che circonda la membrana cellulare e, il cui spessore aumenta all'aumentare delle dimensioni dell'organismo (perché uguale al raggio cellulare [Reynolds, 1997]), dipende dal movimento diffusivo lungo un gradiente di concentrazione.

Per descrivere il tasso di uptake in funzione della concentrazione di nutrienti, si utilizza il modello di Michaelis e Menten:

$$Uptake = V_{max}R/R+K \quad \text{Eq. 1.1}$$

dove

$V_{max}$  = massimo tasso di uptake del nutriente ( $\mu\text{mol nutriente cell}^{-1} \text{giorno}^{-1}$ ) che riflette la morfologia cellulare ed i processi intracellulari ed è controllato unicamente dall'area superficiale disponibile per l'uptake e può aumentare in maniera proporzionale al rapporto superficie/volume (S/V);

R = concentrazione esterna del nutriente ( $\mu\text{mol nutriente L}^{-1}$ );

K = costante di semisaturazione per uptake di nutriente ( $\mu\text{mol nutriente L}^{-1}$ ), riflette la morfologia cellulare, la mobilità e l'insieme dei processi idrodinamici e intracellulari. La costante K è correlata inversamente al rapporto S/V e direttamente alle dimensioni cellulari; pertanto cellule di piccole dimensioni sono competitivamente superiori al diminuire della concentrazione di nutrienti (Morris, 1980).

Le dimensioni corporee delle cellule fitoplanctoniche, espresse come raggio della cellula (r) possono essere anche introdotte direttamente nell'equazione che definisce l'uptake cellulare, dato che

$$V_{max} = n h^{-1} \quad \text{Eq. 1.2}$$

$$K_S = (A v h)^{-1} \quad \text{Eq. 1.3}$$

L'equazione 1.1 diventa:

$$Uptake = n h^{-1} S / S + (A v h)^{-1} \quad \text{Eq. 1.4}$$

dove

n = numero di siti di uptake per lo ione per cellula ( $n_s$ )

h = tempo di legame per ione (s)

A = area di un sito di uptake

$v$  = coefficiente di trasferimento di massa, che è uguale a:

$$v = D/r + u/2 \quad \text{Eq. 1.5}$$

dove

$D$  = diffusione molecolare

$r$  = raggio cellulare

$u$  = velocità relative tra cellula e mezzo (sinking e swimming del fitoplancton sono tenute in conto in tale fattore).

Il rapporto tra  $V_{\max}$  e  $K$  determina  $\alpha$ , ossia l'affinità di uptake per il nutriente e, tenendo conto delle dimensioni cellulari quindi, delle equazioni (1.2) e (1.3) si ha che

$$\alpha = V_{\max}/K = nAv = nA(D/r + u/2) \quad \text{Eq. 1.6}$$

in cui  $nA$  rappresenta l'area della membrana cellulare che è capace di "catturare" gli ioni di nutrienti. Questo indica che l'affinità ( $\alpha = nAv$ ) è proporzionale alla superficie cellulare e, quindi, alle dimensioni cellulari.

In considerazione di ciò, i comuni parametri di uptake possono essere messi in relazione alle dimensioni cellulari:

- a)  $V_{\max}$  aumenta linearmente con il quadrato del raggio cellulare (superficie cellulare o con un esponente pari a 2/3 del volume cellulare);
- b)  $K$  aumenta linearmente all'aumentare del raggio (o con un esponente pari a 1/3 del volume cellulare);
- c)  $\alpha$  aumenta linearmente all'aumentare del raggio.

Analogo ragionamento può essere effettuato relativamente all'assorbimento della luce che nell'ambiente acquatico è fortemente attenuata dal mezzo, dalle sostanze disciolte e dalle particelle sospese, incluso il fitoplancton. L'assorbimento della luce è legato, attraverso funzioni non lineari, ad una interazione tra dimensioni cellulari, composizione e concentrazione dei pigmenti presenti all'interno della stessa. Una diminuzione in assorbimento clorofilla-specifico all'aumentare delle dimensioni cellulari o della concentrazione intracellulare dei pigmenti è conosciuto come effetto package.

L'assorbimento della luce per una cellula sferica può essere espresso come:

$$a = a^*c_iV \quad \text{Eq. 1.7}$$

dove

$a^*$  = coefficiente di assorbimento pigmento-specifico cross-section, espresso come estensione superficiale della cellula per unità in peso del pigmento fotosintetico [ $m^2(mg\ Chla)^{-1}$ ]

$c_i$  = concentrazione intracellulare di clorofilla "a" ( $mg\ Chla\ m^{-3}$ )

V = volume cellulare.

In generale l'assorbimento ottico cross-section delle cellule fitoplanctoniche è dato da:

$$a^* = 3/2((a_s^* Q)/\rho) \quad \text{Eq. 1.8}$$

Q può essere calcolato dalla seguente equazione:

$$Q = 1 + 2(e^{-\rho} / \rho) + 2((e^{-\rho} - 1) / \rho^2) \quad \text{Eq. 1.9}$$

$\rho$  può essere calcolato dalla seguente equazione:

$$\rho = a_s^* c_i d \quad \text{Eq. 1.10}$$

dove

$a_s^*$  = assorbimento clorofilla-specifico del pigmento fotosintetico in soluzione, espresso come estensione superficiale della cellula per unità in peso del pigmento fotosintetico [ $m^2(mg\ Chla)^{-1}$ ];

d = diametro cellulare (m).

L'assorbimento della luce dipende anche dalla geometria e dall'orientamento delle cellule nel mezzo acquoso Kirk (1975a, 1975b, 1976). In una cellula sferica, l'area esposta all'assorbimento della luce diminuisce all'aumentare del diametro, mentre nel caso di alghe non sferiche, che sono appiattite in uno o due piani, l'area superficiale esposta alla luce in un dato piano dipende dall'orientamento; la massima superficie esposta si ha quando i due assi maggiori sono perpendicolari alla fonte unidirezionale di fotoni.

Dimensione e forma sono quindi tratti funzionali del fitoplancton che, da un lato, influenzano direttamente l'acquisizione di risorse e, dall'altro, caratterizzano la performance fotosintetica, intervenendo anche indirettamente nell'acquisizione di risorse (Richardson, *et al.* 1983).

Come conseguenza di queste proprietà individuali associate alle dimensioni corporee delle specie fitoplanctoniche, la struttura dimensionale del fitoplancton, descritta con il termine di "spettri in taglia" (Sheldon, 1972), costituisce una delle componenti strutturali principali delle corporazioni del fitoplancton.

Per le proprie specifiche caratteristiche strutturali e funzionali il fitoplancton è incluso tra gli elementi biologici di qualità (DLgs. 152/06 e WFD 2000/60), per la valutazione dello stato di salute degli ecosistemi acquatici di transizione.

Il fitoplancton, infatti:

- a. è un elemento ecologico chiave degli ecosistemi acquatici di transizione attraverso il quale fluisce l'energia all'interno degli ecosistemi.
- b. Richiede procedure di campionamento (presentate in seguito) estremamente semplici, tecniche di analisi, tempi di lavorazione e analisi dei campioni relativamente brevi (24 ore per misure di biomassa, da 6 a 72 ore per misure di densità fitoplanctonica e riconoscimento tassonomico), e hanno costi contenuti.
- c. un ottimo indicatore dei cambiamenti dello stato trofico e degli impatti a breve termine come l'arricchimento in nutrienti che determina un incremento della biomassa, della produzione primaria, della frequenza di blooms algali oltre che dei cambiamenti nella composizione in specie. Inoltre, il fitoplancton risponde a variazioni di parametri di natura chimico-fisica ed idrodinamica, è stato infatti dimostrato come variazioni di temperatura e di salinità inducono variazioni sulle caratteristiche di comunità delle popolazioni fitoplanctoniche.
- d. È presente sia in aree soggette ad impatti che in aree non impattate.
- e. Attualmente esiste in letteratura un'ampia disponibilità di dati sul fitoplancton negli ambienti di transizione, relativamente a misure di biomassa, densità cellulare, ricchezza in specie, struttura tassonomica e struttura in taglia.

Nei successivi paragrafi di questo capitolo saranno descritte in dettaglio le metodologie di analisi della struttura dimensionale del fitoplancton determinabile attraverso l'uso della microscopia ottica, largamente diffusa in qualsiasi laboratorio di tecniche fitoplanctoniche. Pertanto, le metodologie descritte fanno riferimento alla frazione dimensionalmente più grande del fitoplancton, corrispondente alle frazioni nano-micro fitoplanctoniche. Tuttavia, nella descrizione delle tecniche di campionamento, verrà fatto riferimento all'intera popolazione fitoplanctonica.

## **1.2 Campionamento del fitoplancton**

Esistono fondamentalmente due metodi per la raccolta di campioni di fitoplancton:

1. attraverso l'uso di retini da plancton;
2. per mezzo di bottiglie di profondità.

Sia con il retino che con le bottiglie da plancton è possibile effettuare un campionamento quantitativo; anche se il campionamento con retino consente solo stime quantitative ed è sicuramente più indicato per studi che non necessitino una quantificazione accurata delle densità di popolazione delle specie fitoplanctoniche.

Nei paragrafi successivi vengono riportate le metodiche da adottare per lo studio delle corporazioni fitoplanctoniche, allo scopo di uniformare le procedure e ridurre al minimo l'errore.

Si è cercato, quindi, di riportare i vari passaggi in maniera semplice, indicando gli strumenti necessari per l'analisi (par. *Strumenti*), descrivendo le procedure da seguire (par. *Procedura*), ed evidenziando i possibili problemi metodologici (par. *Considerazioni*).

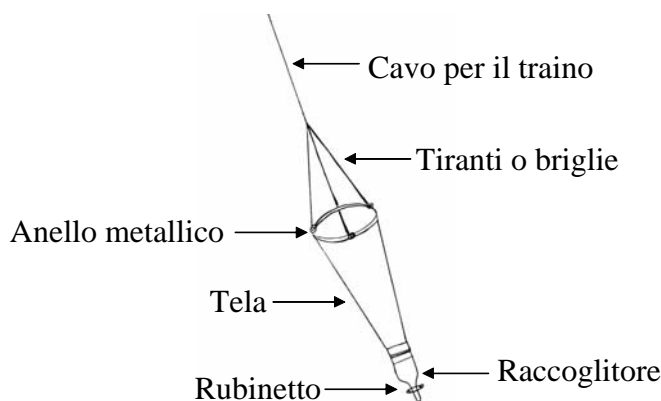
Di seguito vengono descritte le fasi di lavoro da adottare in campo per raccolta e fissazione dei campioni (par. 1.2.1; par. 1.2.2 e par. 1.3); nei paragrafi 1.4 e 1.5 vengono descritte le fasi da adottare in laboratorio, e più esattamente preparazione e lettura al microscopio dei campioni; mentre l'ultimo paragrafo (1.6) è dedicato alla determinazione del biovolume e della biomassa.

### **1.2.1 Campionamento con retino**

Il campionamento con retino è un campionamento selettivo, in quanto la frazione fitoplanctonica campionata dipende dalla maglia della rete e, in nessun caso, comprende la frazione più piccola (picofitoplancton). Il campionamento viene effettuato su transetti che possono essere sia orizzontali (paralleli alla superficie del corpo d'acqua) sia verticali (perpendicolari alla superficie). In tal modo è possibile campionare grandi quantità di materiale filtrando notevoli volumi di acqua. Gli organismi trattenuti dal retino vengono raccolti nel collettore posto all'estremità dello stesso.

Nei campionamenti, il retino è trainato attraverso un cavo da rimorchio solitamente costituito da una corda metrata che indica la profondità alla quale il retino viene immerso. Questo elemento è importante per il campionamento verticale in quanto si evita che l'estremità terminale della rete, venendo a contatto con il sedimento, provochi risospensione nel campione; oppure, se il fondale è roccioso, si evita la rottura del retino. Il campionamento con retino richiede particolari attenzioni quando la profondità dei corpi d'acqua è bassa, caratteristica comune alla maggior parte degli ecosistemi di transizione italiani; in caso di sistemi poco profondi può essere ridotta al minimo la lunghezza della corda di traino ed il limite di utilizzo può essere fissato ad una profondità pari a circa 4-5 volte il diametro dell'apertura del retino.

**STRUMENTI** *Retino da plancton* – Il retino da plancton è costituito da un anello metallico di diametro variabile che sostiene un sacco conico di garza con maglie di dimensioni differenti. All'estremità del sacco è applicato un raccogliitore nel quale vengono raccolti gli organismi campionati (figura 1.2) ed all'imboccatura del retino è possibile posizionare un flussimetro che permetta di stimare il volume d'acqua filtrato.



**Figura 1.2** – Parti di un retino da plancton.

Si possono utilizzare reti da plancton con maglie di diametro variabile da 5 $\mu$ m a 200 $\mu$ m. Nei campionamenti quantitativi, dimensioni dell'apertura del retino, lunghezza della rete e velocità di traino, influenzano l'efficienza di filtrazione dello stesso, data dal rapporto tra il volume d'acqua realmente filtrato ed il volume che dovrebbe teoricamente passare attraverso la rete (area



dell'imboccatura per il percorso di traino); questo, espresso in percentuale, indica l'efficienza di filtrazione. L'efficienza di filtrazione aumenta con l'area del sacco filtrante e tende a raggiungere un massimo relativo quando l'area porosa (dei vuoti) della garza è più di 3 volte la superficie della bocca della rete. Questo rapporto tra la superficie dei vuoti e la superficie della bocca viene definito 'rapporto di apertura' del retino ed è calcolato come segue:

$$R = a\beta/S \quad \text{Eq. 1.11}$$

dove

$a$  = area totale della garza della rete

$\beta$  = porosità delle maglie

$S$  = area dell'imboccatura.

Il "rapporto di apertura" è importante poiché determina l'efficienza di filtrazione del retino da plancton che cresce in modo non lineare con l'aumento del 'rapporto di apertura'; se si considera una rete di forma conica l'efficienza supera l'85% quando il rapporto di apertura è di poco superiore a 3, ed arriva al 95% quando il rapporto è maggiore di 5 (Tranter e Smith, 1968). Quindi, aumentando il rapporto di apertura oltre il valore soglia di 3, l'efficienza di filtrazione aumenta solo lentamente. Per ottimizzare il 'rapporto di apertura' e l'efficienza di filtrazione è possibile regolare la lunghezza del sacco filtrante che, a parità di diametro dell'imboccatura, determina la superficie dei vuoti.

Sulla base di tali determinazioni, viene definita dimensione e forma dei retini da utilizzare, in rapporto alla finalità del campionamento, che spesso determina la selezione della maglia.

**PROCEDURA** Nel campionamento orizzontale, il retino viene lasciato scivolare dalla barca e contemporaneamente si inizia a trainarlo a velocità costante e sempre modesta. Infatti, la maglia del retino determina un attrito allo scorrimento dello stesso in acqua al cui crescere si riduce la frazione del cilindro d'acqua potenzialmente filtrabile che effettivamente attraversa la bocca del retino e viene filtrato. Nel precedente paragrafo il rapporto tra volume potenzialmente filtrabile ed effettivamente filtrato è stato definito come efficienza del retino. Chiaramente, per mantenere costante l'efficienza, la velocità di traino deve essere direttamente proporzionale alla maglia utilizzata. In ogni caso velocità di traino superiore ai 2

nodi (1 nodo = 0.541m/sec) riducono drasticamente l'efficienza del retino, poiché provocano turbolenze all'imboccatura, oltre a determinare rischi di danneggiamento al retino stesso. Per i retini con maglia inferiore a 20µm la velocità consigliata è di 0.5 nodi.

L'acqua che attraversa l'imboccatura del retino viene, quindi, filtrata e il plancton viene spinto nel raccoglitore posizionato nella parte distale del retino (figura 1.2).

Il retino può portare all'imboccatura un flussimetro, attraverso cui viene misurato lo spazio percorso dal retino in immersione. Per stimare il volume di acqua filtrata durante il campionamento è necessario conoscere il numero di giri compiuti dal flussimetro e le dimensioni dell'anello metallico (il raggio). Per il calcolo del volume filtrato (l) si può applicare la seguente relazione:

$$V_{filtrato} = \pi * (\text{raggio retino})^2 * n^{\circ} \text{ giri flussimetro} * \text{passo retino}$$

Quando non è presente il flussimetro, per risalire al volume filtrato è necessario conoscere la distanza percorsa con la barca (campionamento orizzontale). In tal caso il volume filtrato può essere calcolato come segue:

$$V_{filtrato} = \pi * (\text{raggio retino})^2 * \text{campionamento distanza percorsa}$$

Nel caso di corpi d'acqua profondi, eventualità rara nelle acque di transizione, il campionamento con retino può essere effettuato a diverse profondità.

Nel campionamento verticale, per risalire al volume d'acqua filtrato è necessario conoscere la profondità alla quale il retino è stato calato:

$$V_{filtrato} = \pi * (\text{raggio retino})^2 * \text{profondità campionamento}$$

**CONSIDERAZIONI** *Se il campionamento di fitoplancton viene effettuato con il retino è importante tener presente che:*

- *durante la retinata si ha una diminuzione del potere filtrante dovuto all'intasamento progressivo dello stesso tessuto del retino, specialmente per quei retini che hanno le maglie molto piccole;*
- *il campionamento può avvenire sia in orizzontale (il retino viene trainato dal natante), che in verticale quando il prelievo deve essere fatto a profondità definite; in questo caso per evitare la raccolta di organismi durante*

*l'affondamento ed il recupero del retino vengono usati retini a chiusura, in cui sia l'apertura che la chiusura sono controllati dal messaggero;*

*- gli organismi fitoplanctonici si diversificano in base alle dimensioni in picofitoplanctonici, nanofitoplanctonici e microfitoplanctonici per tale motivo in commercio esistono retini a maglie di diverse dimensioni che permettono di raccogliere in maniera selettiva una specifica classe dimensionale (nano e micro fitoplancton).*

*Con i retini da plancton gli organismi di dimensioni più piccole (picofitoplancton) sfuggono alla cattura; quindi, in alternativa al retino, si possono utilizzare altri tipi di campionatori di seguito descritti per quanto riguarda l'analisi quantitativa.*

### **1.2.2 Campionamento con bottiglia di profondità**

Il campionamento con bottiglia di profondità è quantitativo e completo di tutta la popolazione fitoplanctonica. Esso permette di stimare caratteristiche come biomassa, totale e frazionata (pico-, nano-, micro-), densità cellulare e composizione tassonomica, struttura dimensionale e diversità tassonomica, funzionale e dimensionale, delle popolazioni fitoplanctoniche.

Il campionamento con bottiglia è “puntiforme”, relativo a singole stazioni di campionamento e non integrato nello spazio. Sebbene esistono in commercio diverse bottiglie da campionamento, quelle più comunemente utilizzate sono le bottiglie Niskin e di Ruttner, quest'ultima più adatta a corpi d'acqua di profondità ridotta.

Poiché il presente manuale è finalizzato alla descrizione delle metodologie per la analisi della struttura dimensionale di fitoplancton e macrozoobenthos, per una descrizione delle metodologie di analisi della biomassa totale e frazionata si rimanda a: *Metodi nell'ecologia del plancton marino* (1990), *Metodologie analitiche di riferimento* (2001)

**STRUMENTI** *Bottiglia Niskin e bottiglia di Ruttner* – Sia la bottiglia Niskin che la bottiglia di Ruttner hanno una forma più o meno cilindrica, con coperchi di chiusura superiore ed inferiore apribili e chiudibili attraverso un sistema a distanza. Entrambe vengono calate aperte, attraverso un sistema di elastici o agganci,

utilizzando una corda metrata su cui scorre un peso (messaggero) che fa scattare il meccanismo di chiusura della bottiglia. In questo modo avviene il prelievo selettivo del campione di acqua alla profondità voluta. Il materiale con cui vengono costruite le bottiglie può essere materiale plastico o vetro per il corpo cilindrico, mentre la struttura è generalmente di acciaio. Tutte le bottiglie sono dotate di un rubinetto situato ad una estremità che consente di dispensare il campione di acqua negli appositi contenitori (figura 1.3).



**Figura 1.3** – Bottiglia Niskin (sinistra) e bottiglia di Ruttner (destra) chiuse e aperte.

**PROCEDURA** Le bottiglie di profondità, sia Niskin che Ruttner, vengono calate aperte alla profondità stabilita; quando la corda è in posizione perpendicolare rispetto alla superficie del mare si lascia cadere il messaggero che fa scattare un meccanismo a molla tale da permettere la chiusura automatica della bottiglia. Appena si avverte nella corda la vibrazione provocata dalla chiusura della bottiglia si procede al recupero della stessa.

É importante, durante il campionamento verticale, essere sicuri che la bottiglia raccolga l'acqua alla profondità stabilita. Il cavo che sostiene la bottiglia deve essere sempre perpendicolare alla superficie del mare altrimenti bisogna misurare l'angolo che il cavo forma con la verticale per valutare la reale profondità di campionamento; quando la corrente è molto forte, spesso la chiusura della bottiglia può essere difficoltosa, per risolvere questo problema ed avere la certezza di campionare alla profondità voluta, si consiglia di inserire un peso all'estremità della bottiglia.

Quando la bottiglia viene recuperata, il suo contenuto viene dispensato nei contenitori specifici a seconda del tipo di analisi da effettuare. A tal proposito è importante rispettare il seguente ordine:

- 1) ossigeno disciolto
- 2) pH, alcalinità e carbonio inorganico totale
- 3) produzione primaria
- 4) fitoplancton
- 5) nutrienti ed altre sostanze disciolte
- 6) salinità
- 7) sostanze particolate e pigmenti.

### **1.2.3. Altri campionatori per il fitoplancton**

Nei casi in cui non sia possibile campionare con le bottiglie sopra indicate, a causa di particolari caratteristiche del corpo idrico (scarsa profondità, ampiezza, presenza di vegetazione), si possono utilizzare strumenti alternativi spesso progettati e costruiti dagli stessi operatori. Alcuni esempi vengono riportati in figura 1.4. e di seguito descritti.



**Figura 1.4** – Altri campionatori per il fitoplancton.

Il campionatore riportato nella figura a sinistra è stato utilizzato per effettuare campionamenti all'interno di specchi d'acqua poco profondi, di limitata estensione e circondati da una fitta vegetazione a canneti ai quali non era possibile accedere attraverso mezzi natanti. Il campionatore è dotato di una lunga asta metallica che consente all'operatore di effettuare il prelievo dalla terraferma allo specchio d'acqua, evitando la risospensione del sedimento nella colonna d'acqua, provocato dallo stesso operatore qualora questo fosse costretto ad entrare in acqua per effettuare il campionamento. Il contenitore per la raccolta di campioni di materiale plastico e, dalle dimensioni di circa 1l, è dotato di un foro all'estremità inferiore dal attraverso il quale avviene il riempimento.

Il campionatore riportato nella figura 1.4 a destra è stato invece utilizzato, in ambienti poco profondi, di ampia estensione, in cui è possibile accedere attraverso mezzi natanti. Il campionatore è costituito da una pompa di sentina a cui è collegato un tubo di plastica metrato che indica la profondità a cui viene fatto il campionamento. Rispetto alle bottiglie di campionamento, questo campionatore ha il vantaggio, di evitare la risospensione del sedimento causata dall'immersione della bottiglia nella colonna d'acqua.

### **1.3 Conservazione e fissazione dei campioni di fitoplancton**

Una volta raccolto, il campione deve essere dispensato in appositi contenitori che possono essere sia di vetro scuro che di PET, entrambi devono però avere la chiusura con il tappo ermetico ed un sottotappo di materiale totalmente inerte per impedire che il fissativo utilizzato possa diminuire la sua concentrazione nel campione, volatilizzandosi. Ogni contenitore, inoltre, deve essere etichettato, deve cioè riportare alcune indicazioni specifiche su:

- data di campionamento
- stazione di campionamento
- numero di replica.

La fase di etichettatura deve essere effettuata prima del campionamento, utilizzando matite o pennarelli indelebili all'acqua.

La conservazione dei campioni è una fase fondamentale del campionamento di fitoplancton in quanto serve per garantire la stabilità e l'integrità degli organismi fitoplanctonici nell'arco di tempo che intercorre tra il prelievo e l'analisi. Poiché

questo non è sempre possibile, si possono ridurre al minimo le alterazioni della componente algale salvaguardando il campione mediante l'uso di fissativi.

Di seguito si riporta la procedura di conservazione dei campioni di fitoplancton e le caratteristiche principali dei tipi di fissativi più utilizzati.

### **1.3.1 Tipi di fissativi utilizzati: vantaggi e svantaggi**

Molti sono i fissativi che si possono utilizzare per la conservazione dei campioni di fitoplancton, ma solo pochi sono stati testati per un tempo sufficiente da poter valutare i pregi ed i difetti sul campione algale. I principali fissativi sono:

- soluzione di formaldeide costituita da formaldeide al 40% diluita al 20% con acqua distillata e tamponata preferibilmente con dolomite o con 100g/L di esametilentetramina e filtrata prima dell'uso. Il pH finale deve essere neutro o leggermente basico. Così preparata la formaldeide va mantenuta a 5-6°C;
- soluzione di iodio e potassio ioduro detta "soluzione di Lugol" che può essere preparata aggiungendo 20g di potassio ioduro (KI) e 10 grammi di iodio (I<sub>2</sub>) per ogni 200ml di acqua distillata e portando in soluzione.

Il pH di questi fissativi può essere modificato per ottimizzarne le performance relativamente ad alcuni gruppi fitoplanctonici. Entrambi i fissativi possono essere acidificati con acido acetico (20 ml per ogni 200 ml di soluzione); la soluzione di Lugol è generalmente resa più alcalina con aggiunta di acetato di sodio, mentre per ottenere lo stesso risultato viene addizionato alla soluzione di formaldeide esametilentetramina. L'uso di una soluzione di Lugol leggermente alcalina è consigliata per l'osservazione dei Coccolitophoridae in quanto l'ambiente acido tende a dissolvere i coccoliti presenti sulla teca. Tuttavia in campioni ricchi di forme flagellate si consiglia l'uso di soluzioni acide, poiché preservano i flagelli. Di seguito si riportano i principali vantaggi e svantaggi dei due fissativi.

#### Formaldeide

Tra i vantaggi, *a*) è adeguata per la conservazione delle Dinophyceae tectate e nude, Bacillariophyceae e Coccolitophoridae; *b*) i campioni trattati con formaldeide possono essere letti con il microscopio elettronico a scansione e a epifluorescenza.

Tra gli svantaggi, *a*) può causare irritazioni agli occhi ed alla pelle; *b*) è inserita tra le sostanze cancerogene nel NPT (National Toxicology Program's, Fourth

Annual Report on Carcinogens); *c*) in molti organismi fitoplanctonici flagellati provoca la perdita dei flagelli con conseguente difficoltà nel riconoscimento.

#### Soluzione di Lugol

Tra i vantaggi, *a*) non causa la perdita del flagello in molti flagellati, facilitandone il successivo riconoscimento; *b*) è poco tossico per l'osservatore; è adeguato per la conservazione dei Dinophyceae, delle Bacillariophyceae e di specie delicate come i piccoli flagellati (Hallfors *et.al.*, 1979); *c*) se trattati correttamente i campioni possono essere conservati fino a 12 mesi.

Tra gli svantaggi, *a*) lo iodio tende ad ossidarsi col tempo riducendo, quindi, le sue proprietà fissative; *b*) è meno indicato per i Coccolitophoridae in quanto può dissolvere il CaCO<sub>3</sub>, se conservati per più di 1 mese; *c*) riduce le dimensioni degli organismi algali soprattutto se conservati per più di un mese; *d*) i campioni trattati con Lugol non possono essere letti con il microscopio a scansione e a epifluorescenza.

**PROCEDURA** Il campione raccolto con bottiglie di profondità o retino, viene immediatamente dispensato in bottiglie di vetro scuro con tappo ermetico, per evitare la sedimentazione degli organismi fitoplanctonici all'interno del campionatore e quindi la formazione di un sub-campione non omogeneo. Per la conservazione dei campioni si aggiunge nelle bottiglie un fissativo, che può essere costituito da una soluzione di Lugol o da una soluzione di formalina.

La quantità di Lugol da aggiungere al campione deve essere tale che, la concentrazione della soluzione finale (vol/vol) vari indicativamente tra 0.2% e 0.4% (ovvero da 2-4 ml di Lugol per 1000 ml di campione). La quantità di fissativo da aggiungere nel campione, dipende dallo stato trofico dell'ecosistema, per esempio in ambienti oligotrofici la quantità di Lugol consigliata è di circa 2 ml per litro di campione, mentre in ambienti caratterizzati da una maggiore trofia è consigliabile aumentare tale quantità fino a 4ml per litro. Tuttavia, è da tenere presente che tali quantità sono state testate per gli ambienti marini, nelle acque di transizione, dove si osserva una elevata concentrazione di cellule algali e di sostanza organica (che reagisce direttamente con la soluzione di Lugol), la quantità da aggiungere può essere aumentata fino a un massimo di 8 ml di fissativo per litro di campione raccolto.



