



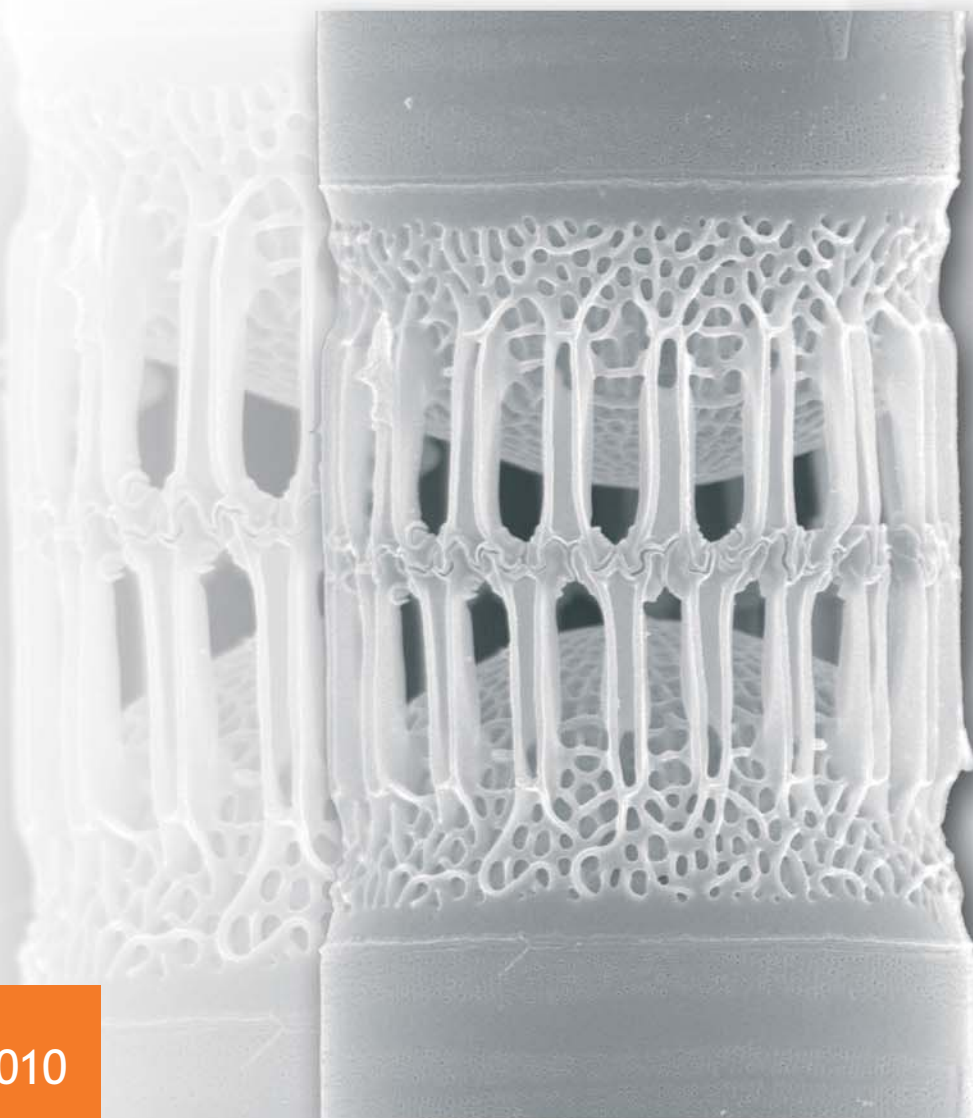
ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale



Società Italiana
di Biologia Marina

Metodologie di studio del Plancton marino



MANUALI E LINEE GUIDA



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

Metodologie di studio del plancton marino

edito da

Giorgio Socal¹, Isabella Buttino², Marina Cabrini³, Olga Mangoni⁴,
Antonella Penna⁵, Cecilia Totti⁶

1 Istituto di Scienze Marine CNR, Venezia

2 Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli - indirizzo corrente: ISPRA, Livorno

3 Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, Trieste

4 Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione di Zoologia, Università degli Studi Federico II, Napoli

5 Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sezione Biologia Ambientale, Università di Urbino

6 Dipartimento di Scienze del Mare. Università Politecnica delle Marche, Ancona

Gli editori e gli autori tutti dedicano questo volume alla memoria dei compianti
Elvezio Ghirardelli e Donato Marino

Manuali e Linee Guida 56/2010

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 manuale.

ISPRA – Istituto Superiore per la protezione e la ricerca ambientale
Via Vitaliano Brancati, 48 – 00144 Roma
www.isprambiente.it

ISPRA, Manuali e Linee Guida 56/2010

ISBN 978-88-448-0427-5

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica

ISPRA

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto di copertina: Foto al Microscopio elettronico a scansione della diatomea *Skeletonema japonicum* di Maria Saggiomo, eseguita presso la Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli

Coordinamento tipografico:

Daria Mazzella

ISPRA - Settore Editoria

Amministrazione:

Olimpia Girolamo

ISPRA - Settore Editoria

Distribuzione:

Michelina Porcarelli

ISPRA - Settore Editoria

Impaginazione e Stampa

Tipolitografia CSR - Via di Pietralata, 157 - 00158 Roma

Tel. 064182113 (r.a.) - Fax 064506671

Finito di stampare giugno 2010

ELENCO DEGLI AUTORI ED AFFILIAZIONI

Maria Luisa Abelmoschi	Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Genova, via Dodecaneso 21, 16146 Genova
Filippo Azzaro	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Maurizio Azzaro	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Mauro Bastianini	Istituto di Scienze Marine CNR, Castello 1364/a, 30122 Venezia
Genuario Belmonte	Laboratorio di Zoogeografia e Faunistica, Stazione di Biologia Marina Di.S.Te.B.A. Università del Salento, Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce
Alfred Beran	Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, via A. Piccard 54, 34151 Trieste
Fabrizio Bernardi Aubry	Istituto di Scienze Marine CNR, Castello 1364/a, 30122 Venezia
Daniela Berto	Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, località Bron-dolo Chioggia
Franco Bianchi	Istituto di Scienze Marine CNR, Castello 1364/a, 30122 Venezia
Ferdinando Boero	Laboratorio di Zoologia e Biologia marina, Stazione di Biologia Marina Di.S.Te.B.A. Università del Salento, Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce
Alfredo Boldrin	Istituto di Scienze Marine CNR, Castello 1364/a, 30122 Venezia
Christophe Brunet	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Isabella Buttino	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli indirizzo corrente ISPRA - Viale Nazario Sauro, 4 57128 Livorno
Marina Cabrini	Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, via A. Piccard 54, 34151 Trieste
Elisa Camatti	Istituto di Scienze Marine CNR, Castello 1364/a, 30122 Venezia
Carolina Cantoni	Istituto di Scienze Marine CNR, viale Romolo Gessi 2, 34123 Trieste
Samuela Capellacci	Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sez. di Biologia Ambientale, Università degli Studi di Urbino, viale Trieste, 296, 61100 Pesaro
Simone Cappello	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Carmela Caroppo	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, via Roma, 3, 74100 Taranto
Gabriella Caruso	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Raffaella Casotti	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Giulio Catalano	Istituto di Scienze Marine CNR, viale Romolo Gessi 2, 34123 Trieste

Federica Cerino	Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, via A. Piccard 54, 34151 Trieste
Patrizia Ciminiello	Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Università degli Studi di Napoli "Federico II", via Montesano 49, 80131 Napoli
Paola Cirino	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Federico Corato	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Cinzia Corinaldesi	Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, via Brezze Bianche, 60131 Ancona
Stefano Cozzi	Istituto di Scienze Marine CNR, viale Romolo Gessi 2, 34123 Trieste
Erica Crevatin	Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, via A. Piccard 54, 34151 Trieste
Emellina Cucchiari	Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, via Brezze Bianche, 60131 Ancona
Phil Culverhouse	School of Computing, Communication & Electronics University of Plymouth, Drake Circus, Plymouth Devon PL4 8AA, UK
Roberto Danovaro	Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, via Brezze Bianche, 60131 Ancona
Cinzia De Vittor	Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, via A. Piccard 54, 34151 Trieste
Paola Del Negro	Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, via A. Piccard 54, 34151 Trieste
Antonio Dell'Anno	Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, via Brezze Bianche, 60131 Ancona
Renata Denaro	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Mauro Fabiano	Dipartimento per lo Studio del Territorio e le sue Risorse, Università degli Studi di Genova, corso Europa 26, 16132 Genova
Marco Faimali	Istituto di Scienze Marine CNR, via De Marini 6, 16149 Genova
Claus Falconi	Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, via A. Piccard 54, 34151 Trieste
Fabiola Fani	Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università degli Studi di Firenze, via Romano 17, 50125 Firenze
Ernesto Fattorusso	Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali, Università degli Studi di Napoli "Federico II", via Montesano 49, 80131 Napoli
Ireneo Ferrari	Dipartimento di Scienze Ambientali, Università degli Studi di Parma, viale G.P. Uberti 337, 43100 Parma
Serena Fonda Umani	Dipartimento di Scienze della vita, Università degli Studi di Trieste, via Valerio 28/1, 34127 Trieste
Roberto Frache	Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Genova, via Dodecaneso 21, 16146 Genova

Gayantonia Franzè	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Francesca Garaventa	Istituto di Scienze Marine CNR, via De Marini 6, 16149 Genova
Mariella Genovese	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Maria Grazia Giacobbe	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Michele Giani	Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, via A. Piccard 54, 34151 Trieste
Laura Giuliano	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Franca Guerrini	Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali, Università di Bologna, Via Sant'Alberto 163, 48123 Ravenna
Giorgio Honsell	Dipartimento di Biologia e di Protezione delle Piante, Università degli Studi di Udine, via delle Scienze 91-93, 33100 Udine
Adrianna Ianora	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Valeria Ibello	Dipartimento di Oceanografia, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, Borgo Grotta Gigante 42/c, 340100 Sgonico (TS)
Mario Innamorati	Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università degli Studi di Firenze, via P.A. Micheli 1, 50121 Firenze
Wiebe Kooistra	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Rosabrina La Ferla	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Leonardo Langone	Istituto di Scienze Marine CNR, via Gobetti 101, 40129 Bologna
Luigi Lazzara	Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università degli Studi di Firenze, via Romana 17, 50125 Firenze
Priscilla Licandro	Sir Alister Foundation for Ocean Science (SAHFOS), The laboratory, Citadel Hill, The Hoe, Plymouth PL1 2PB, UK
Marina Lipizer	Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, via A. Piccard 54, 34151 Trieste
Anna Luchetta	Istituto di Scienze Marine CNR, viale Romolo Gessi 2, 34123 Trieste
Antonella Lugliè	Dipartimento di Botanica ed Ecologia vegetale, Università degli Studi di Sassari, via Muroni 25, 07100 Sassari
Daniela Lumare	Unità di Ricerca di Gambericoltura, Università del Salento, Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce
Febo Lumare	Unità di Ricerca di Gambericoltura, Università del Salento, Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce
Luca Lumare	Unità di Ricerca di Gambericoltura, Università del Salento, Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce
Gian Marco Luna	Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, via Brece Bianche, 60131 Ancona

Mirko Magagnini	Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, via Breccie Bianche, 60131 Ancona
Giovanna Maimone	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Olga Mangoni	Dipartimento delle Scienze Biologiche, Sezione Zoologia, Università degli Studi di Napoli "Federico II", via Mezzocannone 8, 80134 Napoli
Elena Manini	Istituto di Scienze Marine CNR, Largo Fiera della Pesca, 60125 Ancona
Francesca Margiotta	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Luca Massi	Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università degli Studi di Firenze, via P.A. Micheli 1, 50121 Firenze
Teresa Maugeri	Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina, Università di Messina, Salita Sperone 31 98166 Sant'Agata (ME)
Mauro Mecozzi	Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, via di Casalotti 300, 00166 Roma
Roberta Messa	Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Genova, via Dodecaneso 21, 16146 Genova
Monica Modigh	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Marina Monti	Dipartimento di Oceanografia Biologica, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, via A. Piccard 54, 34151 Trieste
Luis Monticelli	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Marina Montesor	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Salvatore Moscatello	Laboratorio di Zoogeografia e Faunistica, Stazione di Biologia Marina Di.S.Te.B.A. Università del Salento, Prov.le Lecce-Monteroni, 73100 Lecce
Rajesh Nair	Dipartimento di Oceanografia, Istituto Nazionale di Oceanografia e Geofisica Sperimentale, Borgo Grotta Gigante 42/C, 34010 Sgonico (TS)
Caterina Nuccio	Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università degli Studi di Firenze, via P.A. Micheli 1, 50121 Firenze
Antonella Penna	Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sez. di Biologia Ambientale, Università degli Studi di Urbino, viale Trieste, 296, 61100 Pesaro
Nunzio Penna	Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sez. di Biologia Ambientale, Università degli Studi di Urbino, viale Trieste, 296, 61100 Pesaro
Isabella Percopo	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Daniela Pessani	Dipartimento di Biologia animale e dell'Uomo, Università degli Studi di Torino, via Accademia Alberini 13, 10123 Torino
Rossella Pistocchi	Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali, Università di Bologna, Via Sant'Alberto 163, 48123 Ravenna
Roberto Poletti	Centro Ricerche Marine Cesenatico, viale Vespucci 2, 47042 Cesenatico (FC)

Marinella Pompei	Centro Ricerche Marine Cesenatico, viale Vespucci 2, 47042 Cesenatico (FC)
Paolo Povero	Dipartimento per lo Studio del Territorio e le sue Risorse, Università degli Studi di Genova, corso Europa 26, 16132 Genova
Ermelinda Prato	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, via Roma, 3, 74100 Taranto
Gabriele Procaccini	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Alberto Puddu	Istituto di Ricerca Sulle Acque CNR, Area della Ricerca RM1, via Salaria km 29,300, 00015 Monterotondo (Roma)
Alessandra Pugnetti	Istituto di Scienze Marine CNR, Castello 1364/a, 30122 Venezia
Antonio Pusceddu	Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, via Brecce Bianche, 60131 Ancona
Maurizio Ribera d'Alcalá	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Fabio Ricci	Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Sez. di Biologia Ambientale, Università degli Studi di Urbino, viale Trieste, 296, 61100 Pesaro
Paola Rivaro	Dipartimento di Chimica e Chimica Industriale, Università di Genova, via Dodecaneso 21, 16146 Genova
Tiziana Romagnoli	Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, via Brecce Bianche, 60131 Ancona
Fernando Rubino	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, via Roma, 3, 74100 Taranto
Aniello Russo	Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, via Brecce Bianche, 60131 Ancona
Vincenzo Saggiomo	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Maria Saggiomo	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Giovanni Sansone	Dipartimento di Fisiologia Generale ed Ambientale, Università degli Studi di Napoli "Federico II", via Mezzocannone 8, 80134 Napoli
Immacolata Santarpia	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Chiara Santinelli	Istituto di Biofisica CNR, via G. Moruzzi 1, 56124 Pisa
Diana Sarno	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Cecilia Satta	Dipartimento di Botanica ed Ecologia vegetale, Università degli Studi di Sassari, via Muroni 25, 07100 Sassari
Fabio Savelli	Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, località Bron-dolo Chioggia
Raffaella Siano	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Giorgio Socal	Istituto di Scienze Marine CNR, Castello 1364/a, 30122 Venezia
Stefania Sparnocchia	Istituto di Scienze Marine CNR, viale Romolo Gessi 2, 34123 Trieste
Mario Sprovieri	Istituto per l'ambiente Marino Costiero CNR, Calata Porta di Massa, Napoli
Alfonso Toscano	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli

Cecilia Totti	Dipartimento di Scienze del Mare, Università Politecnica delle Marche, via Brezze Bianche, 60131 Ancona
Ranieri Urbani	Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, via L. Giorgieri 1, 34127 Trieste
Silvana Vanucci	Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina, Università di Messina, Salita Sperone 31 98166 Sant'Agata (ME)
Michail Yakimov	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Renata Zaccone	Istituto per l'Ambiente Marino Costiero CNR, Spianata S. Raineri 86, 98122, Messina
Adriana Zingone	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale, 80121 Napoli
Annamaria Zoppini	Istituto di Ricerca Sulle Acque CNR, Area della Ricerca RM1, via Salaria km 29,300, 00015 Monterotondo (Roma)
Valerio Zupo	Stazione Zoologica Anton Dohrn, Punta San Pietro, 80077 Ischia Napoli

COMITATO DI LETTURA

I seguenti colleghi, nell'ambito delle proprie competenze hanno effettuato la lettura critica dei diversi Capitoli di questo manuale. A tutti il ringraziamento più sentito della SIBM, di ISPRA e degli editori per aver contribuito con il loro attento e qualificato lavoro al miglioramento della qualità, scientifica e chiarezza dei testi

Fabrizio Bernardi Aubry	ISMAR CNR Venezia
Alfredo Boldrin	ISMAR CNR Venezia
Giancarlo Campesan	ISMAR CNR Venezia
Raffaella Casotti	SZN Napoli
Federica Cerino	INOGS Trieste
Roberto Danovaro	Università Politecnica delle Marche Ancona
Paola Del Negro	INOGS Trieste
Serena Fonda Umani	Università degli Studi di Trieste
Rosabrina La Ferla	IAMC CNR Messina
Luigi Lazzara	Università degli Studi di Firenze
Priscilla Licandro	SAHFOS Plymouth UK
Antonella Lugliè	Università degli Studi di Sassari
Elena Manini	ISMAR CNR Ancona
Rossella Pistocchi	Università di Bologna
Ermelinda Prato	IAMC CNR Taranto
Alessandra Pugnetti	ISMAR CNR Venezia
Maurizio Ribera d'Alcalà	SZN Napoli
Chiara Santinelli	IBF CNR Pisa
Diana Sarno	SZN Napoli
Alfonso Toscano	SZN Napoli
Annamaria Zoppini	IRSA CNR Roma

Gli editori ringraziano la dr. Emanuela Spada di ISPRA per l'assistenza fornita durante la preparazione del manuale

Premessa

È con vivo piacere che, al termine del mio mandato da Presidente della Società Italiana di Biologia Marina, vedo realizzata la pubblicazione di un volume tanto atteso dalla comunità scientifica italiana. Il vecchio Manuale del Plancton, dovuto all'impegno del caro socio Mario Innamorati, era stato superato non già nell'impostazione metodologica quanto piuttosto nei contenuti tecnici dovuti all'avanzamento delle conoscenze. Era quindi ora che venisse pubblicato un nuovo volume contenente tutto quanto occorre conoscere per poter effettuare ricerche di eccellenze sul plancton. E questa richiesta avanzata non soltanto da me in qualità di Presidente ma da tutto il Consiglio Direttivo della SIBM, ha trovato nell'amico e collega Giorgio Socal la persona adatta, capace di catalizzare le migliori competenze scientifiche nazionali nel comporre un'opera così maestosa ed indispensabile come questa. Il percorso della Società Italiana di Biologia Marina si corona pertanto di un nuovo traguardo raggiunto: dopo il prestigioso volume del Manuale del Benthos, di cui è stata redatta e pubblicata anche l'edizione in inglese, ora con questo volume sul plancton si può dire che la SIBM sia in grado di svolgere un ruolo non facilmente sostituibile a livello nazionale nel campo della Biologia Marina. Il testo appena prodotto sul Plancton rappresenta infatti il punto di riferimento per qualsiasi attività, dal monitoraggio alla ricerca, che vede coinvolta la comunità planctonica. Un grazie sentito va all'APAT, oggi ISPRA, che nelle persone del dott. G. Boeri e dell'Ing. S. Corsini *in primis*, hanno compreso l'importanza fondamentale di questa opera ed hanno pertanto deciso di contribuire in maniera sostanziale alla pubblicazione del volume che esce infatti a due nomi (ISPRA e SIBM).

Nell'augurarmi che ci possa essere a breve l'edizione inglese del presente volume, in grado di dare visibilità internazionale ai due Enti sopra citati che l'hanno prodotto, come Presidente SIBM termino ringraziando tutti gli Autori dei testi che hanno messo a disposizione dell'intera comunità scientifica nazionale le loro indiscusse competenze.

ANGELO TURSI
PRESIDENTE SIBM

Mi è particolarmente gradita l'occasione di presentare questa pubblicazione sulle **“Metodologie di studio del plancton marino”** a cura della SIBM che segue la prima pubblicazione a cui ISPRA ha partecipato: “Manuale sulle metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo”.

Il presente manuale rappresenta un aggiornamento delle metodologie di monitoraggio attraverso nuove tecnologie applicate nella moderna oceanografia biologica, rivolta all'ambiente di mare aperto ed a quello costiero e di transizione e proposte a livello internazionale e offre un valido contributo allo studio del plancton marino.

Uno dei pregi di tale volume è quello di utilizzare testi facilmente interpretabili che favoriscono la riproducibilità delle metodologie di analisi, oltre a rappresentare un utile strumento sia per le istituzioni italiane di ricerca che studiano le problematiche legate all'ecologia del plancton marino, sia per gli enti locali quali regioni, ARPA, province e comuni, che svolgono attività di monitoraggio ad ampia scala spazio-temporale.

ING. EMILIO SANTORI
SUBCOMMISSARIO ISPRA

INDICE

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE	2
CAPITOLO 2. TEMPERATURA, SALINITÀ E DENSITÀ	
2.1 INTRODUZIONE	4
2.2 TEMPERATURA	4
2.2.1 Principio del metodo	4
2.2.1.1 <i>Termometri a rovesciamento a mercurio</i>	5
2.2.1.2 <i>Termometri a rovesciamento elettronici digitali</i>	5
2.2.2 Operazioni in mare.....	5
2.2.2.1 <i>Attrezzatura</i>	5
2.2.2.2 <i>Procedura per i termometri a rovesciamento a mercurio</i>	5
2.2.2.3 <i>Procedura per i termometri a rovesciamento elettronici digitali</i>	6
2.2.2.4 <i>Raccomandazioni</i>	6
2.2.3 Operazioni in laboratorio.....	7
2.2.3.1 <i>Calcoli per i termometri a mercurio protetti</i>	7
2.2.3.2 <i>Calcoli per i termometri a mercurio non protetti</i>	7
2.3 SALINITÀ	8
2.3.1 Principio del metodo	9
2.3.2 Operazioni in mare.....	9
2.3.2.1 <i>Attrezzatura</i>	9
2.3.2.2 <i>Procedura di campionamento</i>	9
2.3.2.3 <i>Conservazione dei campioni</i>	10
2.3.2.4 <i>Raccomandazioni</i>	10
2.3.3 Operazioni in laboratorio.....	10
2.3.3.1 <i>Attrezzatura</i>	10
2.3.3.2 <i>Procedura analitica generale</i>	10
2.3.3.3 <i>Calcoli</i>	11
2.3.3.4 <i>Raccomandazioni</i>	11
2.3.4 Altri metodi	12
2.4 PRESSIONE, TEMPERATURA E SALINITÀ (SONDE CTD).....	13
2.4.1 Principio del metodo	13
2.4.2 Operazioni in mare.....	13
2.4.2.1 <i>Attrezzatura</i>	13
2.4.2.2 <i>Procedura di misura</i>	13
2.4.3 Operazioni in laboratorio.....	14
2.4.3.1 <i>Controllo di qualità dei sensori</i>	14
2.4.3.2 <i>Trattamento dei dati</i>	15
2.4.4 Taratura dei sensori.....	15
2.5 DENSITÀ.....	16
2.5.1 Calcoli	17
2.5.1.1 <i>Raccomandazioni</i>	19
2.6 CENNO SUGLI SVILUPPI RECENTI NEL CALCOLO DELLA SALINITÀ ASSOLUTA E DELLE FUNZIONI TERMODINAMICHE	19
2.7 LISTA DEGLI ACRONIMI.....	19
2.8 BIBLIOGRAFIA.....	20
CAPITOLO 3. OSSIGENO DISCIOLTO	
3.1 INTRODUZIONE	22
3.2 PRINCIPIO DEL METODO	22

3.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE	24
3.3.1 Attrezzatura	24
3.3.2 Prodotti chimici	24
3.3.3 Preparazione dei reagenti	24
3.3.4 Procedura di campionamento	25
3.3.5 Prelievo per la determinazione del bianco dei reagenti	25
3.3.6 Conservazione dei campioni	25
3.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO	26
3.4.1 Attrezzatura	26
3.4.2 Prodotti chimici	26
3.4.3 Preparazione dei reagenti	26
3.5 PROCEDURA ANALITICA	27
3.5.1 Preparazione delle soluzioni standard	27
3.5.2 Analisi dei campioni	27
3.5.2.1 Dissoluzione del precipitato	27
3.5.2.2 Titolazione	27
3.5.3 Calcoli	28
3.5.3.1 Standardizzazione del tiosolfato (Ctio)	28
3.5.3.2 Determinazione del bianco dei reagenti	28
3.5.3.3 Calcolo della concentrazione micro-molare (μM o $\mu\text{mol l}^{-1}$) dell'ossigeno disciolto	28
3.5.3.4 Ossigeno disciolto espresso come percentuale del valore di saturazione	29
3.5.3.5 Raccomandazioni	30
3.5.3.6 Problemi possibili	30
3.6 ALTRI METODI	31
3.7 BIBLIOGRAFIA	31

CAPITOLO 4. IL PH DELL'ACQUA DI MARE

4.1 INTRODUZIONE	34
4.2 SCALE DI pH	35
4.3 DETERMINAZIONE DEL pH DELL'ACQUA DI MARE MEDIANTE METODO POTENZIOMETRICO	36
4.3.1 Principio del metodo	36
4.3.2 Schema delle operazioni in mare	37
4.3.2.1 Attrezzatura	37
4.3.2.2 Procedura di campionamento	37
4.3.2.3 Conservazione dei campioni	38
4.3.3 Schema delle operazioni in laboratorio	38
4.3.3.1 Attrezzatura	38
4.3.3.2 Prodotti chimici	38
4.3.3.3 Reagenti	38
4.3.3.4 Preparazione dei reagenti	39
4.3.3.5 Procedura analitica	39
4.3.3.6 Precisione e accuratezza del metodo	40
4.4 DETERMINAZIONE DEL pH DELL'ACQUA DI MARE MEDIANTE METODO SPETTROFOTOMETRICO	40
4.4.1 Principio del metodo	40
4.4.2 Schema delle operazioni in mare	41
4.4.2.1 Attrezzatura	41
4.4.2.2 Procedura di campionamento	41
4.4.2.3 Conservazione dei campioni	41
4.4.3 Schema delle operazioni in laboratorio	41
4.4.3.1 Attrezzatura	41
4.4.3.2 Reagenti	42
4.4.3.3 Preparazione dei reagenti	42
4.4.4 Calcoli ed espressione del risultato	42
4.4.4.1 Correzione delle misure di assorbanza	42

4.4.4.2 Calcolo del pH dell'acqua + indicatore.....	43
4.4.4.3 Correzione del pH dovuta all'aggiunta dell'indicatore	43
4.4.5 Precisione ed accuratezza del metodo	44
4.5 BIBLIOGRAFIA.....	44

CAPITOLO 5. ALCALINITÀ TOTALE E CARBONIO INORGANICO TOTALE

5.1 INTRODUZIONE	45
5.2 METODO INDIRETTO.....	46
5.3 PRINCIPIO DEL METODO	47
5.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE	48
5.4.1 Attrezzatura	48
5.4.2 Procedura di campionamento.....	48
5.5 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO.....	48
5.5.1 Attrezzatura	48
5.5.2 Prodotti chimici	49
5.5.3 Reagenti	49
5.5.4 Procedura analitica.....	49
5.5.4.1 Controllo della concentrazione del titolante.....	49
5.5.4.2 Analisi di campioni di acqua di mare.....	50
5.6 CALCOLI	50
5.7 PRECISIONE E ACCURATEZZA DEL METODO.....	52
5.8 RACCOMANDAZIONI.....	53

CAPITOLO 6. METODI AUTOMATICI DI ANALISI DEI NUTRIENTI

6.1 INTRODUZIONE	54
6.2 METODI A FLUSSO CONTINUO (SFA).....	55
6.2.1 Campionamento e conservazione dei campioni.....	57
6.2.2 Calcoli delle concentrazioni	58
6.3 DETERMINAZIONE DELL'AMMONIACA	59
6.3.1 Principio del metodo	59
6.3.1.1 Reagenti.....	60
6.3.1.2 Standard	61
6.3.1.3 Manifold	61
6.3.1.4 Raccomandazioni ed eliminazione dei problemi.....	62
6.4 DETERMINAZIONE DEI NITRATI.....	62
6.4.1 Principio del metodo	62
6.4.1.1 Reagenti.....	63
6.4.1.2 Standard	64
6.4.1.3 Il riduttore.....	64
6.4.1.4 Manifold	64
6.4.1.5 Raccomandazioni ed eliminazione dei problemi.....	65
6.5 DETERMINAZIONE DEI NITRITI.....	66
6.5.1 Principio del metodo	66
6.5.1.1 Reagenti.....	66
6.5.1.2 Standard	66
6.5.1.3 Manifold	67
6.5.1.4 Raccomandazioni ed eliminazione dei problemi.....	67
6.6 DETERMINAZIONE DEGLI ORTOFOSFATI.....	67
6.6.1 Principio del metodo	67
6.6.1.1 Reagenti.....	68
6.6.1.2 Soluzioni d'uso.....	68
6.6.1.3 Standard	68
6.6.1.4 Manifold	68
6.6.1.5 Raccomandazioni ed eliminazione dei problemi.....	69

6.7 DETERMINAZIONE DEI SILICATI	70
6.7.1 Principio del metodo	70
6.7.1.1 Reagenti	71
6.7.1.2 Soluzioni d'uso	71
6.7.1.3 Standard	71
6.7.1.4 Manifold	71
6.7.1.5 Raccomandazioni ed eliminazione dei problemi	72
6.8 BIBLIOGRAFIA	72
6.9 BIBLIOGRAFIA CONSULTATA	74
6.9.1 Ammoniaca	74
6.9.2 Nitrati	75
6.9.3 Nitriti	76
6.9.4 Ortofosfati	76
6.9.5 Silicati	78

CAPITOLO 7. DETERMINAZIONE DEL CARBONIO ORGANICO DISCIOLTO NELL'ACQUA MARINA

7.1 INTRODUZIONE	79
7.2 CAMPIONAMENTO	79
7.3 FILTRAZIONE	80
7.4 CONSERVAZIONE	80
7.5 METODI DI ANALISI	80
7.5.1 Rimozione del carbonio inorganico	81
7.5.2 Metodi di ossidazione per via umida	81
7.5.3 Metodo di combustione ad alta temperatura (HTO)	81
7.5.3.1 Rivelatori	81
7.5.3.2 Catalizzatori	82
7.5.3.3 Gas di trasporto	82
7.5.3.4 Preparazione degli standards	82
7.5.4 Bianco del sistema	82
7.6 CALCOLI	83
7.7 CONTROLLO DI QUALITÀ	83
7.8 POSSIBILI FONTI DI ERRORE	83
7.9 BIBLIOGRAFIA	83

CAPITOLO 8. AZOTO E FOSFORO TOTALI E TOTALI DISCIOLTI

8.1 INTRODUZIONE	85
8.2 PRINCIPIO DEL METODO	86
8.2.1 Ossidazione in soluzione con perossodisolfato (PO)	86
8.2.2 Fotoossidazione (UV)	87
8.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE	88
8.3.1 Attrezzatura	88
8.3.2 Prodotti chimici	88
8.3.3 Procedura di campionamento	88
8.3.4 Conservazione dei campioni	89
8.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO	89
8.4.1 Ossidazione in soluzione con perossodisolfato (PO)	89
8.4.1.1 Attrezzatura	89
8.4.1.2 Prodotti chimici	89
8.4.1.3 Preparazione dei reagenti	90
8.4.1.4 Procedura analitica	90
8.4.1.5 Determinazione del bianco dei reagenti e controllo dell'efficienza della soluzione ossidante	90
8.4.1.6 Calcoli	91
8.4.2 Fotoossidazione (UV)	91

8.4.2.1 Attrezzatura	91
8.4.2.2 Prodotti chimici	91
8.4.2.3 Procedura analitica	91
8.4.2.4 Determinazione del bianco sperimentale e controllo dell'efficienza di fotoossidazione	92
8.4.2.5 Calcoli	92
8.5 UTILIZZO DI COMPOSTI ORGANICI DI SINTESI COME MODELLI D'OSSIDAZIONE DELLA MATERIA ORGANICA NATURALE	92
8.6 RACCOMANDAZIONI	93
8.7 PROBLEMI POSSIBILI	93
8.8 ALTRI METODI	95
8.9 CONFRONTO TRA I METODI	95
8.10 BIBLIOGRAFIA	96

CAPITOLO 9. CARBONIO ORGANICO ED AZOTO TOTALE PARTICELLATI (POC E PTN)

9.1 INTRODUZIONE	99
9.2 PRINCIPIO DEL METODO	100
9.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE	101
9.3.1 Attrezzatura	101
9.3.2 Procedura di campionamento	101
9.3.3 Filtrazione	102
9.3.4 Conservazione dei campioni	102
9.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO	103
9.4.1 Attrezzatura	103
9.4.2 Prodotti chimici	103
9.4.3 Procedure analitiche	103
9.4.3.1 <i>Trattamento dei campioni e decarbonatazione</i>	103
9.4.3.2 <i>Analisi strumentale</i>	104
9.4.3.3 Raccomandazioni e possibili problemi	105
9.5 BIBLIOGRAFIA	106

CAPITOLO 10. MICRONUTRIENTI (FRAZIONE BIODISPONIBILE DI FERRO E RAME)

10.1 INTRODUZIONE	108
10.2 PRINCIPIO DEL METODO	108
10.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE	109
10.3.1 Attrezzatura	109
10.3.2 Procedura di campionamento	109
10.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO	109
10.4.1 Attrezzatura	109
10.4.2 Prodotti chimici	110
10.4.3 Materiali di riferimento standard certificati (CRMs)	110
10.4.4 Preparazione delle soluzioni	111
10.4.5 Preparazione della resina	111
10.4.6 Preparazione del campione	111
10.4.7 Procedura di pre concentrazione del campione e del CRM	112
10.4.8 Stadio di pre-eluzione	112
10.4.9 Stadio di eluzione	112
10.4.10 Controllo del bianco della procedura	113
10.5 DETERMINAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI FE E CU MEDIANTE ICP-AES	113
10.5.1 Calibrazione strumentale	113
10.6 RACCOMANDAZIONI	114
10.7 BIBLIOGRAFIA	115

CAPITOLO 11. ABBONDANZA VIRALE

11.1 INTRODUZIONE	116
11.2 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE	117

11.2.1 Attrezzatura.....	117
11.2.2 Procedura di campionamento	117
11.2.3 Conservazione dei campioni.....	117
11.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO	117
11.3.1 Attrezzatura.....	117
11.3.2 Soluzioni.....	118
11.4 PROCEDURA ANALITICA.....	118
11.4.1 Calcoli.....	119
11.4.2 Note.....	119
11.5 ISOLAMENTO E CONTEGGIO DI VIRUS MICROALGALI	119
11.5.1 Materiali	120
11.6 PROCEDURA.....	120
11.7 BIBLIOGRAFIA.....	121

CAPITOLO 12. PRODUZIONE VIRALE

12.1 INTRODUZIONE.....	123
12.2 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE.....	123
12.2.1 Attrezzatura.....	123
12.2.2 Procedura di campionamento	124
12.2.3 Allestimento del sistema sperimentale.....	124
12.3 CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	125
12.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO.....	125
12.5 CALCOLI.....	125
12.6 NOTE	125
12.7 BIBLIOGRAFIA	125

CAPITOLO 13. METODI PER LO STUDIO DELLA BIOMASSA DEL BATTERIOPLANCTON MEDIANTE CONTEGGIO SU PIASTRA, MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA E QUANTIFICAZIONE LIPOPOLISACCARIDICA

13.1 INTRODUZIONE.....	127
13.2 CONTEGGI IN PIASTRA.....	128
13.2.1 Principio del metodo.....	128
13.2.2 Apparecchiatura	129
13.2.3 Campionamento e conservazione dei campioni	129
13.2.4 Procedimento	129
13.2.5 Calcoli.....	130
13.3 MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA	130
13.3.1 Principio del metodo.....	130
13.3.2 Campionamento e conservazione del campione	130
13.3.3 Apparecchiatura	130
13.3.4 Reagenti	131
13.3.5 Procedimento	131
13.3.6 Osservazione al microscopio.....	131
13.3.7 Calcoli.....	132
13.3.8 Analisi morfometriche e stime di biomassa.....	132
13.4 QUANTIFICAZIONE DEI LIPOPOLISACCARIDI.....	133
13.4.1 Principio del metodo.....	133
13.4.2 Campionamento e conservazione del campione	133
13.4.3 Materiali e strumentazione	133
13.4.4 Procedimento	134

CAPITOLO 14. ABBONDANZA E BIOMASSA DEL PICOFITOPLANCTON (MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA)

14.1 INTRODUZIONE	136
14.2 MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA E PRINCIPIO DEL METODO	136

14.3 MATERIALE RICHIESTO	138
14.3.1 Attrezzatura	138
14.3.2 Materiale.....	138
14.3.3 Prodotti chimici	139
14.3.4 Preparazione delle soluzioni	139
14.4 PROCEDIMENTO	139
14.4.1 Campionamento e fissazione del campione.....	139
14.4.2 Filtrazione e preparazione del vetrino.....	140
14.4.3 Note	140
14.4.4 Osservazione al microscopio	140
14.5 DETERMINAZIONE DELL'ABBONDANZA CELLULARE	141
14.6 DETERMINAZIONE DELLA BIOMASSA CELLULARE	141
14.6.1 Volume cellulare.....	141
14.6.2 Misure essenziali e formule	142
14.6.3 Conversione del volume cellulare in carbonio	142
14.7 BIBLIOGRAFIA	142

CAPITOLO 15. ANALISI DELLA DIVERSITÀ BATTERICA MEDIANTE ARISA (AUTOMATED RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER ANALYSIS)

15.1 INTRODUZIONE.....	144
15.2 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE.....	144
15.2.1 Attrezzatura.....	144
15.3 PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO	145
15.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO	145
15.4.1 Estrazione e purificazione del DNA	145
15.4.2 Quantificazione spettrofotometrica del DNA	146
15.4.3 Amplificazione mediante PCR della regione ITS1	146
15.4.4 Elettroforesi orizzontale su Gel di Agarosio dei prodotti amplificati	147
15.4.5 Purificazione dei prodotti PCR	147
15.4.6 Elettroforesi capillare dei frammenti ITS1	147
15.5 ANALISI ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI	147
15.6 SOLUZIONI E REAGENTI	149
15.7 STRUMENTI	149
15.8 NOTE/PROBLEMI	149
15.9 BIBLIOGRAFIA	150

CAPITOLO 16. METODI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLA STRUTTURA E FUNZIONE DI COMUNITÀ MICROBICHE MARINE

16.1 INTRODUZIONE.....	151
16.2 FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (FISH).....	152
16.2.1 Principio	152
16.2.2 Schema delle operazioni.....	153
16.2.2.1 Attrezzatura.....	153
16.2.2.2 Prodotti Chimici	153
16.2.2.3 Soluzioni e reagenti	153
16.2.3 Procedura tecnica	154
16.3 LIBRERIE DI CLONI 16S DNA/CDNA.....	155
16.3.1 Principio	155
16.3.2 Schema delle operazioni.....	156
16.3.2.1 Attrezzatura.....	156
16.3.2.2 Prodotti Chimici e Kit Commerciali consigliati.....	156
16.3.2.3 Soluzioni e Reagenti.....	157
16.3.3 Procedura Tecnica	158
16.4 REAL TIME PCR	159

16.4.1 Principio.....	160
16.4.2 Metodi di analisi in Real-Time PCR.....	161
16.4.3 Disegno sperimentale.....	162
16.4.4 Schema delle operazioni.....	163
16.4.4.1 Attrezzatura.....	163
16.4.4.2 Soluzioni e reagenti.....	163
16.4.5 Procedura Tecnica.....	164
16.4.6 Schema delle operazioni in laboratorio.....	164
16.4.7 Procedura di laboratorio.....	164
16.4.8 Note.....	164
16.4.9 Analisi dei risultati.....	165
16.4.10 Real Time PCR in ambiente marino.....	166
16.5 BIBLIOGRAFIA.....	166

CAPITOLO 17. DETERMINAZIONE DELLA PRODUZIONE ETERTROFA PROCARIOTICA PLANCTONICA

17.1 INTRODUZIONE.....	168
17.2 DESCRIZIONE DEL METODO.....	169
17.2.1 Incorporazione di timidina.....	169
17.2.2 Incorporazione di leucina.....	170
17.3 PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO ED ANALISI.....	170
17.3.1 Campionamento.....	170
17.3.2 Preparazione ed incubazione dei campioni.....	170
17.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO.....	170
17.4.1 Estrazione delle macromolecole.....	170
17.4.2 Lettura dei campioni.....	171
17.4.3 Calcoli.....	171
17.4.3.1 Velocità di incorporazione del precursore radioattivo.....	171
17.4.3.2 Trasformazione della velocità di incorporazione del precursore radioattivo in produzione procariotica di carbonio (PCP):.....	171
17.4.4 Soluzioni e reagenti.....	172
17.5 APPARECCHIATURE.....	173
17.6 NOTE/PROBLEMI.....	173
17.6.1 Volume del campione.....	173
17.6.2 Concentrazione saturante.....	173
17.6.3 Tempo di incubazione.....	174
17.6.4 Diluizione del prodotto commerciale.....	174
17.6.5 Interferenze.....	174
17.6.6 Norme di sicurezza.....	175
17.7 BIBLIOGRAFIA.....	175

CAPITOLO 18. RESPIRAZIONE PLANCTONICA

18.1 INTRODUZIONE.....	177
18.2 RESPIRAZIONE DA MISURE DI OSSIGENO DISCIOLTO.....	178
18.2.1 Principio del metodo.....	178
18.2.2 Campionamento e conservazione del campione.....	178
18.2.3 Apparecchiatura.....	179
18.2.4 Reagenti.....	179
18.2.5 Procedimento.....	180
18.2.6 Titolazione.....	180
18.2.7 Calcoli.....	181
18.3 RESPIRAZIONE DA MISURE BIOCHIMICHE (ETS, ATTIVITÀ DEL SISTEMA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI).....	182
18.3.1 Principio del metodo.....	182

18.3.2 Campionamento e conservazione dei campioni	182
18.3.3 Apparecchiatura	182
18.3.4 Reagenti	183
18.3.5 Procedimento	183
18.3.6 Calcoli.....	184
18.4 BIBLIOGRAFIA	185

CAPITOLO 19. ATTIVITÀ ENZIMATICHE EXTRACELLULARI

19.1 INTRODUZIONE.....	187
19.2 PRINCIPIO DEL METODO.....	187
19.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI	188
19.3.1 Attrezzatura.....	188
19.3.2 Reagenti	188
19.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE.....	189
19.4.1 Prelievo del campione.....	189
19.5 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO.....	189
19.5.1 Preparazione ed uso delle soluzioni standard e di substrato	189
19.6 PROCEDURA ANALITICA.....	189
19.7 MISURA FLUORIMETRICA	190
19.8 INCUBAZIONE.....	190
19.9 ELABORAZIONE DEI DATI.....	190
19.10 NOTE E COMMENTI.....	191
19.10.1 Conservazione del campione per successiva analisi.....	191
19.10.2 Misure di ectoenzimi su campioni frazionati per classe dimensionale	192
19.11 BIBLIOGRAFIA	192

CAPITOLO 20. CONTEGGIO IN EPIFLUORESCENZA PER LA STIMA DEL NANOPLANCTON AUTOTROFO ED ETEROTROFO

20.1 INTRODUZIONE.....	194
20.1.1 Principio del metodo.....	194
20.2 MATERIALE RICHIESTO.....	195
20.2.1 Attrezzatura.....	195
20.2.2 Materiale di laboratorio	195
20.2.3 Prodotti chimici e soluzioni	195
20.2.4 Filtri e fluorocromi	196
20.2.4.1 Selezione dei filtri a membrana.....	196
20.2.4.2 Selezione del fluorocromo.....	197
20.2.4.3 Scelta dei set di filtri ottici	199
20.3 PROCEDIMENTO	199
20.3.1 Campionamento e fissazione del campione.....	199
20.3.2 Filtrazione, colorazione e preparazione del vetrino.....	199
20.3.3 Osservazione al microscopio	200
20.4 STIMA DELL'ABBONDANZA CELLULARE	201
20.5 STIMA DEL BIOVOLUME E DELLA CONCENTRAZIONE DI CARBONIO ASSOCIATA AL NANOPLANCTON..	202
20.6 BIBLIOGRAFIA	202

CAPITOLO 21. FITOPLANCTON: METODICHE DI ANALISI QUALI-QUANTITATIVA

21.1 INTRODUZIONE	204
21.2 RACCOLTA DEI CAMPIONI	204
21.2.1 Raccolta con bottiglie.....	205
21.2.2 Raccolta con retini.....	205
21.3 FISSAZIONE	205
21.3.1 Formalina.....	206
21.3.2 Lugol.....	206
21.4 CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI	206

21.5 CONTEGGIO CON IL METODO DI UTERMÖHL	206
21.5.1 Riempimento e sedimentazione.....	207
21.5.2 Osservazione dei campioni.....	208
21.5.3 Conteggio	209
21.5.3.1 <i>Conteggio per transetti</i>	209
21.5.3.2 <i>Conteggio per campi</i>	210
21.5.3.3 <i>Conteggio sull'intera camera</i>	210
21.5.4 Calcoli.....	210
21.6 ALTRI METODI DI CONTEGGIO.....	211
21.6.1 Tipi di camera.....	211
21.6.1.1 <i>Camera di Sedgwick-Rafter</i>	211
21.6.1.2 <i>Camera di Lund</i>	211
21.6.1.3 <i>Camera di Palmer-Maloney</i>	211
21.6.1.4 <i>Camera di sedimentazione modificata</i>	212
21.6.1.5 <i>Camera di Bürker</i>	212
21.6.2 Riempimento	212
21.6.3 Conteggio	213
21.7 STIMA DELLA BIOMASSA FITOPLANCTONICA.....	213
21.7.1 Biovolume.....	213
21.7.2 Stima del contenuto di carbonio dal biovolume cellulare.....	214
21.7.2.1 <i>Formule di conversione</i>	215
21.7.2.2 <i>Calcolo della biomassa fitoplanctonica (contenuto di carbonio)</i>	216
21.8 METODI DI IDENTIFICAZIONE IN MICROSCOPIA OTTICA	217
21.8.1 Tecniche specifiche per le Diatomee.....	218
21.8.1.1 <i>Pulizia dei frustuli</i>	218
21.8.1.2 <i>Preparati stabili</i>	220
21.8.2 Tecniche specifiche per i Dinoflagellati	221
21.8.2.1 <i>Metodo del Calcofluor</i>	221
21.8.2.2 <i>Colorazione delle placche con il colorante di von Stosch</i>	221
21.8.2.3 <i>Squashing</i>	222
21.8.2.4 <i>Vetrini permanenti</i>	222
21.9 LETTERATURA SISTEMATICA.....	223
21.9.1 Generali	223
21.9.2 Diatomee.....	223
21.9.3 Dinoflagellati	224
21.9.4 Cocolitofori	224
21.9.5 Altri fitoflagellati.....	225
21.10 SITI WEB PER LA TASSONOMIA DEL FITOPLANCTON	225
21.10.1 Generali	225
21.10.2 Diatomee	226
21.10.3 Dinoflagellati.....	226
21.10.4 Cocolitofori.....	226
21.10.5 Alghe tossiche	226
21.11 BIBLIOGRAFIA	226

CAPITOLO 22. COLTURE DI DILUIZIONE SERIALE (SDC)

22.1 INTRODUZIONE.....	229
22.2 DESCRIZIONE DEL METODO.....	230
22.2.1 Metodo con le pipette.....	230
22.2.2 Metodo con la siringa.....	231
22.3 OSSERVAZIONE DELLE COLTURE.....	232
22.4 STIMA DELLE CONCENTRAZIONI - CALCOLO DEL NUMERO PIÙ PROBABILE (MPN)	232
22.5 BIBLIOGRAFIA	234

CAPITOLO 23. OSSERVAZIONE DEL FITOPLANCTON AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM) E A TRASMISSIONE (TEM)

23.1 INTRODUZIONE.....	235
23.2 DIATOMEI.....	235
23.2.1 Microscopia elettronica a scansione.....	236
23.2.2 Microscopia elettronica a trasmissione.....	236
23.3 DINOFLAGELLATI.....	236
23.3.1 Microscopia elettronica a scansione.....	236
23.3.1.1 Fissazione.....	237
23.3.1.2 Disidratazione.....	238
23.3.1.3 Essiccazione e metallizzazione.....	239
23.3.2 Microscopia elettronica a trasmissione.....	239
23.4 COCCOLITOFORI.....	239
23.5 FITOFLAGELLATI.....	239
23.6 BIBLIOGRAFIA.....	240

CAPITOLO 24. ISOLAMENTO E METODI DI COLTURA DI MICROALGHE E CIANOBATTERI

24.1 INTRODUZIONE.....	242
24.2 EQUIPAGGIAMENTO.....	242
24.3 STERILIZZAZIONE.....	243
24.3.1 Sterilizzazione termica.....	243
24.3.2 Sterilizzazione con raggi ad alta energia.....	244
24.3.3 Eliminazione di batteri per filtrazione.....	244
24.4 ISOLAMENTO DI MICROALGHE.....	244
24.4.1 Isolamento con micropipetta.....	244
24.4.2 Isolamento tramite diluizione seriale.....	245
24.5 ISOLAMENTO DI CIANOBATTERI.....	246
24.5.1 Messa in coltura su terreno liquido.....	246
24.5.2 Messa in coltura su terreno solido.....	247
24.5.3 Colture monospecifiche.....	247
24.6 TERRENI DI COLTURA.....	247
24.6.1 Soluzioni stock.....	247
24.6.2 Macronutrienti.....	248
24.6.3 Metalli in traccia.....	249
24.6.4 Vitamine.....	250
24.6.5 Tamponi.....	250
24.6.6 Estratto di suolo.....	250
24.7 CONDIZIONI DI CRESCITA E DI MANTENIMENTO DELLE COLTURE.....	251
24.7.1 Scelta del terreno di coltura.....	251
24.7.2 Camere di crescita.....	251
24.7.3 Mantenimento a lungo termine.....	252
24.8 PURIFICAZIONE DELLE COLTURE.....	252
24.8.1 Metodo di Guillard (1973) e di Hoshaw e Rosowski (1973).....	252
24.8.2 Metodo di Droop (1967).....	253
24.8.3 Metodo di Cottrell e Suttle (1993).....	253
24.9 BIBLIOGRAFIA.....	254

CAPITOLO 25. METODI AUTOMATICI PER IL RILEVAMENTO DI MICROALGHE PLANCTONICHE

25.1 INTRODUZIONE.....	255
25.2 IL SISTEMA HAB BUOY.....	256
25.3 BIBLIOGRAFIA.....	257

CAPITOLO 26. STADI DI RESISTENZA DEL FITOPLANCTON

26.1 INTRODUZIONE.....	258
26.2 CAMPIONAMENTO DEI SEDIMENTI.....	258
26.2.1 Scelta del sito.....	258
26.2.2 Metodi di raccolta.....	258
26.2.2.1 <i>Campioni di sedimento</i>	258
26.2.2.2 <i>Trappole di sedimentazione e trappole inverse</i>	260
26.2.2.3 <i>Conservazione e fissazione</i>	260
26.3 STIMA QUANTITATIVA.....	261
26.3.1 Filtrazione per taglia.....	261
26.3.2 Concentrazione delle cisti tramite gradiente di densità (politungstato di sodio).....	262
26.3.3 Analisi quali/quantitativa.....	264
26.4 INDUZIONE DELL'INCISTAMENTO.....	265
26.5 GERMINAZIONE DELLE CISTI.....	266
26.6 METODI MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE DI CISTI DI RESISTENZA NEI SEDIMENTI MARINI: ANALISI MOLECOLARE CON PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION).....	267
26.7 METODO DEL 'MOST PROBABLE NUMBER (MPN)' PER LA VALUTAZIONE DI STADI DI RESISTENZA NEI SEDIMENTI.....	270
26.8 BIBLIOGRAFIA.....	271

CAPITOLO 27. METODI MOLECOLARI PER L'ANALISI DEL FITOPLANCTON MARINO

27.1 INTRODUZIONE.....	274
27.2 TIPOLOGIA DEL MARCATORE MOLECOLARE.....	275
27.3 CAMPIONAMENTO DEL FITOPLANCTON: PROBLEMATICHE METODOLOGICHE.....	278
27.4 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI.....	278
27.4.1 Estrazione del DNA con il metodo CTAB.....	278
27.4.2 Quantificazione di DNA mediante gel di Agarosio.....	280
27.4.3 Quantificazione di DNA mediante spettrofotometro.....	280
27.5 ANALISI DEL DNA AMBIENTALE.....	281
27.5.1 Analisi di PCR per l'identificazione di specie fitoplanctoniche.....	281
27.5.1.1 <i>Protocollo di analisi di PCR</i>	282
27.5.1.2 <i>Analisi di PCR su campioni ambientali</i>	283
27.5.1.3 <i>Vantaggi e svantaggi</i>	283
27.5.2 DNA ambientale e librerie clonali.....	284
27.5.2.1 <i>Estrazione DNA totale</i>	284
27.5.2.2 <i>Scelta del gene bersaglio</i>	284
27.5.2.3 <i>Analisi di PCR</i>	285
27.5.2.4 <i>Clonaggio e minipreparazione</i>	285
27.5.2.5 <i>Vantaggi e svantaggi</i>	286
27.6 DNA AMBIENTALE E TECNICHE DI FINGERPRINTING.....	286
27.6.1 TGGE/DGGE.....	287
27.6.1.1 <i>Vantaggi e svantaggi</i>	287
27.6.2 SSCP.....	287
27.6.2.1 <i>Vantaggi e svantaggi</i>	287
27.7 APPLICAZIONE DEI METODI MOLECOLARI PER STUDI DI TASSONOMIA E FILOGENESI.....	287
27.7.1 La scelta del marcatore.....	287
27.7.2 Allineamento delle sequenze.....	288
27.7.3 Metodi di analisi filogenetiche.....	288
27.7.4 Alberi filogenetici.....	289
27.8 APPLICAZIONE DEI METODI MOLECOLARI PER ANALISI DI POPOLAZIONE.....	290
27.8.1 I marcatori.....	290
27.8.2 Analisi dei dati.....	291
27.8.3 Problemi e possibilità.....	291
27.9 TECNICHE DI IBRIDAZIONE CON SONDE.....	292

27.10 TECNICHE DI ESPRESSIONE	292
27.11 BIBLIOGRAFIA	293

CAPITOLO 28. LA CITOMETRIA A FLUSSO PER LO STUDIO DEI MICROORGANISMI PLANCTONICI

28.1 INTRODUZIONE.....	297
28.2 STRUMENTAZIONE.....	298
28.3 ANALISI.....	299
28.4 STRUMENTI.....	300
28.5 PROTOCOLLI DI ANALISI.....	303
28.5.1 Procedure di verifica e messa a punto dello strumento.....	303
28.5.2 Picofitoplancton.....	304
28.5.2.1 Protocollo.....	304
28.5.3 Batteri eterotrofi.....	305
28.5.3.1 Protocollo.....	306
28.5.4 Virus.....	307
28.6 PROSPETTIVE E NUOVI CAMPI DI APPLICAZIONE.....	307
28.7 SITI WEB E MATERIALE DIDATTICO.....	307
28.8 BIBLIOGRAFIA.....	308

CAPITOLO 29. PRODUZIONE PRIMARIA

29.1 INTRODUZIONE.....	312
29.2 DEFINIZIONI E PRINCIPIO DEL METODO.....	312
29.3 PRODOTTI CHIMICI.....	315
29.4 PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI BICARBONATO DI SODIO MARCATO (NaH ¹⁴ CO ₃).....	315
29.5 CAMPIONAMENTO E INOCULO DELLA SOLUZIONE RADIOATTIVA.....	315
29.6 SISTEMA DI INCUBAZIONE.....	316
29.7 TRATTAMENTO DEI CAMPIONI.....	317
29.7.1 Determinazione della produzione particellata totale e frazionata.....	317
29.7.2 Determinazione della produzione totale ed essudata.....	318
29.8 CALCOLI.....	319
29.9 VANTAGGI E SVANTAGGI.....	319
29.10 BIBLIOGRAFIA.....	320

CAPITOLO 30. PARAMETRI FOTOSINTETICI: CURVE FOTOSINTESI-IRRADIANZA (P_{vs}E METODO ¹⁴C)

30.1 INTRODUZIONE.....	323
30.2 PRINCIPIO DEL METODO.....	323
30.3 STRUMENTAZIONE.....	325
30.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI.....	326
30.5 UTILIZZO DEI PARAMETRI FOTOSINTETICI PER LE STIME GLOBALI DI PRODUZIONE PRIMARIA.....	327
30.6 VANTAGGI E SVANTAGGI.....	327

CAPITOLO 31. PARAMETRI FOTOSINTETICI DA FLUORESCENZA VARIABILE MODULATA (PAM)

31.1. INTRODUZIONE.....	329
31.2 PRINCIPIO DEL METODO.....	329
31.2.1 Terminologia e definizioni.....	330
31.3 PROCEDURA.....	331
31.3.1 Strumentazione.....	331
31.3.2 Misura delle curve PE col metodo dell'impulso saturante.....	332
31.4 VALUTAZIONI CRITICHE.....	333
31.5 BIBLIOGRAFIA.....	334

**CAPITOLO 32. ASSIMILAZIONE DEI NUTRIENTI AZOTATI E DELL'AZOTO MOLECOLARE
NEL PARTICELLATO VIVENTE MEDIANTE TECNICA DI ARRICCHIMENTO
ISOTOPICO (¹⁵N)**

32.1 INTRODUZIONE.....	336
32.2 PRINCIPIO DEL METODO.....	336
32.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI PRELIMINARI ED IN MARE.....	337
32.3.1 Attrezzatura.....	337
32.3.2 Prodotti chimici.....	338
32.3.3 Preparazione delle soluzioni dei nutrienti marcati con ¹⁵ N ed inoculo del gas ¹⁵ N ₂	338
32.3.4 Procedura di campionamento.....	339
32.3.5 Aggiunta del substrato marcato.....	339
32.3.6 Incubazione.....	340
32.3.7 Conservazione dei campioni.....	341
32.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO.....	341
32.4.1 Attrezzatura.....	341
32.4.2 Prodotti chimici.....	341
32.4.3 Filtrazione.....	341
32.4.4 Analisi dei campioni arricchiti.....	342
32.5 CALCOLI.....	343
32.6 RACCOMANDAZIONI E NOTE.....	344
32.7 BIBLIOGRAFIA.....	345

CAPITOLO 33. PIGMENTI CLOROFILLIANI PER LA STIMA DELLA BIOMASSA FOTOTROFA

33.1 INTRODUZIONE GENERALE AI METODI BASATI SUI PIGMENTI.....	348
33.2 CAMPIONAMENTO E FILTRAZIONE.....	349
33.2.1 Attrezzatura e reagenti.....	349
33.2.2 Procedura di campionamento.....	350
33.2.3 Procedura di filtrazione.....	350
33.2.4 Conservazione dei campioni.....	351
33.3 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI.....	352
33.3.1 Attrezzature specifiche.....	352
33.3.2 Prodotti chimici e reagenti.....	352
33.3.3 Procedura.....	352
33.4 SPETTROFOTOMETRIA SU ESTRATTI.....	353
33.4.1 Lettura e calcoli.....	353
33.4.1.1 Concentrazione dei clorofeopigmenti.....	354
33.4.1.2 Concentrazioni delle clorofille a, b e c.....	354
33.4.1.3 Concentrazioni della clorofilla a e dei feopigmenti.....	355
33.4.2 Note sui dosaggi spettrofotometrici.....	356
33.5 SPETTROFLUORIMETRIA SU ESTRATTI.....	356
33.5.1 Attrezzature specifiche.....	357
33.5.2 Procedura.....	357
33.5.2.1 Filtrazione, conservazione ed estrazione.....	357
33.5.2.2 Misure fluorimetriche.....	357
33.5.2.3 Preparazione dello standard iniziale.....	357
33.5.2.4 Standardizzazione di routine dopo la misura fluorimetrica dei campioni.....	358
33.5.2.5 Calcoli delle concentrazioni dei campioni.....	358
33.6 BIBLIOGRAFIA.....	359

**CAPITOLO 34. DETERMINAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DEI PIGMENTI FITOPLANCTONICI
MEDIANTE HPLC**

34.1 INTRODUZIONE.....	361
34.1.1 Indicatori chemotassonomici.....	361
34.1.2 Indicatori fotofisiologici.....	363
34.1.3 Pigmenti di degradazione.....	363

34.2 CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI.....	363
34.3 METODO E PRINCIPIO DI ANALISI.....	364
34.3.1 Strumentazione analitica.....	364
34.3.2 Trattamento del campione.....	365
34.4 CALCOLI E STANDARDIZZAZIONE.....	366
34.5 LIMITI, RACCOMANDAZIONI E SVILUPPO.....	367
34.6 BIBLIOGRAFIA.....	367

CAPITOLO 35. MISURE SPETTRALI DI ASSORBIMENTO E FLUORESCENZA *IN VIVO* DEL FITOPLANCTON

35.1 INTRODUZIONE.....	370
35.2 ASSORBIMENTO.....	370
35.2.1 Principio del metodo.....	371
35.2.2 Metodo.....	372
35.2.2.1 <i>Materiale occorrente</i>	372
35.2.2.2 <i>Schema delle operazioni</i>	373
35.2.2.3 <i>Calcoli</i>	374
35.3 FLUORESCENZA FITOPLANCTONICA.....	378
35.3.1 Fluorescenza spettrale.....	379
35.3.2 Metodo.....	380
35.3.2.1 <i>Materiale occorrente</i>	380
35.3.2.2 <i>Schema delle operazioni</i>	381
35.4 BIBLIOGRAFIA.....	383

CAPITOLO 36. QUANTITÀ E COMPOSIZIONE BIOCHIMICA DELLA MATERIA ORGANICA PARTICELLATA IN ACQUA E NEGLI AGGREGATI MUCILLAGINOSI

36.1 INTRODUZIONE.....	386
36.2 MATERIA ORGANICA PARTICELLATA IN ACQUA.....	388
36.2.1 Metodi di campionamento e conservazione dei campioni.....	388
36.2.2 Carboidrati totali nel particellato.....	388
36.2.2.1 <i>Protocollo Dubois et al. (1956)</i>	388
36.2.2.2 <i>Protocollo Parsons et al. (1984)</i>	390
36.2.2.3 <i>Determinazione di carboidrati uronici totali</i>	390
36.2.3 Proteine totali nel particellato.....	391
36.2.4 Lipidi totali nel particellato.....	393
36.2.5 Coefficienti di conversione.....	394
36.2.6 DNA nel particellato.....	394
36.2.7 Analisi del DNA particellato.....	395
36.3 MATERIALE ORGANICO PARTICELLATO NEGLI AGGREGATI MUCILLAGINOSI.....	396
36.3.1 Campionamento e pre-trattamento dei campioni.....	396
36.3.2 Determinazione della sostanza organica totale.....	397
36.3.3 Carboidrati totali negli aggregati.....	397
36.3.4 Proteine totali negli aggregati.....	398
36.3.5 Lipidi totali negli aggregati.....	398
36.4 BIBLIOGRAFIA.....	399

CAPITOLO 37. STIMA DELLA BIOMASSA TOTALE DA MISURE DI ATP CELLULARE

37.1 INTRODUZIONE.....	403
37.2 PRINCIPIO DEL METODO.....	403
37.3 CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE.....	404
37.4 APPARECCHIATURA.....	404
37.5 REAGENTI.....	404
37.6 PROCEDIMENTO.....	405
37.8 BIBLIOGRAFIA.....	406

CAPITOLO 38. METODOLOGIE ANALITICHE PER LA MISURA DEI VALORI DI COMPOSIZIONE ISOTOPICA DI CARBONIO, AZOTO E OSSIGENO IN DIFFERENTI COMPARTI DEL SISTEMA MARINO

38.1 INTRODUZIONE.....	407
38.2 BASI TEORICHE E NOTAZIONI CONVENZIONALI.....	408
38.3 MISURA DEI VALORI DI $\delta^{13}\text{C}$ NEL CARBONIO INORGANICO DISCIOLTO (DIC) IN ACQUA DI MARE	410
38.3.1 Principio del metodo.....	411
38.3.2 Schema delle operazioni in mare.....	411
38.3.3 Schema delle operazioni in laboratorio.....	411
38.4 MISURA DEI VALORI DI COMPOSIZIONE ISOTOPICA $\delta^{15}\text{N}$ E $\delta^{13}\text{C}$ NEL POM E NEL SEDIMENTO.....	412
38.4.1 Principio del metodo.....	413
38.4.2 Schema delle operazioni in mare.....	414
38.4.3 Schema delle operazioni in laboratorio.....	414
38.4.3.1 Attrezzatura.....	414
38.4.3.2 Prodotti chimici.....	414
38.4.3.3 Preparazione dei campioni.....	415
38.4.3.4 Procedura analitica.....	416
38.4.3.5 Standardizzazione e calcoli.....	416
38.4.3.6 Raccomandazioni e possibili problemi.....	417
38.5 MISURA DEI VALORI DI COMPOSIZIONE ISOTOPICA DEL NITRATO IN ACQUA DI MARE.....	418
38.5.1 Principio del metodo.....	418
38.5.2 Schema delle operazioni in mare.....	419
38.5.2.1 Attrezzatura.....	419
38.5.2.2 Procedura di campionamento.....	419
38.5.3 Schema delle operazioni in laboratorio.....	419
38.5.3.1 Attrezzatura.....	419
38.5.3.2 Prodotti chimici.....	420
38.5.4 Preparazione dei campioni.....	420
38.5.4.1 Rimozione NH_4^+ e DON labile (procedura con ebollizione).....	421
38.5.4.2 Rimozione NH_4^+ e DON labile (procedura con ebollizione).....	421
38.5.4.3 Riduzione del nitrato ad ammoniaca e diffusione.....	421
38.5.4.4 Preparazione di bianchi e standard.....	422
38.6 MISURA DEI VALORI DI COMPOSIZIONE ISOTOPICA $\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$ DELLA COMPONENTE ORGANICA DI ORGANISMI MARINI.....	423
38.6.1 Schema delle operazioni in mare.....	424
38.6.2 Schema delle operazioni in laboratorio.....	424
38.7 MISURA DEI VALORI DI COMPOSIZIONE ISOTOPICA D18O E D13C DI CARBONATI BIOGENICI MARINI.....	425
38.7.1 Principio del metodo.....	425
38.7.2 Schema delle operazioni in laboratorio.....	426
38.7.2.1 Flushing.....	426
38.7.2.2 Acidificazione.....	426
38.7.2.3 Campionamento.....	427
38.8 BIBLIOGRAFIA.....	427

CAPITOLO 39. BIOTOSSINE MARINE

39.1 INTRODUZIONE.....	432
39.2 TOSSINE IDROSOLUBILI.....	433
39.2.1 Saxitossine (METODO LAWRENCE, Lawrence <i>et al.</i> , 2005) – Metodo ufficiale AOAC).....	433
39.2.2 Acido domoico (Metodo ufficiale AOAC, Quilliam <i>et al.</i> , 1995).....	437
39.2.3 Palitossina (Ciminiello <i>et al.</i> , 2008).....	439
39.3 TOSSINE LIPOSOLUBILI.....	442
39.3.1 Acido okadaico (Quilliam, <i>et al.</i> , 1995).....	442
39.3.2 Yessotossine (Ciminiello <i>et al.</i> , 2003).....	444
39.4 BIBLIOGRAFIA.....	447

CAPITOLO 40. ANALISI CHIMICHE, BIOCHIMICHE E MICROBIOLOGICHE DI AGGREGATI MUCILLAGINOSI

40.1 INTRODUZIONE	448
40.2 CAMPIONAMENTO	448
40.3 ANALISI CHIMICHE E BIOCHIMICHE.....	450
40.4 ANALISI MICROBIOLOGICHE	451
40.5 MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE DI AGGREGATI MUCILLAGINOSI	452
40.6 ANALISI DELLE COMUNITÀ MICROALGALI	453
40.7 BIBLIOGRAFIA	454

CAPITOLO 41. MICROZOOPLANCTON

41.1. INTRODUZIONE.....	456
41.2. STIMA DELLE ABBONDANZE.....	456
41.2.1 Procedura di campionamento	456
41.2.2 Conservazione dei campioni.....	457
41.2.3 Concentrazione e conteggio.....	457
41.3 DETERMINAZIONE DELLA BIOMASSA IN TERMINI DI CARBONIO	458
41.4 ANALISI SISTEMATICA.....	459
41.5 BIBLIOGRAFIA	460

CAPITOLO 42. MESOZOOPLANCTON

42.1 INTRODUZIONE.....	467
42.2 METODI DI CAMPIONAMENTO.....	467
42.2.1 Prelievo di campioni con bottiglie o pompe e filtrazione a bordo.....	468
42.2.2 Reti da plancton trainate da natante.....	469
42.2.3 Diverse tipologie di reti e campionatori.....	470
42.2.4 Misura del volume d'acqua filtrato.....	472
42.2.5 Recupero, fissazione e conservazione dei campioni	472
42.3 ANALISI DEI CAMPIONI	473
42.3.1 Stime quantitative di abbondanza.....	473
42.3.2 Determinazione tassonomica	475
42.3.3 Stima della biomassa	476
42.3.3.1 <i>Metodi volumetrici</i>	477
42.3.3.2 <i>Metodi gravimetrici</i>	478
42.3.3.3 <i>Metodi chimici e biochimici</i>	479
42.4 BIBLIOGRAFIA	481

CAPITOLO 43. FORME DI RESISTENZA DELLO ZOOPLANCTON

43.1 INTRODUZIONE.....	485
43.2 CRITERI GENERALI PER L'IDENTIFICAZIONE MORFOLOGICA DELLE FORME DI RESISTENZA	485
43.2.1 Ciliophora.....	485
43.2.2 Rotifera.....	486
43.2.3 Cladocera.....	486
43.2.4 Copepoda.....	487
43.3 METODI DI RACCOLTA	488
43.3.1 Siti di raccolta.....	488
43.3.2 Campionamento dei sedimenti.....	488
43.3.3 Trappole per sedimento.....	489
43.3.4 Conservazione dei campioni.....	489
43.4 ANALISI QUALI-QUANTITATIVA.....	489
43.4.1 Filtrazione per taglia	489
43.4.2 Separazione per centrifugazione	490
43.4.3 Analisi e riconoscimento del materiale isolato	492
43.5 SCHIUSA DELLE FORME DI RESISTENZA.....	492
43.6 BIBLIOGRAFIA	494

CAPITOLO 44. LA RACCOLTA DEL PLANCTON GELATINOSO

44.1 INTRODUZIONE.....	497
44.2 RACCOLTA CON RETINI E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI.....	497
44.3 CENSIMENTI VISUALI	498
44.3.1 Osservazioni da bordo.....	498
44.3.2 Blue diving.....	499
44.4 SISTEMI OTTICI: VIDEO E SOTTOMARINI DA RICERCA	499
44.5 SISTEMI ACUSTICI	501
44.6 BIBLIOGRAFIA	501

CAPITOLO 45. METODO DELLE DILUIZIONI PER LA STIMA DELLA PREDAZIONE DEL MICRO-ZOOPLANCTON (E DEL NANOPLANCTON ETERTROFO)

45.1 INTRODUZIONE	502
45.2 METODI PER LA STIMA DELLA PREDAZIONE	502
45.3.BIBLIOGRAFIA.....	508

CAPITOLO 46. TECNICHE DI MICROSCOPIA A FLUORESCENZA PER LO STUDIO DELLO ZOOPLANCTON

46.1 INTRODUZIONE	511
46.2 ANALISI MORFOLOGICA DEI CROSTACEI (LARVE ED EMBRIONI) MEDIANTE CARBOCIANINE	513
46.3 PROTOCOLLI DI COLORAZIONE CON CARBOCIANINE E HOECHST	515
46.4 VITALITÀ DEGLI EMBRIONI DI COPEPODI	516
46.5 TRATTAMENTO PRELIMINARE PER LA PERMEABILIZZAZIONE DEGLI EMBRIONI DI COPEPODI (COMUNE PER TUTTI I PROTOCOLLI DI COLORAZIONE).....	517
46.6 FECONDAZIONE E SVILUPPO EMBRIONALE DEGLI ORGANISMI MARINI	518
46.6.1 Protocollo colorazione copepodi con TUNEL.....	519
46.7 LA MLC NELLO STUDIO DEGLI AGGREGATI ORGANICI MARINI	520
46.8 CONCLUSIONI.....	520
46.9 BIBLIOGRAFIA	521

CAPITOLO 47. ALLEVAMENTO DEI COPEPODI PLANCTONICI IN PICCOLI E GRANDI VOLUMI

47.1 INTRODUZIONE.....	523
47.2 ALLESTIMENTO DEGLI ALLEVAMENTI.....	523
47.2.1 Campionamento e trasporto in laboratorio.....	523
47.2.2 Trasferimento in mezzo sperimentale	524
47.3 CONDIZIONI SPERIMENTALI.....	525
47.3.1 Qualità dell'acqua di mare.....	525
47.3.2 Temperatura, salinità e luce	525
47.3.3 Ossigeno e pH	525
47.3.4 Volume degli allevamenti.....	525
47.4 ALLEVAMENTI IN PICCOLI VOLUMI.....	527
47.5 ALLEVAMENTI IN GRANDI VOLUMI.....	529
47.5.1 Circolazione totale.....	530
47.5.2 Circolazione parziale	531
47.5.3 Circolazione totale + filtrazione-separazione dei nauplii.....	531
47.5.4 Circolazione parziale + concentrazione dei nauplii.....	531
47.6 ALIMENTAZIONE.....	533
47.7 BIBLIOGRAFIA	536

CAPITOLO 48. PRODUZIONE ED ALLEVAMENTO DI LARVE DI CROSTACEI DECAPODI

48.1 INTRODUZIONE.....	538
48.2 UN PO' DI STORIA.....	539
48.3 LA SITUAZIONE ATTUALE IN MEDITERRANEO.....	539
48.4 LA BIBLIOGRAFIA SPECIFICA E LE CHIAVI DI IDENTIFICAZIONE	539

48.5 RIPRODUZIONE E STADI LARVALI PRINCIPALI.....	541
48.6 MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO ED ECOLOGIA DELLE LARVE.....	542
48.7 PRESENZA DELLE LARVE DI SPECIE ALLOCTONE.....	544
48.8 DUE ESEMPI CONCRETI DI ALLEVAMENTO, IN IMPIANTO ED IN LABORATORIO.....	544
48.8.1 Strutture essenziali per la produzione larvale.....	544
48.8.2 Alimentazione larvale.....	546
48.9 MORFOGENESI NEI PENEIDI.....	547
48.9.1 Nauplio.....	547
48.9.2 Protozoëa.....	548
48.9.3 Mysis.....	549
48.9.4 Post-larva.....	551
48.10 RIPRODUZIONE IN CATTIVITÀ.....	552
48.11 SETTORE DI MANTENIMENTO, CONDIZIONAMENTO E MATURAZIONE DEI RIPRODUTTORI.....	552
48.12 SETTORE DI RIPRODUZIONE E RACCOLTA DELLE UOVA.....	552
48.13 SETTORE DI ALLEVAMENTO LARVALE E POSTLARVALE.....	553
48.14 SETTORE FITOPLANCTON.....	553
48.15 SETTORE DI SCHIUSA DELLE UOVA DI <i>ARTEMIA SALINA</i>	553
48.16 GESTIONE DELL'ALLEVAMENTO LARVALE.....	553
48.17 PRODUZIONE DI POSTLARVE DI <i>HIPPOLYTE INERMIS</i> IN LABORATORIO.....	555
48.18 PRODUZIONE E ALLEVAMENTO LARVALE.....	555
48.19 ALLEVAMENTO POSTLARVALE.....	557
48.20 CONCLUSIONI.....	558
48.21 BIBLIOGRAFIA.....	559

CAPITOLO 49. PRODUZIONE ED ALLEVAMENTO DI LARVE DI CIRRIPIEDI: *Balanus amphitrite* COME SPECIE MODELLO

49.1 INTRODUZIONE.....	562
49.2 DESCRIZIONE DELL'ORGANISMO.....	562
49.3 ALLEVAMENTO DEGLI ORGANISMI ADULTI.....	566
49.3.1 Campionamento degli organismi.....	566
49.3.2 Allestimento e mantenimento degli allevamenti.....	566
49.3.3 Alimentazione degli adulti.....	567
49.4 ALLEVAMENTO DELLE FASI LARVALI.....	567
49.4.1 Ottenimento delle larve.....	567
49.4.2 Allevamento delle larve.....	568
49.4.3 Alimentazione delle fasi larvali.....	569
49.5 OTTENIMENTO DELLA SECONDA GENERAZIONE DI ADULTI.....	569
49.5.1 Insediamento in laboratorio.....	569
49.5.2 Allevamento dei giovani insediati.....	570
49.6 ALLEVAMENTO DELLE SPECIE UTILIZZATE PER L'ALIMENTAZIONE.....	571
49.6.1 Coltura di <i>Tetraselmis suecica</i> per alimentazione.....	571
49.6.2 Ottenimento di <i>Artemia salina</i> per alimentazione.....	571
49.7 BIBLIOGRAFIA.....	572

CAPITOLO 50. ALLEVAMENTO DI STADI LARVALI DI RICCIO DI MARE

50.1 INTRODUZIONE.....	575
50.2 MANTENIMENTO DEI RICCI ADULTI E OTTENIMENTO DEI GAMETI.....	575
50.2.1 Trasporto e mantenimento degli adulti.....	575
50.2.2 Ottenimento dei gameti.....	576
50.3 ALLESTIMENTO DEGLI ALLEVAMENTI.....	576
50.3.1 Fecondazione in vitro.....	576
50.3.2 Sviluppo embrionale.....	578
50.3.3 Trattamento degli embrioni.....	579
50.3.4 Alimentazione delle larve.....	580

50.3.5 Colture algali per l'alimentazione delle larve.....	580
50.3.6 Attrezzatura per l'allevamento	581
50.3.6.1 Contenitori	581
50.3.6.2 Attrezzatura complementare.....	582
50.3.6.3 Acqua di mare.....	582
50.4 BIBLIOGRAFIA	582

CAPITOLO 51. RIPRODUZIONE E ALLEVAMENTO LARVALE IN SCALA DI LABORATORIO DI MOLLUSCHI BIVALVI: *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* E *OSTREA EDULIS*

51.1 <i>MYTILUS GALLOPROVINCIALIS</i>	584
51.1.1 Cenni su biologia ed ecologia	584
51.1.2 Riproduzione controllata	585
51.1.3 Raccolta dei riproduttori.....	585
51.1.4 Condizionamento.....	586
51.1.5 Emissione dei gameti.....	586
51.1.6 Fecondazione	588
51.1.7 Allevamento larvale.....	590
51.1.8 Alimentazione	592
51.1.9 Mortalità	592
51.2 <i>OSTREA EDULIS</i>	593
51.2.1 Cenni su biologia ed ecologia	593
51.2.2 Condizionamento dei riproduttori.....	593
51.2.3 Allevamento larvale.....	595
51.3 BIBLIOGRAFIA	598

CAPITOLO 1. INTRODUZIONE

I. Ferrari, M. Innamorati, G. Socal

L'agricoltore del neolitico conosceva l'essenziale della catena alimentare terrestre: gli animali si nutrono delle piante. Per conoscere quella marina ci sono voluti migliaia di anni, il microscopio e la scoperta del plancton (dal gr. *planctòn, errabondo*, Hensen 1887, come i pianeti, *plan-*, ma le orbite e le migrazioni diurne hanno sconfessato l'etimo). Potremmo dire che la planctologia sia nata quando van Leeuwenhoek (che aveva intagliato 419 lenti: di vetro, cristallo e diamante, fino a 270 x) scrisse alla Royal Society (1673) d'aver scoperto in una goccia d'acqua degli "animaletti" 10.000 volte più piccoli di una pulce d'acqua, poi detti infusori (1763) e vide anche i batteri. Questa nascita sarebbe avvenuta più di un secolo prima di quando Lamarck (1802), riunendo in un unico corpo lo studio di tutti i viventi, piante, funghi, animali, vertebrati, molluschi, ragni, insetti, vermi, meduse, infusori e microbi, l'abbia chiamato *biologia*, rivendicandone l'autonomia teorica e metodologica dalla fisica e dalla chimica e dotandola (1809), unica tra le scienze, di una teoria generale interpretativa dell'origine delle specie per variazione ereditabile nella discendenza: l'evoluzionismo, che Darwin porterà al trionfo (1859).