Per i campioni fissati con formalina, la concentrazione finale consigliata per gli ambienti di transizione varia tra 2% e il 4% (ovvero si aggiungono dai 10 ai 20 ml ogni per 1000 ml di campione). Per entrambi i fissativi, la quantità da aggiungere, all'interno del range consigliato, è a discrezione dell'operatore, che la stabilisce in funzione delle condizioni ambientali (per esempio: fase del ciclo stagionale, presenza di bloom algali, colorazione dell'acqua).

Nel caso in cui venga utilizzata formaldeide, è consigliabile versarla nelle bottiglie prima del travaso del campione. Le bottiglie, contenenti i campioni, non devono essere riempite sino all'orlo in modo che in laboratorio sia possibile agitarle per rendere omogenei i campioni stessi. Il trasferimento dei campioni in laboratorio deve avvenire in contenitori termici; inoltre, le bottiglie devono essere agitate il meno possibile per evitare di danneggiare gli organismi fitoplanctonici. In laboratorio, i campioni possono essere conservati prima della lettura per un periodo e in condizioni che dipendono dal fissativo utilizzato. I campioni fissati con la soluzione di Lugol, devono essere conservati in luoghi freschi, al buio per un periodo massimo di 12 mesi (l'efficienza di lettura decade però dopo i 30 giorni). I campioni fissati con formalina, vanno invece conservati in luoghi freschi e ben areati per ridurre al minimo gli effetti dannosi del fissativo.

**CONSIDERAZIONI** *Se per la conservazione dei campioni di fitoplancton si utilizzano bottiglie in PET e soluzione di Lugol come fissativo, è importante seguire degli accorgimenti. Almeno una volta ogni quindici giorni nel campione si deve aggiungere dell'altro fissativo, in quanto lo iodio tende ad ossidarsi col tempo riducendo le sue proprietà fissative ed inoltre una certa quantità viene assorbita dalla bottiglia (figura 1.5). D'altro canto, se per la fissazione si utilizza formalina, è importante versarla nella bottiglia prima del campionamento, allo scopo di rendere istantanea la fissazione riducendo al minimo i danni agli organismi fitoplanctonici.*



**Figura 1.5** – Bottiglie in PET per la conservazione di campioni.

### **1.3.2 Campioni non fissati**

Ogni volta che si inizia un'attività di monitoraggio è consigliabile prelevare ed analizzare, oltre ai campioni fissati, anche alcuni campioni non fissati, utilizzando uguali tipologie di contenitori; in questo modo, nei campioni non fissati si evita che i prodotti chimici possano alterare la morfologia degli organismi algali rendendo l'identificazione, che deve essere fatta in tempi molto brevi, più complicata.

L'aumento della temperatura dell'acqua, l'esposizione del campione ad un'intensità luminosa eccessiva e la diminuzione dell'ossigeno disciolto nel contenitore, provocata dall'attività batterica, portano ad un rapido decadimento della cellula. Per questi motivi, i contenitori in cui sono conservati i campioni non trattati devono essere riempiti sino all'orlo per ridurre al minimo le vibrazioni durante il trasporto e conservati in contenitori termici al buio. Trasferiti in laboratorio, ai campioni viene tolta una piccola quantità di acqua (circa 10ml) per aumentare la superficie di scambio tra aria e acqua e tenuti ad una temperatura compresa tra 2° e 5° C; in questo modo viene ridotta al minimo l'attività fisiologica degli organismi e rallentati sia la divisione cellulare batterica che il consumo di ossigeno. Nonostante questi accorgimenti, alcune cellule algali, soprattutto quelle più fragili, muoiono in un arco temporale molto breve (*i.e.*, circa un'ora dopo il campionamento). La componente fitoplanctonica di questi campioni non trattati viene esaminata in vivo su vetrini, capsule o bottiglie per cellule.

### **1.4 Preparazione dei campioni per la lettura al microscopio**

In laboratorio, tutti i campioni devono essere preparati per la lettura. Tra le varie metodologie di preparazione dei campioni, per l'osservazione al microscopio e il conteggio degli organismi algali, la più utilizzata è quella di Utermöhl, nota anche come “metodo del microscopio rovesciato” o come “metodo di sedimentazione”.

#### **1.4.1 Metodo di Uthermöl**

Il metodo di Utermöhl è attualmente l'unico metodo per il quale esiste un protocollo completo ufficiale (UNI EN 15204 *Water quality - Guidance standard*

*on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopi. Utermöhl technique*). Il metodo prevede la sedimentazione delle cellule algali presenti in un campione di acqua, in camere di sedimentazione, (che verranno descritte nella successiva sezione) e il successivo conteggio attraverso l'ausilio di un microscopio ottico invertito. Due aspetti molto importanti di questo metodo sono:

a) La scelta del volume da sedimentare A questo proposito si può fare riferimento, se possibile, ai valori di clorofilla "a" che danno un'idea, anche se approssimativa, della densità del fitoplancton; se questo parametro non è noto, la scelta del volume dei campioni da analizzare viene fatta sulla base delle condizioni ambientali e stagionali del sito di studio e sulla base di informazioni derivanti da studi pregressi. In alternativa si può procedere ad un pre-conteggio dei campioni, esaminando rapidamente diversi volumi dello stesso campione. In ogni caso, la scelta del volume ideale da parte dell'operatore deve garantire sia la visibilità delle microalghe che la loro corretta sedimentazione, ovvero una sedimentazione che garantisca una distribuzione random delle cellule. In un campione ideale il campo oculare esaminato dovrebbe contenere un numero di cellule variabile tra 10 e 20.

b) Il tempo necessario per la sedimentazione La procedura di sedimentazione è critica nella determinazione dei valori di densità cellulare ed è critica anche per la determinazione della struttura dimensionale del fitoplancton, oggetto del presente capitolo, in quanto i tempi di sedimentazione dipendono dalle dimensioni cellulari oltre che dalla forma delle cellule, dall'organizzazione cellulare e da alcune caratteristiche della matrice acquosa come, la temperatura e dal tipo di fissativo utilizzato.

Come è noto la velocità di sedimentazione di una cellula è funzione inversa della sua dimensione, inoltre anche la forma assume un ruolo importante, infatti è stato visto come cellule algali che presentano forme più appiattite o che presentano particolari appendici hanno in genere una velocità di sedimentazione più bassa rispetto a forme più tondeggianti. Alcune forme coloniali inoltre possono presentare lo svantaggio di rimanere aderenti alle pareti della camera o di non sedimentare completamente, o sedimentare su più piani, rendendo difficile il conteggio. I tempi di sedimentazione pertanto devono essere sufficientemente lunghi da garantire la sedimentazione di tutte le cellule presenti in sospensione.

Infine, è stato dimostrato che i tempi di sedimentazione dipendono anche dal tipo di fissativo utilizzato, in genere i campioni fissati con formalina presentano tempi di sedimentazione più brevi, rispetto ai campioni fissati con il Lugol, a causa dell'aumento del peso delle cellule dovuto alla fissazione della formalina alle strutture cellulari.

In generale, per i campioni fissati con Lugol vengono ritenuti sufficienti alla sedimentazione tempi pari a 3 ore per ogni centimetro di altezza del cilindro della camera, ma se il campione è ricco di cellule di piccole dimensioni si preferisce aumentare e addirittura raddoppiare i tempi in modo tale da esser sicuri che gli organismi siano tutti sedimentati. In tab. 1.1 si riportano i tempi di sedimentazione in relazione al volume e all'altezza della camera.

**Tabella 1.1** – Tempi di sedimentazione

<b>Volume camera (ml)</b>	<b>Altezza camera (cm)</b>	<b>Tempo sedimentazione (ore)</b>
2	1	3
10	2	8
25	5	24
50	10	36
100	20	72

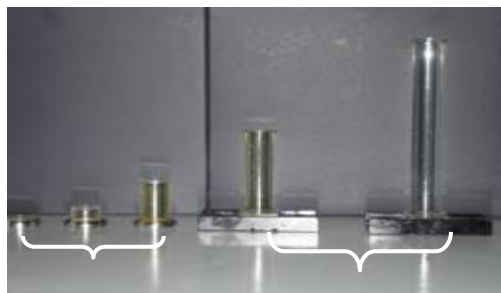
#### **1.4.2 Allestimento delle camere di sedimentazione**

Nella procedura di analisi delle corporazioni fitoplanctoniche secondo il metodo di Utermöhl, i campioni raccolti in natura, fissati e conservati in laboratorio, devono raggiungere una omogenea densità fitoplanctonica in tutto il volume fissato prima di essere versati nella camera di sedimentazione. È necessario che i contenitori contenenti i campioni vengano agitati delicatamente da 100 a 200 volte o per un minuto circa, in modo da far risospendere tutte le cellule depositate durante la conservazione ed ottenerne una distribuzione omogenea nel volume del campione. I campioni vengono, quindi, dispensati nelle camere di sedimentazione e lasciati sedimentare per alcune ore a seconda del volume della camera di sedimentazione utilizzata (vedi tabella 1.1) La sedimentazione deve avvenire a temperatura costante, al buio, su un piano perfettamente orizzontale,

avendo cura di non fare arrivare delle vibrazioni alla camera di sedimentazione. Mantenere una temperatura costante è importante per evitare la risospensione delle cellule provocata dalla creazione di correnti convettive, che altererebbero i processi di sedimentazione, e la formazione di bolle d'aria o l'evaporazione del campione, che renderebbero difficoltosa la lettura al microscopio.

L'allestimento delle camere di sedimentazione viene effettuato con differenti procedure a seconda che si tratti di camere cilindriche o combinate (vedi procedure in questo paragrafo).

**STRUMENTI** *Camere di sedimentazione cilindriche e combinate* – Esistono camere di sedimentazione cilindriche e camere combinate che hanno differenti caratteristiche strutturali (figura 1.6). Le camere di sedimentazione presentano volumi variabili da pochi ml (in genere 2 ml) fino ad un massimo di 100 ml. Le camere cilindriche hanno un'unica struttura costituita dalla camera di sedimentazione (a) e da un vetrino (b) che si poggia sulla camera dopo averla riempita con il campione da analizzare (figura 1.7). Queste camere hanno un volume massimo di 25 ml e un'altezza di massimo 6 cm, ciò permette di allocare la camera direttamente sul tavolino portaoggetti del microscopio per l'osservazione del campione. D'altro canto, le camere combinate sono costituite da più parti che vengono di seguito elencate: alloggiamento della base della camera (c), base della camera di sedimentazione (d), cilindro (e), vetrino per coprire la base (f), vetrino per coprire il cilindro (g) (figura 1.7). Esistono camere combinate fino ad un volume di 100 ml. Tali camere vengono utilizzate in ambienti particolarmente oligotrofici, tuttavia il loro utilizzo è sconsigliato, poiché a causa dell'altezza elevata del cilindro la sedimentazione non avviene in modo tale da garantire la presenza di un numero rappresentativo di cellule sul fondo della camera. Infatti, è stato osservato che se l'altezza della camera è superiore a cinque volte il diametro della stessa, la forza delle correnti convettive fa sì che una parte di fitoplancton non sedimenti mai.



**Figura 1.6** – Camere cilindriche (sinistra) e camere combinate (destra).



**Figura 1.7.** – Parti di una camera cilindrica (sx) e di una camera combinata (dx).

**PROCEDURA** Nel caso delle camere di sedimentazione cilindriche, il campione precedentemente agitato, viene messo nella camera di sedimentazione; quindi, con un vetrino copri-oggetto rotondo e lubrificato con gel al silicone si chiude la camera, facendo attenzione a non creare delle bolle d'aria sia in superficie che lungo le pareti della camera di sedimentazione stessa. Successivamente, si lascia sedimentare il campione e si legge al microscopio ottico invertito.

Nel caso delle camere di sedimentazione combinate, si deve inserire la camera nell'apposito alloggiamento del basamento; successivamente, si deve lubrificare il fondo della stessa con gel al silicone e posizionare la camera di sedimentazione sulla base della camera stessa. La camera viene riempita con il campione precedentemente agitato e viene chiusa con un vetrino rotondo e lubrificato di gel al silicone, facendo attenzione affinché non si creino bolle d'aria in superficie e lungo le pareti della camera stessa; quindi, si lascia sedimentare. Al termine del periodo di sedimentazione, si fa scivolare un vetrino copri-oggetto rettangolare sulla base della camera di sedimentazione e contemporaneamente si sposta la camera di sedimentazione in modo da eliminare l'acqua in eccesso. Il campione è, quindi, pronto per la lettura al microscopio invertito.

**CONSIDERAZIONI** *L'agitazione del campione, fatta per renderlo omogeneo, è un'operazione molto delicata in quanto si rischia, se effettuata in maniera energica, di danneggiare gli organismi più fragili e gli organismi coloniali, ad esempio causando la perdita di flagelli o la rottura delle cellule. Bisogna, inoltre, prestare particolare attenzione al ripiano sul quale si mettono a sedimentare i campioni, che deve essere perfettamente livellato, altrimenti, durante la sedimentazione, le cellule si portano dalla parte del dislivello, causando un errore nel calcolo della densità cellulare. Per ovviare a questo inconveniente si controlla il ripiano con una livella.*

*Può accadere, in alcuni casi, che i campioni da leggere siano molto "sporchi", quindi illeggibili per la presenza di molte particelle di varia natura che si depositano sul fondo, per questo motivo è necessaria una filtrazione dei campioni utilizzando filtri con porosità  $\geq 200\mu\text{m}$ , che è il limite massimo dimensionale del microfitoplancton secondo la classificazione di Sieburth (1979).*

*Può anche accadere che in alcuni casi la densità nei fitoplanctonica sia così elevata che anche con l'uso di camere di sedimentazione con volume molto piccolo le cellule tendano a sedimentare su più piani rendendo difficoltosi conteggio e riconoscimento. In tal caso è suggerito effettuare una diluizione del campione di partenza che dovrà essere inserita nelle formule di calcolo della densità*

### **1.5 Analisi microscopica dei campioni**

L'analisi microscopica ha come obiettivo la stima delle caratteristiche strutturali, tassonomiche e dimensionali, della popolazione fitoplanctonica oggetto di studio. L'analisi microscopica si realizza attraverso 2 fasi principali:

- conteggio ed identificazione degli organismi algali con l'ausilio di chiavi di riconoscimento tassonomico;
- definizione della forma e misura delle caratteristiche morfometriche associate.

L'analisi microscopica viene effettuata utilizzando il microscopio ottico invertito.

**STRUMENTI** *Microscopio ottico invertito* – Per l'analisi dei campioni di fitoplancton il microscopio ottico limita la lettura del campione a poche gocce di liquido da

osservare messe su un vetrino porta-oggetti, mentre utilizzando il microscopio ottico invertito al posto del vetrino portaoggetti si sostituisce una camera col fondo trasparente che può contenere diversi millimetri di campione. Nella camera le cellule sedimentate si troveranno alla base e, per la presenza dell'obiettivo sotto il preparato, sarà possibile identificarle.

L'utilizzo del microscopio ottico invertito (figura 1.8) non permette l'identificazione ed il riconoscimento di cellule algali di dimensioni inferiori a  $5\mu\text{m}$ , tale misura è considerata, quindi, come limite inferiore.

Un microscopio invertito è costituito da una parte ottica:

- fonte luminosa (normalmente è una lampadina ad incandescenza)
- condensatore con il relativo diaframma
- obiettivo (situato sotto il tavolino portaoggetti costituito da una piccola lente) ha il compito di raccogliere la luce da una porzione del campione e concentrarla in un punto (*i.e.*, il fuoco); qui l'immagine viene esplorata grazie alla presenza dell'oculare che è una seconda lente. Scritto sull'obiettivo c'è un numero seguito da una x che corrisponde all'ingrandimento, quindi, maggiore è il numero maggiore sarà l'ingrandimento utilizzato. Anche gli oculari hanno una data potenza che si misura sempre con un numero seguito da una x. L'ingrandimento finale, cioè l'ingrandimento con il quale si osservano gli organismi, è dato quindi dalla combinazione obiettivo-oculare e si calcola moltiplicando il valore dell'obiettivo per il valore dell'oculare; per esempio, con un obiettivo 40x ed un oculare 10x si ottiene un ingrandimento di 400x;
- oculare (lente con cui l'occhio osserva l'immagine formata dall'obiettivo).

Nell'uso del microscopio l'operatore osserva il campione accostando il proprio occhio all'oculare; esiste però una posizione ottimale per l'osservazione dei campioni che è la "pupilla d'uscita". Quando l'occhio si trova in corrispondenza di tale posizione riceve il massimo di luce e può osservare l'intero campo visivo dello strumento. L'"estrazione della pupilla" è la distanza della pupilla d'uscita dall'oculare e, per una visione ottimale, è opportuno che sia non inferiore a 1cm.

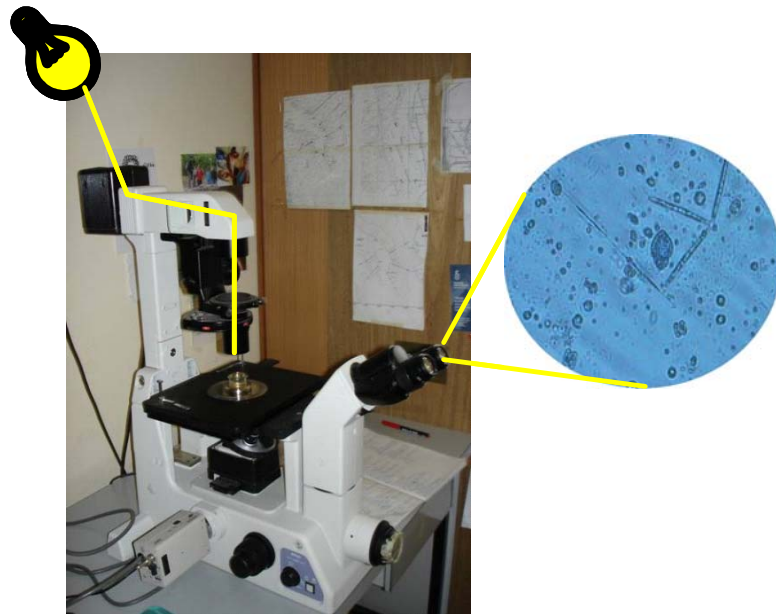
I microscopi sono binoculari, cioè consentono una osservazione del campione con entrambi gli occhi, permettendo quindi di ottenere una visione tridimensionale dell'oggetto.

Alcuni microscopi sono dotati di un "trinoculare" cioè di un terzo tubo posto superiormente alla testata binoculare dove si può collegare una macchina



fotografica, per eseguire microfotografie del campione da esaminare, o una videocamera. Inoltre, in questi microscopi vi è una parte meccanica costituita da:

- corpo del microscopio
- tavolino porta-oggetti
- dispositivo traslatore (è il sistema per spostare micrometricamente il campione in alto o in basso o a destra e a sinistra rispetto all'obiettivo del microscopio)
- torretta porta-obiettivi (è un disco rotante con diverse sedi filettate in cui si inseriscono i diversi obiettivi permettendo di cambiare velocemente l'obiettivo con una semplice rotazione).



**Figura 1.8** – Microscopio ottico invertito con indicazione del percorso ottico.

### **1.5.1 Aspetti preliminari dell'analisi microscopica di campioni di fitoplancton**

Prima di “leggere” il campione di fitoplancton al microscopio ottico invertito, ci sono degli aspetti preliminari che devono essere considerati relativamente a:

- ingrandimento utilizzato
- scelta della dimensione del campione.

➤ **Ingrandimento**

Al termine del processo di sedimentazione, il campione è pronto per essere letto al microscopio ottico invertito. La cella di sedimentazione può essere esaminata utilizzando ingrandimenti diversi. In generale, quando si osserva per la prima volta una camera di sedimentazione si utilizza un ingrandimento di 400x che permette di identificare sia le alghe piccole che quelle grandi. Per le analisi delle caratteristiche morfometriche è opportuno non cambiare mai ingrandimento; in caso questo sia necessario, è indispensabile annotare l'ingrandimento utilizzato. Per il riconoscimento tassonomico questi vincoli non esistono. Quando si devono riconoscere organismi algali di piccole dimensioni è necessario usare un elevato ingrandimento ed un obiettivo ad immersione (1000x), quando al contrario, le cellule hanno elevate dimensioni si possono utilizzare ingrandimenti minori per esempio di 100x.

➤ **Scelta della dimensione del campione**

Uno dei principali quesiti che si sono posti i diversi ricercatori che operano nel campo dell'ecologia del fitoplancton riguarda il numero di cellule da contare in ciascun campione in modo che tale numero risulti significativo e rappresentativo dei parametri che si vogliono stimare (abbondanza numerica, parametri tassonomici e parametri morfometrici) e nello stesso tempo richieda sforzo di campionamento e tempi di analisi ragionevoli. Per rispondere a questo quesito si può fare ricorso ai principi generali dell'analisi statistica inferenziale che si propone, attraverso la descrizione delle caratteristiche di un campione, di ottenere informazioni sulla popolazione da cui il campione è stato estratto, cioè di inferire circa le proprietà della popolazione.

É noto che i risultati delle misurazioni effettuate su un campione di individui estratto da una popolazione più ampia di individui è sempre associato ad una certa percentuale di errore, in quanto il campione non sarà mai perfettamente rappresentativo della popolazione da cui è stato estratto. Pertanto, i parametri misurati nel campione forniscono soltanto una stima dei parametri reali di popolazione. É intuitivo che il numero di unità che compongono il campione cioè la sua dimensione, è uno dei fattori più importanti che influisce sulla precisione della stima: campioni di grandi dimensioni permettono stime più precise. Una

stima costituisce una valutazione approssimativa che per definizione non può essere esatta; però, se il campione è stato selezionato con una metodica corretta (randomizzazione ovvero estrazione casuale dei campioni dall'universo campionario), si può stabilire la variabilità, ossia i limiti probabili di variazione.

Gli errori del campionamento e del sub-campionamento In primo luogo, le misure effettuate su un campione, per quanto ben costruito, sono influenzate dagli errori dovuti al campionamento. Per le corporazioni fitoplanctoniche, i campioni raccolti contengono, in genere molti più organismi di quelli che ragionevolmente si possono contare, pertanto è necessario procedere ad ulteriori sub-campionamenti, riguardanti i passaggi:

- dalla bottiglia di campionamento alla camera di sedimentazione
- dalla camera di sedimentazione alla porzione di superficie effettivamente analizzata (numero di transetti, numero di campi casuali).

Chiaramente entro ciascuna suddivisione del campione viene introdotta una nuova fonte di errore. Per poter avere una stima esatta degli errori introdotti durante il campionamento e le varie fasi di sub-campionamento occorrerebbe avere un numero di repliche significativo per ognuno di essi. Tale procedimento appesantirebbe enormemente il già gravoso lavoro di analisi poiché, calcolando di dover disporre di almeno tre repliche per ogni passaggio, sarebbe necessario esaminare un numero eccessivo di campioni (maggiori approfondimenti riguardanti la statistica del sub-campionamento sono riportati in Venrick, 1971). Poiché il conteggio, il riconoscimento tassonomico e la determinazione delle caratteristiche morfometriche sono tecniche molto laboriose che richiedono lunghi tempi di analisi è necessario per quanto possibile limitare il numero di repliche da analizzare.

Per limitare le cause di errore durante il campionamento e successivi sub-campionamenti si possono utilizzare diversi accorgimenti:

- in campo, in luogo di un solo prelievo di un certo volume sarebbe opportuno prelevare in punti adiacenti più campioni di volume inferiore; ad esempio, invece di prelevare un unico campione di 4l sarebbe opportuno prelevare 4 campioni da 1 litro, separati da una distanza di 50cm l'uno dall'altro; si aumenta così la rappresentatività del sito di campionamento;

▪ in laboratorio, i campioni possono essere letti separatamente, ottenendo una stima della variabilità tra repliche, oppure possono essere mescolati e letti come un unico campione.

Per quanto riguarda il primo sub-campionamento, ovvero dalla bottiglia alla camera di sedimentazione, per ridurre l'errore sarebbe necessario effettuare la determinazione su almeno tre sub-campioni, prelevati dalla stessa bottiglia. Il primo campione, sedimentato ed esaminato, dovrebbe essere rimesso nella bottiglia, rimescolato al resto del campione prima di procedere alla determinazione del secondo sub-campione e così di seguito. Questo naturalmente allungherebbe di molto i tempi di analisi, pertanto molti autori sono concordi nel ritenere sufficiente analizzare un singolo sub-campione, purché siano soddisfatte le seguenti condizioni:

- il volume di acqua da sedimentare deve provenire da un campione ben mescolato (randomizzato) ovvero i sub-campioni devono essere estratti da una popolazione di individui distribuita casualmente in maniera tale che tra sub-campioni non si osservino differenze significative;
- il tempo di sedimentazione deve essere sufficientemente lungo in modo tale da assicurare che tutte le cellule raggiungano il fondo della camera;
- il numero di cellule contate, identificate e misurate sul fondo della camera di sedimentazione deve essere sufficientemente elevato per consentire una stima quanto più precisa possibile dei parametri analizzati nella popolazione.

Per quanto riguarda, infine, il secondo sub-campionamento, ovvero l'intera area della camera di sedimentazione rispetto alla porzione di camera effettivamente letta, è chiaro che l'errore è eliminabile completamente contando l'intera camera. Tuttavia, poiché procedere in questo modo richiede tempi lunghi di analisi, le caratteristiche degli individui sono rilevate su un numero significativo di cellule procedendo per campi casuali o per transetti.

La dimensione del campione e l'errore nella stima. Precedentemente è stata più volte ripetuta la frase "i parametri vengono rilevati su un numero significativo di cellule". Naturalmente, il numero di cellule da contare ovvero la dimensione del campione, deve essere quanto più rappresentativo possibile (in senso statistico) dei valori reali della popolazione da cui gli individui analizzati sono stati estratti. Questa condizione può essere considerata valida se durante il campionamento e le due fasi di sub-campionamento sono stati applicati correttamente i metodi per

la randomizzazione del campione (*i.e.*, prelievo casuale dei campioni dal sito di campionamento, adeguati tempi di mescolamento e sedimentazione dei campioni, scelta casuale di transetti o campi). È possibile determinare la rappresentatività del campione e l'errore della stima se viene rispettata la condizione che tutti gli individui siano distribuiti casualmente all'interno della popolazione campionaria. In questa condizione di distribuzione casuale è possibile individuare gli errori della stima delle misurazioni utilizzando i parametri statistici di alcune distribuzioni di probabilità quali ad esempio la distribuzione di *Poisson*, o la distribuzione normale. Per dimensioni del campione superiori a 30 individui la distribuzione di *Poisson* approssima la distribuzione normale; inoltre, per ragioni pratiche si preferisce fare riferimento alla curva normale standardizzata (cfr. Soliani, 1990). La distribuzione normale standardizzata è anche chiamata *distribuzione dei punti z* (o punti standard) in cui  $z$  indica il numero di scarti sotto o sopra la media.

Nei problemi di stima l'area sottesa alla curva normale standardizzata non rappresenta solo una proporzione ma una vera e propria probabilità, dato che la curva normale, per il teorema del limite centrale, è il modo con cui si distribuiscono le medie di tutti i possibili campioni casuali di numerosità superiore a 30, estratti da una popolazione qualsiasi. L'area complessiva della curva normale rappresenta in tal caso la probabilità dell'evento certo e quindi è uguale a 1.

L'area al di sopra di un determinato valore di ascissa rappresenta la probabilità che la media di un qualsiasi campione estratto cada oltre quel valore e l'area che al di sotto rappresenta la probabilità che la media cada al di sotto di quel valore.

- L'area di probabilità compresa tra i valori di ascissa  $-1.64$  e  $+1.64$  è uguale a 0.90; quindi in una distribuzione normale standardizzata un punto  $z_i$  ha una probabilità del 90% di cadere all'interno di questo intervallo e una probabilità del 10% di cadere all'esterno.
- L'area di probabilità compresa tra i punti di ascissa  $-1.96$  e  $+1.96$  è uguale a 0.95; quindi in una distribuzione normale standardizzata un punto  $z_i$  ha una probabilità del 95% di cadere all'interno dell'intervallo considerato e una probabilità del 5% di cadere all'esterno.
- L'area di probabilità compresa tra i punti di ascissa  $-2.58$  e  $+2.58$  è uguale a 0.99; quindi in una distribuzione normale standardizzata un punto  $z_i$  ha una

probabilità del 99% di essere compreso in questo intervallo e una probabilità dell'1% di cadere all'esterno.

Un campione casuale è rappresentativo nella misura in cui il valore del parametro oggetto di stima cade all'interno dell'intervallo di fiducia considerato. Se si lavora con un intervallo di fiducia del 95% si ha una probabilità di 0.95 di estrarre dalla popolazione un campione rappresentativo, cioè un campione che rende vera l'affermazione: “il parametro della popolazione è compreso tra i limiti dell'intervallo di fiducia” durante l'operazione di stima.

Il campione estratto non è rappresentativo se proviene dalla “code” della distribuzione campionaria. Non si può mai essere certi che il campione estratto non provenga da tali “code”, ma si può quantificare questa probabilità che più esattamente è la probabilità di commettere un errore nell'operazione di stima dell'intervallo.

Pertanto, per stimare in modo statistico il numero utile di cellule da contare è necessario stabilire a priori due parametri:

- la probabilità con cui si vuole effettuare la stima (90%, 95% o 99%);
- l'accuratezza con cui si vuole effettuare la stima (espressa in termini dell'errore relativo che si intende accettare).

Successivamente, in base all'espressione dell'intervallo di confidenza della media, si determina il numero di elementi  $n$  del campione in grado di soddisfare le condizioni prefissate in base alla equazione:

$$n = z_{\alpha}^2 * \sigma^2 / \delta^2 \quad \text{Eq. 1.12}$$

dove

$n$  = dimensione del campione

$z$  = valore di  $z$  per un certo valore di probabilità  $\alpha$  ( $z = 1.96$  per  $\alpha=0.05$ ;  $z = 2.33$  per  $\alpha = 0.01$  )

$\sigma$  = deviazione standard (variabilità della popolazione)

$\delta$  = errore standard (incertezza della stima)

Poiché  $\sigma$  nelle distribuzioni normali standardizzate è uguale a 1 la equazione 1.12 diventa:

$$n = z_{\alpha}^2 / \delta^2 \quad \text{Eq. 1.13}$$

per cui, se per esempio si vuole conoscere la dimensione minima del campione necessaria affinché l'errore nella stima non superi il 20% e la probabilità di

sbagliare non deve essere superiore a 0.05, il numero di cellule da contare e misurare deve essere almeno di 96 come indicato nell'equazione seguente:

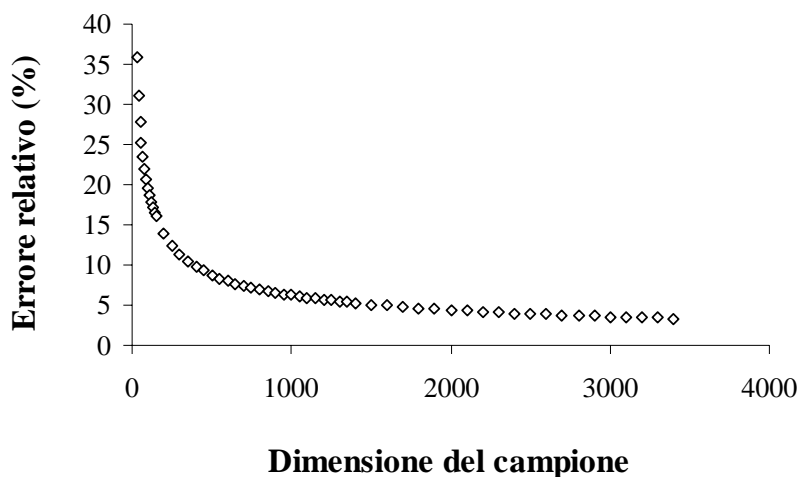
$$n = 1.96 * 1.96 / (0.20 * 0.20) = 96$$

Dalla equazione 1.13 è possibile ottenere l'errore relativo:

$$\delta = z_{\alpha} (100\%) / \sqrt{n} \quad \text{Eq. 1.14}$$

Al crescere della numerosità dei campioni tratti da una popolazione aumenta la precisione della stima dei parametri; tuttavia, poiché essa è proporzionale alla radice quadrata del numero di individui, ne consegue che raddoppiando il numero di individui analizzati, l'errore commesso non viene dimezzato (figura 1.9).

Per determinare il numero di individui da contare è importante tener conto del tipo di relazione che lega l'errore e la dimensione campionaria, oltre che ai tempi e ai costi richiesti per le analisi. Nelle determinazioni dell'abbondanza degli organismi algali un errore di stima compreso tra il 10 e il 15% è in genere considerato accettabile per la maggior parte delle ricerche scientifiche. Tale errore corrisponde ad una dimensione campionaria pari a 200-400 individui.



**Figura 1.9** – Relazione tra errore relativo e numerosità campionaria.

Dimensione campionaria e ricchezza in specie/classi di taglia Un altro problema di cui si deve tener conto nella scelta della dimensione del campione riguarda la rappresentatività della ricchezza in specie, ovvero del numero di specie, e della struttura in taglia delle popolazioni fitoplanctoniche stimata con il campionamento. Per semplicità, nel prosieguo del presente paragrafo si farà

riferimento principalmente alla ricchezza tassonomica, intendendo che il termine specie viene utilizzato anche in modo sostitutivo del termine classe di taglia.

Il metodo precedentemente enunciato per la definizione della numerosità del campione ai fini della determinazione della densità si basa sul principio della distribuzione casuale di ogni individuo all'interno di una popolazione ovvero presuppone che ogni individuo abbia la stessa probabilità di essere contato ed analizzato in relazione alle caratteristiche tassonomiche e morfometriche. Tuttavia, non tutte le specie all'interno di un campione hanno la stessa probabilità di essere campionate, le specie comuni presentano una probabilità più elevata rispetto alle specie rare. Infatti, la dimensione del campione scelta come rappresentativa della abbondanza numerica e delle caratteristiche tassonomiche e morfometriche delle popolazioni fitoplanctoniche, viene in genere considerata come rappresentativa delle caratteristiche delle specie più abbondanti, ma non delle specie rare. In considerazione di ciò, la dimensione campionaria può non essere rappresentativa riguardo al numero di specie presenti in un campione.

È possibile stimare la rappresentatività del campione relativamente alla ricchezza in specie facendo ricorso ad esempio al metodo della rarefazione (Sanders, 1968 modificato da Hulbert, 1971), che permette di calcolare il numero di specie attese in campioni di numerosità standard (ad esempio 1000 individui). L'algoritmo di rarefazione è:

$$E(S_n) = \sum_{i=1}^S \left[ 1 - \frac{\binom{N-m_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right] \quad \text{Eq. 1.15}$$

dove

$E(S_n)$  = numero di specie atteso in un campione casuale di  $n$  individui

$S$  = numero totale di specie nell'intero raggruppamento

$n$  = numero di individui scelto per la standardizzazione ( $n \leq N$ )

$N$  = numero totale di individui nel raggruppamento

$m_i$  = numero di individui della specie  $i$ .

Il termine all'interno della parentesi quadra rappresenta la probabilità che un campione di  $n$  individui contenga la specie  $i$ -esima.



Una volta ottenuto il numero di specie attese, lo si confronta statisticamente con il numero di quelle osservate e si vede qual è il numero di individui statisticamente significativo da contare.

Il metodo della rarefazione presenta alcuni svantaggi:

- i calcoli implicano un gran numero di fattoriali;
- si ha una perdita di informazione in quanto, mentre prima della rarefazione è noto il numero di specie e la loro relativa abbondanza per ogni singolo campione, dopo la rarefazione l'informazione che rimane è il numero di specie attese per campione;
- i campioni comparati potrebbero essere tassonomicamente simili in quanto la rarefazione non è interessata al nome delle specie;
- la rarefazione può essere usata solo su campioni provenienti dallo stesso habitat o da habitat simili poiché è noto che differenti habitat hanno differenti ricchezze in specie;
- le curve di rarefazione non possono essere estrapolate in campioni con un elevato numero di individui.

In alternativa al metodo della rarefazione, la stima della dimensione del campione che rappresenti significativamente la ricchezza in specie può essere effettuata dall'analisi delle relazioni tra numero di specie e numerosità del campione.

È noto che, per campioni omogenei, all'aumentare del numero di individui aumenta anche il numero delle specie sino ad un valore (*plateau*) oltre il quale il numero di specie rimane costante. Questo andamento è stato confermato in una serie di prove sperimentali effettuate su un numero significativo di campioni a diversa concentrazione di clorofilla *a* in cui sono state analizzate, con incrementi progressivi di 50 individui fino ad un numero massimo di 1000 individui (precisione di conteggio stimata al 6%), le relazioni tra ricchezza in specie e numerosità campionaria. La funzione matematica che esprime in modo oggettivo la relazione tra le due variabili, detta equazione di regressione o funzione di regressione della variabile Y sulla variabile X è:

$$y = \frac{ax^2}{b^2 + x^2} \quad \text{Eq. 1.16}$$

dove

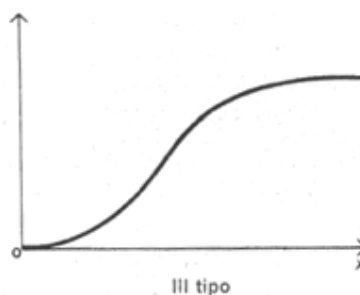
$y$  = numero di specie (o numero di classi di taglia)

$x$  = numero di individui contati

$a$  = massimo numero di specie rilevabile

$b$  = costante di semisaturazione (determina il valore del numero di individui da contare al quale il numero di specie è metà del livello di saturazione).

Tale equazione rappresenta l'espressione matematica della risposta funzionale del III tipo (Holling, 1959) la cui rappresentazione grafica è una curva sigmoide (figura 1.10).



**Figura 1.10** – Risposta funzionale del III tipo (Holling,1959), da Smith (1975).

É possibile stimare la significatività statistica della curva calcolata, utilizzando il test F che si basa sulla scomposizione delle devianze e dei relativi gradi di libertà. Il valore del test F con g.d.l. 1 e  $n-2$  è calcolato attraverso la equazione:

$$F_{(1, n-2)} = \text{varianza della regressione} / \text{varianza d'errore} \quad \text{Eq. 1.17}$$

dove

*varianza della regressione* = rapporto della devianza della regressione con i suoi g.d.l.;

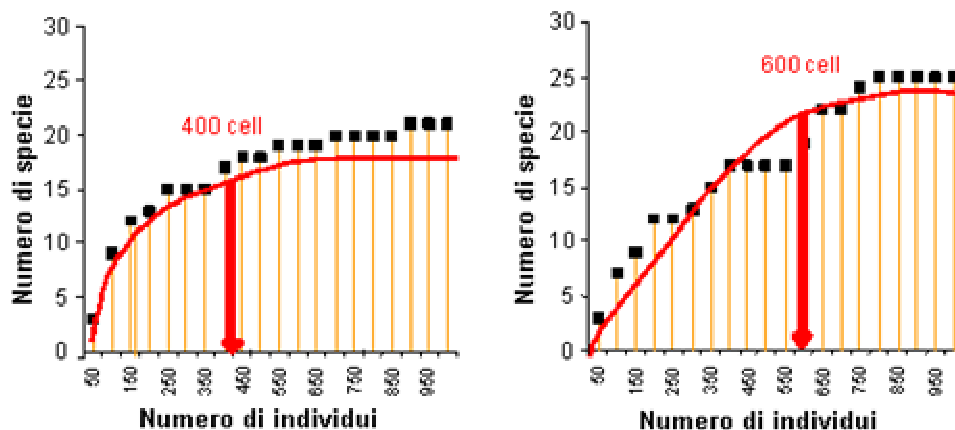
*varianza d'errore* = rapporto della devianza d'errore con i suoi g.d.l..

Dai valori dei dati sperimentali delle variabili X (numero di individui) e Y (numero delle specie osservate o delle classi di taglia osservate), utilizzando un *software* di analisi statistica, è stato possibile calcolare i parametri delle relazioni tra ricchezza in specie e dimensione del campione, in particolare i valori dei coefficienti  $a$  (numero delle specie attese o delle classi di taglia attese) e  $b$  (valore della costante di semisaturazione); inoltre sono state calcolate la *varianza della regressione* e la *varianza d'errore* (figura 1.11).

Un esempio di applicazione della risposta funzionale del terzo tipo è il seguente:

$$Y_1 = 18.91 x^2 / (153.23)^2 + x^2$$

$$Y_2 = 25.65 x^2 / (270.22)^2 + x^2$$



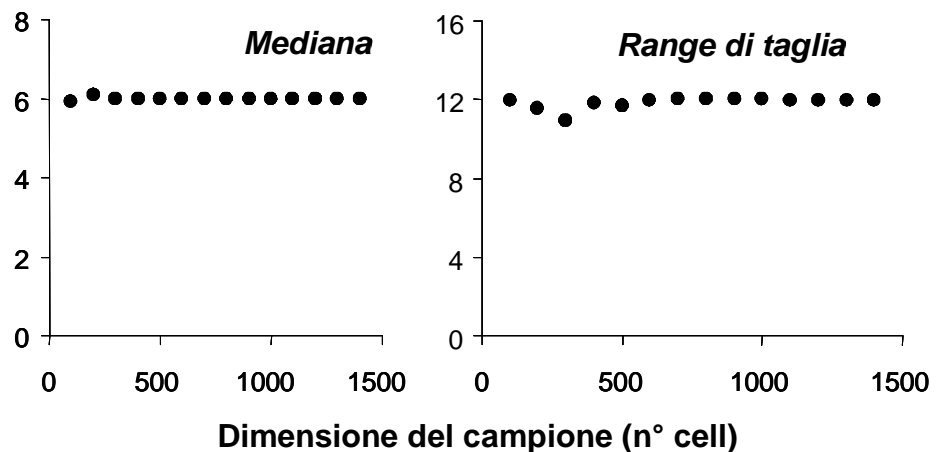
**Figura 1.11** – Due esempi del III tipo di relazione osservata a differenti concentrazioni di clorofilla a ( $0.25\mu\text{g}$  nel 1° caso e  $0.61\mu\text{g}$  nel 2° caso). Le relazioni sono state analizzate su incrementi progressivi di 50 individui fino ad un massimo di 1000 individui.

Le relazioni analizzate sono risultate significative con un  $P < 0.05$  e g.d.l.= 1-18; pertanto, il coefficiente  $b$  dell'equazione di regressione, può essere utilizzato per fornire indicazioni sulla dimensione del campione significativa per la ricchezza in specie. Esso, infatti, rappresenta il valore di semisaturazione ossia il valore del numero di individui in cui ricadono circa la metà del numero di specie atteso nel campione.

Il numero totale di specie atteso può essere stimato in funzione della velocità con cui la retta si avvicina all'asintoto ed in genere essa corrisponde circa al doppio del valore della dimensione del campione fornito da  $b$ . Più precisamente la dimensione del campione è quella corrispondente al punto di raggiungimento dell'asintoto come indicato in figura 1.11, che corrisponde a 400-600 cellule. Tenendo conto di quanto detto precedentemente riguardo allo sforzo di campionamento, la dimensione del campione che si ritiene adeguata per rappresentare in maniera statisticamente significativa sia l'abbondanza che la diversità del campione deve essere di almeno 400 cellule.

*Dimensione campionaria e struttura in taglia* Un esempio analogo può essere fatto considerando la dimensione del campione necessaria per descrivere adeguatamente le caratteristiche della struttura dimensionale delle corporazioni

fitoplanctoniche. Nei grafici sottostanti sono riportate le relazioni tra la dimensione del campione (numero di cellule contate) e due caratteristiche descrittive della struttura dimensionale delle corporazione fitoplanctoniche: taglia mediana e range di taglie. Per un maggiore approfondimento metodologico sui modelli di calcolo delle caratteristiche delle strutture dimensionali fare riferimento al capitolo 3 del presente manuale. L'analisi delle relazioni riportate in figura 1.12 evidenzia come la struttura dimensionale sia molto più conservativa rispetto alla struttura tassonomica e la sua descrizione richiede uno sforzo di campionamento molto inferiore rispetto a quello necessario per descrivere la struttura tassonomica. Infatti, negli esempi riportati, uno sforzo di conteggio di 100 cellule è sufficiente per stabilizzare taglia mediana e range di taglie.



**Figura 1.12** – Due esempi di relazione osservata tra la dimensione del campione e taglia mediana e range di taglia. Le relazioni sono state analizzate su incrementi progressivi di 100 individui fino ad un massimo di 1500 individui.

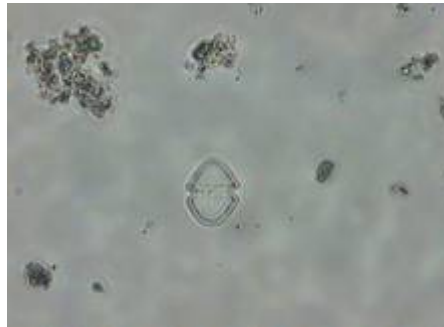
La procedura descritta per stabilire la numerosità delle cellule da contare in ogni campione ai fini della determinazione di ricchezza tassonomica e spettri in taglia può essere effettuata da qualsiasi operatore per adattarla alle condizioni particolari degli ecosistemi di transizione studiati. Semplicemente è necessario effettuare su campioni preliminari conteggi successivi di 50 cellule fino ad un massimo di 2000 cellule contate per campione, valutando successivamente la risposta funzionale ricalcolando le equazioni presentate e stimando la numerosità delle cellule in rapporto al valore asintotico riscontrato.

### 1.5.2 Conteggio degli organismi

#### ➤ Conteggio dei singoli individui algali

Tutti gli organismi algali osservati al microscopio devono essere conteggiati, bisogna fare attenzione però a:

- distinguere le cellule morte da quelle vive, operazione talvolta difficile. Esistono in commercio, dei fissativi che colorano l'interno della cellula facilitando questa distinzione, altrimenti bisogna osservare se nella cellula ci sono degli organelli come il nucleo o i cloroplasti colorati oppure è vuota ed in questo caso si osserva la teca (figura 1.13);
- se la cellula è situata a cavallo tra due campi, bisogna non contarla due volte;
- spesso capita di non riuscire a identificare un organismo, è bene sempre contarlo e, quando è possibile, fare una fotografia o un disegno che lo rappresenti e che possa servire per un eventuale identificazione successiva.



**Figura 1.13** – Teca di un Dinophyceae indeterminato.

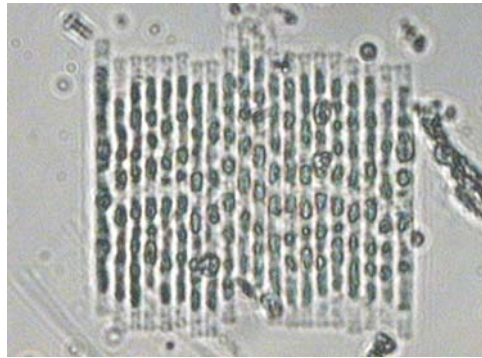
#### ➤ Conteggio degli organismi coloniali

Il conteggio è un'operazione semplice se si considerano organismi unicellulari, ma può divenire laboriosa se gli organismi sono coloniali.

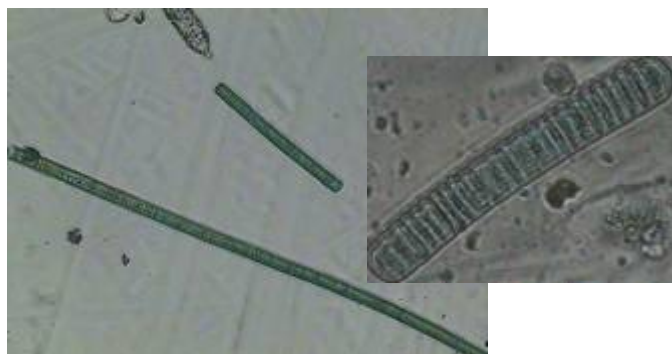
Alcune forme coloniali di Bacillariophyceae, per esempio il genere *Asterionella*, *Fragilaria* (figura 1.14) e *Melosira*, o di Clorophyceae come il genere *Sphaerocystis* o anche di Chrysophyceae come il *Dynobrium*, sono facili da distinguere e quindi da contare, mentre per la maggior parte delle Cyanophyceae per i generi *Oscillatoria* (figura 1.15), *Anabaena* e *Microcystis* il conteggio diventa più complicato.

Se le colonie sono filamentose, basta contare la lunghezza di qualche individuo, disposto su filamenti diversi, in questo modo si ottiene un valore di lunghezza

medio per individuo. Successivamente, misurando la lunghezza di ciascun filamento è possibile risalire al numero di individui che costituiscono la colonia. Se la colonia è sferica, per valutarne le dimensioni si mette a fuoco sul piano focale più basso e su quello più alto e si risale, dallo spostamento compiuto sulla scala della messa a fuoco allo spessore della colonia; quindi si misurano le dimensioni della colonia e degli individui. In tal modo, è possibile calcolare il volume della colonia e risalire al numero di cellule che la costituiscono. Questo metodo può comportare molti errori, ad esempio, nel caso in cui la colonia abbia forme geometriche complesse con diramazioni nelle tre dimensioni spaziali. Per questo motivo, nell'analisi di un campione molto ricco di organismi coloniali si preferisce considerare ogni colonia come singolo individuo.



**Figura 1.14** – Colonia di *Frigilaria* sp. Si distinguono bene le 20 cellule che costituiscono la colonia.



**Figura 1.15** – Colonie di *Oscillatoria* sp. e ingrandimento della colonia.

➤ **Metodi di conteggio**

Il conteggio delle cellule può essere eseguito in modi diversi. Più esattamente si può effettuare un:

- conteggio per transetti
- conteggio per campi casuali
- conteggio sull'intera camera
- conteggio per presenza-assenza.

In generale, la lettura di un campione di fitoplancton dovrebbe prevedere una combinazione delle prime tre strategie di conteggio.

Conteggio per transetti Questo sistema di conteggio prevede l'identificazione delle cellule algali su transetti di lunghezza pari al diametro della camera di sedimentazione e di larghezza pari al diametro del campo visivo. Il numero di transetti da esaminare può andare da un minimo di due ad un massimo che dipende dal numero di individui che bisogna conteggiare.

Conteggio per campi casuali Consiste nell'esaminare in maniera casuale un certo numero di campi microscopici. Il numero dei campi dipende sempre dal numero di cellule che devono essere identificate e, quindi, dalla precisione che si vuole raggiungere.

La scelta dei campi casuali può avvenire mediante un generatore di numeri casuali, estraendo delle coppie di coordinate x e y dal tavolino traslatore. È importante definire le coordinate che delimitano l'area della camera in modo che, una volta estrapolate, ricadano sempre nell'area di studio.

Conteggio sull'intera camera È una metodica che viene utilizzata per contare solo le specie rare o quelle di grandi dimensioni, che possono essere riconosciute con degli ingrandimenti bassi. Il conteggio sull'intera camera è, quindi, un tipo di conteggio che richiede molto tempo.

Conteggio per presenza-assenza È il conteggio più rapido in quanto si prevede che si rilevi solo la presenza o meno delle specie fitoplanctoniche. Per effettuare il conteggio in modo preciso ( $\alpha = 0.05$  dove  $\alpha$  indica il livello di significatività) è necessario leggere molti campi ad esempio, per stabilire l'assenza di una specie su 1000 campi oculari ne devono essere letti 950.

### **1.5.3 Identificazione degli organismi algali**

L'osservazione al microscopio invertito permette contemporaneamente al conteggio di identificare classificare gli organismi algali dal punto di vista tassonomico mediante la consultazione di testi appropriati e delle chiavi di riconoscimento. Le chiavi di riconoscimento tassonomico, sono caratterizzate da una prima parte dove si illustrano le caratteristiche generali della morfologia esterna delle classi, da una seconda parte che è la chiave vera e propria per la determinazione del genere e da una terza parte per la determinazione delle specie comprese in ciascun genere.

Per facilitare ulteriormente il riconoscimento di tutte le specie è riportato il disegno o una foto con le caratteristiche morfometriche principali.

Per il riconoscimento tassonomico dei taxa fitoplanctonici si possono consultare i seguenti testi:

- Rampi L. Bernhard M. (1980) *Chiave per la determinazione delle diatomee pelagiche mediterranee C.N.E.N RT/BIO (79) 8;*
- Rampi L. Bernhard M. (1980) *Chiave per la determinazione delle peridnee pelagiche mediterranee C.N.E.N RT/BIO (80) 8;*
- Rampi L. Bernhard M. (1980) *Chiave per la determinazione delle coccolitoforidee mediterranee C.N.E.N RT/BIO (81) 13;*
- Schiller J. (1933-1937) *Dinoflagellatae (Peridinae), I – II. In L. Rabenhorst Kriptogamen Flora von Deutschland, Osterreich und der Schweiz, Leipzig, Akad. Verlag. Vol 10 ;*
- Sournia A. (1986) *Atlas du Phytoplancton Marin. Volume 1;*
- Sournia A. (1986) *Atlas du Phytoplancton Marin. Volume 3;*
- Tomas R.C. (1996) *Identifying Marine Phytoplankton. Academy Press pp.858.*

**PROCEDURA** Utilizzando un ingrandimento 400x si inizia a leggere il campione sedimentato utilizzando la strategia di conteggio ritenuta più idonea. Sul protocollo di lavoro si annota la stazione e la profondità a cui è stato prelevato il campione, il volume della camera utilizzata per la sedimentazione, la data del prelievo su campo e la data della lettura in laboratorio. A questo punto si inizia la lettura e contemporaneamente si scrive per ogni campo, quali e quanti organismi algali si



riconoscono (allegato 1.1). Una volta identificate e contate un numero di cellule significativo ai fini delle finalità dello studio (cfr. paragrafo 1.5.1), si osserva l'intera camera per le specie rare.

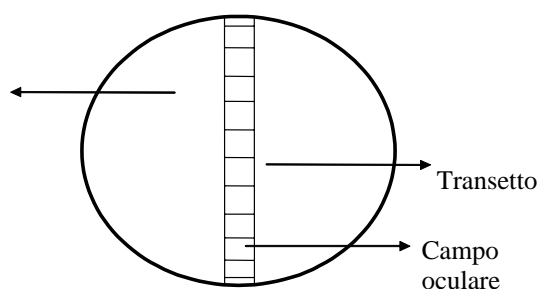
**CONSIDERAZIONI** *La delimitazione del campo oculare è un aspetto importante nella fase del conteggio cellulare perché leggere un campo più volte comporta un errore nella stima della densità cellulare e della diversità specifica del campione.*

*Per ovviare a questo inconveniente è bene operare nel modo seguente:*

- *per la scelta del transetto si può partire dall'estremità inferiore della cella di sedimentazione (figura 1.16) e procedere verso l'alto;*
- *per la lettura dei campi, partendo dall'estremità inferiore della cella di sedimentazione si esamina il primo campo prendendo dei punti di riferimento che delimitano l'area del campo, successivamente si sposta la camera verso l'alto fino ad arrivare al campo successivo dove si prendono altri punti di riferimento sempre per delimitare l'area del campo.*

*Quando si arriva all'estremità superiore della camera di sedimentazione ci si sposta lateralmente a destra o a sinistra e si scende; si continua così sino ad arrivare al numero stabilito di cellule da riconoscere.*

*I punti di riferimento sono importanti in quanto si evita di contare lo stesso campo più volte.*



**Figura 1.16** – Posizionamento di un transetto

#### **1.5.4 Determinazione della densità cellulare dei campioni**

Per il calcolo della densità fitoplanctonica si possono utilizzare diverse formule a seconda della strategia di conteggio utilizzata.

Nel caso di conteggi effettuati su transetti passanti per il centro della camera di sedimentazione, si applicare la seguente formula:

$$\text{Densità cellulare (cell/l)} = (N * \pi * r * 1000) / (2 * h * v * n) \quad \text{Eq. 1.18}$$

dove

N = numero totale delle cellule lette

r = raggio della camera di sedimentazione (mm)

h = altezza del transetto ovvero diametro del campo visivo (mm)

v = volume del campione messo a sedimentare (ml)

n = numero dei transetti sui quali si è effettuato il conteggio.

Nel caso di conteggi su campi casuali, si applica la seguente formula:

$$\text{Densità cellulare (cell/l)} = (N * 1000 * A) / (n * v * a) \quad \text{Eq. 1.19}$$

dove

N = numero totale delle cellule lette

A = area totale della superficie di fondo della camera (mm<sup>2</sup>)

n = numero dei campi sui quali viene effettuato il conteggio

v = volume del campione messo a sedimentare (ml)

a = area del campo visivo considerato (mm<sup>2</sup>)

Nel caso di campioni letti sull'intero fondo della camera, la formula da utilizzare è la seguente:

$$\text{Densità cellulare (cell/l)} = (N * 1000) / v \quad \text{Eq. 1.20}$$

dove

N = numero totale delle cellule lette

v = volume del campione messo a sedimentare (ml).

## **1.6 Determinazione della forma e misura delle caratteristiche morfometriche associate: il biovolume, l'area superficiale e la biomassa fitoplanctonica**

Oltre alla stima del conteggio e al riconoscimento tassonomico degli organismi algali, in questo manuale, vengono descritte le procedure per la determinazione di alcune caratteristiche legate alla forma e alle dimensioni delle cellule algali, quali il biovolume, l'area superficiale e la biomassa. Biovolume e biomassa sono i parametri base che vengono utilizzate per la determinazione delle distribuzioni taglia-abbondanza che verranno descritte nel capitolo 3.

In particolare per biovolume si intende il volume cellulare di ogni organismo fitoplanctonico. La corretta determinazione del biovolume algale è importante poiché consente di effettuare stime della biomassa fitoplanctonica.