Dopo la scoperta degli infusori, il microscopio si diffonde nei laboratori (il biologo è spesso ritratto con il suo microscopio accanto) e diventa uno strumento determinante per il grande sviluppo della biologia, che si differenzia in microbiologia, citologia, istologia, ecc... Schleiden e Schwann formulano la teoria cellulare (1829) ed è Schleiden a incitare Carl Zeiss a produrre i microscopi, che perfezionerà con gran vantaggio per la ricerca. Anche lo studio del plancton conosce questa espansione soprattutto nell'analisi morfologica e il conseguente riconoscimento di specie operato da molti, tra cui: Müller (1858) che trova 50 specie nel Mediterraneo, Haeckel (1862), suo allievo, che identifica 144 specie a Messina e 4318 (1887) nei campioni dei piani abissali, prima pensati senza vita, della spedizione del Challenger (1873–1876). Ma è verso la fine del decennio 1880-1890, soprattutto ad opera di Ernst Haeckel, fondatore dell'*ecologia*, e Victor Hensen, che vengono delineati i primi anelli della catena alimentare marina con i *protofitti*, che fotosintetizzano, ed i *protozoi*, che sono i consumatori primari. Pertanto, seguendo Reynolds (2006), possiamo dire che la planctologia nasce nel penultimo decennio del 1800, e che Haeckel e Hensen possono esserne considerati i padri fondatori. Dal 1890 al 1990 la planctologia ha fatto grandi passi anche in Italia con aumento di studiosi e di centri di studio, (*) l'impiego di nuova strumentazione e quello di più grandi e più attrezzati mezzi navali.

Il confronto dello spettro di temi affrontati in questo Manuale con quello coperto dal libro edito da *Nova Thalassia* nel 1990, al quale si rimanda per la sola misurazione dell'irradianza, evidenzia l'incredibile espansione di competenze maturate tra i planctologi italiani delle ultime generazioni. I progressi delle conoscenze e delle applicazioni sono evidenti in tanti campi: dalle analisi chimiche per la determinazione dei contenuti di nutrienti inorganici e organici e micronutrienti ai metodi molecolari e biochimici per lo studio di strutture e funzioni delle comunità microbiche e alle ricerche sulla composizione isotopica di carbonio, azoto e ossigeno nei diversi comparti del sistema mare; dall'impiego di tecniche microscopiche e colturali per il riconoscimento di forme del fitoplancton e dello zooplancton alla sperimentazione di metodi per la stima di biomassa e produzione di queste biocenosi; dalle indagini sulle biotossine vegetali a quelle sull'identificazione delle forme di resistenza del plancton fino all'attenzione riservata alle fioriture di zooplancton gelatinoso e al loro impatto sui flussi energetici e sui cicli biogeochimici nel sistema pelagico.

Lo sviluppo di questi nuovi capitoli dell'ecologia del plancton è frutto di un percorso virtuoso di piena internazionalizzazione degli standard nazionali di ricerca in un settore fondamentale delle scienze del mare. Quel percorso è stato sostenuto in primo luogo dall'originalità e innovatività dei contributi scientifici in gran parte espressi dagli stessi gruppi di studiosi cui è stata affidata la redazione dei capitoli di questa nuova edizione del Manuale. D'altra parte, la dilatazione dei campi specialistici di ricerca non ha prodotto

frazionamento e frammentarietà, ma si è dispiegata coesivamente sulla base di un riferimento saldo e condiviso ad un approccio ecosistemico allo studio del mare. Un riscontro operativo di questa evoluzione può essere colto proprio dalla diffusa contaminazione dei gruppi, di diversa collocazione nel sistema nazionale della ricerca sul mare (dipartimenti delle Università, istituti del CNR, Stazione Zoologica, senza dimenticare per altro il ruolo di giovani bravissimi e precari), che sono stati implicati nella laboriosa stesura dei capitoli del Manuale.

Oggi la scuola planctologica italiana è chiaramente attestata su un alto livello di qualità della produzione scientifica ed esprime competenze decisive, che possono concorrere ad arricchire le conoscenze di base sui nostri mari e, nel contempo, proporsi come supporto decisivo per azioni di conservazione e ripristino dell'integrità degli ecosistemi marini (anche attraverso la formazione di personale qualificato con compiti di sorveglianza ambientale). Ma a questa straordinaria potenzialità di risorse tecniche e professionali, fa riscontro un quadro ancora insoddisfacente sul fronte delle risorse disponibili per sostenere la ricerca in mare, come su quello delle strategie e politiche di conservazione. Si deve riproporre oggi, con un po' di malinconia in più, la stessa constatazione che, nel corso degli anni ottanta, sollecitò l'allora Comitato Plancton della Società di Biologia Marina a lanciare l'idea ambiziosa di un "Progetto Plancton", un piano nazionale di ricerca per lo studio della distribuzione delle comunità planctoniche nei nostri mari, "per la maggior parte della loro estensione mai indagati". Da quell'idea partì l'iniziativa del libro di *Nova Thalassia*.

Le competenze planctologiche non sono adeguatamente valorizzate neppure sui temi della conservazione. La realizzazione delle aree marine protette così come l'istituzione di siti marini di importanza comunitaria rappresentano esperienze certamente valide: i risultati ottenuti appaiono talora significativi in termini di tutela e promozione della biodiversità, oltre che di sperimentazione di percorsi di gestione sostenibile della fascia costiera. Ma i piani di gestione e monitoraggio e i progetti di ricerca attivati in queste aree sono prevalentemente focalizzati sulla protezione di specie di habitat bentonici e sull'ittiofauna; minima è l'attenzione per lo più riservata al ruolo ecologico determinante della continuità di connessioni tra sedimento e colonna d'acqua, tra comparto bentonico e comparto planctonico. Comincia ad essere da più parti percepita anche l'importanza di istituire aree marine protette al largo: si pensa ad un *network* di aree protette che connetta la fascia costiera al sistema oceanico con attenzione prioritaria alla scala spaziale vasta delle rotte migratorie di pesci, rettili, uccelli e mammiferi. L'interlocazione prioritaria che si cerca è quella con i portatori di interessi consistenti: i governi, le regioni, i mondi della pesca, della navigazione, del turismo.

Gli oggetti (e i processi) su cui si concentra la ricerca di oceanografi, ecologi marini e studiosi del plancton sembrano restare ancora sotto la soglia di visibilità dei decisori e del grande pubblico. Rispetto a questo quadro poco confortante, assumono forte rilievo culturale, politico e normativo le finalità e le indicazioni operative della "Marine Strategy Framework Directive" 2008/58/EC. La Direttiva è strutturata su un esplicito approccio ecosistemico: gli obiettivi di una gestione integrata ed ecocompatibile sono vincolati alla conservazione della biodiversità e alla preservazione dei beni e servizi resi dagli ecosistemi; e, in definitiva, ad una espansione e qualificazione delle conoscenze sulle funzioni ecologiche e sulle dinamiche ambientali, che consentano valutazioni dello stato ecologico e della sua evoluzione. Nei sistemi costieri e nei sistemi pelagici si apre un orizzonte inedito per lo sviluppo di ricerche planctologiche. Gli autori dei capitoli di questo bel Manuale (e i loro allievi) potranno diventare protagonisti di una nuova e buona stagione di ricerche in mare e sul mare. Forse sta arrivando il momento di ripescare e rilanciare il "Progetto Plancton" dei mari italiani pensato poco meno di trent'anni fa.

(*) Vedi: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera D'Alcalà M. (1990): Metodi nell'ecologia del plancton marino. *Nova Thalassia*, vol. 11:372 pp.. Le istituzioni ne possono reperire copia gratuita chiedendo a mcabrini@inogs.it

CAPITOLO 2. TEMPERATURA, SALINITÀ E DENSITÀ

S. Sparnocchia, R. Nair, A. Russo, M. Ribera d'Alcalà

stefania.sparnocchia@ts.ismar.cnr.it

2.1 INTRODUZIONE

In questo capitolo ci occupiamo della misura dei parametri che sono utili a caratterizzare lo stato fisico del sistema marino ed a studiare i processi che in questo avvengono. La temperatura e la salinità sono due variabili fondamentali che, assieme alla pressione, permettono di ricostruire attraverso algoritmi matematici altre proprietà fisiche importanti, la densità in primo luogo. Nel seguito presenteremo gli strumenti e i metodi più attuali e/o più in uso per la loro misura o calcolo, sviluppando ed ampliando quanto già descritto nel volume “Metodi nell’ecologia del plancton marino” (Innamorati *et al.*, 1990).

2.2 TEMPERATURA

La temperatura è la proprietà che regola il trasferimento di energia termica o calore tra due corpi: il flusso di calore è diretto dal corpo più caldo a quello più freddo fino al raggiungimento dell’equilibrio termico. Gli strumenti di misura della temperatura si basano su questo principio elementare. La temperatura, assieme alla salinità, è utile per identificare la massa d’acqua campionata e per calcolare, mediante un’equazione di stato, la densità ed altre grandezze derivate. Questo parametro ha inoltre effetti sui sistemi biologici e in generale sugli equilibri chimico-fisici nell’ambiente marino, fra i quali la solubilità dei gas (es. solubilità dell’ossigeno) ed il pH.

Prima del 1 gennaio 1990 la temperatura era espressa nella Scala Pratica Internazionale di Temperatura del 1968 (IPTS-68). Successivamente si è adottata la Scala Internazionale di Temperatura del 1990 (ITS-90) che rappresenta, attualmente, la migliore approssimazione della temperatura termodinamica (T). L’unità di misura è il Kelvin (K), ed 1 K è definito come una frazione di 1/273,16 della temperatura termodinamica del punto triplo dell’acqua (precisamente della Vienna Standard Mean Ocean Water, così chiamata nonostante non contenga sali o sostanze disciolte). In oceanografia la convenzione è quella di misurare la temperatura nella scala Celsius (t), la cui unità è °C e con $t = T - 273,15$.

La conversione tra la vecchia scala (t_{68}) e quella nuova (t_{90}) è data dalla formula (Saunders, 1990):

$$t_{68} = 1,00024 t_{90}.$$

2.2.1 Principio del metodo

In questo paragrafo presentiamo il metodo di misura della temperatura a profondità discrete lungo la colonna d’acqua basato sull’impiego di termometri a rovesciamento. Questo metodo è utile quando si vuole misurare la temperatura associata ad un campione d’acqua raccolto con bottiglie montate su un cavo d’acciaio, oppure quando si voglia verificare l’accuratezza del sensore di temperatura installato su una sonda multiparametrica. Per gli altri scopi si rimanda al paragrafo 3, dedicato alle misure con sensori montati su sonde multiparametriche.

I termometri a rovesciamento sono di due tipi, a mercurio o elettronici digitali. Le prestazioni dei due tipi di termometro sono simili, ma quelli digitali sono più facili da usare e da calibrare, inoltre raggiungono l’equilibrio molto più velocemente di quelli a mercurio.

2.2.1.1 Termometri a rovesciamento a mercurio

I termometri a rovesciamento a mercurio constano di un termometro principale e di un termometro secondario, accoppiati in un contenitore di vetro che li protegge dalle modifiche meccaniche indotte dalla pressione dell'acqua. Il termometro principale ha un serbatoio di mercurio relativamente grande che comunica, per mezzo di una serpentina strozzata in un punto (chiamato "punto di rottura") con un sottile capillare terminante con un piccolo slargamento che costituisce un serbatoio secondario. Quando il termometro è in posizione dritta, alla profondità voluta, il mercurio contenuto nel serbatoio principale cambia volume in base alla temperatura esterna e occupa parte del capillare sottile. Quando il termometro viene rovesciato, a causa della notevole tensione superficiale, il mercurio contenuto nel capillare si spezza nella serpentina all'altezza della strozzatura, e si separa dal resto. La quantità di mercurio che si è separata, raccolta nel serbatoio secondario e in parte del capillare, indica la temperatura dell'acqua al momento del rovesciamento. Il termometro ausiliario, montato a fianco del termometro a rovesciamento, serve a misurare la temperatura dell'ambiente, una volta riportato il termometro in superficie.

Sono disponibili anche termometri a mercurio privi della protezione in vetro. Questi termometri non protetti, che risentono della compressione del bulbo da parte dell'acqua, utilizzati insieme ai termometri protetti permettono di calcolare la profondità alla quale è stata effettuata la misura. In questo caso la dilatazione finale del mercurio comprende anche una dilatazione apparente dovuta al restringimento del vetro per la pressione dell'acqua. Questa dilatazione apparente, misurabile in volumi equivalenti a gradi centigradi, operate le dovute correzioni e conoscendo il coefficiente di compressibilità del vetro, confrontata con la temperatura misurata dai termometri protetti, permette di risalire alla pressione e quindi alla profondità di campionamento.

2.2.1.2 Termometri a rovesciamento elettronici digitali

Ai termometri a mercurio è ora affiancato il termometro elettronico digitale a rovesciamento, uno strumento in grado di svolgere le stesse funzioni, ma con precisione superiore, e avente le stesse dimensioni di quello a mercurio (quindi entra negli alloggiamenti predisposti per questo tipo di termometro). In questo caso la misura di temperatura è effettuata da un termometro al platino simile ai sensori utilizzati sulle sonde CTD. I vantaggi offerti da questo strumento sono che non usa il mercurio, copre un intervallo di misura più ampio, la lettura è più facile (perché fornita in forma digitale), riduce il rischio di perdita dei dati, è robusto e facile da usare.

2.2.2 Operazioni in mare

2.2.2.1 Attrezzatura

- Termometri a rovesciamento a mercurio o digitali.
- Oculare ingranditore per la lettura dei termometri a mercurio.

2.2.2.2 Procedura per i termometri a rovesciamento a mercurio

- Alloggiare i termometri negli appositi porta termometri di cui sono dotate le bottiglie di campionamento. Nei porta termometri sprovvisti di meccanismo di fermo, i termometri dovranno essere bloccati utilizzando cilindretti di gomma para o neoprene, di solito forniti con i porta termometri, che ammortizzano eventuali shock meccanici.
- Tenere le bottiglie con i termometri alle profondità programmate per il tempo necessario al raggiungimento dell'equilibrio con il mezzo circostante. Per i termometri a mercurio il tempo necessario è 5-10 minuti. Quindi innescare il rovesciamento.
- Riportare in superficie le bottiglie e porle su un apposito supporto, facendo attenzione che non

vengano direttamente colpite dal sole, coprendole eventualmente con un telo bagnato per evitare ampie oscillazioni della temperatura.

- Una volta garantito l'equilibrio tra la temperatura dei termometri e quella ambientale, utilizzando l'apposito oculare, effettuare la lettura della temperatura dell'acqua sul termometro principale (t'') con una precisione al centesimo di grado o superiore in relazione alle caratteristiche della scala. In modo analogo, sul termometro ausiliario, effettuare la lettura della temperatura dell'aria (t'_a) con una precisione al decimo di grado. Fare attenzione che l'occhio sia a livello con la parte alta della colonna di mercurio, per evitare errori dovuti alla rifrazione.
- Trascrivere i dati su di un apposito foglio, riportando per ogni termometro il numero di serie che lo identifica.

2.2.2.3 Procedura per i termometri a rovesciamento elettronici digitali

- Alloggiare i termometri negli appositi porta termometri di cui sono dotate le bottiglie di campionamento. Nei porta termometri sprovvisti di meccanismo di fermo, i termometri dovranno essere bloccati utilizzando cilindretti di gomma para o neoprene, di solito forniti con i porta termometri, che ammortizzano eventuali shock meccanici.
- Con il porta-termometri armato, far scorrere un magnetino (in dotazione con il termometro o comune) per tre volte seguendo l'asse maggiore del termometro, finché sul display non compare la scritta "Samp"; in questo modo il termometro viene impostato in modalità rovesciamento. Per informazione, la modalità "Cont" serve a visualizzare la temperatura istantanea misurata in tempo reale dal termometro, mentre la modalità "Hold" visualizza il dato di temperatura registrato al momento del rovesciamento del termometro, mentre si trovava in modalità "Samp".
- Tenere le bottiglie con i termometri alle profondità programmate per il tempo necessario al raggiungimento dell'equilibrio con il mezzo circostante. Per i termometri digitali il tempo necessario è circa 30 secondi. Quindi inviare il comando di chiusura della bottiglia e di rovesciamento del termometro, e attendere almeno dieci secondi dopo il segnale di conferma chiusura prima di cambiare profondità o di recuperare la bottiglia.
- Una volta riportate in superficie le bottiglie, facendo scorrere una volta sola il magnetino lungo l'asse maggiore del termometro, comparirà sul display per alcuni secondi il valore di temperatura registrato dal termometro durante il rovesciamento.
- Trascrivere i dati su di un apposito foglio, riportando per ogni termometro il numero di serie che lo identifica.

2.2.2.4 Raccomandazioni

- Tutti i termometri a rovesciamento, indipendentemente dal tipo, devono essere calibrati con un termometro di riferimento almeno una volta l'anno. I termometri di riferimento devono a loro volta essere opportunamente calibrati. La calibrazione deve avvenire in bagni termostatati (vedi la sezione "Taratura dei sensori" alla fine del paragrafo 3).
- I termometri a mercurio vanno trattati con delicatezza, evitando colpi netti che possono causare microfratture nel capillare compromettendone il funzionamento; i termometri elettronici digitali sono meno delicati, ma come tutta la strumentazione elettronica vanno comunque trattati con attenzione.
- Nei termometri a mercurio, se il mercurio non torna nel serbatoio, evitare la pratica comune di percuotere delicatamente il termometro, perché ciò provoca piccole lesioni nel capillare. Il riconiungimento deve essere prodotto forzando la dilatazione del mercurio con una sorgente di calore.
- Il principale malfunzionamento a cui possono andare incontro i termometri a mercurio riguarda la possibilità che durante il rovesciamento il mercurio contenuto nel capillare si spezzi ad un'altezza diversa dal "punto di rottura". Ciò può succedere per la presenza di bolle formate da gas residuo

rimasto all'interno del termometro durante la costruzione. Questo gas dovrebbe rimanere confinato all'estremità superiore del termometro, in corrispondenza del serbatoio secondario, ma può succedere che una bolla penetri la colonna di mercurio, causandone la rottura nel punto sbagliato. Per evitare il problema bisogna conservare e trasportare i termometri in posizione verticale (con il serbatoio principale verso il basso) e maneggiarli delicatamente.

2.2.3 Operazioni in laboratorio

2.2.3.1 Calcoli per i termometri a mercurio protetti

- Correggere la lettura fornita dal termometro dall'errore causato dalle imperfezioni del capillare procedendo come indicato nel certificato di calibrazione che accompagna il termometro. Questo certificato può riportare, per intervalli di temperatura di 5 °C in 5 °C, la correzione da apportare al valore letto sul termometro per ottenere il valore di temperatura reale, oppure il valore della temperatura reale in corrispondenza di un dato valore di temperatura letto. Il valore di temperatura letto sul termometro probabilmente non coinciderà esattamente con quelli indicati nel certificato, pertanto bisogna prima di tutto calcolare la correzione da apportare a questo valore applicando una semplice relazione lineare tra valori letti e valori reali. Individuare nelle tabelle del costruttore i valori t''_{inf} e t''_{sup} entro cui è compresa la lettura (t'') e i corrispondenti valori corretti t'_{inf} e t'_{sup} , quindi ricavare le temperature corrette per il termometro principale t' e per quello ausiliario t'_a dalle formule seguenti:

$$t' = t'_{inf} + (t'' - t''_{inf}) \cdot (t'_{sup} - t'_{inf}) / (t''_{sup} - t''_{inf})$$

$$t'_a = t'_{a,inf} + (t''_a - t''_{a,inf}) \cdot (t'_{a,sup} - t'_{a,inf}) / (t''_{a,sup} - t''_{a,inf})$$

Introdurre quindi t' e t'_a nella formula seguente:

$$c = (V_o + t') / (t' - t'_a) / [K - 1/2 (t' - t'_a) - (V_o + t')]$$

dove :

c = correzione da apportare,

K = inverso del coefficiente di dilatazione termica del vetro con cui è costruito il termometro.

V_o = volume di mercurio a 0°C.

I valori di K e V_o si ricavano dal certificato di calibrazione.

Ricavare la temperatura dell'acqua in situ dalla formula:

$$t_w = t' + c$$

2.2.3.2 Calcoli per i termometri a mercurio non protetti

Ricavare la correzione da apportare alla lettura in superficie secondo la formula:

$$c_u = (t'_u + V_{0,u}) \cdot (t_w - t'_{a,u}) / [K - 1/2 (t_w - t'_{a,u})]$$

dove:

t'_u = temperatura del termometro principale corretta secondo la procedura sopra indicata per t' ,

$t'_{a,u}$ = temperatura del termometro ausiliario corretta secondo la procedura sopra indicata per t'_a ,

$V_{0,u}$ = volume di mercurio a 0°C del termometro non protetto.

t_w = temperatura *in situ* ottenuta dalla lettura corretta del termometro protetto.

Calcolare la temperatura apparente del termometro non protetto applicando la formula:

$$t_u = t'_u + c_u$$

Ricavare la profondità di campionamento applicando la formula:

$$z = (t_u - t_w) / \rho_m Q_m$$

dove:

ρ_m = densità media della colonna d'acqua,

Q_m = coefficiente di compressibilità del vetro (di solito misurato in °C cm² kg⁻¹) ovvero l'aumento in gradi della temperatura apparente prodotto da una pressione di 1 kg cm⁻².

2.3 SALINITÀ

La salinità è una misura del contenuto di materiali disciolti nell'acqua di mare. Assieme alla temperatura è un parametro di importanza fondamentale per l'identificazione della massa d'acqua campionata e per calcolare la densità (mediante un'equazione di stato) ed altre grandezze derivate. Condiziona altri parametri come l'ossigeno disciolto e ha effetti su molti processi e sistemi biologici e chimici nell'ambiente marino.

Si definisce salinità assoluta, e la si indica con S_A il rapporto tra la massa totale dei materiali disciolti nell'acqua di mare e la massa complessiva dell'acqua. La salinità assoluta è molto difficile se non impossibile da misurare direttamente, perché sarebbe necessario conoscere completamente la composizione dell'acqua di mare. Pertanto, nella pratica, se ne dà una definizione approssimata, la cui misura sia più facilmente realizzabile.

La prima definizione pratica di salinità è quella data nel 1899 dalla Commissione Internazionale per lo studio degli oceani guidata dal Prof. Martin Knudsen che stabiliva che la salinità è la massa residua di sale (misurata in grammi) per chilogrammo di acqua di mare, quando tutti i carbonati siano stati trasformati in ossidi, i bromuri e gli ioduri sostituiti dai cloruri e tutta la sostanza organica sia stata ossidata (Forch *et al.*, 1902). Anche la determinazione della salinità secondo questa definizione, è difficile da applicare nella pratica e non può costituire un metodo di routine. Poiché i vari componenti contribuiscono alla salinità secondo un rapporto praticamente costante e il componente principale, il cloruro, è facile da misurare accuratamente mediante una semplice analisi chimica (titolazione), per lungo tempo si è determinata la salinità dell'acqua marina in modo indiretto misurando la massa dei cloruri disciolti nell'acqua ed utilizzando relazioni empiriche (Forch *et al.*, 1902; Wooster *et al.*, 1969).

La definizione di salinità è stata rivista quando fu sviluppata una tecnica per poterla determinare dalle misure di conducibilità dell'acqua. Nel 1978, il JPOTS (UNESCO, 1981a) introdusse la Scala Pratica della Salinità (PSS-78), che definisce la salinità pratica in funzione del rapporto K_{15} fra la conducibilità elettrica di un campione di acqua di mare a temperatura $t_{68}=15$ °C (definita nella scala di temperatura IPTS-68) e alla pressione di un'atmosfera standard (101325 Pa nel SI, corrispondenti a 1013,15 millibar), e quella di una soluzione di cloruro di potassio (KCl), in cui la frazione molare di KCl è 0,0324356, alle stesse condizioni di temperatura e pressione. A $K_{15} = 1$ corrisponde una salinità pratica pari a 35.

È bene sapere che a 15 °C, la soluzione standard di KCl succitata ha una conducibilità elettrica che è equivalente a quella di un campione di acqua marina del Nord Atlantico con clorinità di 19,3740 alla stessa temperatura. Questo fatto garantisce:

-
- una certa continuità tra le misure di salinità nella Scala Pratica e quelle precedenti, che in gran parte si basavano appunto sulla misura della clorinità;
 - l'utilizzo dell'acqua di mare con $K_{15} \gg 1$ come uno standard secondario per la taratura di routine degli strumenti per la misura della salinità.

La salinità pratica è una grandezza adimensionale, il cui ordine di grandezza coincide con quello della definizione di Knudsen. Sebbene sia una pratica adottata, tecnicamente è sbagliato usare l'abbreviazione "psu" (practical salinity units), e questa pratica dovrebbe essere assolutamente evitata. Questa grandezza entra in tutti gli algoritmi che sono attualmente in uso per il calcolo delle proprietà termodinamiche dell'acqua marina (UNESCO, 1983) ed è anche quella che viene archiviata nelle banche dati.

Recentemente Millero *et al.* (2008) hanno proposto una nuova definizione, introducendo la salinità di riferimento, definita come la salinità di una soluzione artificiale di acqua marina avente una precisa Composizione di Riferimento secondo lo standard IAPSO e i pesi atomici di IUPAC 2005. Questa grandezza è la migliore stima attualmente disponibile della salinità assoluta ed ha il pregio di essere una grandezza definita nel Sistema Internazionale di misura, quindi è di più facile comprensione al di fuori della comunità oceanografica. Alla data odierna la salinità di riferimento è utilizzata solamente come passaggio intermedio nella stima della salinità assoluta. La salinità pratica continua ad essere il parametro memorizzato negli archivi di dati, e una delle variabili utilizzate per il calcolo delle proprietà termodinamiche dell'acqua marina secondo l'UNESCO (1983).

2.3.1 Principio del metodo

La misura della salinità pratica di un campione di acqua marina si ottiene impiegando i salinometri. Questi sono apparecchi che misurano il rapporto tra la conducibilità di un campione di acqua marina e quello di uno standard di riferimento. Le caratteristiche generali dei salinometri e le procedure da seguire per la loro manutenzione sono descritte nei manuali degli strumenti e possono variare a seconda del costruttore. Lo stesso vale per i principi da seguire per effettuare la misura. In ogni caso, si tratta di determinare la conducibilità del campione, che agisce come conduttore di seconda specie, in un circuito elettrico. Nei salinometri la conducibilità del campione viene comparata indirettamente o direttamente con quella di un'acqua a salinità nota e certificata, detta "acqua standard".

2.3.2 Operazioni in mare

2.3.2.1 Attrezzatura

- Bottiglie Niskin disposte su cavo o su un campionatore multiplo (Rosette).
- Bottiglie di vetro con tappo a tenuta perfetta da 120-250 ml (il volume necessario dipende dal salinometro in uso). Per evitare perdite ed evaporazione, si consiglia l'uso di bottiglie in vetro con tappo e sottotappo.

2.3.2.2 Procedura di campionamento

- Avvinare accuratamente (almeno tre volte) la bottiglia entro la quale si intende conservare il campione, adoperando la stessa acqua del campione.
- Riempire la bottiglia fino alla base del collo, lasciando così lo spazio sufficiente per l'eventuale espansione termica dell'acqua.
- Sciacquare accuratamente ed asciugare bene il tappo, la zona di avvitamento e il collo della bottiglia per evitare la formazione di cristalli di sale che potrebbero precipitare e disciogliersi nel campione al momento della riapertura in laboratorio.

-
- Serrare bene tappo e sottotappo per evitare evaporazione tra il momento della raccolta e l'analisi in laboratorio.

2.3.2.3 Conservazione dei campioni

Per ottenere risultati migliori sarebbe bene analizzare i campioni prima possibile e comunque quando la loro temperatura è in equilibrio con quella del laboratorio. L'equilibrio termico tipicamente viene raggiunto in 4-5 ore, ma può essere accelerato garantendo un buon flusso d'aria attorno alle bottiglie o immergendole in un bagno di acqua (Stalcup, 1991). Tuttavia, se mantenuti a temperatura ambiente in bottiglie ben tappate, i campioni si conservano inalterati per qualche settimana, a meno delle variazioni di conducibilità dovute a modifiche del pH, che possono causare variazioni del valore della salinità anche alla seconda cifra decimale (Grasshoff, 1983). La tenuta e l'inerzia chimica delle bottiglie sono fattori determinanti per una buona conservazione dei campioni.

2.3.2.4 Raccomandazioni

- È consigliabile annotare sulla bottiglia che raccoglie il campione il numero della posizione della bottiglia Niskin sul campionatore. Questo sarà di aiuto nella fase di campionamento e minimizzerà la possibilità di raccogliere il campione sulla Niskin sbagliata.
- Durante la raccolta del campione, per evitarne la contaminazione, prestare attenzione all'acqua di superficie che sgocciola dalle parti esterne del campionatore. La stessa cura va prestata in caso di pioggia.
- Cambiare i sottotappi ogni 2-3 anni o quando si manifestano deformazioni.

2.3.3 Operazioni in laboratorio

2.3.3.1 Attrezzatura

- Un salinometro da laboratorio;
- bottiglie di acqua standard IAPSO.

2.3.3.2 Procedura analitica generale

Preparazione

- Accendere il salinometro con largo anticipo (almeno due ore prima dell'analisi), per stabilizzare il funzionamento delle sue parti elettriche e, quando presente, la temperatura del bagno termostatico.
- Portare due bottiglie di acqua standard ed i campioni nelle vicinanze del salinometro con cui si effettua la misura e lasciar trascorrere un certo periodo di tempo affinché raggiungano la stessa temperatura.

Standardizzazione

- Sciacquare almeno dieci volte la cella di misura con acqua di mare di salinità di circa 35. Esistono in commercio bottiglie di acqua con queste caratteristiche, in alternativa si possono usare i residui di acqua standard usati in operazioni precedenti.
- Agitare accuratamente e dolcemente le bottiglie di acqua standard per omogeneizzarne il contenuto, evitando la formazione di bolle.
- Aprire la bottiglia di acqua standard e inserirla nel dispositivo di campionamento del salinometro.
- Sciacquare almeno quattro o cinque volte la cella di misura con acqua standard.

- Riempire la cella di misura con acqua standard e standardizzare il salinometro secondo la procedura indicata dalla casa costruttrice dello stesso.
- Effettuare almeno due o tre misure della stessa acqua standard, scaricando e riempiendo la cella ogni volta e verificando che il valore della salinità letta dopo la standardizzazione, coincida con il valore di salinità indicata sulla bottiglia dello standard. Se il valore non coincide, ripetere la procedura di standardizzazione con una nuova bottiglia di acqua standard.

Misura

- Omogeneizzare il campione con ripetuti capovolgimenti della bottiglia, ma senza un'agitazione troppo vigorosa per evitare la formazione di bolle d'aria.
- Sciacquare almeno quattro o cinque volte la cella di misura con il campione.
- Riempire la cella di misura con il campione ed effettuare la lettura.
- Scaricare e riempire la cella di misura con il campione ed effettuare una nuova lettura.
- Ripetere l'operazione di cui al punto precedente fino a che lo scarto tra due letture consecutive non sia inferiore al livello di precisione dichiarato dalla casa costruttrice dello strumento.

2.3.3.3 Calcoli

Determinato il rapporto di conducibilità, R_t , tra il campione e l'acqua standard alla temperatura t_{68} (espressa nella scala IPTS-68), si procede al calcolo della salinità pratica secondo la seguente relazione, valida nell'intervallo $2 \leq S \leq 42$ (UNESCO, 1983):

$$S = a_0 + a_1 R_t^{1/2} + a_2 R_t + a_3 R_t^{3/2} + a_4 R_t^2 + a_5 R_t^{5/2} + \Delta S$$

dove:

$$\Delta S = (b_0 + b_1 R_t^{1/2} + b_2 R_t + b_3 R_t^{3/2} + b_4 R_t^2 + b_5 R_t^{5/2}) \cdot (t_{68} - 15) / [1 + k(t_{68} - 15)]$$

t_{68} è espresso in °C. Se si dispone della temperatura nella scala ITS-90 è necessario calcolare t_{68} mediante la formula di conversione, $t_{68} = 1,00024 t_{90}$.

Le costanti hanno i valori sotto elencati:

a_0	=	0,0080	b_0	=	0,0005	k	=	0,0162
a_1	=	-0,1692	b_1	=	-0,0056			
a_2	=	25,3851	b_2	=	-0,0066			
a_3	=	14,0941	b_3	=	-0,0375			
a_4	=	-7,0261	b_4	=	0,0636			
a_5	=	2,7081	b_5	=	-0,0144			

2.3.3.4 Raccomandazioni

- A seconda del salinometro in uso per la misura, la procedura indicata può necessitare di qualche modifica. Si raccomanda di verificarla, seguendo quanto indicato nel manuale di istruzioni dello strumento.
- Evitare la formazione di bolle d'aria nel campione durante le operazioni di travaso o mescolamento del campione stesso. Qualora si verifichi questa evenienza, svuotare e riempire di nuovo la cella.
- In presenza di depositi e/o bolle d'aria sui componenti interni della cella di misura durante l'uso, evitare i tentativi di lavaggio pompando nella cella acqua saponata o soluzioni debolmente acide, perché oltre alla possibilità di risultare inefficaci nel risolvere il problema, possono avere un effetto

negativo sulla taratura di fabbrica e sulla standardizzazione dello strumento. La cosa migliore da fare è risciacquare ripetutamente la cella con acqua deionizzata. Se il problema dovesse persistere, si può rimuovere la cella con attenzione, smontarla e procedere alla pulizia come è indicato dal manuale di istruzioni dello strumento.

- Per mantenere sotto controllo la stabilità dell'elettronica dell'apparato di misura, si consiglia di ripetere la procedura di standardizzazione almeno una volta al giorno. Se si notano variazioni nei valori di standardizzazione è opportuno verificare la qualità della bottiglia di acqua standard in uso ripetendo l'operazione con una nuova bottiglia. Se si continuano a notare variazioni, può essere che il salinometro necessiti di manutenzione e vada inviato alla casa madre.
- Limitare al minimo l'esposizione all'aria dell'acqua standard.
- Per ogni campione, limitare al minimo necessario il tempo impiegato per ottenere una misura valida e limitare il numero di letture, evitando che il volume impiegato scenda al di sotto del minimo necessario per l'analisi.
- Si consiglia di usare per una stessa campagna bottiglie di acqua standard provenienti dallo stesso lotto, in caso contrario è necessario tenere conto delle differenze tra lotti descritte, per esempio, da Mantyla (1987) per correggere le salinità finali. Inoltre, se le bottiglie sono più vecchie di due o tre anni è bene confrontarle con standard più freschi per evidenziare eventuali variazioni di conducibilità dovute all'invecchiamento.

2.3.4 Altri metodi

La determinazione della salinità, così come definita dalla IAPSO, può essere effettuata esclusivamente con il metodo esposto, che è l'unico a consentire la determinazione corretta del rapporto di conducibilità e quindi un corretto uso dell'equazione di stato. I salinometri attuali riescono a misurare la salinità con un'accuratezza di $\pm 0,003$, ma se il campionamento e la conservazione dei campioni vengono fatti in modo corretto, e soprattutto se la temperatura del laboratorio e del campione vengono tenute ben controllate, si può ottenere un'accuratezza anche migliore di $\pm 0,001$.

Per misurare la conducibilità, si possono anche utilizzare dei semplici conduttimetri, misurando contemporaneamente la temperatura del campione. In questo caso la precisione finale del valore di salinità, che sarà comunque più bassa di quella che si può ottenere con un salinometro, dipenderà anche dalla precisione del dato di temperatura. Inoltre, sarà necessaria una serie di calcoli per ottenere il valore di conducibilità riferito ad una temperatura di 15 °C, come indicato in UNESCO (1981b).

Un metodo non conduttimetrico è quello che passa attraverso la misura della clorinità con il metodo volumetrico classico (Grasshoff, 1983) e che consente di ottenere un valore di salinità molto vicino a quello della salinità pratica ($\pm 0,02$, vedi Mamayev, 1986). Questa grandezza però non è linearmente correlabile con quella ricavata dal rapporto di conducibilità, oltre ad avere un errore intrinseco di un ordine di grandezza superiore, pertanto questo metodo è da sconsigliare.

Un altro metodo non conduttimetrico per ottenere i valori di salinità si basa sull'indice di rifrazione. In questo caso si sfrutta il fatto che l'indice di rifrazione (n) dell'acqua di mare cambia con la temperatura e la salinità (e con la lunghezza d'onda della sorgente di luce), per cui si possono ottenere stime della salinità *in situ* a partire da misure di temperatura e di n . Per poter ottenere un'accuratezza di 0,01 sulla salinità, è necessario misurare n con accuratezza entro $20 \cdot 10^{-7}$ e mantenere stabile la temperatura entro $\pm 0,005$ °C. Esistono rifrattometri in grado di misurare n fino a $100 \cdot 10^{-7}$, ottenendo una precisione sulla salinità di 0,06. I rifrattometri portatili sono semplici e facili da usare, ma non consentono di ottenere misure di salinità con incertezze migliori di $\pm 0,2$; pertanto questi strumenti sono molto pratici per avere indicazioni di massima sulla salinità in area costiera, ma non sono utilizzabili per scopi scientifici. Per migliorare la sensibilità, si è ricorso a metodi di interferenza che possono fornire una precisione in n pari a $5 \cdot 10^{-7}$ corrispondente a $\pm 0,003$ in salinità. Questa è una tecnica comparativa, quindi richiede un campione di acqua di riferimento, ma ha il vantaggio di non richiedere la conoscenza esatta della tem-

peratura (assicurato che i due campioni di acqua, quello da misurare e quello di riferimento, siano stati mantenuti per un tempo sufficiente alla stessa temperatura ambiente).

2.4 PRESSIONE, TEMPERATURA E SALINITÀ (SONDE CTD)

2.4.1 Principio del metodo

Il metodo che presentiamo in questo paragrafo impiega sonde multiparametriche ed è l'unico che permette la misura simultanea ed *in situ* della temperatura, della salinità, della pressione e di eventuali altri parametri bio-chimici di interesse.

Le sonde multiparametriche per misure oceanografiche sono in uso dalla metà del secolo scorso. Sono costituite da un'unità centrale che incorpora e gestisce i sensori che misurano le grandezze di interesse. Le sonde per la misura dei parametri fisici in mare vengono comunemente chiamate CTD, un acronimo che sintetizza i tre parametri fisici fondamentali misurati (C=Conductivity, T=Temperature, D=Depth, ossia conducibilità, temperatura e profondità). In realtà, le sonde CTD non misurano la profondità direttamente, ma forniscono una sua misura indiretta rilevando la pressione. Le sonde CTD hanno un duplice uso, come profilatori, quando vengono fatte scendere lungo la colonna d'acqua dalla superficie al fondo o ad una profondità intermedia desiderata, o come strumenti di campionamento a punto fisso (come avviene quando esse sono installate su una boa o su un ancoraggio strumentato). Nel primo caso la misura è un profilo verticale dei parametri, nel secondo caso è una serie temporale in un preciso punto dello spazio. La risoluzione verticale del profilo e quella temporale dipendono dalla frequenza di campionamento dello strumento.

Per controllare il corretto funzionamento di un sistema CTD durante una campagna oceanografica, è utile effettuare confronti raccogliendo campioni d'acqua con un campionatore collegato al sistema, da sottoporre ad analisi con un salinometro ed effettuando misure di temperatura utilizzando termometri a rovesciamento montati sulle bottiglie del campionatore. I valori di pressione misurati dal sensore del sistema CTD, possono essere confrontati con quelli forniti da un sensore di pressione indipendente.

2.4.2 Operazioni in mare

2.4.2.1 Attrezzatura

- Un sistema CTD dotato di sensori per la misura di temperatura, conducibilità e pressione.
- Termometri a rovesciamento.
- Sistema di campionamento per la raccolta di campioni d'acqua.

2.4.2.2 Procedura di misura

La procedura di misura che suggeriamo è ispirata ai protocolli in uso presso la comunità scientifica internazionale (WOCE, 1991; UNESCO, 1988, 1994).

- Portare il sistema di misura (CTD e Rosette) a qualche metro sotto la superficie ed attendere la stabilizzazione dei sensori prima di avviare la misura (almeno un paio di minuti). In sistemi di misura dotati di pompa per il flusso d'acqua ai sensori, questa operazione serve anche ad attivare la pompa.
- Riportare il sistema in prossimità della superficie ed avviare la misura. Se il mare è molto mosso, si raccomanda di restare qualche metro sotto la superficie per evitare i disturbi causati dalla rottura delle onde (es. bolle entro la cella di conducibilità).

-
- Effettuare il profilo mantenendo una velocità di discesa costante e tra 40 cm/s e 120 cm/s.
 - Raccogliere durante il profilo di risalita i campioni d'acqua alle profondità selezionate. In questo modo si avrà un profilo CTD indisturbato durante la fase di discesa e campioni d'acqua senza rischio di contaminazioni nella fase di risalita. Se si chiudessero le bottiglie durante la discesa si rischierebbe contaminazione soprattutto dei campioni raccolti alla superficie, perché la discesa a profondità maggiori sottoporrebbe le bottiglie già chiuse a sforzi dovuti alla maggiore pressione tra ambiente esterno e acqua contenuta nelle bottiglie e possibili infiltrazioni attraverso tappi e guarnizioni. Inoltre l'esame in tempo reale del profilo dei parametri misurati durante la discesa permette di scegliere in maniera più opportuna le quote di campionamento (ad esempio la quota precisa del massimo profondo di clorofilla, se presente un fluorimetro come sensore ausiliario, oppure sulla base della distribuzione verticale delle diverse masse d'acqua).
 - Mentre si eseguono i passaggi precedenti, annotare sul diario della campagna le coordinate della stazione, la data e l'ora di misura, la profondità del fondo, la profondità massima raggiunta dal CTD e ogni altra informazione possa risultare utile nella fase di analisi (es. stato del mare, dati relativi a situazione meteorologica, etc.). Un esempio di documentazione è presentato in UNESCO (1988).

2.4.3 Operazioni in laboratorio

2.4.3.1 Controllo di qualità dei sensori

I sensori devono essere calibrati periodicamente presso il fornitore o in altri centri di calibrazione competenti. Uno di questi centri è il Centro di Taratura Oceanografico dell'Istituto Nazionale di Oceanografia e di Geofisica Sperimentale (INOGS) a Trieste (<http://www.inogs.it>).

Ad ogni modo, anche quando i sensori siano stati calibrati di recente presso una struttura specializzata, è opportuno verificarne il corretto funzionamento durante la campagna oceanografica.

Verificare il funzionamento del sensore di conducibilità del sistema CTD, confrontando le sue misure con quelle ottenute dall'analisi della salinità dei campioni d'acqua raccolti durante il profilo ed effettuate seguendo la procedura indicata nel paragrafo 2.1. Per far questo, trasformare in salinità le misure di conducibilità del sistema CTD e confrontare il valore ottenuto nel profilo di risalita con il corrispondente valore ottenuto dall'analisi del campione d'acqua. Se si osservano grosse differenze, soprattutto negli strati profondi, procedere alla correzione delle misure del CTD calcolando le correzioni necessarie. Per la procedura si veda per es. Emery e Thomson (2001) o Grasshoff *et al.* (1999).

- Verificare il funzionamento del sensore di temperatura del sistema CTD, confrontando le sue misure con quelle ottenute utilizzando termometri a rovesciamento. L'accuratezza e la stabilità dei termometri a rovesciamento sono generalmente inferiori di quelle del sensore di temperatura del sistema CTD, e quindi non sono sufficienti ad evidenziare piccole derive del sensore. Per questo motivo, l'unico metodo utile per correggere le derive del sensore sono le calibrazioni in laboratorio prima e dopo la campagna di misura (vedi sezione "Taratura dei sensori").
- Verificare il funzionamento del sensore di pressione con una misura indipendente effettuata con una seconda sonda, qualora sia disponibile, e prendere nota del valore di pressione misurato dal CTD in aria prima e dopo la calata.
- Documentare qualunque anomalia emerga dal confronto in modo da tracciare le possibili derive dei sensori.

Si raccomanda di effettuare i confronti utilizzando valori ottenuti dal campionamento e misura di masse d'acqua omogenee. Campionamenti nello strato superficiale, le cui proprietà mostrano una variabilità più elevata sia per i rilevanti gradienti verticali che per la maggiore turbolenza, non sono adatti a questa operazione.

2.4.3.2 *Trattamento dei dati*

Dalla misura di pressione, temperatura e conducibilità, la profondità e la salinità vengono calcolate utilizzando procedure internazionalmente accettate descritte in UNESCO (1988, 1994). Le sonde di misura dispongono normalmente di pacchetti software preparati dal costruttore utili alla trasformazione delle grandezze misurate in grandezze fisiche e al calcolo delle grandezze derivate secondo queste procedure internazionali.

2.4.4 **Taratura dei sensori**

Tarare un sensore di misura significa confrontare le sue misure con quelle di un riferimento campione noto, a sua volta tarato con altro riferimento in modo da costituire un'ininterrotta catena che faccia capo ai campioni primari della grandezza da misurare (riferibilità).

La taratura di un sensore di temperatura è effettuata in un bagno termostatico, confrontando su vari punti del "range" oceanografico prescelto la temperatura dello strumento in prova con quella rilevata dal sistema di riferimento. È importante scegliere il giusto "range" oceanografico sulla base dell'utilizzo che si farà della sonda, per esempio utilizzare in Atlantico o in area polare una sonda tarata per il Mediterraneo può ridurre l'accuratezza delle misure, e viceversa. Scegliere un "range" molto ampio, valido per praticamente tutte le situazioni (per esempio temperatura da -2 a 40 °C), comporterebbe ugualmente una riduzione dell'accuratezza nelle condizioni reali di utilizzo (causa scarso numero di punti di taratura ricadenti nel "range" reale). Il sistema di riferimento per la taratura della temperatura è formato da un termometro digitale di precisione (Resistance Bridge), da una Sonda Termometrica al Platino (Standard Platinum Resistance Thermometer - SPRT) e da una Resistenza Campione di Riferimento. La SPRT, a sua volta, deve essere tarata ai seguenti punti fissi sulla Scala Internazionale della Temperatura ITS-90: il Punto Triplo del Mercurio, (TPHg) = - 38,8344°C (facoltativo), il Punto Triplo dell'Acqua (TPW) = 0,01°C (obbligatorio), il Punto di Fusione del Gallio (MPGa) = 29,7646°C (obbligatorio).

La taratura di un sensore di conducibilità è effettuata in un bagno termostatico confrontando, su vari punti, la conducibilità rilevata dallo strumento in prova con quella di riferimento. La conducibilità di riferimento è calcolata con formule che utilizzano la temperatura e la salinità di campioni d'acqua prelevati dal bagno termostatico in corrispondenza di ogni punto di taratura (UNESCO, 1983). La salinità è ottenuta analizzando questi campioni con un salinometro da laboratorio a sua volta "standardizzato" con acqua di mare di riferimento – l'acqua standard IAPSO. Quest'ultima è prodotta e certificata da un unico produttore, l'OSIL in Gran Bretagna.

La taratura di un sensore di pressione è eseguita confrontando la pressione letta dal sistema in prova con quella di riferimento generata da una speciale bilancia idraulica. In pratica, la bilancia e il sensore di pressione sono collegati con un tubetto d'acciaio riempito di specifico fluido idraulico. Nella bilancia un pistone calibrato e un set di pesi rigorosamente certificati permettono di generare una serie di pressioni di riferimento.

Le apparecchiature CTD dovrebbero essere tarate e messe a punto ad intervalli prefissati o prima dell'uso ed in alcuni casi anche subito dopo (calibrazioni prima e dopo la campagna di misura). La procedura utilizzata per la taratura dovrebbe essere documentata, cioè riproducibile nelle medesime modalità e condizioni. La taratura dei CTD richiede ambienti predisposti per questo tipo di attività, strumentazione dedicata di altissima precisione e personale con un alto livello di professionalità ed esperienza. È quindi consigliabile farla fare alle ditte costruttrici o a laboratori riconosciuti.

Quando non è necessaria una taratura a livello metrologico, è comodo utilizzare per confronto, uno strumento multiparametrico di riferimento.

2.5 DENSITÀ

La densità di un fluido è data dal rapporto tra massa e volume. L'unità di misura è il kg m^{-3} . La densità di un campione di acqua di mare viene determinata utilizzando l'equazione di stato che stabilisce una relazione tra questo parametro e la pressione, la temperatura, la salinità pratica, la composizione isotopica e la concentrazione dei gas atmosferici disciolti. Esistono anche metodi diretti di misura della densità in laboratorio, che garantirebbero risultati migliori ad esempio in caso di acque con notevole presenza di materiale in sospensione, ma le difficoltà insite ne limitano fortemente l'utilizzo pratico.

La composizione isotopica dell'acqua di mare è praticamente costante. Per quanto riguarda i gas atmosferici disciolti, si fa riferimento ad un'acqua di mare avente una concentrazione di questi pari al valore di saturazione. In queste condizioni la densità dell'acqua di mare è funzione di tre sole grandezze di stato: salinità pratica, temperatura e pressione.

Già all'inizio del secolo Knudsen (Forch *et al.*, 1902) aveva ricavato la dipendenza funzionale del peso specifico dell'acqua di mare dalla temperatura e dalla salinità definita gravimetricamente alla pressione di un'atmosfera. Per porre in risalto le differenze di peso specifico al variare della salinità e della temperatura erano state introdotte due grandezze così definite:

$$\begin{aligned}\sigma_0 &= (s_0 - 1) \cdot 1000 \\ \sigma_t &= (s_t - 1) \cdot 1000\end{aligned}$$

dove:

s_0 = peso specifico dell'acqua di mare a 0°C , avendo come riferimento l'acqua distillata a 4°C ,
 s_t = peso specifico dell'acqua di mare alla temperatura considerata, avendo come riferimento l'acqua distillata a 4°C .

Le due grandezze, σ_0 e σ_t , definite come “grandezze eccesso” o “anomalie”, sono espresse da numeri dell'ordine di grandezza delle decine e quindi di più facile lettura rispetto al millesimo, al decimillesimo o grandezze ancora inferiori, che corrispondono alla variazione assoluta della densità. Per loro stessa definizione σ_0 e σ_t sono grandezze dimensionali.

Nel 1980, l'UNESCO (1981c), a seguito di un laborioso sforzo di risistemazione sulla base di nuove e più precise misure, nonché delle nuove definizioni di alcune grandezze di stato, ha proposto l'equazione di stato per l'acqua di mare nota come EOS-80, che è tuttora utilizzata. Essendo un'equazione di stato, essa mette in relazione la densità assoluta e l'anomalia di densità o densità eccesso (“excess density”) con le tre grandezze di stato: salinità pratica, temperatura e pressione, ovvero determina le caratteristiche della funzione generale $\rho = \rho(S,t,p)$.

La procedura seguita per la determinazione dei coefficienti numerici riportati nel seguito è esposta in UNESCO (1978, 1979, 1981c) e nella letteratura ivi citata. Schematicamente essa è consistita nell'esprimere la variazione di densità (o di volume specifico) rispetto al riferimento (acqua priva di sali alla pressione di un'atmosfera standard) in funzione della temperatura, della salinità pratica e del coefficiente di elasticità medio o integrale (“secant bulk modulus”) a sua volta espresso in funzione di salinità pratica, temperatura e pressione.

Il coefficiente di elasticità medio o integrale (che è l'inverso di un coefficiente di compressibilità) è definito dall'espressione:

$$K_t = p \cdot \alpha(S,t,0) / [\alpha(S,t,0) - \alpha(S,t,p)]$$

dove:

$\alpha(S,t,0)$ = volume specifico dell'acqua di mare alla pressione di riferimento (un'atmosfera standard);

$\alpha(S,t,p)$ = volume specifico dell'acqua di mare alla pressione p ;

S = salinità pratica;
p = pressione;
t = temperatura in °C.

Dall'espressione precedente si ricava

$$\alpha(S,t,p) = \alpha(S,t,0)/[1 - p/K_t]$$
$$\rho(S,t,p) = \rho(S,t,0)/[1 - p/K_t]$$

dove

$$\rho(S,t,p) = 1/\alpha(S,t,p) \text{ per definizione.}$$

Ciascuno dei fattori delle equazioni precedenti viene espresso in forma polinomiale in funzione delle grandezze misurabili S, t e p, per cui è possibile determinare tutte le grandezze di stato in funzione delle tre prescelte.

Sono stati definiti dei criteri rigidi per quanto riguarda le unità di misura e la simbologia da adoperare, che dovrebbero entrare nell'uso corrente in sostituzione delle vecchie unità.

Sulla base dell'equazione di stato EOS-80, delle definizioni adottate e del sistema di misura prescelto (SI) viene fortemente sconsigliato l'uso del peso specifico e delle grandezze derivate. Viene invece suggerito l'uso della densità (ρ), definita come massa/volume, e dell'anomalia di densità (γ), definita come differenza tra la densità del campione e la densità unitaria, ambedue espresse in unità SI (kg m^{-3}).

Nelle espressioni simboliche le dipendenze funzionali vanno evidenziate secondo quanto indicato dall'UNESCO (1985) e si ha quindi:

$$\rho = \rho(S,t,p) \text{ kg m}^{-3}$$
$$\gamma = \gamma(S,t,p) = \rho - 1000 \text{ kg m}^{-3}.$$

Entrambe le grandezze sono quindi dimensionali e vanno espresse in kg m^{-3} . Le unità di misura delle grandezze in parentesi sono unità di salinità pratica (che è adimensionale), gradi centigradi (°C) e megapascal (MPa).

Ovviamente, sulla base delle nuove grandezze, σ_t viene ad essere sostituita da γ_t . Le equazioni riportate più avanti permettono di ricavare $\rho(S,t,p)$ e quindi anche $\gamma(S,t,p)$. Per ulteriori approfondimenti sull'argomento consultare UNESCO (1981c, 1983, 1985, 1987) per quanto riguarda le altre grandezze ricavabili dall'equazione di stato, Millero (1982) e Fofonoff (1985) per una trattazione sistematica delle proprietà termodinamiche e Mamayev (1986) per il confronto tra i dati ricavati dalla vecchia equazione di stato e quelli basati sull'EOS-80.

L'equazione di stato EOS-80 presenta dei limiti e alla data odierna è in fase di revisione, assieme alle altre proprietà termodinamiche. Nel paragrafo 6 accenneremo ai progressi più recenti. La nuova equazione di stato sarà proposta alla comunità scientifica presumibilmente nel 2010 (McDougall *et al.*, 2009). Si raccomanda pertanto il lettore di verificare la letteratura a venire.

2.5.1 Calcoli

L'equazione di stato è fattorizzata in più parti, linearmente indipendenti e quindi misurabili indipendentemente.

La prima parte fornisce la densità dell'acqua di riferimento ρ_w , che è acqua di mare distillata e pertanto priva di sali ($S = 0$), ma alla composizione isotopica dell'acqua di mare, alla pressione di un'atmosfera standard e a temperatura t_{68} :

$$\rho_w \equiv \rho(0, t_{68}, 0) = a_0 + a_1 \cdot t_{68} + a_2 \cdot t_{68}^2 + a_3 \cdot t_{68}^3 + a_4 \cdot t_{68}^4$$

mentre una seconda parte include la variazione di densità dovuta alla presenza dei sali, in funzione delle variazioni di temperatura, alla pressione di un'atmosfera standard :

$$\rho(S, t_{68}, 0) = \rho(0, t_{68}, 0) + B \cdot S + C \cdot S^{3/2} + D \cdot S^2$$

dove:

$$B = b_0 + b_1 \cdot t_{68} + b_2 \cdot t_{68}^2 + b_3 \cdot t_{68}^3 + b_4 \cdot t_{68}^4$$

$$C = c_0 + c_1 \cdot t_{68} + c_2 \cdot t_{68}^2$$

$$D = d_0$$

Le altre parti riguardano invece le variazioni del coefficiente di elasticità medio, che vengono trattate in maniera analoga, ricavando l'espressione per l'acqua pura :

$$K_w \equiv K(0, t_{68}, 0) = e_0 + e_1 \cdot t_{68} + e_2 \cdot t_{68}^2 + e_3 \cdot t_{68}^3 + e_4 \cdot t_{68}^4$$

Includendo la variazione per salinità e temperatura:

$$K(S, t_{68}, p) = K(S, t_{68}, 0) + (H + I \cdot S + J \cdot S^{3/2}) \cdot p + (M + N \cdot S) \cdot p^2$$

dove

$$H = h_0 + h_1 \cdot t_{68} + h_2 \cdot t_{68}^2 + h_3 \cdot t_{68}^3$$

$$I = i_0 + i_1 \cdot t_{68} + i_2 \cdot t_{68}^2$$

$$J = j_0$$

$$M = m_0 + m_1 \cdot t_{68} + m_2 \cdot t_{68}^2$$

$$N = n_0 + n_1 \cdot t_{68} + n_2 \cdot t_{68}^2$$

In conclusione, richiamando l'equazione scritta in precedenza si ha:

$$\rho(S, t_{68}, p) = 1 / a(S, t, p) = \rho(S, t_{68}, 0) \cdot [1 - p/k(S, t, p)]$$

I valori dei coefficienti introdotti sono:

a_0	=	999,842594	b_0	=	$8,24493 \cdot 10^{-1}$	c_0	=	$-5,72466 \cdot 10^{-3}$
a_1	=	$6,793953 \cdot 10^{-2}$	b_1	=	$-4,0899 \cdot 10^{-3}$	c_1	=	$1,0227 \cdot 10^{-4}$
a_2	=	$-9,095290 \cdot 10^{-3}$	b_2	=	$7,6438 \cdot 10^{-5}$	c_2	=	$-1,6546 \cdot 10^{-6}$
a_3	=	$1,001685 \cdot 10^{-4}$	b_3	=	$-8,2467 \cdot 10^{-7}$			
a_4	=	$-1,120083 \cdot 10^{-6}$	b_4	=	$5,3875 \cdot 10^{-9}$			
a_5	=	$6,536332 \cdot 10^{-9}$						
d_0	=	$4,8314 \cdot 10^{-4}$	e_0	=	$196,5221 \cdot 10^{-2}$	f_0	=	54,6746
		e_1	=	148,4206	f_1	=	-0,603459	
		e_2	=	-2,327105	f_2	=	$1,09987 \cdot 10^{-2}$	
		e_3	=	$1,360477 \cdot 10^{-2}$	f_3	=	$-6,1670 \cdot 10^{-5}$	
		e_4	=	$-5,155288 \cdot 10^{-5}$				
g_0	=	$7,944 \cdot 10^{-2}$	h_0	=	3,239908	i_0	=	$2,2838 \cdot 10^{-3}$
g_1	=	$1,64843 \cdot 10^{-2}$	h_1	=	$1,43713 \cdot 10^{-3}$	i_1	=	$-1,0981 \cdot 10^{-5}$
g_2	=	$-5,3009 \cdot 10^{-5}$	h_2	=	$1,16092 \cdot 10^{-4}$	i_2	=	$-1,6078 \cdot 10^{-6}$
			h_3	=	$-5,77905 \cdot 10^{-7}$			

$$\begin{array}{llll}
 j_0 & = & 1,91075 \cdot 10^{-4} & m_0 & = & 8,50935 \cdot 10^{-5} & n_0 & = & -9,9348 \cdot 10^{-7} \\
 & & m_1 & = & -6,12293 \cdot 10^{-6} & n_1 & = & 2,0816 \cdot 10^{-8} \\
 & & m_2 & = & 5,2787 \cdot 10^{-8} & n_2 & = & 9,1697 \cdot 10^{-1}
 \end{array}$$

2.5.1.1 Raccomandazioni

Anche nel caso dell'equazione di stato i coefficienti sono relativi alla scala pratica di temperatura IPTS-68 e pertanto, nel caso si adoperino valori misurati sulla base della scala assoluta di temperatura (ITS-90), dovranno essere calcolate le opportune trasformazioni (vedi sezione "Temperatura").

I valori dei suddetti coefficienti si applicano quando la pressione è espressa in bar (1 bar = 10^5 Pascal = 0,1 MPa) e tenendo presente che $p = 0$ corrisponde ad un'atmosfera standard (ovvero profondità di 0 metri).

2.6 CENNO SUGLI SVILUPPI RECENTI NEL CALCOLO DELLA SALINITÀ ASSOLUTA E DELLE FUNZIONI TERMODINAMICHE

Nel 2005 SCOR e IAPSO hanno istituito il gruppo di lavoro 127 (WG127) su "Thermodynamics and Equation of State of Seawater" (Termodinamica ed equazione di stato dell'acqua di mare), con il compito di rivedere la definizione e il calcolo di alcune funzioni termodinamiche dell'acqua di mare, tenendo conto di sviluppi recenti nella conoscenza della termodinamica oceanica e della formulazione della scala internazionale di temperatura ITS-90.

Il WG127 ha prima di tutto sviluppato una funzione termodinamica, nota come potenziale di Gibbs, dalla quale è possibile derivare tutte le proprietà termodinamiche dell'acqua di mare mediante semplici operazioni matematiche, come le derivate (Feistel, 2008). Questo potenziale è una funzione della salinità assoluta (invece che di quella pratica), della temperatura e della pressione. L'uso della salinità assoluta al posto di quella pratica, sia nel potenziale di Gibbs che in tutte le altre funzioni termodinamiche, inclusa la densità, è la maggiore differenza tra il nuovo approccio e la pratica attualmente in uso (EOS-80). Il nuovo approccio usato per la termodinamica dell'acqua di mare viene riferito come "Thermodynamic Equation Of Seawater -2010" (Equazione termodinamica dell'acqua di mare -2010), brevemente indicato con TEOS-10.

Le nuove definizioni e gli algoritmi per il calcolo della salinità assoluta e delle proprietà termodinamiche sono descritti in un manuale preparato dal WG127 (McDougall *et al.*, 2009) e in lavori scientifici collegati (Millero *et al.*, 2008; McDougall *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2009; Millero and Huang 2009). Non entreremo nel dettaglio di queste nuove definizioni e delle procedure collegate in quanto il lavoro è ancora in fase di sviluppo e il WG127 prevede di non concluderlo prima del 2010. Si raccomanda il lettore di verificare la letteratura a venire. Si veda anche il sito www.marine.csiro.au/~jackett/TEOS-10/ che informa sugli aggiornamenti e fornisce anche qualche procedura di calcolo.

2.7 LISTA DEGLI ACRONIMI

EOS-80	Equation Of State of seawater of 1980
IAPSO	International Association for the Physical Sciences of the Oceans
IPTS-68	International Practical Temperature Scale of 1968
ITS-90	International Temperature Scale of 1990
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
JPOTS	Joint Panel on Oceanographic Tables and Standards
PSS-78	Practical Salinity Scale of 1978
SI	Sistema Internazionale delle unità di misura
SCOR	Scientific Committee on Oceanic Research
UNESCO	United Nation Educational Scientific and Cultural Organization
WOCE	World Ocean Circulation Experiment

2.8 BIBLIOGRAFIA

- EMERY W.J., THOMSON R.E. (2001) - *Data Analysis Methods in Physical Oceanography*, 2nd Edition, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands : 638 pp.
- FEISTEL R. (2008) - A Gibbs function for seawater thermodynamics for -6 to 80 °C and salinity up to 120 kg⁻¹. *Deep-Sea Res. PT I*, **55**: 1639-1671.
- FOFONOFF N.P. (1985) - Physical properties of seawater: a new salinity scale and equation of state for seawater. *J. Geophys. Res.*, **90**: 3332-3342.
- FORCH C., KNUDSEN M., SORENSEN S.P.L. (1902) - Berichte über die Konstantenbestimmungen zur Aufstellung der hydrographischen Tabellen. Kgl. *Danske Vidensk Selsk. Skrifter, 6 Raekke Naturvidensk, Mathem. Afd.*, **12**: 1-151.
- GRASSHOFF K. (1983) - Determination of salinity. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie; Weinheim: 31-60.
- GRASSHOFF K., KREMLING K., EHRHARDT M., (1999) - *Methods of Seawater Analysis*, 3rd Edition, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Federal Republic of Germany:: 600 pp.
- INNAMORATI M., FERRARI I., MARINO D., RIBERA D'ALCALÀ M. (1990) - *Metodi nell'ecologia del plancton marino. Nova Thalassia*, **11**: 372 pp.
- MAMAYEV O.I. (1986) - Comparison of the equations of state of seawater (Knudsen-Ekman and International 1980). *Oceanology*, **26**: 375-381.
- MANTYLA A.W. (1987) - Standard seawater comparison. *J. Phys. Oceanogr.*, **17**: 543-548.
- McDOUGALL T.J, FEISTEL R., MILLERO F.J., JACKETT D.R., WRIGHT D.G., KING B.A., MARION G.M., CHEN C-T.A., SPITZER P. (2009) – Calculation of the Thermodynamic Properties of Seawater. Global Ship-based Repeat Hydrography Manual. *IOCCP Report No. 14, ICPO Publication Series*, **134**: 112 pp. (www.marine.csiro.au/~jackett/TEOS-10/).
- MARION G.M., MILLERO F.J., FEISTEL R. (2009) - Salinity/temperature ranges for application of seawater S_A -T-P models. *Ocean Sci. Discuss.*, **6**: 171-189.
- McDOUGALL T.J, JACKETT D.R., MILLERO F.J. (2009) - An algorithm for estimating the Absolute Salinity in the global ocean. *Ocean Sci. Discuss.*, **6**: 215-242.
- MILLERO F.J. (1982) - The thermodynamics of seawater. Part I. The PVT properties. *Ocean. Sci. Eng.*, **7**: 403-460.
- MILLERO F.J., FEISTEL R., WRIGHT D.G., McDOUGALL T.J. (2008) - The composition of Standard Sea Water and the definition of the Reference-Composition Salinity Scale. *Deep Sea Res. PT I*, **55**: 50-72.
- MILLERO F.J., HUANG F. (2009) – The density of seawater as a function of salinity (5 to 70 g kg⁻¹) and temperature (0 to 90 °C). *Ocean Sci. Discuss.*, **6**: 153-169.
- SAUNDERS P. (1990) - The International Temperature Scale of 1990, ITS-90. *Woce Newsletter*, **10**, IOS, Wormley, UK.
- STALCUP M.C. (1991) - Salinity measurements. In: WOCE Operational Manual WHPO 91-1, *WOCE Report No 68* (<http://whpo.ucsd.edu/manuals.html>).
- UNESCO (1978) - Eighth report of the joint panel on oceanographic tables and standards. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, **28**: 1-35.
- UNESCO (1979) - Ninth report of the joint panel on oceanographic tables and standards. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, **30**: 1-32.
- UNESCO (1981a) - The practical salinity scale 1978 and the international equation of seawater 1980. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, **36**: 1-25.
- UNESCO (1981b) - Background papers and supporting data on the Practical Salinity Scale 1978. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, **37**: 1-144.
- UNESCO (1981c) - Background papers and supporting data on the International Equation of State of Sea Water 1980. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, **38**: 1-191.
- UNESCO (1983) - Algorithms for computation of fundamental properties of seawater. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, **44**: 1-53.
- UNESCO (1985) - The international system of units (SI) in oceanography. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, **45**: 1-124.
- UNESCO (1987) - International oceanographic tables, vol. 4. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, **40**: 1-193.