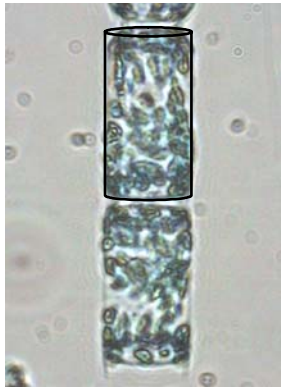
Esistono diversi metodi per la stima del biovolume e della relativa biomassa, basati sull'impiego di sistemi automatici, semiautomatici e manuali (*i.e.*, conteggio elettronico di particelle, citometria a flusso, sistemi automatici di analisi immagine, tomografia computerizzata, stima manuale delle dimensioni lineari e relativo calcolo del volume). I metodi che utilizzano sistemi automatici o semiautomatici, tuttavia, presentano una serie di problematiche che impediscono la loro applicabilità nelle analisi di routine, quali ad esempio bassa risoluzione tassonomica, elevati costi della strumentazione e lunghi tempi di analisi. Per questo motivo, ancora oggi, il metodo più diffuso per il calcolo del volume cellulare è quello manuale nel quale le alghe vengono assimilate a forme geometriche delle quali vengono misurate, al microscopio ottico, le dimensioni lineari necessarie per la determinazione del biovolume delle cellule algali.

### **1.6.1 Identificazione della forma geometrica più idonea**

La prima operazione è quella di identificare la forma geometrica più idonea, infatti l'accuratezza del metodo dipende dal set di forme geometriche selezionate. Le cellule fitoplanctoniche variano molto nella loro forma e pertanto la selezione dell'equivalente modello geometrico richiede molta attenzione. E' raccomandabile fare un'indagine preliminare sui campioni da analizzare per valutare che tipo di specie devono essere misurate e poi assegnare l'equivalente

forma geometrica. Questo servirà per stimare il set di forme più idoneo e costituirà una appropriata guida per assicurarsi che vengano effettuate tutte le misure lineari necessarie. Come regola generale, per limitare il numero di misure lineari da effettuare al microscopio e quindi lo sforzo della lettura dei campioni, la forma geometrica associata deve essere semplice (figura 1.17); tuttavia, in alcuni casi è necessario ricorrere a una combinazione di più forme geometriche semplici (figura 1.18). In questi casi il biovolume si calcola facendo la somma delle forme geometriche semplici utilizzate.

CILINDRO



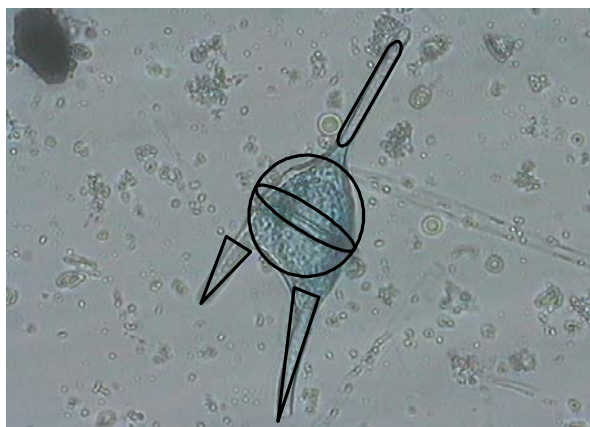
SFERA



Bacillariophyceae – *Cerataulina* sp.

Coccolithophoridae – *Rhabdosphaera* sp.

**Figura 1.17** – Assimilazione delle alghe fitoplanctoniche a forme geometriche semplici.



CILINDRO

+

ELLISSOIDE

+

DUE CONI

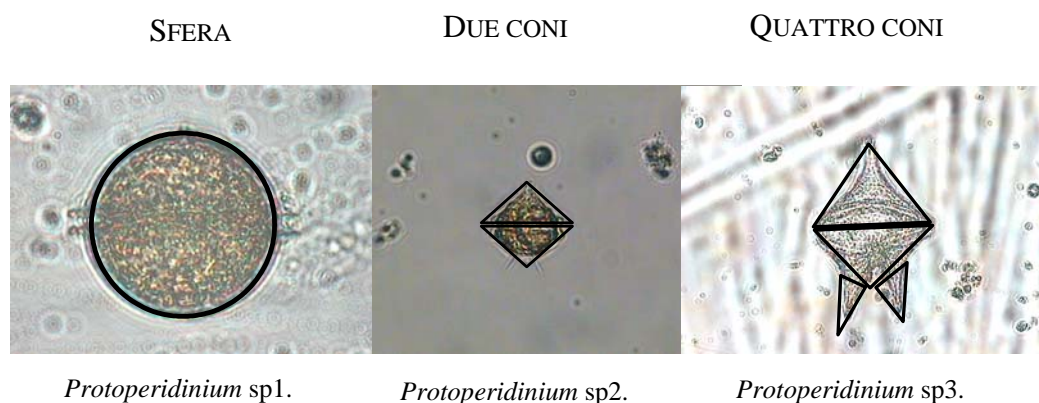
Dinophyceae – *Ceratium* sp.

**Figura 1.18** – Assimilazione delle alghe fitoplanctoniche a forme geometriche composte.

In letteratura sono stati proposti diversi set di forme geometriche per calcolare il biovolume di microalghe presenti in ambienti marini o di acqua dolce (Kovalá e Larrance, 1966; Edler, 1979; Smayda, 1978; Rott, 1981; Hillebrand *et al.*, 1999; Sun e Liu, 2003). Le informazioni disponibili sulle specie fitoplanctoniche delle acque di transizione sono molto più ridotte e fanno riferimento ad un unico inventario floristico e di forme specifico (Vadrucci *et al.*, 2007). In tabella 1.2 in appendice al capitolo, viene proposto un set di forme geometriche da applicare ai taxa fitoplanctonici di ambienti di transizione derivante dall'articolo citato.

### 1.6.2 Identificazione dell'unità tassonomica di applicazione

Come regola generale la forma geometrica viene applicata al livello di genere in quanto le singole specie tendono a conservare le caratteristiche strutturali di questo. Tuttavia, in alcuni casi è possibile che allo stesso genere appartengano specie con caratteristiche morfologiche differenti. In questo caso va selezionata la forma più idonea per la specie analizzata. L'esempio per il genere *Protoperidinium* è riportato in figura 1.19.

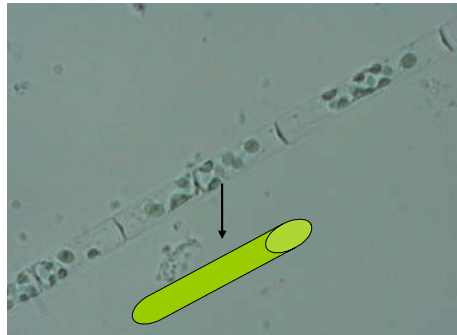


**Figura 1.19** – Esempio di forme geometriche diverse per lo stesso genere.

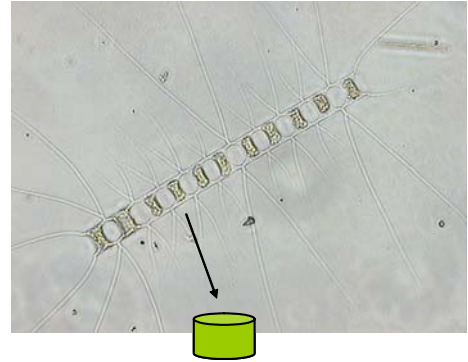
### 1.6.3 Identificazione delle unità di conteggio

Come regola generale, le forme geometriche vengono associate alle singole cellule anche nel caso di forme coloniali. Tuttavia, in alcuni casi, per la difficoltà nell'identificare la singola cellula, è più pratico effettuare l'applicazione sull'intera colonia o su porzioni fisse di filamenti (figura 1.20). In tabella 1.3 in appendice al capitolo 1, viene riportato un elenco floristico dei generi fitoplanctonici identificati negli ambienti acquatici di transizione, delle forme geometriche associate e delle unità di conteggio (U.C.) su cui effettuare il calcolo del biovolume e dell'area superficiale di ogni genere. Le deviazioni di forma di alcune specie rispetto ai generi di appartenenza sono infine riportate nella sezione *Note* della tabella 1.3 in appendice. La lista è stata compilata sulla base di liste floristiche pubblicate in Caroppo e Cardellicchio, 1995; Caroppo, 2000; Gilabert, 2001; Facca *et al.*, 2002; Perez *et al.*, 2002; Nuccio *et al.*, 2003; Hendwood, comm. pers. e dai dati raccolti dagli autori nell'ambito del progetto TWReferenceNET.

SINGOLA CELLULA

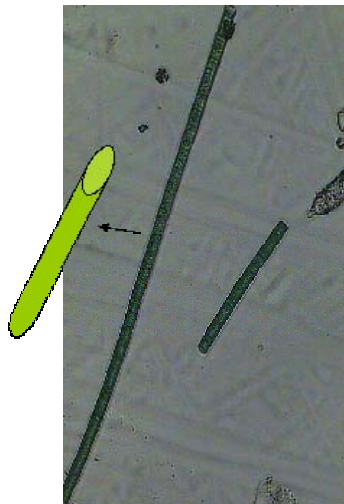


Bacillariophyceae – *Leptocylindrus* sp.



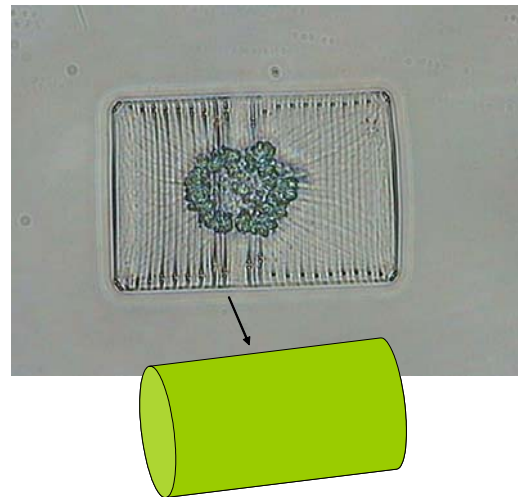
Bacillariophyceae – *Chaetoceros* sp.

FILAMENTI FISSI  
(50-100µm)



Cyanophyceae – *Oscillatoria* sp.

COLONIA



Bacillariophyceae – *Striatella* sp.

**Figura 1.20** – Unità di conteggio riconoscibili nelle corporazioni fitoplanctoniche.

#### **1.6.4 Stima delle dimensioni lineari al microscopio**

Le dimensioni lineari necessarie per il calcolo del biovolume e della superficie cellulare vengono effettuate durante le operazioni di conteggio e identificazione del campione e per ogni unità di conteggio inclusa nell'analisi. Una volta stabilita la forma da associare alla cellula algale si procede con la misura di tutte le dimensioni lineari necessarie per il calcolo. Le dimensioni lineari possono essere misurate manualmente utilizzando un oculare micrometrico oppure in modo semiautomatico, utilizzando un sistema di analisi immagine. In questo manuale viene descritta la procedura che prevede l'uso di un sistema di analisi immagine.

L'uso del sistema di analisi immagine per la determinazione delle dimensioni lineari è consigliabile perché consente una stima più precisa delle dimensioni lineari ( $\pm 0.1 \mu\text{m}$ ) rispetto all'oculare micrometrico ( $\pm 0.5 \mu\text{m}$ ).

**STRUMENTI** *Sistema di analisi immagine* – Alcuni microscopi possono essere dotati di sistemi di analisi immagine che permettono al ricercatore, di misurare alcune caratteristiche morfometriche delle cellule fitoplanctoniche. Alcune tipologie di sistemi di analisi immagine permettono di misurare dimensioni lineari (*i.e.*, lunghezza, larghezza, diametro, sezioni etc.) di ciascuna cellula e di calcolare da queste misure perimetro, area, volume sferico e cilindrico di ogni cellula, consentendo di collegare queste misure biometriche con le definizioni tassonomiche (*i.e.*, classe, genere e specie) pre-inserite dallo sperimentatore attraverso diverse forme di tabelle.

Il sistema è costituito da una videocamera collegata al microscopio invertito, che permette di visualizzare sul monitor del computer solo la parte centrale del campo oculare, leggermente ingrandita. Le cellule possono essere in questo modo contate, classificate e, quindi, l'immagine di ogni cellula o colonia può essere ottenuta attraverso la videocamera per procedere alla misurazione delle caratteristiche biometriche. La cattura dell'immagine può avvenire in maniera automatica o manuale. La cattura automatica individua le singole cellule basandosi su contrasti di grigio e seleziona le cellule rispetto al restante campione attraverso il colore determinato dalla loro pigmentazione che le rende più scure dello sfondo (figura 1.21). Tuttavia, nella selezione delle cellule



fitoplanctoniche il metodo automatico spesso ha un livello di accuratezza estremamente basso a causa della disomogeneità della distribuzione delle strutture interne e dei pigmenti. Il metodo manuale comporta una selezione diretta delle cellule fitoplanctoniche, ricalcandone il perimetro cellulare. E' preferibile utilizzare il metodo manuale rispetto a quello automatico anche se meno immediato, in quanto spesso la selezione automatica può comportare un'acquisizione sbagliata delle caratteristiche morfometriche.



**Figura 1.21** – Sistema di analisi immagine con identificazione (sinistra) e cattura manuale (destra) delle alghe

**PROCEDURA** Il sistema di analisi immagine cattura l'immagine relativa al campo oculare o a una porzione di esso, successivamente, si procede con la misura delle dimensioni lineari per ogni unità di conteggio presente nell'immagine. Per le unità di conteggio associate a forme geometriche semplici si disegnano i contorni dell'unità e automaticamente il sistema di analisi immagine estrapola le misura di massima lunghezza e massima ampiezza, necessarie per il calcolo del volume. Per le unità di conteggio associate a forme geometriche combinate, si procede alla misura manuale di tutte le dimensioni lineari necessarie al calcolo dei volumi delle singole forme geometriche semplici che costituiscono la forma combinata. L'analisi microscopica limita la misura delle dimensioni delle unità di conteggio alla due dimensioni visibili (xy), tuttavia in alcuni casi è richiesta la stima della terza dimensione (z).

Sulla base dei suggerimenti indicati in letteratura è possibile procedere a questa stima nei seguenti modi:

- se le cellule hanno la dimensione lineare massima inferiore ai 20  $\mu\text{m}$ , esse vengono assimilate, indipendentemente dalla loro forma, alla forma geometrica di sferoide (Verity *et al.*, 1992);
- se le cellule hanno la dimensione lineare massima superiore ai 20  $\mu\text{m}$ , si consiglia, quando possibile, di misurare direttamente la terza dimensione. Molti microscopi di buona qualità sono calibrati in modo tale da indicare la distanza focale esistente tra il punto a fuoco che si trova nella parte più bassa di una cellula e il punto a fuoco che si trova nella parte più alta della stessa. Questa distanza rappresenta lo spessore della cellula. Questo metodo si applica solo in presenza di cellule con uno spessore superiore al passo della manopola micrometrica del microscopio. Altri metodi diretti possono essere:
  - nel caso di cellule abbondanti, l'elevata probabilità di osservare differenti visioni della cellula nei preparati microscopici, consente di eseguire la misura direttamente, il valore misurato o la media dei diversi valori misurati vengono utilizzati per tutte le cellule osservate per quella specie;
  - nel caso di specie rare, la cellula è spesso visibile in un'unica visione e la terza dimensione può essere misurata, dopo la lettura completa del campione, facendo ruotare la cellula con l'ausilio di un ago (Sun e Liu, 2003),

Se non è possibile misurare direttamente la terza dimensione della cellula algale, essa può essere ricavata indirettamente da dati disponibili in letteratura o ricavati sperimentalmente dai rapporti tra le dimensioni della specie considerata.

**CONSIDERAZIONI** *La misura delle dimensioni lineari rappresenta la principale fonte di errore nel calcolo del biovolume e dell'area superficiale delle cellule algali. Il modulo di misura del sistema di analisi immagine deve essere sempre calibrato correttamente per ogni livello di magnificazione attraverso l'uso di un micrometro.*

*Un altro aspetto problematico riguarda "l'effetto alone" che può influenzare la misura delle dimensioni lineari soprattutto nel caso delle specie di piccole dimensioni. Per evitare questo inconveniente è bene sempre lavorare utilizzando il microscopio con contrasto di fase, che aumenta il contrasto tra il contorno della cellula e il fondo della camera. Si fa presente che i microscopi e i sistemi di analisi immagine più moderni utilizzano tecnologie miranti a ridurre alla base questo effetto.*

#### **1.6.5 Calcolo del biovolume**

Una volta misurate le dimensioni lineari necessarie in rapporto alla forma geometrica più idonea, si procede al calcolo del biovolume. Alcuni software applicativi dei sistemi di analisi immagine possono essere in grado di calcolare automaticamente il volume. Nei casi in cui questo non si può fare si può ricorrere a uno dei tanti programmi di calcolo attualmente esistenti in commercio.

#### **1.6.6 Dal biovolume alla biomassa**

Il biovolume può essere utilizzato direttamente per fornire una stima della biomassa fitoplanctonica (Sournia, 1978). Tuttavia, alcuni autori sono concordi nel ritenere che il volume plasmatico, ovvero il volume totale meno il volume occupato dal vacuolo, fornisca una stima più accurata della biomassa fitoplanctonica, in quanto esso rappresenta la frazione metabolicamente attiva della cellula (Smayda, 1965). Inoltre, un difetto dell'uso del biovolume totale può essere la sovrastima dell'importanza delle cellule di grandi dimensioni quale conseguenza dell'aumento relativo del volume del vacuolo all'aumentare del volume cellulare. Tuttavia il calcolo del volume plasmatico è piuttosto tedioso, poiché richiede la stima diretta dello spessore della membrana citoplasmatica o

del volume del vacuolo. Per questo nelle analisi di routine, anche se sono noti i problemi della sovrastima delle cellule di grandi dimensioni il biovolume totale viene usato come stima della biomassa fitoplanctonica.

Il biovolume totale può essere convertito in biomassa ed essere espresso o in termini di peso, o in termini di unità di carbonio.

Nel primo caso, i valori di biovolume possono essere convertiti in biomassa note le densità delle cellule algali. Stime sperimentali indicano, per le corporazioni fitoplanctoniche, valori di densità variabili tra 980 gr/cm<sup>3</sup> a 1250 gr/cm<sup>3</sup>. Il valore di 1030 gr/cm<sup>3</sup> è stato indicato da Hutchinson (1967) come valore medio tra quelli osservati sperimentalmente per le specie marine. L'equazione utilizzata per effettuare la conversione del biovolume in biomassa viene di seguito riportata:

$$Peso (ng) = (V * 1.03) / 1000 \quad \text{Eq. 1.21}$$

dove

V = volume della cellula algale (μm<sup>3</sup>).

Nel secondo caso, i dati di biovolume possono essere trasformati in biomassa, sulla base delle relazioni esistenti tra contenuto di carbonio e biovolume delle cellule algali. Queste relazioni sono state ricavate sperimentalmente. Le prime relazioni sono state proposte da Mullin *et al.* (1966) e Strathmann (1967) in campioni fissati di fitoplancton marino. Questi autori misero in evidenza che il contenuto di carbonio per μm<sup>3</sup> varia inversamente con il biovolume. Da queste relazioni Strathmann (1967) ha sviluppato due equazioni per stimare il contenuto di carbonio organico nel fitoplancton partendo dai dati di biovolume, una specifica per le Bacillariophyceae, che presentano un contenuto di carbonio inferiore a quello stimato in altri gruppi fitoplanctonici, e un'altra per tutti gli altri gruppi algali:

$$Bacillariophyceae = \log_{10} C(pg) = 0.758 (\log_{10}V) - 0.422 \quad \text{Eq. 1.21}$$

$$Altro fitoplancton = \log_{10} C(pg) = 0.866 (\log_{10}V) - 0.460 \quad \text{Eq. 1.23}$$

dove

C = contenuto di Carbonio espresso in pg

V = volume della cellula algale espresso in μm<sup>3</sup>.

Attualmente queste equazioni sono state riformulate da Menden-Deur e Lessard (2000), sulla base una serie di dati sperimentali più ampio rispetto a quello utilizzato in Strathmann (1967). Anche in questo caso sono state ricavate due equazioni una per le Bacillariophyceae e una per gli altri gruppi fitoplanctonici:

$$\text{Bacillariophyceae} = \log_{10} C(\text{pg}) = 0.811 (\log_{10} V) - 0.541 \quad \text{Eq. 1.24}$$

$$\text{Altro Fitoplancton} = \log_{10} C(\text{pg}) = 0.939 (\log_{10} V) - 0.665 \quad \text{Eq. 1.25}$$

dove

C = contenuto di Carbonio espresso in pg

V = volume della cellula algale espresso in  $\mu\text{m}^3$ .

Nel caso in cui dai dati di biovolume venga ottenuto, con le formule sopra elencate, il contenuto in carbonio delle cellule, la conversione in biomassa può essere effettuata considerando che il contenuto in carbonio rappresenta mediamente il 45% della biomassa nelle cellule del fitoplancton (Barnes, 1980).

In genere si preferisce utilizzare la seconda modalità di conversione del biovolume in biomassa.

### **1.7 Intercalibrazione**

Prima di operare per l'analisi di corporazioni fitoplanctoniche è consigliabile fare un'intercalibrazione tra le Unità Operative (U.O.) coinvolte in uno studio o un progetto. Durante l'intercalibrazione, tutte le U.O. si incontrano e stabiliscono i criteri e le metodiche da seguire per svolgere una determinata analisi.

Per l'analisi di corporazioni fitoplanctoniche, ed in particolare per indagini qualitative, è molto importante la fase di riconoscimento. Tutte le U.O. dovrebbero utilizzare le stesse chiavi dicotomiche. Inoltre, possono essere svolti degli esercizi di intercalibrazione per valutare gli effetti legati agli operatori.

**Tabella 1.2** – Forme geometriche ed equazioni per il calcolo del biovolume e dell'area della superficie delle cellule fitoplanctoniche.

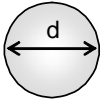
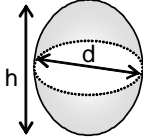
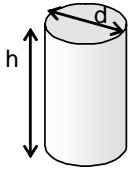
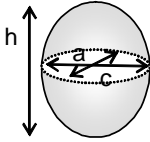
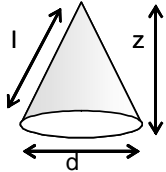
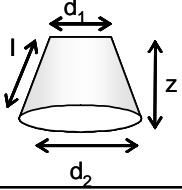
<p><b>1) SFERA</b></p> $V = \frac{\pi}{6} \cdot d^3$ $A = \pi \cdot d^2$ 	<p><b>2) SFEROIDE</b></p> $V = \frac{\pi}{6} \cdot d^2 \cdot h$  $A = \frac{\pi \cdot d}{2} \left( d + \frac{h^2}{\sqrt{h^2 - d^2}} \cdot \sin^{-1} \frac{\sqrt{h^2 - d^2}}{h} \right)$
<p><i>Dimensioni da misurare</i> 1: d = diametro</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i> 2 : d = diametro; h = altezza</p>
<p><b>3) CILINDRO</b></p> $V = \frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot h$ $A = \pi \cdot d \cdot (d/2 + h)$ 	<p><b>4) ELLISSOIDE</b></p> $V = \frac{\pi}{6} \cdot a \cdot c \cdot h$  $A \approx \frac{\pi}{4} \cdot (b+c) \cdot \left[ \left( \frac{b+c}{2} \right) + \frac{2a^2}{\sqrt{4a^2 - (b+c)^2}} \sin^{-1} \frac{\sqrt{4a^2 - (b+c)^2}}{2a^2} \right]$
<p><i>Dimensioni da misurare</i> 2 : d = diametro; h = altezza</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i> 3: a = lunghezza; c = spessore; h = altezza</p>
<p><b>5) CONO</b></p> $V = \frac{\pi}{12} \cdot d^2 \cdot z$ $A = \pi \cdot \frac{d}{2} \cdot \left( \frac{d}{2} + l \right)$ 	<p><b>6) TRONCO DI CONO</b></p> $V = \frac{\pi}{12} \cdot z \cdot (d_1^2 + d_1 \cdot d_2 + d_2^2)$ $A = \frac{\pi}{4} \cdot (d_2^2 + d_1^2 + 2l[d_2 + d_1])$ 
<p><i>Dimensioni da misurare</i> 2: d = diametro; h = altezza ; per l'area l = lato del cono</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i> 3: d<sub>1</sub>= diametro minore; d<sub>2</sub>= diametro maggiore; z= altezza; per l'area l= lato del tronco di cono</p>

Tabella 1.2 – Continua.

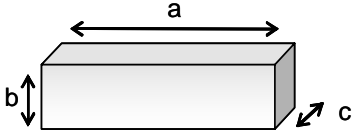
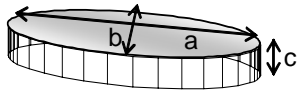
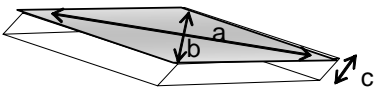
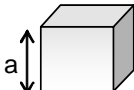
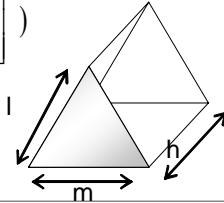
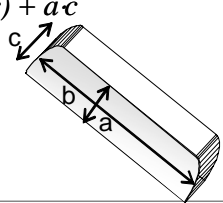
<p><b>7) PARALLELEPIPEDO</b></p> $V = a \cdot b \cdot c$ $A = 2(a \cdot b) + 2(b \cdot c) + 2(a \cdot c)$ 	<p><b>8) PRISMA SU BASE ELLITTICA</b></p> $V = \frac{\pi}{4} \cdot (a \cdot b \cdot c)$ $A = \frac{\pi}{2} \cdot (a \cdot b + [a + b] \cdot c)$ 
<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>3: a = lunghezza; b = larghezza; c = spessore</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>3: a = lunghezza; b = larghezza; c = spessore</p>
<p><b>9) PRISMA SU BASE PARALLELOGRAMMA</b></p> $V = \frac{1}{2} a \cdot b \cdot c$ $A = a \cdot b + \frac{\sqrt{a^2 + b^2}}{4} \cdot c$ 	<p><b>10) CUBO</b></p> $V = a^3$ $A = a^2$ 
<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>3: a = lunghezza; b = larghezza; c = spessore</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>1 :a = lunghezza di un lato</p>
<p><b>11) PRISMA SU BASE TRIANGOLARE</b></p> $V = h \cdot \frac{m}{2} \cdot \sqrt{\left[ l^2 - \left( \frac{m}{2} \right)^2 \right]}$ $A = l \cdot \left( 3 \cdot h + \sqrt{\left[ l^2 - \left( \frac{m}{2} \right)^2 \right]} \right)$ 	<p><b>12) META' PRISMA SU BASE ELLITTICA</b></p> $V = \frac{\pi}{4} \cdot (a \cdot b \cdot c)$ $A = \frac{\pi}{4} (a \cdot b + a \cdot c + b \cdot c) + a \cdot c$ 
<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>3: m = base del triangolo; l = lunghezza di un lato; h = altezza</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>3: a = lunghezza; b = larghezza; c = spessore</p>

Tabella 1.2 – Continua.

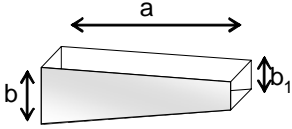
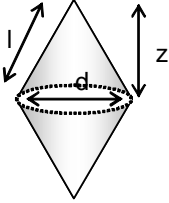
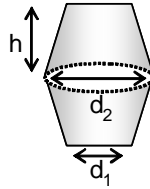
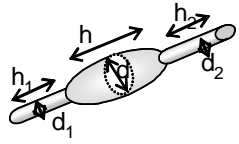
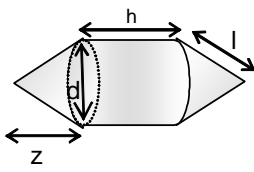
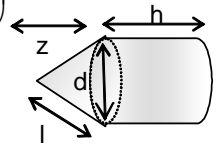
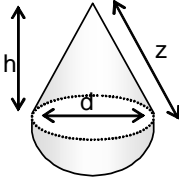
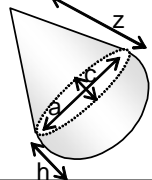
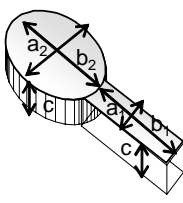
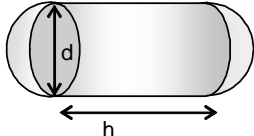
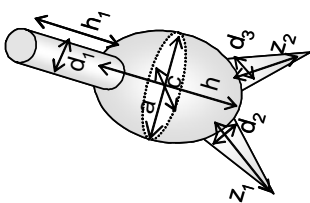
<p><b>13) TRONCO DI PIRAMIDE</b>  <math>V = [(b_1 + b \sqrt{b_1 \cdot b}) \cdot a] / 3</math></p> 	<p><b>14) DUE CONI</b>  <math>V = \frac{\pi}{6} \cdot (a \cdot b \cdot c)</math>  <math>A = \pi \cdot d \cdot l</math></p> 
<p><i>Dimensioni da misurare</i>                      3: a = lunghezza; b = ampiezza base minore; b<sub>1</sub> = ampiezza base maggiore</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i>                      2: d = diametro; z = altezza del cono.                      Per l'area : l = lato di un cono</p>
<p><b>15) DUE CONI TRONCHI</b>  <math>V = \frac{\pi}{6} \cdot h \cdot (d_1^2 + d_1 \cdot d_2 + d_2^2)</math>  <math>A = \frac{\pi}{2} \cdot (d_2^2 + d_1^2 + 2l[d_2 + d_1])</math></p> 	<p><b>16) SFEROIDE + DUE CILINDRI</b>  <math>V = (\frac{\pi}{6} \cdot d^2 \cdot h) + (\frac{\pi}{2} \cdot d_{1/2}^2 \cdot h_{1/2})</math>                      A = somma dei solidi geometrici inclusi</p> 
<p><i>Dimensioni da misurare</i>                      3: d<sub>1</sub> = diametro minore; d<sub>2</sub> = diametro maggiore; h = altezza</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i>                      6: d<sub>1/2</sub> = average value of two cylinder diameters; h<sub>1/2</sub> = valore medio dell'altezza dei due cilindri; d = diametro dello sferoide; h = altezza dello sferoide</p>
<p><b>17) CILINDRO + DUE CONI</b>  <math>V = (\frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot h) + (\frac{\pi}{6} \cdot d^2 \cdot z)</math>  <math>A = \pi \cdot d \cdot (h + l)</math></p> 	<p><b>18) CILINDRO + CONO</b>  <math>V = (\frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot h) + (\frac{\pi}{12} \cdot d^2 \cdot z)</math>  <math>A = \frac{\pi}{2} \cdot d \cdot (\frac{d}{2} + l + 2h)</math></p> 
<p><i>Dimensioni da misurare</i>                      3: d = diametro; h = altezza; z = altezza del cono. Per l'area : l = lato del cono</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i>                      3: d = diametro; h = altezza; z = altezza del cono. Per l'area : l = lato del cono</p>



Tabella 1.2 – Continua.