-
- UNESCO (1988) - The acquisition, calibration and analysis of CTD data. A report of SCOR Working Group 51. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, **54**: 1-59.
- UNESCO (1994) - Protocols for Joint Global Flux Study (JGOFS) Core Measurements. *Manual and Guide*, **29**: 1-181.
- WOCE (1991) - WOCE Operational Manual WHPO 91-1, *WOCE Report No 68*. (<http://whpo.ucsd.edu/manuals.html>).
- WOOSTER W.S., LEE A.J., DIETRICH G. (1969) - Redefinition of salinity. *Deep-Sea Res.*, **16**: 321–322.

CAPITOLO 3. OSSIGENO DISCIOLTO

V. Saggiomo, G. Catalano, M. Ribera d'Alcalà

saggiomo@szn.it

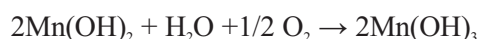
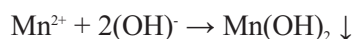
3.1 INTRODUZIONE

La concentrazione dell'ossigeno disciolto (DO) presente nell'acqua di mare dipende da fattori fisico-chimici che determinano la solubilità del gas e dalle attività biologiche (fotosintesi e respirazione).

Note temperatura e salinità dell'acqua è possibile risalire alla concentrazione dell'ossigeno disciolto teorico che non tiene però conto dei processi di produzione e consumo biologico. Lo sbilancio positivo (soprassaturazione) o negativo (sottosaturazione) fra la concentrazione di ossigeno ricavata sperimentalmente e quella teorica è spesso utilizzato come stima dei processi prevalenti nella colonna d'acqua ossia prevalenza di produzione di ossigeno, da parte dei processi foto sintetici, o di consumo da parte dei processi di mineralizzazione del detrito organico. Da una precisa determinazione della concentrazione del DO si possono quindi stimare la produzione netta e la respirazione della comunità planctonica.

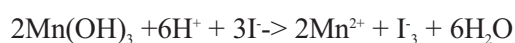
3.2 PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo per la determinazione della concentrazione del DO consta di due fasi. Nella prima, immediatamente successiva al campionamento tramite bottiglia Niskin, l'ossigeno disciolto nel campione d'acqua viene chimicamente "fissato" in un precipitato di idrossidi misti di manganese tri- e tetra-valente. A questo scopo al campione vengono aggiunti in rapida successione due reattivi: R1 costituito da un eccesso di Mn(II), R2 costituito da una soluzione fortemente alcalina di ioduro. In queste condizioni gli ioni Mn^{2+} aggiunti con la soluzione R1 precipitano nel campione come $Mn(OH)_2$ che in ambiente basico viene ossidato dall'ossigeno presente nell'acqua secondo le reazioni:

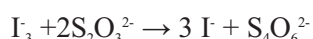


In questa prima fase è importanteappare bene la bottiglia del campione subito dopo l'aggiunta dei due reattivi, altrimenti l'idrossido di manganese continuerà a catturare l'ossigeno dall'aria attraverso la chiusura difettosa della bottiglia

Nella seconda fase, che coincide con il dosaggio in laboratorio, il campione viene acidificato fino ad un pH di poco superiore a 2. In ambiente acido, gli idrossidi di Mn(III) e Mn(IV) liberano ioni Mn^{3+} e Mn^{4+} che ossidano una quantità equivalente dello ioduro aggiunto in eccesso con R2 a iodio elementare (I_2) che viene successivamente in parte complessato dall'eccesso di ioduro a ione I_3^-



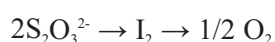
Lo ione complesso I_3^- così prodottosi viene titolato con una soluzione di tiosolfato secondo la reazione



dalla quale, noto il titolo ed il volume di tiosolfato necessario per raggiungere il punto finale della titolazione, si risale alla quantità di DO originariamente presente nel campione.

Il punto finale di titolazione può essere evidenziato o mediante indicatore, utilizzando una soluzione colloidale di amido (salsa d'amido) con cui lo iodio elementare forma, finché presente, un complesso colorato in blu, oppure, senza usare l'indicatore, mediante l'individuazione del punto di flesso di una curva di titolazione potenziometrica con elettrodo redox di platino.

Considerando l'insieme delle reazioni implicate, si arriva infine alle seguenti equivalenze stechiometriche:



Grasshoff (1962a) e Carrit e Carpenter (1966) hanno mostrato che l'ossidazione avviene sia verso il Mn(III) che verso il Mn(IV), per cui è preferibile garantire una quantità di Mn(II) almeno doppia rispetto all'ossigeno presumibilmente presente.

Ambedue le forme di ossidazione del manganese hanno un basso prodotto di solubilità, per cui tutto l'ossigeno risulta stabilmente fissato nel precipitato. In questa fase l'unico problema è quello di limitare gli scambi gassosi con l'esterno, per evitare che la diffusione di ossigeno atmosferico nel campione produca un'ulteriore ossidazione del manganese. Un innalzamento della temperatura del campione, già fissato e in attesa di essere titolato, può costituire una causa d'errore. Questo fenomeno può interessare soprattutto campioni di acque profonde, di solito a temperatura più bassa di quella dell'aria, il cui riscaldamento può dare luogo a fenomeni di dilatazione del liquido con l'allontanamento del tappo e la conseguente diffusione dell'aria nel campione.

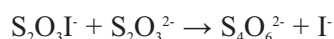
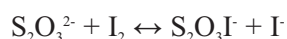
La seconda fase è più critica. Lo iodio che si forma per ossidazione dal manganese è infatti molto volatile, per cui l'eccesso di ioduro deve essere tale da garantire che una parte preponderante dello iodio formatosi per ossidazione si trovi sotto forma di complesso I^- . Inoltre la tensione di vapore dello iodio dipende in modo esponenziale dalla temperatura. La perdita dello iodio dalla soluzione, che è una delle principali fonti di errore, aumenta grandemente in ambienti surriscaldati, è quindi consigliabile effettuare la titolazione in ambienti condizionati.

L'ossidazione a tetratoato è solo una delle possibili ossidazioni del tiosolfato, per cui il controllo delle condizioni di reazione, in particolare del pH, è un elemento critico dell'analisi. Grasshoff (1962a) e Carrit e Carpenter (1966) hanno mostrato che il pH ottimale è compreso tra 2,0 e 2,7.

La reazione tiosolfato-tetratoato risulta, inoltre, essere specie-specifica, vale a dire dipende dall'altra coppia ossido-riduttiva che entra nella reazione, per cui la standardizzazione del tiosolfato va fatta con la stessa specie chimica che viene poi determinata, cioè la coppia iodio-ioduro.

Lo ioduro è ossidato in ambiente acido dall'ossigeno e questa reazione è catalizzata, tra gli altri fattori, dalla luce. La titolazione deve essere pertanto al tempo stesso rapida e al riparo dalla luce solare diretta.

L'ossidazione del tiosolfato avviene probabilmente in due stadi (Carrit e Carpenter, 1966):



Il secondo stadio, che completa la riduzione della molecola di iodio, è più lento rispetto al primo, per cui, in eccesso di ioduro, il primo stadio tende a rimettere in soluzione iodio molecolare. Questo può provocare la determinazione di un punto finale di titolazione apparente, con la ricomparsa del colore dopo qualche secondo. Per questo nella titolazione dell'ultima frazione di iodio, è necessario aggiungere volumi ridotti di titolante, aspettando l'esito della reazione prima dell'aggiunta successiva. Una buona

accuratezza del metodo richiede inoltre che si tenga conto delle capacità ossido-riduttive dei reagenti stessi nei quali, oltre all'ossigeno, possono essere presenti sostanze ossidanti che possono produrre forme ossidate delle specie chimiche coinvolte nel fissaggio dell'ossigeno (Murray *et al.*, 1968). È pertanto consigliabile utilizzare per la determinazione del bianco dei reattivi la procedura suggerita da Grasshoff (1983). Secondo questa procedura, si preleva un certo numero di sub-campioni della stessa acqua fissandoli con dosi crescenti di reattivo. Per questa serie le differenze nei valori di concentrazione di ossigeno non dipendono da quello disciolto nel campione, che è costante, ma derivano dalle capacità ossido-riduttive complessive dei reagenti aggiunti.

Il metodo descritto nel seguito, originariamente concepito da Winkler (1888), è sostanzialmente quello di Carpenter (1965a).

3.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

3.3.1 Attrezzatura

- Tubo di plastica trasparente (es. tygon) da collegare ai rubinetti delle bottiglie da campionamento;
- Bottiglie di pyrex da 60-90 ml, tipo BOD, con tappo smerigliato a becco di flauto o a terminazione troncoconica arrotondata. Ciascuna bottiglia deve essere stata precalibrata per il proprio volume a tappo chiuso con una accuratezza di $\pm 0,1$ ml ;
- Vetreteria da laboratorio;
- Dispenser, micropipette automatiche o siringhe di polietilene con tacche ogni 0,5 ml;
- Contenitore coibentato, schermato dalla luce;
- Matracci tarati da 100 ml;
- 6 bottiglie per la determinazione del bianco dei reattivi. Queste bottiglie vanno selezionate tra quelle a volume noto utilizzate per il prelievo dell'ossigeno, preferibilmente in modo che risultino a due a due di uguale volume ($\pm 0,1$ ml), e con una differenza di volume tra una coppia e la successiva di $1 \pm 0,1$ ml.

3.3.2 Prodotti chimici

- manganese cloruro [$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] o solfato di manganese [$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$];
- sodio idrossido [NaOH] o idrossido di potassio [KOH];
- potassio ioduro [KI].

3.3.3 Preparazione dei reagenti

Soluzione di Mn^{2+} (R1)

Disciogliere 40 g di $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ o 35 g di $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 80 ml di acqua grado reagente e portare a volume in un matraccio da 100 ml. Il reattivo, se conservato in bottiglia chiusa e non contaminato inavvertitamente con R2, contenente ioduro, è stabile indefinitamente.

Soluzione alcalina di ione I (R2)

Disciogliere 20 g di idrossido di sodio o 30 g di idrossido di potassio in 40 ml di acqua grado reagente. Disciogliere 60 g di potassio ioduro in 40 ml di acqua grado reagente. Mescolare poco a poco le due soluzioni in un beuta e portare a volume finale di 100 ml con H_2O . La soluzione va poi conservata in bottiglia di plastica scura e ben tappata. Se non viene contaminata con R1 o con agenti riducenti o ossidanti è stabile indefinitamente.

3.3.4 Procedura di campionamento

Il sub-campionamento del DO dalla bottiglia Niskin, o simile, deve essere fatto velocemente in quanto il gas disciolto tende ad equilibrarsi con l'atmosfera. Questo processo sarà ulteriormente accelerato dalla differenza di temperatura esistente tra il campione e l'ambiente.

Per il sub-campionamento collegare alla bottiglia Niskin il tubo di plastica trasparente, possibilmente di diametro non superiore ai 5 mm e di lunghezza tale da poter comodamente raggiungere il fondo delle bottiglie BOD per la raccolta del campione.

Avvinare le bottiglie, precedentemente pulite dai residui dei campionamenti e delle analisi precedenti, con acqua del campione da analizzare. Evitare di agitare la bottiglia per prevenire la formazione lungo le pareti di un velo d'acqua soprassatura di ossigeno.

Lasciare defluire il campione nella bottiglia verificando che il tubo di riempimento sia privo di bolle d'aria ed evitando il gorgogliamento di aria nel campione. Il tubo di campionamento deve toccare il fondo della bottiglia, che va riempita lentamente facendo traboccare una quantità di acqua pari ad almeno la metà del suo volume totale.

Sfilare lentamente il tubo dalla bottiglia, sempre lasciando scorrere l'acqua, in modo che la bottiglia rimanga sempre colma fino all'orlo. Prima di aggiungere i reattivi, verificare attentamente che nella bottiglia non siano rimaste intrappolate bolle d'aria, altrimenti svuotare la bottiglia e ripetere l'operazione di riempimento.

Nel caso di utilizzo di bottiglie per BOD di circa 100 ml dispensare 0,5 ml di R1 e 0,5 ml di R2 in rapida successione, utilizzando due dispenser automatici o due normali siringhe munite di ago lungo e stretto per poter iniettare i reattivi almeno al di sotto della superficie libera del campione, meglio se sul fondo della bottiglia. Nel caso di utilizzo di bottiglie per BOD di volume diverso da circa 100 ml, dispensare volumi di R1 ed R2 proporzionalmente variati.

Inserire il tappo evitando accuratamente che si formino bolle d'aria tra il tappo ed il liquido, facendo fuoriuscire l'acqua in eccesso. Agitare, capovolgendo più volte la bottiglia ben tappata per almeno 30 secondi.

Porre la bottiglia in un luogo buio ad una temperatura simile a quella di prelievo. Lasciar sedimentare il precipitato per i 2/3 del volume, poi agitare di nuovo. Per limitare ulteriormente la possibilità di scambio di gas con l'ambiente, utilizzare un qualunque sistema che mantenga il tappo ben premuto sul collo della bottiglia, come ad esempio, elastici, nastro adesivo, ecc.

3.3.5 Prelievo per la determinazione del bianco dei reagenti

Prelevare da una stessa bottiglia da campionamento, preferibilmente non da quella relativa al livello superficiale, tanti campioni quante sono le bottiglie preselezionate per i bianchi.

Aggiungere una dose di ciascun reattivo alla coppia di bottiglie di volume più basso, due dosi a quella di volume maggiore di 1 ml e tre dosi a quella con volume maggiore di 2 ml, trattandole poi come normali campioni. Tale operazione va effettuata almeno una volta nel corso di una giornata di prelievi.

3.3.6 Conservazione dei campioni

I campioni fissati vanno conservati al buio e ad una temperatura quanto più possibile vicina a quella di prelievo, da effettuare possibilmente entro la giornata del campionamento.

Teoricamente si potrebbero conservare i campioni fissati per un tempo più lungo se non ci fosse alcuna diffusione gassosa attraverso le chiusure dei tappi che purtroppo avviene, anche se in diversa misura, in tutte le bottiglie. Al fine di ridurre questo fenomeno, si usa conservare le bottiglie, ben chiuse, completamente immerse in acqua della stessa temperatura di origine del campione.

3.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

3.4.1 Attrezzatura

- Matracci tarati da 1 l classe A
- Microburetta di vetro o a pistone da 1 ml o da 5 ml
- 5 bottiglie di pyrex dello stesso tipo di quelle adoperate per il campionamento
- Micropipetta di precisione da 0,500 ml; micropipetta da 0,200 ml
- Lampada fluorescente con schermo opaco o diffusore
- Agitatore magnetico freddo
- Ancorette magnetiche
- 2 dispenser o micropipette automatiche o siringhe di polietilene con tacche ogni 0,5 ml (per reattivi ossigeno)
- Dispenser da 1 ml (per l'acido solforico concentrato).

In alternativa alla microburetta

- Titolatore potenziometrico
- Elettrodo combinato redox di platino, semimicro

3.4.2 Prodotti chimici

- Sodio tiosolfato [$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$];
- Potassio iodato [KIO_3], possibilmente ultrapuro,
- Cloruro di sodio [NaCl];
- Cloroformio [CHCl_3] o sodio-azide [NaN_3];
- Amido solubile;
- Acido solforico concentrato, grado analitico [H_2SO_4].

3.4.3 Preparazione dei reagenti

Soluzione di tiosolfato ~ 0,1 mol l⁻¹ (o ~ 0,1 M)

Sciogliere, in un matraccio tarato da 1 l, 24,82 g di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ in 800 ml di H_2O grado reagente e portare a volume. Aggiungere qualche goccia di cloroformio o di sodio-azide come stabilizzante.

La soluzione va conservata in bottiglia di vetro scura. Poiché il tiosolfato è coinvolto in numerose reazioni ossido-riduttive, la soluzione è relativamente instabile e pertanto va standardizzata contro la soluzione di potassio iodato prima e dopo l'uso. È possibile usare fiale commerciali di soluzione di tiosolfato a titolo noto, pre-stabilizzate.

Soluzione standard di KIO_3 0,01667 mol l⁻¹ (o 0,01667 M)

Essiccare circa 5 g di iodato in stufa a 110°C per almeno un'ora e lasciarlo raffreddare in essiccatore o prelevarlo direttamente da uno stock a suo tempo essiccato e conservato a freddo in essiccatore in presenza di un forte disidratante. Pesare esattamente 3,567 g e discioglierli quantitativamente in 800 ml di acqua grado reagente in un matraccio tarato da 1 l (classe A). Portare esattamente a volume ad una temperatura intorno a quella di taratura del matraccio (di solito 20-25 °C). Sono anche disponibili fiale di standard iodato commerciali.

La soluzione deve essere poi conservata in bottiglie di vetro scuro ben tappate, tenute lontano dal sole ed aperte per il minor tempo possibile solo per i prelievi. A queste condizioni la soluzione standard è da considerarsi stabile per almeno un anno.

Soluzione di amido colloidale (salda d'amido) stabilizzata

Preparare una soluzione satura di cloruro di sodio sciogliendone, in un beaker, circa 350 g in 1 l di acqua distillata. Sciogliere a caldo 10 g di amido solubile nella soluzione di cloruro di sodio satura.

La soluzione va conservata in bottiglia scura ed è utilizzabile fino a che non intorbidisce e floccula.

3.5 PROCEDURA ANALITICA

3.5.1 Preparazione delle soluzioni standard

Riempire per 3/4 del volume almeno 5 bottiglie BOD con acqua di mare o, in mancanza di questa, con acqua distillata e aggiungere a ciascuna, in successione, 0,5 ml di acido solforico concentrato, 0,5 ml di R2 e 0,5 ml di reattivo R1, utilizzando gli stessi dispenser usati per "fissare" i campioni. È preferibile effettuare queste operazioni sotto continua agitazione, consentire il completo mescolamento di ciascun reagente prima dell'aggiunta del successivo. Le bottiglie possono poi essere tappate e conservate al buio fino all'aggiunta della soluzione standard di iodato.

Aggiungere ad ogni bottiglia, mediante una pipetta automatica, esattamente 1000 ml di soluzione di KIO_3 standard.

Agitare qualche secondo e riporre la bottiglia al buio per circa 1 minuto per permettere alla reazione di dismutazione dello iodato di aver luogo producendo iodio molecolare.

Titolare gli standard così ottenuti con la soluzione di tiosolfato come indicato di seguito per i campioni.

3.5.2 Analisi dei campioni

3.5.2.1 Dissoluzione del precipitato

- Registrare il numero della bottiglia ed il suo volume.
- Togliere delicatamente il tappo dalla bottiglia contenente il precipitato e porla sull'agitatore magnetico spento.
- Rapidamente, inserire nella bottiglia un'ancoretta magnetica cercando di sollevare meno precipitato possibile, aggiungere con un dispenser 0,5 ml di acido solforico concentrato, far partire l'agitatore regolandone la velocità in modo da evitare la formazione di vortici e turbolenze;
- Attendere la completa dissoluzione del precipitato (la soluzione diviene di un limpido colore giallino dovuto alla presenza dello iodio),
- Procedere rapidamente alla titolazione con il sodio-tiosolfato.

3.5.2.2 Titolazione

- Immergere il puntale della buretta contenente la soluzione di tiosolfato nella bottiglia contenente il campione o lo standard.
- All'inizio far fluire rapidamente la soluzione di tiosolfato, rallentando poi il flusso quando il colore giallo del campione si schiarisce e, importante, fermandosi prima della scomparsa totale del colore giallo.
- Quando la soluzione è quasi incolore, accendere l'eventuale lampada e aggiungere circa 0,2 ml di salda d'amido (compare un'intensa colorazione viola), riprendere le aggiunte di tiosolfato lentamente fino alla quasi scomparsa del colore blu.

-
- Attendere qualche secondo. Se osservata in trasparenza contro una luce fluorescente diffusa, la bottiglia mostra un tenue colore disperso come una nuvola. Procedere molto lentamente con la titolazione fino alla completa scomparsa del colore, punto finale (PF) della titolazione. Registrare il volume di tiosolfato aggiunto.

Nel caso si usi un titolatore automatico con elettrodo combinato redox/platino, il programma di titolazione dovrà prevedere una diminuzione di flusso del titolante in prossimità del PF che corrisponderà al punto di flesso della curva di titolazione.

3.5.3 Calcoli

3.5.3.1 Standardizzazione del tiosolfato (C_{tio})

Titolare gli standard di KIO_3 preparati (vedi) con la soluzione di tiosolfato $\sim 0,1$ M (vedi “Preparazione dei reagenti”).

Il titolo molare C_{tio} della soluzione di tiosolfato sarà:

$$C_{tio} = 6 * (V_{KIO_3} * C_{KIO_3}) / V_{tio}$$

dove

C_{tio} = concentrazione molare (M) esatta della soluzione di $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$

V_{KIO_3} = volume in ml di standard KIO_3 iniettato (vedi “Preparazione delle soluzioni standard”)

C_{KIO_3} = concentrazione molare (nel nostro caso, 0,01667 M, avendo pesato esattamente 3,567 g di KIO_3) dello standard di KIO_3 usato

V_{tio} = volume in ml di tiosolfato necessari a titolare lo standard

Calcolare la media e la deviazione standard di V_{tio} nelle repliche e scartare i valori che differiscano per più di due deviazioni standard dalla media. Ricalcolare la media e la deviazione standard di V_{tio} che sarà usato nel calcolo di C_{tio} .

3.5.3.2 Determinazione del bianco dei reagenti

Titolare le 3 coppie di bottiglie dedicate alla determinazione del bianco ed annotare il volume di tiosolfato utilizzato. Calcolare la concentrazione del DO (vedi “Calcolo della concentrazione dell’ossigeno disciolto”) come se il bianco (C_{bl}) fosse zero. Il coefficiente angolare della retta di correlazione tra le concentrazioni di DO così ottenute ed il volume di R1+R2 aggiunti corrisponde al bianco dei reattivi (C_{bl}).

Un modo più semplice sarebbe quello di calcolare la differenza tra i valori medi per ogni coppia di bottiglie e la successiva, ma data la notevole variabilità nelle differenze questo metodo è da usare in via subordinata. Questa procedura consente la determinazione del bianco dei reattivi, non quella del bianco del campione, ovvero la presenza nel campione di sostanze chimiche interferenti (ad es. iodato) capaci di produrre iodio elementare nella soluzione acidificata. Se il livello di accuratezza voluto lo richiedesse, si dovrebbe misurare il bianco anche per ciascun campione, secondo la procedura suggerite da Tijssen e van Bennekom (1989).

3.5.3.3 Calcolo della concentrazione micro-molare (μM o $\mu mol l^{-1}$) dell’ossigeno disciolto

$$DO (\mu M) = [(C_{tio} * v) / (4 * (Y - y)) * 10^6] - C_{bl}$$

dove:

C_{tio}	= concentrazione molare esatta della soluzione di $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$, come risultante dal procedimento di standardizzazione
v	= volume in ml di tiosolfato necessari a titolare il campione incognito
C_{bl}	= bianco dei reagenti (vedi determinazione del bianco dei reagenti)
Y	= volume in ml della specifica bottiglia BOD utilizzata per ogni campione
y	= volume totale, in ml, dei reagenti R1 + R2 aggiunti a ciascuna bottiglia di campione (nel caso riportato, 1 ml)

La concentrazione dell'ossigeno si può esprimere anche in $mg\ l^{-1}$ e in $ml\ l^{-1}$ di ossigeno a 760 mm Hg per litro di soluzione 0 °C di temperatura

Le conversioni alle suddette grandezze sono:

$$DO\ (mg\ l^{-1}) = DO\ (\mu mol\ l^{-1}) * 0,032$$

$$DO\ (ml\ l^{-1}) = DO\ (\mu mol\ l^{-1}) * 0,022414$$

È inoltre possibile passare dalle concentrazioni espresse per unità di volume (l di acqua di mare) a quelle per unità di massa (kg di acqua di mare)

In tal caso qualsiasi delle concentrazioni sopra elencate deve venir divisa per la densità (ρ) del campione d'acqua di mare analizzato, considerato alla temperatura di esecuzione dell'analisi (usualmente 20 o 25 °C cioè ρ_{20} o ρ_{25})

Va notato che la concentrazione per unità di massa è certamente più rigorosa, mentre quella per unità di volume dovrebbe essere ulteriormente corretta per conoscere il corrispondente valore di concentrazione di ossigeno *in situ*.

NOTA

Va inoltre precisato che, se la quantità di ossigeno presente nel campione viene espressa in unità di volume, si considera il volume che l'ossigeno occuperebbe se si comportasse come un gas ideale alla pressione di una atmosfera standard (1013,25 hPa). Si attribuisce quindi a questo gas un volume molare di 22,414 l a 0 °C. Le unità prescelte sono pertanto convenzionali in quanto, per ottenere un'espressione più corretta, occorrerebbe applicare l'equazione di stato dei gas reali che consentirebbe di conoscere l'effettivo volume dell'ossigeno disciolto in condizioni normali.

3.5.3.4 Ossigeno disciolto espresso come percentuale del valore di saturazione

Il calcolo della percentuale del valore di saturazione può essere effettuato solo conoscendo il valore della solubilità dell'ossigeno nel campione d'acqua di mare che si è analizzato. È noto che la solubilità di un gas in un liquido dipende, oltre che dalle proprietà del solvente (composizione e temperatura), anche dalla pressione parziale esercitata sulla soluzione dal gas in questione (legge di Henry). Il valore di solubilità corrisponde quindi alla quantità di ossigeno che si discioglierrebbe in acqua in condizioni di equilibrio tra lo strato superficiale del mare e l'atmosfera soprastante.

Per determinarla si fa allora riferimento ad un campione in equilibrio termodinamico con una miscela gassosa di composizione uguale all'atmosfera standard, alla pressione di una atmosfera standard (frazione molare dell'ossigeno = 0,20946) e saturata di vapore d'acqua. A seconda che la concentrazione di ossigeno venga rapportata all'unità di massa o di volume del solvente, si ottengono due valori di concentrazione, denominata USAC (acronimo di "Unit Standard Atmospheric Concentration"). Tali valori sono rappresentati dai simboli C_0^i e C_0^* secondo la simbologia introdotta da Benson e Krause (1980, 1984). Queste grandezze sono state di recente ricalcolate in base ad una procedura più rigorosa introdotta dagli stessi Autori e raccomandata successivamente dall'UNESCO (Millero, 1986) in sostituzione dei valori contenuti nelle tavole oceanografiche UNESCO (1973) che si basavano sugli algoritmi di Weiss (1970).

La formula di seguito riportata è il prodotto di interpolazioni numeriche di dati ricavati da equazioni che più rigorosamente calcolano le grandezze cercate. Inoltre (vedi capitolo “Temperatura”) va notato che la formula si basa sulla scala pratica di temperatura del 1968 (IPTS-68) e pertanto, nel caso si adoperino valori misurati sulla base della scala ITS-90, occorrerà applicare le appropriate conversioni.

Calcolo:

$$[\text{O}_2] \% \text{ sat} = 100 * \text{DO}/C_0^a$$

dove:

$$\ln C_0^a = a_0 + a_1/T + a_2/T^2 + a_3/T^3 + a_4/T^4 - S * (b_0 + b_1/T + b_2/T^2)$$

Nella formula C_0^a corrisponde alla concentrazione del DO teorico C_0^i e C_0^* riportato per unità di massa oppure per unità di volume a seconda del set di coefficienti scelto (Tab. 1 e Tab. 2)

Tab. 1

	$\mu\text{mol-O}_2 \text{ kg}^{-1}$	$\text{ml-O}_2 \text{ kg}^{-1}$	$\text{mg-O}_2 \text{ kg}^{-1}$
a_0	-135,29996	-139,0980	-138,74202
a_1	$1,572288 \cdot 10^5$	$1,572288 \cdot 10^5$	$1,572288 \cdot 10^5$
a_2	$-6,637149 \cdot 10^7$	$-6,637149 \cdot 10^7$	$-6,637149 \cdot 10^7$
a_3	$1,243678 \cdot 10^{10}$	$1,243678 \cdot 10^{10}$	$1,243678 \cdot 10^{10}$
a_4	$-8,621061 \cdot 10^{11}$	$-8,621061 \cdot 10^{11}$	$-8,621061 \cdot 10^{11}$
b_0	0,020573	0,020573	0,020573
b_1	-12,142	-12,142	-12,142
b_2	2363,1	2363,1	2363,1

Tab. 2

	$\mu\text{mol-O}_2 \text{ l}^{-1}$	$\text{ml-O}_2 \text{ l}^{-1}$	$\text{mg-O}_2 \text{ l}^{-1}$
a_0	-135,90205	-135,90205	-135,90205
a_1	$1,575701 \cdot 10^5$	$1,575701 \cdot 10^5$	$1,575701 \cdot 10^5$
a_2	$-6,642308 \cdot 10^7$	$-6,642308 \cdot 10^7$	$-6,642308 \cdot 10^7$
a_3	$1,243800 \cdot 10^{10}$	$1,243800 \cdot 10^{10}$	$1,243800 \cdot 10^{10}$
a_4	$-8,621949 \cdot 10^{11}$	$-8,621949 \cdot 10^{11}$	$-8,621949 \cdot 10^{11}$
b_0	0,017674	0,017674	0,017674
b_1	-10,754	-10,754	-10,754
b_2	2140,7	2140,7	2140,7

3.5.3.5 Raccomandazioni

- In sede di fissazione dei campioni, evitare accuratamente di far venire a contatto i reattivi R1 e R2.
- Durante la titolazione manuale utilizzare lo stesso criterio di individuazione del PF di titolazione sia per gli standard che per i campioni, evitando di cambiare operatore.
- Effettuare la titolazione rapidamente, diminuendo il flusso del tiosolfato solo in vicinanza del PF, allo scopo di minimizzare gli errori dovuti alla foto-ossidazione dello ioduro e alla riduzione dello iodio ad opera della salda d'amido

3.5.3.6 Problemi possibili

- Un problema che di solito si presenta è quello della formazione di bolle nella bottiglia contenente il campione; per prevenire il fenomeno occorre lavare le bottiglie con detergenti e sciacquarle ac-

curatamente.

- Talora si forma una bolla d'aria sotto il tappo della bottiglia contenente il campione già fissato; in tal caso non c'è altro da fare che prenderne nota e considerare la possibile esistenza di un errore per eccesso, comunque non quantificabile, della quantità di ossigeno disciolto.

3.6 ALTRI METODI

La determinazione dell'ossigeno in soluzione è tra le procedure analitiche più studiate. Ci limitiamo nel seguito a dare indicazioni sui lavori che possono rivestire un certo interesse nella ricerca oceanografica.

Il metodo di Winkler viene utilizzato in molte versioni, specie per la determinazione del punto finale di titolazione o, meglio, del punto equivalente. I due punti, quando si adopera la salda d'amido come indicatore, non coincidono (Carpenter, 1965b). Il punto finale può essere determinato potenziometricamente (Knowles e Lowden, 1953; Aminot, 1988; Oudot, 1988), amperometricamente (Bradbury e Hambly, 1952) o fotometricamente (Broenkow e Cline, 1969; Bryan *et al.*, 1976; Tijssen, 1981; Williams e Jenkinson, 1982). In tutti questi casi l'accuratezza è decisamente migliore, fino a giungere ad un errore di $\pm 0,002$ sulla concentrazione dell'ossigeno espressa in ml l⁻¹. Questi metodi, che si prestano anche ad essere automatizzati, richiedono però un'integrazione dell'attrezzatura e quindi un sensibile aumento nei costi.

Metodi diversi dal Winkler sono basati sull'uso di elettrodi di tipo polarografico che misurano la corrente di diffusione prodotta dalla riduzione di ossigeno al catodo (Grasshoff, 1962a,b, 1963; Greene *et al.*, 1970). Una trattazione estensiva su questo tipo di elettrodi e su altre misure elettrometriche dell'ossigeno si può trovare in Whitfield (1975), Attwood *et al.* (1977), Grasshoff (1981), Langdon (1984), Karagounis *et al.* (1986), Guzman *et al.* (1987). Questi metodi si prestano per rilevazioni in continuo, specie se l'elettrodo è in movimento e sono spesso montati su sonde CTD di varie ditte. Hanno un'accuratezza di solito inferiore a quella del metodo Winkler e, specie per gli elettrodi coperti da membrana, possono dare risultati non costanti nel tempo, oppure al variare della temperatura e/o della pressione. Recentemente sono stati però fatti notevoli passi avanti per correggere questi aspetti.

Un metodo ottico basato sul "quenching" prodotto su un segnale di fluorescenza fu introdotto più di venti anni fa da McFarlane e Hamilton (1987). Il metodo offriva notevoli vantaggi, non solo perché la misura non dipendeva dalle condizioni nelle quali viene effettuata, ma anche, e soprattutto, perché la concentrazione dell'ossigeno non variava nel corso della misura. Inoltre l'applicazione del metodo, non richiedeva che ci fosse ricambio del campione in prossimità dell'elettrodo durante la misura. Inizialmente la sensibilità del metodo era inferiore a quella ottenibili con i più consolidati elettrodi polarografici. Nel corso dell'ultimo decennio la tecnologia è notevolmente migliorata sia nell'ingegnerizzazione dei sensori che nel sistema di rilevamento del segnale. Senza entrare nel dettaglio di un settore in rapidissimo sviluppo si segnala che, per applicazioni oceanografiche, il sensore ormai di uso corrente è l'Optode prodotto dalla casa norvegese Aanderaa che offre prestazioni confrontabili con gli elettrodi tradizionali, con il vantaggio di una più facile manutenzione se utilizzato su profilatori CTD. Per un'analisi sulle prestazioni del sensore si può fare riferimento, tra gli altri, a Martini *et al.* (2007) e Tengberg *et al.* (2006) e riferimenti ivi riportati.

Infine Malaiyandi e Sastri (1983) rivedono sinteticamente i metodi fotometrici diretti, che presentano il vantaggio di essere metodi di misura diretti, senza lo stadio di titolazione.

Va comunque ribadito che, a tutt'oggi, nessun metodo è paragonabile, per precisione ed accuratezza con i metodi che si basano, con le modifiche sopra esposte, su quello proposto da Winkler che rimane il metodo di riferimento per la determinazione dell'ossigeno disciolto, specialmente se il PF di titolazione viene determinato strumentalmente per via elettrochimica o fotometrica.

3.7 BIBLIOGRAFIA

AMINOT A. (1958) - Precision and accuracy of dissolved oxygen measurements. A comment to the paper by Oudotet

-
- NL. 1988: precise shipboard determination of dissolved oxygen (Winkler procedure) for productivity studies with a commercial system. *Limnol. Oceanogr.*, **33**: 1646-1648.
- ATTWOOD D.K., KINARD W.F., BARCELONA V.L.J., JOHNSON E.C. (1977) - Comparison of polarographic electrode and Winkler titration determinations of dissolved oxygen in oceanographic samples. *Deep-Sea Res.*, **24**: 311-313.
- BENSON B.B., KRAUSE D. Jr. (1980) - The concentration and isotopic fractionation of gases in freshwater in equilibrium with atmosphere. *Limnol. Oceanogr.*, **25**: 662-671.
- BENSON B.B., D. KRAUSE, Jr. - (1984) - The concentration and isotopic fractionation of oxygen dissolved in freshwater and seawater in equilibrium with atmosphere. *Limnol. Oceanogr.*, **29**: 620-632.
- BRADBURY J.H., HAMBLY A.N. (1952) - An investigation of errors in the amperometric and starch indicator methods for the titration of millinormal solutions of iodine and thiosulfate. *Aust J. Sci. Res. Ser. A*, **5**: 541-554.
- BROENKOW W.W., CLINE J.D. (1969) - Colorimetric determination of dissolved oxygen at low concentrations. *Limnol. Oceanogr.*, **14**: 450-454.
- BRYAN J.R., RILEY J.P., LeB. WILLIAMS P.J. (1976) - A Winkler procedure for making precise measurements of oxygen concentrations for productivity and related studies. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **21**: 191-197.
- CARPENTER J.H. (1965a) - The Chesapeake Bay Institute Technique for the Winkler dissolved oxygen method. *Limnol. Oceanogr.*, **10**: 141-143.
- CARPENTER J.H. (1965b) - The accuracy of the Winkler method for dissolved oxygen analysis. *Limnol. Oceanogr.*, **10**: 135-140.
- CARRITT D.E., CARPENTER J.H. (1966) - Comparison and evaluation of currently employed modifications of the Winkler method for determining dissolved oxygen in seawater; a NASCO Report. *J. Mar. Res.*, **24**: 286-318.
- GRASSHOFF K. (1962a) - Untersuchungen über die Sauerstoffbestimmung im Meerwasser. 1. Teil. *Kieler Meeresforsch.*, **18**: 42-50.
- GRASSHOFF K. (1962b) - Untersuchungen über die Sauerstoffbestimmung im Meerwasser. 2. Teil. *Kieler Meeresforsch.*, **18**: 151-160.
- GRASSHOFF K. (1963) - Untersuchungen über die Sauerstoffbestimmung im Meerwasser. 3. Teil. *Kieler Meeresforsch.*, **19**: 8-15.
- GRASSHOFF K. (1981) - The electrochemical determination of oxygen. In: Whitfield M., D. Jagner (eds), *Marine Electrochemistry*. J. Wiley & Sons, Sussex: 327-420.
- GRASSHOFF K. (1983) - Determination of oxygen. In: Grasshoff, K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim: 61-72.
- GREENE M.W., GAFFORD R.D., ROHRBAUGH D.G. (1970) - A continuous profiling, deep-submersible, dissolved-oxygen monitor. *Mar. Technol. Soc., Sixth Annual Reprints*, **2**: 1485-1593.
- GUZMAN S.Q. de, BAUDINO O.M., CORTINEZ V.A. (1987) - Design and evaluation of an electrochemical sensor for determination of dissolved oxygen in water. *Talanta*, **34**: 551-554.
- KARAGOUNIS V., LUN L., LIU C.C. (1986) - A thick-film multiple component cathode three-electrode oxygen sensor. *IEEE Trans. Biomed. Eng. BME*, **33**: 108-112.
- KNOWLES G., LOWDEN G.F. (1953) - Methods for detecting the end point in the titration of iodine with thio-sulphate. *Analyst*, **78**: 159-164
- LANGDON C. (1984) - Dissolved oxygen monitoring system using a pulsed electrode: design, performance, and evaluation. *Deep-Sea Res.*, **31**: 1357-1367.
- MALAIYANDI M., SASTRI V.S. (1983) - Studies on the determination of dissolved oxygen in water. *Talanta*, **30**: 983-985.
- McFARLANE R., HAMILTON M.C. (1987) - A fluorescence based dissolved oxygen sensor. *SPIE, Fiber Optic Sensors II*, **798**: 324-330.
- MARTINI M., BUTMAN B., MICKELSON M.J. (2007) - Long-Term Performance of Aanderaa Optodes and Sea-Bird SBE-43. Dissolved-Oxygen Sensors Bottom Mounted at 32 m in Massachusetts Bay. *Journal of Atmospheric and Oceanic Technology*, **24**: 1924-1935.
- MILLERO F.J. (1986) - Solubility of oxygen in seawater. *UNESCO Technical Papers in Marine Science*, **50**: 13-17.
- MURRAY C.N., RILEY J.P., WILSON T.R.S. (1968) - The solubility of oxygen in Winkler reagents used for the determination of dissolved oxygen. *Deep-Sea Res.*, **15**: 237-238.
- OUDOT C., GERARD R., MORIN P. (1988) - Precise shipboard determination of dissolved oxygen (Winkler pro-

-
- cedure) for productivity studies with a commercial system. *Limnol. Oceanogr.*, **33**: 146-150.
- TENGBERG A., HOVDENES J., ANDERSSON H.J., BROCANDEL O., DIAZ R., HEBERT D., ARNERICH T., HUBER C., KÖRTZINGER A., KHRIPOUNOFF A., REY F., RÖNNING C., SCHIMANSKI J., SOMMER S., STANGELMAYER A. (2006) - Evaluation of a lifetime-based optode to measure oxygen in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.: Methods* **4**: 7-17.
- TIJSSEN S.B. (1981) - Anmerkungen zur photometrischen Winkler-sauerstoff-Titration und ihre Anwendung zur Schdtzung der Primarproduktion im Meer. In: *III Internationales hydromikrobiologisches Symposium*, Smedenice, 3-7 Juni 1980, Veda, Verlag der slowakischen Akademie der Wissensehaften, Bratislava: 343-353.
- TIJSSEN S.B., VAN BENNEKOM A.J. (1989) - High precision determination of dissolved oxygen. *ICES C.M. 1989/c:6*, Annex C: 11-12.
- WILLIAMS P.J. leB., JENKINSON N.W. (1982) - A transportable microprocessor controlled precise Winkler titration suitable for field station and shipboard use. *Limnol. Oceanogr.*, **27**: 576-584.

CAPITOLO 4. IL PH DELL'ACQUA DI MARE

A. Luchetta, P. Rivaro, G. Catalano, R. Messa

anna.luchetta@ts.ismar.cnr.it

4.1 INTRODUZIONE

Il pH (dal latino *pondus hydrogenii*, potenziale dell'idrogeno) è una scala di misura dell'acidità di una soluzione acquosa, ideata dal chimico danese Søren Sørensen nel 1909.

Per definizione il pH è uguale al logaritmo negativo, in base 10, della concentrazione in moli di ioni H^+ nel caso di una soluzione ideale (diluita); mentre nel caso di una soluzione non ideale (concentrata) con un'alta forza ionica, come è l'acqua di mare, diventa:

$$pH = -\log a_{(H^+)} \quad (1)$$

dove $a_{(H^+)}$ = attività degli ioni idrogeno.

È importante chiarire subito che la scala di concentrazione di riferimento usata in questo capitolo per dare i valori di pH è la *total hydrogen ion concentration*, mentre l'unità di misura adottata è il numero di moli per kg di acqua di mare (H^+/kg_{sw}). Questa espressione è la più comunemente adottata in oceanografia ed è raccomandata dai recenti protocolli internazionali (IOC e SCOR) e da Dickson *et al.*, 2007a.

L'esatta definizione dell'espressione della concentrazione di ioni idrogeno adottata deriva dall'uso dei pH-metri come strumenti di misura del pH e quindi dalla necessità di disporre di una scala che colleghi il potenziale letto dall'elettrodo a vetro in uno o più punti fissi con valore noto di pH.

Storicamente sono state usate anche altre scale (esempio quella derivata dall'uso di normali tamponi commerciali) e unità di misura (vedi prossimo paragrafo). Perciò quando si devono confrontare dati storici o dati provenienti da laboratori diversi è importante accertarsi della scala di riferimento e delle unità di misura usate prima di procedere al confronto dei valori.

L'acqua di mare è una soluzione tampone il cui valore di pH è mediamente vicino alle 8,0 unità. Il valore preciso dipende fortemente dall'effetto tampone esercitato dal sistema acido carbonico – carbonati:



Le reazioni sopra indicate implicano la partecipazione dell'anidride carbonica ad un equilibrio multiplo, regolato da costanti di equilibrio. Tutti i processi fisici, chimici e biologici che influiscono sulla concentrazione di anidride carbonica disciolta (aumentandola o facendola diminuire) possono quindi influire sul valore finale del pH, tramite quest'equilibrio multiplo.

Per esempio variazioni della temperatura e della salinità della superficie del mare o della pressione parziale atmosferica di CO_2 influiscono sulla solubilità dell'anidride carbonica in acqua (solubility pump); anche i processi di fotosintesi e respirazione del fitoplancton o di ossidazione della materia organica, sia disciolta che particellata, comportano variazioni dell'anidride carbonica disciolta (biological pump).

Le variazioni di pH indotte da queste reazioni sarebbero molto più grandi in assenza dell'effetto tampone esercitato proprio dal sistema carbonato. Valori di pH attorno alle 8,5 unità sono stati misurati in acque superficiali dove la forte attività fotosintetica consuma CO_2 , mentre valori più bassi del valore medio indicato sono stati osservati al di sotto dello strato eufotico, per effetto della rimineralizzazione

della materia organica. Valori inferiori a 7,5 sono stati registrati in corrispondenza del minimo di ossigeno nel Pacifico settentrionale.

Diversi studi hanno messo in evidenza il processo di acidificazione delle acque oceaniche in conseguenza dell'aumento di CO₂ atmosferica (Caldeira e Wickett 2003; Bates, 2007). In questo contesto è chiaro che per potere evidenziare minime variazioni di pH su grandi scale spazio-temporali è necessario disporre di metodi accurati e sensibili (Feely *et al.* 2009).

La determinazione del valore del pH di un campione d'acqua marina può essere eseguita attraverso due metodiche che saranno separatamente descritte qui di seguito: quella potenziometrica e quella spettrofotometrica (Byrne *et al.*, 1988; Clayton e Byrne, 1993; Dickson, 1993).

Nell'esecuzione di queste determinazioni è basilare seguire una metodologia standardizzata secondo protocolli internazionali (Dickson *et al.*, 2007b) specialmente in considerazione dell'estrema importanza dei risultati ottenuti per le tematiche dell'acidificazione dei mari e degli effetti del cambiamento climatico sul pH e sugli equilibri del sistema carbonato (solubility pump e biological pump del carbonio).

L'adozione di protocolli internazionali è importante anche quando vi sia la necessità di confrontare dati ottenuti dai vari laboratori sparsi nel mondo.

4.2 SCALE DI PH

Come precedentemente accennato, quando la grandezza da misurare è diversa da quella determinata dallo strumento di misura è necessario disporre di una scala che colleghi le due grandezze. Questo è il caso dei pH-metri che misurano un potenziale elettrico che bisogna poi trasformare in concentrazione o attività degli ioni idrogeno. La scala si costruirà disponendo di valori potenziale misurato in alcune soluzioni di riferimento, di cui è noto il valore di pH e di una legge fisica, in questo caso l'equazione di Nernst, che descrive il tipo di funzione (in questo caso lineare) che collega questi punti.

Il pH secondo la NBS (National Bureau of Standards) *scale* è definito come:

$$pH_{NBS} = -\log a_H \quad (6)$$

Questa scala che usa i tamponi diluiti del NBS (equivalenti ai tamponi commercialmente disponibili) come valori noti di riferimento per l'attività protonica a_H , non è però consigliata per misure in campioni di acqua di mare a causa della diversa forza ionica fra soluzioni tampone e campioni.

Pertanto per il pH dell'acqua di mare si usano tamponi a forza ionica più elevata e, a seconda di quale miscela tampone viene scelta, esistono tre scale diverse (Millero *et al.*, 1993).

La *free hydrogen ion scale* è definita da:

$$pH_F = -\log m(H^+) \quad (7)$$

In cui m è la concentrazione molale di ioni H⁺

La *total hydrogen ion scale* tiene conto della presenza dello ione solfato:

$$pH_T = -\log m^*(H^+) \quad (8)$$

dove $m^*(H^+) = m(H^+) + m(HSO_4^-) = m(H^+) [1 + m(SO_4^{2-})/k(HSO_4^-)]$,

$m(SO_4^{2-})$ è la *concentrazione molale* del solfato e $k(HSO_4^-)$ è la costante di dissociazione dello ione bisolfato.

L'uso di questa scala permette di misurare il pH effettuando la calibrazione con soluzioni contenenti SO₄²⁻, senza quindi dover definire le proprietà fisico-chimiche della costante di dissociazione dello ione bisolfato ($k(HSO_4^-)$).

La *seawater scale* include nella molalità degli ioni H^+ sia gli ioni solfato che i fluoruri:

$$pH_{SWS} = -\log m(H^+)_{SWS} \quad (9)$$

$$\begin{aligned} \text{dove } m(H^+)_{SWS} &= m(H^+) + m(HSO_4^-) + m(HF) = \\ &= m(H^+) [1 + m(SO_4^{2-})/k(HSO_4^-) + m(F^-)/k(HF)], \end{aligned}$$

$m(F^-)$ è la concentrazione molale del fluoruro e $k(HF)$ la costante di dissociazione dell'acido fluoridrico.

Secondo Dickson, 1993 l'effetto dello ione fluoruro non dovrebbe essere incluso nella definizione di pH per l'acqua di mare; sarebbe infatti più semplice considerarlo come specie minore del sistema acido-base, così come si tratta lo ione borato.

Le costanti di equilibrio riportate in letteratura sono espresse sia nella *seawater scale* che nella *total hydrogen ion scale*. La conversione del valore di pH da una scala all'altra avviene in base alla relazione:

$$pH_T = pH_{SWS} - \log \left\{ \frac{[1 + m(SO_4^{2-})/K(HSO_4^-)]}{[1 + m(SO_4^{2-})/K(HSO_4^-) + m(F^-)/K(HF)]} \right\} \quad (10)$$

in cui $pH_T = pH$ misurato nella *total hydrogen ion scale*.

Oltre alla scala che si decide usare, è importante esprimere l'unità di misura scelta. In oceanografia, infatti, si preferisce esprimere il pH in mol kg_{sw}^{-1} piuttosto che in molalità ($\text{mol kg}_{H_2O}^{-1}$). Dickson, 1993 fornisce la relazione che permette di convertire un'unità di misura nell'altra:

$$pH(\text{mol} * \text{kg} - SW) = pH(\text{mol} * \text{kg} - H_2O) - \log(1 - 0.00106S) \quad (11)$$

in cui S = salinità del campione

4.3 DETERMINAZIONE DEL PH DELL'ACQUA DI MARE MEDIANTE METODO POTENZIOMETRICO.

La metodica che sarà qui descritta si rifà alle procedure standard di lavoro raccomandate dalla Comunità Scientifica Internazionale (IOC e SCOR) raccolte in Dickson *et al.*, 2007a (SOP 6a).

Si tratta in particolare del metodo per la determinazione potenziometrica del pH dell'acqua di mare espresso nella *total hydrogen ion pH scale* ed in mol/kg_{sw} .

4.3.1 Principio del metodo

Per definizione il pH è dato dall'attività di un'unica specie chimica (ioni H^+) e non è quindi direttamente misurabile. La misura potenziometrica si basa sull'uso di una cella:

elettrodo di riferimento	soluzione concentrata di KCl	soluzione campione	elettrodo a vetro
-----------------------------	---------------------------------	-----------------------	----------------------

Si assume che l'elettrodo a vetro abbia un comportamento Nernstiano cioè lineare rispetto ai valori di pH. Quindi:

$$p(a_{(H^+)}) = \frac{(E^0 + E_j) - E}{RT \ln 10 / F} \quad (12)$$

dove E_j = potenziale di giunzione liquida tra le due semicelle

$$E^o = E^o + (RT/F) \ln a(\text{Cl}^-)_{\text{KCl}}$$

E = potenziale della soluzione campione

R = costante dei gas

T = temperatura assoluta (°K)

F = costante di Faraday

Se questa cella viene usata per misurare sequenzialmente due soluzioni, una campione (X) e una di riferimento (S), allora:

$$\text{p}a(\text{H}^+)_{\text{X}} - \text{p}a(\text{H}^+)_{\text{S}} = \frac{E_{\text{S}} - E_{\text{X}}}{RT \ln 10 / F} + \frac{\Delta E_{\text{J}}}{RT \ln 10 / F} \quad (13)$$

dove ΔE_{J} è il potenziale di giunzione residuo, ovvero la differenza del potenziale di giunzione tra la soluzione campione e di riferimento.

L'equazione (7) è la base della definizione operativa del pH:

$$\text{pH}_{(\text{X})} = \text{pH}_{(\text{S})} + \frac{E_{\text{S}} - E_{\text{X}}}{RT \ln 10 / F} \quad (14)$$

secondo quanto riportato in IUPAC,1979 e Covington *et al.*,1985. Secondo questa definizione la cella descritta in precedenza può essere usata per misurare differenze di pH mediante potenziometria se si considera trascurabile il potenziale di giunzione residuo. L'approssimare il ΔE_{J} a zero fa commettere un errore che è minimizzato se la composizione della soluzione di riferimento è simile a quella del campione di acqua di mare. Da accurate e precise misure in laboratorio, eseguite usando celle senza giunzione liquida, sono stati assegnati i valori di $\text{pH}_{(\text{S})}$ a diverse soluzioni standard preparate in acqua di mare artificiale (miscela tampone).

4.3.2 Schema delle operazioni in mare

Il prelievo dei campioni dalle bottiglie Niskin va effettuato prima che sia stata prelevata circa metà dell'acqua contenuta nella Niskin e comunque entro 10 minuti da quando la rosette è a bordo e dieci minuti dall'inizio delle operazioni di prelievo. Questo accorgimento è necessario per minimizzare la perdita di CO_2 dal campione causata dall'ingresso di aria nel corso del prelievo di acqua.

L'avvelenamento con HgCl_2 (necessario per fermare l'attività biologica che altererebbe il contenuto di CO_2 e gli equilibri chimici presenti al momento del campionamento) non è necessario per la determinazione del pH se il campione viene raccolto in bottiglie di piccole dimensioni e se l'analisi viene effettuata immediatamente dopo il prelievo.

4.3.2.1 Attrezzatura

- tubi flessibili in Tygon®, lunghi abbastanza da raggiungere il fondo delle bottiglie in cui viene raccolto il campione e pretrattati lasciandoli in ammollo in acqua di mare per almeno un giorno (per evitare la formazione di bolle nel tubo);
 - contenitore di misura a chiusura ermetica solitamente bottiglie in vetro tipo BOD (affinché il campione non sia soggetto a scambi di CO_2 con l'atmosfera);
 - micropipetta a volume variabile (50-250 μl);
- soluzione satura di HgCl_2 .

4.3.2.2 Procedura di campionamento

I campioni devono essere prelevati dalla bottiglia Niskin (o da altro campionatore) subito dopo quelli dell'ossigeno, utilizzando la stessa tecnica per evitare di fare bolle ed introdurre aria nel campione, seguendo lo schema:

-
1. normalizzare due volte la bottiglia (se non precedentemente lavata);
 2. riempire la bottiglia dal fondo mediante il tubo flessibile e far traboccare almeno metà del volume totale (meglio l'intero), facendo particolare attenzione ad evitare la formazione di bolle;
 3. aggiungere una quantità di soluzione satura di HgCl_2 pari ad almeno lo 0,02% del volume del campione;
 4. chiudere accuratamente.

4.3.2.3 Conservazione dei campioni

I campioni vanno conservati al buio e in ambiente refrigerato fino al momento dell'analisi (+ 4°C) ma senza raggiungere mai condizioni di congelamento.

4.3.3 Schema delle operazioni in laboratorio

4.3.3.1 Attrezzatura

- Cella di pH (di solito un elettrodo a vetro e di riferimento a calomelano combinati, anche se l'uso dei due elettrodi separati aumenta la qualità della misura);
- pH-metro o altro voltmetro ad elevata impedenza ($>10^{13} \Omega$) per la misura dell'e.m.f. della cella. L'uso di un pH-metro con sensibilità pari a $\pm 0,1$ mV rende possibile la discriminazione del valore del pH alla terza cifra decimale ($\pm 0,002$ unità di pH); l'accuratezza della misura dipende comunque dall'affidabilità dei valori di pH assegnati alle soluzioni tampone usate;
- contenitore di misura a chiusura ermetica;
- termometro con accuratezza $\pm 0,05^\circ\text{C}$ (in modo da controllare la temperatura al decimo di grado durante la misura).

4.3.3.2 Prodotti chimici

- NaCl (grado reagente) da essiccare in forno a 110°C ;
- Na_2SO_4 (grado reagente) da essiccare in forno a 110°C ;
- KCl (grado reagente) da essiccare in forno a 110°C ;
- MgCl_2 (grado reagente);
- CaCl_2 (grado reagente);
- HCl di grado suprapur;
- 2-amino-2-idrossimetil-1,3-propandiolo ("TRIS");
- 2-aminopiridina;
- acqua deionizzata;

4.3.3.3 Reagenti

- acqua artificiale, la cui preparazione richiede:
 - NaCl;
 - Na_2SO_4 ;
 - KCl;
 - soluzione calibrata di MgCl_2 ;
 - soluzione calibrata di CaCl_2 ;
 - acqua deionizzata.
- soluzioni tampone (total hydrogen ion scale), la cui preparazione richiede:
 - soluzione calibrata di HCl, con concentrazione nota allo 0,1%;
 - 2-amino-2-idrossimetil-1,3-propandiolo ("TRIS");
 - 2-aminopiridina.

4.3.3.4 Preparazione dei reagenti

La composizione di una soluzione tampone di TRIS/HCl e di 2-aminopiridina/HCl in acqua di mare artificiale a salinità 35 è la seguente (Tab. 1):

Tab. 1 - Composizione di un tampone TRIS/HCl e 2-aminopiridina/HCl in acqua di mare artificiale a S=35,00

Costituenti	Moli	Peso (gr)
NaCl	0,38762	22,6446
KCl	0,01058	0,7884
MgCl ₂	0,05474	-
CaCl ₂	0,01075	-
Na ₂ SO ₄	0,02927	4,1563
HCl	0,04000	-
<i>Uno tra:</i>		
2-amino-2-idrossimetil-1,3-propandiolo ("TRIS")	0,08000	9,6837
2-aminopiridina	0,08000	7,5231
<i>Peso totale della soluzione contenente:</i>		
2-amino-2-idrossimetil-1,3-propandiolo ("TRIS")	-	1044,09
2-aminopiridina	-	1041,93

Questi valori sono calcolati in base alla composizione di un'acqua di mare artificiale (S = 35) in cui 0,04 mol/kg_{H₂O} di NaCl sono sostituiti da 0,04 mol/kg_{H₂O} di HCl e in cui vengono aggiunte 0,08 mol/kg_{H₂O} della base desiderata. La soluzione tampone così preparata può essere conservata a lungo (alcune settimane) in un contenitore sigillato e pieno.

Per calcolare la composizione della soluzione tampone in un'acqua di mare artificiale a salinità diversa da 35, si usa la relazione:

$$m_s = m_{35} \left(\frac{25.5695S}{1000 - 1.0019S} \right) \quad (15)$$

In base a questa si calcola la composizione dell'acqua di mare artificiale (senza alcuna base nè HCl) e poi si corregge il valore di $m(\text{NaCl})$ sottraendogli 0,04 mol/kg_{H₂O} e aggiungendo 0,08 mol/kg_{H₂O} della base.

4.3.3.5 Procedura analitica

1. Controllo della cella per verificare che gli elettrodi abbiano effettivamente una risposta ideale in base all'equazione di Nernst: entrambe le soluzioni tampone (TRIS e 2-aminopiridina) vengono termostatate a 25°C e se ne misura il potenziale (mV).

La risposta dell'elettrodo (s) è data da:

$$s = \frac{E_{AMP} - E_{TRIS}}{pH(S)_{TRIS} - pH(S)_{AMP}} \quad (16)$$

$$pH(S)_{TRIS} = (11911,08 - 18,2499S - 0,039336S^2) [1/(T/K)] - 366,27059 + 0,53993607S + 0,00016329S^2 + (64,52243 - 0,084041S) \ln(T/K) - 0,11149858(T/K) \quad (17)$$

$$pH(S)_{AMP} = (111,35 + 5,44875S) [1/(T/K)] + 41,6775 - 0,015683S - 6,20815 \ln(T/K) - \log_{10}(1 - 0,00106S) \quad (18)$$

Il valore di s così calcolato deve essere confrontato con il valore ideale di Nernst ($RT \ln 10 / F$). Se i due differiscono di più dello 0,3%, gli elettrodi devono essere sostituiti. Inoltre il potenziale misurato dalla cella dovrebbe essere stabile nel tempo (con un drift $< 0,05 \text{ mV min}^{-1}$).

- Misura del potenziale (mV) della soluzione tampone “TRIS” (E_s) e del campione (E_x) portati alla stessa temperatura (25°C); è importante cercare di limitare l’esposizione del campione di acqua di mare all’atmosfera così da minimizzare lo scambio di CO_2 .
- Calcolo del pH del campione in base alla relazione:

$$\text{pH}(X) = \text{pH}(S) + \frac{E_s - E_x}{RT \ln 10 / F} \quad (19)$$

Come già detto, $\text{pH}(X)$ e $\text{pH}(S)$ sono espressi nella *total hydrogen ion scale*, in $\text{mol/kg}_{\text{sw}}$ e si riferiscono alla misura del pH a 25°C .

4.3.3.6 Precisione e accuratezza del metodo

Questa metodica, se applicata con attenzione, permette di raggiungere una precisione di 0,003 unità di pH. L’accuratezza dipende molto dalla preparazione della soluzione tampone di riferimento, e in particolare modo dal rapporto reale tra TRIS e HCl nel tampone.

4.4 DETERMINAZIONE DEL PH DELL’ACQUA DI MARE MEDIANTE METODO SPETTROFOTOMETRICO.

Recentemente è stato proposto come metodo di misura del valore del pH dell’acqua di mare quello spettrofotometrico, che consiste nel misurare l’assorbimento nel visibile di un indicatore colorato di pH aggiunto al campione d’acqua di mare. La misura è precisa, sensibile, e teoricamente libera dalla necessità calibrazioni (di rette di taratura), ma la strumentazione è più costosa e la velocità d’analisi minore rispetto al metodo potenziometrico (Dickson 1993).

Per confrontare i valori di pH ottenuti da questo metodo con quelli potenziometrici si deve tenere presente che la scala potenziometrica cui si fa riferimento è la “*total hydrogen ion concentration pH scale*”, mentre l’unità di misura è il numero di moli $\text{H}^+/\text{kg}_{\text{sw}}$.

La procedura che sarà qui descritta si rifà alle procedure standard di lavoro raccomandate dalla Comunità Scientifica Internazionale (IOC e SCOR) raccolte in Dickson *et al.*, 2007b (SOP 6b).

4.4.1 Principio del metodo

Il metodo si basa sull’assorbimento a tre diverse lunghezze d’onda (730, 578 e 434 nm) di un campione d’acqua di mare a cui sia stato aggiunto un indicatore colorato; la misura viene eseguita a T costante (25°C). L’aggiunta dell’indicatore influisce sul valore di pH del campione, perciò si dovrà correggere il suo effetto. Per gli indicatori solfonftaleinici (porpora di m-cresolo nel nostro caso), l’equilibrio che interessa è quello della seconda dissociazione:



poiché l’indicatore è presente ad una bassa concentrazione nel campione, la concentrazione totale di ioni idrogeno nell’acqua di mare può essere determinata usando la seguente espressione:

$$\text{pH} = \text{pK}(\text{HI}) + \log [\text{I}^2] / [\text{HI}] \quad (21)$$

La determinazione si basa sul fatto che le diverse forme dell’indicatore abbiano spettri di assorbimento diversi. Così le informazioni contenute nello spettro possono essere usate per stimare il rapporto $[\text{I}^2] / [\text{HI}]$.

Ad una singola lunghezza d'onda λ , l'assorbanza misurata in una cella con un cammino ottico l è data dalla legge di Lambert-Beer:

$$A\lambda / l = \varepsilon\lambda(\text{HI}^-) * [\text{HI}^-] + \varepsilon\lambda(\text{I}^{2-}) * [\text{I}^{2-}] + B\lambda + e \quad (22)$$

dove $B\lambda$ corrisponde al “background” dell'assorbanza del campione ed “e” è l'errore dovuto al “noise” dello strumento. A condizione che i valori dei coefficienti di estinzione $\varepsilon\lambda(\text{HI}^-)$ e $\varepsilon\lambda(\text{I}^{2-})$ siano misurati in funzione della lunghezza d'onda, le misure di assorbanza a due o più lunghezze d'onda possono essere usate per stimare il rapporto $[\text{I}^{2-}] / [\text{HI}^-]$.

Nel caso in cui si usino solo due lunghezze d'onda, e a condizione che il “background” possa essere effettivamente eliminato da una procedura sottrattiva, l'equazione (3) può essere ri-arrangiata per dare:

$$[\text{I}^{2-}]/[\text{HI}^-] = (A_1/A_2 - \varepsilon_1(\text{HI}^-)/\varepsilon_2(\text{HI}^-)) / (\varepsilon_1(\text{I}^{2-})/\varepsilon_2(\text{HI}^-) - (A_1/A_2) * \varepsilon_2(\text{I}^{2-})/\varepsilon_2(\text{HI}^-)) \quad (23)$$

i numeri 1 e 2 si riferiscono alle lunghezze d'onda scelte. Per avere una migliore sensibilità le lunghezze d'onda corrispondono ai massimi assorbimenti delle forme basiche (I^{2-}) e acide (HI^-) usate. I diversi termini ε sono i coefficienti di estinzione delle specifiche specie alle lunghezze d'onda 1 e 2 rispettivamente.

4.4.2 Schema delle operazioni in mare

4.4.2.1 Attrezzatura

- Celle cilindriche in vetro ottico, con cammino ottico: 10 cm, due colli e tappo in PTFE. Si consiglia un numero di celle sufficiente a raccogliere tutti i campioni di una stessa calata.
- Tubicino di campionamento (come quelli per ossigeno disciolto) di dimensioni adatte ad essere inserito nel collo della cella.

4.4.2.2 Procedura di campionamento

Prelevare i campioni dalla bottiglia Niskin (o da altro campionatore) subito dopo quelli dell'ossigeno usando la stessa tecnica. Si campiona direttamente nella cella cilindrica in vetro ottico:

1. avvinare la cella un paio di volte
2. riempirla lentamente dal fondo, evitando le bolle d'aria; lasciar fuoriuscire abbondantemente il campione (volume dell'intera cella)
- 3.appare la cella subito, evitando di intrappolare bolle d'aria.

4.4.2.3 Conservazione dei campioni

I campioni vanno conservati refrigerati (+ 4 °C) al buio fino al momento dell'analisi, che va eseguita entro poche ore dal campionamento.

4.4.3 Schema delle operazioni in laboratorio

4.4.3.1 Attrezzatura

- Sistema per la pre-termostatazione (a circa 25 °C) delle celle (stufa ad aria o bagno termostatico)
- Spettrofotometro di ottima qualità, a doppio raggio (eventualmente singolo raggio) con portacelle termostato
- Sistema per la termostatazione del portacelle con controllo fine della temperatura ($\pm 0,1$ °C), preferibilmente ad effetto Peltier.

-
- Cavi per i vari collegamenti
 - Carta per pulire le celle
 - Micropipetta da 50 μl con puntali per indicatore

4.4.3.2 Reagenti

- Indicatore: porpora di m-cresol (2 mmol l^{-1})
- Soluzione di NaOH 0,1 M
- Acqua milli-Q per il bianco

4.4.3.3 Preparazione dei reagenti

Indicatore

Per preparare una soluzione concentrata (almeno 2 mmol l^{-1}) a pH noto, intorno a valore $7,9 \pm 0,1$ unità di pH in modo che abbia un rapporto A_{578}/A_{434} di circa 1,6, pesare con molta accuratezza 0,076488 g di porpora di m-cresol e scioglierli in acqua milli-Q portando a volume in un matraccio tarato da 0,1 l. Controllare il valore del rapporto A_{578}/A_{434} della soluzione ottenuta (usando una cella con cammino ottico da 0,5 mm). Se non corrisponde al valore voluto di 1,6 che è circa il valore che si ottiene per i campioni di acqua di mare, portarlo al valore voluto mediante piccole aggiunte di una soluzione di NaOH 0,1 M.

Procedura analitica

Il campione (in cella cilindrica) viene messo a pre-termostatare a 25 °C per circa 10-15 min; quando è pronto la cella viene pulita esternamente e messa nel portacelle termostato dello spettrofotometro. Si fanno passare un paio di minuti prima di procedere alla prima lettura dell'assorbanza alle 3 lunghezze previste: quella a cui l'indicatore non assorbe (730 nm), quella a cui la forma basica (I^2) dell'indicatore assorbe al massimo (578 nm), quella a cui la forma acida (HI^-) assorbe al massimo (434 nm). Quindi si aggiungono 50 μl di indicatore, si ri-tappa la cella badando che non si formino bolle d'aria, si agita bene per mescolare indicatore e campione. Si rimette la cella nel portacelle termostato dove si lascia sviluppare il colore per 5 minuti prima di eseguire la seconda lettura. I valori di assorbimento devono essere compresi tra 0,4 e 1,0 per ciascuno dei due picchi di assorbimento. terminate le letture si potrà procedere ad una nuova misurazione.

4.4.4 Calcoli ed espressione del risultato

4.4.4.1 Correzione delle misure di assorbimento

Per ognuna delle tre lunghezze d'onda, si sottrae l'assorbanza del campione da solo all'assorbanza del campione contenente l'indicatore.

L'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di "non-assorbimento" (730 nm) serve anche per monitorare e correggere un qualsiasi spostamento della linea di base o per errore nel riposizionamento della cella, o per shift strumentale. Questo significa che la grandezza di qualsiasi spostamento della linea di base è identico attraverso lo spettro visibile. Sottraendo così la misura dello spostamento dal "background" alle lunghezze d'onda 1 e 2 si ottiene l'assorbanza finale corretta ad ogni lunghezza d'onda.

Questi valori finali sono utilizzati per calcolare A_1/A_2 , il rapporto di assorbimenti che descrive il grado di protonazione dell'indicatore.

4.4.4.2 Calcolo del pH dell'acqua + indicatore

Il pH dell'acqua di mare con l'indicatore è dato dalla seguente espressione:

$$\text{pH} = \text{pK}_2 + \log \left(\frac{(A_1/A_2 - \epsilon_1(\text{HI}^-) / \epsilon_2(\text{HI}^-)) / (\epsilon_1(\text{I}^{2-}) / \epsilon_2(\text{HI}^-) - (A_1 / A_2) * \epsilon_2(\text{I}^{2-}) / \epsilon_2(\text{HI}^-)}{\epsilon_1(\text{I}^{2-}) / \epsilon_2(\text{HI}^-)} \right) \quad (24)$$

pK_2 è la costante di dissociazione acida per la specie HI^- (espressa nella scala di concentrazione di ioni idrogeno totali in mol Kg-soln⁻¹), A_1 e A_2 sono le assorbanze corrette misurate alle lunghezze d'onda di massimo assorbimento della forma basica ed acida rispettivamente. I vari coefficienti di estinzione ϵ corrispondono ai valori misurati per le specifiche specie alle lunghezze d'onda 1 e 2 rispettivamente. In cui:

$$\epsilon_1(\text{HI}^-) / \epsilon_2(\text{HI}^-) = 0,00691$$

$$\epsilon_1(\text{I}^{2-}) / \epsilon_2(\text{HI}^-) = 2,2220$$

$$\epsilon_2(\text{I}^{2-}) / \epsilon_2(\text{HI}^-) = 0,1331$$

La costante di equilibrio K_2 è funzione della salinità (S) e della temperatura (T) e deve essere determinata in modo accurato sperimentalmente. Per il m-cresol purple è:

$$\text{pK}_2 = 1245,69 / (T/K) + 3,8275 + 0,00211 * (35 - S) \quad (25)$$

dove $293 \leq T/K \leq 303$ e $30 \leq S \leq 37$.

4.4.4.3 Correzione del pH dovuta all'aggiunta dell'indicatore

L'aggiunta dell'indicatore al campione di acqua di mare perturba il suo pH (un altro sistema acido-base è stato aggiunto). Sebbene la perturbazione di pH possa essere calcolata dalla conoscenza degli equilibri chimici del campione e dell'indicatore, è più semplice valutare la grandezza della correzione empiricamente nel seguente modo: viene fatta una coppia di aggiunte di indicatore ad ogni serie di campioni di acqua di mare con diversi pHs, e il cambiamento del rapporto A_1/A_2 , con la seconda aggiunta dell'indicatore, è determinato come una funzione del valore A_1/A_2 misurato dopo la prima aggiunta. Questa funzione è:

$$(\Delta(A_1 / A_2)) / V = a + b * (A_1 / A_2) \quad (26)$$

dove V è il volume di indicatore aggiunto. Il rapporto finale di assorbanza corretto è:

$$(A_1 / A_2)_{\text{corr}} = (A_1 / A_2) - V * (a + b * (A_1 / A_2)) \quad (27)$$

Esempio di calcolo (DOE 2007, SOP 6b):

campione seawater S= 38,4508 T_{analisi} = 25,0 °C pK₂ = 7,9983

Assorbanze misurate:

campione A₇₃₀ = 0,1716 A₅₇₈ = 0,1114 A₄₃₄ = 0,1224

campione + indicatore A₇₃₀ = 0,1726 A₅₇₈ = 0,7230 A₄₃₄ = 0,4437

$$A_{578}/A_{434} = 1,8999$$

che corretto per il volume di indicatore aggiunto, secondo eq. 27 in cui V=0,05 ml, a=0,125 e b= 0,147, darà $(A_{578}/A_{434})_{\text{corr}} = 1,8797$

applicando eq. 24 si otterrà il valore di $\text{pH}_T = 7,976$

A questo punto per riportare i valori di pH ottenuti a 25 C alla temperatura in situ, si utilizza la relazione usata da (Millero, 2007), che vale per campioni con temperatura variabile da 0 a 40 °C e salinità compresa tra 30 e 40:

$$\text{pH}_T = \text{pH}_{298} + A + B (T - 298) + C (T - 298)^2 \quad (28)$$

in cui:

$$A = -2,6492 - 0,0011019 S + 4,9319 \times 10^{-6} S^2 + 5,187 X - 2,158 X^2$$

$$B = 0,10265 - 0,20322 X + 0,084431 X + 3,1618 \times 10^{-5} S$$

$$C = 4,4528 \times 10^{-5}$$

$$X = \text{TA}/\text{TCO}_2 = 1,09$$

Questa formula dovrebbe fornire valori di pH compresi tra 7,5 e 8,5

4.4.5 Precisione ed accuratezza del metodo

La deviazione standard (precisione) ottenuta è $\pm 0,001$ unità di pH.

L'accuratezza è <0.005 unità di pH.

4.5 BIBLIOGRAFIA

- BATES N.R. (2007) - Interannual variability of the oceanic CO₂ sink in the subtropical gyre of the North Atlantic Ocean over the last two decades. *J. Geophys. Res.*, **112**:C09013.
- BYRNE R.H., ROBERT-BALDO, G. THOMPSON S.W., CHEN C.T.A. (1988) - Seawater pH measurements: an at-sea comparison of spectrophotometric and potentiometric methods. *Deep Sea Res. PT I*, **35**: 1405-1410.
- CALDEIRA K., WICKETT M.E. (2003) - Anthropogenic carbon and ocean pH. *Nature* **425**: 365.
- CLAYTON T.D, BYRNE, R.H. (1993) - Spectrophotometric seawater pH measurements: Total hydrogen ion concentration scale calibration of m-cresol purple and at-sea results. *Deep Sea Res. PT I*, **40**: 2115-2129.
- COVINGTON A.K., BATES R.G., DURST R.A. (1985) - Definition of pH scales, standard reference values, measurements of pH and related terminology. *Pure Appl.Chem.*, **57**: 531-542.
- DICKSON A.G. (1993) - The measurement of sea water pH. *Mar. Chem.*, **44**: 131-142.
- DICKSON A.G., SABINE, C.L., CHRISTIAN, J.R. (2007a) - SOP 6a. Determination of the pH of seawater using glass/reference electrode cell. In: Dickson A.G., Sabine C.L., Christian J.R. (eds.), *Guide to the best practices for ocean CO₂ measurements.*, PICES Special Publication 3: 191 pp.
- DICKSON A.G., SABINE C.L., CHRISTIAN J.R. (2007b) - SOP 6b. Determination of the pH of seawater using the indicator dye m-cresol purple. In: Dickson A.G., Sabine C.L., Christian J.R. (eds.), *Guide to the best practices for ocean CO₂ measurements.*, PICES Special Publication 3: 191 pp.
- FEELY R.A., FABRY V., DICKSON A., GATTUSO J.P., BIJMA J., RIEBESELL U., DONEY S., TURLEY C., SAINO T., LEE K., ANTHONY K., KLEYPAS J. (2009) - *An International Network for Ocean Acidification. Community White Paper.* OceanObs09, Venice 21-25 Sept. 2009 at web site <http://oceanobs.org>
- IUPAC, 1979. Manual of symbols and terminology for physicochemical quantities and units. *Pure Appl. Chem.*, **1**: 41 pp.
- MILLERO F.J., ZHANG J.-Z., FIOLE S., SOTOLONGO S., ROY R.N., LEE K., MANE S. (1993) - The use of buffers to measure the pH of seawater. *Mar. Chem.*, **44**: 143-152.
- MILLERO F.J. (2007) - The Marine Inorganic Carbon Cycle. *Chem. Rev.*, **107**: 308-341.

CAPITOLO 5. ALCALINITÀ TOTALE E CARBONIO INORGANICO TOTALE

P. Rivaro, A. Luchetta, G. Catalano, R. Messa

rivaro@chimica.unige.it

5.1 INTRODUZIONE

L'evidenza scientifica dell'aumento in atmosfera della concentrazione di gas a effetto serra, soprattutto CO₂, di questi ultimi decenni ha generato un dibattito all'interno della comunità scientifica internazionale e nella società civile, sul ruolo dell'uomo sui cambiamenti climatici che coinvolgono il pianeta e sul modo in cui il sistema Terra potrà rispondere.

Diversi processi correlati al ciclo biogeochimico del carbonio nell'ecosistema marino, ad esempio l'acidificazione dei mari o la dissoluzione dei carbonati, risentono dell'aumento atmosferico della CO₂. In questo quadro, misure attendibili e precise di CO₂ disciolta in mare diventano fondamentali per poter stimare il flusso netto di C tra oceano e atmosfera e per rendere più attendibili gli scenari futuri delineati su basi modellistiche.

Il Carbonio Inorganico Totale (C_T), definito anche CO₂ totale disciolta o DIC (Dissolved Inorganic Carbon), è la quantità di carbonio inorganico disciolto in un campione d'acqua di mare (Millero *et al.*, 1993):

$$C_T = [\text{CO}_2^*] + [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] \quad (1)$$

in cui la specie CO₂^{*}(aq) è la somma delle concentrazioni delle due specie CO₂(aq) e H₂CO₃(aq), che non possono essere determinate individualmente.

Il processo di dissoluzione dell'anidride carbonica in mare (equazione 2) segue la legge di Henry e dipende quindi dalla pressione parziale in atmosfera della CO₂, dalla temperatura del mare e dalla variabile non termodinamica della salinità.



La CO₂^{*}(aq) interagendo con il sistema tampone acido carbonico-carbonati prende parte ad una serie di reazioni che si possono schematizzare con una serie di equilibri termodinamici (equazioni 3 e 4) regolati da costanti di equilibrio note (equazioni 5, 6, 7):



$$K_0 = [\text{CO}_2^*] / f(\text{CO}_2) \quad (5)$$

$$K_1 = [\text{H}^+][\text{HCO}_3^-] / [\text{CO}_2^*] \quad (6)$$

$$K_2 = [\text{H}^+][\text{CO}_3^{2-}] / [\text{HCO}_3^-] \quad (7)$$

In queste equazioni $f(\text{CO}_2)$ è la fugacità o pressione parziale reale della CO₂ in fase gassosa e le specie del C inorganico sono espresse in termini di concentrazione totale stechiometrica. Le costanti di equilibrio dipendono da temperatura e salinità dell'acqua di mare e sono state calcolate e riportate in diversi lavori (Roy *et al.*, 1993; Millero *et al.*, 2002; Millero *et al.*, 2006).

Il sistema dei carbonati è molto importante dal momento che regola il pH dell'acqua di mare e controlla il ricircolo della CO₂ tra biosfera, litosfera, atmosfera e oceani.

Le specie coinvolte nel sistema di equilibri non sono tutte direttamente misurabili, ma per poterle

definire si impiegano 4 parametri: pressione parziale (o fugacità) della CO₂ (pCO₂) disciolta in acqua di mare, carbonio inorganico totale (DIC), Alcalinità totale (A_T) e pH.

Per poter determinare la distribuzione delle diverse specie di C inorganico nel sistema, a una data temperatura e salinità, occorre misurare in un campione di acqua di mare almeno 2 dei 4 parametri sopra citati.

Il carbonio inorganico totale, in particolare, si può determinare sia con misure dirette che con un calcolo (metodo indiretto) a partire dalla misura di altri due parametri del sistema carbonato.

Sono metodi diretti:

- la misura coulombometrica, gas cromatografica o IR della concentrazione di CO₂ totale, ottenuta acidificando il campione ed estraendo l'anidride carbonica così prodotta in corrente di gas inerte (Skirrow G., 1975; DOE 2007, SOP 2)
- la determinazione potenziometrica in cella chiusa (doppio fessio) eseguita titolando il campione con HCl (DOE 2007, SOP 3a)

È metodo indiretto il calcolo del carbonio inorganico totale a partire da misure di alcalinità totale e di pH. Questo calcolo si basa sulla definizione (1) già data del carbonio inorganico totale

$$\text{DIC} = [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_3^{2-}] + [\text{CO}_2] \quad (1)$$

esprimendo le concentrazioni come

$$[\text{HCO}_3^-] = (A_t - \sum B_i) / (1 + k_2^* / [\text{H}^+]) \quad (8)$$

$$[\text{CO}_3^{2-}] = (A_t - \sum B_i) k_2^* / [\text{H}^+] + 2k_2^* \quad (9)$$

$$[\text{CO}_2] = \{(A_t - \sum B_i) [\text{H}^+] / k_1^*\} / (1 + 2k_2^* / [\text{H}^+]) \quad (10)$$

in cui

$$\sum B_i = [\text{B(OH)}_4^-] + [\text{SiO(OH)}_3^-] + [\text{OH}^-] + [\text{HPO}_4^{2-}] + [\text{PO}_4^{3-}] + [\text{NH}_3] + [\text{HS}^-] + (\text{specie minori o non identificate}) - [\text{H}^+]_{\text{Free}} - [\text{HSO}_4^-] - [\text{HF}] - [\text{H}_3\text{PO}_4] - (\text{specie minori o non identificate}). \quad (11)$$

k_1^* , k_2^* , $[\text{H}^+]$ sono le costanti di equilibrio e la concentrazione di ioni H⁺ determinate per T, S e P *in situ* e sostituendole nell'eq. 1 si ottiene una relazione matematica complessa (descritta in DOE 2007), che permette di calcolare il DIC dalle misure di A_T e pH.

In questo manuale si descriverà il metodo indiretto.

5.2 METODO INDIRETTO

Il metodo qui descritto si rifà alle procedure standard di lavoro raccomandate dalla Comunità Scientifica Internazionale (IOC e SCOR) raccolte in: DOE, SOP 3b (2007). La concentrazione di carbonio inorganico disciolto totale si ricava, tramite programmi di calcolo, dalle misure dirette dell'alcalinità totale (determinata con una titolazione potenziometrica con HCl in cella aperta) e del pH (ricavato per via potenziometrica o spettrofotometrica).

L'alcalinità totale (A_T) è definita come "il numero di moli di ioni H⁺ equivalenti necessari a neutralizzare l'eccesso di accettori di protoni (basi formate da acidi deboli con costante di dissociazione $K \leq 10^{-4.5}$ a 25°C e a forza ionica 0) rispetto ai donatori di protoni (acidi con $K \geq 10^{-4.5}$) in 1 kg di acqua di mare" (DOE 2007).

Secondo la definizione data:

$$A_T = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{B}(\text{OH})_4^-] + [\text{SiO}(\text{OH})_3^-] + [\text{OH}^-] + [\text{HPO}_4^{2-}] + [\text{PO}_4^{3-}] + [\text{NH}_3] + [\text{HS}^-] + (\text{specie minori o non identificate}) - [\text{H}^+]_{\text{Free}} - [\text{HSO}_4^-] - [\text{HF}] - [\text{H}_3\text{PO}_4] - (\text{specie minori o non identificate}) \quad (12).$$

In realtà, come si vede dalla Tab. 1, il valore dell'alcalinità totale è determinato principalmente dal contributo degli ioni bicarbonato (HCO_3^-) e carbonato (CO_3^{2-}) (rispettivamente per l'89,8% e il 6,7%) e in parte minore da quello dello ione borato [$\text{B}(\text{OH})_4^-$] (2,9%). Il contributo delle altre specie è percentualmente trascurabile e viene quindi determinato usando le costanti di dissociazione dei rispettivi acidi (Millero *et al.*, 1993).

In casi particolari, come in situazioni di anossia, si può avere un contributo significativo da parte di altre specie (come NH_3 e HS^-).

Tab. 1. - Contributo percentuale delle singole specie all'alcalinità totale.

Specie	Contributo% A_T
HCO_3^-	89,8
CO_3^{2-}	6,7
$\text{B}(\text{OH})_4^-$	2,9
$\text{SiO}(\text{OH})_3^-$	0,2
OH^-	0,1
HPO_4^{2-}	0,1

L'unità di misura adottata per l'alcalinità totale è $\mu\text{mol H}^+ \text{kg}^{-1}\text{-SW}$. I suoi valori sono spesso correlati ai valori di salinità; ciò non sorprende dal momento che in situazioni normali lo ione bicarbonato (HCO_3^-) è uno dei costituenti maggiori dell'acqua di mare.

5.3 PRINCIPIO DEL METODO

L'alcalinità totale di un campione di acqua di mare è determinata con una titolazione a cella aperta, impiegando come titolante HCl diluito, si individua il punto finale per via potenziometrica.

Una quantità nota di acqua di mare viene titolata, a temperatura costante, con una soluzione di HCl 0,1 M. La titolazione è monitorata dall'elettrodo a vetro che misura le variazioni del potenziale della cella dopo ogni aggiunta di titolante. Il dato di alcalinità è ricavato a partire dai valori dei volumi di titolante aggiunto e dei rispettivi potenziali misurati, usando un metodo matematico per approssimare la curva ed individuare il punto di flesso corrispondente alla conversione di tutti gli ioni HCO_3^- in H_2CO_3 .

L'impiego della cella aperta consente di pesare con precisione una quantità definita di acqua di mare, semplificando la procedura rispetto all'impiego di una cella chiusa che rende difficoltosa la corretta determinazione del volume del campione. Il metodo indicato in questo capitolo utilizza la cella aperta.

In generale, una quantità nota di acqua di mare viene posta nella cella termostata a 25°C, e acidificata con una singola aggiunta di titolante in modo che il pH sia compreso tra 5,5 e 5,8. La soluzione viene mantenuta in agitazione per almeno 10 minuti per permettere alla CO_2 , prodotta dall'aggiunta di acido, di degasare. Successivamente la titolazione prosegue con aggiunte di HCl fino al raggiungimento di un valore di pH circa 3. Questa procedura in due step permette di valutare il punto finale della titolazione senza distinguere il contributo delle singole specie del sistema carbonato.

L'acido cloridrico utilizzato come titolante è preparato in una soluzione di NaCl 0,6 M in modo da approssimare la forza ionica del campione di acqua di mare (pari a circa 0,7 M) e mantenere costanti i coefficienti di attività durante la titolazione.

Una volta determinata l'alcalinità totale, l'algoritmo di calcolo applicato per derivare il valore di CO₂ totale richiede la conoscenza del pH che sarà stato determinato con uno dei due metodi (potenziometrico o spettrofotometrico) riportati nel capitolo specifico di questo manuale.

5.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

5.4.1 Attrezzatura

- bottiglie in vetro borosilicato del tipo BOD, aventi capacità 500 ml
- tubi flessibili in Tygon®;
- micropipetta a volume variabile (50-250 µl);
- soluzione satura di HgCl₂.

5.4.2 Procedura di campionamento

Il prelievo del campione dalla bottiglia Niskin successivo a quelli per i gas disciolti, DIC e pH. L'operazione di riempimento della bottiglia con il campione di acqua di mare deve essere fatta con molta attenzione. Dopo aver inserito il tubo in Tygon nel rubinetto della Niskin è necessario sciacquare la bottiglia con acqua del campione da analizzare. La bottiglia va riempita lentamente e occorre far traboccare almeno metà del volume totale. Il tubo in Tygon viene sfilato dalla bottiglia lentamente, lasciando scorrere l'acqua in modo che la bottiglia sia colma fino all'orlo.

Dal campione viene eliminato un piccolo volume d'acqua per creare uno spazio di testa. Uno spazio di testa pari all'1% del volume totale è ottimale per la raccolta di campioni destinati comunque a non subire variazioni di temperatura maggiori di 30°C; in questo modo si assicura uno spazio vuoto sufficiente ad accogliere l'espansione del liquido associata ad un suo eventuale riscaldamento ma abbastanza piccolo da minimizzare gli scambi di gas tra spazio di testa e campione. Si aggiunge infine una quantità di soluzione satura di HgCl₂ pari ad almeno lo 0,02% del volume del campione (corrispondente a 100 µl per un volume di campione pari a 500 ml), in modo da fermare l'attività biologica che altererebbe il contenuto di CO₂ e gli equilibri chimici presenti al momento del campionamento.

Il campione così trattato va sigillato accuratamente, agitato e conservato al buio in ambiente refrigerato (+ 4°C). È importante che il campione non subisca congelamento durante la conservazione.

Per il campionamento del pH vedi capitolo specifico.

5.5 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

5.5.1 Attrezzatura

La strumentazione per la determinazione dell'A_T è costituita da:

- cella di titolazione (volume interno minimo 100 ml), contenente:
- elettrodo a vetro per la misura del potenziale;
- termometro digitale avente precisione ± 0,1 °C;
- tubo capillare per l'introduzione del titolante dalla buretta;
- agitatore magnetico;
- voltmetro ad elevata impedenza (precisione strumentale richiesta ± 0,1 mV) interfacciato ad un computer;

- buretta automatica a pistone (volume 10 ml, precisione richiesta $\pm 0,001$ ml) interfacciata al computer;
- bagno termostato per mantenere la cella ad una data $T \pm 0,1^\circ\text{C}$ (in modo che l'E° della cella del pH e la costante di Nernst non varino significativamente);
- bilancia tecnica con precisione $\pm 0,01$ g;
- bilancia di Mohr-Westphal o densimetro di precisione per la determinazione della densità del titolante (precisione richiesta $\pm 0,02\%$).

5.5.2 Prodotti chimici

- Acido cloridrico (HCl) grado tecnico 37%;
- cloruro di sodio (NaCl) essiccato per almeno 1 notte in muffola a 110°C ;
- carbonato di sodio anidro (Na_2CO_3) essiccato per almeno 3 ore in muffola a 280°C ;
- acqua deionizzata Milli-Q

5.5.3 Reagenti

Soluzione titolante

A partire da HCl 37% (12 M) preparare, per opportuna diluizione, una soluzione di HCl 0,1 M contenente una quantità tale di NaCl da approssimare il valore della forza ionica della soluzione a quello dell'acqua di mare ($0,7 \text{ mol kg}^{-1}$). Per esempio, per la preparazione di 1 litro di titolante, 8,281 ml di HCl 37% vengono portati a volume con una soluzione di NaCl 0,6M.

Soluzione di background

Soluzione di NaCl 0,7 M, preparata sciogliendo 40,908 g di NaCl in 1 l di acqua Milli-Q.

Soluzioni standard di Na_2CO_3

Il titolo dell'HCl impiegato per la titolazione può essere verificato tramite soluzioni standard di Na_2CO_3 . Allo scopo, sono preparate tre soluzioni di Na_2CO_3 nella matrice di background (soluzione di NaCl 0,7 M) con concentrazioni pari a 0,5, 1,0 e 1,25 mmol kg^{-1} , corrispondenti a valori di alcalinità totale di 1000, 2000 e 2500 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ rispettivamente,.

5.5.4 Procedura analitica

5.5.4.1 Controllo della concentrazione del titolante

Il titolo della soluzione di HCl preparata secondo quanto descritto, può essere verificato per via coulombometrica o per retro titolazione delle soluzioni standard di Na_2CO_3 . Nel secondo caso, si procede a titolare le tre soluzioni standard di Na_2CO_3 portate a temperatura costante ($25 \pm 0,1^\circ\text{C}$), mediante aggiunte successive di 0,1 ml di HCl 0,1 M fino al raggiungimento di pH circa 3. È necessario registrare il valore del potenziale stabile in corrispondenza di ogni aggiunta.

L' A_T di ogni soluzione di calibrazione è dovuta ai seguenti termini:

$$A_T = A_T(\text{blank}) + [2m(\text{Na}_2\text{CO}_3)/105,988] * [1/m(\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-soln})] \quad (13)$$

dove $A_T(\text{blank})$ è l'alcalinità totale della soluzione di background di NaCl, $m(\text{Na}_2\text{CO}_3)$ la massa del carbonato di sodio usato per preparare la soluzione, e $m(\text{Na}_2\text{CO}_3\text{-soln})$ la massa totale della soluzione preparata. I valori di A_T ricavati dai valori di potenziale misurati durante la titolazione (calcolati assumendo

un valore approssimato di concentrazione di HCl pari a 0,1 M) sono funzione lineare del contributo all' A_T dato dal Na_2CO_3 .

Se il titolo della soluzione di HCl è esattamente 0,1M, la pendenza della retta di calibrazione (α) è pari a 1, altrimenti la concentrazione dell'acido viene corretta fino a che $\alpha = 1$ in: $C_{i+1} = C_i / \alpha$

Si ricorda che per ricavare valori accurati di alcalinità totale è indispensabile conoscere la densità del titolante, nelle condizioni di analisi, con una precisione pari a 0,02%.

5.5.4.2 Analisi di campioni di acqua di mare

Portare il campione di acqua di mare ancora nella bottiglia di campionamento sigillata alla temperatura di $25^\circ \pm 0,1$ °C in bagno termostato.

Nel mentre sciacquare diverse volte la cella di misura con acqua Milli-Q per rimuovere residui del campione e dell'acido aggiunto durante la precedente titolazione. Asciugare accuratamente la cella.

Verificare e registrare la densità del titolante all'inizio di ogni set di misura.

Pesare il campione di acqua di mare da titolare direttamente nella cella, registrare il peso (precisione $\pm 0,01$ g) e la temperatura a cui è stata effettuata la pesata.

Immergere la cella nel bagno termostato, inserire un'ancoretta magnetica e immergere nella cella il capillare della buretta e gli elettrodi di misura.

Mettere in funzione l'agitatore magnetico, facendo attenzione che l'agitazione non sia troppo vigorosa e che l'ancoretta magnetica non urti capillare ed elettrodi.

Iniziare la titolazione con una singola aggiunta di titolante tale da portare il pH del campione ad un valore compreso tra 3,5 e 4,0 (in caso di un campione mediterraneo pari a 165 g, l'aggiunta iniziale deve essere di circa 3 ml).

Lasciare il campione acidificato in agitazione per 10 minuti per consentire la fuoriuscita della CO_2 e proseguire la titolazione con singole aggiunte di titolante pari a 0,05 ml e fino a pH 3.

Registrare i dati di potenziale corrispondenti a ogni aggiunta. Una volta che la titolazione è completata, sollevare elettrodi e capillare della buretta dalla cella. Procedere al riempimento della buretta.

Risciacquare elettrodi, capillare e termometro con acqua Milli-Q e asciugare delicatamente con carta bibula.

5.6 CALCOLI

La curva di titolazione di un campione di acqua di mare (Fig. 1) presenta due punti di flesso che corrispondono alle seguenti reazioni:



L' A_T ed il DIC si possono calcolare avendo misurato accuratamente: concentrazione e densità del titolante, i valori di volume di titolante aggiunto, i corrispondenti valori di e.m.f.

In prima approssimazione il valore di A_T e di DIC possono essere ricavati applicando le seguenti formule:

$$A_T = v_2 * C_{\text{HCl}} / \text{peso del campione} \quad (16)$$

$$\text{DIC} = (v_2 - v_1) * C_{\text{HCl}} / \text{peso del campione} \quad (17)$$

dove v_2 e v_1 sono i ml di HCl aggiunti in corrispondenza dei punti di flesso PE2 e PE1 e C_{HCl} è la concentrazione dell'HCl utilizzato per la titolazione (Millero, 1996).

I risultati così ottenuti rappresentano soltanto una stima dei valori, dal momento che il punto cruciale della precisione dell'analisi è proprio l'identificazione dei punti di flesso e del punto finale (o punto di

equivalenza) della titolazione con precisione elevata. Se, per esempio, in accordo con quanto riportato da Dickson *et al.* (2003) o Millero (2007), la precisione desiderata è $\pm 1 \mu\text{mol kg}^{-1}\text{-SW}$ (sulla titolazione di un campione del peso di 150 g con HCl di concentrazione 0,1 M) il punto di equivalenza essere individuato con una precisione di $\pm 1 \mu\text{l}$. Poiché le aggiunte di acido sono nell'ordine di 50 μl , la precisione ottenuta da un approccio grafico non è sufficiente. Si deve quindi fare ricorso all'impiego di funzioni matematiche. L' A_T viene in questo caso ricalcolata sulla base dei valori delle coppie di dati di potenziale e volume aggiunto di titolante, utilizzando o funzioni di Gran modificate (in cui le equazioni sono riportate a una forma lineare e successivamente adattate per iterazioni successive attraverso il metodo dei minimi quadratici) o altri approcci di fitting di curve non lineari. Entrambi i metodi sono basati sulle medesime relazioni tra bilancio di massa e equilibri. La differenza consiste nel peso assunto dai dati sperimentali nel fitting dei minimi quadratici.

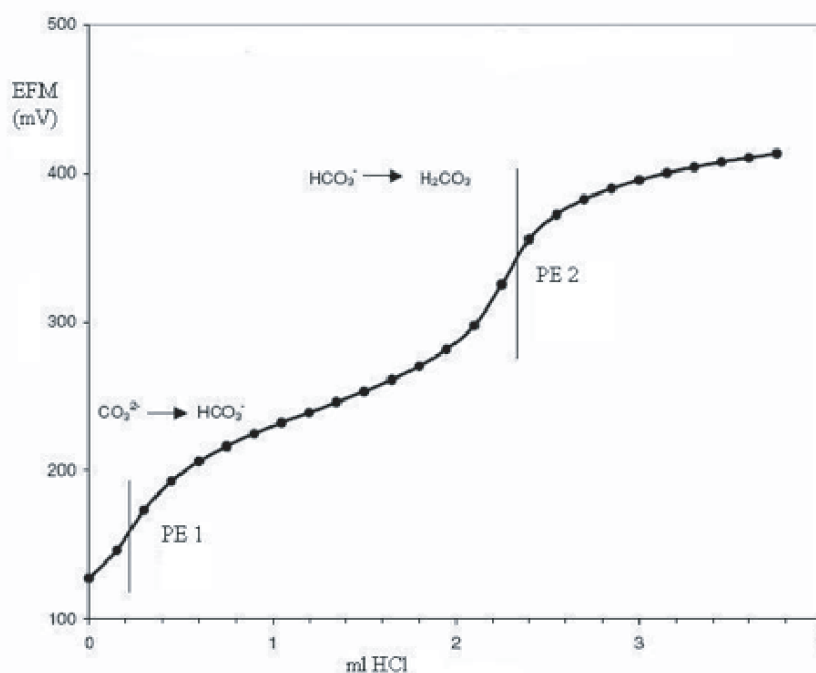


Fig. 1 - Esempio di curva di titolazione di un campione di acqua di mare.

Il bilancio protonico corrispondente al punto finale della titolazione deriva dalla definizione di A_T precedentemente data (8) e corrisponde a :

$$[\text{H}^+]_{\text{Free}} + [\text{HSO}_4^-] + [\text{HF}] + [\text{H}_3\text{PO}_4] = [\text{HCO}_3^-] + 2[\text{CO}_3^{2-}] + [\text{B}(\text{OH})_4^-] + [\text{OH}^-] + [\text{HPO}_4^{2-}] + 2[\text{PO}_4^{3-}] + [\text{SiO}(\text{OH})_3^-] + [\text{HS}^-] + [\text{NH}_3] \quad (18)$$

in cui non vengono considerate le specie minori o non identificate.

Ad ogni punto della titolazione, la concentrazione analitica totale degli ioni H^+ è data dalla seguente relazione:

$$C_H = [\text{H}^+]_{\text{Free}} + [\text{HSO}_4^-] + [\text{HF}] + [\text{H}_3\text{PO}_4] - [\text{HCO}_3^-] - 2[\text{CO}_3^{2-}] - [\text{B}(\text{OH})_4^-] - [\text{OH}^-] - [\text{HPO}_4^{2-}] - 2[\text{PO}_4^{3-}] - [\text{SiO}(\text{OH})_3^-] - [\text{HS}^-] - [\text{NH}_3] \quad (19)$$

La concentrazione iniziale di H^+ nel campione corrisponde pertanto al valore negativo di A_T . In ogni punto della titolazione, a seguito dell'aggiunta di una massa m di titolante avente una concentrazione

C, il valore di concentrazione di ioni H⁺ risulta:

$$C_H = \frac{mC - m_0A_T}{m_0 + m} \quad (20)$$

dove m_0 corrisponde alla massa in g del campione.

Il valore di C_H così calcolato può essere sostituito nella relazione (11) che diventa:

$$\frac{mC - m_0A_T}{m_0 + m} = [H^+]_{Free} + [HSO_4^-] + [HF] + [H_3PO_4] - [HCO_3^-] - 2[CO_3^{2-}] - [B(OH)_4^-] - [OH^-] - [HPO_4^{2-}] - 2[PO_4^{3-}] - [SiO(OH)_3^-] - [HS^-] - [NH_3] \quad (21)$$

Questa equazione rappresenta la base di tutti i calcoli impiegati nel processo di ricalcolo dell' A_T . Si ricorda che la maggior parte dei termini che compaiono nell'equazione è pari a 0, quando viene effettuata la titolazione di campioni preparati in matrice di NaCl, come nel caso delle soluzioni standard impiegate per la retta di taratura.

Nel computo dell'alcalinità, oltre all'equazione (13) sono utilizzate l'equazione di Nerst

$$E = E^0 - (RT/F)\ln[H^+] \quad (22)$$

che mette in relazione e.m.f. dell'elettrodo e concentrazione totale degli ioni H⁺ (vedi paragrafo Misura del pH con metodo potenziometrico in questo volume) e le equazioni relative alle concentrazioni totali singole specie con le appropriate costanti di equilibrio.

Diversi programmi in linguaggio FORTRAN sono stati sviluppati per calcolare i parametri del sistema carbonato (ad esempio, A_T , DIC, pH) in soluzioni standard di Na₂CO₃, tamponi TRIS e campioni di acqua di mare.

Come detto, i programmi si basano sulle equazioni (13) e (18) e richiedono come dati di input i valori di salinità del campione, la temperatura a cui è stata effettuata la misura, il volume e la densità del campione (o la sua massa), la concentrazione e la densità dell'HCl impiegato come titolante, la concentrazione di fosfati e silicati misurata nel campione. Alcuni programmi (cfr Millero *et al.*, 1993) non considerano tra i dati di input le concentrazioni dei nutrienti. Tale assunzione, valida per acque superficiali, non incide sull'accuratezza della misura di A_T ma solamente sul dato di alcalinità dovuto ai carbonati.

Per ottenere valori di A_T attendibili dal computo, è necessario utilizzare almeno 25 coppie di dati di volume del titolante aggiunto- valori di e.m.f. misurati.

Il file di output dei programmi fornisce i valori di A_T , DIC, E^0 e di pK_1 .

Maggiori dettagli sui programmi per il ricalcolo dell' A_T e per il calcolo del DIC possono essere reperiti in DOE SOP 3 (1994 Version) e in Millero *et al.*, 1993 oltre che nei siti <http://andrew.ucsd.edu/co2qc/index.html> e <http://cdiac.ornl.gov/oceans/co2rprt.html>, dal quale è anche possibile scaricare versioni demo del programma messo a punto da Lewis e Wallace (1998) per derivare il DIC dai dati di pH e di alcalinità totale.

5.7 PRECISIONE E ACCURATEZZA DEL METODO

L'accuratezza di questo metodo può essere valutata attraverso analisi di campioni standard di riferimento, con un contenuto di Carbonio Inorganico totale certificato, forniti dal Dr. A. Dickson, Scripps Institution of Oceanography, U.S.A.

La precisione può essere determinata attraverso analisi ripetute sia dei campioni standard certificati, che di repliche di campioni di acqua di mare.

Informazioni sulle caratteristiche e sulla disponibilità dei materiali certificati sono disponibili nel sito <http://andrew.ucsd.edu/co2qc/index.html>.

Questa metodica, se applicata con attenzione, permette di raggiungere una accuratezza pari a $\pm 4 \mu\text{mol kg}^{-1}\text{-SW}$ e una precisione pari a $\pm 3 \mu\text{mol kg}^{-1}\text{-SW}$.

5.8 RACCOMANDAZIONI

Le bottiglie per il campionamento dell'acqua devono essere in vetro borosilicato che, non essendo permeabile ai gas ed essendo chimicamente resistente, permette di evitare variazioni del pH causate dalla dissoluzione dell'anidride carbonica che può essere rilasciata dai vetri normali.

I tubi in Tygon®. per il campionamento devono essere lunghi abbastanza da raggiungere il fondo delle bottiglie in cui viene raccolto il campione e pretrattati lasciandoli in ammollo in acqua di mare per almeno un giorno per evitare la formazione di bolle d'aria nel tubo.

Una buretta caratterizzata da elevata riproducibilità ($\pm 0,001 \text{ ml}$) è indispensabile per ottenere risultati di elevata precisione. Si suggerisce di verificare e calibrare il sistema della buretta automatica prima dell'analisi dei campioni.

Si suggerisce di effettuare all'inizio della giornata di lavoro una titolazione di una soluzione standard o di un campione per condizionare il sistema analitico.

Il metodo qui descritto è utilizzabile per campioni aventi valori di alcalinità tra 2000 e 2800 $\mu\text{mol kg}_{\text{sw}}^{-1}$. Valori inferiori si possono ritrovare in acque costiere e polari. In tal caso si suggerisce di ridurre il volume dell'aggiunta iniziale di titolante in modo da portare il pH del campione all'inizio della titolazione a un valore di circa 3,5 unità.

5.9 Bibliografia

- DICKSON A.G., AFGHAN J.D., ANDERSON G.C. (2003) - Reference materials for oceanic CO_2 analysis: a method for the certification of total alkalinity. *Mar. Chem.*, **80**: 185-197.
- DOE (1994) - *Handbook of methods for the analysis of the various parameters of the carbon dioxide system in Sea Water. Version 2*, Dickson A.G., Goyet C. (eds), ORNL/CDIAC-74.
- DOE (2007) - *Handbook of Methods for the Analysis of the Various Parameters of the Carbon Dioxide System in Sea Water - Version 3.0*, SOP 2. Dickson A.G., Goyet C. (eds): 1-13
- DOE (2007) - *Handbook of Methods for the Analysis of the Various Parameters of the Carbon Dioxide System in Sea Water - Version 3.0*, SOP 3a., Dickson A.G., Goyet C. (eds): 1-18
- DOE (2007) - *Handbook of Methods for the Analysis of the Various Parameters of the Carbon Dioxide System in Sea Water - Version 3.0*, SOP 3b, Dickson A.G., Goyet C. (eds): 1-15
- LEWIS E., WALLACE D. (1998) - *Program Developed for CO_2 System Calculations*. ORNL/CDIAC-105. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, U.S. Department of Energy, Oak Ridge, Tennessee
- MILLERO F.J. (1996) - *Chemical oceanography* 2nd ed., Kennish M.J., Lutz, P.L. (eds), CRC Press, Boca Raton, Florida: 453 pp.
- MILLERO F.J. (2007) - The Marine Inorganic Carbon Cycle. *Chem. Rev.*, **107**: 308-341.
- MILLERO F.J., ZHANG J.Z., LEE K., CAMPBELL D.M. (1993) - Titration alkalinity of sea water. *Mar. Chem.*, **44**: 153-165.
- MILLERO F.J., PIERROT D., LEE K., WANNINKHOF R., FEELY R., SABINE C.L., KEY R.M., TAKAHASHI T. (2002) - Dissociation constants for carbonic acid determined from field measurements. *Deep-Sea Res. PT I*, **49**: 1705-1723.
- MILLERO F.J., GRAHAM T.B., HUANG F., BUSTOS-SERRANO H., PIERROT D. (2006) - Dissociation constants of carbonic acid in seawater as a function of salinity and temperature. *Mar. Chem.*, **100**: 80-94.
- ROY R.N., ROY L.N., VOGEL K.M., MOORE C.P., PEARSON T., GOOD E.C., MILLERO F.J., CAMPBELL D.M. (1993) - The dissociation constants of carbonic acid in seawater at salinities 5 to 45 and temperatures 0 to 45°C. *Mar. Chem.*, **44**: 249-267.
- SKIRROW, G. (1975) - The dissolved gases - carbon dioxide. In: Riley J. P., Skirrow G. (eds.), *Chemical Oceanography, Vol. 2*. Academic Press, New York: 1-192.

CAPITOLO 6. METODI AUTOMATICI DI ANALISI DEI NUTRIENTI

V. Saggiomo, G. Catalano, F. Corato, M. Ribera D'Alcalà

vincenzo.saggiomo@szn.it

6.1 INTRODUZIONE

Sin dai lavori pionieristici di Atkins e Cooper, nelle prime decadi del secolo scorso (consultare Mills, 1989 sia per la storia che per i riferimenti bibliografici), la determinazione delle concentrazioni dei nutrienti (nitriti, nitrati, ammonio, ortosilicati ed ortofosfati) in acqua di mare è sempre stata considerata un'attività essenziale per lo studio della dinamica del plancton marino. Di conseguenza, esiste una letteratura vastissima che qui riportiamo solo in piccola parte, per ragioni di spazio e talvolta di rappresentatività.

I metodi per l'analisi dei nutrienti possono essere, molto schematicamente, classificati in metodi manuali, semi-automatici ed automatici in relazione al ruolo dell'operatore ed in metodi colorimetrici, spettroscopici, elettrochimici, etc. in relazione alla metodica analitica utilizzata ed al sistema di rivelazione del composto *target*. In questo capitolo si discuteranno i metodi colorimetrici che oltre ad essere i più utilizzati garantiscono un ottimo rapporto costi-qualità dei risultati. Per ambienti particolari e/o concentrazioni al di fuori dei tipici intervalli oceanografici esistono metodi specifici che possono essere ricercati nella letteratura scientifica.

Per un numero molto ridotto di campioni, le procedure manuali sono, in via teorica, ancora praticabili, ma se la determinazione dei nutrienti disciolti è inserita in attività periodiche è essenziale attrezzarsi con un sistema automatico.

I metodi manuali sono descritti in Innamorati *et al.* (1990) e rivisti ed aggiornati nelle schede raccolte nel volume "Metodologie analitiche di riferimento" prodotte dall'ICRAM nel 2001 per il Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio – Servizio Difesa Mare, nell'ambito del programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero. I metodi automatici si basano, quasi sempre, sulle stesse reazioni utilizzate nei metodi manuali ma con il vantaggio che l'aggiunta dei reagenti, il mescolamento e la lettura colorimetrica vengono effettuate con dispositivi che ne permettono l'automazione. Tale sistema, oltre ad essere affidabile e preciso, ha innumerevoli vantaggi tra cui: consentire l'analisi di un numero elevato di campioni in tempi molto ridotti, ridurre il numero di operatori, evitare possibili errori quali la misura sistematica di volumi, operare su volumi molto ridotti riducendo drasticamente la possibilità di contaminazione del campione durante la fase di campionamento, condurre analisi, contestualmente, su tutti i nutrienti, etc..

Le apparecchiature automatiche disponibili, basate su metodi colorimetrici, possono essere distinte in sistemi a flusso continuo e sistemi automatici discreti (Spandrio, 1985). In questo manuale verranno riportate soltanto le schede relative a sistemi automatici a flusso continuo (SFA) redatte da autori che hanno maturato, in questo ambito, una conoscenza trentennale su vari strumenti ma che non hanno esperienza specifica su sistemi automatici discreti.

I sistemi a flusso continuo, basati sulle tecniche di *segmented flow analysis* (SFA) e di *flow injection analysis* (FIA), sono stati e sono tuttora ampiamente utilizzati per le analisi dei nutrienti di acque marine e la bibliografia che li riguarda è molto ampia (tra gli altri Gray *et al.*, 2006; Crompton, 2006 e riferimenti ivi inclusi). Queste apparecchiature consentono di ottenere risultati rapidi, precisi e accurati, ma sono complesse dal punto di vista idraulico, richiedendo personale tecnico esperto nel loro uso ed in grado di gestire i problemi che talora si presentano (flusso irregolare del campione e/o dei reattivi, rottura delle bolle d'aria nel caso della SFA, etc. - vedi nel seguito).

Nonostante esistano numerose metodiche anche per i sistemi FIA (ad es. Hales *et al.*, 2004) essi non hanno mai raggiunto la diffusione dei sistemi SFA, perché molto più delicati sia nell'uso che nelle procedure.

6.2 METODI A FLUSSO CONTINUO (SFA)

Un analizzatore automatico è composto generalmente da: campionatore, pompe peristaltiche, serpentine di reazione, registratori e computer. Il sistema di reazione (manifold) è costituito da serpentine, iniettori e bollatori. Le serpentine normalmente sono di vetro pyrex e hanno un diametro di pochi millimetri, la loro funzione è quella di facilitare il mescolamento del campione con il reagente (Fig. 1) mentre il numero di spire è legato al tempo di residenza necessario alla reazione chimica che deve aver luogo.

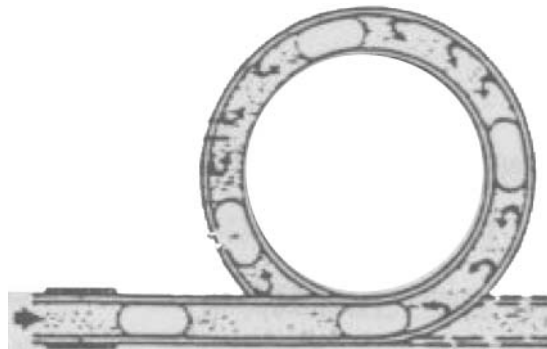


Fig. 1 - Serpentina.

Il numero di serpentine, iniettori e bollatori da utilizzare, per assemblare un manifold, varia in base al tipo di parametro che si intende analizzare.

La curvatura della serpentina, unita all'attrito del fluido sulle pareti, produce il mescolamento del campione con i reagenti. Le reazioni vengono inoltre favorite dall'effetto parete in quanto il rapporto superficie volume è piuttosto alto in relazione ai ridotti diametri delle serpentine (ca. 1-2 mm). Per limitare un eccessivo mescolamento del campione con l'acqua di lavaggio che viene pompata tra un campione e l'altro, il flusso viene segmentato con bolle di gas, di solito aria. Poiché una parte del liquido aderisce temporaneamente alla parete, il mescolamento tra un segmento e l'altro si verifica comunque e dà luogo al cosiddetto *carryover*, che è la ragione per la quale si genera la caratteristica forma dei picchi in sistemi SFA. Alla fine della serie di serpentine la soluzione entra in una cella a flusso di cammino ottico tra 1,5 e 5 cm, dove è misurata l'attenuazione ottica alla lunghezza d'onda di massimo assorbimento del composto prodotto. Poiché la presenza di gas produrrebbe continue variazioni dell'attenuazione ottica per la rifrazione della luce, esistono due metodi per neutralizzare il disturbo:

1. la debollazione del campione mediante un raccordo a T. In questo caso il flusso della miscela pompata attraverso la cella è leggermente più basso del flusso della miscela (campione + reattivi + gas) pompata nel circuito, per cui sia il gas che una frazione della miscela sono forzati verso la gamba della T rivolta verso l'alto, evitando l'ingresso delle bolle nella cella;
2. un debollatore elettronico. In questo caso, ad intervalli regolari corrispondenti al passaggio delle bolle nella cella la lettura dell'attenuazione viene elettronicamente interrotta e viene registrata solo quando la cella contiene solo la miscela.

Bisogna infine considerare che, specie per l'acqua di mare, l'indice di rifrazione della miscela è diverso da quello della miscela di acqua ultrapura con i reagenti, differenza che può essere accentuata dalla curvatura delle parti terminali della cella a flusso. Poiché il cosiddetto bianco deve basarsi sull'attenuazione dell'acqua ultrapura, va misurata separatamente l'attenuazione dovuta alla rifrazione dell'acqua salata.

Per lo stesso motivo si preferisce utilizzare come acqua di lavaggio, acqua di mare sintetica o con bassissimo contenuto di nutrienti (ad es. acqua di mare prelevata in superficie al largo in stagioni di stratificazione). Questo evita la presenza di picchi spuri tra i campioni e l'acqua di lavaggio, dovuti semplicemente alla variazione dell'indice di rifrazione.

I colorimetri devono essere del tipo ad amplificazione variabile, essere predisposti in modo da poter ottenere uno zero e dotati di filtri monocromatori intercambiabili in funzione delle lunghezze d'onda che si intendono utilizzare. Esistono anche spettrofotometri con celle a flusso disegnate per sistemi SFA, ma ovviamente hanno costo superiore.

Un registratore è un componente utile del sistema, anche quando i calcoli vengono effettuati su dati digitali forniti da un convertitore A/D. Benché i registratori contengono anche una parte di meccanica di precisione, per cui il loro costo può essere consistente, se ne consiglia l'uso perché essi permettono la conservazione delle informazioni su un supporto cartaceo e, soprattutto, offrono la possibilità all'operatore di visualizzare l'andamento delle analisi (forma dei picchi, presenza di picchi spuri, etc.) e, quindi, di intervenire in caso di problemi. Nei sistemi più recenti, la visualizzazione avviene tramite lo stesso PC che gestisce il sistema. Il computer ha il compito di elaborare il segnale analogico proveniente dal colorimetro, convertendolo con un apposito convertitore A/D in informazione digitale, e di fornire, direttamente, i valori delle tensioni di uscita dei fotometri per poi trasformarle in concentrazione degli ioni di NO_2 , NO_3 , NH_4 , PO_4 ed SiO_4 esaminati.

Il grado di automazione dei sistemi varia da marca a marca con una tendenza ad un'automazione sempre più spinta. Per quanto le soluzioni totalmente automatiche siano molto attraenti nei lavori di *routine*, la loro relativa rigidità può spesso creare problemi di operatività. Pertanto, sarà l'operatore, in base alle sue esigenze ed alla sua esperienza, che dovrà decidere fino a che punto avvalersi delle procedure automatiche.

Per quanto detto in precedenza, l'ottimizzazione di una metodica si basa su alcuni semplici criteri.

Un'alta salinità della miscela accentua il problema della rifrazione, di contro, una bassa salinità, ottenibile con reagenti a bassa concentrazione e quindi con una notevole diluizione del campione per opera dei reagenti, abbassa la sensibilità del metodo. Per questo motivo deve essere necessariamente individuato il giusto compromesso tra la portata dei flussi di reagenti e quello del campione, in relazione all'intervallo di concentrazione da analizzare.

La portata complessiva del flusso, in ogni sezione del circuito, e quindi il rapporto tra sezione dei tubi della pompa peristaltica e numero di spire delle serpentine, deve essere commisurato al tempo della reazione che deve avvenire in quella sezione del circuito.

La portata del flusso nella cella deve essere sufficientemente alta da garantire un buon lavaggio della cella e, quindi, compensare per il *carryover*, ma sufficientemente basso da prevenire l'ingresso delle bolle di gas nella cella o le fluttuazioni di flusso dovute alla compressibilità dell'aria.

Come sopra accennato, la molteplicità dei metodi riportati in letteratura riflette più l'ottimizzazione delle metodiche per diversi ambienti che una significativa differenza nelle reazioni utilizzate. Nelle sezioni dedicate alle singole metodiche si farà cenno ad alcuni aspetti specifici.

Sui principi generali dei sistemi SFA, oltre alla documentazione fornita dalle case produttrici (si veda ad es. <http://www.seal-analytical.com/Markets/SeawaterAnalysis/tabid/116/Default.aspx>) si può fare riferimento ai classici manuali di Strickland e Parsons (1965) e Grasshoff *et al.* (1999). Altrettanto numerosi sono i rapporti tecnici dei vari laboratori prodotti per omogeneizzare le metodiche nell'ambito di programmi internazionali come JGOFS o WOCE. Tra gli altri segnaliamo Folkard (1978), Whitley *et al.* (1981), Gordon *et al.* (1993) ed il sito di ALOHA, la serie temporale nei pressi delle Hawaii (<http://hahana.soest.hawaii.edu/hot/methods/results.html>).

I principi chimici ed analitici dei metodi sono descritti in più o meno grande dettaglio nella bibliografia segnalata che spesso riporta a quella originale. In Innamorati *et al.* (1990) c'è anche una sintetica discussione su metodi alternativi. Nel seguito riportiamo in un'unica sezione le indicazioni relative alle procedure comuni a tutti i parametri e nelle successive quelle specifiche dei vari metodi.

6.2.1 Campionamento e conservazione dei campioni

Questo è uno degli aspetti tuttora controversi in letteratura, nonostante ciascun operatore supponga di avere prove consistenti a supporto della propria procedura ed appaia superfluo sottolineare che l'analisi dei campioni, direttamente dopo il prelievo sarebbe, in ogni caso, la soluzione ottimale. L'esperienza degli scriventi è ricca al punto da poter dire che nei casi in cui la cattiva qualità dei risultati potrebbe essere stata causata dalle procedure di campionamento e conservazione, non sempre è stato possibile attribuirne le cause alle procedure di conservazione. L'unica via per mitigare il rischio della perdita di informazione per degradazione dei campioni è quello di disporre di repliche. È sempre buona norma processare lo stesso campione di acqua più volte in modo da disporre di repliche sin dal campionamento. Infatti, per un reale controllo sarebbe preferibile chiudere due distinte bottiglie di campionamento alla stessa quota. Purtroppo, non sempre è possibile concedersi questo lusso, soprattutto per i costi operativi delle operazioni in mare, per cui è comunque consigliabile prelevare più di un campione dalla stessa bottiglia Niskin.

I fattori che incidono sull'alterazione dei campioni, possono essere di tipo meccanico, fisico, chimico, biologico e sistematico. Si può in parte ovviare a questi inconvenienti, utilizzando i seguenti accorgimenti:

1. il campione può essere conservato in fiale monouso del tipo da scintillazione, in polietilene ad alta densità, con tappo idoneo ad assicurare una perfetta chiusura. Il polietilene ha il vantaggio di essere resistente agli agenti chimici e alle variazioni termiche, ha una maggiore resistenza meccanica e, da prove sperimentali, si è visto che non cede e non assorbe sostanze;
2. il problema biologico può essere in parte attenuato adottando alcune precauzioni:
 - filtrare il campione mediante siringhe dotate di swinnex contenente filtri in fibra di vetro con poro passante $< 1 \mu\text{m}$ preventivamente sciacquati con abbondante acqua DDW e poi, di volta in volta, con l'acqua del campione stesso;
 - utilizzare un'unica fiala per determinare la concentrazione dei sali nutritivi che si intendono analizzare;
3. lavare i contenitori con HCl al 10%;
4. sciacquare poi con acqua DDW e, infine, con il campione stesso;
5. il campione deve essere prelevato direttamente dalla bottiglia da campionamento e conservato al buio ad una temperatura di $+4^\circ\text{C}$ se viene analizzato entro le 24 ore. Se il campione non viene analizzato entro tale termine, deve essere congelato ad una temperatura di -20°C avendo cura di lasciare la fiala in posizione verticale;
6. la fiala deve essere riempita per non più dei $3/4$ del volume.

Soprattutto su navi oceanografiche di piccole dimensioni, al fine di evitare la contaminazione del campione di acqua di mare con gas di scarico, è consigliabile campionare direttamente dal beccuccio della bottiglia Niskin utilizzando una siringa da 50 ml. In questo caso la siringa dovrebbe essere dotata di swinnex e rubinetti a doppia via per facilitare le operazioni di lavaggio della siringa stessa. La distribuzione dei campioni in fiale da scintillazione per la conservazione può essere fatta nei laboratori/ambienti della nave non contaminati da gas di scarico.

Il vantaggio delle fiale da scintillazione, oltre alla praticità dell'organizzazione delle fiale stesse in supporti appositamente disegnati, è nella rapidità del congelamento, che è tuttora considerata la migliore procedura di conservazione. Altre soluzioni per la preservazione dei campioni vanno dal congelamento rapido in azoto liquido o in ghiaccio secco alla conservazione a $+4^\circ\text{C}$ dopo aggiunta di un agente antibatterico, che deve essere selezionato in relazione alle normative vigenti sull'uso dei citostatici. Alcuni operatori hanno verificato che l'uso di fiale già utilizzate riduce i casi di contaminazione. Altri risciacquano le fiale con una soluzione diluita di HCl (0,1 M) e lasciano asciugare le fiale capovolte. In sintesi, una procedura normalmente affidabile è quella di utilizzare contenitori anche nuovi, ma precedentemente protetti dalla polvere o da altre possibili contaminazioni, che vanno lavati più volte con il campione e riempiti non completamente in modo da evitare che la dilatazione del liquido durante il congelamento forzi le brine fuori del contenitore.

Il congelamento deve avvenire con le fiale in posizione verticale mentre lo scongelamento, preferibilmente, a temperatura ambiente con ripetute agitazioni del contenitore. Gli attuali campionatori permettono di alloggiare direttamente i contenitori, anche quelli da 50 cm³, evitando così le operazioni di travaso e minimizzando ulteriori contaminazioni. Questo aspetto orienta anche la scelta del campionatore.

6.2.2 Calcoli delle concentrazioni

Come detto in precedenza, molti sistemi automatici di analisi dei nutrienti sono dotati di *software* che permette, con algoritmi più o meno sofisticati, di determinare l'altezza del picco e di fornire la concentrazione dei singoli campioni avendo in precedenza determinato la curva di calibrazione ed il valore del bianco dei reagenti. Per quanto il *software* possa essere sofisticato, non sempre è in grado di gestire eventi anomali, per cui è consigliabile un continuo monitoraggio del funzionamento dello strumento.

È opinione degli scriventi, soprattutto considerando l'attuale disponibilità di programmi di calcolo come i fogli elettronici, che la soluzione migliore sia quella di ottenere dall'analizzatore i valori dei tre componenti necessari al calcolo delle concentrazioni, ovvero il valore del bianco, quella della linea di base in vicinanza dei campioni e quella dei singoli campioni. La procedura suggerita nel seguito non è certamente l'unica possibile e, ancora una volta, sarà compito dell'operatore decidere quali percorsi seguire.

In rapida sintesi, la concentrazione dei campioni viene determinata in base alla legge di Lambert-Beer che lega l'assorbanza del campione alla concentrazione del colorante prodotto dalle reazioni, che è a sua volta proporzionale alla concentrazione della specie chimica di interesse. Come in tutte le procedure colorimetriche, l'assorbanza è la somma di quella prodotta dal colorante più quella prodotta dai reagenti sia per il loro colore intrinseco che per la presenza nei reagenti e nell'acqua di lavaggio della specie chimica di interesse o di altre impurità potenzialmente interferenti. È quindi necessario determinare l'assorbanza dovuta ai soli reagenti con acqua ultrapura (cioè il bianco, DDW) e, successivamente, l'assorbanza della soluzione di lavaggio, di solito acqua di mare sintetica o acqua di mare a basso contenuto di nutrienti (ovvero la linea di base, OSW), utile però a seguirne la deriva nel tempo. In precedenza si è detto che deve essere misurata l'attenuazione dovuta alla diversa rifrazione tra il bianco e la linea di base ed i campioni.

Operativamente, una possibile procedura è la seguente. Si stabilizza lo strumento con i reagenti e acqua ultrapura (DDW) per 15-20 minuti. Si verifica che l'idraulica sia stabile (bolle regolari e linea di base stabile). Si procede quindi alla determinazione dell'indice di rifrazione campionando in continuo prima l'acqua ultrapura (DDW) e successivamente l'acqua di lavaggio (OSW), avendo sostituito uno dei reattivi, di solito quello con minore portata, con acqua ultrapura. Si registra la differenza di lettura che corrisponde al finto assorbimento dovuto alla rifrazione. Si reinserisce il reagente sostituito e si ristabilizza la linea di base con DDW. Quando si è pronti per l'analisi dei campioni si sostituisce la DDW con OSW (di fatto, si sposta l'ago di pescaggio da un contenitore ad un altro) e si attende che la linea di base si ristabilizzi. Poi si attiva il campionatore disponendo i campioni in gruppi (di solito una o più stazioni) e avendo cura di intervallare i gruppi con una lettura di OSW. In questo modo ogni gruppo di campioni è inserito tra due letture di OSW, che permettono un buon controllo della deriva della linea di base. È buona norma anche analizzare periodicamente una serie di soluzioni a concentrazione nota (i cosiddetti standard) che vanno sempre preparati giornalmente. Usualmente si inserisce almeno una serie di standard a concentrazione crescente all'inizio della serie di campioni ed una alla fine. Se la serie di campioni è molto lunga si possono inserire ulteriori serie di standard intermedie. Gli standard devono essere a concentrazioni crescente in modo che la differenza fra il più basso ed il più alto includa il range di concentrazioni atteso per i campioni da analizzare. Questa procedura permette sia di determinare la linearità di risposta alla legge di Lambert-Beer (determinare cioè la pendenza o coefficiente angolare della retta di estinzione/concentrazione degli standard crescenti che, in assenza di bianco, dovrebbe passare

per l'origine degli assi) nel range di concentrazione atteso, sia di determinare eventuali variazioni nell'efficienza del metodo (gain) che verrebbe evidenziata da significative variazioni di tale pendenza con il prosieguo della serie analitica. Infatti, quasi mai la pendenza della retta di standardizzazione iniziale, cioè il suo coefficiente angolare ed il suo valore reciproco F, coincideranno con quelli degli standard finali e/o intermedi. La soluzione più semplice a questo problema è quella di fare la media fra F iniziale, finale e/o intermedio ed usare questo F_m medio nella formula di calcolo di seguito riportata. Appare ovvio che questa procedura comporterà degli errori per i primi ed ultimi picchi di ogni serie, tanto più significativi in funzione della differenza fra F iniziale ed F finale. La procedura più corretta, ma più complicata, consiste nel determinare il "gain" sequenziale di lettura campione dopo campione, similmente a quanto viene fatto per il calcolo della deriva della linea di base, e moltiplicare il valore di lettura di ogni campione per il proprio F così determinato. Terminata l'analisi dei campioni, è buona norma rimisurare la lettura della DDW e lavare il circuito senza i reagenti.

Per il calcolo delle concentrazioni si possono quindi introdurre le seguenti grandezze (i valori sono nell'unità in uso, *cm* se si legge sul tracciato di un registratore o *conte digitali* se si lavora sulle uscite del convertitore A/D):

V_{DDW}	=	valore della lettura della DDW al momento della determinazione del bianco
V_{OSW0}	=	valore della lettura dell'OSW successiva al bianco (DDW)
R	=	variazione della linea di base OSW in mm per indice di rifrazione
V_{OSWi}	=	valore della lettura dell'OSW che precede il primo dei campioni del gruppo
N_{OSWi}	=	numero sequenziale della lettura di OSW che precede il gruppo di campioni
V_{OSWn}	=	valore della lettura dell'OSW che segue l'ultimo dei campioni del gruppo
N_{OSWn}	=	numero sequenziale della lettura di OSW dopo l'ultimo dei campioni del gruppo
V_c	=	valore della lettura del campione
N_c	=	numero sequenziale della lettura del campione
D	=	deriva
F_m	=	fattore medio ricavato dalle curve standard (il reciproco della pendenza o coefficiente angolare della retta lettura-concentrazione dei campioni di calibrazione)
C	=	concentrazione del campione

la concentrazione del campione è data dall'equazione:

$$C = [V_c - D \cdot (N_c - N_{OSWi}) - V_{OSWi} + (V_{OSW0} - V_{DDW}) - R] \cdot F$$

dove la deriva (D) è data da: $D = (V_{OSWn} - V_{OSWi}) / (N_{OSWn} - N_{OSWi})$

L'indice di rifrazione è riferito allo spostamento della linea di base in assenza di reattivi dovuto alla differenza di salinità fra l'acqua distillata deionizzata (DDW) e l'acqua oligotrofica (OSW).

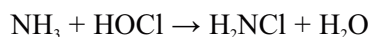
6.3 DETERMINAZIONE DELL'AMMONIACA

6.3.1 Principio del metodo

Il metodo proposto si basa su una serie di reazioni, catalizzate fotochimicamente, che portano alla formazione del blu di indofenolo. La concentrazione del composto viene poi dosata per via colorimetrica. La prima applicazione analitica della formazione di indofenolo, a partire da fenolo e ipoclorito, risale a Berthelot (1859).

Solo di recente sono stati approfonditi alcuni aspetti dei vari stadi della reazione (Patton e Crouch, 1977), che rimangono comunque non completamente chiariti.

Il primo stadio consiste nella formazione della monoclorammina secondo la reazione:



La formazione della monoclorammina predomina, rispetto a quella della di- e triclorammina, per valori di pH superiori a 7,5. In dettaglio, il massimo della velocità di formazione di questo composto intermedio si ha a pH 8, ma il pH ottimale per ottenere la massima concentrazione stabile risulta essere circa 10,5. A pH inferiori, infatti, la monoclorammina si decompone abbastanza rapidamente, mentre a pH superiori a 11,5 la sua formazione è troppo lenta per poter essere sfruttata in una metodica analitica (Patton e Crouch, 1977). Inoltre, a pH superiore a 11, l'ipoclorito ossida l'ammoniaca a nitrito (Richards e Kletsch, 1964).

Lo stadio successivo della reazione consiste nell'attacco della monoclorammina sull'anello benzenico del fenolo per formare, probabilmente, cloramminochinone.

Questo è lo stadio più lento, e tuttora poco noto, della reazione. Lubochinsky e Zalta (1954) introdussero per primi l'uso di nitroprussiato, per accelerare la reazione.

Patton e Crouch (1977) affermano che la specie chimica attiva non è il nitroprussiato, bensì l'acquapentacianoferrato, che si forma dal nitroprussiato o dal ferricianuro, ambedue comunemente usati per questa metodica. Questo sembra confermato dall'effetto catalizzatore della luce (Liddicoat *et al.*, 1975), perché l'acquapentacianoferrato si forma anche per irraggiamento ultravioletto del ferricianuro (Patton e Crouch, 1977; Catalano, 1987).

Infine il chinone, o comunque l'intermedio formatosi, produce indofenolo per copolazione con un altro fenolo. Questo stadio è strettamente dipendente dal pH, in quanto OH⁻ entra direttamente nella reazione. Il valore del pK di formazione oscilla intorno a 8÷9 (Koroleff, 1969) per cui per una buona resa è necessario, anche in questo caso, mantenere il pH al di sopra di 10. Per questo motivo, tutti i metodi che utilizzano fenolo e ipoclorito richiedono un ambiente avente pH intorno a 10,5 (Ivancic e Degobbi, 1984). Va rilevato che a questo pH gli ioni bivalenti presenti in acqua di mare precipitano in forma di idrossidi, rendendo necessaria la loro chelazione con un complessante, che di solito è citrato trisodico (Solorzano, 1969).

Vi è inoltre da dire che un'eccessiva quantità di nitroprussiato, in presenza di luce, induce reazioni collaterali che portano alla formazione di indofenolo anche in assenza di ammoniaca (Gravitz e Gleye, 1975).

Infine, data l'importanza del controllo del pH nello sviluppo della reazione (Sasaki e Sawada, 1980), il significativo effetto salino (differente resa della reazione in acqua dolce o salata) che si manifesta in questa metodica (Koroleff, 1983a) dipende in larga misura dalla capacità tampone della matrice del campione. Per tale motivo il metodo può essere applicato a campioni raccolti in ambienti estuariali, dove sono forti le variazioni di alcalinità, tamponando adeguatamente la soluzione (Mantoura e Woodward, 1983).

Massimo di assorbanza: 630 nm

6.3.1.1 Reagenti

1. Il primo reagente è un tampone composto da 120 g di trisodiocitrato, sciolto in 500 ml di acqua distillata deionizzata (DDW), e poi portata al volume di un litro. A questa soluzione va addizionato dell'idrossido di sodio in percentuale tale da portare il pH della soluzione al valore di 11. Questo reagente va conservato in bottiglia di vetro, ed è molto stabile.
2. Fenolo + sodio-nitroprussiato (35 g di fenolo + 0,40 g di sodio nitroprussiato). Dissolvere in 800 ml di acqua DDW, portare poi a 1000 ml. Questo reagente è stabile per 24 ore.
3. Ipoclorito. Sciogliere 5 g di idrossido di sodio + 1 g di dicloroisocianurato in 400 ml di acqua DDW, portare a 500 ml. Conservare in bottiglia di vetro, alla temperatura di +4°C. Stabile per una settimana.

6.3.1.2 Standard

Fare essiccare circa 2 g di cloruro di ammonio in stufa alla temperatura di 100°C controllando che il peso del sale rimanga costante nel tempo. Riporre, poi, i sali in un essiccatore con gel di silice per altre 24 ore. Compiute queste operazioni, fare sciogliere in acqua grado reagente in proporzione tale da ottenere una concentrazione di 2 mmol dm⁻³.

Tale standard é utilizzato nella procedura quotidiana per la preparazione di 5 standard a concentrazione minore.

La concentrazione degli standard minori viene scelta in base alla quantità di sali di NH₄ che ci si aspetta di trovare, in modo che il set di sub-standard copra tutto l'intervallo di concentrazioni previsto. Dai 5 standard viene ricavato un fattore di moltiplicazione necessario al calcolo delle concentrazioni.

6.3.1.3 Manifold

Il manifold (Fig. 2) è composto da tre iniettori, tre serpentine da 10 spire ognuna, un bagno termostatico e una trappola contenente acido cloridrico al 10%. Il primo iniettore (A), è fornito di 3 ingressi: il primo è per il campione, il secondo provoca la bollazione, mediante la quale il liquido viene diviso in tanti segmenti tutti uguali, onde evitare che i campioni in esame possano mescolarsi tra di loro. Il terzo ingresso provvede all'immissione del primo reagente. Subito dopo ci sono 2 serpentine composte da 10 spire ognuna: nella prima avviene il mescolamento del liquido con il tampone; nella seconda, introdotto da un iniettore posto alla fine della prima serie di spire (B), il reagente si mescola con il campione complessato. Al punto (C) viene inserito il terzo reagente. Per accelerare la produzione blu di indofenolo la soluzione viene fatta passare in una serpentina immersa in un bagno termostato (D) alla temperatura di 75°C. All'uscita del bagno, al punto (E) si trova l'ultima serpentina entro la quale avviene il raffreddamento della soluzione.

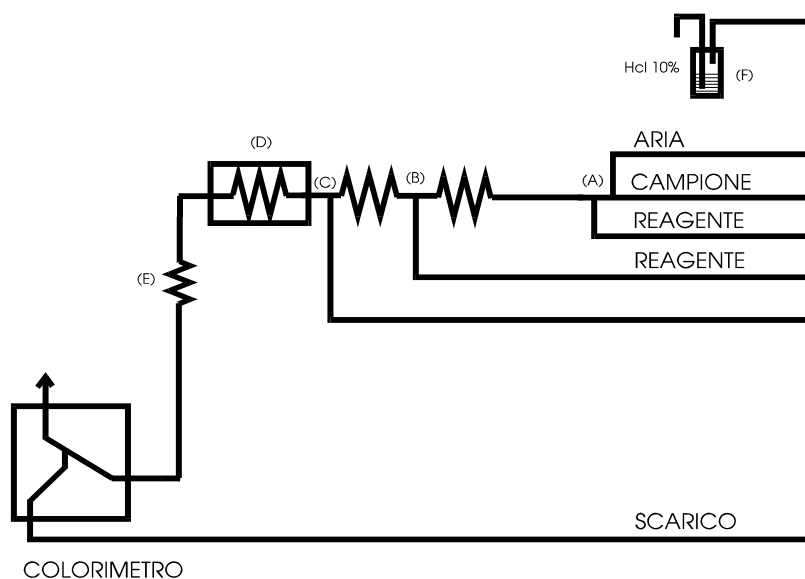


Fig. 2 - Manifold per il dosaggio di NH₄.

L'aria per la bollazione viene immessa nel circuito attraverso una trappola (F) contenente HCl al 10%. Questo accorgimento è stato adottato per far sì che vengano eliminati gli eventuali vapori di ammoniaca contenuti nell'aria del laboratorio.

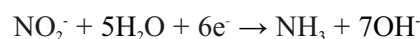
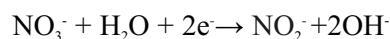
6.3.1.4 Raccomandazioni ed eliminazione dei problemi

- controllare che la linea di base non abbia oscillazioni in quanto se si notassero anche piccole variazioni significherebbe che si è formato del flocculato nel campione causato dal fenolo non più stabile;
- inserire i reagenti uno alla volta, in ordine rigoroso dal primo al terzo;
- il lavaggio del circuito va effettuato con la progressiva eliminazione dei reattivi dal terzo al primo;
- osservare se si forma del precipitato vicino all'iniettore dell'ipoclorito, perché ciò segnalerebbe che il circuito è sporco oppure il tampone non funziona;
- se all'accensione dell'apparecchio si presentasse una linea di base non stabile in assenza di reagenti, lavare il circuito con NaOH e poi con HCl al 10% mediante gli aghi di pescaggio del campione;
- se durante l'analisi si verificasse un evidente aumento della linea di base pulire immediatamente la celletta di lettura del colorimetro iniettando dell'acido cloridrico al 50% direttamente nella celletta senza fermare il circuito;
- usare acqua DDW deionizzandola, possibilmente, direttamente nel contenitore di prelievo dello strumento;
- se la temperatura ambiente fosse superiore a +20°C aggiungere un dispersore di calore alla serpentina di raffreddamento;
- se fosse necessario variare componenti del circuito (iniettori, bollatori) riequilibrare il circuito cambiando le portate dei tubi;
- usare contenitori idonei ai diversi reagenti da utilizzare. Il tappo del contenitore deve essere fornito di piccoli fori nei quali inserire capillari (aghi, etc.) per il prelievo del reagente; in caso di preparazione di standard misti, non unire mai nello stesso matraccio standard NO₃ con standard NH₄;
- usare acqua povera di nutrienti, ovvero acqua oligotrofica (OSW) come acqua di lavaggio tra un campione e l'altro. E' bene che l'OSW abbia valori di salinità simili al campione da analizzare.

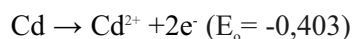
6.4 DETERMINAZIONE DEI NITRATI

6.4.1 Principio del metodo

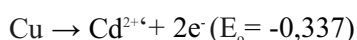
Il metodo proposto per l'analisi dei nitrati si basa sulla loro riduzione, in fase eterogenea, a nitriti e sul successivo dosaggio dei nitriti totali utilizzando una metodica colorimetrica. Il metodo è stato introdotto da Morris e Riley (1963), ma solo successivamente la dinamica delle reazioni implicate è stata studiata approfonditamente (Nydhal, 1976; Grasshoff, 1983). Le reazioni principali su cui si basa la procedura analitica, in ambiente basico, sono:



L'ulteriore riduzione di N(III) risulta sfavorita in condizioni di pH elevato. Il riducente utilizzato è il cadmio, il cui potenziale di semicoppia è:



Il cadmio viene parzialmente ricoperto da rame con potenziale di semicoppia pari a:



per cui il potenziale riducente totale risulta essere pari a -0,740 V.

Un aspetto spesso trascurato è l'ossidazione del cadmio e del rame per effetto non tanto della riduzione dell'azoto, quanto di quella dell'ossigeno disciolto. Infatti, mentre la concentrazione di nitrato è dell'ordine delle $\mu\text{mol dm}^{-3}$, la concentrazione dell'ossigeno disciolto è pari a circa $0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$, per cui la quantità di cadmio ossidato dall'ossigeno risulta maggiore di almeno un ordine di grandezza.

La principale reazione in cui è coinvolto il cadmio risulta essere la seguente:



Il prodotto di solubilità dell'idrossido di cadmio in acqua pura è $6 \cdot 10^{-15}$ per cui in acqua distillata, con valori di pH pari a 8,5, l'idrossido di cadmio inizia a precipitare, depositandosi sulla superficie del reattore ed alterandone le caratteristiche. Per ovviare alla precipitazione dell'idrossido di cadmio e ridurre al minimo la possibilità di un'ulteriore riduzione dei nitriti, si tampona la soluzione a pH 8,5 con un tampone ammonio-cloruro di ammonio che complessa il cadmio, spostandolo dall'equilibrio di precipitazione. I fattori che influenzano maggiormente il tempo di contatto dei nitrati con il cadmio, e, quindi, l'efficienza della reazione, sono: le caratteristiche della superficie del reattore, l'entità della superficie attiva del reattore stesso, il tempo di residenza della soluzione nel reattore e di conseguenza le caratteristiche del flusso.

L'uso di cadmio granulare presenta il vantaggio di essere facilmente disponibile ed economico e di avere un eccellente rapporto superficie/volume. Il principale inconveniente risiede nella variabilità nel tempo delle caratteristiche del riduttore. La progressiva dissoluzione del cadmio elimina, infatti, i granuli di dimensione minore, alterando lo spettro di grandezza dei granuli stessi. È opportuno quindi utilizzare cadmio con una ristretta gamma di misura dei granuli.

Un'altra variabile da considerare è il tempo di contatto fra cadmio, nitrato e nitrito. Un tempo di contatto eccessivamente lungo favorisce la riduzione del nitrito, per cui la lunghezza della colonna di riduzione, a parità di sezione, deve essere ottimizzata al fine di ottenere una riduzione totale del nitrato e una minima riduzione del nitrito.

Nella procedura proposta, le dimensioni della colonna e la velocità di flusso suggerite sono adatte per analisi di campioni con concentrazioni di nitrato nell'intervallo $0 \div 10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ e prevedono l'uso di cadmio in granuli da $0,25 \div 0,42 \text{ mm}$ di diametro ($60 \div 40 \text{ mesh}$). Queste caratteristiche vanno eventualmente modificate sulla base delle misure di efficienza della colonna. Va infine segnalato che gli ioni cloruro rallentano, per cause ancora poco chiare, la reazione di riduzione, che pertanto ha efficienza diversa in acqua di mare e in acqua dolce. Il metodo proposto è sostanzialmente quello illustrato da Grasshoff (1983).

Massimo di assorbanza: 550 nm

6.4.1.1 Reagenti

1. Il primo reagente è un tampone composto da 10 g di ammonio cloruro, sciolto in 700 ml di acqua distillata deionizzata (DDW), e poi portata al volume di un litro. Alla soluzione va aggiunto 1 ml di Brij e idrossido di sodio in percentuale tale da portare il pH della soluzione al valore di 8,5. Molto stabile.