<p><b>19) CONO + MEZZA SFERA</b></p> $V = \frac{\pi}{12} \cdot d^2 \cdot (z+d)$ $A = \frac{\pi}{2} \cdot d \cdot (l+d)$ 	<p><b>20) META' ELLISSOIDE + CONO SU BASE ELLITTICA</b></p> $V = \left(\frac{\pi}{12} \cdot a \cdot b\right) \cdot (h+z)$ <p>A = somma dei solidi geometrici inclusi</p> 
<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>2: d = diametro; z = altezza del cono. Per l'area : l = lato del cono</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>4: a = lunghezza; c = spessore; h = altezza; z = altezza del cono</p>
<p><b>21) PRISMA SU BASE ELLITTICA + PARALLELEPIPEDO</b></p> $V = c \left( a_1 \cdot b_1 + \frac{\pi}{4} a_2 \cdot b_2 \right)$ $A = 2(a_1 \cdot b_1) + 2c(a_1 + b_1) + \frac{\pi}{2} (a_2 \cdot b_2 + [a_2 + b_2] \cdot c)$ 	<p><b>22) CILINDRO + DUE MEZZE SFERE</b></p> $V = \left(\frac{\pi}{4} \cdot d^2 \cdot h\right) + \left(\frac{\pi}{6} \cdot d^3\right)$ $A = \pi \cdot d \cdot (h+d)$ 
<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>5: a<sub>1</sub> = lunghezza del parallelepipedo; b<sub>1</sub> = larghezza del parallelepipedo; c = spessore; a<sub>2</sub> = lunghezza del prisma; b<sub>2</sub> = larghezza del prisma</p>	<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>2: d=diametro; h= altezza</p>
<p><b>23) ELLISSOIDE + 2 CONI + CILINDRO</b></p> $V = \left(\frac{\pi}{6} \cdot a \cdot c \cdot h\right) + \left(\frac{\pi}{6} \cdot d_{4/5}^2 \cdot z_{1/2}\right) + \left(\frac{\pi}{4} \cdot d_1^2 \cdot h_1\right)$ <p>A = somma dei solidi geometrici inclusi</p> 	<p><i>Dimensioni da misurare</i></p> <p>9: a = lunghezza; c = spessore; h = altezza dell'ellissoide; d<sub>1</sub> = diametro; h<sub>1</sub> = altezza; d<sub>4/5</sub> = valore medio del diametro dei due con; z<sub>1/2</sub> = valore medio dell'altezza dei due con</p>

**Tabella 1.3** – Elenco floristico dei generi fitoplanctonici identificati in 30 ambienti acquatici di transizione del bacino del Mediterraneo, delle forme geometriche e delle unità di conteggio (U.C.). Nella colonna “Forma” i numeri si riferiscono alla tabella 1.2. I numeri in parentesi rimandano alle rispettive note.

Genere	Forma	U.C.	Genere	Forma	U.C.
<b>Bacillariophyceae</b>					
<i>Achnanthes</i>	8	cellula	<i>Leptocylindrus</i>	3	cellula
<i>Actinopterychus</i>	3	cellula	<i>Licmophora</i>	13	cellula
<i>Amphiprora</i>	8	cellula	<i>Lioloma</i>	3	cellula
<i>Amphora</i>	4	cellula	<i>Lyrella</i>	8	cellula
<i>Asterionella</i>	7	cellula	<i>Mastogloia</i>	8	cellula
<i>Asterolampra</i>	3	cellula	<i>Melosira</i>	3	cellula
<i>Asteromphalus</i>	3	cellula	<i>Navicula</i> (6)	8	cellula
<i>Asterionellopsis</i>	11	cellula	<i>Nitzschia</i> (7)	9	cellula
<i>Bacillaria</i>	7	cellula	<i>Paralia</i>	3	cellula
<i>Bacteriastrium</i>	3	cellula	<i>Phaeodactylum</i>	12	cellula
<i>Bellarochea</i>	11	cellula	<i>Pinnularia</i>	7	cellula
<i>Berkeleya</i>	8	cellula	<i>Planktoniella</i>	3	cellula
<i>Biddulphia</i> (1)	8	cellula	<i>Pleurosigma</i>	9	cellula
<i>Campylodiscus</i>	8	cellula	<i>Porosira</i>	3	cellula
<i>Cerataulina</i>	3	cellula	<i>Proboscia</i>	3	cellula
<i>Chaetoceros</i>	8	cellula	<i>Psammodictyon</i>	9	cellula
<i>Climacosphaenia</i>	21	cellula	<i>Pseudo-Nitzschia</i> (8)	9	cellula
<i>Cocconeis</i>	8	cellula	<i>Pseudosolenia</i>	9	cellula
<i>Corethron</i>	22	cellula	<i>Rhabdonema</i>	7	cellula
<i>Coscinodiscus</i>	3	cellula	<i>Rhaphoneis</i>	9	cellula
<i>Coscinosira</i>	3	cellula	<i>Rhizosolenia</i>	3	cellula
<i>Cyclotella</i>	3	cellula	<i>Skeletonema</i>	3	cellula
<i>Cylindrotheca</i>	16	cellula	<i>Stauroneis</i> (9)	8	cellula
<i>Cymatopleura</i>	7	cellula	<i>Stephanodiscus</i>	22	cellula
<i>Cymbella</i>	4	cellula	<i>Stictocyclus</i>	3	cellula
<i>Dactyliosolen</i>	3	cellula	<i>Striatella</i>	8	colonia
<i>Detonula</i>	3	cellula	<i>Surirella</i>	4	cellula
<i>Diatoma</i>	8	cellula	<i>Synedra</i> (10)	7	cellula
<i>Dimerogramma</i>	8	cellula	<i>Tabellaria</i> (11)	7	cellula
<i>Diploneis</i> (2)	8	cellula	<i>Thalassionema</i>	7	cellula
<i>Ditylum</i>	11	cellula	<i>Thalassiosira</i>	3	cellula
<i>Ellerbeckia</i>	3	cellula	<i>Thalassiothrix</i>	7	cellula
<i>Epithemia</i>	12	cellula	<i>Toxarium</i>	3	cellula
<i>Eucampia</i>	8	cellula	<i>Trachyneis</i>	8	cellula
<i>Eunotia</i>	12	cellula	<i>Triceratium</i>	11	cellula
<i>Fragilaria</i>	8	cellula	<i>Tropidoneis</i>	8	cellula
<i>Fragilariopsis</i>	8	cellula			
<i>Gomphonema</i>	13	cellula			
<i>Grammatophora</i> (3)	8	cellula			
<i>Hantzschia</i>	7	cellula			
<i>Guinardia</i>	3	cellula			
<i>Gyrosigma</i> (4)	4	cellula			
<i>Haslea</i>	8	cellula			
<i>Hemiaulus</i>	3	cellula			
<i>Hyalodiscus</i> (5)	1	cellula			
<i>Lauderia</i>	3	cellula			

Tabella 1.3 – Continua.

Genere	Forma	U.C.	Genere	Forma	U.C.
<b>Chlorophyceae</b>					
<i>Actinastrum</i>	17	cellula	<i>Diplopelta</i>	4	cellula
<i>Ankistrodesmus</i>	17	cellula	<i>Diplopsalis</i>	19	cellula
<i>Carteria</i>	1	cellula	<i>Glenodinium</i>	4	cellula
<i>Chlamydomonas</i>	1	cellula	<i>Gonyaulax (16)</i>	14	cellula
<i>Chlorogonium</i>	14	cellula	<i>Katodinium</i>	18	cellula
<i>Coelastrum</i>	1	cellula	<i>Gymnodinium (17)</i>	4	cellula
<i>Crucigenia</i>	10	cellula	<i>Gyrodinium (18)</i>	4	cellula
<i>Gonium</i>	2	cellula	<i>Goniodoma</i>	1	cellula
<i>Kirchneriella</i>	14	cellula	<i>Heterocapsa</i>	14	cellula
<i>Lagerheimia</i>	4	cellula	<i>Heterodinium</i>	14	cellula
<i>Micractinium</i>	1	cellula	<i>Lingulodinium</i>	4	cellula
<i>Monoraphidium</i>	14	cellula	<i>Massartia</i>	4	cellula
<i>Oocystis</i>	2	cellula	<i>Mesoporos</i>	8	cellula
<i>Pediastrum</i>	2	cellula	<i>Minuscula</i>	19	cellula
<i>Planktonema</i>	3	cellula	<i>Nematodinium</i>	4	cellula
<i>Scenedesmus</i>	2	cellula	<i>Oblea</i>	1	cellula
<i>Schroderia</i>	14	cellula	<i>Oxytoxum (19)</i>	2	cellula
<i>Stichococcus</i>	3	cellula	<i>Oxyphysis</i>	14	cellula
<i>Tetraedon</i>	7	cellula	<i>Oxyrrhis</i>	2	cellula
<i>Tetrapedia</i>	1	cellula	<i>Pachydinium</i>	19	cellula
<i>Tetrastrum</i>	1	cellula	<i>Peridinium</i>	4	cellula
<i>Treubaria (12)</i>	5	cellula	<i>Phalacroma</i>	4	cellula
<b>Chrysophyceae</b>					
<i>Calycomonas</i>	5	cellula	<i>Pheopolykrikos</i>	4	cellula
<i>Chrysococcus</i>	2	cellula	<i>Podolampas</i>	4	cellula
<i>Dinobryon</i>	2	cellula	<i>Polykrikos</i>	4	cellula
<i>Mallomonas</i>	2	cellula	<i>Pronoclituca</i>	19	cellula
<i>Monochrys</i>	2	cellula	<i>Prorocentrum</i>	4	cellula
<i>Ochromona</i>	19	cellula	<i>Protoceratium</i>	1	cellula
<i>Parapedinella</i>	1	cellula	<i>Protopteridinium (20)</i>	14	cellula
<i>Paulinella</i>	5	cellula	<i>Pyrocystis</i>	2	cellula
<i>Spumella</i>	19	cellula	<i>Ptychodiscus</i>	4	cellula
<b>Cryptophyceae</b>					
<i>Leucocryptos</i>	19	cellula	<i>Pyrophacus</i>	4	cellula
<i>Chroomonas</i>	19	cellula	<i>Scrippsiella</i>	4	cellula
<i>Cryptomonas</i>	2	cellula	<i>Torodinium</i>	2	cellula
<i>Hillea</i>	2	cellula	<i>Warnowia</i>	2	cellula
<i>Plagioselmis</i>	19	cellula	<b>Dictyochophyceae</b>		
<i>Pseudobodo</i>	1	cellula	<i>Apedinella</i>	2	cellula
<i>Rhinomonas</i>	19	cellula	<i>Dictyocha</i>	1	cellula
<i>Rhodomonas</i>	19	cellula	<i>Pseudopedinella</i>	6	cellula
<b>Dinophyceae</b>					
<i>Akashiwo</i>	4	cellula	<b>Euglenophyceae</b>		
<i>Alexandrium</i>	4	cellula	<i>Astasia</i>	4	cellula
<i>Amphidinium (13)</i>	4	cellula	<i>Euglena</i>	20	cellula
<i>Amphisolenia</i>	3	cellula	<i>Eutreptia</i>	18	cellula
<i>Blastodinium</i>	4	cellula	<i>Eutreptiella</i>	18	cellula
<i>Ceratium (14)</i>	23	cellula	<i>Lepocinclis (21)</i>	14	cellula
<i>Cochlodinium</i>	2	cellula	<i>Phacus</i>	8	cellula
<i>Dinophysis (15)</i>	4	cellula	<i>Strombomonas</i>	4	cellula
			<i>Trachelomonas</i>	4	cellula

Tabella 1.3 – Continua.

Genere	Forma	U.C.	Genere	Forma	U.C.
<b>Prasinophyceae</b>					
<i>Aulacomonas</i>	2	cellula	<i>Lohmannosphaera</i>	1	cellula
<i>Halosphaera</i>	1	cellula	<i>Ophiaster</i>	2	cellula
<i>Mamiella</i>	2	cellula	<i>Phaeocystis</i>	20	cellula
<i>Micromonas</i>	2	cellula	<i>Pavlova</i>	1	cellula
<i>Pachysphaera</i>	2	cellula	<i>Pontosphaera</i>	1	cellula
<i>Pterosperma</i>	1	cellula	<i>Prymnesium</i>	19	cellula
<i>Pyramimonas</i>	5	cellula	<i>Rhabdosphaera</i>	1	cellula
<i>Tetraselmis</i>	2	cellula	<i>Syracolithus</i>	1	cellula
<b>Cyanophyceae</b>					
<i>Anabaenopsis</i>	3	*fil. da 100 µm	<b>Xanthophyceae</b>		
<i>Anabaena</i>	3	fil. da 100 µm	<i>Meringosphaeria</i>	1	cellula
<i>Aphanizomenon</i>	3	fil. da 100 µm	<b>Zygnematophyceae</b>		
<i>Coelosphaerium</i>	2	colonia	<i>Closterium</i>	8	cellula
<i>Chroococcus</i>	1	cellula	<i>Cosmarium</i>	3	cellula
<i>Coccolithus cyanobacteria</i>	1	cellula	<i>Mougeoutia</i>	3	cellula
<i>Gloeocapsa</i>	1	cellula	<i>Staurastrum</i>	15	cellula
<i>Gomposphaeria</i> (22)	1	cellula	<b>Others classes</b>		
<i>Filamentous cyanobacteria</i>	3	fil. da 100 µm	<i>Bicosta</i>	3	cellula
<i>Lyngbya</i>	3	fil. da 100 µm	<i>Ebria</i>	1	cellula
<i>Merismopedia</i>	10	cellula	<i>Hermesinum</i>	1	cellula
<i>Microcystis</i>	1	parte di colonia	<i>Rhizochloris</i>	1	cellula
<i>Nodularia</i>	3	fil. da 100 µm			
<i>Nostoc</i>	3	cellula			
<i>Oscillatoria</i>	3	fil. da 100 µm			
<i>Phormidium</i>	3	fil. da 100 µm			
<i>Snowella</i>	2	colonia			
<i>Spirulina</i>	3	fil. da 100 µm			
<i>Synechococcus</i>	1	cellula			
<i>Trochiscia</i>	1	cellula			
<i>Woronichinia</i>	1	colonia			
<b>Prymnesiophyceae</b>					
<i>Alisphaera</i>	1	cellula			
<i>Acanthoica</i>	2	cellula			
<i>Acanthosolenia</i>	3	cellula			
<i>Anoplosolenia</i>	14	cellula			
<i>Braarudosphaera</i>	1	cellula			
<i>Calciopappus</i>	5	cellula			
<i>Calciosolenia</i>	3	cellula			
<i>Calyptosphaera</i>	1	cellula			
<i>Ceratolithus</i>	1	cellula			
<i>Chrysochromulina</i>	2	cellula			
<i>Coccolithus</i>	1	cellula			
<i>Coronosphaera</i>	1	cellula			
<i>Emiliana</i>	1	cellula			
<i>Gephyrocapsa</i>	1	cellula			
<i>Halopappus</i>	2	cellula			
<i>Helladosphaera</i>	1	cellula			

\* filamenti da 100 µm

**Note:**

- 1) Eventuali estensioni cellulari dovrebbero essere addizionate come cilindri o coni.
- 2) L'asse transapicale (ampiezza) è considerata come la media tra l'ampiezza minima e l'ampiezza massima della cellula
- 3) Specie con valve lineari dovrebbero essere calcolate come parallelepipedi.
- 4) Ellissoide -10%
- 5) Per le forme più appiattite, la forma prisma su base ellittica risulta più appropriata.
- 6) Specie con valve romboidali dovrebbero essere calcolate usando le forme, prisma su base ellittica o parallelogramma, specie con valve lineari dovrebbero essere calcolate come parallelepipedi
- 7) Specie con valve sigmoidi o a romboidi dovrebbero essere calcolate come prisma su base parallelogramma, specie con valve ellittiche dovrebbero essere calcolate come prisma su base ellittica, specie con valve lineari dovrebbero essere calcolate come parallelepipedi.
- 8) Specie con valve lineari dovrebbero essere calcolate come parallelepipedi
- 9) Specie con valve lineari dovrebbero essere calcolate come parallelepipedi
- 10) Specie con valve ellittiche dovrebbero essere calcolati come prisma su base ellittica.
- 11) L'asse transapicale (ampiezza) è considerata come la media tra l'ampiezza minima e l'ampiezza massima della cellula
- 12) Il biovolume è calcolato come somma del numero di coni.
- 13) *A. sphenoides*: sferoide
- 14) Calcolare il biovolume del genere *Ceratium* è piuttosto difficile, poiché esso richiede l'associazione con una forma geometrica molto complessa. La forma, qui proposta è quella più frequentemente riportata in altri set di forme geometriche per il calcolo del biovolume. Tuttavia il numero di coni da addizionare può variare in relazione al numero di corni o spine presenti nelle specie. Inoltre, tale forma è molto difficile da applicare nell'analisi di routine a causa dell'elevato numero di dimensioni lineari da misurare. G. Hansen 1992 propone di calcolare il biovolume di *Ceratium* utilizzando le relazioni allometriche tra ampiezza del cingulum e biovolume, stimate per alcune specie di questo genere. *C. fusus*: cono+cono; *C. trichoceros*, *C. macroceros*, tutte i corni sono considerati cilindri; *C. tripos*: il corpo centrale è considerato come cono.
- 15) *D. pulchella*: sferoide; *D. caudata*, *D. tripos*: i corni sono addizionati come coni.
- 16) *G. spinifera*, *G. scrippsae*: cono+mezza sfera
- 17) *G. rhomboides*: cono+cono
- 18) *G. lachymae*: cono+mezza sfera
- 19) *O. viride*: cono+cono
- 20) *P. elegans*, cilindro+tre coni; *P. brevipes*, *P. thorianum*, *P. pallidum*: cono+mezzo ellissoide; *P. minutum*: sfera; *P. divergens*, cono+metà ellissoide, tuttavia pronunciati corni ipotocali dovrebbero essere addizionati come coni, *P. bipes*, cono+mezza sfera
- 21) Specie allungate apicalmente dovrebbero essere calcolate come sferoidi.
- 22) Specie con forme allungate dovrebbero essere calcolate come cilindri o sferoidi.

## **CAPITOLO 2 – MACROINVERTEBRATI BENTONICI**

*F. Sangiorgio, M. Pinna, L. Gravili*

### **2.1 Introduzione**

Per macroinvertebrati bentonici si intendono tutti gli organismi invertebrati con dimensione lineare, misurata sull'asse maggiore, superiore ad un millimetro, che vivono a contatto con il fondo o nel sedimento.

Da alcuni decenni, i macroinvertebrati bentonici vengono utilizzati sia nei programmi di monitoraggio a lungo termine dello stato di salute degli ecosistemi acquatici (WFD 2000/60/EC; D.L. 152/00; Ferreira *et al.*, 2007), sia per un monitoraggio dei cambiamenti di stato in relazione agli effetti delle perturbazioni naturali e di origine antropica (Hawkes, 1979; Borja *et al.*, 2000; Salas *et al.*, 2004; Basset *et al.*, 2004; Pinna *et al.*, 2007). I vantaggi in termini applicativi ed economici nell'uso dei macroinvertebrati bentonici, rispetto ad altri elementi biologici di qualità, come descrittori di stato di salute degli ecosistemi acquatici sono stati ripetutamente confermati. Da un punto di vista ecologico, questi organismi svolgono un ruolo fondamentale nei processi funzionali degli ecosistemi acquatici, sia marini, d'acqua dolce che di transizione, ed hanno una posizione chiave all'interno delle reti trofiche essendo contemporaneamente e prevalentemente decompositori e/o filtratori e prede per i livelli trofici superiori (Griffiths, 1991). La struttura tassonomica ed in taglia delle comunità di macroinvertebrati bentonici presenti in un sito sono il risultato di un insieme di fattori biotici ed abiotici che integrano i cambiamenti ambientali nelle caratteristiche fisiche, chimiche ed ecologiche del loro habitat sia su scala spaziale che temporale. I vantaggi dell'uso dei macroinvertebrati nel bio-monitoraggio sono legati principalmente ad alcune loro caratteristiche quali ubiquità, cicli vitali abbastanza lunghi se comparati con quelli di altri gruppi, relativa facilità di campionamento, capacità di risposta a perturbazioni ambientali.

Tradizionalmente, il monitoraggio con macroinvertebrati bentonici ha seguito un approccio o di tipo qualitativo basato sulle cosiddette "specie indicatrici" e perciò costruito sulla presenza-assenza di taxa sensibili alle perturbazioni, o quantitativo se basato sull'abbondanza numerica e ricchezza tassonomica delle

comunità campionate. Negli ultimi decenni attraverso studi teorici e sperimentali è stata posta l'attenzione sui tratti funzionali dei macroinvertebrati bentonici tra cui emergono per la loro valenza applicativa le caratteristiche legate alla mole corporea degli individui, riassunte negli spettri in taglia e nelle distribuzioni taglia/ abbondanza, dimensionali. In tal senso sono stati definiti i presupposti per la costruzione di strumenti innovativi basati sulla taglia individuale del macroinvertebrato bentonico, utili alla valutazione dello stato di salute degli ecosistemi acquatici e che fornirebbero delle informazioni alternative e/o complementari a quelle tassonomiche.

## **2.2 Campionamento dei macroinvertebrati bentonici**

La scelta delle tecniche di campionamento dei macroinvertebrati bentonici negli ecosistemi di transizione è strettamente legata alle caratteristiche strutturali degli ecosistemi stessi, che possono essere estremamente variabili entro e tra ecosistemi. È importante, quindi, che le tecniche di campionamento siano adeguate al sito e che, inoltre, non richiedano procedure e metodiche complesse e costose. Innanzitutto, si deve tener conto della natura e delle caratteristiche del substrato su cui si deve campionare. Gli ecosistemi acquatici di transizione sono generalmente caratterizzati da un fondo molle, costituito da sedimenti diversamente composti con percentuali variabili di fango, sabbia, ghiaia, ciottoli e resti di materiale di origine organogena, rappresentato da gusci e conchiglie di bivalvi e gasteropodi morti. Le zone di fondo duro, costituito da rocce, sono poco frequenti in questo tipo di ecosistemi acquatici e, comunque, sono localizzate lungo la fascia costiera o nelle zone in cui la velocità di corrente di marea non consente la deposizione del sedimento. I fondi molli possono essere nudi o ricoperti da vegetazione, sia sommersa che emergente, e costituiscono un'ampia varietà di habitat per le guilds di macroinvertebrati bentonici che li colonizzano. Su queste superfici, i macroinvertebrati hanno la capacità di penetrare nel sedimento e, in relazione alla composizione/granulometria del substrato e agli adattamenti specifici, possono raggiungere anche una profondità di 15-20 cm costruendo un intreccio di canali e gallerie che favoriscono l'ossigenazione del sedimento stesso. Tenendo conto di questi aspetti e degli strumenti di cui si dispone, è possibile eseguire il campionamento di macroinvertebrati bentonici

attraverso: 1. prelievo di unità di sedimento di fondo molle in cui sono noti la superficie e/o il volume; 2. campionamento dei macroinvertebrati bentonici con trappole trofiche e substrati artificiali.

Indipendentemente dalla tecnica di campionamento che si utilizza è importante che l'unità campionaria sia raccolta in modo corretto (e.g., perdita di materiale appartenente all'unità campionaria), sia sufficiente per descrivere le caratteristiche strutturali della comunità e sia oggettiva, cioè tale che tutte le sue componenti abbiano la stessa probabilità di essere raccolte. Per questo è importante che la dimensione del campione sia sufficiente e che la tecnica utilizzata per la raccolta sia estensiva e non selettiva per taxa o per dimensione degli individui.

Nei paragrafi successivi vengono riportate le due tecniche di campionamento di macroinvertebrati bentonici (i.e., prelievo di unità di superficie/volume di sedimento di fondo molle e campionamento dei macroinvertebrati con trappole trofiche) con la descrizione delle specifiche procedure. Per ciascuna procedura sono stati riportati gli strumenti utilizzati (par. *Strumenti*), sono stati descritti tutti i passaggi (par. *Procedura*), indicando e sottolineando gli eventuali problemi o suggerimenti (par. *Considerazioni*).

Il presente capitolo è articolato in cinque paragrafi, dei quali il primo (2.1) è a carattere introduttivo, il secondo ed il terzo paragrafo (2.2 e 2.3) sono dedicati alla descrizione delle attività in campo relative alle tecniche di campionamento adottate ed i successivi due paragrafi (2.4 e 2.5) descrivono le fasi di lavoro effettuate in laboratorio sui campioni di macroinvertebrati bentonici.

### **2.3 Prelievo di unità di sedimento di fondo molle in cui sono noti la superficie e/o il volume**

Dopo aver definito il piano di campionamento si procede ad individuare la strumentazione più adatta per effettuare il lavoro di campo cioè prelevare il sedimento dai siti di campionamento. Il prelievo di sedimento può essere effettuato per mezzo di diversi strumenti tra i quali la benna ed il box corer sono particolarmente adatti a studi di tipo quantitativo; per questo vengono preferiti rispetto ad altri campionatori. D'altra parte, l'utilizzo di benne e box corer può presentare alcuni svantaggi, legati sostanzialmente al tipo ed alle caratteristiche



del substrato da campionare. Infatti, nel caso in cui si avesse la necessità di campionare su substrato duro e/o roccioso, l'uso di questo tipo di strumenti sarebbe limitato o addirittura impossibile da adottare; inoltre, se il fondale fosse caratterizzato dalla presenza di macrofite sommerse o emergenti, si avrebbero notevoli difficoltà nella penetrazione dello strumento al di sotto della superficie di fondo per la presenza di rizomi. A seconda, quindi, degli obiettivi prefissati e delle caratteristiche del fondale si deve procedere alla scelta del campionatore più adeguato.

### **2.3.1 Scelta degli strumenti di campionamento**

Esistono numerosi strumenti che possono essere utilizzati per il campionamento dei macroinvertebrati bentonici di fondi incoerenti. Principalmente, possono essere usate draghe, benne, carotatori di vario tipo e box corer.

L'uso della draga risulta essere particolarmente vantaggioso quando si debbano effettuare campionamenti qualitativi mirati alla raccolta di specie *target*, in particolare bivalvi e gasteropodi di alcuni millimetri di dimensione; d'altro canto, l'uso della draga non è indicato nel momento in cui debbano essere effettuate analisi di tipo quantitativo. I campionamenti effettuati con la draga forniscono la possibilità di avere un quadro qualitativo ampio e generale del popolamento bentonico di una determinata area, ma essendo difficilmente misurabile la quantità di sedimento manipolato durante le fasi di prelievo, questi campionamenti sono inadatti per un'analisi di tipo quantitativo. Inoltre, il fatto che, durante le operazioni di prelievo, le draghe vengano trascinate sul fondale determina un forte disturbo per le comunità bentoniche, favorendo l'allontanamento delle specie più vagili, facilitando la frammentazione degli organismi raccolti non dotati di valve o gusci resistenti e rendendoli assolutamente inadatti per le analisi successive (Gambi *et al.*, 1987). In generale, comunque, il campionamento con la draga non è adeguato per l'applicazione di descrittori dello stato di salute legati alle dimensioni corporee, in quanto una grossa componente dimensionale dei macroinvertebrati bentonici viene persa. Infatti, per riuscire a filtrare il sedimento si utilizzano draghe con maglie di gran lunga più grandi di quelle necessarie a trattenere organismi di piccole

dimensioni, a partire da 1 millimetro, che costituiscono una componente rilevante in termini dimensionali delle comunità bentoniche.

Benne, carotatori e box corer sono strumenti particolarmente adatti a studi di tipo quantitativo, necessari per un'adeguata caratterizzazione delle comunità di macroinvertebrati bentonici; essi consentono, infatti, di prelevare più o meno facilmente quantità ben definite di sedimento e, quindi, di ottenere una notevole riproducibilità del campione. Questi strumenti permettono, inoltre, di ottenere informazioni più precise sulla distribuzione degli organismi e, campionando esemplari più integri, permettono anche una valutazione più accurata della biomassa individuale.