-
2. Sulfanilamide. Sciogliere 10 g di sulfanilamide in 100 ml di HCl concentrato e portare ad un litro in acqua DDW. La soluzione va conservata in bottiglia di vetro marrone ed è stabile per almeno un mese.
 3. Etilendiaminadiidrocloreuro. Sciogliere 1 g di reagente in 1 litro di acqua DDW. La soluzione va conservata in bottiglia di vetro scuro ed è stabile per almeno 1 mese.

6.4.1.2 Standard

Fare essiccare circa 2 g di KNO_3 in stufa alla temperatura di 100°C controllando che il peso del sale rimanga costante nel tempo. Riporre, poi, i sali in un essiccatore con gel di silice per altre 24 ore. Compiute queste operazioni, fare sciogliere in acqua grado reagente in proporzione tale da ottenere una concentrazione di 5 mmol dm^{-3} .

Tale standard è utilizzato nella procedura quotidiana per la preparazione di 5 standard a concentrazione minore.

La concentrazione degli standard minori viene scelta in base alla quantità di sali di NO_3 che ci si aspetta di trovare, in modo che il set di sub-standard copra tutto l'intervallo di concentrazioni previsto. Dai 5 standard viene ricavato un fattore di moltiplicazione necessario al calcolo delle concentrazioni.

6.4.1.3 Il riduttore

Il riduttore è composto da un tubo di vetro pyrex lungo 20 cm con diametro interno di 2 mm e piegato ad U.

Nel tubo vengono inseriti dei granuli di cadmio preparati precedentemente secondo la procedura riportata di seguito.

- Setacciare del cadmio granulare e ricavare una frazione di granuli compresi tra 0,42 e 0,60 mm, lavare poi con HCl al 10% e poi con acqua DDW.
- Sciogliere in 100 ml di acqua DDW 2 g di solfato di rame, immergere nella soluzione il cadmio e agitare fino alla scomparsa del colore.
- Lavare il cadmio fino all'eliminazione totale del rame colloidale legato al cadmio e controllare che i granelli acquisiscano un colore argenteo.
- Riempire il tubo di vetro con dell'acqua DDW e inserire i granuli prelevandoli dalla beuta con una pipetta Pasteur. Riempito il riduttore inserire della lana di vetro alle estremità così da non permettere al cadmio di fuoriuscire.

Esistono alternative all'uso del cadmio granulare come l'utilizzo di serpentine di cadmio o con pareti interne ricoperte di cadmio o l'utilizzo di serpentine di polietilene con un filo di cadmio all'interno. In tutti i casi l'attivazione del cadmio con la soluzione di solfato di rame è necessaria (vedi Innamorati *et al.*, 1990 per una discussione). In alcune procedure il solfato di rame viene aggiunto in continuo col tampone.

6.4.1.4 Manifold

Il manifold (Fig. 3) è composto da tre iniettori e cinque serpentine, una da 5 spire e quattro da 10 spire e un riduttore. Il primo iniettore (A), è fornito di tre ingressi: il primo è per il campione, il secondo è per la bollazione ed il terzo ingresso provvede all'immissione del primo reagente. Subito dopo c'è una serpentina composta da 5 spire nella quale avviene il mescolamento del liquido con il tampone. All'estremità della serpentina troviamo un debollatore che ha la funzione di eliminare la bolla dal circuito onde evitare che entri aria nel riduttore che è collegato al bollatore stesso al punto (B). Al punto (C) dopo il riduttore, troviamo il secondo iniettore fornito di tre ingressi: il primo è per il campione ridotto da NO_3 ad NO_2 , il secondo serve per ripristinare la bollazione ed il terzo provvede all'immissione del secondo reagente. Subito dopo ci sono 4 serpentine composte da 10 spire ognuna: nelle prime 2 avviene il mescolamento col secondo reagente, nelle altre 2 quello del terzo reagente introdotto al punto (D) mediante un iniettore.

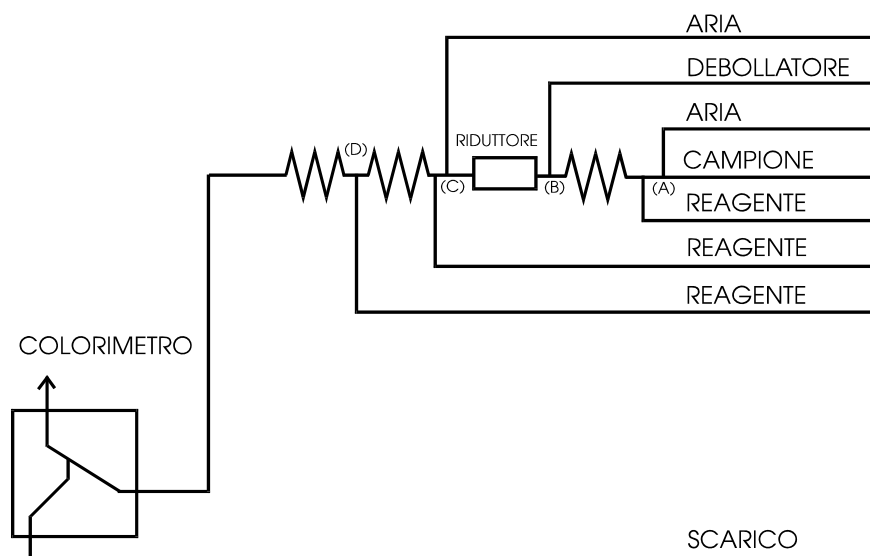


Fig. 3 - Manifold per il dosaggio di NO_3^- .

6.4.1.5 Raccomandazioni ed eliminazione dei problemi

- Non far passare aria attraverso il riduttore.
- Controllare l'efficienza del riduttore confrontando lo standard di nitrato con quello dei nitriti secondo la metodologia descritta nei punti che seguono.
- Preparare due standard di nitrato: uno alla concentrazione di $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ l'altro a $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ e verificare che al raddoppio della concentrazione corrisponde un effettivo raddoppio della lettura.
- Preparare uno standard nitrato alla concentrazione di $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ed un altro di nitrito sempre alla stessa concentrazione. Far passare i due standard nello stesso circuito preparato per i nitrati e verificare che diano lo stesso valore di lettura; ciò per accertarsi che non si sia verificata una riduzione della concentrazione di nitriti nella colonna di cadmio.
- Regolare la bollazione del circuito, ogni volta che il riduttore viene sostituito agendo sulle portate dei tubi;
- Attivare il riduttore facendo passare nel circuito uno standard NO_3^- con concentrazione di $25 \mu\text{mol dm}^{-3}$ ogni volta che questo viene sostituito.
- Se all'accensione dell'apparecchio si presentasse una linea di base non stabile in assenza di reagenti, lavare il circuito con HCl al 10%.
- Se durante l'analisi si verificasse un evidente aumento della linea di base pulire immediatamente la celletta di lettura del colorimetro iniettando dell'acido cloridrico al 50% direttamente nella celletta senza fermare il circuito.
- Usare acqua DDW deionizzandola, possibilmente, direttamente nel contenitore di prelievo dello strumento.
- Se necessitasse variare componenti del circuito (iniettori, bollatori) riequilibrare il circuito cambiando le portate dei tubi.
- Usare contenitori idonei ai diversi reagenti da utilizzare. Il tappo del contenitore deve essere fornito di piccoli fori nei quali inserire capillari (aghi, etc.) per il prelievo del reagente.
- Nella formazione degli standard misti non unire mai standard NO_3^- né con standard NH_4^+ né con standard NO_2^- .
- Usare acqua povera di nutrienti, ovvero acqua oligotrofica (OSW), come acqua di lavaggio tra un campione e l'altro. E' bene che l'OSW abbia valori di salinità simili al campione da analizzare.

-
- Controllare che lo standard NO_2 , passato attraverso la colonna di riduzione dei nitrati, abbia lo stesso valore di lettura dello standard NO_2 analizzato nel circuito per i nitriti.

Poiché la concentrazione dei nitrati viene determinata dopo la loro riduzione a nitriti, vanno tenuti presenti alcuni aspetti. Il cadmio ramato non ha un'efficienza di riduzione del 100% ed in talune condizioni riduce anche il nitrito. Pertanto se fosse necessario discriminare i due ioni bisognerebbe determinare accuratamente l'efficienza del riduttore sia per il nitrito con una soluzione a concentrazione di solo nitrito e del nitrato con una soluzione a concentrazione nota di solo nitrato. Per i campioni naturali, nota la concentrazione di nitrito determinato in un altro canale, va sottratta alla concentrazione di nitrito+nitrato in forma di nitrito, determinato nel canale dei nitrati, la concentrazione del nitrito nel campione corretta per l'eventuale riduzione ed il valore va a sua volta corretto per l'efficienza della colonna. In molti casi il dato utile è semplicemente la concentrazione di nitrito+nitrato, che a meno del possibile piccolo errore dovuto alla riduzione del nitrito, è il valore calibrato ricavato dal canale del nitrato. In altri casi si sottrae semplicemente alla concentrazione del nitrato+nitrito la concentrazione del nitrito determinata indipendentemente. Per una discussione più dettagliata si veda Innamorati *et al.* (1990).

6.5 DETERMINAZIONE DEI NITRITI

6.5.1 Principio del metodo

Il metodo proposto si basa su una serie di reazioni che portano alla formazione di un composto diazoico colorato che viene dosato per via colorimetrica. Questa procedura, tra le più sensibili tra le analisi colorimetriche dirette, è specifica per i nitriti e non presenta alcuna variazione di efficienza in relazione alla forza ionica della soluzione.

Il metodo originale, proposto da Griess-Ilosvay (Ilosvay, 1889), è stato successivamente modificato da Shinn (1941) ed applicato all'analisi dell'acqua di mare da Bendschneider e Robinson (1952).

La procedura analitica consiste nella formazione, in ambiente con pH inferiore a 2 e temperatura non superiore a 40°C , di un sale di diazonio (cloruro di diazosulfanilammide) che reagisce successivamente con naftiletilendiammina per generare un colorante diazoico.

Massimo di assorbanza: 550 nm

6.5.1.1 Reagenti

1. Sulfanilamide. Sciogliere 10 g di sulfanilamide in 100 ml di HCl concentrato e portare ad un litro in acqua DDW. La soluzione va conservata in bottiglia di vetro scura. Stabile almeno 1 mese.
2. Etilendiaminadiidrocloreuro. Sciogliere 1 g di reagente in 1 l di acqua DDW. La soluzione va conservata in bottiglia di vetro scura. Stabile almeno 1 mese.

6.5.1.2 Standard

Fare essiccare circa 2 g di NaNO_2 in stufa alla temperatura di 100°C controllando che il peso del sale rimanga costante nel tempo. Riporre, poi, i sali in un essiccatore con gel di silice per altre 24 ore. Compiute queste operazioni, fare sciogliere in acqua grado reagente in proporzione tale da ottenere una concentrazione di 2 mmol dm^{-3} .

Tale standard è utilizzato nella procedura quotidiana per la preparazione di 5 standard a concentrazione minore.

La concentrazione degli standard minori viene scelta in base alla quantità di sali di NO_2 che ci si aspetta di trovare, in modo che il set di sub-standard copra tutto l'intervallo di concentrazioni previsto. Dai 5 standard viene ricavato un fattore di moltiplicazione necessario al calcolo delle concentrazioni.

6.5.1.3 Manifold

Il manifold (Fig. 4) è composto da due iniettori e quattro serpentine da 10 spire ognuna.

Il primo iniettore (A), è fornito di 3 ingressi: il primo è per il campione, il secondo è per la bollazione e il terzo ingresso provvede all'immissione del primo reagente. Subito dopo ci sono 4 serpentine composte da 10 spire ognuna: nelle prime 2 avviene il mescolamento del primo reagente, nelle altre 2 quello del secondo reagente introdotto al punto (B) mediante il secondo iniettore.

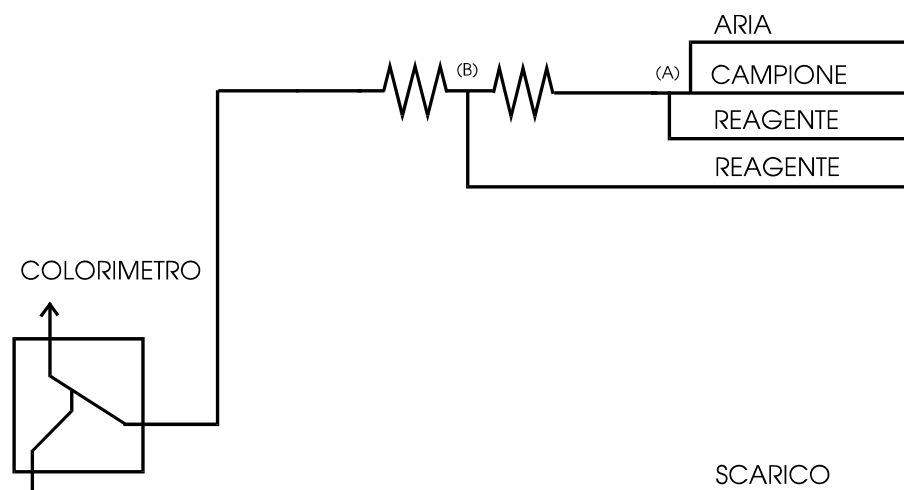


Fig. 4 - Manifold per il dosaggio di NO₂.

6.5.1.4 Raccomandazioni ed eliminazione dei problemi

- Se all'accensione dell'apparecchio si presentasse una linea di base non stabile in assenza di reagenti, lavare il circuito con HCl al 10%.
- Se durante l'analisi si verificasse un evidente aumento della linea di base pulire immediatamente la celletta di lettura del colorimetro iniettando dell'acido cloridrico al 50% direttamente nella celletta senza fermare il circuito.
- Usare acqua DDW deionizzandola direttamente nel contenitore di prelievo dello strumento.
- Se necessitasse variare componenti del circuito (iniettori, bollatori) riequilibrare il circuito cambiando le portate dei tubi.
- Usare contenitori idonei ai diversi reagenti da utilizzare. Il tappo del contenitore deve essere fornito di piccoli fori nei quali inserire capillari (aghi, etc.) per il prelievo del reagente.
- Usare acqua povera di nutrienti, ovvero acqua oligotrofica (OSW), come acqua di lavaggio tra i campioni. È bene che l'OSW abbia salinità simile ai campioni.

6.6 DETERMINAZIONE DEGLI ORTOFOSFATI

6.6.1 Principio del metodo

Il metodo si basa sulla formazione di un complesso fosfomolibdico di colore blu (del gruppo dei blu di molibdeno) la cui concentrazione viene misurata per via colorimetrica (spettrofotometro o colorimetro) (Deniges, 1920). Gli aspetti rilevanti per lo sviluppo del complesso fosfomolibdico sono di seguito schematizzati.

Lo ione molibdato MoO_4^{2-} ed i suoi polimeri formano, in ambiente acido, eteropoliacidi stabili con

elementi del IV e V gruppo (Boltz e Mellon 1947; Cotton e Wilkinson, 1968). L'acido fosfomolibdico è un complesso di colore giallo. La riduzione del molibdato da Mo(VI) a Mo(V) in questo complesso produce un eteropoliacido di colore blu. Il picco massimo di assorbanza varia in base al tipo di riducente adoperato, probabilmente in relazione al variare del rapporto tra Mo(VI) e Mo(V) nel complesso e al tipo di aggregazione delle unità base nella soluzione.

Murphy e Riley (1962) introdussero, nella procedura per la determinazione dei fosfati nell'acqua di mare, l'uso di un sale di antimonio trivalente, che entra nell'eteropoliacido in un rapporto di circa 1:1 con il fosforo. Questa modificazione induce uno spostamento del massimo di assorbanza verso l'infrarosso, con un incremento del coefficiente di estinzione molare e un drastico aumento nella velocità di formazione. Le proprietà ottiche di questa classe di composti sono state esaminate da Going e Eisenreich (1974). La successiva riduzione avviene per opera dell'acido ascorbico, eliminando così dipendenze dalla forza ionica (effetto salino) e dalla temperatura (Harvey, 1948; Murphy e Riley, 1958, 1962; Jones e Spencer, 1963).

Per minimizzare l'interferenza di altri ioni che reagiscono in maniera analoga con i molibdati è necessario mantenere il pH della soluzione finale al di sotto di 1, condizione nella quale la formazione di eteropoliacidi con Si e As è decisamente sfavorita (Koroleff, 1983b). La metodologia proposta è quella di Murphy e Riley (1962) nella versione riportata da Strickland e Parsons (1968).

Massimo di assorbanza: 880 nm

6.6.1.1 Reagenti

1. Molibdato d'ammonio. Sciogliere 10 g di molibdato in 800 ml di acqua distillata deionizzata (DDW), e poi portare al volume di un litro. La soluzione è stabile per almeno un mese.
2. Antimonio potassio tartrato (KAT). Sciogliere 2,5 g di KAT in 800 ml di acqua distillata deionizzata, e poi portare al volume di 1 l. Conservare in bottiglia di vetro, stabile per almeno un mese.
3. Acido solforico concentrato.
4. Acido ascorbico.

6.6.1.2 Soluzioni d'uso

- Reagente misto. Miscelare in un cilindro di vetro graduato da 250 ml, ed agitando dopo ogni aggiunta, 100 ml di stock molibdato+25 ml di KAT+30 ml di H₂SO₄ conc.+1 ml di SLS (Sodio-Lauril-Solfato) e portare a 250 ml. Il reagente è molto stabile e va conservato in bottiglia di vetro.
- Acido ascorbico. Sciogliere 1,8 g di acido ascorbico in 100 ml di DDW.

6.6.1.3 Standard

Fare essiccare circa 2 g di KH₂PO₄ in stufa alla temperatura di 110°C controllando che il peso del sale rimanga costante nel tempo. Riporre, poi, i sali in un essiccatore con gel di silice per altre 24 ore. Compiute queste operazioni, fare sciogliere in acqua grado reagente in proporzione tale da ottenere una concentrazione di 2 mmol dm⁻³.

Tale standard è utilizzato nella procedura quotidiana per la preparazione di 5 standard a concentrazione minore.

La concentrazione degli standard minori viene scelta in base alla quantità di sali di PO₄ che ci si aspetta di trovare, in modo che il set di sub-standard copra tutto l'intervallo di concentrazioni previsto. Dai 5 standard viene ricavato un fattore di moltiplicazione necessario al calcolo delle concentrazioni.

6.6.1.4 Manifold

Il manifold (Fig. 5) è composto da due iniettori e tre serpentine da 10 spire ognuna.

Il primo iniettore (A), è fornito di 3 ingressi: il primo è per il campione, il secondo è per la bollazione

e il terzo ingresso provvede all'immissione del primo reagente. Subito dopo ci sono 3 serpentine composte da 10 spire ognuna: nella prima avviene il mescolamento del primo reagente, nelle altre 2 quello del secondo reagente introdotto al punto (B) mediante il secondo iniettore.

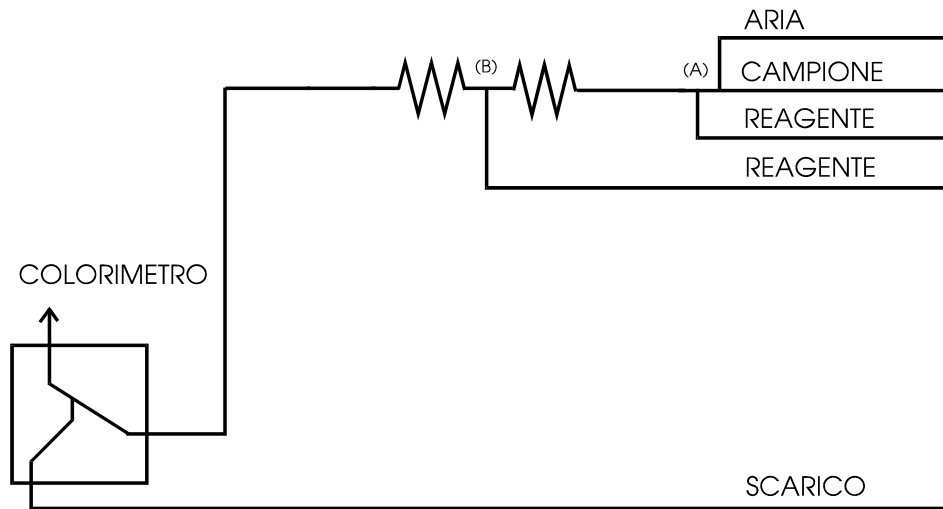


Fig. 5 - Manifold per il dosaggio di PO_4 .

6.6.1.5 Raccomandazioni e eliminazione dei problemi

- Se all'accensione dell'apparecchio si presentasse una linea di base non stabile in assenza di reagenti, lavare il circuito con NaOH e poi con HCl al 10%.
- Se durante l'analisi si verificasse un evidente aumento della linea di base pulire immediatamente la celletta di lettura del colorimetro iniettando dell'acido cloridrico al 50% direttamente nella celletta senza fermare il circuito.
- Usare acqua DDW deionizzandola, possibilmente, nel contenitore di prelievo dello strumento.
- Se necessitasse variare componenti del circuito (iniettori, bollatori) riequilibrare il circuito cambiando le portate dei tubi.
- Usare contenitori idonei ai diversi reagenti da utilizzare. Il tappo del contenitore deve essere fornito di piccoli fori nei quali inserire capillari (aghi, etc.) per il prelievo del reagente.
- Usare acqua povera di nutrienti, ovvero acqua oligotrofica (OSW), come acqua di lavaggio tra un campione e l'altro. E' bene che l'OSW abbia valori di salinità simili al campione da analizzare.
- Per temperatura inferiore ai $10^{\circ}C$ aggiungere al manifold un bagno termostato alla temperatura di $40^{\circ}C$.
- Se si formasse del precipitato nel reagente del molibdato, scartare.
- In caso di preparazione di standard misti non unire mai nello stesso matraccio standard PO_4 con standard SiO_4 .
- Usare come celletta di lettura per il colorimetro un modello che sia provvisto di un ingresso molto stretto onde evitare disturbi di rifrazione.
- Usare fototubi di lettura ad alta sensibilità per letture di 880 nm.

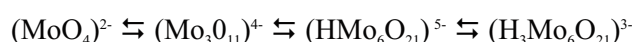
6.7 DETERMINAZIONE DEI SILICATI

6.7.1 Principio del metodo

La determinazione dei silicati disciolti viene effettuata inducendo la formazione di un poliacido silicomolibdico che viene successivamente ridotto a blu di molibdeno. Il composto finale ha un massimo di assorbanza a 810 nm, e viene dosato per via colorimetrica.

La catena di reazioni è fortemente influenzata da variazioni anche minime delle condizioni di reazione a causa della molteplicità dei prodotti intermedi e della loro instabilità. Presentiamo perciò solo un quadro sintetico del processo utilizzato e dei fattori che influenzano le reazioni implicate.

Lo ione molibdato in ambiente acquoso dà luogo alla formazione di numerosi poliacidi polisomeri. Con il diminuire del pH, le forme più abbondanti seguono una sequenza di equilibri del tipo:

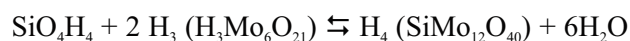


rendendo il pH una variabile essenziale nel determinare il tipo di polimero molibdico presente in maggiore quantità (Garrett e Walker, 1964).

L'acido silicomolibdico si forma con differente velocità in relazione al grado di polimerizzazione del silicato. I trimeri, infatti, hanno un tempo di formazione circa cento volte più lungo dei monomeri (Mullin e Riley, 1955). Il grado di polimerizzazione dipende a sua volta dal pH, aumentando in ambiente acido, e dal trattamento subito dalla soluzione.

L'acido silicomolibdico esiste in almeno due isomeri α e β (Strickland, 1952 a, b, c; Morrison e Wilson, 1963 a, b, c; Garrett e Walker, 1964; Scott, 1975; Truesdale e Smith, 1975), di cui il primo è termodinamicamente più stabile ma sfavorito cineticamente a valori di pH minori di 2.

Secondo Grasshoff (1964) la reazione di formazione è una reazione reversibile che procede secondo l'equilibrio:



Il prodotto di reazione dipende fortemente dal pH e dalle concentrazioni dei reagenti in quanto il tipo di cinetica muta anche in relazione alla concentrazione del molibdato (Garrett e Walker, 1964). Inoltre la forma β si trasforma lentamente nella forma α anche a pH bassi.

I due isomeri α e β dell'acido silicomolibdico presentano un picco di massima assorbanza nella parte blu dello spettro, ma con coefficienti di estinzione piuttosto diversi, nessuno dei quali particolarmente elevato. Per le ragioni dette in precedenza, inoltre, essi non garantiscono sufficiente stabilità nel tempo. Questa affermazione è però contraddetta da Grasshoff (1964), che suggerisce un metodo per produrre l'isomero α in condizioni da mantenerlo stabile per almeno 24 ore. La successiva riduzione dell'isomero β per opera del solfato di p-metilamminofenolo (metolo) in ambiente acido e in presenza di solfito produce un blu di molibdeno stabile per almeno 2 ore dal completamento della reazione (Mullin e Riley, 1955).

Anche in questo processo è importante il controllo del pH per evitare una riduzione diretta del molibdato in eccesso per opera del metolo.

Tutte le reazioni sopra schematizzate dipendono sia dalla forza ionica della soluzione che dalla presenza di specifici ioni, specie quelli bivalenti; pertanto la concentrazione del prodotto finale e forse anche la sua estinzione molare dipendono dalla concentrazione salina del miscuglio di reazione e, di conseguenza, del campione. La formazione di poliacidi con il molibdato, infatti, è caratteristica anche di altri ioni, in particolare fosfato e arseniato (Boltz e Mellon, 1947; Cotton e Wilkinson, 1968); per evitare le interferenze dei fosfomolibdati, questi possono essere eliminati con acido ossalico (Strickland e Parsons, 1968).

Massimo di Assorbanza: 820 nm

6.7.1.1 Reagenti

1. Cloruro Stannoso. Sciogliere 20 g di cloruro stannoso in 12,5 ml di HCl concentrato + 27,5 ml di acqua DDW. Il reagente viene sciolto alla temperatura di 70°C.
2. Acido tartarico. Sciogliere 100 g di acido tartarico in 1 l di DDW.
3. Molibdato d'ammonio. Sciogliere 40 g di molibdato in 800 ml di DDW, e poi portare al volume di 1 l.

6.7.1.2 Soluzioni d'uso

- Molibdato. Miscelare 50 ml di HCl al 10% + 40 ml di molibdato +15 ml di DDW.
- Cloruro Stannoso. Miscelare 2,5 ml di cloruro stannoso + 48 ml di HCl al 10% + 50 ml di DDW.

6.7.1.3 Standard

Fare essiccare circa 2 g di Na_2SiF_6 in stufa alla temperatura di 105°C fino a giungere ad un peso costante nel tempo. Riporre, poi, il sale in un essiccatore con gel di silice per altre 24 ore. Compiute queste operazioni, fare sciogliere in acqua grado reagente in proporzione tale da ottenere una concentrazione di 10 mmol dm^{-3} .

Tale standard é utilizzato nella procedura quotidiana per la preparazione di 5 standard a concentrazione minore.

La concentrazione dei sub-standard viene scelta in base alla quantità di SiO_4 che ci si aspetta di trovare, ma in modo da coprire tutto l'intervallo di concentrazioni previsto. Dai 5 standard viene ricavato il fattore di moltiplicazione per il calcolo delle concentrazioni.

6.7.1.4 Manifold

Il manifold (Fig. 6) é composto da tre iniettori e sei serpentine da 10 spire ognuna. Il primo iniettore (A), é fornito di 3 ingressi: Il primo è per il campione, il secondo è per la bollazione e il terzo ingresso provvede all'immissione del primo reagente. Subito dopo ci sono 6 serpentine composte da 10 spire ognuna: nelle prime due avviene il mescolamento del primo reagente, nelle seconde due quello del secondo reagente introdotto al punto (B) mediante un secondo iniettore, ed infine nelle ultime due viene mescolato il terzo reagente introdotto al punto (C).

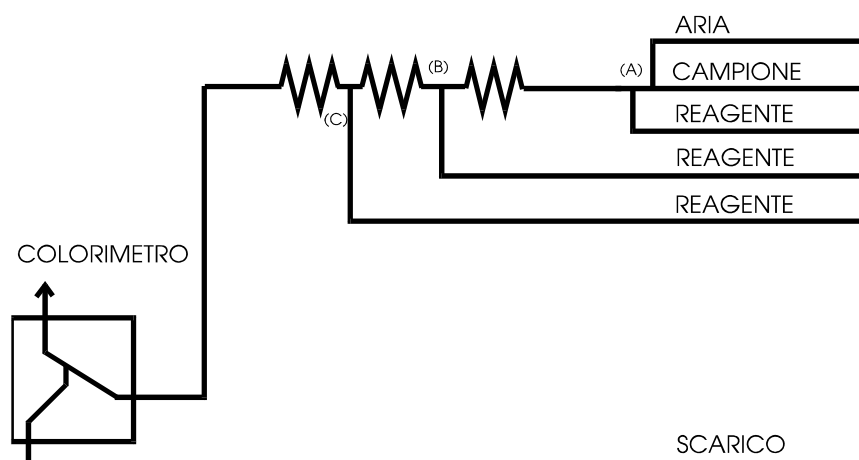


Fig. 6 - Manifold per il dosaggio di SiO_4 .

6.7.1.5 Raccomandazioni e eliminazione dei problemi

- Se all'accensione dell'apparecchio si presentasse una linea di base non stabile in assenza di reagenti, lavare il circuito con NaOH e poi con HCl al 10%.
- Se durante l'analisi si verificasse un evidente aumento della linea di base pulire immediatamente la celletta di lettura del colorimetro iniettando dell'acido cloridrico al 50% direttamente nella celletta senza fermare il circuito.
- Usare acqua DDW deionizzandola, possibilmente, direttamente nel contenitore di prelievo dello strumento.
- Se necessitasse variare componenti del circuito (iniettori, bollatori) riequilibrare il circuito cambiando le portate dei tubi.
- Usare contenitori idonei ai diversi reagenti da utilizzare. Il tappo del contenitore deve essere fornito di piccoli fori nei quali inserire capillari (aghi, etc.) per il prelievo del reagente.
- Usare acqua povera di nutrienti, ovvero acqua oligotrofica (OSW), come acqua di lavaggio tra un campione e l'altro. È bene che l'OSW abbia valori di salinità simili al campione da analizzare.
- Se si formasse del precipitato nel reagente del molibdato, scartare.
- Usare come celletta di lettura per il colorimetro un modello che sia provvisto di un ingresso molto stretto onde evitare disturbi di rifrazione.
- Usare fototubi di lettura ad alta sensibilità per letture a 820 nm;
- Se inserendo i reagenti si notasse una colorazione blu del campione, all'uscita dalla seconda serie di serpentine, ciò indicherebbe che l'acido tartarico è da scartare.

6.8 BIBLIOGRAFIA

- BENDSCHNEIDER K., ROBINSON R.I. (1952) - A new spectrophotometric method for the determination of nitrite in sea water. *J. Mar. Res.*, **11**: 87-96.
- BERTHELOT M.P. (1859) - *Repertoire de Chemie Appliquée*, pp. 284.
- BOLTZ D.F., MELLON M.G. (1947) - Determination of phosphorus, germanium, silicon, and arsenic by the heteropolyblue method. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **19**: 873-877.
- CATALANO G. (1987) - An improved method for the determination of ammonia in seawater. *Mar. Chem.*, **20**: 289-295.
- COTTON F.A., WILKINSON G. (1968) - Gli elementi della seconda e terza serie di transizione. In: Ambrosiana, Milano (ed), *Chimica Inorganica*, 917-1059.
- CROMPTON T.R. (2006) - *Analysis of seawater: a guide for the analytical and environmental chemist*. Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K, 510 pp.
- DENIGES M.G. (1920) - Reaction decoloration extremement sensible des phosphate et des arseniates. Ses applications. *C.R. Acad. Sci., Paris*, **171**: 802-804.
- FOLKARD A. (1978) - Automatic analysis of sea water nutrients, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Directorate of Fisheries Research, Technical Report N. 46.
- GARRETI H.E., WALKER A. J. (1964) - The spectrophotometric determination of silicic acid in dilute solution. *Analyst*, **89**: 642-650.
- GOING J.E., EISENREICH S.J. (1974) - Spectrophotometric studies of reduced molybdo-antimonylphosphoric acido. *Anal. Chim. Acta*, **70**: 95-106.
- GORDON L.I., JENNINGS J.C.J., ROSS A.A., KREST J.M. (1993) - A Suggested Protocol for Continuous Flow Automated Analysis of Seawater Nutrients (Phosphate, Nitrate, Nitrite and Silicic Acid) in the WOCE Hydrographic Program and the Joint Global Ocean Fluxes Study. *Oregon State University, College of Oceanic and Atmospheric Sciences*, Technical Report, 93-1.
- GRASSHOFF K. (1964) - On the determination of silica in sea water. *Deep-Sea Res.*, **11**: 597-604.
- GRASSHOFF K. (1983) - Determination of nitrate. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 143-150.
- GRASSHOFF K., EHRHARDT M., KREMLING K., ANDERSON L. (ed) (1999) - *Methods of seawater analysis*, Wiley-Vch Verlag, Weinheim, 600 pp.

- GRAVITZ N., GLEYE L. (1975) - A photochemical side reaction that interferes with phenolphthorite assay for ammonia. *Limnol. Oceanogr.*, **20**: 1015-1017.
- GRAY S.M., HANRAHAN G., MCKELVIE I.D., TAPPIN A., TSE F., WORSFOLD P.J. (2006) - Flow Analysis techniques for spatial and temporal measurement of nutrients in aquatic systems. *Envir. Chem.* **3**: 3-18.
- HALES B., VAN GEEN L., TAKAHASHI T. (2004) - High-frequency measurement of seawater chemistry: Flow-injection analysis of macronutrients. *Limnol. Oceanogr.-Meth.*, **2**: 91-101.
- HARVEY H.W. (1948) - The estimation of phosphate and total phosphorus in sea waters. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **27**: 337-359.
- ILOSVA Y.L. (1889) - Determination of nitrite in saliva and exhaled air. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **2**: 388-391.
- INNAMORATI M., FERRARI I., MARINO D., RIBERA D'ALCALA' M. (1990) - *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. Nova Thalassia 11 Trieste, 372 pp.
- IVANCIC I., DEGOBBIS D. (1984) - An optimal manual procedure for ammonia analysis in natural waters by indophenol blue method. *Water Res.*, **18**: 1143-1147.
- JONES P.W.G., SPENCER C.P. (1963) - Comparison of several methods of determining inorganic phosphate in sea-water. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **43**: 251-273.
- KOROLEFF F. (1969) - Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *ICES paper, C.M./C*, **9**: 19-22.
- KOROLEFF F. (1983a) - Determination of ammonia. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of seawater analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 150-175.
- KOROLEFF F. (1983b) - Determination of phosphorus. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 125-139.
- LIDDICOAT M.I., TIBBITTS S., BUTLER E.I. (1975) - The determination of ammonia in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, **20**: 131-132.
- LUBOCHINSKY B., ZALTA J. (1954) - Microdosage colorimetric de l'azote ammoniacal. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **36**: 1363-1366.
- MANTOURA R.F.C., WOODWARD E.M.S. (1983) - Optimization of the indophenol blue method for the automated determination of ammonia in estuarine waters. *Estuar. Coast. Shelf S.*, **17**: 219-224.
- MILLS E. (1989) - *Biological oceanography: an early history, 1870-1960*. Cornell University Press, Ithaca, NY (USA), 378 pp.
- MORRIS A.W., RILEY J.P. (1963) - The determination of nitrate in sea water. *Anal. Chim. Acta*, **29**: 272-279.
- MORRISON I.R., WILSON A.L. (1963a) - The absorptiometric determination of silicon in water. Part I. Formation, stability and reduction of β - and α -molybdosilicic acids. *Analyst*, **88**: 88-99.
- MORRISON I.R., WILSON A.L. (1963b) - The absorptiometric determination of silicon in water. Part II. Method for determining "reactive" silicon in power-stations waters. *Analyst*, **88**: 100-104.
- MORRISON I.R., WILSON A.L. (1963c) - The absorptiometric determination of silicon in water. Part III. Method for determining the total silicon content. *Analyst*, **88**: 446-455.
- MULLIN J.B., RILEY J.P. (1955) - The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **12**: 162-176.
- MURPHY J., RILEY J.P. (1958) - A single-solution method for the determination of soluble phosphate in sea water. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **37**: 9-14.
- MURPHY J., RILEY J.P. (1962) - A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chim. Acta*, **27**: 31-36.
- NYDHAL F. (1976) - On the optimum conditions for the reduction of nitrate to nitrite by cadmium. *Talanta*, **23**: 349-357.
- PATTON J.C., CROUCH S.R. (1977) - Spectrophotometric and kinetics investigation of the Berthelot reaction for the determination of ammonia. *Anal. Chem.*, **49**: 464-469.
- RICHARDS F.A., KLETSCHE R.A. (1964) - The spectrophotometric determination of ammonia and labile amino compounds in fresh and seawater by oxidation to nitrite. In: Miyake Y., Koyama T. (eds), *Recent Researches in the Fields of Hydrosphere, Atmosphere, and Nuclear Geochemistry*, Maruzen Co., Tokyo, 65- 81.
- SASAKI K., SAWADA Y. (1980) - Determination of ammonia in estuary. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **46**: 319-321.
- SCOTT B.D. (1975) - Reactive silicate in seawater. A comparison of the reduced alpha and beta molybdosilicic acid methods of spectrophotometric analysis. *C. S.J.R. O. Aust. Div. Fish. Oceanogr. Rep.*, **65**: 1-10.
- SHINN M.B. (1941) - A colorimetric method for the determination of nitrite. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **13**: 33-35.
- SOLORZANO L. (1969) - Determination of ammonia in natural waters by phenolphthorite methods. *Limnol. Oceanogr.*, **14**: 799-801.

-
- SPANDRIO L. (1985) - *Manuale di laboratorio*. Piccin Nuova Libraia, Padova: 1036 pp.
- STRICKLAND J.D.H. (1952a) - The preparation and properties of silicomolybdic acid I. The properties of alpha silicomolybdic acid. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**: 862-867.
- STRICKLAND J.D.H. (1952b) - The preparation and properties of silicomolybdic acid II. The preparation and properties of alpha silicomolybdic acid. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**: 868-871.
- STRICKLAND J.D.H. (1952c) - The preparation and properties of silicomolybdic acid III. The combination of silicate and molybdate. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**: 872-876.
- STRICKLAND J.J., PARSONS T. (1965) - A manual of sea water analysis: with special reference to the more common micronutrients and to particulate organic material. *Fisheries Research Board of Canada*, 311 pp.
- STRICKLAND J.D., PARSONS T.R. (1968) - A practical handbook of sea-water analysis. *Bull. Fish. Res. Board Can.*, **167**: 1-312.
- TRUESDALE V.W., SMITH C.J. (1975) - The formation of molybdosilicic acids from mixed solutions of molybdate and silicate. *Analyst*, **100**: 203-212.
- WHITLEDGE T., MALLOY S., PATTON C., WIRICK C. (1981) - Automated nutrient analyses in seawater. BNL-51398, Brookhaven National Laboratory, Upton, NY (USA).

6.9 BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

6.9.1 Ammoniaca

- AIREY D., DAL PONT G., SANDARS G. (1984) - Method of determining and removing sulphide to allow the determinations of sulphate, phosphate, nitrite and ammonia by conventional methods in small volumes of anoxic waters. *Anal. Chim. Acta*, **166**: 79-92.
- AIREY D., SANDARS G. (1987) - Automated analysis of nutrients in seawater. *Rep. CSIRO Mar. Lab.*, **166**: 1-106.
- BERG B.R., ABDULLAH M.I. (1977) - An automatic method for the determination of ammonia in seawater. *Water Res.*, **11**: 637-638.
- BOWER C.E., HOLM-HANSEN O. (1980) - A salicylate-hypochlorite method for determining ammonia in seawater. *Can. J. Aquat. Sci.*, **37**: 794-798.
- CROWTHER J., EVANS J. (1980) - Blanking system for the spectrophotometric determination of ammonia in surface waters. *Analyst*, **105**: 849-854.
- DEGOBBIS D. (1973) - On the storage of seawater samples for ammonia determination. *Limnol. Oceanogr.*, **18**: 146-150.
- FOLKARD A.R. (1978) - Automatic analysis of seawater nutrients. *Fish. Res. Tech. Rep. Dir. Fish. Res. (G.B.) MAFF Lowestoft (UK)*, **46**: 1-23.
- GARDNER W.S. (1978) - Microfluorimetric method to measure ammonium in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, **23**: 1069-1072.
- GRASSHOFF K., JOHANNSEN H. (1972) - A new automatic and direct method for the automatic determination of ammonia in sea water. *J. Cons. int. Explor. Mer.*, **34**: 516-521.
- HARA H., MOITAKE A., OKAZAKI S. (1987) - Alternate washing method for flow-through determination of ammonium ion using an ammonia gas electrode. *Anal. Chem.*, **59**: 1995-1999.
- HELDER W., DE VRIES R.T.P. (1979) - An automatic phenol-hypochlorite method for the determination of ammonia in sea- and brackish waters. *Neth. J. Sea Res.*, **13**: 154-160.
- JOHANNSEN H. (1972) - A new sensitive and direct method for the automatic determination of ammonia in seawater. *J. Cons. C.I.E.M.*, **34**: 516-521.
- KLINGAMAN E.D., NELSON D.W. (1976) - Evaluation of methods for preserving the levels of soluble inorganic phosphorus and nitrogen in unfiltered water samples. *J. Envir. Qual.*, **5**: 42-46.
- KRAUS P.R., CROUCH S.R. (1987) - Investigation of a chemiluminescent system for determination of ammonia by flow-injection analysis. *Anal. Lett.*, **20**: 183-200.
- KURASHINA S., HISHIDA M., UENO Y., IMOTO T. (1979) - An investigation of the coastal environment with a consecutive-automatic analyzer (CAA). *Rep. Hydrogr. Res.*, **14**: 39-48.

-
- LE CORRE P., TREGUER P. (1978) - Dosage de l'ammonium dans l'eau de mer: comparaison entre deux méthodes d'analyse automatique. *J. Cons. C.I.E.M.*, **38**: 147-153.
- MARVIN K.T., PROCTOR R.R. Jr (1965) - Stabilizing the ammonia-nitrogen content of estuarine and coastal waters by freezing. *Limnol. Oceanogr.*, **10**: 288-290.
- MERKS A.G.A. (1975) - Determination of ammonia in sea water with an ion-selective electrode. *Neth. J. Sea Res.*, **9**: 371-375.
- RIOS A., LUQUE DE CASTRO M.D., VALCAREL M. (1986) - Simultaneous flow-injection fluorimetric determination of ammonia and hydrazine with a novel mode of forming pH gradients. *Anal. Chim. Acta*, **187**: 139-145.
- SIMEONOV V. (1980) - Critical considerations on the practical application of Orion ion-sensitive electrodes to sea and other natural water samples. *Z. Anal. Chem.*, **301**: 290-293.

6.9.2 Nitrati

- AIREY D., SANDARS G. (1987) - Automated analysis of nutrients in seawater. *Rep. C.S.I.R.O Mar. Lab.*, **166**: 1-106.
- AOKI T., UEMURA S., MUNEMORI M. (1986) - Continuous flow method for simultaneous determination of nitrate and ammonia in water. *Envir. Sci. Technol.*, **20**: 515-517.
- ARMSTRONG F.A.J. (1963) - Determination of nitrate in water by ultraviolet spectrophotometry. *Anal. Chem.*, **35**: 1292-1294.
- FOLKARD A.R. (1978) - Automatic analysis of seawater nutrients. *Fish. Res. Tech. Rep. Dir. Fish. Res. (G.B.) MAFF Lowestoft*, **46**: 1-23.
- HAGER S.W., ATLAS E.L., GORDON L.I., MANTYLA A.W., PARK P.K. (1972) - A comparison at sea of manual and autoanalyzer analyses of phosphate, nitrate, silicate. *Limnol. Oceanogr.*, **17**: 931-937.
- HANSEN H.P., GRASSHOFF K. (1983) - Automated chemical analysis. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 347- 379.
- HARRIS S., MORTIMER R. (2002) - Determination of nitrate in small volume samples (100 µl) of seawater by the cadmium-copper reduction method. *Intern. J. Env. Anal. Chem.*, **82**: 369-376.
- HYDES D.J., HILL N.C. (1985) - Determination of nitrate in seawater: nitrate to nitrite reduction with copper - cadmium alloy. *Estuar. Coast. Shelf S.*, **21**: 27-130.
- ITOH H., SHINBORO Y. (1980) - Determination of anions in sea water by ion chromatography. *Bunseki Kagaku*, **29**: 239-243.
- IVEY J.P., DA VIES D.M. (1987) - Ion chromatographic determination of selected ions in Antarctic ice. *Anal. Chim. Acta*, **194**: 281-286.
- JENKINS D. (1968) - The differentiation, analysis, and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters. *Advan. Chem. Ser.*, **73**: 265-280.
- JOHNSON K.S., PETTY R.L. (1983) - Determination of nitrate and nitrite in seawater by flow injection analysis. *Limnol. Oceanogr.*, **28**: 1260-1266.
- JONES M.N. (1984) - Nitrate reduction by shaking with cadmium. Alternative to cadmium columns. *Water Res.*, **18**: 643-646.
- KREMLING K., WENCK A (1986) - On the storage of dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate in Atlantic Ocean water samples. *Meeresforsch.*, **31**: 69-74.
- MacDONALD R.W., McLAUGHLIN F.A., PAGE J.S. (1980) - Nutrient storage by freezing: data report and statistical analysis. *Pac. Mar. Sci. Rep.*, **80**: 1-69.
- MacDONALD R.W., McLAUGHLIN F.A. (1982) - The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters. *Water Res.*, **16**: 95-104.
- MOTOMIZU S., MIKASA H., TOEI K. (1987) - Fluorimetric determination of nitrate in natural waters with 3-amino-1,5-naphthalenedi-sulphonic acid in a flow-injection system. *Anal. Chim. Acta*, **193**: 343-347.
- MOURINO C., FRAGA F. (1985) - Determinacion de nitratos en agua de mar. *Inv. Pesq.*, **49**: 81-96.
- NAKASHIMA S., MASAKAZU Y., ZENKI M., AKAHASHI A.T., TOEI K. (1983) - Spectrophotometric determination of nitrite in natural waters by flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, **155**: 263-268.
- OLSEN R.J. (1980) - Phosphate interference in the cadmium reduction analysis of nitrate. *Limnol. Oceanogr.*, **25**: 758- 760.

-
- OTSUKI A. (1978) - A reactivation solution for a copperized cadmium column in the automatic determination of nitrate in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, **99**: 375-377.
- OUDOT C., MONTEL Y. (1988) - A high sensitivity method for the determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in sea water with a Technicon AutoAnalyzer II. *Mar. Chem.*, **24**: 239-252.
- PROPP M.V., PROPP L.N. (1979) - An improved reduction column for determination of nitrates in sea and fresh waters. *Oceanology*, **19**: 748-750.
- RÖSSNER B., BEHNERT J., KIPPLINGER A. (1987) - Ion-chromatography in the routine analysis of water and environmental materia. *Z. Analyt. Chem.*, **327**: 698-700.
- SCHROEDER D.C. (1987) - The analysis of nitrate in environmental samples by reversed-phase HPLC *J. Chromatog. Sci.*, **25**: 405- 408.
- STANTON M.P. (1974) - Simple, efficient reduction column for use in the automated determination of nitrate in water. *Anal. Chem.*, **46**: 1616.
- THAYER G.W. (1970) - Comparison of two storage methods for the analysis of nitrogen and phosphorus fractions in estuarine waters. *Chesap. Sci.*, **11**: 155-158.
- WEISS J. (1987) - Ionchromatography- a review of recent developments. *Z. Analyt. Chem.*, **327**: 451-455.
- WILLIS R.B. (1980) - Reduction column for automated determination of nitrate and nitrite in water. *Anal. Chem.*, **52**: 1376-1377.
- ZAGATTO E.A.G., JACINTHO A.O., MORATTI J., BERGAMIN H. (1980) - An improved flow injection determination of nitrite in waters by using intermittent flows. *Anal. Chim. Acta*, **120**: 399-403.

6.9.3 Nitriti

- AIREY D., DAL PONT G., SANDARS G. (1984) - A method of determining and removing sulphide to allow the determination of sulphate, phosphate, nitrite and ammonia by conventional methods in small volumes of anoxic waters. *Anal. Chim. Acta*, **166**: 79-92.
- AIREY D., SANDARS G. (1987) - Automated analysis of nutrients in seawater. *Rep. C.S.I.R.O. Mar. Lab.*, **166**: 1-106.
- FOLKARD A.R. (1978) - Automatic analysis of seawater nutrients. *Fish. Res. Tech. Rep. Dir. Fish. Res. (G.B.) MAFF Lowestoft*, **46**: 1-23.
- GRASSHOFF K. (1983) - Determination of nitrite. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 139-142.
- HANSEN H.P., GRASSHOFF K. (1983) - Automated chemical analysis. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 347- 379.
- JENKINS D. (1968) - The differentiation, analysis, and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters. *Advan. Chem. Ser.*, **73**: 265-280.
- JOHNSON K.S., PEITY R.L. (1983) - Determination of nitrate and nitrite in seawater by flow injection analysis. *Limnol. Oceanogr.*, **28**: 1260-1266.
- NAKASHIMA S., MASAKAZU Y., ZENKI M., TAKAHASHI A., TOEI K. (1983) - Spectrophotometric determination of nitrite in natural waters by flow injection analysis. *Anal. Chim. Acta*, **155**: 263-268.
- OUDOT C., MONTEL Y. (1988) - A high sensitivity method for the determination of nanomolar concentrations of nitrate and nitrite in seawater with a Technicon AutoAnalyzer II. *Mar. Chem.*, **24**: 239-252.
- THAYER G.W. (1970) - Comparison of two storage methods for the analysis of nitrogen and phosphorus fractions in estuarine waters. *Chesap. Sci.*, **11**: 155-158.
- ZAGATTO E.A.G., JACINTHO A.O., MORTATTI J., BERGAMIN H. (1980) - An improved flow injection determination of nitrite in waters by using intermittent flows. *Anal. Chim. Acta*, **120**: 399-403.

6.9.4 Ortofosfati

- AIREY D., DAL PONT G., SANDARS G. (1984) - A method of determining and removing sulphide to allow the determination of sulphate, phosphate, nitrite and ammonia by conventional methods in small volumes of anoxic waters. *Anal. Chim. Acta*, **166**: 79-92.
- AIREY D., SANDARS G. (1987) - Automated analysis of nutrients in seawater. *Rep. C.S.I.Ro. Mar. Lab.*, **166**: 1-106.

-
- CESCON B.S., SCARAZZATO P.G. (1973) - Determination of low phosphate concentrations in seawater by an isobutyl acetate extraction procedure. *Limnol. Oceanogr.*, **18**: 499-500.
- COETZEE J.F., GARDNER C.W. Jr. (1986) - Determination of sulphate, orthophosphate, and triphosphate ions by flow injection analysis with lead ion selective electrode as detector. *Anal. Chem.*, **58**: 608-611.
- COLLIER A.W., MARVIN K.T. (1953) - Stabilization of the phosphate ratio of seawater by freezing. *Bull. U.S. Bur. Fish.*, **79**: 71-76.
- DE JONGE V.N., VILLERIUS L.A. (1980) - Interference of sulphide in inorganic phosphate determination in natural waters. *Mar. Chem.*, **9**: 191-197.
- EICHOLZ G.H., NAGEL A.E., HUGHES R.B. (1965) - Adsorption of ions in dilute aqueous solutions on glass and plastic surfaces. *Anal. Chem.*, **37**: 863-868.
- FITZGERALD G.P., FAUST S.L. (1967) - Effects of water sample preservation methods on the release of phosphorus from algae. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 332-334.
- FOLKARD AR. (1978) - Automatic analysis of seawater nutrients. *Fish. Res. Tech. Rep. Dir. Fish. Res. (G.B.) MAFF Lowestoft*, **46**: 1-23.
- GILMARTIN M. (1967) - Changes in inorganic phosphate concentration occurring during seawater sample storage. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 325-328.
- HIRAI Y., YOZA N., OHASHI S. (1980) - Flow-injection analysis of inorganic ortho- and poly-phosphate using ascorbic acid as reductant of molybdophosphate. *Chem. Lett.*, **5**: 499-502.
- HUDES D.J. (1984) - A manual of methods for the continuous flow determination of ammonia, nitrate-nitrite, phosphate and silicate in seawater. *Rep. Inst. Oceanogr. Sci. Wonnley*, **177**: 1-37.
- IVEY J.P., DA VIES D.M. (1987) - Ion chromatographic determination of selected ions in Antarctic ice. *Anal. Chim. Acta*, **194**: 281-286.
- JENKINS D. (1968) - The differentiation, analysis, and preservation of nitrogen and phosphorus forms in natural waters. *Advan. Chem. Ser.*, **73**: 265-280.
- KLINGAMAN E.D., NELSON D.W. (1976) - Evaluation of methods for preserving the levels of soluble inorganic phosphorus and nitrogen in unfiltered water samples. *J. Envir. Qual.*, **5**: 42-46.
- KREMLING K., WENCK A. (1986) - On the storage of dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate in Atlantic Ocean water samples. *Meeresforsch.*, **31**: 69-74.
- LENNOX L.J. (1979) - An automated procedure for the determination of phosphorus. *Water Res.*, **13**: 1329-1333.
- MacDONALD R.W., McLAUGHLIN F.A., PAGE J.S. (1980) - Nutrient storage by freezing: data report and statistical analysis. *Pac. Mar. Sci. Rep.*, **80**: 1-69.
- MacDONALD R.W., F.A McLAUGHLIN (1982) - The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters. *Water Res.*, **16**: 95-104.
- MANGELSOORF P. (1972) - Methodische Verbesserungen der Phosphat-Bestimmung in Meerwasser mit dem AutoAnalyzer insbesondere für den Bordbetrieb. *Helgoländer Wiss. Meeresunters.*, **23**: 376-382.
- MOTOMIZU S., WAKIMOTO T., TOEI K. (1984) - Solvent extraction-spectrophotometric determination of phosphate with molybdate and malachite green in river water and seawater. *Talanta*, **31**: 235-240.
- MURPHY J., RILEY J.P. (1956) - The storage of sea-water samples for the determination of dissolved inorganic phosphate. *Anal. Chim. Acta*, **14**: 318-319.
- NGUYEN Th.H., BAKER L.M. (1987) - Total phosphate determination by ion chromatography. *Proceedings AWWA Water Quality Technology Conference*. Baltimore, Maryland, November 15-20, 1987, 577-590.
- NOVOSELOV A.A., SHEREMET'YEVA A.I., DANILENKO A.F. (1976) - Method for simultaneous obtaining silicon-free and phosphate-free sea water aboard ship. *Oceanology*, **16**: 358-359.
- PROCTOR C.M., HOOD D.W. (1954) - Determination of inorganic phosphate in sea water by an iso-butanol extraction procedure. *J. Mar. Res.*, **13**: 122-132.
- RÖSSNER B., BEHNERT J., KIPPLINGER A. (1987) - Ion-chromatography in the routine analysis of water and environmental materia. *Z. Analyt. Chem.*, **327**: 698-700.
- TABATABAI M.A. DICK W.A. (1983) - Simultaneous determination of nitrate, chloride, sulphate, and phosphate in natural waters by ion chromatography. *J. Environ. Qual.*, **12**: 209-213.
- TRAYER G.W. (1970) - Comparison of two storage methods for the analysis of nitrogen and phosphorus fractions in estuarine waters. *Chesap. Sci.*, **11**: 155-158.
- TREGUER P., LE CORRE P., COURTOT P. (1976) - Dosage automatique des orthophosphates dans l'eau de mer utilisation de l'AutoAnalyzer II. *J. Cons. Int. Explor. Mer*, **36**: 289-294.

-
- VAN STADEN J.F. (1987) - Flow-injection analysis of substances in water. I. Anions. A critical review. *Water SA.*, **13**:197- 208.
- WEISS J. (1987) - Ion chromatograph: a review of recent developments. *Z. Analyt.Chem.*, **327**: 451-455.

6.9.5 Silicati

- ARMSTRONG F.A.J. (1952) - The determination of silicate in sea water. *J. Mar. biol. Ass. U.K.*, **30**: 149-160.
- BIEN G.S. (1958) - Salt effect correction in determining soluble silica in sea water by silicomolybdic acid method. *Anal. Chem.*, **30**: 1525-1526.
- BREWER P.G., RILEY J.P. (1966) - The automatic determination of silicate-silicon in natural waters with special reference to sea water. *Anal. Chim. Acta*, **35**: 514-519.
- BURTON J.D., LEATHERLAND T.M. (1970) - The reactivity of dissolved silicon in some natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, **15**: 473-476.
- FANNING K.A., PILSON M.E.Q. (1973) - On the spectrophotometric determination of dissolved silica in natural waters. *Anal. Chem.*, **45**: 136-140.
- FOLKARD A.R. (1978) - Automatic analysis of seawater nutrients. *Fish. Res. Tech. Rep. Dir. Fish. Res. (G.B.) MAFF Lowestoft*, **46**: 1-23.
- HAGER S.W., ATLAS E.L., GORDON L.I., MANTYLA A.W., PARK P.K. (1972) - A comparison at sea of manual and autoanalyzer analyses of phosphate, nitrate, silicate. *Limnol. Oceanogr.*, **17**: 931-937.
- HANSEN H.P., GRASSHOFF K. (1983) - Automated chemical analysis. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 347-379.
- ITOH H., SHINBORO Y. (1980) - Determination of anions in sea water by ion chromatography. *Bunseki Kagaku*, **29**: 239-243.
- IVEY J.P., DAVIES D.M. (1987) - Ion chromatographic determination of selected ions in Antarctic ice. *Anal. Chim. Acta*, **194**: 281-286.
- KOROLEFF F. (1983) - Determination of silicon. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds), *Methods of Seawater Analysis*, Verlag Chemie, Weinheim, 174-183.
- KREMLING K., WENCK A. (1986) - On the storage of dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate in Atlantic Ocean water samples. *Meeresforsch.*, **31**: 69-74.
- MacDONALD R.W., McLAUGHLIN F.A., PAGE J.S. (1980) - Nutrient storage by freezing: data report and statistical analysis. *Pac. Mar. Sci. Rep.*, **80**: 1-69.
- MacDONALD R.W., McLAUGHLIN F.A. (1982) - The effect of storage by freezing on dissolved inorganic phosphate, nitrate and reactive silicate for samples from coastal and estuarine waters. *Water Res.*, **16**: 95-104.
- MacDONALD R.W., McLAUGHLIN F.A., WONG C.S. (1986) - The storage of reactive silicate samples by freezing. *Limnol. Oceanogr.*, **31**: 1139-1142.
- NOVOSELOV A.A., SHEREMET'YEVA A.I., DANILENKO A.F. (1976) - Method for simultaneous obtaining silicon-free and phosphate-free sea water aboard ship. *Oceanology*, **16**: 358- 359.
- RÖSSNER B., BEHNERT J., KIPPLINGER A. (1987) - Ion-chromatography in the routine analysis of water and environmental material. *Z. Analyt. Chem.*, **327**: 698-700.
- VAN STADEN J.F. (1987) - Flow-injection analysis of substances in water. I. Anions. A critical review. *Water SA.*, **13**: 197- 208.
- VOINOVITCH L.A., DRUON M. (1986) - Methode generale d'analyse des silicates par spectrometrie d'absorption atomique. *Analysis*, **14**: 87-94.
- WEISS J. (1987) - Ion chromatography- a review of recent developments. *Z. Analyt. Chem.*, **327**: 451-455.

CAPITOLO 7. DETERMINAZIONE DEL CARBONIO ORGANICO DISCIOLTO NELL'ACQUA MARINA

M. Giani, C. De Vittor, F. Savelli, C. Santinelli

mgiani@inogs.it

7.1 INTRODUZIONE

La sostanza organica disciolta (DOM) in mare è definita come il pool di molecole organiche che passa attraverso un filtro di 0,2-1 μm .

Circa il 90% della DOM è costituito dal carbonio organico disciolto (DOC). Esso nelle acque oceaniche presenta una concentrazione di 60-90 $\mu\text{mol C l}^{-1}$ in superficie e 35-45 $\mu\text{mol Cl}^{-1}$ nelle acque profonde (Benner, 2002). In acque costiere di bacini con elevata produzione primaria, le concentrazioni possono essere comprese tra 100 e 280 $\mu\text{mol C l}^{-1}$ (Pettine *et al.*, 2001; Cauwet *et al.*, 2002; Giani *et al.*, 2005; De Vittor *et al.*, 2008).

Il carbonio totale (TC) presente nell'acqua di mare è costituito dal carbonio inorganico disciolto (DIC), dato dall'insieme di bicarbonati, carbonati e CO_2 e particellato (PIC), e dal carbonio organico disciolto (DOC, volatile e non volatile) e particellato (POC) schematizzando:

$$\text{TC} = \text{DIC} + \text{PIC} + \text{DOC}_{\text{volatile}} + \text{DOC}_{\text{non volatile}} + \text{POC}$$

Il DOC può essere determinato per differenza tra il carbonio totale disciolto, misurato mediante la tecnica di combustione ad alta temperatura e la frazione inorganica determinata come CO_2 . Tale metodo è utilizzato nelle acque dolci meno ricche in carbonati (APAT-IRSA CNR, 2004).

In acqua di mare, dove il DIC ha una concentrazione 25-50 volte maggiore rispetto al DOC, si procede prima all'eliminazione del carbonio inorganico mediante aggiunta di acido cloridrico o fosforico e successiva rimozione della CO_2 liberata attraverso il gorgogliamento di aria pura nel campione ed, in seguito, alla determinazione del carbonio organico disciolto. La fase di gorgogliamento può rimuovere anche il carbonio organico volatile che, in determinati casi, può rappresentare fino al 5% del DOC iniziale, per cui, l'analisi permette di determinare soltanto la componente non volatile del carbonio organico disciolto (Avril, 2002).

La determinazione del DOC richiede molta attenzione sia nella fase di campionamento, in quanto è relativamente facile contaminare il campione durante il prelievo, che in quella di manipolazione ed analisi in laboratorio. Ulteriori errori nella determinazione del DOC possono essere causati da una rimozione incompleta dei carbonati oppure da un'ossidazione soltanto parziale della sostanza organica disciolta (Hedges *et al.*, 1993; Urbansky, 2001; Aiken *et al.*, 2002).

7.2 CAMPIONAMENTO

I campioni d'acqua di mare per la determinazione del DOC possono essere prelevati utilizzando bottiglie Niskin (le migliori sono quelle con molle teflonate, o-rings di silicone e rubinetti di nylon, oppure Niskin con tutte le rifiniture in PVC) oppure bottiglie Go-Flo; quest'ultime hanno il vantaggio di aprirsi a circa 10 m di profondità e quindi di attraversare la superficie dell'acqua chiuse, diminuendo così la probabilità di contaminazione da parte di sostanze eventualmente presenti in superficie. In generale, più le bottiglie sono grandi minore è la probabilità di contaminazione. I campioni vengono prelevati a varie profondità durante la risalita del sistema CTD/Rosette. Prima di iniziare le operazioni di campionamento, le bottiglie devono essere pulite e condizionate con acqua di mare, l'ideale sarebbe riempirle con acqua

prelevata in mare-aperto qualche ora prima del campionamento. È di fondamentale importanza non utilizzare solventi organici per pulire le bottiglie prima del campionamento. I campioni per l'analisi del DOC devono avere un'alta priorità nell'ordine di campionamento e, al fine di ridurre la potenziale contaminazione da parte dei fumi della nave e/o della manipolazione delle bottiglie, dovrebbero essere prelevati subito dopo i campioni per i gas disciolti. Devono, inoltre, essere prelevati evitando il contatto con il rubinetto delle bottiglie della Rosette (Sharp *et al.*, 1993) e utilizzando guanti senza polvere. I campioni devono preferibilmente essere raccolti in bottiglie in vetro, anche se sono accettabili bottiglie in policarbonato, polipropilene o polisulfone, lavate con acido. Per minimizzare la contaminazione e la perdita di DOC per adsorbimento sulle pareti delle bottiglie di campionamento è di fondamentale importanza precondizionarle tramite avvinamenti ripetuti. Sono consigliate bottiglie di vetro scuro, in quanto permettono di evitare cambiamenti e perdite di DOM dovuti al "fotobleaching" (Santinelli *et al.*, 2002, 2006, 2008; Seritti *et al.*, 2003; Vignudelli *et al.*, 2004).

7.3 FILTRAZIONE

I campioni devono essere filtrati, immediatamente dopo il campionamento, attraverso filtri in fibra di vetro Whatman o Millipore GF/F (porosità nominale 0,7 μm) precombusti (450°C per 4 ore) montati su un porta filtro metallico, o filtri in acetato di cellulosa sterili 0,2 μm (p. es. Sartorius). La filtrazione ha la funzione di rimuovere dal campione il particolato sospeso ed i microrganismi che potrebbero causare un cambiamento nella concentrazione della DOM. Mediante filtrazione su 0,2 μm si ottiene, ovviamente, una maggiore rimozione della popolazione batterica presente nel campione. D'altra parte la filtrazione è una potenziale sorgente di errore a causa di: (1) rilascio di DOM dal filtro stesso, (2) rottura delle cellule durante la filtrazione, (3) adsorbimento di una frazione del DOC sul filtro (Moran *et al.*, 1999). È consigliabile utilizzare lo stesso filtro per più campioni avvinandolo ogni volta con il campione. Prima di utilizzarlo per la prima volta deve essere lavato abbondantemente con acqua di mare. In alternativa, se la concentrazione del POC è trascurabile (<5% del DOC) è possibile non filtrare i campioni. Poiché una differenza di pressione eccessiva tra le due facce del filtro può determinare la rottura delle cellule sia in depressione (pompe da vuoto) che in pressione positiva (filtrazione con siringa o sotto pressione di N_2) è consigliabile mantenere la differenza di pressione inferiore a 80-100 mm Hg (Taguchi e Laws, 1988; Stockner *et al.*, 1990).

7.4 CONSERVAZIONE

Per preservare i campioni è possibile aggiungere dell'acido (HCl ultrapuro per arrivare a pH 2) o un veleno adatto ad inibire l'attività batterica (soluzione di HgCl_2 , Thomas *et al.*, 1995) e mantenerli a 4 °C, oppure si possono congelare. L'acidificazione può determinare: produzione di sostanze volatili dall'idrolisi della DOM, adsorbimento di ammonio e altre ammine volatili dall'atmosfera ed, in acque costiere, la precipitazione degli acidi umici.

Il congelamento è il metodo migliore per la conservazione a lungo termine dei campioni (Sharp *et al.*, 1993).

7.5 METODI DI ANALISI

I metodi contemporanei di determinazione del DOC si basano sulla rimozione delle specie del carbonio inorganico presenti nell'acqua marina, sull'ossidazione della sostanza organica a biossido di carbonio e sulla quantificazione del biossido di carbonio prodotto.

7.5.1 Rimozione del carbonio inorganico

Al fine di rimuovere il carbonio inorganico, i campioni vengono acidificati, immediatamente prima dell'analisi, con HCl 2N o H₃PO₄ al 50% fino ad ottenere un pH < 2 (Williams *et al.*, 1993). La CO₂, derivante dai carbonati e bicarbonati disciolti, viene eliminata tramite gorgogliamento ottenuto con un flusso continuo (150 ml min⁻¹) di ossigeno o aria ad alta purezza per 10 min. Alcuni recenti strumenti (ad esempio SHIMADZU VCSH) permettono di eseguire tale fase automaticamente.

7.5.2 Metodi di ossidazione per via umida

I primi metodi utilizzati per la misura del carbonio organico nell'acqua di mare si basavano sull'ossidazione della sostanza organica a bassa temperatura con persolfato (Menzel e Vaccaro, 1964, Williams, 1969). I metodi di ossidazione per via umida e quelli per combustione ad alta temperatura se applicati correttamente forniscono risultati comparabili (Benner e Hedges, 1993; Cauwet, 1999).

7.5.3 Metodo di combustione ad alta temperatura (HTO)

La tecnica HTO prevede l'ossidazione ad alta temperatura del campione e la successiva rivelazione all'infrarosso della CO₂ prodotta.

La tecnica è basata sull'iniezione diretta (100 µl per campioni di acqua di mare con concentrazioni entro le 200 µmol C l⁻¹, volumi inferiori per concentrazioni superiori) in un tubo di combustione in quarzo, impaccato con un catalizzatore (in genere Pt su ossido di alluminio o quarzo), posto verticalmente in una fornace a 680°C e mantenuto in un'atmosfera di gas puro (aria o ossigeno). La siringa per l'autocampionamento, viene sciacquata automaticamente più volte, con il campione da analizzare, prima di procedere all'iniezione in fornace.

La sostanza organica presente nel campione viene ossidata sul catalizzatore a CO₂ e portata dal gas ad un deumidificatore (elettronico basato sull'effetto Peltier, o magnesio perclorato) e quindi ad un trappola per alogeni (Cu) prima di arrivare al rivelatore. Le iniezioni vengono abitualmente ripetute 4-5 volte per campione ed il risultato è ritenuto accettabile soltanto quando il coefficiente di variabilità tra le misure è inferiore al 2%.

Sebbene, potenzialmente, la strumentazione che utilizza il sistema HTO sia in grado di misurare direttamente il carbonio organico totale (disciolto + particellato) presente in un campione d'acqua non filtrato, tale tipo di analisi viene sconsigliata per campioni in cui la concentrazione di POC non sia trascurabile. Ad esempio con concentrazioni di DOC di 100 µmol C l⁻¹ e precisione analitica pari al 5%, il valore accettabile di POC dovrebbe essere ≤ 5 µmol C l⁻¹ (Sharp *et al.*, 1993). Lavori più recenti (Aiken *et al.*, 2002) riportano che il POC non può essere adeguatamente misurato con il sistema HTO a causa di problemi legati all'efficienza di ossidazione.

7.5.3.1 Rivelatori

La CO₂, risultante dall'ossidazione catalitica ad alta temperatura del carbonio organico presente nel campione d'acqua, viene misurata mediante un rivelatore sensibile nella regione degli infrarossi (NDIR-rivelatore infrarosso non dispersivo) che fornisce un segnale proporzionale alla concentrazione istantanea della CO₂ presente nel gas di trasporto. La risposta strumentale, ad ogni iniezione, è visualizzata su monitor sottoforma di un picco la cui area sottesa è proporzionale alla concentrazione di DOC presente nel campione. L'acqua derivante dall'evaporazione del campione e in parte anche dalla reazione di ossidazione deve essere rimossa. Ci sono vari metodi per rimuovere l'acqua, uno di essi, usato negli analizzatori TOC Shimadzu, utilizza un deumidificatore termoelettrico basato sull'effetto Peltier che raffredda ed essicca il gas di combustione.

Esistono anche strumenti dotati di rivelatori a ionizzazione di fiamma (FID) (Urbansky, 2001). In questo caso la CO₂ viene ridotta a CH₄. Questo sistema è più sensibile rispetto ai sistemi basati sui rivelatori NDIR ma più complesso e di costo elevato.

7.5.3.2 Catalizzatori

Per le acque marine vengono impiegati preferenzialmente catalizzatori in quarzo platinato (quarzo-Pt) oppure catalizzatori a base di allumina-Pt che hanno un'efficienza analoga a quella del quarzo-Pt (Cauwet, 1994) ma determinano bianchi più elevati (Benner e Strom, 1993; Cauwet, 1994; Dafner e Wangersky, 2002). I catalizzatori in commercio, sono costituiti da platino (1,2%) supportato su piccole sfere da 1-2 mm in allumina o da 3 mm in silice (catalizzatori a bassa sensibilità), nel caso in cui il campione da analizzare abbia concentrazioni di DOC non inferiori a 17 µmol C l⁻¹, o da lana di quarzo (catalizzatori ad alta sensibilità) per concentrazioni minori. L'utilizzo di quest'ultimo tipo di catalizzatore è sconsigliato se le concentrazioni di DOC, nel campione d'acqua, superano il valore di 83 µmol C l⁻¹.

Il catalizzatore, prima di essere impaccato nella colonna di ossidazione, deve essere pretrattato per eliminare eventuali impurità organiche. Il trattamento consiste in una serie di lavaggi con acido (HCl 2N per 1-2 ore), risciacqui con acqua ultrapura e trattamenti in muffola a 500 °C per 6 ore.

In ogni caso, per minimizzare il bianco del sistema dopo il pretrattamento del catalizzatore ed il suo impaccamento nella colonna di ossidazione, bisogna effettuare iniezioni ripetute di acqua ultrapura finché non venga raggiunta la più bassa e stabile area d'integrazione (<1000 unità). Possono essere necessarie anche più di 100 iniezioni.

7.5.3.3 Gas di trasporto

L'aria pura da utilizzare come gas di trasporto non deve contenere più di 1 parte per milione (ppm) di biossido di carbonio (CO₂), monossido di carbonio (CO), ed idrocarburi (HC) (Shimadzu Corporation, 1997). In alternativa all'aria può essere utilizzato anche ossigeno a purezza >99,999%. Il gas può venir fatto passare attraverso una trappola riempita con ascarite per la rimozione finale della CO₂.