L'uso della benna con appropriate dimensioni può permettere la raccolta di campioni relativamente indisturbati soprattutto se la benna viene immanicata e non calata utilizzando una corda. L'area di presa delle benne utilizzate più comunemente oscilla tra 0.03 e 0.55 m<sup>2</sup>, anche se le dimensioni usate più comunemente sono tra 0.1 e 0.2 m<sup>2</sup> (Eleftheriou e Holme, 1984; Roddle, 1989).

Recentemente, il testo *Protocolli per il campionamento e la determinazione degli elementi di qualità biologica e fisico-chimica nell'ambito dei programmi di monitoraggio ex 2000/60/CE delle acque di transizione* pubblicato on line da ICRAM (2008), suggerisce di utilizzare un campionatore la cui superficie sia almeno pari a 200 cm<sup>2</sup>.

La benna immanicata permette di ottenere una penetrazione perpendicolare alla superficie del sedimento e, quindi, permette di raggiungere la profondità di prelievo desiderata. Al contrario, le benne che vengono calate con una corda possono risentire pesantemente delle correnti sommerse e perciò conficcarsi nel sedimento in maniera molto diversa da un campione ad un altro sia in termini di deviazione dalla perpendicolare sia in termini di profondità di prelievo raggiunta. Inoltre, il meccanismo di chiusura della benna è in molti casi passivo e si avvia dopo che la benna comincia ad essere rimossa dal fondo.

I carotatori ed i box corer sono particolarmente adatti al prelievo di campioni di sedimento utilizzabili per la raccolta della componente di macroinvertebrati bentonici in quanto non provocano un significativo disturbo del substrato ed il dilavamento del materiale è relativamente limitato; tali strumenti sono, inoltre, in grado di mantenere inalterata la stratificazione presente nel campione, al

contrario di quanto si verifica con le benne. Principalmente per questi motivi, quindi, carotatori e box corer sono particolarmente utili per studi di tipo quantitativo e per analisi della distribuzione verticale degli organismi nel sedimento. I carotatori hanno, però, dei limiti operativi legati al fatto che, non essendo dotati di meccanismi di chiusura, sono caratterizzati molto spesso da fuoriuscita di sedimento soprattutto se questo è poco compatto, hanno generalmente un diametro di pochi centimetri che comporta un elevato numero di prelievi per ottenere campioni significativi; inoltre, essi sono costruiti in plexiglas e perciò possono essere soggetti a rottura se colpiscono un corpo solido.

Allo stato attuale, in considerazione dei vantaggi e svantaggi che ciascun tipo di strumento presenta, i box corer manuali (figura 2.1) sembrano essere gli strumenti più idonei per il campionamento di macroinvertebrati bentonici, finalizzato alla costruzione di descrittori dimensionali dello stato di salute degli ecosistemi acquatici di transizione (Kramer *et al.*, 1994).



**Figura 2.1** – Box corer manuale.

Generalmente l'area di presa del box corer è di circa  $0.02 \text{ m}^2$  e la profondità di penetrazione può anche essere modificata inserendo esternamente al *box* un piano trasversale regolabile in altezza.

L'uso del box corer può presentare alcuni vantaggi rispetto ad altri strumenti poiché essi sono: *i*) immanicati e dotati di un'asta allungabile fino a 3m, *ii*) dotati di un meccanismo di chiusura attivo e controllato direttamente dall'operatore, *iii*) dotati di un meccanismo di chiusura che consente la raccolta solamente del sedimento presente all'interno del *box*, *iv*) possono essere facilmente utilizzati sia da operatori posizionati su piccole imbarcazioni sia da operatori deambulanti.

In figura 2.2 è riportata la sequenza delle fasi di utilizzo del box corer manuale manovrato da un operatore deambulante.



**Figura 2.2** – Sequenza delle fasi con cui viene utilizzato un box corer manuale da un operatore deambulante. In successione da sinistra verso destra si osserva la fase di apertura e posizionamento del box corer, l’inserimento del box corer nel sedimento ed infine la fase di chiusura.

Al fine di rendere minima o nulla l’azione di disturbo sul fondale si consiglia di effettuare i campionamenti da una barca. Le fasi di campionamento con box corer sono essenzialmente due:

- prelievo di sedimento
- vagliatura dei campioni.

### **2.3.2 Prelievo di sedimento con box corer**

**PROCEDURA** Il box corer o carotatore a cassetta, viene conficcato nel sedimento e fatto scendere fino a portare il bordo superiore a livello del sedimento stesso. È necessario avere una buona presa dello strumento per poterlo successivamente chiudere mediante l’apposita leva e, quindi, sollevarlo. Quando il box corer contenente il campione di sedimento è affiorato, la superficie esterna del campionatore deve essere accuratamente sciacquata per evitare contaminazioni del campione con il sedimento esterno. Successivamente, il box corer viene adagiato verticalmente in un’ampia vasca, aperto e liberato dal blocco di sedimento. In figura 2.3 si può osservare come appare un campione di sedimento estratto dal box corer.



**Figura 2.3** – Campione di sedimento estratto dal box corer.

Il campione, rimosso dal box corer, è collocato in un contenitore in plastica dove viene aggiunta acqua di lavaggio o acqua di campo precedentemente filtrata su filtro 0.05 mm in modo tale da non contaminare il campione con organismi estranei ad esso, al fine di sciogliere adeguatamente il sedimento stesso. Il contenitore in cui lavorare deve essere sufficientemente grande da permettere la successiva vagliatura del campione che viene effettuata per allontanare il detrito organico ed il sedimento più fine. Qualora non fosse possibile l'immediato trattamento del campione, si consiglia di riporlo in un sacchetto di plastica resistente e opportunamente etichettato e di effettuare la vagliatura in laboratorio nel più breve tempo possibile. Prima di un successivo utilizzo, il box corer deve essere accuratamente sciacquato per evitare la contaminazione dei campioni.

### **2.3.3 Vagliatura dei campioni**

**PROCEDURA** La vagliatura consiste nel far passare il campione che è in acqua attraverso un setaccio con maglia quadrata per separare i macroinvertebrati bentonici dal resto del materiale campionato ed evitare la perdita di organismi significativi. Nei programmi di monitoraggio per le acque di transizione la maglia del setaccio con cui effettuare la vagliatura è fissata in 1 mm<sup>2</sup> (*Protocolli per il campionamento e la determinazione degli elementi di qualità biologica e fisico-chimica nell'ambito dei programmi di monitoraggio ex 2000/60/CE delle acque di transizione*, 2008).

Il materiale vagliato deve essere successivamente ricontrrollato in modo da ripulire la componente biologica da impurità ed altro materiale estraneo. Dopo la fase di vagliatura, il volume del campione si presenta notevolmente ridotto in

quanto sono stati eliminati il sedimento fine, l'acqua in eccesso e le parti macroscopiche di detrito. In figura 2.4 è riportato un esempio di come appare il campione di sedimento dopo la vagliatura in campo.



**Figura 2.4** – Campione dopo vagliatura in campo.

Al termine di queste fasi di vagliatura e pulitura del campione dal materiale più finemente particolato, il campione raccolto viene riposto all'interno di contenitori per procedere alla fissazione, avendo cura di rimuovere manualmente gli organismi rimasti eventualmente attaccati al setaccio ed inserendoli nello stesso contenitore. I contenitori per la conservazione dei campioni devono essere a chiusura ermetica, con un volume sufficiente a contenere il campione e le soluzioni di trattamento; inoltre, è importante che i contenitori abbiano un'apertura ampia in modo da facilitare le operazioni di svuotamento. Possono essere utilizzati, ad esempio, contenitori con un volume di 1000 ml in plastica semitrasparente in modo da poterne osservare il contenuto (figura 2.5).



**Figura 2.5** – Campione vagliato, stoccato e fissato in una bottiglia di plastica con tappo ermetico.

Per le procedure di fissazione ed il tipo di soluzioni da utilizzare si rimanda al paragrafo 2.5.

Il campione fissato deve essere etichettato prima di essere trasferito nel luogo di stoccaggio. L'etichetta deve riportare in modo sintetico tutte le indicazioni relative a sito e data di campionamento, nome della stazione, numero di replica, nome degli operatori che hanno effettuato il campionamento ed eventuali note.

**CONSIDERAZIONI** *Durante le fasi di vagliatura e di stoccaggio provvisorio è opportuno utilizzare alcuni accorgimenti: i) non si deve esercitare un'azione di sfregamento del campione contro la superficie del setaccio per non correre il rischio di procurare dei danni strutturali agli organismi; ii) conviene versare un po' per volta il contenuto della vasca nel setaccio per evitare di intasarlo; iii) è opportuno raccogliere l'acqua di lavaggio del setaccio in un apposito contenitore per controllare che non ci siano state perdite fortuite di materiale e nel caso recuperare gli eventuali organismi presenti; iv) si consiglia di riempire il contenitore per lo stoccaggio non oltre il 40-50% del proprio volume per rendere efficace la fissazione; v) dopo aver aggiunto la soluzione fissativa e chiuso il tappo della bottiglia, bisogna agitare il campione in modo tale da favorire la diluizione completa dell'intero campione nella soluzione fissativa.*

#### **2.3.4 Lavaggio e sorting dei campioni**

I campioni di macroinvertebrati bentonici, dopo vagliatura e fissazione, vengono sottoposti a fasi di manipolazione in laboratorio che consistono nel lavaggio e nel sorting. La fase di lavaggio è necessaria per allontanare la soluzione fissativa con cui i campioni sono stati trattati precedentemente. Per tutelare la salute degli operatori, il lavaggio deve essere effettuato sotto cappa raccogliendo l'acqua residua di lavaggio in contenitori idonei. Il campione viene riversato su un retino con maglia 0.25 mm<sup>2</sup> e l'acqua può essere spruzzata direttamente sul campione tramite un ugello tipo doccia purché la pressione non sia tale da danneggiare gli animali. È difficile stabilire quanto tempo debba durare la fase di lavaggio in quanto questo dipende dalla dimensione del campione e dall'accuratezza che si vuole raggiungere. Dopo il lavaggio si procede al sorting dei campioni, a cui si rimanda al paragrafo 2.4.4. Inoltre, per la determinazione della biomassa

individuale dei macroinvertebrati finalizzata alla costruzione dei descrittori dimensionali si rimanda alla sezione 2.6.

#### **2.4 Campionamento dei macroinvertebrati bentonici con trappole trofiche e substrati artificiali**

Il campionamento di macroinvertebrati bentonici con substrati artificiali si basa sulla costruzione ed introduzione in natura di substrati costituiti da ciottoli o da materiale vegetale che formano superfici colonizzabili da parte dei macroinvertebrati bentonici.

Tra le strutture semi-naturali più utilizzate per questo tipo di campionamento troviamo i campionatori multiplastrata, i campionatori a cestello e le trappole trofiche.

Il campionatore multiplastre più frequentemente utilizzato è costituito da piastre di forma quadrangolare o rotonda di masonite o materiale equivalente, alternate a spaziatori e fissate su una spranga o corda in nylon sospesa in acqua. Similmente, il campionatore a cestello è una struttura galleggiante costituita da una rete in nylon, riempita di ciottoli e chiusa ad una estremità. Un altro tipo di campionatore sono le trappole trofiche, costituite da detrito vegetale immesso all'interno di sacchetti a rete in nylon che vengono depositati sul fondo dell'ecosistema acquatico (Kaushik e Hynes, 1971; Petersen e Cummins, 1974).

Tra le tre tipologie di substrato artificiale, i campionatori multiplastrata ed a cestello hanno la necessità di dover rimanere in acqua per un periodo di tempo maggiore rispetto ai substrati costituiti da detrito vegetale affinché possano essere colonizzati dagli invertebrati. Infatti, anche se il tempo di esposizione del substrato artificiale per la colonizzazione degli invertebrati dipende da molteplici fattori, tra cui le caratteristiche strutturali dell'ecosistema ed il periodo stagionale, in generale è necessario un periodo di almeno 30-40 giorni di immersione per i campionatori con piastre e ciottoli, mentre possono essere sufficienti 7 giorni di immersione per le trappole trofiche di detrito vegetale. Ciò è legato sostanzialmente al fatto che le trappole di detrito vegetale costituiscono patch di accumulo di risorsa trofica sul fondo dell'ecosistema acquatico che attirano fortemente i macroinvertebrati bentonici. È, inoltre, importante tener conto del fatto che le trappole trofiche di detrito vegetale costituiscono un supporto quasi naturale per i macroinvertebrati bentonici rispetto ai campionatori



multiplastrata ed a cestello che introducono una condizione di maggiore artificialità nell'ecosistema acquatico da monitorare.

In considerazione dei vantaggi legati all'uso di trappole trofiche rispetto alle altre tipologie di campionatori artificiali ed anche alla semplicità di allestimento delle stesse, nel presente manuale verranno descritte le metodologie per la costruzione di trappole di detrito vegetale.

#### **2.4.1 Substrati artificiali costituiti da trappole trofiche**

Le trappole trofiche sono costituite da “pacchi” di detrito vegetale che vengono introdotti in natura e riposti sul fondo dell'ecosistema acquatico. Questo tipo di approccio, noto in letteratura come “leaf bag technique” (Bocock e Gilbert, 1957; Shanks e Olson, 1961), può essere utilizzato per il campionamento di macroinvertebrati bentonici che comunemente colonizzano il detrito organico in decomposizione negli ecosistemi acquatici (Kaushik e Hynes, 1971; Petersen e Cummins, 1974). I pacchi di foglie, immessi in acqua, simulano il naturale accumulo di materia organica morta (*i.e.*, detrito) che si realizza negli ambienti acquatici (ad esempio estuari, fiumi, laghi e lagune) principalmente a partire dalla stagione tardo-estiva ed inizio-autunnale (Petersen e Cummins, 1974).

Le trappole trofiche di detrito sono generalmente costituite dalle specie vegetali più rappresentative dell'ecosistema in studio in quanto esse costituiscono il maggior input detritico per le comunità bentoniche presenti. Le specie vegetali comunemente osservate negli ecosistemi acquatici di transizione del bacino del Mediterraneo sono diverse, tra cui *Phragmites australis* (Cav.) Trin ex Steud., *Schoenus nigricans* L., *Spartina alterniflora* Loisel, *Typha latifolia* L. e tra quelle sommerse *Cymodocea nodosa* (Ucria) Asch. e *Zostera marina* L. La specie più frequentemente utilizzata nella costruzione di pacchi di detrito vegetale è la *Phragmites australis* in quanto ubiquitaria in queste aree ed anche risorsa trofica preferenzialmente utilizzata dagli invertebrati.

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

### **2.4.2 Allestimento ed immissione in natura delle trappole trofiche**

Il lavoro finalizzato alla costruzione ed introduzione in campo delle trappole di detrito vegetale prevede:

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

#### ➤ **Raccolta del materiale fogliare**

**STRUMENTI** È conveniente disporre di:

- cesoie
- contenitori in plastica
- guanti in lattice

**PROCEDURA** Per la preparazione dei pacchi di detrito vegetale è necessario prima di tutto disporre del materiale fogliare che deve esser raccolto in campo. Nel caso di foglie di *Phragmites australis*, generalmente vengono raccolte nel periodo tardo-estivo o inizio-autunnale, quando sono prossime all'abscissione. In campo, muniti di cesoie, si procede direttamente al taglio delle foglie, avendo cura di non sradicare l'intera pianta; le foglie vengono, quindi, accumulate in grossi contenitori o in sacchi che permettano un più agevole trasporto in laboratorio per le fasi successive di lavoro.

**CONSIDERAZIONI** *Per la raccolta delle foglie in campo non sono necessari particolari strumenti; sono indispensabili un paio di cesoie e contenitori sufficientemente grandi per il trasporto. Inoltre, è consigliabile utilizzare un paio di guanti come protezione per le mani, un mascherino protettivo per gli occhi e un abbigliamento adatto al lavoro in campo, tra cui un paio di stivali.*

➤ **Stoccaggio**

**PROCEDURA** Il materiale vegetale raccolto in campo viene trasferito in laboratorio e sparso su superfici abbastanza ampie nel più breve tempo possibile. Le foglie devono essere lasciate per qualche tempo, almeno una settimana, in ambiente luminoso ed areato perché possa completarsi il processo di essiccazione. L'ambiente areato è consigliabile affinché non si creino muffe sulla superficie fogliare, che potrebbero inibire il consumo delle foglie da parte degli invertebrati bentonici. Se possibile, è meglio posare le foglie all'aperto nei giorni soleggiati e riporle all'interno prima del tramonto.

Il trattamento del materiale fogliare in ambiente areato deve proseguire fino a che le foglie non siano abbastanza secche; possono essere sufficienti un paio di settimane, se le foglie vengono esposte quotidianamente al sole. In questo modo, il materiale vegetale è pronto per le fasi di lavoro successive oppure per lo stoccaggio che è necessario effettuare in un ambiente sufficientemente asciutto.

➤ **Trattamento in stufa termostata**

Per la preparazione dei pacchi di detrito, è preferibile utilizzare foglie secche rispetto a quelle verdi, in quanto le prime sono rese più appetibili per gli invertebrati bentonici per la presenza di microfunghi che le colonizzano con maggiore densità rispetto alle foglie non secche. Infatti, al momento dell'immissione in acqua le foglie secche sono caratterizzate da un più rapido rilascio di sostanze organiche solubili, fosforo e potassio rispetto alle foglie verdi e fresche (Gessner, 1991), rendendole più facilmente colonizzabili dagli ifomiceti acquatici (Barlocher, 1991) e quindi, più aggredibili dai macroinvertebrati bentonici. Per questo, la preparazione dei pacchi di foglie prevede una fase di trattamento in stufa termostata finalizzata anche alla stima del peso secco di ciascun pacco.

**STRUMENTI** *Stufa termostata* – Per le operazioni di essiccazione del materiale biologico si utilizza una stufa termostata, meglio se a ventilazione forzata che consente un rapido raggiungimento della temperatura desiderata ed una omogenea distribuzione del calore all'interno della cabina.

Generalmente, la stufa è dotata di un'unica apertura chiusa da una o talvolta due porte, nel qual caso la più interna è in vetro al fine di consentire l'ispezione senza alterare l'equilibrio termico. L'isolamento è generalmente costituito da lana di roccia (figura 2.6).



**Figura 2.6** – Stufa termostata.

**PROCEDURA** In laboratorio, quando le foglie sono ben asciutte ed essiccate, per renderle più omogenee devono essere spuntate della parte apicale e della guaina basale che, avendo una differente consistenza ed una maggiore durezza rispetto alla restante parte della foglia, risultano più difficilmente utilizzabili dai macroinvertebrati bentonici. Per facilitare la preparazione delle trappole trofiche (*i.e.*, pacchi fogliari), è preferibile tagliare le foglie in frammenti più o meno uguali di lunghezza pari a circa 10 cm. Le foglie tagliate in frammenti, vengono riposte in stufa termostata meglio se a ventilazione forzata, per circa 72 ore a 60°C, in modo tale da permettere la perdita completa dell'acqua di idratazione dalla guaina fogliare o meglio il raggiungimento di un peso costante. Il trattamento in stufa termostata a 60°C per 72 ore è stato standardizzato in base a procedure sperimentali atte anche a ridurre la possibilità di denaturare composti organici tra cui principalmente le proteine, che può verificarsi nel caso di alte temperature (Paine, 1971). In caso di stufa priva di ventilazione forzata il tempo richiesto per il raggiungimento di un peso costante del materiale fogliare con la perdita completa dell'acqua di idratazione potrebbe essere maggiore di 72 ore.

➤ **Preparazione dei pacchi fogliari**

Per disporre di campioni comparabili nell'analisi quantitativa dei macroinvertebrati è necessario costruire pacchi di detrito di peso secco uguale.

**STRUMENTI** *Bilancia analitica* – Le fasi di misura del peso del materiale fogliare vengono effettuate su bilancia analitica che può avere differenti caratteristiche a seconda del modello e della marca. In generale, una caratteristica che contraddistingue alcuni modelli di bilancia analitica da altri è la presenza di una schermatura contro le correnti d'aria, costituita da una struttura semirotonda esterna azionabile manualmente o a motore. Nel caso in cui essa sia presente, il campione dovrebbe essere climatizzato alla temperatura della bilancia (figura 2.7).



**Figura 2.7** – Bilancia analitica.

**PROCEDURA** Le foglie tagliate ed essiccate, vengono pesate in gruppi uguali su bilancia analitica con precisione  $\pm 0.001\text{g}$  ed accuratezza della pesata  $\pm 0.050\text{g}$ ; in questo modo si potrà disporre di repliche di campioni confrontabili tra loro. Il peso secco standardizzato è pari a 3.000 grammi, ottenuto attraverso prove sperimentali nell'ambito di studi di monitoraggio in ecosistemi di transizione.

Ciascun gruppo di foglie di peso noto, viene riposto all'interno di un sacchetto a rete in nylon, precedentemente annodato ad una estremità e successivamente chiuso alla stessa maniera all'altra estremità. Preferibilmente, i sacchetti vengono realizzati con rete di maglia  $0.5 \times 0.5\text{cm}$  di luce che permette il passaggio di macroinvertebrati bentonici all'interno delle trappole trofiche ed allo stesso tempo limita la perdita di frammenti fogliari. I pacchi di detrito vegetale, così

organizzati, costituiscono le trappole trofiche da sistemare in campo per il campionamento di macroinvertebrati bentonici (figura 2.8).

Prima del trasferimento in natura, i pacchi di detrito devono essere sistemati in file di almeno tre pacchi, utilizzando una corda in nylon e avendo cura di lasciare alle due estremità una lunghezza di corda tale da permettere l'ancoraggio a supporti immessi in acqua. I pacchi di ciascuna fila costituiscono le repliche di campionatori per i macroinvertebrati bentonici per ciascuna stazione di campionamento. Ad ogni fila di pacchi è consigliabile legare un piccolo galleggiante per l'identificazione della stazione di campionamento ed una zavorra ad ogni estremità, che permetta ai pacchi di portarsi sul fondo. Prima del trasferimento in natura, è consigliabile tenere i pacchi di detrito per 8-12 ore immersi in acqua all'interno di contenitori sottoposti ad un leggero flusso di acqua corrente che permette sia la re-idratazione delle foglie sia la perdita di sostanze quali i tannini. La re-idratazione delle foglie minimizza la perdita di materiale vegetale durante il trasporto in campo e facilita la sedimentazione dei pacchi di detrito sul fondo acquatico in natura; d'altra parte, la perdita di alcune sostanze che possono essere tossiche per i macroinvertebrati bentonici, facilita la colonizzazione delle foglie (figura 2.9).



**Figura 2.8** – In alto: rete in nylon e foglie di *Phragmites australis*. In basso: pacchi di foglie di *Phragmites australis* pronti per l'immissione in campo.



**Figura 2.9** – Pacchi di foglie di *Phragmites australis* sottoposti all'azione di acqua corrente prima dell'introduzione in natura.

➤ **Immissione in natura**

**STRUMENTI** Per il trasferimento e la sistemazione dei pacchi di detrito in natura sono necessari strumenti e materiale facilmente reperibili:

- buste in polietilene
- contenitori in plastica di grandi dimensioni
- corda in nylon
- forbici
- galleggianti
- zavorre.

Per il trasferimento delle trappole di detrito fogliare in natura, è consigliabile riporre ciascuna corda ed i pacchi ad essa legati, all'interno di una busta in polietilene per evitare perdita di materiale fogliare e confusione tra file di pacchi. È conveniente riporre tutto il materiale in grossi contenitori rigidi in modo tale da permettere un agevole trasferimento in campo.

La sistemazione in acqua delle trappole trofiche può essere effettuata da una barca con la quale ci si porta sulla stazione di campionamento o a piedi, se la profondità lo permette. In campo, è preferibile effettuare le fasi di lavoro in collaborazione tra due operatori in modo tale da facilitare le operazioni di rilascio in acqua.

### **2.4.3 Prelievo delle trappole trofiche**

In linea generale, dopo circa sette giorni dalla sistemazione dei pacchi di detrito in campo, è possibile effettuare il prelievo degli stessi. Tale intervallo di tempo è riferito a foglie di *P. australis*, ma può variare in funzione di fattori interni, quali le caratteristiche strutturali del detrito, ed esterni quali le caratteristiche abiotiche dell'ecosistema o in relazione a fattori legati al periodo stagionale di campionamento.

**STRUMENTI** Anche per il prelievo delle trappole trofiche sono necessari strumenti e materiale facilmente reperibili:

- buste in polietilene
- contenitori in plastica di grandi dimensioni
- contenitori termostatati (se disponibili)
- forbici

**PROCEDURA** Durante il campionamento è necessario operare con la massima accuratezza in modo da evitare la perdita di macroinvertebrati che colonizzano il detrito fogliare. È conveniente che il campionamento sia effettuato da due operatori, muniti di buste in polietilene e forbici; un operatore procede al taglio della corda, mentre l'altro è pronto a far scivolare la busta sotto il pacco di foglie permettendo anche il passaggio di acqua all'interno fino a ricoprire il pacco stesso. Le buste devono essere richiuse in modo tale da lasciare all'interno la massima quantità di aria possibile (figura 2.10). I campioni devono essere trasferiti in laboratorio preferibilmente ad una temperatura che sia abbastanza vicina a quella esterna, utilizzando un contenitore termostatato. In laboratorio, i campioni possono essere riposti in camera termostata ad una temperatura costante per mantenere integra la componente animale. Prima di fare ciò, è necessario aprire le buste per evitare che si creino all'interno condizioni di ipossia; basta porre le buste una accanto all'altra in un grosso contenitore in plastica in modo tale che l'acqua non fuoriesca con il rischio di perdita degli animali. Si può procedere, quindi, alla terza fase di lavoro che prevede l'analisi dei campioni in laboratorio attraverso il sorting.

Anche per il prelievo delle trappole trofiche sono necessari strumenti e materiale facilmente reperibili:





**Figura 2.10** – Pacchi di detrito fogliare di *Phragmites australis* dopo il campionamento in natura.

#### **2.4.4 Sorting dei campioni**

Ciascun campione, costituito dal pacco di detrito e dai macroinvertebrati bentonici ad esso associati, viene sottoposto in laboratorio alla procedura del sorting che consiste essenzialmente nella separazione della componente animale da quella vegetale e da eventuale sedimento.

**STRUMENTI** Il sorting dei campioni viene effettuato in laboratorio utilizzando, se possibile, strumentazione specifica come di seguito indicato:

- bicchieri in plastica
- contenitori in plastica
- etichette
- pipette Pasteur in plastica
- pinzette in acciaio o in plastica con punta arrotondata.

**PROCEDURA** Si procede all'apertura della busta e si versa il campione e l'acqua nel contenitore per le fasi successive di sorting. Dopo aver grossolanamente separato i macroinvertebrati bentonici dalle foglie di detrito, si procede ad una pulizia più accurata delle foglie da piccoli invertebrati che rimangono sulla superficie. Se la quantità di macroinvertebrati bentonici presenti sul detrito lo rende necessario, la separazione della componente animale da quella vegetale può essere effettuata dividendo progressivamente il campione iniziale in più sub-campioni.

I macroinvertebrati vengono prelevati singolarmente per mezzo di pipette Pasteur in plastica trasparente, che possono essere tagliate all'estremità per facilitare il prelievo di individui con dimensioni più grandi, mentre gli individui poco mobili, quali ad esempio i gasteropodi, possono essere prelevati con pinzette con punta arrotondata. Tutti gli individui vengono riposti in bicchieri in plastica opportunamente etichettati, separandoli per grandi raggruppamenti tassonomici ed avendo cura di riempire i bicchieri con il materiale biologico non oltre la metà del volume complessivo. Al termine della fase di sorting si deve procedere ad un attento esame della vasca di raccolta per il prelievo degli individui più piccoli (figura 2.11).

Prima di fissare e conservare i campioni è necessario corredarli di etichette. Su ciascuna etichetta si devono riportare informazioni relative a data, stazione di campionamento e numero di replica. Le stesse informazioni vanno riportate tal quali su protocollo di lavoro (allegato 2.1).

**CONSIDERAZIONI** *Il campione e l'acqua contenuti in ciascuna busta vanno versati in un contenitore in plastica rigida preferibilmente con dimensioni pari a 40 cm di lunghezza, 25cm larghezza e 10 cm altezza o simili, di colore preferibilmente bianco. Tali dimensioni sono consigliate perché contenitori più ampi rendono più difficoltoso il prelievo di invertebrati molto mobili che avrebbero una superficie più ampia su cui muoversi; d'altro canto, contenitori troppo alti risultano scomodi se la procedura del sorting si protrae a lungo. Inoltre, il colore bianco è consigliato perché rende più facilmente visibili gli invertebrati.*



**Figura 2.11** – In alto: buste contenenti pacchi di foglie di *Phragmites australis*. In successione: fasi operative del sorting.

### 2.5 Fissazione e conservazione dei campioni di macroinvertebrati bentonici

La conservazione dei campioni prevede l'uso di sostanze chimiche che impediscono la degenerazione post-mortem dei tessuti per autolisi o per attacco microbico, e che mantengono il più possibile inalterata la struttura tissutale degli

invertebrati. Il miglior risultato nella fissazione si ottiene quando l'animale è ancora vivo, ma anestetizzato. Prima della fissazione è consigliabile, quindi, trattare il campione con una soluzione anestetizzante, ad esempio con alcool etilico al 10-15%, che deve esser versata nel contenitore lasciandola agire per circa 30 minuti. Successivamente, l'anestetizzante può essere rimosso, aspirandolo lungo le pareti interne del contenitore per mezzo di una pipetta Pasteur, facendo attenzione al materiale biologico.

**STRUMENTI** La conservazione dei campioni di macroinvertebrati bentonici avviene secondo le procedure standard di fissazione e conservazione, per cui il materiale e gli strumenti di cui disporre sono:

- bicchieri in plastica
- etichette
- fissativo
- pinzette
- pipette Pasteur.

**PROCEDURA** Per la fissazione del campione, si deve riempire il bicchiere contenente il materiale biologico, con la soluzione fissativa fino a raggiungere circa il 70% dell'intero volume. È necessario agitare delicatamente, ma con cura, il campione in modo che tutti gli individui possano venire a contatto con la soluzione di fissaggio. La eventuale presenza in eccesso di sostanza organica particolata richiede una maggiore quantità di soluzione di fissaggio. Per la fissazione del materiale biologico si può utilizzare alcool etilico al 70% [Box 2.1] oppure formalina al 4% (o formaldeide al 10%) [Box 2.2].

Per la conservazione a lungo termine, il campione può essere lasciato in etanolo al 70% oppure in formalina al 10%, utilizzati per la fissazione. Nel caso in cui si faccia uso di alcool etilico, è necessario monitorare i campioni ed eventualmente aggiungere periodicamente piccole quantità di etanolo poiché questo ha la proprietà di evaporare facilmente.

Uno svantaggio legato all'uso dell'etanolo è la perdita in biomassa che si osserva in campioni di macroinvertebrati trattati con soluzione di alcool etilico; tale perdita in peso può essere variabile a seconda del taxon, dell'intervallo di tempo

di conservazione del campione e del volume del campione stesso (Leuven *et al.*, 1985).

*Box 2.1 – Soluzione di alcool al 70%*

La soluzione di etanolo al 70% si ottiene portando a volume (1 litro) con acqua bidistillata 700 ml di etanolo assoluto. L'alcool etilico è un buon agente conservante, particolarmente adatto alla preservazione di crostacei ed insetti, ma al contrario della formalina non fissa i tessuti. Il suo principale vantaggio è di possedere una bassa tossicità.

*Box 2.2 – Soluzione di formalina al 4%*

La formalina è una soluzione acquosa commerciale di formaldeide al 40%. La formaldeide si ossida facilmente ad acido formico producendo una soluzione con pH variabile da 2.5 a 5. Un tale grado di acidità comporterebbe il danneggiamento delle parti calcificate e degli altri tessuti degli organismi, per cui la formaldeide va tamponata o neutralizzata. Già l'aggiunta di acqua di mare esercita un certo potere tampone sulla formalina commerciale, ma di breve durata. Un pratico modo per tamponare la formalina è usare esamina. In particolare per ottenere 10 litri di soluzione di formalina al 4% si aggiungono 9 litri d'acqua ad 1 litro di formaldeide al 40% tamponata (tampone esamina: 100g di hexamethylenetetramine in 1 litro di formalina commerciale).

La formalina risulta essere la soluzione che meglio conserva le caratteristiche strutturali degli individui, ma essa è tossica e cancerogena; va, quindi, usata con estrema cautela, preferibilmente all'aperto e comunque sempre in ambienti molto ventilati e/o sotto cappa. In laboratorio, si consiglia di usare sempre una maschera per i vapori e dei guanti in lattice. I contenitori trattati con formalina devono essere contrassegnati in modo inequivocabile; per una migliore trattazione sull'uso e sulla gestione di sostanze chimiche pericolose si fa riferimento alla legge 626/94 e successive integrazioni e alle disposizioni interne di ciascun ente di ricerca.

## **2.6 Determinazione della biomassa individuale**

L'ultima fase di lavoro in laboratorio, che prevede la determinazione della biomassa individuale dei macroinvertebrati, finalizzata alla costruzione delle distribuzioni in classi di taglia, può essere realizzata seguendo procedure in parte differenti tra loro, a seconda del materiale e degli strumenti di cui si dispone. Per la determinazione della biomassa individuale dei macroinvertebrati bentonici non è indispensabile una classificazione tassonomica fino a livello specifico. La biomassa di ciascun individuo può essere determinata attraverso:

- la misura diretta ed individuale del peso di tutti gli invertebrati bentonici che costituiscono i campioni;
- le relazioni lunghezza-peso.

### **2.6.1 Misura diretta del peso individuale**

Nel caso in cui la biomassa degli individui venga determinata seguendo la prima procedura metodologica, è sufficiente separare i macroinvertebrati bentonici per grandi raggruppamenti tassonomici. Tale suddivisione può essere effettuata a livello di phylum per platelminti, anellidi, echinodermi e cnidari, mentre è consigliabile separare a livello di classe i molluschi e gli artropodi, distinguendo, in quest'ultimo caso, anche le fasi larvali da quelle adulte. Questa distinzione tra raggruppamenti tassonomici, risulta necessaria, sostanzialmente perché sono state osservate sperimentalmente differenze significative tra diversi taxa, nel contenuto in ceneri (*i.e.*, componente inorganica degli individui).

**STRUMENTI** Per la determinazione della biomassa individuale dei macroinvertebrati bentonici è necessario disporre di strumenti differenti a seconda della procedura che si segue:

- bilancia analitica
- bilancia micro-analitica
- carta bibula
- crogioli in ceramica
- muffola-inceneritore
- piastre multipozzetto
- pinze
- pipette Pasteur

- sistema analisi immagine
- stereoscopio
- stufa termostata

*Bilancia analitica* – Le caratteristiche della bilancia analitica sono state descritte nel paragrafo 2.3.1.

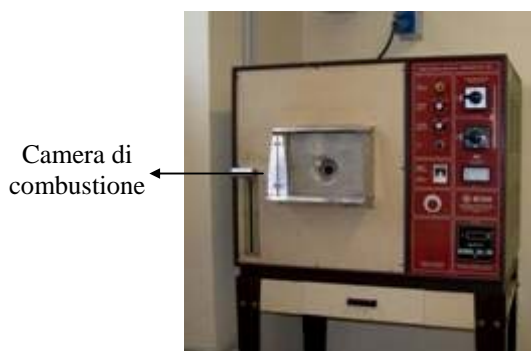
*Bilancia micro-analitica* – Le caratteristiche della bilancia micro-analitica sono sostanzialmente le stesse di una bilancia analitica dotata di schermatura contro le correnti d'aria. Tra le caratteristiche che possono differenziare i due tipi di bilancia sicuramente bisogna ricordare la precisione di lettura che nel caso di bilancia micro-analitica può essere pari a  $0.1\mu\text{g}$  (figura 2.12).



**Figura 2.12** – Bilancia micro-analitica.

*Muffola-inceneritore* – La muffola-inceneritore serve per sottoporre il materiale biologico al processo di combustione che permette la volatilizzazione della parte organica dei campioni.

Generalmente, la muffola-inceneritore permette un trattamento fino a  $1200^{\circ}\text{C}$  essendo caratterizzata da isolamento 100% in fibra ceramica e struttura in acciaio inossidabile (figura 2.13). Il materiale biologico da trattare deve essere posto in contenitori di ceramica adatti alle elevate temperature raggiunte all'interno della camera di combustione.



**Figura 2.13** – Muffola-inceneritore.

*Stereoscopio* – Lo stereoscopio permette una osservazione tridimensionale per mezzo della luce riflessa ad un ingrandimento generalmente compreso tra 8 e 50 volte le dimensioni del campione.

Uno stereoscopio è costituito da:

- due oculari collegati a due cammini ottici
- un prisma e una serie di lenti che permettono l'ingrandimento delle immagini
- un sistema per la selezione dell'ingrandimento desiderato
- un sistema per la messa a fuoco ossia di un dispositivo traslatore che permette di spostare micrometricamente il campione in alto o in basso rispetto all'obiettivo
- l'obiettivo
- una base per appoggiare il campione .

La fonte luminosa utilizzata durante l'uso dello stereoscopio è fornita da uno strumento di solito non incluso nello stereoscopio. Si consiglia l'uso di dispositivi che producono luce fredda per limitare l'essiccazione del campione durante la fase di osservazione.

*Sistema analisi immagine* – Il sistema di analisi immagine permette di realizzare misure geometriche su immagini provenienti da qualsiasi fonte. Attualmente, il sistema di analisi immagine è utilizzato in sostituzione di metodi soggettivi tradizionali di misura di dimensioni lineari su campioni, quali la carta millimetrata, il calibro, etc.

Il sistema di analisi immagine permette di misurare alcune caratteristiche morfometriche come ad esempio la lunghezza degli invertebrati.



Il sistema è costituito da una videocamera collegata ad uno stereoscopio e ad un PC, su cui è installato un software che permette di visualizzare sul monitor una porzione o tutto il campione ingrandito. La telecamera proietta sul monitor l'immagine dell'invertebrato posto sotto lo stereoscopio all'ingrandimento selezionato e tramite il software si acquisisce l'immagine e si procede immediatamente alla misurazione delle caratteristiche biometriche (figura 2.14).



**Figura 2.14** – Sistema di analisi immagine.

**PROCEDURA** Per determinare la biomassa (peso secco al netto delle ceneri) di ciascun individuo è indispensabile disporre di informazioni sul peso secco (*i.e.*, peso costante) e sul contenuto in ceneri (*i.e.*, componente inorganica). Per ottenere queste informazioni si opera come segue.

➤ **Peso secco**

Il peso secco da determinare sugli invertebrati corrisponde al peso costante raggiunto in stufa termostata ad una determinata temperatura. Esso viene determinato su ogni singolo individuo.

**PROCEDURA** I macroinvertebrati bentonici costituenti ciascun campione, dopo fissazione e conservazione, devono essere riposti singolarmente in contenitori multipozzetto, avendo cura di passarli prima su carta bibula per eliminare il fissativo in eccesso; il trasferimento si effettua con pinzette in acciaio o in plastica con punta arrotondata in modo tale da non danneggiare gli individui. É opportuno

etichettare i contenitori multipozzetto riportando le informazioni relative al campione e scrivere su protocollo le informazioni relative al raggruppamento tassonomico di ciascun invertebrato come in allegato 2.2.

Prima di essere pesati, gli invertebrati devono essere trattati in stufa termostata tarata ad una temperatura di 60°C che permette una completa essiccazione degli individui senza causare alterazioni della componente organica degli stessi. Per ottenere ciò, tutti i campioni vengono riposti in stufa termostata per almeno 72 ore, sufficienti al raggiungimento di un peso costante.

La misura del peso secco di ciascun invertebrato viene effettuata con l'ausilio di una bilancia micro-analitica ( $x \pm 0.001\text{mg}$ ), utilizzando preferibilmente pinze per entomologi in modo da evitare di danneggiare gli individui che sono particolarmente fragili in questa fase di lavoro; tutte le informazioni devono essere trascritte su protocollo (allegato 2.2) oppure, se si dispone di un software appropriato, salvate direttamente su PC.

Gli individui pesati vengono riposti in crogioli di ceramica numerati, aggiungendo nello stesso crogiolo tutti gli invertebrati appartenenti allo stesso taxon (ciascun crogiolo deve corrispondere ad un raggruppamento tassonomico) (figura 2.15), ed il numero viene annotato su apposito protocollo (allegato 2.3). Il crogiolo va successivamente lasciato in stufa (60 °C) per qualche ora e ripesato insieme al suo contenuto.

La fase successiva di lavoro prevede la determinazione del contenuto in ceneri che viene effettuata per ciascun taxon.



**Figura 2.15** – Crogiolo in ceramica con macroinvertebrati bentonici appartenenti ad un raggruppamento tassonomico (sinistra) e piastre multipozzetto (destra).

➤ **Contenuto in ceneri**

Il contenuto in ceneri degli invertebrati corrisponde alla componente inorganica degli stessi e si ottiene con trattamento dei campioni in muffola-inceneritore ad alte temperature. Il trattamento in muffola e la determinazione delle ceneri vengono effettuati su gruppi di individui perché il contenuto in ceneri sarebbe difficilmente apprezzabile sul singolo individuo.

**PROCEDURA** Gli invertebrati vengono trattati in muffola ad una temperatura di 450°C per 6 ore in modo che si realizzi la combustione della componente organica (Paine, 1966). È sconsigliabile l'uso di temperature più elevate in quanto potrebbero causare la sublimazione di alcune componenti, perdendo informazione utile alla stima successiva della biomassa (vedi par. successivo). Al termine del processo di combustione, la muffola deve essere aperta con molta cautela perché l'escursione termica potrebbe provocare spostamenti repentini di aria dall'interno verso l'esterno con conseguente perdita di ceneri; per questo conviene coprire i crogioli con apposito coperchio in ceramica. Successivamente, ciascun crogiolo contenente le ceneri, viene trasferito in essiccatore per mezzo di apposita pinza in acciaio (figura 2.16) e pesato su bilancia analitica ( $x \pm 0.010\text{mg}$ ); la stessa operazione deve esser effettuata anche con il crogiolo vuoto (tara) dopo aver eliminato le ceneri. Per tali operazioni è consigliabile l'uso di guanti in lattice per evitare eventuale idratazione del materiale che si pesa. Le informazioni devono essere riportate su protocollo di lavoro (allegato 2.3).



**Figura 2.16** – Pinza in acciaio inossidabile per muffola-inceneritore.

➤ **Biomassa**

Il peso secco al netto delle ceneri o biomassa di ciascun invertebrato si ottiene correggendo il peso secco di ogni singolo individuo per il contenuto in ceneri (in percentuale) calcolato sui raggruppamenti tassonomici degli invertebrati.

**PROCEDURA** Se sono state seguite le procedure fin qui descritte, nella successiva fase di lavoro si può operare come segue.

Si calcola il contenuto in ceneri, espresso in percentuale, per ogni raggruppamento tassonomico di macroinvertebrati applicando la equazione 2.1:

$$\% \text{ ceneri }_t = [(peso \text{ ceneri})_t / (peso \text{ secco})_t] * 100 \quad \text{Eq. 2.1}$$

dove

t = taxon.

Utilizzando il valore percentuale del contenuto in ceneri si calcola la biomassa individuale (mg) degli invertebrati bentonici mediante la equazione 2.2:

$$biomassa \text{ }_i = (peso \text{ secco})_i - \{[(peso \text{ secco})_i * (\% \text{ ceneri})_t] / 100\} \quad \text{Eq. 2.2}$$

dove

i = individuo

t = taxon.

In questo modo si dispone delle informazioni necessarie alla costruzione delle distribuzioni in classi di taglia (cfr. capitolo 3).

### **2.6.2 Stima della biomassa attraverso relazioni allometriche lunghezza-peso**

La biomassa individuale dei macroinvertebrati può essere stimata in modo indiretto mediante relazioni lunghezza-peso, ossia attraverso la costruzione di una relazione tra una dimensione lineare degli invertebrati ed il peso corporeo.

Più esattamente, è possibile costruire le relazioni lunghezza-peso degli invertebrati per gli individui di ciascun taxon attraverso una misura diretta di una dimensione lineare e del peso corporeo (prima procedura) oppure, se non si hanno strumenti e materiale necessari, può essere sufficiente ottenere informazioni sulle relazioni lunghezza-peso mediante ricerca bibliografica.

Nel caso in cui si segua la prima procedura, si devono effettuare misure di lunghezza e peso su gruppi di individui (sub-campioni), mentre è necessario ottenere una misura della lunghezza su tutti gli individui del campione. Se possibile, è consigliabile includere nel sub-campione individui molto variabili nelle loro dimensioni.

➤ **Misura di una dimensione lineare**

**PROCEDURA** Gli invertebrati vengono separati, con l'ausilio di chiavi dicotomiche, in differenti raggruppamenti tassonomici di ognuno dei quali si prende un sub-campione di individui su cui effettuare una misura sia di lunghezza che di peso. Gli individui vengono riposti in una piastra Petri per l'osservazione sotto stereoscopio/microscopio in modo tale da misurarne una dimensione lineare (ad esempio lunghezza, larghezza, diametro), se possibile con l'ausilio di un sistema di analisi immagine. Ad esempio, si può utilizzare uno stereoscopio del tipo Leica MZ12<sub>5</sub> (0.8x-10.0x) oppure Leica MZ6 (0.63x-4.0x) ed un sistema di analisi immagine Leica Qwin (cfr. pag. 82), il quale è costituito da una videocamera collegata allo stereoscopio e ad un PC, su cui è installato un software che permette di visualizzare sul monitor una porzione o tutto il campione ingrandito; la telecamera, proietta sul monitor l'immagine dell'invertebrato, si acquisisce l'immagine tramite il software e si procede immediatamente alla misurazione delle caratteristiche biometriche. Per l'osservazione sotto stereoscopio, si utilizza un ingrandimento variabile da 0.63x a 2.0x a seconda delle dimensioni degli invertebrati; lo stesso ingrandimento selezionato sullo stereoscopio, deve essere scelto sul sistema immagine al PC. Quindi, si procede al fermo immagine ed alla misura della dimensione lineare tramite software, che viene riportata su protocollo di lavoro (allegato 2.2). La misura della dimensione lineare può essere riferita a grandi raggruppamenti tassonomici così come indicato in tabella 2.1 e deve essere effettuata seguendo esattamente la stessa procedura entro ogni raggruppamento tassonomico. È consigliabile effettuare le misure solo sugli individui integri e non spezzati. Ottenute le misure di una dimensione lineare sugli individui dei sub-campioni, si devono effettuare misure del peso secco di ciascun individuo per la stima della biomassa, le cui procedure metodologiche sono state descritte nei paragrafi precedenti.

➤ **Relazioni lunghezza-peso**

Le relazioni lunghezza-peso sono equazioni allometriche di potenza (Benke *et al.*, 1999) nelle quali la biomassa (mg) risulta essere funzione di una dimensione lineare (mm) e sono del tipo:

$$M = a L^b \quad \text{Eq. 2.3}$$

dove

M = biomassa individuale

L = dimensione lineare individuale

a, b = costanti.

La equazione 2.3 è spesso convertita nella forma lineare usando una trasformazione logaritmica:

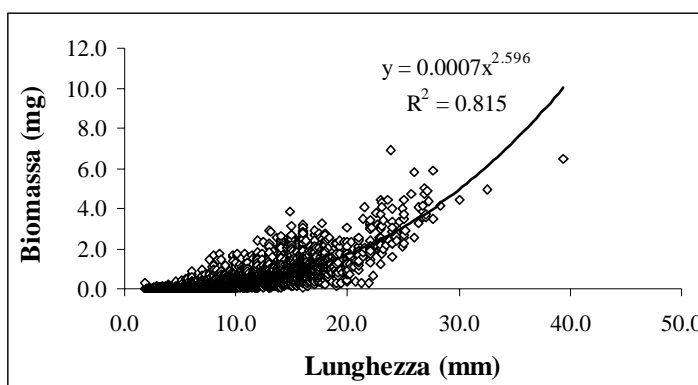
$$\ln M = \ln a + b \ln L \quad \text{Eq. 2.4}$$

Poiché sono noti la dimensione lineare ed il peso secco di ciascun individuo dei sub-campioni, è possibile correlare queste due misure come mostrato in figura 2.17. Quindi, disponendo della misura su dimensione lineare di tutti gli invertebrati dei campioni, e note le costanti *a* e *b*, si calcola la biomassa individuale applicando la equazione 2.3.

**Tabella 2.1** – Dimensione lineare per grandi raggruppamenti tassonomici.

PHYLUM - CLASSE	ORDINE	DIMENSIONE LINEARE
Anthozoa		Asse maggiore
Bivalvia		Asse maggiore delle valve
Crustacea	Amphipoda	Corpo senza antenne e uropodi
Crustacea	Decapoda	Corpo senza antenne
Crustacea	Isopoda	Corpo senza antenne e uropodi
Gastropoda		Asse maggiore della conchiglia
Clitellata		Lunghezza totale
Insecta	Coleoptera	Lunghezza totale (dal margine anteriore della testa all'ultimo segmento addominale)
Insecta	Diptera	Lunghezza totale (dal margine anteriore della testa all'ultimo segmento addominale)
Insecta	Ephemeroptera	Lunghezza totale (dal margine anteriore della testa all'ultimo segmento addominale escluse antenne ed appendici)
Insecta	Odonata	Lunghezza totale (dal margine anteriore della testa all'ultimo segmento addominale escluse antenne ed appendici)
Insecta	Hemiptera	Lunghezza totale (dal margine anteriore della testa all'ultimo segmento addominale escluse antenne)
Insecta	Plecoptera	Lunghezza totale (dal margine anteriore della testa all'ultimo segmento addominale escluse

		antenne ed appendici)
Nematoda		Lunghezza totale
Nemertea		Lunghezza totale
Ophiuroidea		Larghezza del disco
Polychaeta		Lunghezza totale (escluse antenne e appendici)
Turbellaria		Lunghezza totale



**Figura 2.17** – Analisi di correlazione tra lunghezza (mm) e biomassa (mg) di macroinvertebrati bentonici campionati in acque di transizione del Mediterraneo orientale (ordine Diptera).

*CONSIDERAZIONI* Durante tutte le fasi di trattamento dei campioni in laboratorio occorre prestare attenzione alle informazioni iniziali di provenienza dei campioni stessi e trasferirle da una fase di lavoro alla successiva. A tale scopo bisogna etichettare i campioni e registrarli su appositi protocolli di lavoro come indicato negli allegati. In linea generale, è consigliabile utilizzare etichette adesive esterne o nastro carta su cui scrivere con pennarello indelebile o matita, riportando l'informazione minima su nome del sito di campionamento, data di campionamento, numero di identificazione del campione e delle eventuali repliche. Tali informazioni devono avere il loro riscontro su un protocollo dove possono essere aggiunte altre informazioni ritenute utili. Nel caso di una separazione dello stesso campione in più contenitori va riportato lo split number ossia una indicazione del tipo 1 di 3, 2 di 3, 3 di 3.

## **CAPITOLO 3 – DESCRIPTTORI LEGATI ALLA TAGLIA**

*L. Sabetta*

### **3.1 Distribuzioni in classi di taglia: introduzione**

Al fine di evidenziare le proprietà del collettivo di dati derivanti dalla determinazione sperimentale della taglia corporea degli individui rinvenuti in un campione, le misure di biomassa individuale possono essere convenientemente descritte in termini di distribuzione taglia-abbondanza.

La distribuzione taglia-abbondanza di una popolazione biologica, sia essa fitoplanctonica o di macroinvertebrati bentonici, descrive la suddivisione degli individui in intervalli (classi) di dimensione corporea e mostra l'abbondanza relativa delle differenti classi.

Di seguito è descritta la procedura per la costruzione delle distribuzioni in classi di taglia a partire dalla misura di biomassa individuale di una popolazione biologica (e.g. fitoplancton e/o invertebrati bentonici) e per la derivazione di descrittori sintetici delle distribuzioni.

### **3.2 Organizzazione tabulare dei dati**

Per ottenere distribuzioni in classi di taglia a partire dai dati di biomassa individuale delle popolazioni fitoplanctoniche o di macroinvertebrati bentonici derivate come riportato nei capitoli 1 e 2, il primo passaggio è la organizzazione dei dati in una forma idonea. È conveniente organizzare i dati in forma tabulare riportando per ciascun valore di biomassa individuale stimato tutte le informazioni che identificano il campione, tra questi vanno indicati:

- sito di studio
- data di campionamento
- stazione di campionamento.

In tal modo i dati risultano organizzati in maniera funzionale sia per una elaborazione sull'intero data set (ad esempio distribuzione in classi di taglia per ecosistema) sia per una elaborazione su sub-set di dati (ad esempio distribuzione in classi in taglia per tempi di campionamento e/o per stazione di campionamento).

Il trattamento dei dati può essere realizzato utilizzando un qualsiasi software di gestione dati che permetta di fare delle semplici elaborazioni statistiche.



### 3.3 Definizione delle classi di taglia

Nella costruzione di una distribuzione in classi di taglia il primo passaggio consiste nella definizione delle classi di frequenza. Le misure di biomassa individuale di una popolazione biologica variano normalmente su diversi ordini di grandezza, conseguentemente una trasformazione logaritmica dei dati si rende necessaria al fine di ridurre l'intervallo di variazione dei dati e consentire una analisi statistica delle distribuzioni. Una trasformazione logaritmica delle misure di biomassa individuale è anche suggerita dalle evidenze sperimentali che mostrano come le relazioni che gli individui stabiliscono con le risorse siano in modo matematico funzione del logaritmo del loro peso corporeo (relazioni allometriche, Peters, 1983).

La definizione del numero di classi all'interno delle quali raggruppare i logaritmi dei valori di biomassa individuale rappresenta un punto critico nella costruzione delle distribuzioni in taglia. Un numero troppo basso di classi, raggruppando eccessivamente i dati, determina una perdita di informazione, rendendo impossibile evidenziare qualunque caratteristica della distribuzione. Allo stesso tempo, un numero troppo elevato di classi disperde i valori e non rende manifesta la forma della distribuzione.

Il numero di classi di taglia ottimale dipende dal numero totale di osservazioni e dall'intervallo di variazione dei dati. Per stimare in modo oggettivo il numero di classi, sono disponibili vari metodi; tra essi ricordiamo quello di Scott che nel 1979 ha determinato l'ampiezza ottimale delle classi (dalla quale ovviamente dipende direttamente anche il numero di classi), mediante la relazione

$$h = (3.5 s) \sqrt[3]{N} \quad \text{Eq. 3.1}$$

dove

h = ampiezza ottimale delle classi di taglia

s = deviazione standard delle misure del campione

N = numero di osservazioni.

Una volta stabilito il numero ottimale di classi si può procedere alla determinazione dei valori estremi delle classi. L'individuazione del valore minimo e del valore massimo della serie di osservazioni, attraverso ad esempio la seriazione dei valori di biomassa individuale in ordine crescente o decrescente, consente di definire il campo o intervallo di variazione dei valori osservati. Nella formazione delle classi, il limite inferiore della prima classe ed il limite superiore

dell'ultima classe non devono essere necessariamente i valori osservati, ma li devono ovviamente comprendere.

Tra le altre avvertenze importanti nella costruzione delle distribuzioni, è da ricordare che, poiché le misure di biomassa individuale sono una variabile continua, è necessario definire con precisione il valore minimo e quello massimo di ogni classe, onde evitare incertezze nell'attribuzione di un singolo dato tra due classi contigue. Inoltre, la classe iniziale e quella terminale non devono essere classi aperte (ad esempio  $<1$  quella iniziale e  $>12$  quella finale). Con classi estreme aperte, si perde l'informazione del loro valore minimo o massimo e quindi del valore centrale di quella classe; la conseguenza è la perdita di un dato indispensabile, per calcolare i parametri descrittivi della distribuzione (cfr. paragrafo successivo).

### **3.4 Costruzione delle distribuzioni in classi di taglia**

Una volta stabilite le classi di taglia si può procedere in maniera molto semplice alla costruzione della distribuzione taglia-abbondanza della popolazione biologica esaminata attraverso il conteggio del numero di osservazioni (organismi) che ricadono all'interno dell'intervallo di taglia definito da ciascuna classe [box 3.1]. In particolare per ciascuna classe di taglia si può determinare:

- la *frequenza assoluta* della classe, cioè il numero di volte con la quale compare
- la *frequenza relativa* della classe cioè la sua frequenza assoluta divisa per il numero totale
- la *frequenza cumulata* di una classe (che può essere stimata con quelle assolute e/o con quelle relative) è la somma di tutte le frequenze delle classi minori con quella della classe stessa.

La trasformazione da frequenza assoluta a frequenza relativa risulta utile quando si vogliono confrontare due o più distribuzioni, che hanno un differente numero complessivo di osservazioni. La frequenza cumulata offre informazioni importanti quando si intende stimare il numero totale di osservazioni inferiore (o superiore) ad un valore prefissato.

La distribuzione taglia-abbondanza fornisce una lettura sintetica delle caratteristiche più importanti della serie di osservazioni relative alla struttura in taglia della popolazione biologica studiata. Al fine di evidenziare in maniera

semplice e immediata tali proprietà si può ricorrere alla rappresentazione grafica sotto forma di istogramma. Negli istogrammi delle distribuzioni taglia-abbondanza lungo l'asse orizzontale sono riportate le classi di taglia mentre l'asse verticale rappresenta il numero assoluto, oppure la frequenza, con cui compaiono i valori di ogni classe. In figura 3.1 è riportato un esempio di distribuzione in classi di taglia relativa e cumulata di una corporazione di macroinvertebrati bentonici.