7.5.3.4 Preparazione degli standards

Come standard analitici vengono utilizzate soluzioni di ftalato acido di potassio (C₈H₅KO₄, KHP). Per la preparazione della soluzione madre (1 g C l⁻¹ equivalenti a 83 mmol C l⁻¹), 0,2125 g di KHP, accuratamente pesati su bilancia analitica, vengono sciolti in acqua ultrapura a basso contenuto di carbonio e portati a volume in matraccio tarato da 100 ml. La soluzione ottenuta deve essere conservata al buio a 4°C ed è stabile per 1 mese. Dalla soluzione madre si ottengono per diluizione almeno 4 standards in modo da coprire l'intervallo di concentrazioni atteso per i campioni.

Nel caso dell'acqua di mare si usano 4 soluzioni con concentrazione compresa tra 0,0 e 2,5 mg C l⁻¹ (equivalenti a 208,14 µmol C l⁻¹).

La concentrazione in carbonio viene determinata attraverso curve di calibrazione a 4 punti. Ciascun valore di concentrazione viene determinato con un minimo di tre iniezioni con un coefficiente di variazione inferiore al 2%. Repliche di più campioni hanno evidenziato dispersioni comprese tra 1,5 e 4 % (Giani *et al.*, 2005; De Vittor *et al.*, 2008).

7.5.4 Bianco del sistema

Il bianco del sistema è dato dal bianco strumentale e dal bianco dell'acqua e dei reagenti utilizzati per gli standards.

Il bianco del sistema deve essere misurato ogni giorno all'inizio ed alla fine della serie di analisi utilizzando acqua a basso contenuto di carbonio (~5-6 µmol C l⁻¹) che può essere acquistata assieme al materiale certificato di riferimento dall'University of Miami (FL, USA).

7.6 CALCOLI

La concentrazione del DOC viene calcolata come riportato da Thomas *et al.* (1995), utilizzando l'equazione:

$$\text{DOC } (\mu\text{mol C l}^{-1}) = \frac{\text{area campione-area del bianco di sistema} \cdot 1000}{\text{pendenza della retta di calibrazione}^* \quad 12,011}$$

*si intende che la retta di calibrazione sia stata determinata come risposta strumentale in funzione delle concentrazioni espresse in mg C l⁻¹.

7.7 CONTROLLO DI QUALITÀ

Un enorme passo in avanti nella determinazione del DOC è stato reso possibile grazie alla realizzazione di campioni di acqua di mare di riferimento a concentrazione nota (University of Miami, FL, USA, Sharp *et al.*, 2002). Tali campioni consentono di valutare la "bontà" delle misure e di intercalibrarsi con gli altri laboratori (Sharp *et al.*, 2002). L'accuratezza della misura viene valutata tramite l'analisi giornaliera di tali campioni di riferimento. Il valore misurato deve essere nel range del valore atteso $\pm 2 \mu\text{mol C l}^{-1}$ altrimenti le analisi vanno interrotte, deve essere fatto un controllo dello strumento con eventuale sostituzione di colonna e catalizzatore o delle guarnizioni e una volta che i bianchi sono accettabili si deve fare una nuova curva di calibrazione (Santinelli *et al.*, 2002).

7.8 POSSIBILI FONTI DI ERRORE

Si riassumono di seguito alcuni dei problemi analitici che più frequentemente sono fonte di errore nei metodi HTC:

- contaminazione nel campionamento/conservazione dei campioni;
- rimozione non completa dei carbonati;
- variazioni meccaniche nell'iniezione del campione;
- variazioni del bianco di sistema (effetto memoria, derive della linea di base);
- variazioni nell'efficienza dell'ossidazione anche in seguito alla deposizione di sale.

7.9 BIBLIOGRAFIA

- AIKEN G., KAPLAN L.A., WEISHAAR J. (2002) - Assessment of relative accuracy in the determination of organic matter concentration in aquatic systems. *J. Environ. Monitor.*, **4**: 70-74.
- APAT-IRSA-CNR (2004) - *Metodi analitici per le acque. 5040. Carbonio Organico disciolto*, Vol. II: 645-651.
- AVRIL B. (2002) - DOC dynamics in the northwestern Mediterranean Sea (DYFAMED site). *Deep-Sea Res. PT II*, **49**: 2163-2182.
- BENNER R., STROM M. (1993) - A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation. *Mar. Chem.*, **41**: 153-160.
- BENNER R., HEDGES J.I. (1993) - A test of the accuracy of freshwater DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation and UV-promoted persulfate oxidation. *Mar. Chem.*, **41**: 161-165.
- BENNER R. (2002) - Chemical composition and Reactivity. In: Hansell D.A., Carlson, C.A. (eds.), *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press: 59-90.
- CAUWET G. (1994) - HTO method for dissolved organic carbon analysis in seawater: influence of catalyst on blank estimation. *Mar. Chem.*, **47**: 55-64.
- CAUWET G. (1999) - Determination of dissolved organic carbon and nitrogen by high temperature combustion.

-
- In: Grasshof K., Kremling K., Erhardt M. (eds.), *Methods of Seawater Analysis*. Wiley-VCH., Weinheim (Germany): 408-420.
- CAUWET G., DELIAT G., KRASSTEV A., SHTRÉVA G., BECQUEVORT S., LANCELOT C., MOMZIKOFF A., SALIOT A., COCIASU A., POPA L. (2002) - Seasonal accumulation in the Black Sea. A regional explanation for a general mechanism. *Mar. Chem.*, **79**: 193-205.
- DAFNER E.V., WANGERSKY P. (2002) - A brief overview of modern directions in marine DOC studies Part I. –Methodological aspects. *J. Environ. Monitor.*, **4**: 48-54.
- DE VITTOR C., PAOLI A., FONDA UMANI S. (2008) - Dissolved organic carbon variability in a shallow coastal marine system (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **7**: 280-290.
- GIANI M., SAVELLI F., BERTO D., ZANGRANDO V., ČOSOVIĆ B., VOJVODIĆ V. (2005) - Temporal dynamics of dissolved and particulate organic carbon in the northern Adriatic Sea in relation to the mucilage events. *Sci. Total Envir.*, **353**: 126-138.
- HEDGES J. I., BERGAMASCHI B.A., BENNER R. (1993) - Comparative analyses of DOC and DON in natural waters. *Mar. Chem.*, **41**: 121-134.
- MENZEL D.W., VACCARO R.F. (1964) - The measurement of dissolved organic and particulate carbon in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, **9**: 138-142.
- MORAN S.B., CHARETTE M.A., PIKE S.M., WICKLUND C.A. (1999) - Differences in seawater particulate organic carbon concentration in samples collected using small- and large-volume methods. The importance of DOC adsorption to the filter blank. *Mar. Chem.*, **67**: 23-42.
- PETTINE M., CAPRI S., MANGANELLI M., PATROLECCO L., PUDDU A., ZOPPINI A. (2001) - The Dynamics of DOM in the Northern Adriatic Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **52**: 471-489.
- SANTINELLI C., GASPARINI G.P., NANNICINI L., SERITTI A. (2002) - Vertical distribution of Dissolved Organic Carbon (DOC) in the Western Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res. PT I*, **49** (12): 2203-2219.
- SANTINELLI C., MANCA B.B., GASPARINI G.P., NANNICINI L., SERITTI A. (2006) - Vertical distribution of dissolved organic carbon (DOC) in the Mediterranean Sea. *Clim. Res.*, **31**: 205-216.
- SANTINELLI C., RIBOTTI A., SORGENTE R., GASPARINI G.P., NANNICINI L., VIGNUDELLI S., SERITTI A. (2008) - Coastal dynamics and dissolved organic carbon in the Western Sardinian Shelf (Western Mediterranean). *J. Mar. Sys.*, **74**: 167-188.
- SERITTI A., MANCA B.B., SANTINELLI C., MURRU E., BOLDRIN A., NANNICINI L. (2003) - Relationships between dissolved organic carbon (DOC) and water mass structures in the Ionian Sea (winter 1999). *J. Geophys. Res.* **108** (C9): 8112.
- SHARP J.H., PELTZER E.T., ALPERIN M.J., CAUWET G., FARRINGTON J.W., FRY B., KARL D.M., MARTIN J.H., SPITZY A., TUGRUL S., CARLSON C.A. (1993) - Procedures subgroup report. *Mar. Chem.*, **37**: 37-50.
- SHARP J.H., CARLSON C.A., PELTZER E.T., CASTLE-WARD D.M., SAVIDGE K.B., RINKER K.R. (2002) - Final dissolved organic carbon broad community intercalibration and preliminary use of DOC reference materials. *Mar. Chem.*, **77**: 239-253.
- SHIMADZU CORPORATION (1997) - *Instruction manuals for total organic carbon analyzer model ASI-5000A, and TOC control software*. Kyoto (Japan), Shimadzu Corporation: 212 pp.
- STOCKNER J.G., KLUT M.E., COCHLAN W.P. (1990) - Leaky filters: a warning to aquatic Ecologists. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **47**: 16-23.
- TAGUCHI S., LAWS E.A. (1988) - On the microparticles which pass through glass fiber filter type GF/F in coastal and open waters. *J. Plankton Res.*, **10**(5): 999-1008.
- THOMAS C., CAUWET G., MINSTER J.F. (1995) - Dissolved organic carbon in the equatorial Atlantic ocean. *Mar. Chem.*, **49**: 155-169.
- URBANSKY E.T. (2001) - Total organic carbon analyzers as tools for measuring carbonaceous matter in natural waters. *J. Environ. Monitor.*, **3**: 102 -112.
- VIGNUDELLI S., SANTINELLI C., MURRU E., NANNICINI L., SERITTI A. (2004) - Distributions of dissolved organic carbon (DOC) and chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in coastal waters of the northern Tyrrhenian Sea (Italy). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **60**: 133-149.
- WILLIAMS P.J.LE.B. (1969) - The wet oxidation of organic matter in seawater: *Limnol. Oceanogr.*, **14**: 292-297.
- WILLIAMS P.J.LE.B., BAUER J., BENNER R., HEGEMAN J., ITTEKKOT V., MILLER A., NORRMAN B., SUZUKI Y., WANGERSKY P., MCCARTY M. (1993) - DOC subgroup report. *Mar. Chem.*, **41**: 11-21

CAPITOLO 8. AZOTO E FOSFORO TOTALI E TOTALI DISCIOLTI

S. Cozzi, F. Margiotta, V. Saggiomo

stefano.cozzi@ts.ismar.cnr.it

8.1 INTRODUZIONE

Per concentrazione totale di azoto (TN) e fosforo (TP) presente in un campione d'acqua marina si intende la somma delle moli di questi elementi per unità di volume, presenti in forma chimica combinata, sia organica o inorganica sia disciolta o particellata (Fig. 1). Nel caso dell'azoto, non viene però inclusa nel TN la forma molecolare gassosa disciolta (N_2) la quale, sebbene sia la più abbondante nell'ambiente marino ($\approx 95\%$ dell'azoto totale), presenta un'eccezionale inerzia chimica che la rende difficilmente utilizzabile dagli organismi viventi, esclusi i batteri azotofissatori (Butcher *et al.*, 1992).

L'azoto inorganico combinato è presente nell'acqua di mare principalmente sotto forma di nitrato, nitrito ed ammonio, insieme ad ulteriori forme gassose meno abbondanti (N_xO_y). Il fosforo inorganico è costituito essenzialmente da ortofosfato e polifosfati, questi ultimi soprattutto di origine antropica. Le frazioni organiche di entrambi questi elementi sono invece un insieme complesso di composti disciolti a vario peso molecolare, colloidali, particelle detritali organiche e plancton. I composti organici disciolti presenti nell'ambiente marino derivano essenzialmente dalla decomposizione del materiale di origine cellulare e dai prodotti d'escrezione degli organismi viventi. L'azoto organico disciolto (DON) è contenuto nei gruppi amminici degli amminoacidi, proteine e polipeptidi, mentre il fosforo organico disciolto (DOP) è presente nei fosfolipidi e fosfonucleotidi (Lee e Wakeham, 1989; Wotton, 1990; Wada e Hattori, 1991; Handa *et al.*, 2000; Hansell e Carlson, 2002).

La concentrazione dell'azoto inorganico disciolto (DIN) varia da valori prossimi allo zero, in corpi d'acqua dove i nutrienti sono stati esauriti dall'assimilazione biologica, fino a circa $45 \mu\text{M}$ nelle acque oceaniche. Le zone estuarine possono essere però ulteriormente arricchite in DIN ($< 200 \mu\text{M}$) a causa degli apporti di nitrato di origine continentale. Il DON varia nell'ambiente oceanico da $2-5 \mu\text{M}$ nelle acque profonde, a $1-13 \mu\text{M}$ in quelle superficiali. Acque costiere ($3-19 \mu\text{M}$) e zone estuarine ($5-60 \mu\text{M}$) presentano concentrazioni superiori di DON, come conseguenza dei processi di produzione *in situ* e degli apporti alloctoni. Le concentrazioni di ortofosfato variano da valori $< 0,01 \mu\text{M}$ nelle acque superficiali esaurite di nutrienti, a circa $2 \mu\text{M}$ nelle acque oceaniche profonde. Al contrario del DON, il DOP è presente in un intervallo di concentrazione generalmente più costante ($0,05-0,3 \mu\text{M}$).

Le frazioni particellate dell'azoto (PN) e fosforo (PP) non costituiscono in genere la parte predominante di questi elementi nelle acque oligotrofiche ed oceaniche (Loh e Bauer, 2000). Elevate quantità di PN e PP possono, tuttavia, essere trovate nelle acque costiere ed estuarine. Nell'ambiente marino non soggetto ad apporti continentali diretti, il PN e PP sono essenzialmente costituiti da materia organica quale cellule planctoniche, detriti costituiti da tessuti di microrganismi e residui fecali. La presenza di azoto e fosforo inorganici nel particellato marino può essere principalmente ristretta a ioni adsorbiti sulla superficie delle particelle organiche o inclusi in esse (Wotton, 1990).

La distinzione tra azoto e fosforo totali (TN e TP) ed azoto e fosforo totali disciolti (TDN e TDP) viene effettuata operazionalmente sulla base di una separazione in classi dimensionali a $0,45 \mu\text{m}$, generalmente ottenuta per filtrazione. Tale distinzione è però largamente arbitraria, in quanto la frazione $< 0,45 \mu\text{m}$ non contiene soltanto composti dell'azoto e fosforo realmente disciolti, ma anche colloidali e quantità variabili di particellato submicroscopico, picoplancton e femtoplancton.

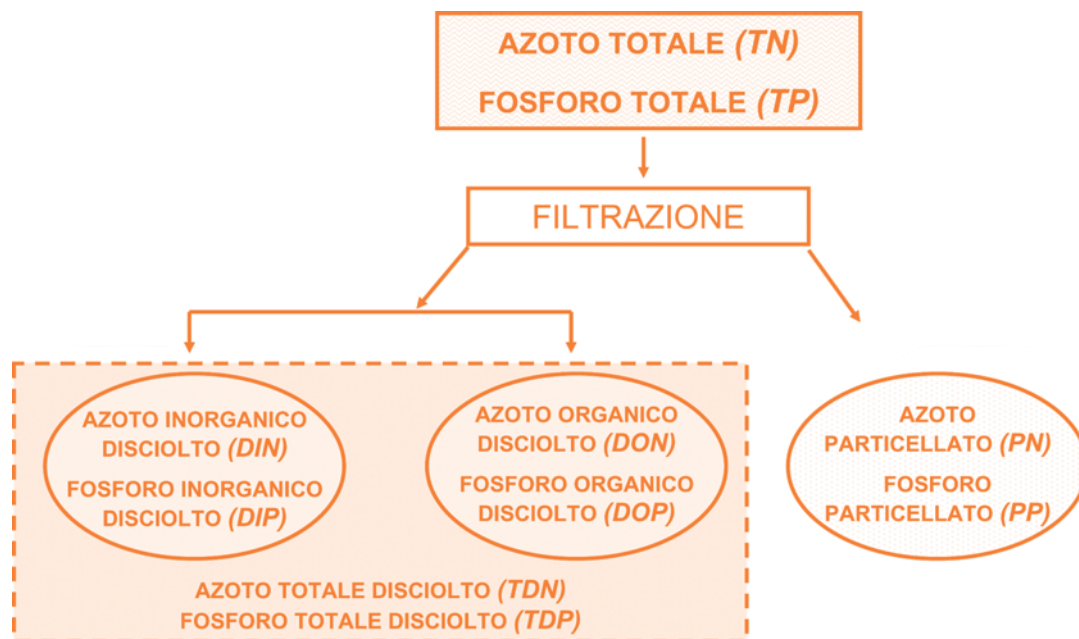


Fig. 1 - Schematizzazione delle frazioni dell'azoto e fosforo presenti nell'ambiente marino.

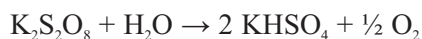
8.2 PRINCIPIO DEL METODO

L'analisi del TN e TP (TDN e TDP) richiede un primo stadio d'ossidazione per ridurre tutte le frazioni organiche di questi elementi a forme specifiche di azoto e fosforo inorganici, la cui concentrazione può essere successivamente determinata nel campione. Tra i diversi gruppi di metodi utilizzati per questo scopo, l'ossidazione in soluzione con perossodisolfato di potassio (PO) e la fotoossidazione con radiazione ultravioletta (UV) permettono la determinazione del TN e TP mediante analisi manuale, con un ridotto utilizzo di apparati sperimentali. L'utilità di altri gruppi di metodi quali la digestione Kjeldahl, l'ossidazione ad alta temperatura in presenza (HTCO) o assenza (HTO) di catalizzatori e l'incenerimento/idrolisi (Ash/Hyd) viene discussa alla fine del presente capitolo.

8.2.1 Ossidazione in soluzione con perossodisolfato (PO)

L'ossidazione con perossodisolfato (PO), per la simultanea determinazione di TN e TP, è una variazione proposta da Valderrama (1981) alle metodiche originali di Koroleff (1976 a, b) che prevedevano la determinazione dell'azoto e fosforo totali su differenti subcampioni. Infatti, mentre i composti organici del fosforo possono essere facilmente trasformati in ortofosfato mediante ossidazione in ambiente acido, una completa ossidazione dei composti azotati necessita di un ambiente alcalino. Con questo metodo il pH della miscela parte da 9,7 e diminuisce progressivamente fino a 5-6 al termine del processo. Tali condizioni si realizzano con l'aggiunta al campione di un tampone, basato sulla coppia acido borico-borato, unitamente al proseguire delle reazioni d'idrolisi coinvolte nel processo stesso.

L'agente ossidante utilizzato è il perossodisolfato di potassio ($K_2S_2O_8$), che si decompone a caldo secondo la reazione:



Nel corso del processo d'ossidazione, che avviene in autoclave ad elevata temperatura e pressione, l'aumento della concentrazione di KHSO_4 determina la diminuzione desiderata del pH. Per ottenere un'ossidazione quantitativa della materia organica, l'agente ossidante (O_2) che si produce per idrolisi del $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ deve essere circa 10 volte in eccesso.

La resa della reazione d'ossidazione varia a seconda dei composti azotati presenti. Ad esempio, nitriti, ammoniaca, urea, diversi amminoacidi alifatici e proteine si ossidano in modo quantitativo. I composti con un legame semplice N-N si ossidano più difficilmente, mentre quelli con doppio legame N=N risultano quasi recalcitranti all'ossidazione (Nydahl, 1978).

Modifiche apportate a tale metodo permettono anche la determinazione simultanea dell'azoto e fosforo particellati (Pujo-Pay e Raimbault, 1994) o del DOC, DON e DOP (Raimbault *et al.*, 1999). Infine, per le acque dolci è stata proposta una digestione in microonde (Johnes e Heathwaite, 1992) che permette la riduzione dei tempi di reazione mantenendo comunque alta l'efficienza d'ossidazione del metodo.

8.2.2 Fotoossidazione (UV)

In questo gruppo di metodi, l'ossidazione del fosforo ed azoto organici presenti nel campione avviene grazie a processi fotochimici, indotti dalla radiazione ultravioletta in presenza di piccole quantità di un reagente ossidante. La specie ossidante che si utilizza più comunemente è il radicale idrossile, che si forma in soluzione in seguito alla decomposizione del perossido di idrogeno (H_2O_2) sottoposto a radiazione UV (Golimowski e Golimowska, 1996). Nel caso dell'ossidazione di campioni d'acqua di mare, la presenza di elevate concentrazioni di carbonio inorganico disciolto mantiene, durante l'irraggiamento, il pH del campione a valori compresi tra 7 e 9, che sono generalmente raccomandati. Per l'ossidazione di campioni costituiti da acque dolci, è stata suggerita l'aggiunta di NaHCO_3 come tampone per stabilizzare il pH a valori alcalini (Koroleff, 1983).

L'irraggiamento viene condotto per 2 ore nel caso del fosforo e per 20-24 ore nel caso dell'azoto. Per ogni campione è perciò necessario preparare due repliche, una per l'analisi del fosforo ed una per l'analisi dell'azoto. Alla fine dello stadio d'ossidazione, le provette vengono lasciate raffreddare, ed i campioni vengono analizzati entro breve tempo, rispettivamente come ortofosfato ed azoto inorganico disciolto, usualmente mediante metodo colorimetrico.

Il metodo di fotoossidazione UV è stato descritto da Armstrong *et al.* (1966) e Armstrong e Tibbitts (1968), e successivamente rivisto da Walsh (1989) e Bronk *et al.* (2000). Esso utilizza dei fotoreattori che sono spesso apparati personalizzati, di tipo non commerciale. Essi sono costituiti da un corpo cilindrico in acciaio, dove vengono alloggiati le provette di quarzo contenenti i campioni, sono muniti di una lampada a vapori di mercurio ad alta pressione (900-1200 W) e di un sistema di alimentazione elettrico. Le provette sono poste ad una distanza di circa 10 cm dalla lampada e mantenute durante l'irraggiamento alla temperatura di 80-85°C grazie ad un sistema di ventilazione forzata. A causa della grande varietà di fotoreattori esistenti, le condizioni operative ottimali di utilizzo di ogni apparato sperimentale devono essere testate singolarmente. Sono state descritte in letteratura diverse varianti dei metodi UV, utilizzabili a seconda delle caratteristiche della matrice del campione e dell'intervallo di concentrazione considerato. Alcune di esse utilizzano come reagente ossidante il perossodisolfato di potassio, in sostituzione del perossido di idrogeno (Cozzi e Giani, 2007 e riferimenti inclusi).

Sono stati sviluppati anche sistemi automatici che permettono l'analisi in continuo di campioni, generalmente filtrati, mediante ossidazione UV seguita da dosaggio colorimetrico. Essi si basano sullo sviluppo di analizzatori a flusso segmentato (Collos e Mornet, 1993; Aminot e K erouel, 2001) o a flusso continuo (McKelvie e Hart, 1989; Kroon, 1993; Oms *et al.*, 2003).

8.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

8.3.1 Attrezzatura

- Contenitori plastici in polietilene ad alta densità (HDPE), in teflon o in vetro borosilicato con tappo a tenuta per la raccolta dei campioni, di volume sufficiente per l'avvinamento dei contenitori da laboratorio utilizzati durante lo stadio d'ossidazione e durante l'analisi colorimetrica finale del fosforo reattivo ed azoto inorganico disciolto (20-200 ml);
- Tubi di campionamento in silicone o teflon;
- Congelatore, per la conservazione dei campioni a -20°C.

Per il campionamento delle frazioni disciolte dell'azoto e fosforo (TDN e TDP) sono inoltre necessari:

- Filtri in microfibra di vetro borosilicato di porosità nominale 0,7 µm (GF/F da 25 o 47 mm di diametro) trattati precedentemente in muffola a 450°C per 24 ore;
- Portafiltri e siringhe di campionamento in materiale inerte, equivalente a quello utilizzato per la raccolta dei campioni.

8.3.2 Prodotti chimici

- Acido cloridrico 37%, reagente puro;
- Acqua ultrapura da laboratorio, grado reagente.

8.3.3 Procedura di campionamento

Tutti i contenitori e le attrezzature da laboratorio utilizzate per il campionamento del TN e TP devono essere lavati accuratamente, trattati con acido cloridrico diluito (10%) e risciacquati con acqua ultrapura da laboratorio, grado reagente.

Nel caso dell'analisi del TN e TP, il campione viene raccolto direttamente dalla bottiglia primaria di campionamento (ad esempio, dalle bottiglie Niskin montate sul sistema di profilazione tipo Rosette) ed introdotto in quella di conservazione, dopo aver avvinato 2-3 volte questa ultima con il campione stesso. Il sub-campionamento deve avvenire entro breve tempo, per evitare la sedimentazione all'interno della bottiglia primaria di campionamento, la quale causerebbe una raccolta di subcampioni non omogenei e non rappresentativi dell'ambiente acquatico studiato.

Nel caso si vogliano analizzare le frazioni disciolte è necessario operare una filtrazione dei campioni utilizzando filtri in microfibra di vetro borosilicato di diametro pari a 25 o 47 mm, a seconda della quantità di particolato sospeso presente nell'ambiente acquatico. I filtri devono essere trattati in precedenza in muffola (450°C per 24 ore) allo scopo di rimuovere i possibili contaminanti organici adsorbiti sulla loro superficie.

In questo caso, i campioni vengono prelevati dalle bottiglie del sistema di profilazione alla fine della calata e filtrati entro breve tempo. È preferibile che la filtrazione dei campioni avvenga direttamente dalla bottiglia primaria di campionamento, senza operare subcampionamenti che possono aumentare il rischio di contaminazione dei campioni. A questo scopo, si può utilizzare un sistema filtrante a caduta costituito da un portafiltro munito di un tubo di campionamento, oppure una siringa dosatrice automatica munita di portafiltro, che deve essere collegata al rubinetto della bottiglia primaria mediante un tubetto. Utilizzando questi sistemi si raccoglie un volume opportuno di campione filtrato nel contenitore di conservazione. È necessario sciacquare ripetutamente il filtro ed il contenitore con il campione filtrato prima del prelievo definitivo, allo scopo diminuire il rischio di contaminazione.

I filtri devono essere sostituiti quando la filtrazione comincia ad essere difficile per occlusione dello stesso. Filtri a diversa porosità selezionano frazioni di azoto e fosforo organici diverse e forniscono concentrazioni di DON e DOP non confrontabili.

Nel caso si vogliano determinare le frazioni organiche totali (ON, OP) o quelle organiche disciolte (DON e DOP) è necessario prelevare dalla stessa bottiglia primaria un'altra replica del campione per l'analisi dei nutrienti inorganici disciolti (NO_3 , nitrato; NO_2 , nitrito; NH_4 , ammonio; PO_4 , ortofosfato), le cui concentrazioni saranno utilizzate per determinare per differenza le frazioni organiche totali:

$$\text{ON} = \text{TN} - (\text{NO}_3 + \text{NO}_2 + \text{NH}_4)$$

$$\text{OP} = \text{TP} - \text{PO}_4$$

o organiche disciolte:

$$\text{DON} = \text{TDN} - (\text{NO}_3 + \text{NO}_2 + \text{NH}_4)$$

$$\text{DOP} = \text{TDP} - \text{PO}_4$$

In ambienti ad elevata trofia, anche la determinazione dei nutrienti inorganici disciolti deve avvenire in campioni d'acqua filtrati in modo analogo a quelli di TDN e TDP, allo scopo di ottenere valori di concentrazione comparabili.

8.3.4 Conservazione dei campioni

Una volta raccolti, i campioni di TN e TP (TDN e TDP) vengono congelati immediatamente a -20°C , fino all'analisi in laboratorio. La loro conservazione può protrarsi anche per diversi mesi senza causare alterazione dei risultati. Trasformazioni interne al campione tra le frazioni organiche ed inorganiche dell'azoto e del fosforo non influenzano l'accuratezza dell'analisi, ammesso che il successivo stadio d'ossidazione sia esaustivo.

Altri metodi riportati in letteratura per la conservazione dei campioni sono la refrigerazione ($+4^\circ\text{C}$) al buio, l'avvelenamento con cloruro di mercurio e la pastorizzazione. Tuttavia, il loro utilizzo non è comune e non appare essere più affidabile del congelamento (Cozzi e Giani, 2007).

8.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

8.4.1 Ossidazione in soluzione con perossodisolfato (PO)

8.4.1.1 Attrezzatura

- Attrezzatura per l'analisi del "Nitrato" e "Ortofosfato" (vedere capitoli relativi);
- Autoclave;
- Bagno termostatico o forno a microonde;
- Pipetta a bolla da 50 ml;
- Pipetta da 5 ml.

8.4.1.2 Prodotti chimici

- Potassio perossodisolfato $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ (contenuto in azoto $<0,001\%$);
- Sodio idrossido (NaOH; contenuto in azoto $<0,001\%$);

-
- Acido Borico (H_3BO_3);
 - Reagenti per l'analisi del "Nitrato" e "Ortofosfato" (vedere capitoli relativi).

8.4.1.3 Preparazione dei reagenti

Il reagente ossidante viene preparato sciogliendo 50 g perossodisolfato di potassio e 30 g di acido borico in 1 l di soluzione di idrossido di sodio $0,375 \text{ mol l}^{-1}$ (15 g di NaOH sciolti e portati a volume a 1 l con acqua ultrapura da laboratorio, grado reagente).

Il reagente è stabile per diversi mesi se conservato a temperatura ambiente in bottiglie ambrate al riparo dalla luce diretta.

8.4.1.4 Procedura analitica

- Scongellare i campioni in un bagno termostato a 37°C o in forno a microonde, prelevare 50 ml di acqua con una pipetta a bolla, avvinata almeno tre volte con il campione, e trasferire nel contenitore di reazione, anch'esso preventivamente avvinato con il campione.
- Inoculare 5 ml di reattivo ossidante dispensato con una pipetta. Dopo aver inoculato il reattivo nel campione chiudere ermeticamente il tappo e procedere alla reazione di ossidazione entro 48 ore, in quanto tempi maggiori possono determinare una diminuzione della concentrazione dell'azoto. Una volta avvenuta la reazione d'ossidazione le concentrazioni dei nitrati e dei fosfati prodotti rimangono costanti anche per tre mesi (Valderrama, 1981). Se si ha la certezza di poter autoclavare il campione entro tempi brevi è possibile effettuare l'inoculo del reattivo ossidante al momento del campionamento, evitando il congelamento del campione.
- Mettere in autoclave i campioni per almeno 30 minuti ($T = 120^\circ\text{C}$, $P = 2 \text{ bar}$).
- Portare i campioni a temperatura ambiente. Alcuni autori suggeriscono di verificare che non sia avvenuta una variazione del volume del campione (Valderrama, 1981; Genchi, 1990) e di aggiungere acqua ultrapura da laboratorio, grado reagente, nel caso si osservi una diminuzione dello stesso. Tuttavia, questa operazione rischia d'inquinare il campione, pertanto se ne sconsiglia l'uso. In caso di una diminuzione evidente, si suggerisce di misurare il volume finale del campione tenendone conto nel calcolo delle concentrazioni.
- Al termine della fase d'ossidazione tutto l'azoto presente nel campione dovrebbe essere stato convertito in nitrato ed il fosforo in ortofosfato. Procedere dunque alla determinazione della concentrazione di questi analiti come riportato nei rispettivi capitoli del presente volume.

8.4.1.5 Determinazione del bianco dei reagenti e controllo dell'efficienza della soluzione ossidante

Poiché i reattivi utilizzati per la preparazione della soluzione ossidante possono contenere impurezze d'azoto e fosforo tali da determinare un sovrastima del TN e TP nei campioni, è necessario determinare il bianco dei reagenti. A tal fine si preparano 3 campioni di "bianco":

- trasferire 50 ml di acqua ultrapura da laboratorio, grado reagente in 3 contenitori di reazione, ed inoculare 5 ml di reagente ossidante in ciascuno di essi;
- autoclavare i tre bianchi seguendo la stessa procedura utilizzata per i campioni.

Prima di utilizzare il reagente ossidante è consigliabile verificarne l'efficienza analizzando standard di riferimento artificiali, costituiti da soluzioni di composti organici di sintesi, contenenti azoto e fosforo a concentrazioni note. Una dettagliata descrizione dell'utilizzo di tali composti è riportata in un paragrafo specifico seguente.

La verifica dell'efficienza della soluzione di perossodisolfato deve essere effettuata per assicurarsi che questa sia massima, e non per correggere rese d'ossidazione non quantitative di campioni naturali.

Infatti, un ridotto potere ossidante si può manifestare in modo variabile a seconda della diversa composizione della materia organica coinvolta nella reazione. Se si osserva un ridotta efficienza d'ossidazione occorre preparare un nuovo reagente.

8.4.1.6 Calcoli

Al termine della fase d'ossidazione si determinano le concentrazioni di nitrato (C_{NO_3}) ed ortofosfato (C_{PO_4}) nei campioni di acqua di mare. Si calcola il bianco dei reagenti per l'azoto (B_N) e per il fosforo (B_P) come media delle concentrazioni di nitrato e ortofosfato determinate nei tre campioni di "bianco".

La concentrazione di TN e TP si calcola come:

$$C_{TN} = (C_{NO_3} - B_N) * f$$
$$C_{TP} = (C_{PO_4} - B_P) * f$$

dove f è il fattore di diluizione pari a 1.1 (se sono stati addizionati 5 ml di soluzione ossidante a 50 ml di campione).

8.4.2 Fotoossidazione (UV)

8.4.2.1 Attrezzatura

- Forno a microonde;
- Muffola;
- Omogenizzatore ad ultrasuoni per campioni liquidi;
- Fotoreattore UV, dotato di lampada a vapori di mercurio ad alte pressione (≈ 1200 W) e sistema di raffreddamento ad aria;
- Provette di quarzo per l'ossidazione dei campioni munite di tappo a tenuta;
- Vetreria da laboratorio, matracci tarati e bilancia analitica per la preparazione di soluzioni a concentrazione nota;
- Micropipetta di precisione di volume compreso tra 25-200 μ l;
- Attrezzatura per l'analisi del "Nitrato", "Nitrito", "Ammonio" e "Ortofosfato" (vedere capitoli relativi);

8.4.2.2 Prodotti chimici

- Perossido di idrogeno (H_2O_2) in soluzione acquosa 30%, reagente puro;
- Acido cloridrico 37%, reagente puro;
- Acqua ultrapura da laboratorio, grado reagente;
- Cloruro di sodio ed altri composti organici di sintesi, reagenti puri, contenenti azoto e fosforo per il controllo dell'efficienza dello stadio d'ossidazione (vedere il paragrafo seguente);
- Reagenti per l'analisi del "Nitrato, Nitrito ed Ammonio" e "Ortofosfato" (vedere capitoli relativi).

8.4.2.3 Procedura analitica

I campioni congelati vengono rapidamente disciolti utilizzando un forno a microonde, evitando però il loro riscaldamento eccessivo. I campioni possono essere poi trattati con un omogenizzatore per liquidi ad ultrasuoni, allo scopo di distruggere l'eventuale particellato organico formatosi nel campione, o sulle pareti dei contenitori, durante la conservazione. La presenza di tale particellato potrebbe portare a perdite

di azoto e fosforo dalla matrice acquosa durante l'analisi (Ogawa *et al.*, 1999).

Le provette di quarzo da utilizzare nel fotoreattore devono essere lavate accuratamente, trattate con acido cloridrico diluito (10%) e risciacquate con acqua ultrapura grado reagente. Prima del loro utilizzo, un ulteriore trattamento in muffola (550°C, 24 ore) è indicato per rimuovere eventuali contaminanti organici adsorbiti sulla loro superficie.

Una aliquota precisa di campione, sufficiente per la successiva analisi colorimetrica, viene introdotta nelle provetta di quarzo insieme al perossido di idrogeno. La provetta viene tappata ed inserita nel fotoreattore. È necessario preparare due repliche per ogni campione, una per l'analisi del TN ed una per l'analisi del TP. Le aliquote di campione utilizzate sono generalmente comprese tra 5 a 25 ml, mentre l'aggiunta di perossido di idrogeno varia da 25 a 200 µl, a seconda dalle caratteristiche del fotoreattore.

La fotoossidazione decorre a 85°C per 2 ore nel caso del fosforo e per 20-24 ore nel caso dell'azoto. Alla fine dello stadio di ossidazione, i campioni vengono estratti dal fotoreattore e lasciati raffreddare. Il TDP viene analizzato come ortofosfato, ed il TDN viene analizzato come somma di nitrato, nitrito ed ammonio, utilizzando le medesime tecniche descritte nel presente volume per l'analisi dei nutrienti inorganici disciolti.

8.4.2.4 Determinazione del bianco sperimentale e controllo dell'efficienza di fotoossidazione

Il metodo UV ha valori di bianco sperimentale generalmente bassi (Walsh, 1989; Bronk *et al.*, 2000; Sharp *et al.*, 2002). Tuttavia, il perossido di idrogeno aggiunto al campione può contenere impurezze di azoto e fosforo, che incrementano la concentrazione di TN e TP nei campioni. È necessario stimare il valore del bianco sperimentale attraverso l'analisi di campioni artificiali di acqua ultrapura da laboratorio o di acqua di mare artificiale (37 g l⁻¹ NaCl reagente puro in acqua da laboratorio), addizionati con perossido di idrogeno e trattati con la stessa procedura utilizzata per l'analisi dei campioni naturali. Il valore di concentrazione ottenuto, se osservabile, va sottratto alla concentrazione di TP e TN del campione.

L'efficienza d'ossidazione del fotoreattore UV può variare nel tempo durante un periodo prolungato d'analisi, a causa di variazioni nelle condizioni ambientali di utilizzo dell'apparato o per usura della lampada a vapori di mercurio. Per assicurare una migliore riproducibilità dei risultati dovrebbero essere analizzati insieme ad ogni gruppo di campioni anche degli delle soluzioni standard di riferimento naturali o artificiali.

Standard di riferimento naturali sono costituiti da repliche omogenee del medesimo campione d'acqua naturale, dolce o marina, che vengono raccolte in una volta sola e conservate congelate a -20°C. Esse vengono poi analizzate di volta in volta seguendo la stessa procedura dei campioni. Standard di riferimento artificiali sono soluzioni di composti organici di sintesi, contenenti azoto e fosforo a concentrazione nota, preparate in acqua ultrapura da laboratorio o in acqua di mare artificiale. Per loro utilizzo fare riferimento al paragrafo seguente.

8.4.2.5 Calcoli

Nel metodo UV, i campioni sottoposti ad irraggiamento vengono analizzati come nitrato, nitrito ed ammonio nel caso del TN, e come ortofosfato reattivo nel caso di TP, secondo la procedura descritto nei relativi capitoli del presente manuale. Il valore del bianco sperimentale, se osservabile, deve essere sottratto alle concentrazioni finali di TN e TP.

8.5 UTILIZZO DI COMPOSTI ORGANICI DI SINTESI COME MODELLI D'OSSIDAZIONE DELLA MATERIA ORGANICA NATURALE

Tutti i metodi d'analisi del fosforo ed azoto totali o organici disciolti considerano l'utilizzo di soluzioni a concentrazione nota di composti organici di sintesi, allo scopo di valutare nel tempo l'efficienza d'ossidazione dell'apparato sperimentale. Queste soluzioni standard devono essere preparate utilizzando rea-

genti ultrapuri e devono avere concentrazioni confrontabili a quelle dei campioni naturali. In letteratura sono stati testati molti composti organici utili a questo scopo, soprattutto tra quelli la cui presenza è nota nelle acque naturali, alcuni dei quali vengono elencati in Tab. 1.

Tuttavia, è necessario evidenziare che nessun composto organico specifico ha la medesima resistenza all'ossidazione dei campioni naturali, dal momento che questi ultimi contengono un insieme complesso di materia organica disciolta a vario peso molecolare (biopolimeri e geopolimeri), materia colloidale e particellata (vivente e non vivente). Per questo motivo, nessun standard artificiale può essere considerato un composto modello assoluto della materia organica presente negli ambienti acquatici. Alcuni composti organici di sintesi sono, infatti, noti recalcitranti, che presentano percentuali d'ossidazione significativamente inferiori al 100% rispetto a tutti i metodi d'ossidazione utilizzati.

Per questo motivo, soluzioni di standard artificiali dovrebbero essere impiegate principalmente per controllare l'efficienza nel tempo del sistema d'ossidazione, ma non per ottenere fattori di correzione da applicare alla determinazione di campioni naturali in caso d'ossidazioni non quantitative.

8.6 RACCOMANDAZIONI

I contenitori di reazione utilizzati nel metodo PO devono essere conservati pieni di una soluzione di HCl 10%, e risciacquati accuratamente con acqua ultrapura da laboratorio, grado reagente, prima dell'utilizzo.

Per evitare una sottostima del valore di TN nella determinazione UV di diversi composti organici naturali e di sintesi, è necessario determinare la concentrazione finale dell'azoto inorganico disciolto non solo come somma del nitrato e nitrito, ma anche come ammonio. È noto infatti, che diversi composti azotati tra cui l'acido etilen-diammino-tetracetico (EDTA), l'antipirina ($C_{11}H_{12}N_2O$) e l'urea ($CO(NH_2)_2$) possono rilasciare un certa quantità d'ammonio residuo dopo la fotoossidazione.

8.7 PROBLEMI POSSIBILI

Nel metodo PO, soprattutto per quanto riguarda la determinazione dell'azoto, possono sorgere alcuni problemi dovuti alle impurezze presenti nei reattivi. Pertanto è necessario utilizzare reattivi a basso contenuto di azoto, o utilizzare la tecnica di ricristallizzazione descritta da Nydahl (1978) per la loro purificazione. È importante controllare sempre la qualità dell'acqua ultrapura in uso, per cui è preferibile utilizzare sempre acqua da laboratorio di produzione recente.

Infine, affinché la reazione porti alla completa ossidazione di tutti i composti azotati, l'ossigeno deve essere circa 10 volte in eccesso rispetto all'azoto nel campione. Pertanto, se si attendono concentrazioni molto elevate di TN è indispensabile aumentare la quantità di reagente ossidante aggiunto ai campioni.

L'aumento eccessivo del tempo d'irraggiamento nel metodo UV durante l'analisi del fosforo non migliora la resa ossidativa ma, al contrario, potrebbe determinare problemi a causa del progressivo rilascio di silicato nel campione da parte delle provette di quarzo. Elevate concentrazioni in soluzione di silicato possono interferire con l'analisi dell'ortofosfato, in quanto entrambi questi nutrienti sono determinati mediante la reazione colorimetrica del complesso blu di molibdeno.

Per migliorare la resa del metodo UV verso composti resistenti alla fotoossidazione sono stati proposti in letteratura sistemi automatici d'ossidazione in sequenza in ambienti acido e basico (Collos e Mornet, 1993), o l'utilizzo nel metodo UV del reagente perossodisolfato (Kroon, 1993).

Tab. 1 – Efficienza d’ossidazione (%) riportata in letteratura per alcuni composti organici di sintesi contenenti azoto e fosforo, rispetto ai metodi d’ossidazione con perossodisolfato (PO), fotoossidazione (UV), ossidazione ad alta temperatura (HTO) ed incenerimento/idrolisi in presenza di MgSO₄ (Ash/Hyd), in matrice d’acqua di mare artificiale (SW) o dolce (DW).

STANDARD CONTENENTI AZOTO ORGANICO						
Composto	Concentrazione	Matrice	Efficienza ossidazione (%)			Riferimento
Nome	μM		PO	UV	HTO	
Urea	10	SW	-	83,3	100,2	Walsh, 1989
Urea	5	DW	98,7	101,1	96,7	Bronk et al., 2000
Urea	25	SW	96,8	76,5	96,8	Bronk et al., 2000
Solfato d’ammonio	40	SW	-	99,5	100,2	Walsh, 1989
Solfato d’ammonio	25	SW	104,2	67,4	93,8	Bronk et al., 2000
Glicina	20	SW	-	95,5	99,6	Walsh, 1989
EDTA	40	SW	-	95,7	100,5	Walsh, 1989
EDTA	5	DW	87,1	87,9	93,0	Bronk et al., 2000
Antipirina	40	SW	-	50,9	101,1	Walsh, 1989
Antipirina	40	DW	68,1	46,6	69,8	Bronk et al., 2000
Acidi umici	11	DW	94,8	91,6	59,9	Bronk et al., 2000

STANDARD CONTENENTI FOSFORO ORGANICO						
Composto	Concentrazione	Matrice	Efficienza ossidazione (%)			Riferimento
Nome	μM		PO	UV	Ash/Hyd	
Ac. 1-amminoetilfosfonico	1	SW	98	94	-	Thomson-Bulldis e Karl, 1998
Ac. fosfoglicerico	1	SW	99	89	-	Thomson-Bulldis e Karl, 1998
Ac. Ribonucleico	10	SW	95,0	-	98,7	Monaghan e Ruttenberg, 1999
Adenosina-5'-trifosfato	1	SW	108	35	-	Thomson-Bulldis e Karl, 1998
Adenosina-5'-trifosfato	10	SW	95,0	-	95,3	Monaghan e Ruttenberg, 1999
Glucosio-1-fosfato	1	SW	98	96	-	Thomson-Bulldis e Karl, 1998
Glucosio-6'-fosfato	1	DW	101	102	-	K�rouel e Aminot, 1996
Glucosio-6'-fosfato	1	SW	92	89	-	K�rouel e Aminot, 1996
Glucosio-6'-fosfato	10	SW	98,8	-	99,0	Monaghan e Ruttenberg, 1999
Guanosina-5'-monofosfato	1	DW	100	101	-	K�rouel e Aminot, 1996
Guanosina-5'-monofosfato	1	SW	94	88	-	K�rouel e Aminot, 1996
Guanosina-5'-monofosfato	10	SW	93,8	-	95,8	Monaghan e Ruttenberg, 1999
Polifosfato (n = 3)	10	SW	98,4	-	97,5	Monaghan e Ruttenberg, 1999
Polifosfato (n = 91)	1	SW	88	26	-	Thomson-Bulldis e Karl, 1998
Ribosio-5-fosfato	1	DW	103	101	-	K�rouel e Aminot, 1996
Ribosio-5-fosfato	1	SW	95	89	-	K�rouel e Aminot, 1996
Timidina-5'-monofosfato	1	SW	110	96	-	Thomson-Bulldis e Karl, 1998

8.8 ALTRI METODI

La digestione Kjeldahl è un metodo APHA, AWWA e WPCF (Clesceri *et al.*, 1998), che si basa sulla conversione dell'azoto organico in ammonio, durante una digestione del campione ad alta temperatura (360-380°C; 1-2 ore), in presenza di acido solforico concentrato e solfato di potassio. Sono riportate in letteratura diverse varianti del metodo, che includono l'utilizzo di procedure manuali o automatiche, adatte all'analisi dell'azoto organico a diversi livelli di concentrazione (Elkei, 1976; Bowman e Delfino, 1982; Rohwedder e Pasquini, 1991; Mitamura, 1994; Doval *et al.*, 1997; Su *et al.*, 1997). Il metodo determina l'azoto organico presente nello stato d'ossidazione -3, incluso l'ammonio inizialmente presente nel campione (azoto totale Kjeldahl; TKN). Tuttavia, la digestione Kjeldahl non è quantitativa nella determinazione dell'azoto presente negli altri stati d'ossidazione ed implica una procedura manuale complessa. Inoltre, il metodo ha una scarsa sensibilità, una bassa precisione e bianchi elevati.

Un altro importante gruppo di metodi per la determinazione dell'azoto organico si basa sulla combustione ad alta temperatura, in assenza (HTO) o presenza (HTCO) di catalizzatori. Il metodo è stato inizialmente utilizzato su sistemi sperimentali (Gordon e Sutcliffe, 1973; Sharp, 1974; Suzuki *et al.*, 1985), ed in seguito sviluppato su analizzatori commerciali che sono stati oggetto di esperimenti d'intercalibrazione e confronto con gli altri metodi (Walsh, 1989; Hansell, 1993; Hedges *et al.*, 1993; Bronk *et al.*, 2000; Sharp *et al.*, 2002; Sharp *et al.*, 2004). L'ossidazione dell'azoto organico presente in un campione acquoso avviene in una colonna di combustione ad alta temperatura (900-1100°C), oppure a temperatura inferiore (650-900°C) in presenza di un catalizzatore, costituito generalmente da platino metallico supportato su Al₂O₃. Tuttavia, sono stati utilizzati anche altri catalizzatori quali AlSiO₃, PtCl₆, MnO₂, ossidi di cromo e cobalto. Il principale prodotto azotato presente nella miscela di gas combusti è l'ossido nitrico (NO), la cui concentrazione viene determinata per chemiluminescenza. Il metodo è accurato, sensibile e permette la contemporanea determinazione del carbonio organico.

Un metodo manuale d'incenerimento ed idrolisi è stato sviluppato da Solorzano e Sharp (1980) per l'analisi del TP in campioni acquosi. I campioni liquidi vengono essiccati in presenza di MgSO₄ e successivamente posti in muffola a 450-500°C per 2 ore. Il residuo secco, ripreso e riscaldato con HCl acquoso, può essere analizzato come ortofosfato mediante metodo colorimetrico. Successive versioni del metodo hanno incluso l'utilizzo di Mg(NO₃)₂ come catalizzatore e diverse condizioni sperimentali d'incenerimento (Ormaza-Gonzales e Statham, 1996; Monaghan e Ruttenberg, 1999). Il metodo garantisce una elevata efficienza d'ossidazione del fosforo organico, ed è adatto all'analisi del fosforo particellato raccolto su filtri in microfibra di vetro. Tuttavia, esso implica una laboriosa procedura manuale e può essere affetto da perdite di fosforo in campioni di matrice non salina.

8.9 CONFRONTO TRA I METODI

Il metodi d'ossidazione con perossodisolfato PO e di fotoossidazione UV sono stati largamente impiegati negli studi ad alta risoluzione in ambiente marino, anche se la loro efficacia è stata dibattuta in letteratura senza raggiungere un accordo definitivo (Walsh, 1989; Hedges *et al.* 1993; Bronk *et al.*, 2000; Sharp *et al.*, 2002; Sharp *et al.*, 2004). La scelta del metodo analitico più adatto dovrebbe perciò considerare vari aspetti come le caratteristiche della matrice dei campioni, l'intervallo di concentrazione, la presenza nei campioni di elevate quantità di particellato, la presenza di materia organica di origine naturale o antropica e l'esperienza pratica del laboratorio.

Il metodo PO è riconosciuto avere una efficienza d'ossidazione molto elevata verso la maggior parte dei composti organici presenti nell'ambiente marino. L'aggiunta al campione di un reagente ossidante concentrato può, tuttavia, portare a bianchi sperimentali elevati o variabili (Bronk *et al.*, 2000; Sharp *et al.*, 2002). Per questi motivi, il suo utilizzo è particolarmente indicato in acque costiere caratterizzate da elevate concentrazioni di TN e TP, anche di origine antropica.

Aspetti positivi del metodo UV sono i bassi valori di bianco sperimentale e la semplicità di manipo-

lazione dei campioni. Tuttavia, l'efficienza d'ossidazione verso alcune classi di composti specifici è meno elevata rispetto al metodo PO. Il suo utilizzo appare perciò più conveniente in mare aperto, soprattutto in acque oligotrofiche non interessate da apporti continentali (Walsh, 1989; Sharp *et al.*, 2002).

Nel caso dell'analisi dell'azoto totale, i metodi HTO-HTCO risultano essere molto efficaci. Essi necessitano però dell'acquisto di costosi analizzatori commerciali, le cui condizioni operative devono essere attentamente valutate, per quanto concerne le procedure sperimentali per ottenere bianchi analitici stabili ed efficienze d'ossidazione costanti delle colonne di combustione (Hedges *et al.*, 1993; Sharp *et al.*, 2002; Sharp *et al.*, 2004).

8.10 BIBLIOGRAFIA

- AMINOT A., KÉROUEL R. (2001) - An automated photo-oxidation method for the determination of dissolved organic phosphorus in the marine fresh water. *Mar. Chem.*, **76**: 113-126.
- ARMSTRONG F.A.J., TIBBITTS S. (1968) - Photochemical combustion of organic matter in sea water for nitrogen, phosphorus and carbon determination. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **48**: 143-152.
- ARMSTRONG F.A.J., WILLIAMS P.M., STRICKLAND J.D.H. (1966) - Photo-oxidation of organic matter in sea water by ultra-violet radiation, analytical and other applications. *Nature*, **211**: 481-483.
- BOWMAN G.T., DELFINO J.J. (1982) - Determination of total Kjeldahl nitrogen and total phosphorus in surface waters and wastewaters. *J. Water Pollut. Control Fed.*, **54**: 1324-1330.
- BRONK D.A., LOMAS M.W., GLIBERT P.M., SCHUKERT K.J., SANDERSON M.P. (2000) - Total dissolved nitrogen analysis: comparisons between the persulfate, UV and high temperature oxidation methods. *Mar. Chem.*, **69**: 163-178.
- BUTCHER S.S., CHARLSON R.J., ORIANI G.H., WOLFE G.V. (1992) - *Global Biogeochemical Cycles*. Academic Press, London: 379 pp.
- CLESCERI L.S., GREENBERG A.E., EATON A.D. (1998) - *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association), WPCF (Water Environment Federation Publication), 20th Edition, Washington DC. Part 4000: 99-128.
- COLLOS Y., MORNET F. (1993) - Automated procedure for determination of dissolved organic nitrogen and phosphorus in aquatic environments. *Mar. Biol.*, **116**: 685-688.
- COZZI S., GIANI M. (2007) - Determination of organic nitrogen and urea. In: Leo M.L., Nollet (ed.), *Handbook of Water Analysis*. 2nd Edition, Taylor & Francis Group (eds), CRC Press, Boca Raton, London, New York: 367-392.
- DOVAL M.D., FRAGA F., PEREZ F. (1997) - Determination of dissolved organic nitrogen in seawater using Kjeldahl digestion after inorganic nitrogen removal. *Oceanol. Acta*, **20**: 713-720.
- ELKEI O. (1976) - An automated method for the determination of low level Kjeldahl nitrogen in water and waste water. *Anal. Chim. Acta.*, **86**: 63-68.
- GENCHI G. (1990) - Azoto e fosforo totali. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera D'Alcalà M. (eds.), *Metodi nell'ecologia del plancton marino, Nova Thalassia*, **11**: 171-179.
- GOLIMOWSKI J., GOLIMOWSKA K. (1996) - UV-photooxidation as pretreatment step in inorganic analysis of environmental samples. *Anal. Chim. Acta*, **325**: 111-133.
- GORDON D.C. Jr., SUTCLIFFE W.H. Jr. (1973) - A new dry combustion method for the simultaneous determination of total organic carbon and nitrogen in seawater. *Mar. Chem.*, **1**: 231-244.
- HANDA N., TANOUE E., HAMA T. (2000) - *Dynamics and characterization of marine organic matter*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, London, Boston: 560 pp.
- HANSELL D.A. (1993) - Results and observation from the measurement of DOC and DON in seawater using a high-temperature catalytic oxidation. *Mar. Chem.*, **41**: 195-202.
- HANSELL D.A., CARLSON C.A. (2002) - *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter*. Academic Press, London: 774 pp.
- HEDGES J.I., BERGAMASCHI B.A., BENNER R. (1993) - Comparative analysis of DOC and DON in natural waters. *Mar. Chem.*, **41**: 121-134.
- JOHNES P.J., HEATHWAUTE A.L. (1992) - A procedure for simultaneous determination of total nitrogen and total phosphorus in freshwater samples using persulphate microwave digestion. *Water Res.*, **26**: 1281-1287.

-
- KÉROUEL R., AMINOT A. (1996) - Model compounds for the determination of organic and total phosphorus dissolved in natural waters. *Analytica Chim. Acta*, **318**: 385-390.
- KOROLEFF F. (1976a) - Total and organic nitrogen. In: Grasshoff K. (ed.), *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie: 167-177.
- KOROLEFF F. (1976b) - Determination of phosphorous. In: Grasshoff K. (ed.), *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie: 117-126.
- KOROLEFF F. (1983) - Total and organic nitrogen. In: Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. (eds.), *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim: 162-173.
- KROON H. (1993) - Determination of nitrogen in water: comparison of a continuous-flow method with on-line UV digestion with the original Kjeldahl method. *Anal. Chim. Acta*, **276**: 287-293.
- LEE C., WAKEHAM S.G. (1989) - Organic matter in Sea-water: Biogeochemical Processes. In: Riley J.P. (ed.), *Chemical Oceanography*. Academic Press, Oxford, **9**: 1-51.
- LOH A.N., BAUER J.E. (2000) - Distribution, partitioning and fluxes of dissolved and particulate organic C, N and P in the eastern North Pacific and Southern Oceans. *Deep-Sea Res PT I*, **47**: 2287-2316.
- McKELVIE I.D., HART B.T. (1989) - Spectrophotometric determination of dissolved organic phosphorus in natural waters using in-line photo-oxidation and flow injection. *Analyst*, **114**: 1459-1463.
- MITAMURA O. (1994) - Determination of dissolved organic nitrogen in freshwater samples based on Kjeldahl Digestion. *Jap. J. Limnol.*, **55**: 39-45.
- MONAGHAN E.J., RUTTENBERG K.C. (1999) - Dissolved organic phosphorus in the coastal ocean: reassessment of available methods and seasonal phosphorus profiles from the Eel River Shelf. *Limnol. Oceanogr.*, **44**: 1702-1714.
- NYDAHL F. (1978) - On the peroxodisulphate oxidation of total nitrogen in waters to nitrate. *Water Res.*, **12**: 1123-1130.
- OGAWA H., FAKUDA R., KOIKE I. (1999) - Vertical distributions of dissolved organic carbon and nitrogen in the Southern Ocean. *Deep-Sea Res. PT I*, **46**: 1809-1826.
- OMS M.T., CERDA A., CERDA V. (2003) - Sequential injection system for on-line analysis of total nitrogen with UV-mineralization. *Talanta*, **59**: 319-326.
- ORMAZA-GONZALES F.I., STATHAM, P.J. (1996) - A comparison of methods for the determination of dissolved and particulate phosphorus in natural waters. *Wat. Res.*, **30**: 2739-2747.
- PUJO-PAY M., RAIMBAULT P. (1994) - Improvement of the wet-oxidation procedure for simultaneous determination of particulate organic nitrogen and phosphorus collected on filters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **105**: 203-207.
- RAIMBAULT P., POUVESLE W., DIAZ F., GARCIA N., SEMPÉRÉ. R. (1999) - Wet-oxidation and automated colorimetry for simultaneous determination of organic carbon, nitrogen and phosphorus dissolved in seawater. *Mar. Chem.*, **66**: 161-169.
- ROHWEDDER J.J.R., PASQUINI C. (1991) - Differential conductimetry in flow injection. Determination of ammonia in Kjeldahl digests. *Analyst*, **116**: 841-845.
- SHARP J.H. (1974) - Improved analysis for "particulate" organic carbon and nitrogen from seawater. *Limnol. Oceanogr.*, **19**: 984-989.
- SHARP J.H., RINKER K.R., SAVIDGE K.B., ABELL J., YVES BENAÏM J., BRONK D., BURDIGE D.J., CAUWET G., CHEN W., DOVAL M.D., HANSELL D., HOPKINSON C., KATTNER G., KAUMEYER N., MCGLATHERY K.J., MERRIAM J., MORLEY N., NAGEL K., OGAWA H., POLLARD C., PUJO-PAY M., RAIMBAULT P., SAMBROTTO R., SEITZINGER S., SPYRES G., TIRENDI F., WALSH T.W., WONG C.S. (2002) - A preliminary methods comparison for measurement of dissolved organic nitrogen in seawater. *Mar. Chem.*, **78**: 171-184.
- SHARP J.H., BEAUREGARD A.Y., BURDIGE D., CAUWET G., CURLESS S.E., LAUCK R., NAGEL K., OGAWA H., PARKER A.E., PRIMM O., PUJO-PAY M., SAVIDGE W.B., SEITZINGER S., SPYRES G., STYLES R. (2004) - A direct instrument comparison for measurement of total dissolved nitrogen in seawater. *Mar. Chem.*, **84**: 181-193.
- SOLORZANO L., SHARP J.H. (1980) - Determination of total dissolved phosphorus and particulate phosphorus in natural waters. *Limnol. Oceanogr.*, **25**: 754-758.
- SU X.L., NIE L.H., YAO S.Z. (1997) - Determination of ammonium in Kjeldahl digests by gas-diffusion flow-injection analysis with a bulk acoustic wave-impedance sensor. *Talanta*, **44**: 2121-2128.
- SUZUKI Y., SUGIMURA Y., ITOH T. (1985) - A catalytic oxidation method for the determination of total nitrogen dissolved in seawater. *Mar. Chem.*, **16**: 83-97.

-
- THOMSON-BULLDIS A., KARL D. (1998) - Application of a novel method for phosphorus determinations in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 1565-1577.
- VALDERRAMA J.C. (1981) - The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Mar. Chem.*, **10**: 109-122.
- WADA E., HATTORI A. (1991) - *Nitrogen in the Sea: forms, abundances and rate processes*. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston: 208 pp.
- WALSH T.W. (1989) - Total dissolved nitrogen in Sea water: A new- high-temperature combustion method and a comparison with photo-oxidation. *Mar. Chem.*, **26**: 295-311.
- WOTTON R.S. (1990) - *The biology of particles in aquatic systems*. CRC Press, Boca Raton, Florida: 303 pp.

CAPITOLO 9. CARBONIO ORGANICO ED AZOTO TOTALE PARTICELLATI (POC E PTN)

A. Boldrin, M. Giani, L. Langone, F. Margiotta, P. Povero, V. Saggiomo

alfredo.boldrin@ismar.cnr.it

9.1 INTRODUZIONE

Il materiale particellato sospeso nella colonna d'acqua è definito come la frazione compresa nell'intervallo dimensionale 0,45 – 300 μm . Tale frazione riveste un ruolo rilevante in tutti gli ecosistemi acquatici e, pertanto, l'analisi della composizione e della distribuzione del particellato è di fondamentale importanza per lo studio dei principali cicli biogeochimici (C, N e P) in quanto la produzione, la decomposizione e la sedimentazione delle particelle influenzano profondamente la distribuzione di questi elementi negli oceani.

La sostanza particellata organica in ambiente acquatico è costituita principalmente da organismi viventi, autotrofi ed eterotrofi (fitoplancton, batteri, microzooplancton), e da una frazione, spesso considerevole, di particelle detritiche ed aggregati organici (ad es. marine snow).

Lungo la colonna d'acqua è possibile distinguere tre zone in cui la composizione del particellato ed i processi che lo coinvolgono sono di natura differente:

- lo strato superficiale (zona eufotica) in cui il particellato è composto soprattutto dagli organismi viventi e nel quale è riciclata gran parte della frazione detritica;
- gli strati profondi in cui il biota è costituito essenzialmente da batteri e nei quali avvengono lenti fenomeni di rimineralizzazione e rilevanti processi chimici di scambio tra sostanza particellata e disciolta;
- l'interfaccia acqua-sedimento dove la materia organica sedimenta lentamente per poi essere sottoposta nel sedimento ad ulteriori trasformazioni.

Anche la composizione chimica del materiale particellato varia lungo la colonna d'acqua. In generale, per ambienti di mare aperto, il rapporto C/N varia da 5-8 in superficie a 10-12 in profondità, indicando che il materiale proteico è riutilizzato più velocemente dei carboidrati. Infatti, la sostanza organica perde prima l'azoto, il fosforo e l'ossigeno in quanto l'energia necessaria per la rottura dei legami C-C e C-H è sensibilmente più alta rispetto ai legami C-N, C-P e C-O.

Le interazioni tra sostanza organica particellata e disciolta possono essere molteplici: la decomposizione microbica, la dissoluzione delle particelle sospese o che sedimentano possono rilasciare elementi associati con la frazione labile della sostanza disciolta e, d'altra parte, le particelle possono adsorbire elementi in traccia dalla fase disciolta, favorendo il loro trasferimento ai sedimenti.

Per la determinazione del carbonio organico particellato (POC) ed azoto particellato totale (PTN) si possono applicare sia metodi di ossidazione per via umida (Strickland e Parsons, 1972; Raimbault e Slawyk, 1991) che metodi di ossidazione ad alta temperatura (Menzel e Vaccaro, 1964; Gordon, 1969; Strickland e Parsons, 1972). In questo capitolo viene descritto il metodo analitico mediante combustione ad alta temperatura che rappresenta il metodo attualmente più diffuso.

Il metodo proposto può essere utilizzato per stimare la biomassa in carbonio per il fitoplancton e lo zooplancton e, con opportune modifiche, viene spesso usato per analizzare il carbonio organico, il carbonio totale e l'azoto totale nei sedimenti e nei campioni da trappola di sedimentazione.

9.2 PRINCIPIO DEL METODO

Per la determinazione delle concentrazioni di POC e PTN tipiche degli ambienti marini (POC 5 - 500 $\mu\text{g C l}^{-1}$ e PTN 0,5 - 100 $\mu\text{g N l}^{-1}$) il metodo attualmente più diffuso si basa su analizzatori elementali CHN. Questo metodo descritto da Gordon (1969) e Kerambrun e Szekielda (1969) è stato successivamente migliorato da Sharp (1974) e Hedges e Stern (1984). Sono stati pubblicati protocolli operativi per l'applicazione in ambiente marino (JGOFS, 1994; Ehrhardt e Koeve, 1999). Un confronto tra le varie metodiche e le problematiche relative alla determinazione del carbonio organico particellato è stato recentemente effettuato da Gardner *et al.* (2003), mentre per l'azoto particellato da Cozzi e Giani (2007).

Gli analizzatori elementali CHN in commercio sono costituiti essenzialmente da: un autocampionatore, una colonna di combustione (reattore), una colonna di riduzione, un sistema di separazione gas-cromatografico o criogenico, un'unità di rilevamento (detector), un sistema computerizzato di controllo dello strumento e di registrazione dei risultati analitici.

Il campione viene posto in una capsula metallica (in genere di alluminio, stagno o argento) ed immerso, mediante l'autocampionatore, nel reattore di combustione mantenuto ad una temperatura compresa tra 970°C e 1050°C. La reazione esotermica di ossidazione delle capsule di metallo utilizzate per introdurre i campioni determina una *flash combustion* che innalza ulteriormente la temperatura fino a circa 1700-1800°C (Pella e Colombo, 1973). In alcuni analizzatori elementali che utilizzano capsule ceramiche per l'introduzione dei campioni la temperatura del reattore di combustione viene mantenuta a temperature comprese tra 1300 e 1500°C. Dalla combustione del campione si ottengono H_2O , CO_2 , N_2 e ossidi di N (NO_x). I gas derivanti dal processo di combustione sono trasportati mediante elio, o più raramente argon, attraverso un catalizzatore, generalmente composto da ossidi di cromo e di cobalto, al fine di rendere completa l'ossidazione di C e N. Nella colonna di riduzione, mantenuta a 640-650°C, costituita da granuli di rame ridotto puro, avviene la riduzione degli ossidi di azoto a N_2 e l'eliminazione dell'eccesso di ossigeno mediante formazione di ossidi di rame. L'acqua che si forma nella combustione viene rimossa usando come adsorbente una trappola contenente magnesio perclorato anidro in forma granulata. I gas prodotti sono separati mediante una colonna gascromatografica e, successivamente, rilevati e quantificati attraverso un rivelatore di conducibilità termica (*Thermal Conductivity Detectors - TCD*).

Attraverso l'analisi elementare si determinano le concentrazioni di carbonio e azoto complessivamente presenti nel campione, senza differenziare la loro origine organica o inorganica. Quindi, il carbonio inorganico eventualmente presente sul filtro viene misurato insieme al carbonio organico. In acqua di mare il C inorganico disciolto è generalmente presente in forma di CO_3^{2-} , HCO_3^- e CO_2 . Queste forme possono precipitare come carbonati durante l'essiccazione del filtro e contribuire in misura variabile alla determinazione del C, in dipendenza dal tipo e grandezza del filtro; es. fino a 2,5-3,0 $\mu\text{g C}$ per i filtri da 24 mm di diametro e 7,0 $\mu\text{g C}$ per filtri da 42,5 mm (Sharp, 1974). Un'altra possibile sorgente di C inorganico è costituita dalla frazione carbonatica nel particellato che può provenire dagli scheletri di organismi marini (es. cocolitoforidi) oppure dai minerali carbonatici veicolati dai fiumi.

Per determinare la frazione organica del C è necessario eliminare la componente inorganica prima dell'analisi, mediante trattamento acido del campione e volatilizzazione della CO_2 prodotta. La frazione inorganica del carbonio particellato si può determinare per differenza fra la concentrazione del C totale particellato (campione senza trattamento acido) e la concentrazione del POC (campione decarbonatato). L'azoto presente nel campione non è influenzato dal trattamento acido e, quindi, l'analisi proposta fornisce la stima del contenuto di N totale. Tuttavia, la frazione inorganica dell'azoto è molto ridotta in gran parte degli ambienti marini, pertanto la concentrazione di azoto particellato totale in pratica è uguale a quella dell'azoto particellato organico. La quantità di N inorganico che si può trovare su un filtro da 24 mm è stata stimata essere inferiore a 0,06 $\mu\text{g N}$ (Sharp, 1974).

9.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

9.3.1 Attrezzatura

- Sistema di campionamento dell'acqua a quote determinate con bottiglie tipo Niskin o GO-FLO in genere posizionate su un carosello (Rosette) o pompa per filtrazioni in situ.
- Bottiglie di campionamento in polietilene di capacità variabile a seconda del volume da filtrare.
- Tubi per il campionamento in silicone o tygon.
- Sistema di filtrazione a vuoto con rampe a più posizioni per filtrazioni in depressione dotate di portafiltri da 25 mm di diametro, di polmone di raccolta del filtrato e di pompa elettrica da vuoto a membrana, centrifuga o peristaltica.
- Filtri da 25 mm di diametro, precombusti a 450°C per 4-5 ore, usualmente in fibra di vetro.
- Pinzette di acciaio inossidabile.
- Capsule portafiltro.
- Stufa per l'essiccazione dei filtri e/o congelatore a -20°C.

9.3.2 Procedura di campionamento

I campioni di POC/PTN sono raccolti a quote standard e/o a quote scelte in base alla struttura termo-alina e ai profili dei parametri ottici (torbidità, trasmittanza, fluorescenza *in situ*) della colonna d'acqua.

Per il campionamento normalmente si utilizzano bottiglie di prelievo tipo Niskin o GO-FLO montate su rosette interfacciata con sonda multiparametrica CTD. Questo sistema consente una chiusura delle bottiglie alla profondità desiderata. Un ulteriore metodo di campionamento è rappresentato dai sistemi *in situ* con pompa sommersa che consente la filtrazione di grandi volumi (100-1000 l). È stata osservata una significativa differenza fra i due sistemi in presenza di basse concentrazioni ($\text{POC} < 5 \mu\text{mol C l}^{-1}$) in quanto il sistema a basso volume con bottiglia di prelievo tende a sovrastimare la concentrazione di POC a causa dell'assorbimento di DOC nel filtro (Moran *et al.*, 1999). Per minimizzare questo errore si raccomanda di filtrare un volume elevato di acqua (Moran *et al.*, 1999; Gardner *et al.*, 2003). In questa sezione sarà descritto esclusivamente il metodo mediante bottiglia di prelievo per la sua ampia diffusione, rimandando alla bibliografia già citata per i particolari relativi alla filtrazioni di grandi volumi.

I campioni d'acqua per la determinazione di POC/PTN sono raccolti dalla bottiglia di prelievo dopo i campioni per le analisi di ossigeno disciolto, CO₂ e di altri parametri idrochimici (DOC, nutrienti, ecc), quindi dopo circa 15-30 min dall'arrivo in superficie del campionatore multiplo (Rosette). Questo intervallo deve essere il più breve possibile poiché la sedimentazione delle particelle sospese potrebbe creare distribuzioni non uniformi all'interno della bottiglia di prelievo (Gardner, 1977). Per ottenere un campione rappresentativo, soprattutto in condizioni particolari (es. durante bloom algali, plume fluviali), può essere indispensabile agitare la bottiglia di prelievo immediatamente prima della raccolta del subcampione da analizzare.

Per il prelievo di acqua dalle bottiglie di campionamento viene utilizzato un tubo in silicone o tygon e bottiglie in polipropilene accuratamente pulite e preventivamente avvinate con una frazione di acqua del campione.

Per le misure di POC/PTN, vengono generalmente filtrati da 1 a 4 l di acqua in relazione alla concentrazione di materiale sospeso stimata. In ambienti con concentrazioni molto elevate di particolato (es. ambienti lagunari od estuarini) il volume si può ridurre a 0,1- 0,5 l mentre in ambienti fortemente oligotrofici questi volumi dovranno essere aumentati a 8 - 10 l.

In presenza di concentrazioni elevate di organismi dello zooplancton o di grosse particelle detritiche può essere effettuata una prefiltrazione del campione mediante retino da 250-300 μm . Tale operazione

si effettua inserendo nel tubo per il prelievo dalle bottiglie di campionamento un sistema di filtrazione *on-line* dotato di retino preventivamente trattato con HCl diluito e lavato con acqua distillata. La prefiltrazione tuttavia può comportare diversi inconvenienti come la perdita di frazioni rappresentative del campione in presenza di aggregati. Risulta quindi generalmente preferibile non effettuare la prefiltrazione ma eliminare manualmente organismi di grandi dimensioni eventualmente presenti sul filtro.

9.3.3 Filtrazione

Immediatamente dopo la raccolta, il campione viene filtrato, avendo cura di evitare contaminazioni esterne. I filtri utilizzati devono necessariamente essere di materiali inorganici privi, per quanto possibile, di ogni contaminazione da C o da N. I filtri maggiormente usati in ambienti marini sono in fibra di vetro da 25 mm di diametro. Questi filtri sono disponibili in varie porosità, ma generalmente si utilizzano filtri con porosità nominale di 0,7 - 1 μm . I filtri più usati sono i Whatman GF/F (porosità 0,7 μm) o GF/C (porosità 1 μm). Una valida alternativa a questi filtri è rappresentata dai filtri Poretics (GF-75), sempre in fibra di vetro e porosità analoghe ma con concentrazioni di C e N nel filtro più basse (Pike e Moran, 1997). Oltre ai filtri in fibra di vetro vengono utilizzati, anche se meno frequentemente, filtri in micro-quarzo, filtri in ossido di alluminio (Altabet, 1990) e filtri a membrana di argento (Gordon e Sutcliffe, 1974).

I filtri vanno preventivamente trattati in muffola a 450°C per 4-5 ore per eliminare le eventuali tracce di composti organici. Trattamenti in muffola a temperature o tempi superiori sono sconsigliati in quanto possono modificare le caratteristiche fisiche dei filtri. I filtri devono essere conservati in capsule di alluminio coperti da fogli di alluminio precombusti per eliminare tracce di materiale organico e mantenuti in ambiente controllato fuori da ogni contaminazione fino al loro utilizzo.

Per le operazioni di filtrazione possono essere utilizzati apparati di diversa tipologia. In presenza di elevati volumi da filtrare e per evitare contaminazioni sono utilizzati sistemi di filtrazione *on line*. Questi sistemi sono costituiti da un portafiltri in linea che si applica da un lato direttamente alla bottiglia di campionamento e dall'altro ad un recipiente di raccolta mantenuto sotto vuoto. I sistemi di filtrazione utilizzati possono essere assemblati con elementi reperibili in commercio secondo le diverse esigenze. Per volumi ridotti, si possono utilizzare sistemi di filtrazione integrati completi di recipiente di carico, di portafiltra e beuta di raccolta. In tutti i casi, il volume filtrato deve essere misurato con accuratezza.

La filtrazione del campione deve avvenire sotto vuoto moderato <80-100 mm Hg (Taguchi e Laws, 1988; Stockner *et al.*, 1990), per evitare la possibile rottura delle cellule del plancton con la conseguente fuoriuscita di protoplasma e/o la rottura del filtro in presenza di valori più elevati di vuoto.

Il risciacquo del filtro con acqua distillata, dopo la filtrazione, per rimuovere le sostanze contenenti carbonio (DOC, carbonati) non è consigliato in quanto è stata dimostrata la parziale perdita di campione durante questa operazione (Hurd e Spencer, 1991). Alla fine della filtrazione il filtro viene parzialmente essiccato mantenendo il vuoto per circa 30 sec. Per stimare l'entità del bianco del filtro e per controllare l'assenza di contaminazione nella procedura di pretrattamento del campione, ogni 5-10 campioni si prepara un bianco procedurale, cioè un filtro risciacquato con acqua di mare filtrata e poi trattato e conservato come un normale campione.

9.3.4 Conservazione dei campioni

Dopo la filtrazione, i campioni vengono riposti in capsule portafiltra pulite (capsule Petri). Se possibile, vengono essiccati in stufa a bassa temperatura (40-60°C) e conservati chiusi in essiccatore. In alternativa, vengono posti immediatamente a -20°C ed essiccati prima dell'analisi (Lorrain *et al.*, 2003). Non sono state osservate differenze significative nei due metodi di conservazione dei filtri per un periodo di tempo fino a 100 giorni (Zimmermann *et al.*, 1997). Come regola generale, i campioni devono essere maneggiati il meno possibile durante le varie operazioni.

9.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

9.4.1 Attrezzatura

- Analizzatore elementale CHN.
- Elettrobilancia analitica con risoluzione a 1 µg al minimo valore di fondo scala (1-2 mg).
- Muffola.
- Stufa per l'essiccamento dei filtri.
- Fogli di stagno circolari da 30 mm di diametro o capsule per analisi elementare.
- Pinzette in acciaio.
- Pressa per incapsulare i filtri nei dischi di stagno (opzionale).

9.4.2 Prodotti chimici

- Acido cloridrico HCl concentrato, grado reagente.
- Acqua ultrapura da laboratorio.
- Standard per microanalisi certificato.
- Catalizzatori per l'ossidazione e riduzione ed altri prodotti indicati nei manuali d'uso degli analizzatori elementali.
- Elio (o altro gas inerte) e Ossigeno ad elevato grado di purezza.

9.4.3 Procedure analitiche

9.4.3.1 Trattamento dei campioni e decarbonatazione

In laboratorio dopo scongelamento ed essiccazione dei campioni (a 40-60 °C per due ore), il filtro è sottoposto ad un trattamento con acido per l'eliminazione del carbonio inorganico che può avvenire secondo due diverse procedure:

- Eliminazione del C inorganico mediante esposizione in essiccatore a vapori di acido cloridrico per 12 ore a temperatura ambiente (Hedges e Stern, 1984). I filtri, collocati su vial o capsule, preventivamente trattate con acido e precombuste a 450° per 2 ore, sono posti per circa 12 ore all'interno di un essiccatore mantenuto saturo di vapori ottenuti ponendo un contenitore aperto con HCl concentrato, grado reagente, nel compartimento inferiore dell'essiccatore. Dopo questo trattamento i filtri sono nuovamente essiccati. Questo metodo è adatto per campioni contenenti una quantità di carbonati superiore al 50% del peso secco. Il metodo di acidificazione per esposizione ai vapori acidi ha lo svantaggio principale di poter causare una contaminazione dei campioni evidenziata da valori del bianco elevati (Ryba e Burgess, 2002).
- Trattamento del filtro con alcune gocce di HCl al 25% (Niewwenhuize *et al.*, 1994) o 1N (Lorrain *et al.*, 2003), seguito da una ulteriore essiccazione dei campioni sempre a 50°C. Questo ultimo trattamento sembra garantire valori di filtri bianco più bassi. Lo svantaggio principale del trattamento di acidificazione diretta, è rappresentato da una possibile perdita di azoto nei campioni di particellato sospeso, in relazione al tipo di acido utilizzato e alla sua concentrazione (Cutter e Radford-Knoery, 1991; King *et al.*, 1998; Lohse *et al.*, 2000; Ryba e Burgess, 2002; Lorrain *et al.*, 2003).

Durante il trattamento acido vi è la trasformazione dei carbonati di calcio in altri composti (ad es. in presenza di HCl si formano cloruri di calcio), questo determina una variazione nel peso dei campioni

durante la decarbonatazione, con conseguenti errori nelle pesate di eventuali subaliquote effettuate dopo il trattamento.

I filtri bianco vengono trattati allo stesso modo dei filtri-campioni.

Dopo l'acidificazione, i filtri sono collocati in dischi o capsule di stagno, precedentemente lavati con esano grado reagente e quindi opportunamente impaccati al fine di ottenere dimensioni ridotte del campione necessarie per l'immissione nello strumento. Questa operazione può essere effettuata manualmente mediante pinzette anche se richiede una certa dose di abilità e di pratica, o agevolata da una piccola pressa che si può reperire in commercio.

9.4.3.2 Analisi strumentale

Il C e N contenuti nel filtro sono determinati mediante un analizzatore elementare CHN. Diversi strumenti con caratteristiche adeguate sono reperibili in commercio, quindi per le corrette procedure analitiche è necessario fare riferimento alle specifiche tecniche della ditta costruttrice. Le operazioni di manutenzione ordinaria e straordinaria dello strumento di analisi sono definite nei manuali delle ditte produttrici. In generale, gli interventi per la manutenzione ordinaria dello strumento riguardano la sostituzione del raccogliatore di resti incombusti di capsule, dischi e filtri, e la sostituzione delle colonne di combustione e di riduzione. La frequenza di questi interventi dipendono dalla tipologia dei campioni e l'esaurimento delle colonne è correlato alla concentrazione di C e N nei campioni analizzati. Le operazioni di manutenzione ordinaria vengono di norma effettuate dall'operatore seguendo le indicazioni specifiche descritte nel manuale dello strumento. Per quanto riguarda la manutenzione straordinaria, si suggerisce una revisione annuale dello strumento da parte dei tecnici della ditta produttrice.

Il range di misura di un analizzatore elementare è tipicamente compreso tra 0,001–3,6 mg C e 0,001–6,0 mg N con una precisione del $\pm 0,2$ %. A seconda dello strumento utilizzato il tempo necessario per un'analisi è compreso tra 4 e 6 min.

Ogni giorno, prima di analizzare i campioni, devono essere effettuate le procedure di calibrazione e di standardizzazione dello strumento di misura. Per la calibrazione, vengono effettuate una serie di repliche di analisi senza campioni per la verifica del bianco strumentale fino alla costanza dei valori per almeno 3-5 repliche. Di seguito viene effettuata la standardizzazione mediante analisi di un materiale di riferimento per microanalisi con concentrazione elementare di C, N e H certificata. In Tab. 1 sono riportati alcuni standard usati nell'analisi elementare con la loro composizione chimica, espressa come frazione percentuale. Uno standard con caratteristiche adeguate per le analisi elementari è rappresentato dall'Acetanilide ($\text{CH}_3\text{CONHC}_6\text{H}_5$) - Standard Reference Material per microanalisi del NIST – National Institute of Standards and Technology del Department of Commerce (US).

Tab. 1 - Standard per microanalisi e loro composizione chimica percentuale.

Standard	N%	C%	H%	S%	O%
Acetanilide	10,36	71,09	6,71	-	11,84
Atropine	4,84	70,56	8,01	-	16,59
BBOT 2,5 bis (5-ter-butyl-benzoxazol-2-yl) thiophene	6,51	72,53	6,09	7,44	7,43
Cyclohexanone 2,4-dinitrophenylhydrazone	20,14	51,79	5,07	-	23,00
Nicotinamide	22,94	59,01	4,95	-	13,10
Sulphanilamide	16,27	41,84	4,68	18,62	18,58

Per la standardizzazione vengono effettuate almeno tre analisi dello standard intervallate da un'analisi senza campione ciascuna. Gli standard sono pesati in capsule di stagno lavate con esano, la pesata è effettuata con bilancia analitica con risoluzione di 1 µg. Usando come standard l'Acetanilide, approssimativamente si utilizza una quantità di standard compresa tra 0,3 e 0,8 mg. Si consiglia di utilizzare una quantità di standard con concentrazioni di C e N prossime a quelle previste per i campioni, tenendo presente che ad alte concentrazioni la risposta dei rivelatori a termocoducibilità può deviare dalla linearità. I valori ottenuti dall'analisi dello standard vengono mediati e rappresentano i valori di riferimento per le analisi dei campioni.

È particolarmente utile durante una sessione giornaliera di lavoro, analizzare ad intervalli regolari standard primari o standard di laboratorio, rappresentato da un campione di sedimento ben omogeneizzato con concentrazione nota di carbonio ed azoto, per avere un costante controllo di qualità e ottenere utili indicazioni sulle variazioni delle performance strumentali (variazione nell'efficienza della combustione o riduzione).

Una volta effettuata la calibrazione e standardizzazione dello strumento è possibile iniziare l'analisi dei campioni. La sequenza di analisi prevede l'esecuzione di 5 campioni seguiti da un bianco del filtro e da un bianco strumentale per il controllo dello stato dell'analizzatore. I segnali dei rivelatori sono generalmente raccolti e registrati in un sistema informatico computerizzato.

Il bianco strumentale viene sottratto ai valori relativi di tutte le analisi; questa correzione è generalmente effettuata direttamente dal programma di utilizzo dello strumento. Il bianco del filtro o procedurale dipende da molti fattori (ad es. il tipo di filtro, il trattamento, ecc). I valori di bianco del filtro sono tipicamente molto bassi per l'azoto (inferiori a 1 µg N), mentre per il C possono raggiungere i 10 µg C. La media del contenuto in C e N dei filtri bianchi viene sottratta ai valori misurati sui campioni. Quindi, i valori di C e N in peso, determinati nelle analisi e corretti per il bianco strumentale, vengono espressi in concentrazione di C e N in massa su volume, calcolata come:

$$C = (S - B) / V$$

dove:

C = concentrazione in µg C l⁻¹ e µg N l⁻¹

S = risultato per il filtro campione in µg C o µg N

B = bianco del filtro in µg C o µg N

V = volume filtrato (litri)

Le concentrazioni di POC e PTN sono espresse in µg l⁻¹ o in µmol l⁻¹, il rapporto C/N è espresso generalmente in rapporto molare. La conversione fra le unità di misura è la seguente:

$$\mu\text{mol C l}^{-1} = \frac{\mu\text{g C l}^{-1}}{12,0107}$$

$$\mu\text{mol N l}^{-1} = \frac{\mu\text{g N l}^{-1}}{14,0067}$$

9.4.3.3 Raccomandazioni e possibili problemi

È da evitare ogni contaminazione dei filtri, dei vari contenitori ed è necessario utilizzare reattivi puri.

Bisogna impiegare particolare attenzione nella standardizzazione dello strumento e nella verifica funzionale durante le analisi.

Pur essendo provvisto di autocampionatore, si raccomanda di controllare con continuità l'analizzatore durante le analisi, sia per possibili malfunzionamento dello stesso, sia per possibili derive della risposta strumentale.

In presenza di campioni con elevate concentrazioni di C e N è preferibile alternare una o più analisi a vuoto tra i campioni per evitare l'eventuale effetto memoria nell'analisi successiva. Questo può avvenire con maggiore probabilità nelle analisi di biomassa fitoplanctonica ma soprattutto zooplanctonica. In questo ultimo caso si deve prestare particolare attenzione anche a non superare i limiti di rilevabilità del C.

9.5 BIBLIOGRAFIA

- ALTABET M.A. (1990) - Organic C, N, and stable isotopic composition of particulate matter collected on glass-fiber and aluminium oxide filters. *Limnol. Oceanogr.*, **35**: 902-909.
- COZZI S., GIANI M. (2007) - Determination of organic nitrogen and urea. In: Nollet L. (ed.), *Handbook of Water Analysis*, CRC Press, Boca Raton Fl.: 367-392.
- CUTTER G.A., RADFORD-KNOERY J. (1991) - Determination of carbon, nitrogen, sulfur and inorganic sulfur species in marine particles. In: Hurd D.C., Spencer D.W. (eds.), *Marine particles: analysis and characterization. Geophysical Monograph: 63*. American Geophysical Union, Washington DC: 57-63.
- EHRHARDT M., KOEVE W. (1999) - Determination of particulate organic carbon and nitrogen. In: Grasshoff K., Kremling K., Ehrhardt M. (eds), *Methods of seawater analysis. Third Edition*. Wiley VCH, Weinheim: 437-444.
- GARDNER W.D. (1977) - Incomplete extraction of rapid settling particles from water samplers. *Limnol. Oceanogr.*, **22**: 764-768.
- GARDNER W.D., RICHARDSON M.J., CARLSON C.A., HANSELL D., MISHONOV A.V. (2003) - Determining true particulate organic carbon: bottles, pumps and methodologies. *Deep Sea Res.*, **50**: 655-674.
- GORDON D.C. Jr. (1969) - Examination of methods of particulate organic carbon analysis. *Deep Sea Res.*, **16**: 661-665.
- GORDON D.C. JR., SUTCLIFFE W.H. JR. (1974) - Filtration of seawater using silver filters for particulate nitrogen and carbon analysis. *Limnol. Oceanogr.*, **19**: 989-993.
- HEDGES J.I., STERN J.H. (1984) - Carbon and nitrogen determination of carbonate-containing solids. *Limnol. Oceanogr.*, **29**: 657-663.
- HURD D.C., SPENCER D.W. (1991) - *Marine Particles: Analysis and Characterization. Geophysical Monograph: 63*, American Geophysical Union, Washington DC: 472 pp.
- JGOFS (1994) - Report Nr. 19, Protocols, Chapter 15. Determination of Particulate Organic Carbon and Particulate Nitrogen. http://usjgofs.whoi.edu/protocols_rpt_19.html, 123-125.
- KERAMBRUN P., SZEKIELDA K.H. (1969) - Composition élémentaire (C, H, N) de *Sphaeroma serratum* et *S. hookeri* (Crustacea: Isopoda). *Mar. Biol.*, **4**: 352-356.
- KING P., KENNEDY H., NEWTON P.P., JICKELLS T. D., BRAND T., CALVERT S., CAUWET G., ETCHEBER H., HEAD B., KHRIPOUNOFF A., MANIGHETTI B., MIQUEL J.C. (1998) - Analysis of total organic carbon and total nitrogen in settling oceanic particles and a marine sediment: an interlaboratory comparison. *Mar. Chem.*, **60**: 203-216.
- LOHSE L., KLOOSTERHUIS R.T., DE STIGTER H.C., HELDER W., VAN RAAPHORST W., VAN WEERING T.C.E. (2000) - Carbonate removal by acidification causes loss of nitrogenous compounds in continental margin sediments. *Mar. Chem.*, **69**: 193-201.
- LORRAIN A., SAVOYE N., CHAUVAUD L., PAULET Y-M., NAULET N. (2003) - Decarbonation ad preservation method for the analysis of organic C and N contents and stable isotope ratios of low-carbonated suspended particulate material. *Anal. Chim. Acta*, **491**: 125-133.
- MENZEL D.W., VACCARO R.F. (1964) - The measurement of dissolved organic and particulate carbon in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, **9**: 138-142.
- MORAN S.B., CHARETTE M.A., PIKE S.M., WICKLUND C.A. (1999) - Differences in seawater particulate organic carbon concentration in samples collected using small- and large-volume methods: the importance of DOC adsorption to the filter blank. *Mar. Chem.*, **67**: 33-42.
- NIEUWENHUIZE J., MAAS Y.E.M., MIDDELBURG J.J. (1994) - Rapid analysis of organic carbon and nitrogen in particulate materials. *Mar. Chem.*, **45**: 217-224.
- PELLA E., COLOMBO B. (1973) - Study of carbon, hydrogen and nitrogen determination by combustion-gas chromatography. *Mikrochimica Acta*, **61**: 697-719.
- PIKE S. M., MORAN S.B. (1997) - Use of Poretics[®] 0.7 µm pore size glass fiber filters for determination of par-

-
- ticulate organic carbon and nitrogen in seawater and freshwater. *Mar. Chem.*, **57**: 355-360.
- RAIMBAULT P., SLAWYK G. (1991) - A semiautomatic, wet-oxidation method for the determination of particulate organic nitrogen collected on filters. *Limnol. Oceanogr.*, **36**: 405-408.
- RYBA S.A., BURGESS R.M. (2002) - Effects of sample preparation on the measurement of organic carbon, hydrogen, nitrogen, sulfur, and oxygen concentrations in marine sediments. *Chemosphere*, **48**: 139-147.
- SHARP J. H. (1974) - Improved analysis for "particulate" organic carbon and nitrogen from seawater. *Limnol. Oceanogr.*, **19**: 984-989.
- STOCKNER J.G., KLUT M.E., COCHLAN W.P. (1990) - Leaky filters: a warning to aquatic Ecologists. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **47**: 16-23.
- STRICKLAND J.D. H., PARSONS T.R. (1972) - A practical manual of sea water analysis. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **167**: 310 pp.
- TAGUCHI S., LAWS E.A. (1988) - On the microparticles which pass through glass fiber filter type GF/F in coastal and open waters. *J. Plankton Res.*, **10**: 999-1008.
- ZIMMERMANN C.F., KEEFE C.W., BASHE J. (1997) - *Determination of carbon and nitrogen in sediments and particulates of estuarine/coastal waters using elemental analysis - Method 440.0*. National Exposure Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency: 10 pp. www.epa.gov/nerlcwww/m440_0.pdf.

CAPITOLO 10. MICRONUTRIENTI (FRAZIONE BIODISPONIBILE DI FERRO E RAME)

P. Rivaro, M. L. Abemoschi, R. Frache

rivaro@chimica.unige.it

10.1 INTRODUZIONE

Gli elementi presenti in acqua di mare con concentrazioni inferiori a 50 μM sono definiti elementi minori o in tracce. A seconda della funzione assunta nei processi biologici, vengono distinti in metalli essenziali (ad esempio Fe, Cu, Mn, Se, Mo) e non essenziali (Hg, Cd). I metalli essenziali sono detti anche micronutrienti e di fatto, nonostante il modesto fabbisogno da parte dell'organismo, sono fondamentali in diversi processi, quali la fotosintesi, la glicolisi e il metabolismo delle proteine (Libes, 1992; Falkowski *et al.*, 1998).

La biodisponibilità dei metalli (ovvero la facilità di assunzione da parte degli organismi) dipende fortemente dalla loro speciazione, cioè dalla forma chimica con cui si trovano in acqua, che a sua volta dipende da diverse variabili, alcune riguardanti l'elemento stesso (configurazione elettronica e concentrazione) e altre peculiari dell'ambiente marino (pH, potenziale redox, temperatura, quantità e tipo di liganti inorganici e organici, interazioni all'interfaccia aria-acqua o acqua-sedimento o acqua-particellato) (Muller *et al.*, 2003).

La determinazione di Fe e Cu in acqua di mare è un problema analitico molto complesso a causa delle basse concentrazioni dei metalli e della presenza della matrice salina, che può causare forti interferenze nelle misure strumentali. I limiti di rivelabilità delle tecniche spettroscopiche impiegate per l'analisi di metalli in tracce richiedono una preconcentrazione del campione, generalmente ottenuta mediante l'impiego di resine chelanti, estrazione con solventi o precipitazione.

L'impiego di resine chelanti, rispetto agli altri metodi di preconcentrazione, offre il vantaggio di fornire informazioni utili anche per uno studio della speciazione del metallo in esame, poiché le resine chelano la sua frazione libera e quella debolmente complessata, vale a dire le sue forme più biodisponibili (Pesaento *et al.*, 1993; Biesuz *et al.*, 2006). Questo dato associato al contenuto totale di elementi in tracce è molto utile nell'interpretazione dei processi che regolano il bloom fitoplanctonico, o lo sviluppo di un particolare popolamento algale (Hutchins *et al.*, 1998; 1999).

10.2 PRINCIPIO DEL METODO

Le tecniche di preconcentrazione su fase solida (resine chelanti) sono utilizzate per l'analisi di metalli in tracce in acqua di mare sia in "batch off-line" sia "on-line" grazie a opportuni sistemi di analisi ad iniezione in flusso, noti con l'acronimo inglese FIA (Flow Injection Analysis). Il FIA è preferibile al sistema in "batch off-line", poiché richiede minore manipolazione della resina e tempi più brevi di lavaggio, riducendo il rischio di contaminazione del campione. Le fasi solide sono costituite da una parte chimicamente inerte (reticolo polimerico a base di vinil e divinil benzene) che conferisce rigidità e stabilità meccanica alla fase, su cui sono legati chimicamente gruppi funzionali imminodiacetici che rappresentano i siti attivi. La selettività spiccata di tali gruppi nei confronti dei metalli di transizione è dovuta alla formazione di un legame di coordinazione tra la coppia elettronica dell'azoto e gli orbitali d vuoti dei metalli. Tuttavia, l'impiego di una resina imminodiacetica non rimuove completamente l'effetto della matrice salina a causa di una sua certa affinità per Na^+ , K^+ e soprattutto per Ca^{2+} e Mg^{2+} . La coeluizione di questi elementi maggiori contemporaneamente agli analiti di interesse costituisce una potenziale interferenza nella successiva determinazione strumentale mediante tecniche spettroscopiche quali

assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica del campione (ETA-AAS). Diversi approcci sono impiegabili per ridurre il problema delle interferenze basati sul tipo di calibrazione strumentale, sull'impiego di modificatori di matrice o sull'eliminazione della matrice mediante eluizione selettiva degli elementi maggiori (Grotti *et al.*, 2000; 2001; 2002).

Nell'ottimizzazione del metodo di preconcentrazione di metalli con resine chelanti devono essere considerati diversi parametri quali: quantità, tipo e forma di resina; volume di campione, velocità del flusso e volume di pre-eluzione e di eluizione.

Particolare attenzione deve essere dedicata alla determinazione del bianco della procedura per ridurre i detection limits strumentali, fondamentale requisito per la determinazione di elementi quali il Ferro in campioni di acqua di mare di altura.

Infine, per quanto riguarda la determinazione strumentale, l'ETA-AAS ha rappresentato una delle tecniche analitiche maggiormente utilizzate per la determinazione di elementi a livello di concentrazioni del $\mu\text{g l}^{-1}$. Recentemente si preferisce impiegare la spettrometria simultanea di emissione atomica (ICP-AES), di analoga sensibilità, ma più veloce e versatile.

10.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

10.3.1 Attrezzatura

- Tubo in gomma trasparente da collegare alle bottiglie di campionamento.
- Bottiglie da 1 o 2 l in polietilene (Nalgene®) opportunamente lavate e conservate come suggerito nel paragrafo Raccomandazioni:
- Filtri in policarbonato porosità nominale 0,45 μM (Millipore®) pre-pesati e pre-lavati.
- Apparato per la filtrazione del campione.
- Congelatore a -20°C .

10.3.2 Procedura di campionamento

- Sciacquare i contenitori con acqua Milli-Q al momento dell'uso e normalizzarli con aliquote del campione di acqua di mare.
- Spillare dalle bottiglie di campionamento 2 l di campione.
- Filtrare i campioni d'acqua raccogliendo direttamente in bottiglie di polietilene il campione di acqua filtrato.
- Congelare i campioni di acqua a -20°C .

10.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

10.4.1 Attrezzatura

- Micro colonne riempite con 200 mg di resina supportata su di un letto di volume complessivo di 1,5 ml IC-Chelate, Alltech, Deerfield, IL, USA.
- Pompa peristaltica a 16 canali Watson-Marlow pump 205-S.
- Tubi pompa tygon (Watson-Marlow \O mm 0,88 arancio/arancio).
- Cappa a flusso laminare.

- Bottiglie di polietilene lavate secondo la procedura riportata nelle Raccomandazioni.
- Provette tipo Falcon da 15 ml.
- Vetreria da laboratorio lavata secondo la procedura riportata nelle Raccomandazioni.

10.4.2 Prodotti chimici

- Soluzioni standard Cu, Fe, Lu 1000 mg l⁻¹ per AA/ICP calibration (Sigma-Aldrich).
- Acido nitrico 65% grado di purezza Suprapur (VWR).
- Sodio carbonato grado di purezza Suprapur (VWR).
- Acido acetico glaciale grado di purezza Ultrapur (Sigma-Aldrich).
- Ammoniaca 25%, grado di purezza Ultrapur (Sigma-Aldrich).
- Acido nitrico 65% grado di purezza Ultrapur (Sigma-Aldrich).
- Acqua MQ di grado Ultrapuro (Millipore).

10.4.3 Materiali di riferimento standard certificati (CRMs)

Un materiale di riferimento certificato (CRM) è un materiale o sostanza per il quale una o più delle sue proprietà sono note e certificate tramite procedure tecnicamente valide ed è accompagnato dalla relativa documentazione di queste caratteristiche emessa da un Ente Certificante. I CRMs possono essere impiegati per diverse ragioni, tra cui la calibrazione delle apparecchiature, la validazione e il confronto di metodiche e la valutazione dell'accuratezza di un metodo.

I CRMs scelti per il nostro scopo sono campioni di acque naturali, opportunamente prelevati e sub-campionati in condizioni di contaminazione controllata, il cui contenuto in metalli è stato accuratamente determinato in diversi laboratori internazionali mediante tecniche analitiche indipendenti. A seconda dei valori di salinità dei campioni e degli intervalli di concentrazione dei metalli possono essere impiegati i seguenti CRM, distribuiti dal National Research Council Canada:

1. NASS-5 (Acqua di mare oceanica).
2. CASS-3 (Acqua di mare costiera).
3. SLEW-3 (Acqua di estuario).
4. SLRS-1 (Acqua di fiume).
5. SLRS-3 (Acqua di fiume).

In Tab.1 sono riportati i valori certificati per Cu e Fe nei CRMs citati.

Tab. 1 – Valori certificati di Cu e Fe in diversi CRMs.

CRM	Salinità	Cu (µg l ⁻¹)	Fe (µg l ⁻¹)
NASS-5	30,4	0,297 ± 0,046	0,207 ± 0,035
CASS-4	30,7	0,592 ± 0,055	0,713 ± 0,058
SLEW-3	15,0	1,55 ± 0,12	0,586 ± 0,059
SLRS-1		3,58 ± 0,30	31,5 ± 2,1
SLRS-3		1,35 ± 0,07	103 ± 5

10.4.4 Preparazione delle soluzioni

Le soluzioni per il trattamento delle resine vanno preparate al momento e direttamente in contenitori in polietilene precedentemente lavati. Questa procedura va eseguita con particolare cura, utilizzando tutti gli accorgimenti per limitare al massimo le contaminazioni (utilizzo di reattivi ultrapuri e relativa manipolazione sotto cappa a flusso laminare, utilizzo guanti in polietilene etc..)

Soluzione tampone di ammonio acetato 1 M:

Miscelare 38,5 ml di NH_3 grado ultrapur al 25% con 29,5 ml di CH_3COOH glaciale grado *ultrapur* in bottiglia di PE da 500 ml. Controllare il pH e portarlo a 5,5 mediante aggiunte goccia a goccia di NH_3 o CH_3COOH concentrati *ultrapur*. Portare a volume finale con acqua MQ.

Soluzione di acido nitrico 1 M:

35 ml di acido concentrato, grado di purezza ultra o suprapur in bottiglie di PE da 500 ml portati a volume con acqua MQ.

10.4.5 Preparazione della resina

La resina è fornita commercialmente in forma Na^+ e richiede un pretrattamento tale da garantire la minore contaminazione possibile. Prima di ogni analisi, la resina impaccata nelle colonne e i tubi della pompa peristaltica che trasportano i campioni devono quindi essere lavati e testati.

I lavaggi vengono effettuati con soluzioni acide che portano la resina in forma H^+ e hanno lo scopo di eliminare le impurezze presenti con particolare riguardo ai metalli in tracce, i cui livelli di concentrazione sono non trascurabili nei reattivi utilizzati.

Durante le operazioni di lavaggio delle colonne così come nelle operazioni di pre concentrazione e di eluizione viene mantenuta una velocità di flusso pari a 2 ml min^{-1} ottenuta utilizzando i tubi indicati e impostando la velocità della pompa a 56 rpm.

Il flusso per ogni tubo è costante nel tempo, ma possono esserci piccole differenze tra un tubo e l'altro. Si possono uniformare i volumi calcolando precisamente il tempo di percolamento del liquido attraverso la resina per tutti i tubi. In questo modo il rapporto tra volume di campione passato attraverso la colonna e volume di eluato finale è costante per tutti i tubi; questo rapporto rappresenta il valore del fattore di preconcentrazione a cui è stato sottoposto il campione.

Il tempo di inizio viene registrato con l'ausilio di un timer dal momento in cui le colonnine iniziano a gocciolare, dopo aver svuotato i tubi dalla precedente soluzione. Alternativamente il fattore può essere calcolato attraverso il rapporto tra la quantità di campione fluiva attraverso la resina e la quantità di eluato raccolta, determinati per pesata. In questo caso è necessario tenere conto della densità dei campioni reali.

Il primo lavaggio dei tubi e delle colonnine viene effettuato impiegando una soluzione 1M di HNO_3 grado di purezza *suprapur*, facendo fluire 240 ml di soluzione acida per ogni colonna (tempo richiesto circa 120 min).

Un secondo lavaggio viene effettuato utilizzando 40 ml di una soluzione 1M di HNO_3 grado ultrapur subito prima dell'utilizzo delle colonne (tempo richiesto 20 min).

L'efficienza di questa procedura di lavaggio della resina va testata di volta in volta in quanto essa dipende da fattori variabili (stato di conservazione/pulizia/utilizzo/ della resina e di tutti i tubi di connessione), per cui occorre sempre verificare il livello di "bianco reattivo" mediante determinazione strumentale dei livelli di metalli in tracce, sia degli acidi di lavaggio utilizzati sia dell'eluato raccolto dopo il lavaggio stesso.

10.4.6 Preparazione del campione

Scongelare a temperatura ambiente i campioni di acqua di mare.

Tutte le operazioni di preparazione e di trattamento del campione devono essere condotte sotto cappa

a flusso laminare. Gli standard certificati commerciali sono conservati a pH 2: è necessario quindi neutralizzare l'acidità con carbonato di sodio per portare il pH a valori ottimali per la chelazione (~ 6,5).

Allo scopo aggiungere 180 mg di carbonato di sodio ogni 100 ml di acqua nel caso di CRM CASS-3 e NASS-5; 140 mg ogni 100 ml di acqua nel caso di CRM SLEW-3, SLRS-1 e SLRS-3.

Controllare il pH su un'aliquota di campione dopo la dissoluzione totale del carbonato.

I campioni di acqua di mare, il cui pH è mantenuto a circa 8,0 da un sistema tampone naturale, non necessitano di trattamenti di neutralizzazione.

10.4.7 Procedura di pre concentrazione del campione e del CRM

La resina viene utilizzata in forma ammonio a un pH che permette lo scambio tra ioni NH_4^+ e il metallo in soluzione. La forma NH_4^+ permette l'impiego della resina anche su campioni di acqua naturale prive di proprietà tamponanti (per esempio acque estuarine, campioni di ghiaccio marino o di neve) garantendo comunque un pH di lavoro ottimale per la chelazione.

Per la sostituzione sui gruppi funzionali degli ioni H^+ con ioni NH_4^+ occorre impiegare tampone ammonio acetato 1M grado *ultrapur* pH compreso tra 5 e 5,5. Circa 10 ml di tampone sono fatti fluire attraverso ciascuna colonna (tempo occorrente 5 min). La resina è così pronta per la pre concentrazione di metalli presenti in acque naturali.

Il campione viene pre concentrato sulla resina aspirandolo direttamente dalle bottiglie con una velocità di flusso pari a 2 ml min^{-1} .

Il volume di campione che viene pre concentrato dipende dalla quantità di resina impaccata nelle colonne e può variare tra 300 e 500 ml in funzione degli intervalli di concentrazione dei metalli attesi e della quantità di campione disponibile. Ad esempio, nel caso di campioni di acque antartiche sia costiere che di altura sono necessari circa 500 ml di campione. Se il CRM impiegato per la valutazione dell'accuratezza è la NASS-5, date le sue concentrazioni relativamente più elevate, è sufficiente pre concentrarne circa 300 ml per ricadere negli intervalli di concentrazione richiesti dal metodo.

10.4.8 Stadio di pre-eluzione

La fase di preconcentrazione è seguita da uno stadio di pre-eluzione.

Questo passaggio ha lo scopo di rimuovere ioni Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , costituenti maggiori dell'acqua di mare, per i quali i gruppi funzionali della resina imminodiacetica presentano una certa affinità. La loro co-eluzione agli analiti costituisce una potenziale interferenza nella successiva determinazione strumentale mediante tecniche spettroscopiche. Lo stadio di pre eluzione è significativamente condizionato dal pH della soluzione tampone impiegata; a $\text{pH} < 5$ vengono eluiti gli elementi di transizione, mentre a $\text{pH} > 5$ i metalli di transizione sono trattenuti dalla resina e Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} vengono recuperati quantitativamente.

Oltre al valore del pH è importante anche il volume di tampone impiegato che deve consentire di eliminare la matrice salina senza perdere degli analiti di interesse.

Per la pre-eluzione si impiega una soluzione di ammonio acetato grado *ultrapur* 1M tamponata a pH 5,5. Aliquote di 30 ml di tampone vengono fatti fluire attraverso le micro colonne con una velocità di flusso pari a 2 ml min^{-1} . Tale volume garantisce la rimozione selettiva degli elementi maggiori, senza causare perdite di Cu e Fe.

10.4.9 Stadio di eluzione

Per l'eluzione dei metalli in tracce pre concentrati sulla resina, si utilizza una soluzione 1M di HNO_3 di grado di purezza *ultrapur* 1M con pH inferiore a 2,0.

Il volume di eluizione necessario per il recupero quantitativo di tutti gli analiti chelati dalla resina è funzione della sua quantità: per 200 mg di resina l'acido deve fluire per 1,5 min.

10.4.10 Controllo del bianco della procedura

Prima di procedere alla pre concentrazione dei metalli in tracce da campioni di acqua di mare, occorre valutare il bianco della procedura analitica, con cui sono determinati il contributo dato alla concentrazione dei metalli da parte dei reattivi e della resina, quest'ultimo dipendente dalla bontà della procedura di lavaggio.

Il contributo dei reattivi (acido nitrico e tampone acetato) viene determinato mediante analisi diretta dei reagenti. Il contributo delle resine viene valutato lasciando fluire attraverso le colonne HNO₃ 1 M ultrapur per almeno 20 min, e, a seguire, tampone ammonio acetato per 20 min. Dopo aver svuotato i tubi si eluisce con HNO₃ ultrapur 1M, lasciandolo fluire attraverso la colonna per 1,5 min. L'eluato è raccolto in provette tipo falcon da 15 ml e mantenuto a 4°C sino alla lettura strumentale.

In questo modo si può valutare indipendentemente il contributo della resina e dei reagenti che entrano a contatto con la resina stessa, ovvero valutare i limiti di rilevabilità dell'intera procedura analitica, che dipendono significativamente dalla possibilità di mantenere un livello di contaminazione minimo e il più costante possibile, viste le bassissime concentrazioni degli analiti nei campioni considerati.

Il bianco della procedura deve essere determinato anche durante ogni analisi, contestualmente ai campioni, e i valori ottenuti devono essere sottratti alle concentrazioni dei campioni di acqua.

10.5 DETERMINAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI FE E CU MEDIANTE ICP-AES

La spettrometria di emissione atomica con sorgente al plasma induttivo (ICP-AES) è oggi considerata una tecnica strumentale collaudata per una rapida analisi simultanea di elementi in campioni allo stato liquido.

In analisi in emissione atomica la riproducibilità delle misure è legata soprattutto alla stabilità della sorgente a plasma. Questo aspetto può essere controllato attraverso l'utilizzo di uno standard interno, cioè di un elemento che non è presente nella matrice in esame e che viene aggiunto con la stessa concentrazione sia alle soluzioni di calibrazione strumentale che ai campioni da analizzare.

In questo modo è possibile effettuare una correzione dei segnali di emissione atomica alle lunghezze d'onda scelte per l'analisi di Fe e Cu, in funzione delle variazioni di segnale dello standard interno dovute a vari fattori (stabilità del plasma, efficienza del trasporto del nebulizzato, presenza di elementi maggiori ad alte concentrazioni, differente acidità/densità dei campioni, ecc.). L'elemento impiegato come standard interno è Lutezio (Lu), che può essere aggiunto "on-line" nella linea di aspirazione del campione verso il sistema di nebulizzazione dell'ICP-AES mediante un raccordo a "T".

La soluzione di Lu ha concentrazione 4 ppm e viene preparata per diluizione dalla soluzione madre commerciale (concentrazione 1000 ppm) in HNO₃ 1%.

10.5.1 Calibrazione strumentale

Si consiglia di preparare uno standard madre multielementare e per diluizioni successive una curva di lavoro esterna.

La preparazione dello standard madre viene effettuata utilizzando standard commerciali mono-elementari a concentrazione 1000 ppm, diluiti a 5 ppm in acqua Milli-Q in un matraccio tarato da 100 ml. La soluzione standard madre deve essere immediatamente trasferita in un contenitore in polietilene sul quale verrà indicata la data di preparazione. La conservazione a 4°C ne garantisce la stabilità per diversi mesi.

Le soluzioni di calibrazione si preparano e si portano al volume finale direttamente in provette tipo falcon da 15 ml utilizzando la taratura delle stesse. (La tacca di taratura deve essere controllata tramite pesata per ogni lotto di provette)

In dettaglio, dalla soluzione standard madre si prepara al momento uno standard intermedio avente concentrazione 0,25 ppm ponendo 0,5 ml di “madre” in provetta e diluendo a 10 ml con acqua MQ.

Dallo standard intermedio si preparano le 5 soluzioni di lavoro ponendo 100, 200, 400, 800, 1600 µl di standard intermedio in provetta, aggiungendo 100 µl di HNO₃ grado ultrapur e diluendo a 10 ml con acqua MQ.

Il bianco della calibrazione si prepara diluendo 100 µl di HNO₃ grado ultrapur a 10 ml con acqua MQ.

Sulla base dei valori di emissione delle soluzioni standard a concentrazione nota si determinano le concentrazioni di Cu e Fe nei campioni in esame a partire dall'intensità dei loro segnali di emissione.

La precisione e i limiti di rivelabilità del metodo vengono determinati dall'analisi di 20 bianchi della procedura. Per ogni campione si suggerisce di effettuare almeno 5 repliche strumentali sulle quali calcolare media, deviazione standard e deviazione standard percentuale. I valori di precisione per ogni elemento sono ottenuti come media delle precisioni calcolate per ogni campione. Il detection limit (d.l.) strumentale è calcolato come 3 volte la deviazione standard del bianco, mentre come detection limit del metodo si considera il valore ottenuto dividendo il d.l. strumentale per il fattore di preconcentrazione medio, espresso in ppt.

In Tab. 2 sono riportati i valori del d.l. del metodo e della precisione percentuale relativi a Fe e Cu ottenuti nei nostri laboratori seguendo la procedura e le raccomandazioni indicate e impiegando per la determinazione dei metalli un ICP-AES VISTA-PRO (Varian - Springvale, Australia).

Tab. 2 – Detection limit (ng l⁻¹) e precisione (%) del metodo

Analita	d.l. (ng l⁻¹)	Precisione (%)
Cu	2,9	42
Fe	4,5	15

10.6 RACCOMANDAZIONI

Si raccomanda di utilizzare reattivi al massimo grado di purezza disponibili in commercio.

L'analisi di elementi in tracce e sub-tracce impone una rigorosa procedura sia nella scelta che nella pulizia dei materiali che entrano in contatto con i campioni, sia nelle modalità operative durante il campionamento e il trattamento dei campioni in quanto possibili fonti di contaminazione.

Tutti i contenitori in materiale plastico che entrano in contatto con il campione o con i reattivi utilizzati per il trattamento della resina devono essere preventivamente sottoposti ad una serie di lavaggi.

La procedura standard prevede:

- A. lavaggio preliminare con acqua e sapone, qualora il contenitore sia nuovo, per eliminare la presenza di sostanze organiche;
- B. lavaggio in HNO₃ di grado tecnico all'1%;
- C. due lavaggi in HNO₃ grado suprapur allo 0,1 % su agitatore rotante per 24 h;
- D. lavaggio in HNO₃ grado ultrapur allo 0,1 % in agitazione per 24 h;

Tra un lavaggio e l'altro sciacquare accuratamente con acqua Milli-Q per 2-3 volte;

Conservare i contenitori in HNO₃ ultrapur concentrazione 0,1% fino al momento dell'uso;

Lavare i matracci di vetro per la preparazione delle soluzioni standard con una soluzione al 30% HNO₃ (grado tecnico) bollente per circa 2 hs.

Testare la pulizia delle provette impiegate per la raccolta dell'eluato delle resine.

La pompa peristaltica utilizzata è una multicanale ed è dotata di 16 alloggiamenti. Si consiglia tuttavia di non superare un numero massimo di 12 campioni da trattare contemporaneamente per lo spazio occupato dalle bottiglie e dai tubi sotto la cappa a flusso laminare.

Si ricorda infine che, poiché il bianco della procedura deve essere determinato in ogni analisi contestualmente ai campioni, di dedicare a questo scopo alcune delle colonne disponibili.

10.7 BIBLIOGRAFIA

- BIESUZ, R., ALBERTI, G., D'AGOSTINO, G., MAGI, E., PESAVENTO, M. (2006) - Determination of cadmium (II), copper (II), manganese (II) and nickel (II) species in Antarctic seawater with complexing resins. *Mar. Chem.*, **101**: 180-189.
- FALKOWSKI, P.G., BARBER, R.T., SMETACEK, V. (1998) - Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, **281**: 200-206.
- GROTTI, M., ABELMOSCHI, M.L., SOGGIA, F., TIBERIADE, C., FRACHE, R. (2000) - Reduction of interferences in graphite furnace atomic absorption spectrometry by multiple linear regression modelling. *Spectrochim. Acta B*, **55**: 1847-1860.
- GROTTI, M., SOGGIA F. ABELMOSCHI, M.L., RIVARO, P., MAGI, E., FRACHE, R. (2001) - Temporal distribution of trace metals in Antarctic coastal waters. *Mar. Chem.*, **76**: 189-209.
- GROTTI, M., ABELMOSCHI, M.L., SOGGIA, F., FRACHE, R. (2002) - Determination of trace metals in seawater by electrothermal atomic absorption spectrometry following solid-phase extraction: quantification and reduction of residual matrix effects. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **17**: 46-51.
- HUTCHINS, D.A., BRULAND, K.W. (1998) - Iron-limited diatom growth and Si:N uptake ratios in a coastal upwelling regime. *Nature*, **393**: 561-564.
- HUTCHINS, D.A., WITTER, A.E., BUTLER, A., LUTHER, G.W. III (1999) - Competition among marine phytoplankton for different chelated iron species. *Nature*, **400**: 858-861.
- LIBES, S.M. (1992) - Trace metals in seawater. In: Rose N. (ed.), *An introduction to marine biogeochemistry*. Wiley & Sons Inc., Singapore: 168-188.
- MULLER F.L., JACQUET, S., WILSON W.H. (2003) - Biological factors regulating the chemical speciation of Cu, Zn, and Mn under different nutrient regimes in a marine mesocosm experiment. *Limnol. Oceanogr.*, **48**: 2289-2302.
- PESAVENTO, M., BIESUZ, R., GALLORINI, M., PROFUMO, A. (1993). - Sorption mechanism of trace amounts of divalent metal ion on a chelating resin containing iminodiacetate groups. *Anal. Chem.*, **65**: 2522-2527.

CAPITOLO 11. ABBONDANZA VIRALE

R. Danovaro, C. Corinaldesi, A. Zingone, P. Del Negro

r.danovaro@univpm.it

11.1 INTRODUZIONE

I virus sono considerati le entità biologiche più abbondanti sul Pianeta. Secondo stime recenti, in acque oceaniche il loro numero totale è nell'ordine di 10^{30} (Suttle, 2005), valore che eccede, di almeno un ordine di grandezza, l'abbondanza totale dei procarioti. Sempre in acque oceaniche sembra avvengano circa 10^{23} eventi di infezione virale ogni secondo (Suttle, 2005). Tali infezioni rappresentano la principale causa di mortalità per un gran numero di organismi, dai procarioti ai grandi mammiferi (Suttle, 2005). Sulla base di tali considerazioni, è stato ipotizzato che i virus rivestano un ruolo di primo piano nel funzionamento degli ecosistemi acquatici e, più in particolare, nel funzionamento del circuito microbico (Fuhrman, 1999; Weinbauer, 2004). La valutazione dell'abbondanza virale rappresenta il primo passo verso la comprensione del ruolo ecologico dei virus. La misura dell'abbondanza virale è infatti alla base di ogni stima di produzione e decadimento virale e, di conseguenza, di ogni studio concernente l'impatto dei virus sugli organismi ospiti e il loro ruolo all'interno delle reti trofiche.

Le prime evidenze dell'elevata abbondanza virale in campioni ambientali si devono a studi condotti in microscopia elettronica a trasmissione (TEM) (Azam *et al.*, 1983). A causa della grande laboriosità del metodo e della difficoltà nell'analizzare grandi quantità di campioni, le analisi al TEM sono state progressivamente sostituite, nell'ultimo decennio, da conteggi in microscopia ad epifluorescenza (EM). Questo approccio fornisce una maggiore attendibilità dei risultati (richiedendo una minore manipolazione del campione) e un'accuratezza di gran lunga superiore all'approccio TEM (Hennes e Suttle, 1995; Noble e Fuhrman, 1998). Gli studi condotti nell'ultimo decennio mediante EM hanno consentito di individuare abbondanze tipiche di circa 10^6 virus ml^{-1} in acque oceaniche superficiali e una elevata eterogeneità nella distribuzione. Ad oggi, le abbondanze virali più alte sono state individuate in ambienti costieri ad elevato carico trofico, dove si possono superare i 10^8 virus ml^{-1} . In generale, le abbondanze virali sono correlate alla produttività del sistema e sono più elevate in corrispondenza di grandi abbondanze procariotiche e/o di maggiori concentrazioni di clorofilla *a* (Corinaldesi *et al.*, 2003; Bongiorno *et al.*, 2005). Anche ambienti estremamente oligotrofi, come le acque oceaniche profonde, possono ospitare elevate densità di virioplancton (Weinbauer *et al.*, 2003; Magagnini *et al.*, 2007).

Il conteggio di virus mediante EM richiede un trattamento del campione con appropriati fluorocromi. Tali molecole si legano al genoma virale e, opportunamente eccitate, emettono luce nel campo del visibile o dell'UV. Nell'ultima decade sono state utilizzate diverse tipologie di fluorocromi (Yo-Pro-1, DAPI, SYBR Green I, SYBR Green II, SYBR Gold; Hennes e Suttle, 1995; Weinbauer e Suttle, 1997; Noble e Fuhrman, 1998; Chen *et al.*, 2001). Tuttavia, soltanto la famiglia dei SYBR viene ad oggi utilizzata per lo studio di campioni ambientali (Noble e Fuhrman, 1998; Chen *et al.*, 2001; Danovaro *et al.*, 2008; Dell'Anno *et al.*, 2009).

Viene qui descritta la procedura per il conteggio del virioplancton in campioni d'acqua mediante microscopia ad epifluorescenza e colorazione con SYBR Gold che, al momento, rappresenta il fluorocromo che offre il miglior compromesso tra persistenza del segnale e riduzione della fluorescenza di fondo.

11.2 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

11.2.1 Attrezzatura

- Campionatore (bottiglie sterili monouso) o bottiglia tipo Niskin opportunamente trattate per campionamento microbiologico (vedi sotto);
- Provette sterili con tappo da 15 ml;
- Pipette sterili da 5 ml con propipetta o pipette automatiche da 5 ml e relativi puntali sterili.

11.2.2 Procedura di campionamento

1. Il prelievo dei campioni prevede l'utilizzo di un campionatore sterile monouso. Qualora ciò non fosse possibile si utilizzi un campionatore di altro tipo (e.g., bottiglia tipo Niskin), sciacquato ripetutamente prima dell'uso con acido cloridrico diluito e quindi con acqua distillata sterile (Sieburth, 1979).
2. Trasferire il campione dalla Niskin ad un contenitore sterile. Prelevare, con la pipetta, un volume opportuno di campione e distribuirlo in provette sterili (almeno 3). Il volume di campione da prelevare dipende dal tipo di ambiente in cui si opera e dalla relativa condizione trofica. Si consiglia in ogni caso di non scendere al di sotto dei 10 ml di campione per ciascuna replica.

11.2.3 Conservazione dei campioni

Il metodo migliore per la conservazione dei campioni è il congelamento rapido alla temperatura di -20°C fino al momento dell'analisi (Wen *et al.*, 2004). In alternativa, i campioni possono essere conservati a 4°C previa aggiunta di una soluzione di formaldeide sterile (concentrazione finale 2%,) Wommack e Colwell (2000). Tuttavia, il trattamento con formaldeide causa una significativa riduzione dell'abbondanza virale nell'arco di poche ore (Wen *et al.*, 2004).

11.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

11.3.1 Attrezzatura

- Autoclave.
- Cappa a flusso laminare.
- Sistema di produzione di acqua ultrapura (MilliQ).
- Apparato di filtrazione: supporti per filtri da 25 mm \varnothing , imbuti da 15 ml, pompa da vuoto, beuta di scarico.
- Microscopio ad epifluorescenza.
- Provette sterili con tappo da 15 ml.
- Siringhe sterili da 5 ml.
- Acqua di mare sterile (vd. Nota 1).
- Membrane in ossido di alluminio (Al_2O_3) di porosità pari a 0,02 μm e 25 mm \varnothing (Anodisc - Whatman).
- Filtri per siringa, porosità 0,02 μm (Anotop - Whatman).
- Piastre petri sterili.
- Pipette automatiche a volume variabile (2-20 μl , 100-1000 μl , 1-5 ml) e relativi puntali monouso

-
- sterili.
 - Pinzette sterili.
 - Vetrini portaoggetto e coprioggetto.
 - SYBR Gold, Invitrogen (vd. Nota 2).
 - Soluzione antifade.
 - Olio da immersione a basso indice di riflessione per microscopia ad epifluorescenza.
 - Acido cloridrico 1N.

11.3.2 Soluzioni

- Tampone TE: 10 mM Tris-HCl, 1 mM Acido Etilendiaminotetracetico (EDTA) in acqua MilliQ prefiltrata su filtri a porosità 0,02 μm (Anotop, Whatman), pH 7,4-7,6. Prima dell'uso il tampone TE viene ulteriormente filtrato su filtri a porosità 0,02 μm (Anotop, Whatman).
- Soluzione di lavoro SYBR Gold: la soluzione madre SYBR Gold (Invitrogen) è in forma concentrata (10000X). Per una soluzione di lavoro ideale la soluzione madre deve essere diluita fino a raggiungere una concentrazione finale di 2X. Generalmente, la diluizione viene eseguita in due fasi successive: inizialmente la soluzione madre viene diluita di cento volte (1:100) con il tampone TE raggiungendo una concentrazione di 100X. Successivamente, la soluzione ottenuta viene diluita di ulteriori 50 volte (1:50) fino ad ottenere la concentrazione finale di 2X. La soluzione di lavoro deve essere conservata ad una temperatura di 4°C fino ad un massimo di 15 giorni.
- Soluzione antifade: 50% glicerolo, 50% tampone fosfato salino (PBS) a pH 7,4-7,6 (la soluzione tampone può essere preparata direttamente ma è disponibile anche commercialmente) e 0,5% acido ascorbico (vd. Nota 3).

11.4 PROCEDURA ANALITICA

1. Trasferire in condizioni sterili e sotto cappa a flusso laminare 100 μl di campione in una provetta sterile da 15 ml (vd. Nota 4).
2. Aggiungere acqua di mare sterile fino a raggiungere un volume finale di 5 ml.
3. Usando una pinzetta sterile, posizionare il filtro Anodisc sul supporto di filtrazione. Posizionare l'imbuto al di sopra del filtro, prestando attenzione a non lasciare alcuno spazio vuoto tra filtro e imbuto.
4. Trasferire con la pipetta automatica e puntale sterile il contenuto delle provette all'interno dell'imbuto ed azionare la pompa da vuoto. La pressione non deve superare i 20 kPa (150mm Hg) al fine di preservare l'integrità delle cellule procariotiche.
5. Al termine della filtrazione, rimuovere l'imbuto e trasferire il filtro su piastra sterile, prestando attenzione a non capovolgerlo.
6. Pipettare 100 μl della soluzione di lavoro SYBR Gold sulla parte superiore del filtro, avendo cura di distribuirla uniformemente.
7. Incubare al buio per 20 min.
8. Riposizionare il filtro sull'apparato di filtrazione e risciacquare 3 volte l'apparato con 3 ml di acqua di mare sterile.
9. Pipettare 20 μl della soluzione *antifade* sulla superficie di un vetrino pulito.
10. Al termine del risciacquo, rimuovere il filtro e posizionarlo sul vetrino (prestando attenzione a non capovolgerlo), sopra la soluzione antifade precedentemente posta. Aggiungere, sulla faccia superiore del filtro, ulteriori 20 μl della soluzione *antifade*.
11. Coprire il filtro con un vetrino coprioggetto evitando la formazione di bolle che ostacolerebbero il conteggio.

12. Aggiungere una goccia di olio da immersione sulla faccia superiore del coprioggetto ed esaminare al microscopio ad epifluorescenza (luce blu-verde, eccitazione 480-495nm, ingrandimento 1000X).
13. Contare al minimo 10 campi ottici o 200 virus.
14. I vetrini possono essere conservati fino a 3 mesi ad una temperatura di -20°C.
15. Dopo la filtrazione di ogni campione, i supporti e gli imbuti devono essere risciacquati con HCl 1N.

11.4.1 Calcoli

$$\text{Virus ml}^{-1} = \frac{[\text{numero medio di virus per campo ottico}] \times [\text{coefficiente campo ottico}]}{\text{Volume campione}}$$

Dove:

Coefficiente campo ottico = (area filtrata / area di conteggio)

Volume del campione filtrato (in ml) non della soluzione campione + acqua sterile

11.4.2 Note

1. L'acqua di mare sterile (i.e. autoclavata e filtrata con filtri Anotop 0,02 µm) deve essere preparata prima di iniziare il trattamento dei campioni.
2. Il SYBR Gold è un fluorocromo in grado di legarsi a DNA ed RNA a singola e doppia elica, mentre il SYBR Green I (*Molecular Probes*) si lega principalmente a DNA a doppia elica pur legandosi, ma con sensibilità molto bassa, anche a DNA a singola elica ed a RNA, (Fischer *et al.*, 2005). Al contrario, il SYBR Green II (*Molecular Probes*) fornisce una fluorescenza maggiore con RNA e DNA a singola elica. Il SYBR Gold sta diventando il fluorocromo più utilizzato per il conteggio di virus in campioni di acqua e di sedimento. In microscopia ad epifluorescenza, esso presenta una fluorescenza stabile di colore giallo-verde, sebbene la sua brillantezza rossa possa variare a seconda del genoma virale (Chen *et al.*, 2001). Rispetto al SYBR Green I, la fluorescenza del SYBR Gold è generalmente più elevata e, al contempo, la fluorescenza di fondo è sufficientemente bassa da consentire il conteggio dei virus (Fischer *et al.*, 2005). Si raccomanda di non usare soluzioni di lavoro preparate da tempo (più di 15 giorni) a causa della scarsa stabilità dei fluorocromi a basse concentrazioni.
3. Al fine di facilitare il mescolamento, si raccomanda di aggiungere il glicerolo dopo aver aggiunto la soluzione PBS.
4. Il volume di campione utilizzato dipende dall'abbondanza virale attesa. Un volume ottimale permette di ottenere, al termine della procedura analitica, 20-40 virus/campo ottico. Se il numero di virus osservato si discosta significativamente da questo valore, si consiglia di variare opportunamente il volume del campione filtrato. Il volume riportato, puramente indicativo, si riferisce ad acque costiere mediamente produttive.

11.5 ISOLAMENTO E CONTEGGIO DI VIRUS MICROALGALI

In tutti i tipi di ambienti i popolamenti virali sono essenzialmente dominati da fagi, che infettano e controllano l'abbondanza dei popolamenti procariotici. Di gran lunga inferiore è l'abbondanza dei virus di microalghe eucariotiche, che tuttavia sono in grado di infettare specie appartenenti a vari gruppi algali e possono giocare un ruolo molto importante nel declino delle fioriture di fitoplancton (Zingone, 1995, Brussaard, 2004). Per ottenere stime dell'abbondanza di specifici virus si ricorre ad esperimenti di in-

fezione dell'ospite di interesse con campioni naturali di virus. L'infezione su ospiti specifici viene anche utilizzata qualora si voglia isolare virus del suddetto ospite per esperimenti successivi.

Due metodi vengono correntemente usati per isolare ceppi virali e contare virus specifici per un determinato ospite: la titolazione per placche e il metodo delle colture liquide, entrambi basati sull'infezione di colture della specie ospite con campioni naturali diluiti serialmente. Nella titolazione per placche, comunemente utilizzato per i batteri, si piastrano su agar diluizioni diverse del campione su colture dell'ospite. La concentrazione iniziale dei virus si ottiene dal numero di placche litiche contabili ad una certa diluizione, moltiplicando questo numero per la diluizione (3 placche litiche a 1:100 = 300 virus attivi o PFU, *Plaque Forming Units*).

L'infezione in mezzo liquido è invece particolarmente adatta alle microalghe planctoniche, per le quali non è sempre facile ottenere una crescita su agar (Cottrell e Suttle, 1991; 1995; Sahlsten, 1998). Anche in questo caso, si ottiene una stima dell'abbondanza delle particelle virali attive, che di solito è inferiore al numero di particelle virali evidenziabili con tecniche di conteggio diretto in microscopia ottica o elettronica. Il metodo consiste nell'aggiunta del campione, ultrafiltrato su filtri di porosità 0,22 µm e diluito serialmente, a colture di microalghe in fase di attiva crescita. La presenza del virus determina scolorimento della coltura, inizialmente verde o bruno a seconda dei pigmenti accessori delle microalghe. Il numero di unità infettive nel campione di partenza si ricava a partire dal numero di colture che si sbiancano ai diversi step di diluizione, utilizzando il calcolo del *Most Probable Number* (MPN).

Poiché è noto che diversi ceppi algali possono essere più o meno suscettibili all'infezione virale (Nagasaki *et al.*, 1999; Zingone *et al.*, 1999), e che per una singola specie ospite esistono ceppi virali distinti e di infettività diversa (Zingone *et al.*, 2006), è opportuno effettuare gli esperimenti di infezione utilizzando più di un ceppo della specie ospite.

11.5.1 Materiali

- Siringhe di plastica da 20 ml.
- Filtri Acrodisc® in fibra di vetro (porosità 1 µm, diametro 25 mm), o anche filtri in fibra di vetro equivalenti montati su supporto Sweenex®.
- Filtri HT low-protein-binding Tuffrin® con membrane in polisulfone (porosità 0,22 µm, diametro 25 mm).
- Piastre da 96 pozzetti (12 file x 8 pozzetti).
- Colture microalgali.
- Pipetta automatica a 8 canali.
- Puntali da 20-200 µl.
- Terreno di coltura per le diluizioni.

11.6 PROCEDURA

1. Preparare quantità sufficienti di colture della specie ospite, facendo in modo che nel giorno del campionamento queste siano in fase di crescita esponenziale e di colore visibile.
2. Il giorno precedente il campionamento, versare 9 ml di coltura in ciascuna provetta di un set di almeno 5 provette per 5 passaggi di diluizione (25 tubi). Nel caso si utilizzino le piastre da 96 pozzetti, porre 200 µl di coltura in ciascuno dei pozzetti della piastra. Il riempimento della piastra è agevolato dall'utilizzo di un pipettatore a 8 canali, che permette di riempire un'intera fila in un unico passaggio.
3. Raccogliere il campione e mantenerlo al fresco e al buio fino all'incubazione, da effettuare di preferenza nel giro di qualche ora.
4. Agitare il campione.
5. Prefiltrare 11 ml di campione su filtro da 25 mm in fibra di vetro di porosità 1 µm, utilizzando filtri

-
- Acrodisc® già in vendita negli appositi portafiltri, ovvero filtri analoghi montati su portafiltri Sweeney. Questo passaggio permette di rimuovere particelle più grandi e detrito, evitando così l'intasamento della membrana polisulfonica Tuffrin.
6. Filtrare il campione prefiltrato su membrana Tuffrin, scartando il primo ml di filtrato.
 7. Versare 9 ml di terreno di coltura in ciascuna di 4 provette.
 8. Versare 1 ml di campione ultrafiltrato su membrana da 0,22 µm in un tubo con 9 ml di terreno di coltura, tappare e agitare per qualche secondo, quindi prelevare 1 ml da questo tubo e porlo in un nuovo tubo con 9 ml di terreno. Effettuare il passaggio 4 volte, per ottenere 4 diluizioni, da 1:10 a 1:10000, del campione da analizzare.
 9. Se per l'esperimento di infezione si utilizzano colture in tubi, porre 1 ml del campione ultra filtrato in ciascuno dei 5 tubi della 1ª serie, 1 ml della diluizione 1:10 nella 2ª serie, 1 ml della diluizione 1:100 nella 3ª serie e così via, badando di marcare i tubi di ciascuna serie con un pennarello indelebile con un numero di tacche da 1 a 5, corrispondente allo step di diluizione. Le diluizioni possono essere anche effettuate direttamente in una siringa, così come spiegato nel capitolo delle 'Colture di diluizione'.
 10. Se si utilizzano le piastre da 96 pozzetti, porre 100 µl di campione ultrafiltrato in ciascuno degli 8 pozzetti della 1ª e della 12ª fila della piastra, 100 µl della diluizione 1:10 nella 2ª e nell'11ª fila, 100 µl della diluizione 1:100 nella 3ª e nella 10ª fila e così di seguito fino alla diluizione 1:1000 nella 5ª e nella 8ª fila, ottenendo in pratica 8 + 8 repliche per ciascuno dei 5 step di diluizione. Questa operazione è più agevole e rapida usando la pipetta automatica a otto canali dopo aver versato i campioni delle diverse diluizioni in capsule Petri.
 11. I pozzetti centrali (6ª e 7ª fila) si utilizzano come controlli, ponendo nella 6ª fila 100 µl di terreno di coltura in ogni pozzetto, per ottenere un bianco degli step di diluizione e, nella fila 7ª, 100 µl di acqua di mare ultra filtrata e autoclavata, per ottenere un bianco della prima serie di pozzetti, nei quali viene aggiunto il campione naturale non diluito con terreno di coltura.
 12. Incubare i tubi o le piastre nelle stesse condizioni in cui si mantengono le colture della specie ospite.
 13. Monitorare l'eventuale sbiancamento dei tubi 'a occhio' o con un fluorimetro per una settimana. Per le piastre, la lisi si evidenzierà con lo scolorimento dei pozzetti a confronto dei controlli, che manterranno un colore vivace. Annotare il numero di pozzetti o tubi sbiancati per ogni step di diluizione.
 14. Calcolare l'abbondanza dei virus e l'errore standard associato utilizzando le tavole apposite riportate, ad esempio, in Andersen e Throndsen (2003) ovvero, se si utilizzano le piastre, uno dei tanti programmi disponibili, ad esempio quello in BASIC di Hurley e Roscoe (1983).
 15. Nei pozzetti o nei tubi delle serie più diluite che si scoloriscono si ha la massima probabilità di ottenere ceppi virali isolati, che andranno comunque purificati attraverso successive procedure di diluizione.

11.7 BIBLIOGRAFIA

- ANDERSEN P., THRONDSSEN J. (2003) - Estimating cell numbers. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC-UNESCO, Paris: 99-129
- AZAM F., FENCHEL T., FIELD J.G., GRAY J.S., MEYERREIL L.A., THINGSTAD F. (1983) - The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **10**: 257-263.
- BONGIORNI L., MAGAGNINI M., ARMENI M., NOBLE R., DANOVARO R. (2005) - Viral production, decay rates, and life strategies along a trophic gradient in the North Adriatic Sea. *Appl. Environm. Microbiol.*, **71**: 6644-6650.
- BRUSSAARD C.P.D. (2004) - Viral control of phytoplankton population - a review. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **51**: 125-138.

-
- CHEN F., LU J.R., BINDER B., HODSON R.E. (2001) - Enumeration of viruses in aquatic environments using SYBR Gold stain: application of digital image analysis and flow cytometer. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 539-545.
- CORINALDESI C., CREVATIN E., DEL NEGRO P., MARINI M., RUSSO A., FONDA-UMANI S., DANOVARO R. (2003) - Large-scale spatial distribution of virioplankton in the Adriatic Sea: testing the trophic state control hypothesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 2664-2673.
- COTTRELL M.T., SUTTLE C.A. (1991) - Wide-spread occurrence and clonal variation in viruses which cause lysis of a cosmopolitan, eukaryotic marine phytoplankter, *Micromonas pusilla*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **78**: 1-9.
- COTTRELL M.T., SUTTLE C.A. (1995) - Dynamics of a lytic virus infecting the photosynthetic marine picoflagellate *Micromonas pusilla*. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 730-739.
- DANOVARO R., DELL'ANNO A., CORINALDESI C., MAGAGNINI M., NOBLE R., TAMBURINI C., WEINBAUER M. (2008) - Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems. *Nature*, **454**: 1084-1087.
- DELL'ANNO A., CORINALDESI C., MAGAGNINI M., DANOVARO R. (2009) - Determination of viral production in aquatic sediments using the dilution-based approach. *Nature Prot.*, **4**: 1013-1022.
- FISCHER U.R., KIRSCHNER A.K.T., VELIMIROV B. (2005) - Optimization of extraction and estimation of viruses in silty freshwater sediments. *Aquat. Microb. Ecol.*, **40**: 207-216.
- FUHRMAN J.A. (1999) - Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**: 541-548.
- HENNES J.E., SUTTLE C.A. (1995) - Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 1050-1055.
- HURLEY M.A., ROSCOE M.E. (1983) - Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. *J. Appl. Bacteriol.*, **55**: 159-164.
- MAGAGNINI M., CORINALDESI C., MONTICELLI L.S., DE DOMENICO E., DANOVARO R. (2007) - Viral abundance and distribution in Mesopelagic and Bathypelagic waters of the Mediterranean Sea. *Deep Sea Res. PT I*, **54**: 1209-1220.
- NAGASAKI K., TARUTANI K., YAMAGUCHI M. (1999) - Cluster analysis on algicidal activity of HaV clones and virus sensitivity of *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae). *J. Plank. Res.*, **21**: 2219-2226.
- NOBLE R.T., FUHRMAN J.A. (1998) - Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.*, **14**: 113-118.
- SAHLSTEN E. (1998) - Seasonal abundance in Skagerrak-Kattegat coastal waters and host specificity of viruses infecting the marine photosynthetic flagellate *Micromonas pusilla*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **16**: 103-108.
- SIEBURTH J. (1979) - *Sea Microbes*. Oxford University Press. Inc., New York, pp 491.
- SUTTLE C.A. (2005) - Viruses in the sea. *Nature*, **437**: 356-361.
- WEINBAUER M.G., SUTTLE C.A. (1997) - Comparison of epifluorescence and transmission electron microscopy for counting viruses in natural marine waters. *Aquat. Microb. Ecol.*, **13**: 225-232.
- WEINBAUER M.G., BRETTAR I., HÖFLE M.G. (2003) - Lysogeny and virus-induced mortality of bacterioplankton in surface, deep, and anoxic marine waters. *Limnol. Oceanogr.*, **48**: 1457-1465.
- WEINBAUER M.G. (2004) - Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**: 127-181.
- WEN K., ORTMANN A., SUTTLE C.A. (2004) - Accurate estimation of viral abundance by epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 3862-3867.
- WOMMACK K.E., COLWELL R.R. (2000) - Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, **64**: 69-114.
- ZINGONE A. (1995) - The role of viruses in the dynamics of phytoplankton blooms. *G. Bot. It.*, **129**: 415-423.
- ZINGONE A., SARNO D., FORLANI G. (1999) - Seasonal dynamics of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) and its viruses in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *J. Plank. Res.*, **21**: 2143-2159.
- ZINGONE A., NATALE F., BIFFALI E., BORRA M., FORLANI G., SARNO D. (2006) - Diversity in morphology, infectivity, molecular characteristics and induced host resistance between two viruses infecting *Micromonas pusilla*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **45**: 1-14.

CAPITOLO 12. PRODUZIONE VIRALE

R. Danovaro, M. Magagnini, C. Corinaldesi

r.danovaro@univpm.it

12.1 INTRODUZIONE

La stima dell'abbondanza virale fornisce solo limitate informazioni sul ruolo ecologico dei virus nell'ecosistema. Lo studio delle dinamiche virali e l'impatto dei virus sugli organismi ospiti, e in definitiva la comprensione del ruolo dei virus nelle reti trofiche e nei cicli biogeochimici, non possono prescindere da stime accurate di produzione virale. Studi recenti condotti in differenti ecosistemi suggeriscono che l'infezione virale può determinare fino al 100% della mortalità procariotica, con effetti a cascata sul ciclo della materia organica e sul trasferimento di energia ai livelli trofici superiori (Suttle, 2005). Infatti, la lisi delle cellule procariotiche determina la trasformazione della biomassa procariotica in detrito cellulare (disciolto e particellato) il quale, a causa della sua labilità, può essere rapidamente metabolizzato dalla stessa comunità procariotica (Weinbauer, 2004). Tale processo genera un anello trofico nel quale la biomassa procariotica, rimossa attraverso la lisi virale, è nuovamente utilizzata da procarioti non infetti (i.e. viral shunt Suttle, 2005), determinando un potenziale incremento della produzione di C procariotica e dei tassi di respirazione fino al 30% (Fuhrman, 1999). Allo stesso tempo, il processo può determinare un decremento dell'efficienza di trasferimento del C ai livelli trofici superiori (Fuhrman, 1999).

La tecnica di diluizione permette di quantificare gli incrementi dell'abbondanza dei virus nel tempo in microcosmi diluiti con acqua di mare sterile (Wilhelm *et al.*, 2002; Bongiorno *et al.*, 2005; Dell'Anno *et al.*, 2009). Tale tecnica riduce il background di virus liberi attraverso l'introduzione di acqua sterile, consentendo un ottimale monitoraggio della produzione virale a partire da piccoli cambiamenti dell'abbondanza virale nel tempo. Dato che i virus prodotti derivano da ospiti infetti prima dell'inizio dell'esperimento, la riduzione dei tassi di contatto virus-ospite attraverso la diluizione del campione non influenza i tassi di produzione virale. Inoltre, la diluizione del campione rende trascurabile il grazing dei protozoi sui virus e riduce sensibilmente la degradazione enzimatica delle particelle virali (Danovaro *et al.*, 2008).

12.2 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

Lo schema si riferisce ad operazioni da eseguire a bordo, immediatamente dopo il recupero dei campioni, al buio e in condizioni di temperatura *in-situ*.

12.2.1 Attrezzatura

- Campionatore tipo Niskin o bottiglie sterili monouso.
- Provette sterili da 15 ml.
- Pipette da 5 ml e relativi puntali sterili.
- Acqua di mare sterile (vd. Nota 1).
- Filtri da siringa Anotop a porosità 0,02 μm .
- Contenitori sterili tipo Whirl-Pak bag da 2 l o equivalenti.
- Contenitori sterili da 1l.