Box 3.1 - Costruzione di una distribuzione in classi di taglia di una corporazione di macroinvertebrati bentonici

**Tabella 3.1** – Dati: misure di biomassa individuale (mg) dei macroinvertebrati bentonici rinvenuti in un campione.

0.036	0.040	0.043	0.045	0.053	0.058	0.061	0.062	0.065	0.069	0.074	0.075	0.082	0.083	0.085
0.087	0.087	0.090	0.093	0.093	0.093	0.096	0.096	0.101	0.106	0.107	0.109	0.111	0.115	0.116
0.116	0.117	0.123	0.128	0.131	0.132	0.134	0.139	0.142	0.148	0.150	0.150	0.168	0.179	0.183
0.198	0.199	0.206	0.206	0.207	0.216	0.216	0.218	0.218	0.220	0.225	0.226	0.237	0.247	0.257
0.257	0.262	0.281	0.297	0.308	0.312	0.313	0.315	0.323	0.327	0.328	0.332	0.338	0.342	0.342
0.350	0.350	0.373	0.373	0.374	0.374	0.374	0.374	0.374	0.374	0.374	0.374	0.374	0.374	0.374
0.374	0.374	0.374	0.374	0.382	0.383	0.385	0.391	0.391	0.404	0.406	0.407	0.434	0.434	0.437
0.452	0.452	0.458	0.461	0.467	0.481	0.500	0.504	0.510	0.532	0.596	0.603	0.664	0.666	0.675
0.702	0.709	0.720	0.720	0.756	0.764	0.776	0.780	0.811	0.845	0.845	0.875	0.890	0.896	0.918
0.937	0.985	1.029	1.038	1.100	1.112	1.119	1.125	1.137	1.616	1.670	2.879	3.021	3.673	5.038
10.526	10.327													

N.B.. i valori di biomassa devono essere trasformati in logaritmi naturali prima di costruire la distribuzione in classi.

**Tabella 3.2** – Distribuzione dei macroinvertebrati in classi logaritmiche di taglia.

k	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
$x_k$	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4	5
Classe	$-5 \leq x < -4$	$-4 \leq x < -3$	$-3 \leq x < -2$	$-2 \leq x < -1$	$-1 \leq x < 0$	$0 \leq x < 1$	$1 \leq x < 2$	$2 \leq x < 3$	$3 \leq x < 4$	$4 \leq x < 5$	$5 \leq x < 6$
$F_{a_k}$	0	0	4	33	40	60	9	4	2	0	0
$F_{r_k}$	0	0	2.6	21.7	26.3	39.5	5.9	2.6	1.3	0	0
$F_{c_k}$	0	0	2.6	24.3	50.7	90.1	96.1	98.7	100	100	100

N = numero totale di dati sperimentali (unità statistiche), ovvero la dimensione, o numerosità del campione

k è l'indice della generica classe; quindi k=1, 2, 3, .....Nc

$x_k$  è il valore numerico associato alla classe k

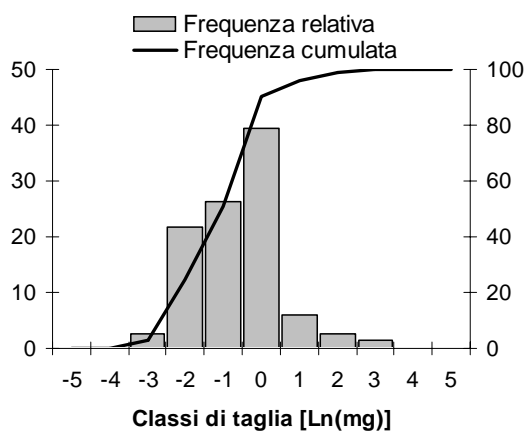
$n_k$  è il numero di *occorrenze* della classe k,

$F_{a_k}$  (frequenza assoluta) =  $n_k$

$F_{r_k}$  (frequenza relativa) =  $n_k/N$

$F_{c_k}$  (frequenza cumulata) =  $\sum_{i=1}^k F_{r_i}$

**Figura 3.1** – Rappresentazione grafica della distribuzione in classi di taglia della corporazione di macroinvertebrati bentonici riportati nell'esempio in tabelle 3.13.2.



### **3.5 Descrizione quantitativa delle distribuzioni e derivazione dei descrittori**

L'analisi quantitativa delle distribuzioni taglia-abbondanza può essere condotta attraverso la determinazione di alcune statistiche che descrivono in maniera sintetica le proprietà fondamentali dei dati sperimentali raccolti. Tipicamente queste misure descrittive sintetiche sono legate a tre proprietà principali delle distribuzioni:

- tendenza centrale
- dispersione
- forma.

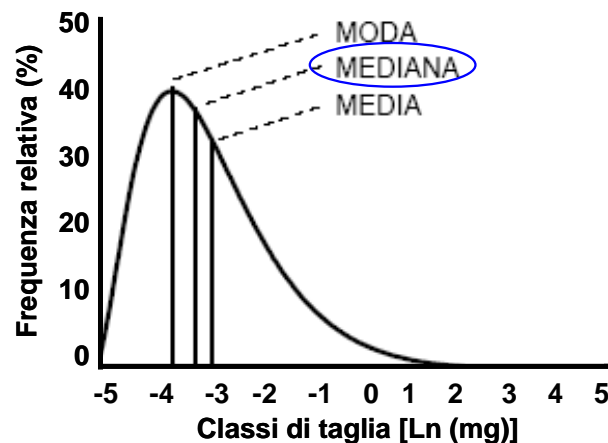
#### **3.5.1 Misure di tendenza centrale**

Le misure di tendenza centrale servono per individuare il valore intorno al quale i dati sono raggruppati. Esistono diverse statistiche che possono fornire questo tipo di informazione e la scelta dipende fondamentalmente dalle caratteristiche della distribuzione. Sono misure di tendenza centrale: media, moda e mediana. Relativamente alle distribuzioni taglia-abbondanza tra le due misure si propone la **mediana** (figura 3.2) come misura sintetica di tendenza centrale. La mediana è la più robusta, in quanto poco influenzata dalla presenza di dati anomali, inoltre non richiede la condizione di normalità della distribuzione, essendo una statistica non parametrica e funziona bene anche per distribuzioni multimodali. Pertanto può rappresentare uno strumento idoneo alla descrizione delle strutture dimensionali. La mediana di una distribuzione taglia-abbondanza è quel valore di taglia corporea che si trova a metà della distribuzione, cioè tale che 50 per cento degli organismi abbia un valore di taglia uguale o inferiore a questo e il restante 50 per cento un valore superiore.

Per calcolare la mediana di un gruppo di dati, occorre:

- disporre i valori in una fila ordinata in modo crescente oppure decrescente e contare il numero totale  $n$  di dati;

- se il numero ( $n$ ) di dati è dispari, la mediana corrisponde al valore numerico del dato centrale, quello che occupa la posizione  $(n+1)/2$ ;
- se il numero ( $n$ ) di dati è pari, la mediana è stimata utilizzando i due valori centrali che occupano le posizioni  $n/2$  e  $n/2+1$ ; con poche osservazioni, come mediana viene assunta la media aritmetica di queste due osservazioni intermedie; con molte osservazioni raggruppate in classi, si ricorre talvolta alle proporzioni.



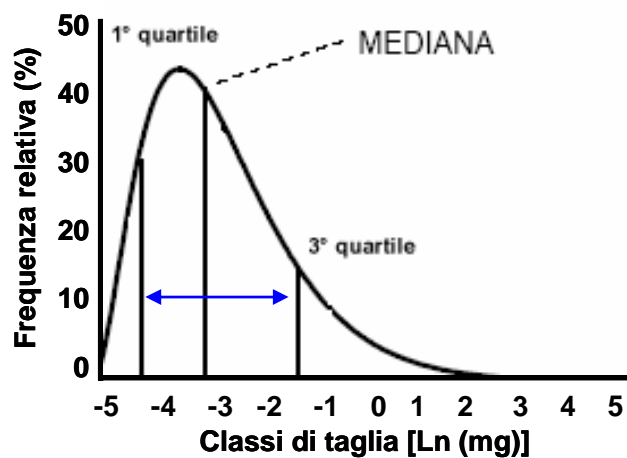
**Figura 3.2** – Rappresentazione schematica delle misure di tendenza centrale di una distribuzione.

### 3.5.2 Misure di dispersione

Le misure di dispersione consentono di quantificare l'ampiezza di una distribuzione taglia-abbondanza, ovvero di definire quanto la distribuzione sia più o meno raccolta intorno al valore centrale.

La più semplice ed intuitiva misura di dispersione è il campo di variabilità dei dati sperimentali, ovvero la differenza tra il valore minimo e quello massimo assunti dalle misure di taglia corporea degli individui. L'intervallo di variazione è però una misura poco efficiente della dispersione dei dati, poiché dipende dalla quantità dei dati osservati e può essere influenzata da occasionali valori eccezionali che

non danno l'idea dell'effettiva dispersione dei dati sperimentali intorno al loro centro. In questo contesto la differenza interquartile o range di quartile (i quartili ripartiscono la distribuzione in 4 parti di pari frequenze) ha il vantaggio di eliminare i valori estremi collocati nelle code della distribuzione. Come misura di dispersione delle distribuzioni taglia-abbondanza si propone la differenza tra il 1°quartile e il 3°quartile (figura 3.3). Il primo quartile è il valore (o l'insieme di valori) di una distribuzione per cui il 25% delle osservazioni è minore uguale ad esso. Il terzo quartile è il valore (o l'insieme di valori) di una distribuzione per cui il 75% delle osservazioni è minore di esso. La differenza tra il 1° e il 3° quartile di una distribuzione taglia-abbondanza rappresenta l'ampiezza dell'intervallo intorno alla taglia mediana che include il 50% delle osservazioni di biomassa corporea individuale.



**Figura 3.3** – Rappresentazione schematica della differenza interquartile tra il 1° e il 3° quartile come misura di dispersione di una distribuzione.

### 3.5.3 Indici di forma

Gli indici di forma consentono di quantificare due caratteristiche di forma della distribuzione taglia-abbondanza: la asimmetria e la curtosi.

Una distribuzione è simmetrica, se i valori che sono equidistanti dalla mediana hanno la stessa frequenza. Se la condizione non è verificata allora la distribuzione è:

- asimmetrica a destra quando i valori che si allontanano maggiormente dalla media sono quelli più elevati, collocate a destra dei valori centrali (figura 3.4a);
- asimmetria a sinistra quando i valori che si allontanano maggiormente dalla media sono quelli minori (figura 3.4 b).

Esistono diversi indici per calcolare l'asimmetria o skewness (skew in inglese significa infatti sbilenco) di una distribuzione, tutti godono delle stesse proprietà:

- sono nulli (skewness = 0) quando la distribuzione è simmetrica;
- sono positivi (skewness > 0) quando la distribuzione è asimmetrica destra;
- sono negativi (skewness < 0) quando la distribuzione è asimmetrica sinistra.

Uno degli indici più comunemente utilizzati calcola la skewness di una distribuzione dal cubo degli scarti dalla media diviso il cubo della deviazione standard (Coefficiente di skewness di Fisher):

$$skewness = \frac{1}{\sigma^3} \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^3}{N} \text{ Eq. 3.2}$$

dove

$x_i$  = i valori di taglia osservati

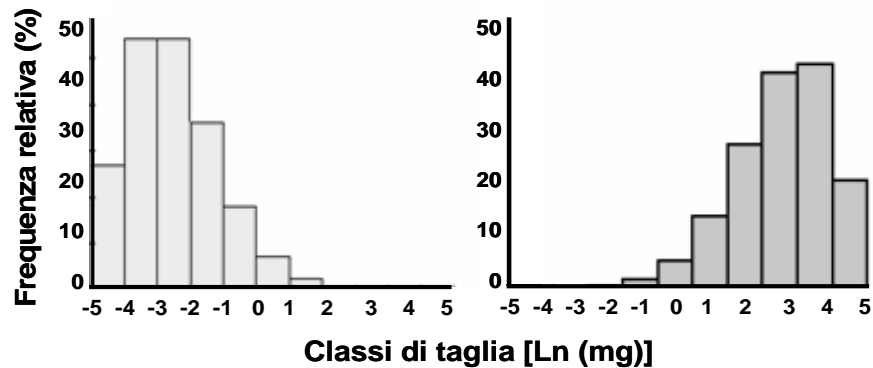
$\bar{x}$  = il valore di taglia medio

N = numero di osservazioni

$\sigma$  = deviazione standard.

Essendo un rapporto tra misure statistiche della stessa distribuzione la misura è adimensionale, indipendente dal valore assoluto degli scarti dalla media; quindi può essere utilizzato per il confronto tra due o più distribuzioni.





**Figura 3.4** – Esempi di distribuzione asimmetrica destra (a) e asimmetrica sinistra (b) rispetto a una distribuzione normale.

Una seconda misura di forma è la curtosi (dal greco kurtos, che significa curvo o convesso), essa descrive il grado di appiattimento, rispetto alla curva normale o gaussiana.

Un indice comunemente utilizzato per calcolare la curtosi è l'indice di curtosi di Fisher corretto per spostare la variazione intorno allo 0:

$$curtosi = \frac{1}{\sigma^4} \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^4}{N} - 3 \quad \text{Eq. 3.3}$$

dove

$x_i$  = valori di taglia osservati

$\bar{x}$  = valore di taglia medio

N = numero di osservazioni

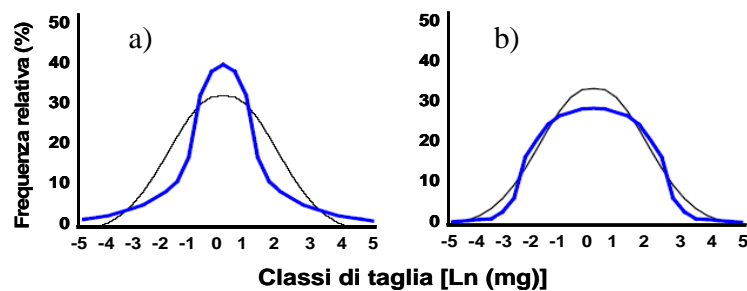
$\sigma$  = deviazione standard.

Una distribuzione è:

- mesocurtica (curtosi = 0), quando ha forma uguale alla distribuzione normale;
- leptocurtica (curtosi > 0; figura 3.5a), quando ha un eccesso di frequenza delle classi centrali, una frequenza minore delle classi intermedie ed una presenza

maggiore delle classi estreme; è quindi una distribuzione più alta al centro e agli estremi e più bassa ai fianchi;

- platicurtica (curtosi  $< 0$ ; figura 3.5b), quando rispetto alla normale presenta una frequenza minore delle classi centrali e di quelle estreme, con una frequenza maggiore di quelle intermedie; è quindi una distribuzione più bassa al centro e agli estremi mentre è più alta ai fianchi; la caratteristica più evidente è il numero più ridotto di valori centrali.



**Figura 3.5** – Esempi di distribuzione leptocurtica (a) e platicurtica (b) rispetto a una distribuzione normale.

Misure di tendenza centrale, di dispersione e di forma rappresentano metriche descrittive delle proprietà delle distribuzioni in classi di taglia e possono, pertanto essere utilizzate come descrittori sintetici della struttura in taglia degli elementi biologici di qualità. In questa ricerca come misura di tendenza centrale è stata utilizzata la mediana, come misura di dispersione sono state utilizzati il range di quartile e i percentili e come misure di forma sono stati utilizzati skewness e curtosi.

**BIBLIOGRAFIA**

- Baldauf S. L. (2003) The Deep Roots of Eukaryotes. *Science* 300: 1703-1706
- Barlocher F. (1991) Fungal colonization of fresh and dried leaves in the River Teign (Devon, England). *Nova Hedwigia* 52: 349-357.
- Barnes R. D. (1980) *Invertebrate Zoology*. Saunders College/Holt, Rinehart and Winston, Philadelphia, 1237 pp.
- Basset A., Sangiorgio F., Pinna M. (2004). Monitoring with benthic macroinvertebrates: advantages and disadvantages of body size related descriptors. *Aquatic Conservation, Marine and Freshwater Ecosystems* 14: 43-58.
- Benke A. C., Huryn A. D. Smock L. A., Wallace B. (1999) Length-mass relationships for freshwater macroinvertebrates in North America with particular reference to the South Eastern United States. *Journal of North American Benthological Society* 18(3): 308-343.
- Bocock K. L., Gilbert O. L. (1957) The disappearance of leaf litter under different woodland conditions. *Plant Soil* 9: 179-185.
- Borja A, J. Franco, Pérez V. (2000) A marine biotic index to establish the ecological quality of soft-bottom benthos within European estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin* 40(12): 1100-1114.
- Brown J. H., West G. B. (2000) *Scaling in Biology*. Oxford University Press, 352 pp.
- Caroppo C. (2000) The contribution of picophytoplankton to community structure in a Mediterranean brackish environment. *Journal of Plankton Research* 22: 381-397.
- Caroppo C., Cardellicchio N. (1995) Preliminary studies on phytoplankton communities of Mar Piccolo in Taranto (Ionian Sea). *Oebalia* 21(2): 61-76.
- Carstensen J. D., Henriksen P., Heiskanen A. S. (2007) Summer algal blooms in shallow estuaries: definition, mechanisms, and link to eutrophication. *Limnology and Oceanography* 52(1): 370-384.
- Castelli A., Lardicci C., Tagliapietra D. (2003) Il macrobenthos di fondo molle. In: Gambi M. C., Dappiano M. (Eds) *Manuale di metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo*. SIBM, Genova, pp.109-144.
- Cermeño P., Marañón E., Harbour D., Harris R. P. (2006) Invariant scaling of phytoplankton abundance and cell size in contrasting marine environments. *Ecology Letters* 9: 1210-1215.
- Coombs J., Greenwood A. D. (1976) Compartmentation of the photosynthetic apparatus. In: J. Barber (Ed) *The Intact Chloroplast*. Elsevier-North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp.1-51.
- Delwiche C. F. (1999) Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *American Naturalist* 154 (suppl.): S164-S177.

- Edler L. (1979) Recommendation on method for marine Biological Studies in the Baltic Sea. Phytoplankton and Chlorophyll. *Baltic Marine Biologist Publication* (5): 1-38
- Eleftheriou A., Holme N. A. (1984) Macrofauna techniques. In: Holme N. A., McIntyre A. D. (Eds) *Methods for the Study of Marine Benthos*. Blackwell Scientific Publications, London, pp.140-216.
- Facca C., Sfriso A., Socal G. (2002) Temporal and spatial distribution of Diatoms in the surface sediments of the Venice Lagoon. *Botanica Marina* 45: 170-183.
- Ferreira J. G., Vale C., Soares C. V., Salas F., Stacey P. E., Bricker S. B., Silva M. C., Marques J. C. (2007) Monitoring of coastal and transitional waters under the E.U. Water Framework Directive. *Environmental Monitoring Assessment*, 135: 195-216.
- Gambi M. C., Giangrande A., Scardi M. (1987) Confronto tra metodiche nel campionamento dei policheti di fondo mobile. In: Bregant D., Fonda Umani S. (Eds) *Atti VII Congresso Associazione Italiana Oceanologia e Limnologia*, Trieste, pp. 325-332.
- Gessner M. O. (1991) Differences in processing dynamics of fresh and dried leaf litter in a stream ecosystem. *Freshwater Biology* 26: 387-398.
- Gilbert J. (2001) Seasonal plankton dynamics in a Mediterranean hypersaline coastal lagoon: the Mar Menor. *Journal of Plankton Research* 23(2): 207-217.
- Griffiths R. W. (1991) Environmental quality assessments of the St Clair River as reflected by the distribution of benthic macroinvertebrates in 1985. *Hydrobiologia* 219: 143-164.
- Hallfors G., Melvasalo T., Viljama H. (1979) Effects of different fixatives and preservation on phytoplankton counts. *Publication of the Water Research Institute*, National Board of the Waters, Finland, 34: 25-34.
- Hawkes H. A. (1979) Invertebrates as indicator of river water quality. In: James A., Evison L. (Eds) *Biological Indicators of Water Quality*. John Wiley, Chichester, pp. 17-61.
- Hillebrand H. C. D., Durselen D., Kirschtel U., Pollinger T., Zohary T. (1999) Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology* 35: 403-424.
- Holling C. S. (1959) Some characteristics of simple types of predation and parasitism. *Canadian Entomologist* 91: 385-398.
- Hulbert S. H. (1971) The non-concept of species-diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* 52: 577-586.
- Hutchinson G. E. (1967) *A treatise on limnology: introduction to Lake Biology and the Limnoplankton*. Wiley Interscience, New York press.
- Istituto Centrale per la Ricerca Scientifica e Tecnologica Applicata al Mare (ICRAM) (2008) *Protocolli per il campionamento e la determinazione degli*

*elementi di qualità biologica e fisico-chimica nell'ambito dei programmi di monitoraggio ex 2000/60/CE delle acque di transizione*, 33 pp.

Kaushik N. K., Hynes H. B. N. (1971) The fate of the dead leaves that fall into streams. *Archiv fur Hydrobiologie* 68: 465-515.

Kirk J. T. O. (1975a) A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. I. General treatment of suspensions of pigmented cells. *New Phytologist* 75: 11-20.

Kirk J. T. O. (1975b) A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. II.. Spherical cells. *New Phytologist* 75: 21-36.

Kirk J. T. O. (1976) A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. III. Cylindrical and spheroid cells. *New Phytologist* 77: 341-358

Kovala P. E., Larrance J. P. (1966) *Computation of phytoplankton cell number, cell volume, cell surface area and plasma volume per litre, from microscopical counts*. University of Washington. Special report vol. 38: 1-91.

Kramer K. J. M., Brockmann U. H., Warwick R. M. (1994) *Tidal estuaries: manual of sampling and analytical procedures*. Commission of the European Communities (Eds), Taylor & Francis, 304 pp.

Leuven R. S. E. W., Brock T. C. M., van Druten H. A. M. (1985) Effects of preservation on dry- and ash-free dry weight biomass of some common aquatic macro-invertebrates. *Hydrobiologia* 127: 151-159.

Litchman E., Klausmeier C. A., Schofield O. M., Falkowski P. G. (2007) The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecology Letters* 10: 1170-1181.

Magaletti E., Ghetti A., Cabrini M., Pompei M. (2001) Fitoplancton. In: Cicero A. M., Di Girolamo I. (Eds) *Metodologie analitiche di riferimento*. ICRAM, Roma.

McGill B.J., Enquist B. J., Weiher E., Westoby M. (2006) Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends in Ecology and Evolution* 21(4): 178-185.

Menden-Deur S., Lessard E. J. (2000) Carbon to Volume relationship for dinoflagellates, diatoms and other plankton. *Limnology and Oceanography* 45: 569-579.

Morabito G., Oggioni A., Caravati E., Panzani P. (2007) Seasonal morphological plasticità of phytoplankton in Lago Maggiore (N. Italy). *Hydrobiologia* 578: 47-57.

Morris I. (1980) Studies in ecology volume 7. In: Morris (Ed) The physiological ecology of phytoplankton. University of California Press, pp.1-625.

Mouillot D. Spathris S., Reizopoulou S., Laugier T., Sabetta L., Basset A., Do Chi T. (2006) Alternatives to taxonomic-based approaches to assess changes in transitional water communities. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 16: 469-482.

- Mullin M. M., Sloan P. R., Eppley R. W. (1966) Relationship between carbon content, cell volume, and area in phytoplankton. *Limnology and Oceanography* 11: 307-311.
- Nuccio C., Melillo C., Massi L., Innamorati M. (2003) Phytoplankton abundance, community structure and diversity in the eutrophicated Orbetello lagoon (Tuscany) from 1995 to 2001. *Oceanologica Acta* 26: 15-25.
- Paine R. T. (1966) Endothermy in bomb calorimetry. *Limnology and Oceanography* 11: 126-129.
- Paine R. T. (1971) The measurement and application of the calorie to ecological problems. *Ecological Calorimetry* 42: 145-164.
- Perez M. C., Comas A., del Rio J. G., Sierra J. P. (2002) Planktonic Chlorophyceae from the lower Ebro River (Spain). *Acta Botanica Croatica Cr.* 61(2): 99-124.
- Peters R. H. (1983) *The ecological implication of body size*. E. Beck, H. J. B. Birks and E. F. Connor (Eds). Cambridge University Press, Cambridge.
- Petersen R. C., Cummins K. W. (1974) Leaf processing in a woodland stream. *Freshwater Biology* 4: 343-368.
- Pinna M., Gravili L., Basset A. (2007) Response of benthic macroinvertebrate community descriptors to chemical pollution in the aquatic ecosystems of Fiume Grande and Punta della Contessa salt pans (Brindisi, Italy). In: Pinna M., Uricchio V. F., Aresta M. and Basset A. (Eds). *Rivers and citizens, cross-border experiences in environmental protection and sustainable development*, Coordinamento SIBA, Università del Salento, ISBN 978-88-8305-049-7, pp. 107-117.
- Platt T., Filion C. (1973) Spatial variability of the productivity: biomass ratio for phytoplankton in a small marine basin. *Limnology and Oceanography* 18: 743-749.
- Reynolds C. (1997) Vegetation processes in the pelagic: a model for ecosystem theory. *Oldendorf ECI*.
- Richardson K., Beardall J., Raven J. A. (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytologist* 93: 157-91.
- Roddle M. J. (1989) Precision of the mean and the design of benthos sampling programmes: caution advised. *Marine Biology* 103: 225-230.
- Root R. B. (1967) The niche exploitation pattern of the Blue-Grey Gnatcatcher. *Ecological Monograph* 37: 317-350.
- Rott E. (1981) Some results from phytoplankton counting intercalibration. *Schweiz. Z. Hydrobiologie* 43: 34-62.
- Salas F., Neto J. M., Borja A., Marques J. C. (2004). Evaluation of the applicability of a marine biotic index to characterize the status of estuarine ecosystems: The case of Mondego estuary (Portugal). *Ecological Indicators* 4: 215-225.

- Salmaso N., Padisak J. (2007) Morpho-functional groups and phytoplankton development in two deep lakes (Lake Garda, Italy and Lake Stechlin, Germany). *Hydrobiologia* 578: 97-112.
- Sanders H. L. (1968) Marine benthic diversity: a comparative study. *American Naturalist* 102: 243-282
- Shanks R. E, Olson J. S. (1961) First year breakdown of leaf litter in Southern Appalachian forest. *Ecology*: 134:194-195.
- Sheldon P. W., A. Prakash, W. H., Jr. Sutcliffe (1972). The size distribution of particles in the ocean. *Limnology and Oceanography*. 17: 327-340.
- Sieburth J. (1979) *Sea microbes*. Oxford University Press. New York.
- Smayda T. J. (1965) A quantitative analysis of the phytoplankton of the Gulf of Panama. II. On the relationship between C14 assimilation and the standing crop. *Inter-American Tropical Tuna Commission Bulletin* 9: 467-531.
- Smayda T. J. (1978) From phytoplankton to biomass. *UNESCO Phytoplankton Manual*, pp. 273-279.
- Soliani L. (1990) *Statistica applicata alla ricerca e alle professioni scientifiche*. Libri Scientifici. Com. Gruppo PEGASO.
- Sournia A. (Ed.) (1978) Phytoplankton manual. *UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology*, 337 pp.
- Strathmann R. R. (1967) Estimating the organic content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnology and Oceanography* 12: 411- 418.
- Sun J., Liu D. (2003) Geometric model for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 25(11):1331-1346.
- Tranter D. J., Smith P. E. (1968) Filtration performance. In Tranter D. J., Fraser J. H. (Eds) *Zooplankton Sampling*. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology, pp. 27-56.
- Vadrucci M. R., Cabrini M., Basset A. (2007) A biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion. *Transitional Water Bulletin* Vol 1(2): 83-102.
- Verity P. G., Robertson C. Y., Tronzo C.R., Andrews M. G., Nelson J. R., Sieracki M. E. (1992) Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnology and Oceanography* 37: 1434-1446.
- Venrick E. L. (1971) The statistics of subsampling. *Limnology and Oceanography* 16 (5): 811-818.
- Virno Lamberti C., Pellegrini D., Pulcini M., Valentini (2001) Analisi delle comunità bentoniche di fondi mobili in ambiente marino. In: A. Cicero A. M., Di Girolamo I. (Eds) *Metodologie analitiche di riferimento*. ICRAM, Roma.

Bibliografia

---

Weithoff G. (2003). The concepts of “Plant Functional Types” and “Functional Diversity” in lake phytoplankton – a new understanding of phytoplankton ecology. *Freshwater Biology* 48: 1669-1675.

Zingone A., Honsell G., Marino D., Montresor M., Socal G. (1990) Fitoplancton In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera D’Alcalà M. (Eds) *Metodi nell’ecologia del plancton marino. Nova Thalassia*, LINT Trieste 11: 183-198.

Zobel M. (1997) The relative role of species pools in determining plant species richness: an alternative explanation of species coexistence? *Trends in Ecology and Evolution* 12:266-269.







**Allegato 2.2**

<b>Sito di studio:</b>				
<b>Data:</b>				
<b>Nome operatore:</b>				
Cella	Stazione n°	Taxon	Lunghezza (mm)	Peso secco (mg)
A1				
A2				
A3				
A4				
A5				
A6				
A7				
A8				
A9				
A10				
A11				
A12				
B1				
B2				
B3				
B4				
B5				
B6				
B7				
B8				
B9				
B10				
B11				
B12				
C1				
C2				
C3				
C4				
C5				
C6				
C7				
C8				
C9				
C10				
C11				
C12				