12.2.2 Procedura di campionamento

- Il prelievo dei campioni prevede l'utilizzo di un campionatore batteriologico, tipo Niskin. Qualora ciò non fosse possibile si utilizzi un campionatore di altro tipo, sciacquato ripetutamente prima dell'uso con acido cloridrico diluito e quindi con acqua distillata sterile (Sieburth, 1979).
- Il prelievo dei campioni dalle bottiglie va effettuato il più rapidamente possibile per evitare errori dovuti alla sedimentazione delle cellule procariotiche. I campioni vanno trasferiti dalle Niskin a contenitori sterili che devono essere tenuti al buio e a temperatura in-situ fino all'allestimento dei microcosmi.
- Il volume di campione da prelevare dipende dal tipo di ambiente in cui si opera e dal relativo carico trofico. Si consiglia di effettuare gli esperimenti di produzione virale a partire da 100 ml di campione.

12.2.3 Allestimento del sistema sperimentale

1. Prima del campionamento, preparare un set di 15 provette come illustrato in Fig.1. Le provette dovrebbero essere preparate in tre repliche per ciascun intervallo di incubazione (vd. Nota 2).
2. Prelevare (mediante contenitore sterile) il campione da ciascuna bottiglia Niskin. Si noti che l'allestimento di ogni microcosmo richiede 100 ml di campione. La procedura ottimale prevede esperimenti in triplicato, da effettuarsi mediante l'allestimento di tre microcosmi indipendenti per ciascuna delle stazioni o quote batimetriche previste. Il prelievo di ciascuna replica deve essere effettuato a partire da Niskin diverse chiuse nello stesso punto.
3. Allestire i microcosmi (tre repliche) trasferendo 100 ml di campione in ogni Whirl-Pak bag. Diluire mediante 200 ml di acqua di mare sterile (diluizione finale del campione 1 a 3).
4. Immediatamente dopo l'allestimento dei microcosmi, effettuare il primo sub-campionamento: trasferire 10 ml di campione diluito dal microcosmo alla corrispondente provetta sterile (vedi p.to 1). Interrompere la produzione virale mediante congelamento in azoto liquido e conservare a -20°C fino alle successive analisi di laboratorio (vd. Nota 3).
5. Incubare le Whirl-Pak bag al buio e a temperatura *in-situ*.
6. Dopo i tempi di incubazione prestabiliti, effettuare i successivi sub-campionamenti e trattare i campioni come indicato al p.to 4.

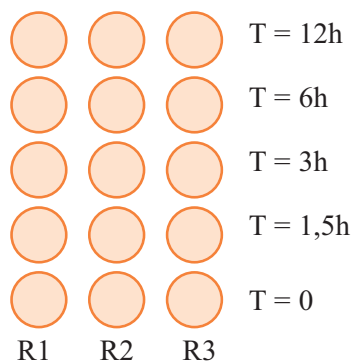


Fig.1 - Schema illustrativo dei 5 set di repliche e dei tempi di incubazione generalmente utilizzati in un esperimento di produzione virale.

12.3 CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Come descritto nel capitolo “Abbondanza virale”, i campioni dovrebbero essere conservati a -20°C fino alle analisi di laboratorio (Wen *et al.*, 2004). In alternativa, i campioni possono essere conservati a 4°C previo trattamento con formaldeide sterile a concentrazione finale 2% (Wommack e Colwell, 2000). Si noti che il trattamento con formaldeide causa una significativa riduzione dell’abbondanza virale nell’arco di poche ore. Si raccomanda pertanto di usare questo metodo di conservazione solo nel caso in cui non sia possibile mantenere una temperatura di -20°C fino alle analisi di laboratorio (Wen *et al.*, 2004).

12.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

Il metodo descritto permette di calcolare gli incrementi dell’abbondanza virale nel tempo a partire da stime in triplicato per ciascuno dei tempi di incubazione. Seguire le procedure di laboratorio descritte nel capitolo “Abbondanza virale” ed applicare successivamente le formule indicate di seguito per il calcolo della produzione virale.

12.5 CALCOLI

I tassi di produzione sono calcolati a partire dalla regressione di primo ordine dell’abbondanza virale trovata in ciascuno step di incubazione su tempo. La produzione virale può essere espressa come virus prodotti $\text{ml}^{-1} \text{h}^{-1}$. Per il calcolo dell’abbondanza virale è necessario tener conto della diluizione iniziale del campione di un fattore 3.

12.6 NOTE

- L’acqua di mare sterile dovrebbe essere preparata prima di tutte le altre procedure mediante filtrazione con filtri da siringa Whatman Anotop di porosità pari a 0,02 μm .
- Un esperimento di produzione virale deve essere effettuato a partire dalla stima dell’abbondanza virale in un minimo di 5 intervalli di incubazione. Ad ogni intervallo di incubazione, l’abbondanza virale è calcolata mediante il conteggio di tre repliche, prelevate da altrettanti microcosmi. Il primo set di repliche rappresenta il tempo 0 (t_0) e può essere usato per la stima dell’abbondanza virale di partenza. I successivi intervalli di incubazione sono generalmente scelti come indicato in Fig.1, ma il tempo di incubazione può variare a seconda dello stato trofico del sistema e dei tassi di incremento attesi. Generalmente, acque eutrofiche sono caratterizzate da produzione virale più alta rispetto ad acque oligotrofiche; pertanto, possono essere pianificati intervalli di incubazione più lunghi rispetto a quelli indicati in Fig. 1.
- In caso di indisponibilità di azoto liquido, la produzione virale può essere interrotta mediante l’introduzione di formaldeide o paraformaldeide (concentrazione finale 2%). Tuttavia, come indicato nel capitolo “Abbondanza virale”, sopra, l’uso di tali fissativi risulta in una veloce degradazione delle particelle virali e in definitiva ad una sottostima dell’abbondanza virale di ogni intervallo di incubazione.

12.7 BIBLIOGRAFIA

BONGIORNI L., MAGAGNINI M., ARMENI M., NOBLE R., DANOVARO R. (2005) - Viral production, decay rates, and life strategies along a trophic gradient in the North Adriatic Sea. *Appl. Environm. Microbiol.*, **71**:

6644-6650.

- DANOVARO R., CORINALDESI C., FILIPPINI M., FISCHER U.R., GESSNER M.O., JACQUET S., MAGAGNINI M., VELIMIROV B. (2008) - Viriobenthos in freshwater and marine sediments: a review. *Freshwat. Biol.* **53**: 1186–1213.
- FUHRMAN J.A. (1999) - Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature*, **399**: 541-548.
- DELL'ANNO A., CORINALDESI C., MAGAGNINI M., DANOVARO R. (2009) - Determination of viral production in aquatic sediments using the dilution-based approach. *Nat. Protoc.* **7**: 1013-1022.
- SUTTLE C.A. (2005) - Viruses in the sea. *Nature*, **437**: 356-361.
- SIEBURTH J. McN. (1979) – *Sea Microbes*. Oxford University Press. Inc., New York: 491 pp.
- WEINBAUER M.G. (2004) – Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.*, **28**: 127-181.
- WEN K., ORTMANN A., SUTTLE C.A. (2004) - Accurate estimation of viral abundance by epifluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 3862–3867.
- WILHELM S.W., BRIDGEN S.M., SUTTLE C.A. (2002) – A dilution technique for the direct measurement of viral production: a comparison in stratified and tidally mixed coastal waters. *Microb. Ecol.*, **43**: 168-173.
- WOMMACK K.E., COLWELL R.R. (2000) - Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, **64**: 69-114.

CAPITOLO 13. METODI PER LO STUDIO DELLA BIOMASSA DEL BATTERIOPLANCTON MEDIANTE CONTEGGIO SU PIASTRA, MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA E QUANTIFICAZIONE LIPOPOLISACCARIDICA

R. La Ferla, G. Maimone, E. Manini, R. Zaccone, A. Zoppini

rosabruna.laferla@iamc.cnr.it

13.1 INTRODUZIONE

Alla fine degli anni '70 i metodi disponibili per lo studio dell'ecologia microbica fornivano informazioni parziali sulla biomassa e sull'attività microbica degli ecosistemi acquatici. I metodi allora disponibili erano affetti da errori tali da produrre abbondanze cellulari pari solo allo 0,1-15% di quelle ottenute con i metodi odierni (Amann *et al.*, 1995) e prevedevano per lo più il conteggio delle colonie sviluppate su terreni di coltura. Negli ultimi decenni i nuovi approcci metodologici, hanno permesso un notevole avanzamento delle conoscenze sia nella quantificazione e caratterizzazione della biomassa batterioplanctonica, che nella descrizione delle attività metaboliche. L'utilizzo di fluorocromi ad elevata specificità, unitamente alla tecnica di microscopia ad epifluorescenza e alla disponibilità di membrane filtranti ad elevata precisione, ha permesso un notevole avanzamento delle conoscenze sul reale contributo della biomassa batterioplanctonica (Maugeri *et al.*, 1990). Inoltre, la disponibilità di tecniche avanzate per lo studio delle attività metaboliche e di tecniche molecolari innovative ha messo in luce l'eterogeneità della comunità batterioplanctonica presente nella colonna d'acqua degli oceani, comportando importanti variazioni nella definizione delle popolazioni microbiche stesse. Mentre nei primi anni '80, il batterioplancton includeva tutti gli organismi procarioti (classe dimensionale 0,2-2 μm) costituiti principalmente dal picoplancton eterotrofo e in quantità minore dal picofitoplancton (Sieburth, 1979), alla fine dello stesso decennio, la scoperta di importanti differenze genetiche all'interno dei procarioti stessi ha fatto sì che siano stati individuati due ben differenziati domini: Eubacteria e Archaea (Woese, 1987). Oggi si preferisce quindi raggruppare il batterioplancton sotto l'unico termine di procarioti, nonostante le significative differenze funzionali tra questi gruppi.

Le stime dell'abbondanza batterica possono essere effettuate mediante diversi metodi, diretti o indiretti. Tra quest'ultimi, il conteggio su piastra è il metodo più tradizionale e si basa sulla quantificazione delle colonie batteriche cresciute su appropriati terreni di coltura. Esso permette di stimare il numero di batteri vitali e capaci di riprodursi, ma ha lo svantaggio di stimare una piccola frazione delle popolazioni in ambienti naturali. Tra i metodi diretti, il conteggio delle cellule in epifluorescenza è il metodo standard utilizzato in tutti gli ambienti acquatici su cui si basa gran parte degli studi microbiologici (Hobbie, 1977; Porter e Feig, 1980; Ducklow, 2000).

Per quantificare la biomassa del batterioplancton negli ambienti marini vengono utilizzati numerosi fattori di conversione da applicarsi alla abbondanza cellulare, tra i quali il più adottato è 20 fg C cell⁻¹ (Lee e Fuhrman, 1987; Ducklow e Carlson, 1992). Tuttavia, poiché il contenuto di carbonio cellulare cambia al variare delle condizioni naturali, dello stato fisiologico e dalla struttura volumetrica, è preferibile determinare la biomassa utilizzando la stima del conteggio in combinazione con quello del volume cellulare. Il primo fattore di conversione da biovolume a biomassa riportato in letteratura era basato su misurazioni di colture di *E. coli* (121 fg C μm^{-3} ; Watson *et al.*, 1977), le cui cellule sono 100 volte più grandi di quelle del batterioplancton in ambienti naturali. Bratbak e Dundas (1984) e Bratbak (1985), da studi basati su colture di batteri marini coltivati in laboratorio, adottarono fattori da 160 a 930 fg C μm^{-3} . Tutt'oggi, i fattori di conversione più frequentemente usati risultano 310 fg C μm^{-3} (Fry, 1988), come pure i fattori di conversione allometrici riportati da Posch *et al.* (2001).

Un altro metodo per determinare la biomassa in ambienti acquatici è la quantificazione delle endotossine batteriche di tipo lipopolisaccaridico (LPS), originariamente descritto da Watson *et al.* (1977) e Maeda *et al.* (1983). La procedura analitica per i LPS è stata recentemente automatizzata e nuovamente applicata per la stima del batterioplancton poiché è un test rapido, specifico, di facile esecuzione e di alta sensibilità (Karl *et al.*, 1999; Ducklow, 2000; La Ferla *et al.*, 2004).

13.2 CONTEGGI IN PIASTRA

Il metodo del conteggio su piastra permette di stimare il numero di batteri vitali e capaci di riprodursi nei terreni di coltura. A tal scopo le condizioni di laboratorio devono riprodurre il più possibile le condizioni ambientali in cui i batteri vivono e quindi la temperatura, il pH, la pressione, la tensione di ossigeno, devono essere mantenute simili a quelle dell'ambiente che si vuole studiare. Per tali difficoltà di coltura, nello studio di ambienti estremi, il metodo è stato man mano sostituito da metodi diretti e molecolari.

I batteri coltivabili rappresentano la componente vitale associata con il particolato organico e dotata di un ampio spettro enzimatico; essa può variare in quantità e qualità in risposta ad input di sostanza organica, nutrienti e variazioni di temperatura (Zaccone *et al.*, 2002). È noto che il numero dei batteri vitali ottenuto con i terreni di coltura rappresenta meno del 1% della comunità microbica totale in acque oceaniche (Kogure *et al.*, 1979; Zampino *et al.*, 2004). Una larga discrepanza nell'abbondanza tra il numero dei batteri totali e quelli coltivabili è stata riscontrata da Bianchi e Giuliano (1996) che riportano percentuali di 0,001 - 0,2% in acque pelagiche del Mediterraneo nord occidentale.

Nelle zone costiere, la frazione di batteri coltivabili sul conteggio totale, è più variabile poiché i batteri eterotrofi possono adattarsi a condizioni ambientali con elevati apporti organici. Essi diminuiscono lungo un gradiente costa-largo e superficie-fondo e possono raggiungere percentuali del 6,8% in zone di upwelling (Zdanowski e Figueiras, 1999). In prossimità della foce di fiumi nell'Adriatico settentrionale sono stati osservati i valori massimi in superficie (10-22%), i quali diminuiscono all'aumentare della profondità (0,3-2%) e verso il largo (Zaccone *et al.*, 1998; 2002). La non coltivabilità di molti batteri pelagici deriva da meccanismi di adattamento a condizioni di oligotrofia (riduzione del volume cellulare, della sintesi proteica ecc.), per cui i batteri perdono la capacità di riprodursi in un mezzo ricco come il terreno di coltura. Tuttavia è stato dimostrato come una consistente frazione di non coltivabili sia ancora attiva, cioè capace di produrre enzimi e di respirare. In ogni comunità batterica esiste un ampio range di stadi metabolici diversi e di attività batterica collegati con la vitalità cellulare (Smith e del Giorgio, 2003; Zampino *et al.*, 2004). La discrepanza tra batteri totali e batteri coltivabili è stata anche giustificata da alcuni autori dalla presenza di "ghosts", cioè cellule prive di nucleoidi (Zweifel e Hagstrong, 1995).

La determinazione e l'attività dei batteri marini nei terreni di coltura è anche usata per lo studio della microflora saprofitica associata agli organismi marini e delle patologie infettive degli allevamenti ittici (Mancuso *et al.*, 2005a; 2005b; Zaccone *et al.*, 2005).

13.2.1 Principio del metodo

Il terreno di coltura utilizzato per il conteggio totale è quello preparato secondo la formula di Zobell (1941), costituito da acqua di mare invecchiata, cui viene aggiunta una fonte di azoto organico, fosfato ferroso e vitamine (quali peptone ed estratto di lievito) per favorire la crescita degli eterotrofi. Terreni disidratati e standardizzati sono oggi in commercio come Marine Agar 2216 e Marine Broth 2216 (Difco, MicroBiol diagnostici) contenenti gli elementi minerali che duplicano la composizione dell'acqua di mare con peptone ed estratto di lievito.

L'analisi microbiologica delle acque marine costiere prevede l'utilizzo di diverse tecniche colturali di conteggio mediante membrana filtrante e di tipo statistico (*Most Probable Number*). Ciascuna tecnica presenta da una parte il vantaggio della facilità d'uso e velocità dei tempi di risposta, ma dall'altra parte esistono limiti all'utilizzo di alcune di esse. Piccole quantità di acqua di mare possono essere seminate direttamente nel terreno di coltura sulla superficie dell'agar mediante la tecnica di spargimento o *spread plate*. È pertanto evidente che questa metodica è utilizzabile solo per mettere in evidenza quei microrganismi che sono presenti nel campione in numero relativamente elevato da essere presenti in numero consistente anche in sub campioni di volume ridotto. Dopo incubazione del campione, il numero di colonie che si sviluppano permette di risalire al numero di batteri eterotrofi presenti per unità di volume del campione, partendo dal presupposto che ogni colonia sia stata originata da un solo microrganismo.

13.2.2 Apparecchiatura

- Attrezzature di base per un laboratorio di batteriologia.
- Apparecchi per sterilizzazione: autoclave, stufa a secco.
- Attrezzature per l'incubazione: armadi termostatici, frigo-termostato.
- Bilance tecniche ed analitiche.
- Cappa a flusso laminare, bunsen.
- Membrane filtranti e apparecchiature per filtrazione.
- Bottiglie e tubi per diluizione, beute, cilindri tarati,
- Pipette e micropipette, piastre di Petri monouso.
- Terreni disidratati.
- Acqua distillata.

13.2.3 Campionamento e conservazione dei campioni

Il campionamento va effettuato in condizioni asettiche. I campioni d'acqua vengono prelevati a varie quote mediante bottiglie Niskin disinfettate mediante lavaggio con HCl diluito al 10% o bottiglie monouso sterili e raccolti in flaconi sterili da 50 ml. All'atto del prelievo, il flacone sterile deve essere aperto avendo cura di non toccare né la parte interna del tappo che andrà a contatto con il campione prelevato, né l'interno del collo del flacone, e avendo cura di chiuderlo immediatamente. Nell'eseguire i prelievi si deve sempre avere cura di non riempire completamente il flacone al fine di consentire una efficace agitazione del campione al momento dell'analisi in laboratorio.

Tutti i campioni di acqua devono essere esaminati nel minore tempo possibile; il trasporto deve avvenire in modo che essi siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra 4° e 10°C.

13.2.4 Procedimento

I campioni giunti entro poche ore in laboratorio in cassette refrigerate, vengono seminati immediatamente nei terreni di coltura. Il campione (1 ml), viene diluito in 9 ml di acqua di mare sterile, omogeneizzato, e se necessario (a seconda della torbidità del campione) diluito ulteriormente (almeno 3 diluizioni). Quindi piccole quantità (0,1- 0,2 ml) del campione tal quale o diluito vengono seminate in due repliche direttamente su piastre di Marine Agar con una bacchetta sterile (*spread plate*) ed incubate a temperatura ambiente per 7 gg. Per quantità maggiori di liquido si possono utilizzare le membrane filtranti, grigliate e sterili (porosità 0,4 µm), ponendo la membrana sul terreno solido. Dopo incubazione le colonie sono contate manualmente o con l'aiuto di un apparecchio conta colonie. Le piastre che presentano una

crescita batterica confluyente devono essere scartate così come quelle che contengono colonie in numero minore di 3 e maggiore di 300.

13.2.5 Calcoli

Per ottenere la abbondanza dei batteri eterotrofi, come CFU ml⁻¹ (colonie formanti unità per unità di volume) si fa la somma del numero di colonie ottenuto in ciascuna piastra diviso il volume del liquido seminato. Per es. $(x_1+x_2+x_3+x_4+x_5+x_6)/(v_1+v_2+v_3+v_4+v_5+v_6)$, dove x= numero di colonie in ciascuna piastra e v= ml di campione seminato (0,1- 0,01 - 0,001ml).

13.3 MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA

13.3.1 Principio del metodo

Il campione d'acqua è raccolto su filtro (porosità 0,2 µm) e colorato con un fluorocromo specifico quale il 4'6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) per il DNA oppure Arancio di Acridina (AO) per DNA e RNA. L'operatore potrà quindi agevolmente distinguere, sul fondo scuro del filtro, le cellule presenti che appariranno colorate in blu o in verde (rispettivamente per DAPI o AO) e il materiale di origine detritica colorato in giallo o in rosso (rispettivamente per DAPI o AO). Nella Fig. 1 è riportato un campo microscopico colorato con DAPI.

La conta diretta delle cellule su filtro permette di stimare soltanto l'abbondanza batterica totale, perché non permette l'identificazione delle cellule su base metabolica né fornisce indicazioni sulla vitalità delle cellule.

13.3.2 Campionamento e conservazione del campione

I campioni d'acqua sono prelevati in condizioni asettiche come descritto nel paragrafo precedente. Aliquote di acqua (in genere da 10 a 50 ml) sono raccolte in provette sterili di polipropilene rapidamente, per evitare la sedimentazione delle cellule nelle stesse bottiglie di prelievo. Entro 3 h dal prelievo, il campione deve essere fissato con formaldeide al 37% sterilizzata per filtrazione su membrana di porosità 0,22 µm (concentrazione finale pari al 2%: su 50 ml di campione 2,5 ml di formaldeide). Dopo l'aggiunta del fissativo, il campione va agitato e conservato al buio a 4°C. I campioni devono essere filtrati in tempi molto brevi e montati su vetrini da microscopio. I preparati possono così essere conservati a -20 °C, senza subire alterazioni, fino ad un massimo di 70 giorni.

13.3.3 Apparecchiatura

- Provette sterili (tipo Falcon) in polipropilene da 10-50 ml, monouso.
- Filtri a membrana in policarbonato neri, 25 mm di diametro, porosità 0,22µm.
- Siringa e supporto per filtri sterili completo di filtro a porosità 0,22µm.
- Cappa chimica.
- Apparati sterili per filtrazione (filtro di porosità 0,22 µm) di soluzioni acquose e aldeidi.
- Apparato di filtrazione completo di pompa aspirante con manometro, beuta da vuoto, portafiltro e imbuto da filtrazione (diametro 25 mm), pinze a molla per fissare l'imbuto alla base e pinzetta per filtri.
- Vetrini da microscopio completi di coprioggetti accuratamente puliti (precleaned).

-
- Olio da immersione per microscopio a ridotta fluorescenza (indice di rifrazione 1,1518) (tipo Cargille).
 - Micropipette e puntali sterili.
 - Congelatore e frigorifero per la conservazione dei campioni e delle soluzioni.
 - Autoclave.
 - Guanti monouso.
 - Apparato per la produzione di acqua ultrapura (Milli-Q).
 - Microscopio ad epifluorescenza dotato di lampada a vapori di mercurio HBO da 100W, oculari 10x di cui uno dotato di reticolo quadrettato, obiettivo ad immersione 100x. Combinazione di filtri: DAPI: filtro di eccitazione G365, ripartitore cromatico FT395, filtro di sbarramento LP420; Arancio di Acridina: filtro di eccitazione BP450-490, ripartitore cromatico FT510 e filtro di sbarramento LP515.

13.3.4 Reagenti

- Formaldeide al 37% filtrata attraverso filtri da 0,2 μm .
- Soluzione DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindolo). Sciogliere il sale (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) in acqua ultrapura. Oppure soluzione di Arancio di Acridina (3,6-bis [dimetilamino] cloruro di acridinio) 0,025% (p/v). Per entrambi i fluorocromi, filtrare su 0,2 μm utilizzando la siringa o l'apparato di filtrazione sterile.

13.3.5 Procedimento

L'allestimento dei vetrini per il conteggio viene effettuato secondo quanto suggerito da Porter e Feig (1980), se il fluorocromo adoperato è il DAPI, e secondo Hobbie *et al.* (1977) se si adoperava l'AO. Subcampioni di volume variabile (da 0,5 a 10 ml o più), a seconda delle caratteristiche trofiche delle acque e della profondità dell'ambiente studiato, sono posti nell'apparato di filtrazione predisposto con filtri a membrana nera in policarbonato (diametro 25 mm, porosità 0,22 μm). Al campione viene quindi aggiunta la soluzione di DAPI (100 μl per ml di campione; tempo di esposizione 7-10 min.), oppure di Arancio di Acridina (concentrazione finale 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$; tempo di esposizione 5 min). Trascorso il tempo necessario per colorare le cellule si procede alla filtrazione. Per evitare il danneggiamento delle cellule, la pressione del vuoto esercitata dalla pompa di filtrazione non deve superare gli 80 mm Hg.

Rimuovere il filtro e porlo su un vetrino portaoggetto sul quale è stata applicata una goccia di olio da immersione. Aggiungere una goccia d'olio anche sul filtro prima di porre il vetrino coprioggetto.

Per l'Arancio di Acridina prima dell'osservazione al microscopio aggiungere una goccia di acqua sterile tra il vetrino portaoggetti e il vetrino coprioggetto per una miglior visualizzazione del preparato.

Il filtro così montato può essere conservato per un massimo di 70 giorni, a -20°C .

13.3.6 Osservazione al microscopio

Al momento dell'osservazione si pone una goccia di olio da immersione sul vetrino coprioggetto e si procede alla determinazione dell'abbondanza cellulare tramite conteggio al microscopio ad epifluorescenza. Il campione deve essere distribuito uniformemente sul filtro con una densità ottimale di 20-50 cellule per campo. È necessario osservare da 20 a 40 campi distribuiti con criterio di casualità su tutta l'area del filtro ed un totale di almeno 300 cellule per avere un errore stocastico minore del 10%. È raccomandabile la preparazione e la lettura di almeno 3 repliche per campione.

13.3.7 Calcoli

Per risalire al numero di cellule per ml di campione viene applicata la seguente formula:

$$Cell / ml = (N \times area\ del\ filtro \times 1,05) / area\ del\ campo \times V$$

dove:

- N = numero medio di cellule nei campi esplorati.
- V = volume di campione filtrato (ml).
- 1,05 = fattore di correzione per campioni fissati con formalina.
- Area del filtro = si intende l'area in cui è deposto il campione e non quella totale (mm²).
- Area del campo = può corrispondere all'intero campo visivo o all'area di un reticolo inserito nell'oculare (mm²).
- Ai fini del calcolo un campo senza cellule va considerato come un campo esplorato.

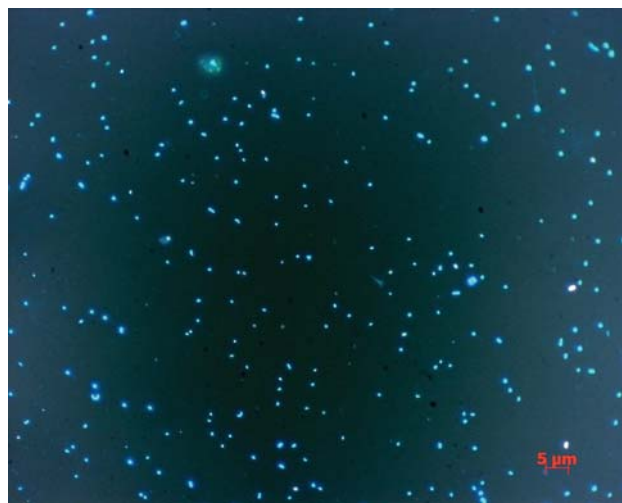


Fig.1 - Cellule di procarioti colorati con DAPI e osservati in microscopia ad epifluorescenza a 1000x. (foto di Giovanna Maimone)

13.3.8 Analisi morfometriche e stime di biomassa

I risultati del conteggio cellulare possono essere integrati con i dati relativi al volume cellulare al fine di ottenere una stima della biomassa batterica. Le tecniche più diffuse per la stima del biovolume batterico sono la microscopia confocale (Bloem *et al.*, 1995) e ad epifluorescenza (Daims *et al.*, 2007). L'analizzatore di immagine, associato ad una camera digitale e ad un software per il trattamento di immagini, consente di acquisire ed archiviare una serie di immagini digitali che saranno utilizzate successivamente per condurre l'analisi morfometrica. Il numero di immagini acquisite per ogni vetrino dipende dalla qualità del campione e del preparato. I pixel che costituiscono l'alone caratteristico della fluorescenza sono eliminati attraverso l'utilizzo di specifici filtri selettivi, mentre filtri di segmentazione rendono le immagini binarie e pronte per la misura (Bloem *et al.*, 1995; Massana *et al.*, 1997; Shopov *et al.*, 2000). La stima del volume delle singole cellule si effettua misurando il diametro maggiore delle cellule (lunghezza, L) e perpendicolarmente ad esso il diametro minore (larghezza, W). Il volume cellulare è stimato in µm³, assumendo come sferica la forma dei cocci e cilindrica, con le estremità emisferiche, quella dei bastoncelli (Massana *et al.*, 1997). La misura dell'asse centrale per i vibrioni e gli spirilli potrebbe incontrare qualche difficoltà vista la presenza di zone ricurve, ma fornisce ugualmente una valida stima delle dimensioni reali (Fry, 1990). Il sistema può essere calibrato in modo più accurato utilizzando biglie in lattice fluorescenti a dimensione nota (Sieraki *et al.*, 1989). Per il calcolo del biovolume sono applicate

le formule proposte da Bratbak (1985):

$$\begin{array}{ll} \text{per i cocchi:} & V (\mu\text{m}^3) = (\pi/6)L^3 \\ \text{per gli altri morfotipi:} & V (\mu\text{m}^3) = (\pi/4)W^2(L-W/3) \end{array}$$

Per ottenere un volume medio rappresentativo, per ogni campione devono essere misurate almeno 200 cellule (Bratbak, 1993). Per calcolare il contenuto di carbonio cellulare (CC) espresso in fg C cell^{-1} , al volume cellulare medio ricavato per singolo campione (V), vengono applicati i seguenti fattori: per i campioni colorati con DAPI è preferibile adoperare la relazione allometrica $\text{CC} = 218 \times V^{0.86}$ proposta da Loferer-Krößbacher *et al.* (1998); per quelli colorati con AO si utilizza la relazione allometrica $\text{CC} = 120 \times V^{0.72}$ proposta da Norland (1993).

La biomassa del batterioplancton totale ($\mu\text{g C l}^{-1}$) è quindi calcolata moltiplicando l'abbondanza cellulare per il CC derivato dal volume cellulare del campione.

13.4 QUANTIFICAZIONE DEI LIPOPOLISACCARIDI

13.4.1 Principio del metodo

Il lipopolisaccaride (LPS) è un costituente della parete cellulare di tutti i batteri gram-negativi, inclusi i procarioti fotosintetici. Il lipopolisaccaride è una molecola tossica, purificata biochimicamente, trovata nelle endotossine, termine usato in modo generico per indicare i LPS ed altre sostanze strettamente associate con essi nella parete delle cellule. I LPS sono presenti nell'acqua di mare e la loro misura può essere utilizzata come un indicatore della biomassa batterica nell'ambiente marino.

Per determinare e quantificare la presenza di LPS in un campione in soluzione, viene utilizzato il LAL test, che adopera il *Limulus Amoebocyte Lysate* ricavato da *Limulus polyphemus*. Quanto maggiore è la concentrazione di LPS nel campione, tanto più rapida è l'emissione di colore (misurata come densità ottica) derivata dall'agglutinazione degli amebociti e quindi dalla reazione LAL-LPS.

13.4.2 Campionamento e conservazione del campione

I campioni, prelevati asepticamente come sopra descritto, vengono posti in provette apirogene, conservati a -20°C e analizzati quanto prima (non oltre 10 gg) per evitare una perdita di endotossina.

13.4.3 Materiali e strumentazione

- Kit LAL per metodo cromogenico.
- Micropiastre apirogene (si raccomanda l'uso di micropiastre coperte, multi-pozzetto).
- Provette da saggio (provette in vetro borosilicato, da 10x75 mm, apirogene).
- Supporti per provette.
- Pipette, micropipette o pipettatore automatico a ripetizione con puntali a perdere sterili, monouso, apirogeni.
- agitatore tipo Vortex.
- Acido acetico al 25%.
- Spettrofotometro dotato di un lettore automatico per micropiastre e di un software per la gestione ed elaborazione dei dati. È preferibile inoltre utilizzare uno spettrofotometro dotato del controllo della temperatura.

13.4.4 Procedimento

Per ottenere risultati validi occorre adottare una metodologia accurata. L'analisi prevede la miscelazione del campione d'acqua con il LAL, l'incubazione a 37 °C per 10 min, la successiva aggiunta del reattivo cromogeno e una ulteriore incubazione sempre a 37 °C per altri 6 min. La reazione è quindi bloccata con acido acetico al 25%. La quantità di endotossine nel campione è determinata dalla comparsa di un colore giallo paglierino nella soluzione, la cui assorbanza è letta nello spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 405 nm. La concentrazione di lipopolisaccaridi di ogni campione, espressa in ng di LPS ml⁻¹ è convertita in C utilizzando il fattore di conversione 6,35 proposto da Watson e Hobbie (1979).

13.5 Bibliografia

- AMANN R.J., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H. (1995) - Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**: 143-169.
- BIANCHI A., GIULIANO L. (1996) - Enumeration of viable bacteria in the marine pelagic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 174-177.
- BLOEM J., VENINGA. M., SHEPHERD J. (1995) - Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 926-936.
- BRATBAK G. (1993) - Microscope methods for measuring bacterial biovolume: epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds.), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*, Lewis Publisher, USA: 309-317.
- BRATBAK G., DUNDAS I. (1984) - Bacterial dry matter content and biomass estimations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**: 755-757.
- BRATBAK G. (1985) - Bacterial biovolume and biomass estimation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 1488-1493.
- DAIMS H., WAGNER M. (2007) - Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**: 237-248.
- DUCKLOW H.W., CARLSON C.A. (1992) - Oceanic bacterial production. In: Marshall K.C. (ed), *Advances in Microbial Ecology*, vol 12, Plenum Press, New York: 113-181.
- DUCKLOW H. (2000) - Bacterioplankton production and biomass in the oceans. In: Kirchman D. (ed.), *Microbial ecology of the oceans*, ch. 4, Wiley New York: 85-120.
- FRY J.C. (1990) - Direct methods and biomass estimation. *Methods Microbiol.*, **22**: 41-85.
- HOBBIE J.E., DALEY R., JASPER S. (1977) - Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 1225-1228.
- KARL D.M., BIRD D.F., BJÖRKMAN K., HOULIKAN T., SHACKELFORD R., TUPAS L. (1999) - Microorganisms in the accreted ice of Lake Vostok, Antarctica. *Science*, **286**: 2144-2147.
- KOGURE, K., U. SIMIDU, TAGA (1979) - A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**:415-420.
- LA FERLA R., LO GIUDICE A., MAIMONE G. (2004) - Morphology and LPS content for the estimation of marine bacterioplankton biomass in the Ionian Sea. *Sci. Mar.*, **68**: 23-31.
- LEE S., FUHRMAN A. (1987) - Relationship between biovolume and biomass of naturally derived bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 1298-1303.
- LOFERER-KRÖBBACHER M., KLIMA J., PSENNER R. (1998) - Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 688-694.
- MAEDA M., LEE W.J., TAGA N. (1983) - Distribution of lipopolysaccharide, an indicator of bacterial biomass, in subtropical areas of the sea. *Mar. Biol.*, **76**: 257-262.
- MANCUSO M., MACRÌ B., MONACO S., ZACCONE R., PARADISO M.L., CARUSO G., MARINO F. (2005a) - Aspetti microbiologici e anatomo-istologici in corso di flavobacteriosi in dentici (*Dentex dentex*) di allevamento. *Ittiopatologia: Rivista di patologia degli organismi acquatici*, **2**: 15-20.
- MANCUSO M., BASILE V., INNELLA G., MARINO F., CAVALIERI S., ZACCONE R (2005b) - *Mugil cephalus*: un campanello d'allarme della comparsa di focolai di pseudotubercolosi in *Dicentrarchus labrax* allevati in gabbie off-shore. *Biol. Mar. Medit.*, **12**: 195-197.

-
- MASSANA R., GASOL J.P., BJØRNSSEN P.K., BLACKBURN N., HANSTRÖM A., HIETANEN S., HYGUM B.H., KUPARINEN J., PEDROS-ALIÒ C. (1997) - Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Sci. Mar.* **61**: 397-407.
- MAUGERI T.L., ACOSTA POMAR L., BRUNI V. (1990) – Picoplankton. *Nova Thalassia*, **11**: 199-205.
- NORLAND S. (1993) – The relationship between biomass and volume of bacteria. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J., (eds), *Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton: 303-307.
- PORTER K.G., FEIG Y.S. (1980) -The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* **25**: 943-948.
- POSCH, T., LOFERER-KRÖßBACHER M., GAO G., ALFREIDER A., PERNTHALER J., PSENNER R. (2001) - Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors. *Aquat. Microb. Ecol.*, **25**: 55-63.
- SHOPOV A., WILLIAMS S.C., VERITY P.G. (2000) - Improvements in image analysis and fluorescence microscopy to discriminate and enumerate bacteria and viruses in aquatic samples. *Aquat. Microb. Ecol.*, **22**: 103–110.
- SIEBURTH J. McN. (1979) – Sea microbes. Oxford University Press Inc., New York: 491 pp.
- SIERACKI M.E., REICHENBACH S.E., WEBB K.L. (1989) - Evaluation of automated threshold selection methods for accurately sizing microscopic fluorescent cells by image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 2762–277.
- SMITH E.M., DEL GIORGIO P.A. (2003) - Low fractions of active bacteria in natural aquatic communities? *Aquat. Microb. Ecol.*, **31**: 203-208.
- WATSON S.W., NOVITSKY T.J., QUINBY H.L., VALOIS F.W. (1977) - Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 940-946.
- WATSON S.W., HOBBIE J.E. (1979) – Measurement of bacterial biomass of lipopolysaccharides. In: Conser-ton J.W., Colwell R.R., (eds), *Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology*. Philadelphia, ASTM: 82-88.
- WOESE C. R. (1987) - Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, **51**: 221-271.
- ZACCONI R., CARUSO G., CALÌ C., SCARFÒ R. (1998) - Primi dati sulla caratterizzazione microbiologica delle acque dell'Adriatico settentrionale. *Atti XII congresso AIOL.*, **2**: 487-497.
- ZACCONI R., CARUSO G., CALÌ C. (2002) - Heterotrophic bacteria in the Northern Adriatic Sea: seasonal changes and enzyme profile. *Marine Environmental Research*: **54** (1): 1-19.
- ZACCONI R., MANCUSO M., MODICA A., ZAMPINO D. (2005) – Microbiological indicators for aquaculture impact in Mar Piccolo (Taranto). *Aquacult. Int.*, **13** (1-2): 167-173.
- ZAMPINO D., ZACCONI R., LA FERLA R. (2004) - Determination of living and active bacterioplankton: a comparison of methods. *Chem. Ecol.*, **20**: 411-422.
- ZDANOWSKI M.K., FIGUEIRAS F. G. (1999) - CFU bacterial fraction in the estuarine upwelling ecosystem of Ria de Vigo, Spain: variability in abundance and their ecophysiological description. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **182**: 1-15.
- ZOBELL C.E. (1941) - Studies on marine bacteria I. The cultural requirement of heterotrophic aerobes *J. Mar. Res.*, **4**: 42-75.
- ZWEIFEL U. L., HAGSTRÖM Å. (1995) - Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 2180-2185.

CAPITOLO 14. ABBONDANZA E BIOMASSA DEL PICOFITOPLANCTON (MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA)

C. Caroppo, S. Vanucci, P. Del Negro, R.B. La Ferla, G. Maimone, T.L. Maugeri

carmela.caroppo@iamc.cnr.it

14.1 INTRODUZIONE

Il termine picofitoplancton, o picoplancton fototrofo, definisce l'insieme degli organismi fototrofi unicellulari appartenenti alla classe dimensionale compresa tra 0,2 e 2 μm (Sieburth *et al.*, 1978). Il picofitoplancton è costituito sia da organismi procariotici che eucariotici. La componente procariotica è rappresentata essenzialmente da cianobatteri, principalmente ascrivibili all'ordine delle Chroococcales, genere *Synechococcus* (Waterbury *et al.*, 1979), e da proclorofite del genere *Prochlorococcus* (Chisholm *et al.*, 1988). La componente eucariotica è costituita da un insieme eterogeneo di organismi appartenenti a differenti gruppi tassonomici (e.g. primnesiofitee, clorofitee, prasinofitee, crisofitee) (Johnson e Sieburth, 1982; Stockner e Antia, 1986). Il picofitoplancton è presente in tutti gli ambienti acquatici; negli ambienti marini pelagici riveste un ruolo ecologico di rilievo contribuendo in maniera preponderante alla produttività primaria ed alla biomassa autotrofa di questi ecosistemi (Raven, 1998).

Le tecniche più utilizzate per la stima dell'abbondanza e della biomassa del picofitoplancton sono la microscopia ad epifluorescenza e la citometria a flusso.

La microscopia ad epifluorescenza ha il vantaggio di essere di semplice applicazione e di consentire facilmente la distinzione delle cellule picofitoplanctoniche da quelle fitoplanctoniche di dimensioni maggiori e dalle particelle di detrito; la citometria a flusso, applicando ottiche molto avanzate, permette di discriminare minime variazioni qualitative e quantitative di fluorescenza ed identificare quindi anche organismi caratterizzati da autofluorescenza molto debole quali le proclorofite, difficilmente visibili in microscopia ad epifluorescenza.

14.2 MICROSCOPIA AD EPIFLUORESCENZA E PRINCIPIO DEL METODO

Il principio del metodo della microscopia ad epifluorescenza si basa sulla visualizzazione delle cellule che posseggono pigmenti fotosintetici che, eccitati con luce di opportuna lunghezza d'onda, emettono fluorescenza naturale (autofluorescenza).

Prerogativa per l'applicazione del metodo è la modalità di trattamento e conservazione dei campioni, poiché solo le cellule che presentano pigmenti in buono stato possono essere visualizzate e contate.

Il metodo permette di discriminare gruppi differenti di organismi in base allo spettro di emissione di autofluorescenza che riflette una specifica composizione in fotopigmenti. I principali pigmenti fotosintetici sfruttati per il conteggio del picofitoplancton sono la clorofilla *a* (o la divinil-clorofilla *a* per le proclorofite) e le ficobiline, rappresentate da una varietà di ficocianine e ficoeritrine. La clorofilla *a*, pur essendo presente in tutti gli organismi picofitoplanctonici, è utilizzata per evidenziare gli eucarioti e le proclorofite, mentre le ficobiline per evidenziare i cianobatteri. Tra questi, si distinguono quelli con prevalenza in ficocianina, quelli con ficoeritrina di tipo I e quelli con ficoeritrina di tipo II (Wood *et al.*, 1985). In microscopia, fra le popolazioni marine è possibile distinguerne alcune di diversa valenza ecologica in base alle ficobiline predominanti ed al tipo di ficoeritrina (Fig. 1).

La clorofilla *a* presenta un massimo di assorbimento a 420-440 nm (violetto-blu) ed emette fluorescenza a 670-690 nm (rosso scuro). Le ficocianine, presenti in tutti i cianobatteri, compreso il genere *Synechococcus* (e.g. Olson *et al.*, 1988), assorbono lunghezze d'onda arancio-rosso (620-650 nm) ed emettono

fluorescenza nel rosso vivo (640-660 nm). La ficoeritrina di tipo I contiene, in varie proporzioni, entrambi i cromofori ficourobilina (PUB) e ficoeritrobilina (PEB) che presentano rispettivamente un massimo di assorbimento a 490-500 nm (blu) ed a 540-565 nm (verde); la ficoeritrina di tipo II ha solo il cromoforo PEB ed un massimo di assorbimento a 540-565 nm. Entrambi i tipi di ficoeritrine quindi, assorbono luce verde ed emettono fluorescenza giallo-arancio (550-580 nm), mentre solo la ficoeritrina di tipo I assorbe efficientemente anche la luce blu. Occorre tener presente che la fissazione chimica e la conservazione dei campioni modificano la struttura dei pigmenti. Tali cambiamenti strutturali si riflettono in moderate variazioni degli spettri di eccitazione e di emissione, oltre che nell'intensità dell'autofluorescenza (MacIsaac e Stockner, 1993).

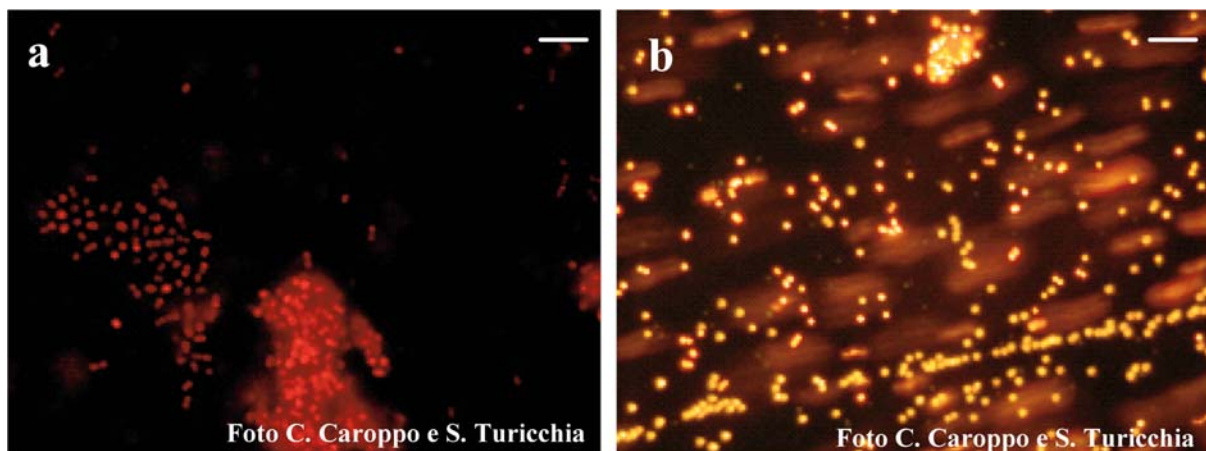


Fig. 1 - Microscopia ad epifluorescenza di cianobatteri isolati e mantenuti in coltura; a) microorganismi con prevalenza in ficocianina; b) microorganismi con prevalenza in ficoeritrina (barra = 10 μ m).

Ciò premesso, per il conteggio del picofitoplancton, in campioni naturali fissati, sono necessari due set di filtri ottici che dovrebbero essere ottimali per l'eccitazione e la fluorescenza di cellule fissate: (i) un set per l'eccitazione della clorofilla *a* e della ficoeritrina di tipo I; (ii) un set per l'eccitazione delle ficocianine e della ficoeritrina di tipo II. MacIsaac e Stockner (1993) hanno proposto un set di filtri con campo di eccitazione nel violetto-blu (filtro di eccitazione BP 395-500 nm, ripartitore cromatico FT 510 nm e filtro di sbarramento LP 520 nm) per un'eccitazione ottimale della clorofilla *a* e della ficoeritrina di tipo I nei campioni fissati; più comunemente, come primo set di filtri viene utilizzato uno con campo di eccitazione nel blu (BP 450-490 nm, ripartitore cromatico FT 510 nm e filtro di sbarramento LP 520 nm). Il secondo set di filtri più comunemente usato presenta un campo di eccitazione nel verde-giallo (filtro di eccitazione BP 520-560 nm ripartitore cromatico FT 580 nm e filtro di sbarramento LP 590 nm). Sebbene il massimo di eccitazione della ficocianina sia a lunghezze d'onda >560 nm, i picchi di assorbimento sono abbastanza larghi per una sufficiente eccitazione ed autofluorescenza; allo stesso modo, sebbene il massimo di emissione in autofluorescenza della ficoeritrina di tipo II sia a lunghezze d'onda <590 nm, la fluorescenza che si osserva a lunghezze d'onda maggiori è normalmente sufficiente per permetterne una discriminazione (Tab. 1).

Tab. 1 - (A) Caratteristiche spettrali di assorbimento e di emissione dei principali pigmenti del picofitoplancton. (B) Caratteristiche ottiche dei set dei filtri usati per la visualizzazione dei diversi organismi picofitoplanctonici.

A				B				
Picoplancton	Pigmenti	Cromoforo	Assorbimento	Emissione	Set di filtri ottici*			Colore di emissione
autotrofo			nm	nm	BP	FT	LP	
					nm	nm	nm	
Eucarioti	clorofilla <i>a</i>		420-440	670-690	BP 450-490	FT 510	LP 520	rosso scuro
Proclorofite	divinil-clorofilla <i>a</i>				BP 450-490	FT 510	LP 520	rosso scuro
Cianobatteri	ficocianine		620-650	640-660	BP 520-560	FT 580	LP 590	rosso
Cianobatteri	ficoeritrine di tipo I	PUB	490-500					
		PEB	540-565	550-580	BP 450-490	FT 510	LP 520	giallo-arancio
Cianobatteri	ficoeritrine di tipo II	PEB	540-565	550-580	BP 520-560	FT 580	LP 590	arancio-rosso

* Filtro di eccitazione = BP; Ripartitore Cromatico = FT; Filtro di Sbarramento = LP

14.3 MATERIALE RICHIESTO

14.3.1 Attrezzatura

- Microscopio equipaggiato per l'epifluorescenza dotato di: (i) lampada a vapori di mercurio ad alta pressione (100-, 200W); (ii) obiettivo ad immersione 100x ad alta apertura numerica e fondo piatto, tipo Neofluor; (iii) oculari da 8 a 12,5x dotati di reticolo quadrettato e di micrometro; (iv) set di filtri ottici (ogni set è costituito da: filtro di eccitazione/lamina dicroica/filtro di sbarramento) interscambiabili ed appropriati per l'autofluorescenza della clorofilla *a* (BP450-490/FT510/LP520) e dei pigmenti accessori dei cianobatteri (BP520-560/ FT580/LP590); (v) dispositivo di scorrimento veloce per il passaggio rapido da un set di filtri all'altro;
- tavolino traslatore graduato e vetrino micrometrico;
- congelatore e frigorifero;
- autoclave;
- cappa chimica;
- apparato di filtrazione completo di pompa aspirante con manometro, beuta da vuoto, portafiltro del diametro di 25 mm, imbuto da filtrazione e pinze per fissare l'imbuto alla base.

14.3.2 Materiale

- Normale materiale da laboratorio. La vetreria che entra in contatto con il campione deve essere accuratamente lavata e sterilizzata. La sterilità è raccomandabile al fine di eliminare materiale detritico e batterico estraneo al campione da analizzare che può rendere l'osservazione microscopica più difficoltosa;
- contenitori sterili in materiale plastico o vetro da 250 ml;
- siringhe e filtri da siringa sterili di porosità 0,22 μm ;
- filtri a membrana di policarbonato neri ("black-stained", e.g. Nuclepore®) o di ossido di alluminio (Anopore®) con porosità nominale di 0,2 μm e diametro di 25 mm;
- filtri in cellulosa (diametro di 25 mm, porosità 0,45 - 0,8 μm) di supporto ai filtri in policarbonato per facilitare una distribuzione uniforme delle cellule sulla superficie di questi ultimi;

-
- vetrini portaoggetto e coprioggetto;
 - siringhe sterili monouso, filtri da siringa monouso di diametro 21 mm e porosità 0,22 µm;
 - olio non fluorescente per microscopia ad immersione (e.g. Cargille tipo FF);
 - micropipette, puntali sterili, pinzette per filtri a membrana e guanti monouso.

14.3.3 Prodotti chimici

- Glutaraldeide (25%)
- Paraformaldeide

Entrambi i tipi di fissativi possono essere utilizzati aggiungendo volumi opportuni in modo da raggiungere, nel campione da analizzare, la concentrazione finale di 1% di glutaraldeide oppure di 0,1 - 0,2% di paraformaldeide (Hall, 1991). Generalmente si preferisce utilizzare la glutaraldeide poiché modifica poco la struttura delle cellule (Callieri e Stockner, 2002 e bibliografia in esso riportata).

14.3.4 Preparazione delle soluzioni

Tutte le soluzioni stock appena preparate devono essere filtrate su 0,22 µm e conservate al buio a 4 °C fino al momento del loro utilizzo.

Soluzione stock di glutaraldeide

La soluzione stock di glutaraldeide deve essere preparata a fresco per diluizione utilizzando acqua di mare sterile, in modo che raggiunga la concentrazione finale del 10%.

Soluzione stock di paraformaldeide

La soluzione stock di paraformaldeide al 10% viene preparata sciogliendo 10 g di paraformaldeide in 85 ml di acqua distillata alla temperatura di 70 °C. Il valore di pH (7,0 – 8,0) deve essere controllato ed eventualmente corretto aggiungendo NaOH. Maggiori dettagli per la preparazione di questo stock sono riportati in Hall (1991).

14.4 PROCEDIMENTO

14.4.1 Campionamento e fissazione del campione

Il prelievo dei campioni d'acqua prevede l'utilizzo di un campionatore batteriologico. Qualora ciò non fosse possibile, si può utilizzare un campionatore oceanografico tipo Niskin, sciacquato ripetutamente, prima dell'uso, con acido diluito e quindi con acqua distillata sterile (Sieburth, 1979).

I campioni, appena raccolti, vanno versati in bottiglie di vetro scuro o di polycarbonato sterili oscurate con carta stagnola. Il volume d'acqua da campionare dipende dal tipo di ambiente in cui si opera e per ogni campione devono essere prelevate almeno due aliquote. Nel caso di acque costiere, a puro titolo orientativo, si consiglia di raccogliere due aliquote di 100 ml per ogni campione.

I campioni vengono immediatamente fissati con la soluzione stock di glutaraldeide o paraformaldeide precedentemente preparata. Subito dopo la fissazione i campioni vengono posti al buio a 4 °C. In queste condizioni i campioni possono essere conservati per poche settimane prima della preparazione dei vetrini.

14.4.2 Filtrazione e preparazione del vetrino

Al fine di ottenere una valutazione significativa dell'abbondanza del picofitoplancton per ogni campione d'acqua devono essere preparati tre vetrini, ovvero tre repliche. Si procede quindi come di seguito riportato.

- Predisporre l'apparato di filtrazione ponendo con le apposite pinze il filtro nero di porosità pari a 0,22 μm sopra al filtro bagnato di supporto. Il filtro di supporto può essere utilizzato per numerose preparazioni. Fissare l'imbuto da filtrazione alla base con le pinze a molla.
- Introdurre un'aliquota di campione (da 10 a 15 ml in relazione allo stato trofico dell'ecosistema in esame).
- Procedere alla filtrazione esercitando una pressione di aspirazione non superiore a 5 KPa per evitare il danneggiamento delle cellule.
- Prelevare il filtro appena risulta privo di acqua.
- Appoggiare il filtro (ponendo la parte di raccolta verso l'alto) al centro del vetrino portaoggetto su cui è stata precedentemente posta una piccola goccia di olio ad immersione.
- Porre un'altra goccia di olio sulla superficie del filtro e montare il vetrino coprioggetto esercitando una leggera pressione fino a che l'olio abbia ricoperto il filtro. Nel caso in cui il preparato debba essere conservato è consigliabile verificare al microscopio la qualità dell'immagine, controllando, in particolare, che l'immagine giaccia su un solo piano focale e che le cellule siano uniformemente distribuite sul filtro.
- Osservare immediatamente il vetrino oppure preservare il vetrino, in posizione orizzontale, a 4 °C ed al buio per pochi giorni o, ancora, congelare a -20 °C fino all'osservazione microscopica (entro alcuni mesi dalla preparazione del vetrino). Evitare il ricongelamento del vetrino.
- Per una conservazione prolungata è possibile anche filtrare il campione immediatamente dopo il prelievo e la fissazione e riporre il filtro in una capsula Petri sterile a -20 °C. Soltanto al momento dell'analisi microscopica montare il filtro sul vetrino secondo le modalità sopra descritte. Tuttavia, l'esperienza ha evidenziato che l'osservazione microscopica del vetrino deve essere effettuata nel più breve tempo possibile per evitare il decadimento dell'autofluorescenza.

14.4.3 Note

Per la preparazione del vetrino, alcuni autori propongono l'utilizzo del glicerolo al 50% anziché l'olio per immersione a bassa fluorescenza, in quanto favorirebbe l'azione di disaccoppiamento delle ficoeritrine aumentandone l'autofluorescenza (Wyman, 1992).

14.4.4 Osservazione al microscopio

L'osservazione al microscopio ad epifluorescenza deve essere effettuata ad un ingrandimento di 1000-1250x. Il campo ottico viene inizialmente eccitato con luce blu (BP450-490/FT510/LP520): le cellule eucariotiche e le prochlorofite fluorescono in rosso scuro, mentre i cianobatteri con la ficoeritrina di tipo I fluorescono in giallo-arancio (Fig. 2). Occorre sottolineare che le prochlorofite, a seguito delle loro piccolissime dimensioni (0,6 μm), emettono una fluorescenza molto flebile che ne rende problematica la loro visualizzazione ed è quindi consigliabile effettuare il loro conteggio tramite citometria a flusso. Nei campioni naturali, i cianobatteri con prevalenza in ficocianina o con ficoeritrina di tipo II, eccitati con luce blu sono difficilmente visibili in quanto emettono una fluorescenza debole o assente (Fahnenstiel e Carrick 1992; MacIsaac e Stockner, 1993). Lo stesso campo ottico viene quindi eccitato con luce verde-giallo (P520-560/FT580/LP590) (tramite il passaggio rapido dal primo set di filtri al secondo) per

evidenziare, assieme ai cianobatteri di tipo I, anche i cianobatteri con prevalenza in ficocianina o con ficoeritrina di tipo II che emettono fluorescenza rispettivamente nel rosso e nell'arancio-rosso (Tab. 1). Il conteggio si effettua su un numero di campi scelti casualmente, non inferiore a 20 e tale da consentire l'identificazione di almeno 100 cellule appartenenti ad ogni gruppo funzionale.

La microscopia ad epifluorescenza non consente di effettuare riconoscimenti tassonomici; ciononostante alcuni dettagli sulla forma e sulle dimensioni delle cellule possono essere utili per ulteriori indagini. I cianobatteri del genere *Synechococcus* comprendono forme coccoidi, ovoidali, bastoncellari. Forme microcoloniali *Synechococcus*-like costituite da 4-50 individui e cianobatteri filamentosi tipo *Oscillatoria*, di dimensioni 4-30 μm , sono più comuni in ambienti d'acqua dolce. Gli organismi eucariotici sono generalmente coccoidi o flagellati ma il flagello è visibile soltanto utilizzando colorazioni con fluorocromi.

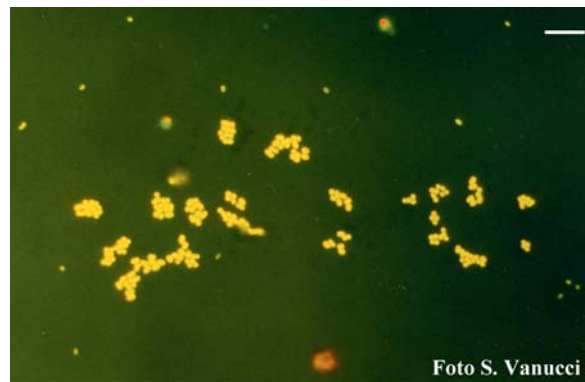


Fig. 2 - Microscopia ad epifluorescenza (eccitazione con luce blu). Cellule picofitoplanctoniche del Nord Adriatico: i cianobatteri di tipo I mostrano un colore giallo-arancio, gli eucarioti rosso (barra = 10 μm).

14.5 DETERMINAZIONE DELL' ABBONDANZA CELLULARE

$$AC = (N \times A \times K) / (a \times V)$$

Dove:

AC = Abbondanza cellulare (cell. ml^{-1})

N = media aritmetica del numero di cellule per campo

A = area di filtrazione (mm^2)

K = fattore di moltiplicazione: K = 1,11 nel caso si usi come fissativo la glutaraldeide; K=1,01 – 1,02 nel caso si usi come fissativo la paraformaldeide rispettivamente alle concentrazioni di 0,1-0,2%

a = area del campo visivo (mm^2)

V = Volume del campione filtrato (ml)

L'area di filtrazione (A) corrisponde all'area della sezione interna della colonna di filtrazione mentre l'area del campo visivo (a) può corrispondere all'intero campo o all'area di un reticolo inserito nell'oculare.

14.6 DETERMINAZIONE DELLA BIOMASSA CELLULARE

14.6.1 Volume cellulare

Il picofitoplancton costituisce una componente essenziale nel funzionamento degli ecosistemi acquatici

pertanto, negli studi ecologici, quantificarne la biomassa assume fondamentale importanza. Un metodo comunemente usato è quello di associare all'abbondanza il volume cellulare ed il relativo contenuto in termini di carbonio.

14.6.2 Misure essenziali e formule

Il metodo attualmente più utilizzato per la stima delle dimensioni cellulari è quello della microscopia ad epifluorescenza integrato con l'analisi di immagine, sebbene la citometria a flusso sia ritenuta il metodo più preciso.

L'analizzatore di immagine, costituito da una camera digitale, un computer e un software opportuno, consente di acquisire ed archiviare una serie di immagini digitali utilizzate successivamente per condurre l'analisi morfometrica e morfologica delle cellule. Il numero di immagini da acquisire per ogni vetrino dipende dalla qualità del campione e del preparato.

La stima del volume delle singole cellule si effettua misurando l'asse maggiore delle cellule (*lunghezza*, L) e perpendicolarmente ad essa l'asse minore (*larghezza*, W). I pixels che costituiscono l'alone caratteristico della fluorescenza sono esclusi dalla misura (Lee e Fuhrman, 1987). Il volume cellulare è stimato in μm^3 , assumendo come sferiche le forme coccoidi e cilindriche quelle ovoidali e bastoncellari (Massana *et al.*, 1997). Il sistema deve essere calibrato con biglie in lattice fluorescenti come riportato da Kirschner e Velimirov (1997).

Per il calcolo del biovolume sono applicate le formule proposte da Bratbak (1985):

$$\begin{array}{ll} \text{per forme coccoidi:} & V (\mu\text{m}^3) = (\pi/6) \times L^3 \\ \text{per forme ovoidali e bastoncellari:} & V (\mu\text{m}^3) = (\pi/4)W^2 \times (L-W/3) \end{array}$$

Per ottenere un adeguato volume medio, per ogni campione devono essere misurate almeno 200 cellule (Bratbak, 1993).

14.6.3 Conversione del volume cellulare in carbonio

Per calcolare il contenuto di Carbonio Cellulare (CC) espresso in fg C cell^{-1} , al volume cellulare medio ricavato per singolo campione (V) vengono applicati diversi fattori di conversione ricavati empiricamente. Per cellule di *Synechococcus*, quelli più recenti sono di $230 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ (Worden *et al.*, 2004) e $254 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ (Baudoux *et al.*, 2007). Per quanto riguarda invece cellule di *Prochlorococcus* e di picoeucarioti, i fattori di conversione maggiormente utilizzati sono rispettivamente $59 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ (Li e Harrison, 2001) e $1500 \text{ fg C } \mu\text{m}^{-3}$ (Zubkov *et al.*, 1998).

La Biomassa del picofitoplancton B ($\mu\text{g C l}^{-1}$) è calcolata moltiplicando l'Abbondanza Cellulare (AC) per il contenuto di Carbonio Cellulare (CC) derivato dal volume cellulare medio del campione.

14.7 BIBLIOGRAFIA

- BAUDOUX A.C., VELDHUIS M.J.W., WITTE H.J., BRUSSAARD C.P.D. (2007) - Viruses as mortality agents of picophytoplankton in the deep chlorophyll maximum layer during IRONAGES III. *Limnol. Oceanogr.*, **52**: 2519-2529.
- BRATBAK G. (1985) - Bacterial biovolume and biomass estimation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**: 1488-1493.
- BRATBAK G. (1993) - Microscope methods for measuring bacterial biovolume: epifluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and transmission electron microscopy. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publisher, USA: 309-317.
- CALLIERI C., STOCKNER J.G. (2002) - Freshwater autotrophic picoplankton: a review. *J. Limnol.*, **6**: 1-14.

-
- CHISHOLM S.W., OLSON R.J., ZETTLER E.R., GOERICKE R., WATERBURY J.B., WELSCHMEYER N.A. (1988) - A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, **334**: 340.
- FAHNENSTIEL G.L., CARRICK H.J. (1992) - Phototrophic Picoplankton in lakes Huron and Michigan: abundance, distribution, composition, and contribution to biomass and production. *Can. J. Aquat. Sci.*, **49**: 379-388.
- HALL J.A. (1991) - Long-term preservation of picophytoplankton for counting by fluorescence microscopy. *Br. Phycol. J.*, **26**: 169-174.
- JOHNSON P.W., SIEBURTH J. McN. (1982) - *In situ* morphology and occurrence of eukaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *J. Phycol.*, **18**: 318.
- KIRSCHNER A.K.T., VELIMIROV B. (1997) - A seasonal study of bacterial community succession in a temperate backwater indicated by variation in morphotype numbers, biomass and secondary production. *Microb. Ecol.*, **34**: 27-38.
- LEE S., FUHRMAN A. (1987) - Relationship between biovolume and biomass of naturally derived bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 1298-1303.
- LI W.K.W., HARRISON W.G. (2001) - Chlorophyll, bacteria and picophytoplankton in ecological provinces of the North Atlantic. *Deep-Sea Res. II*, **48** : 2271-2293.
- MACISAAC E.A., STOCKNER J.G. (1993) - Enumeration of phototrophic picoplankton by autofluorescence microscopy. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publisher, USA: 187-197.
- MASSANA R., GASOL J.P., BJØRNSSEN P.K., BLACKBURN N., HANSTRÖM A., HIETANEN S., HYGUM B.H., KUPARINEN J., PEDROS-ALIÒ C. (1997) - Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Sci. Mar.*, **6**: 397-407.
- OLSON R.J., CHISHOLM S.W., ZETTLER E.R., ARMBRUST E.V. (1988) - Analysis of *Synechococcus* pigment types in the sea using single and dual beam flow cytometry. *Deep-Sea Res.*, **35**: 425-440.
- RAVEN J.A. (1998) - The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Functional Ecology*, **12**: 503-513.
- SIEBURTH J. MCN. (1979) - *Sea Microbes*. Oxford University Press Inc., New York: pp. 491.
- SIEBURTH J.MCN., SMETACEK V., LENZ J. (1978) - Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.*, **23**: 1256-1263.
- STOCKNER J.G., ANTIA N.J. (1986) - Algal picophytoplankton from marine and freshwater ecosystems: a multidisciplinary perspective. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **43**: 2472.
- WATERBURY J.B., WATSON S.W., GUILLARD R.R.L., BRAND L.E. (1979) - Wide-spread occurrence of a unicellular, marine planktonic, cyanobacterium. *Nature*, **277**: 293-294.
- WOOD A.M., HORAN P.K., MUIRHEAD K., PHINNEY D.A., YENTISH M.C., WATERBURY J.B. (1985) - Discrimination between types of pigments in marine *Synechococcus* spp. by scanning spectroscopy, epifluorescence microscopy and flow cytometry. *Limnol. Oceanogr.*, **30**: 1303-1313.
- WORDEN A.Z., NOLAN J.K., PALENIK B. (2004) - Assessing the dynamics and ecology of marine picophytoplankton: the importance of the eukaryotic component. *Limnol. Oceanogr.*, **49**: 168-179.
- WYMAN M. (1992) - An *in vivo* method for the estimation of phycoerythrin concentrations in marine cyanobacteria (*Synechococcus* spp.). *Limnol. Oceanogr.*, **37**: 1300-1306.
- ZUBKOV M.V., SLEIGH M.A., TARRAN G.A., BURKILL P.H., LEAKEY R.J.G. (1998) - Picoplanktonic community structure on an Atlantic transect from 508N to 508S. *Deep-Sea Res. I*, **45**: 1339-1355.

CAPITOLO 15. ANALISI DELLA DIVERSITÀ BATTERICA MEDIANTE ARISA (AUTOMATED RIBOSOMAL INTERGENIC SPACER ANALYSIS)

G.M. Luna, R. Danovaro

g.luna@univpm.it

15.1 INTRODUZIONE

L'analisi della biodiversità dei Procarioti (Batteri ed Archaea) negli ecosistemi marini ha ricevuto, negli ultimi anni, una sempre crescente attenzione. Numerosi studi sono stati condotti per comprendere la biogeografia dei Procarioti marini, le dinamiche spazio-temporali ed i fattori che ne influenzano la biodiversità (Fuhrman et al., 2006). Tali studi vengono condotti utilizzando un'ampia gamma di tecniche bio-molecolari, che permettono di superare i noti problemi di "non-coltivabilità" dei Procarioti marini (Amann et al., 2001). Una tecnica largamente utilizzata si basa sul clonaggio ed il sequenziamento di geni ribosomali (il più utilizzato è il gene che codifica per la subunità 16S dell'RNA ribosomale); tuttavia, questa procedura è estremamente dispendiosa in termini di tempo, che ne limita un ampio utilizzo in campo ecologico, dove in genere è necessario processare un elevato numero di campioni e repliche. In alternativa, le tecniche di "fingerprinting molecolare" permettono di quantificare la ricchezza di taxa e la struttura di comunità in modo più rapido (Hewson e Fuhrman, 2004). Le tecniche di fingerprinting più utilizzate sono la T-RFLP applicata al gene 16S rRNA di Batteri o Archaea o Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (Marsh, 1999) e la tecnica ARISA applicata alla regione intergenica spaziatrice (ITS1) sull'operone ribosomale dei Batteri o Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis (Fisher e Triplett, 1999). Entrambe sono considerate più sensibili rispetto ad altri metodi di fingerprinting, quali la DGGE e la SSCP (Marsh, 1999; Fisher e Triplett, 1999), soprattutto per la loro capacità di identificare anche i taxa meno abbondanti. Uno studio recente ha inoltre dimostrato che l'ARISA fornisce una stima più accurata della biodiversità batterica rispetto alla T-RFLP (Danovaro et al., 2006). Ciò è dovuto al fatto che l'ARISA si basa sull'amplificazione della regione intergenica compresa tra i geni 16S e 23S sull'operone rRNA (nota anche come regione ITS1), caratterizzata da maggior variabilità in lunghezza e sequenza nucleotidica tra differenti specie batteriche rispetto al gene 16S rDNA (Daffonchio et al., 2003). Come per la T-RFLP, l'output di ogni analisi ARISA è costituito da un elettroferogramma (vedi sotto) che descrive con una buona accuratezza il numero di taxa presenti, definiti come OTU o "Operational Taxonomic Units" e corrispondenti al livello tassonomico di genere/specie, e la loro abbondanza relativa all'interno della comunità. Questo metodo viene oggi considerato il migliore per lo studio dei pattern di diversità batterica su un elevato numero di campioni (Hewson e Fuhrman, 2004; Luna et al., 2004; Luna et al., 2006; Fuhrman e Hagstrom, 2008). I vantaggi e gli svantaggi delle tecniche di fingerprinting molecolare, tra cui l'incapacità di identificare le specie quantitativamente meno rappresentate (specie "rare"), sono stati di recente discussi (Bent e Forney, 2008).

15.2 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

15.2.1 Attrezzatura

- Campionatore per batteri (anche bottiglia Niskin sterilizzata) o bottiglie sterili monouso.
- Filtri Nuclepore in policarbonato (diametro 47 mm, 0,2 µm di diametro medio dei pori).
- Provette sterili da 15 ml.

-
- Pipette da 5 ml e relativi puntali sterili.
 - Pinzette sterili.

15.3 PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO

1. Il prelievo dei campioni prevede l'utilizzo di una bottiglia da campionamento per batteri. Qualora ciò non fosse possibile si può utilizzare una bottiglia tipo Niskin, sciacquata ripetutamente prima dell'uso con acido cloridrico diluito e quindi con acqua distillata sterile.
2. I campioni (da un minimo di 50 ml fino a qualche litro, a seconda della tipologia di studio da effettuare) sono successivamente filtrati su filtri in policarbonato Nuclepore mediante pompa da vuoto (pressione <100 mmHg) e conservati all'interno di provette sterili ad una temperatura di -20°C o (preferibilmente) di -80°C fino all'estrazione del DNA, che deve essere effettuata non più tardi di 4 settimane dal campionamento.

Alcuni autori suggeriscono di prefiltrare il campione usando filtri GF/F (diametro 47 mm; porosità 0,7 µm) preventivamente sterilizzati mediante incubazione a 450°C per 2h. È bene chiarire che questa procedura porta ad una parziale perdita di biodiversità per esclusione delle cellule di maggiori dimensioni e/o delle cellule adese a particelle sospese; tuttavia, alcuni autori la ritengono utile per la rimozione dei microeucarioti, la cui presenza potrebbe alterare i risultati delle analisi di fingerprinting (Hewson e Fuhrman, 2004; Fuhrman et al., 2006).

15.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

Il metodo ARISA necessita che siano effettuate in sequenza le seguenti procedure:

1. Estrazione e purificazione di una quantità di DNA genomico sufficiente per la successiva amplificazione mediante PCR.
2. Quantificazione del DNA (necessaria per la determinazione della quantità di DNA estratto e impiegato nella reazione PCR).
3. Amplificazione mediante PCR della regione ITS1 (necessaria per disporre di una quantità sufficiente di DNA di tale regione genica).
4. Elettroforesi orizzontale dei prodotti PCR su gel di agarosio (necessaria per verificare che l'amplificazione sia avvenuta correttamente).
5. Purificazione dei prodotti PCR (necessaria per l'eliminazione di sali, Taq, *primers* ed altri reagenti utilizzati durante la reazione PCR).
6. Elettroforesi capillare dei prodotti purificati (consente di misurare la lunghezza in paia di basi e l'intensità relativa delle regioni ITS1 amplificate).
7. Analisi ed interpretazione dei risultati.

15.4.1 Estrazione e purificazione del DNA

L'estrazione del DNA da campioni di acqua si effettua generalmente tramite un kit commerciale (UltraClean Soil DNA Isolation kit MoBio). Questo kit permette un veloce isolamento di DNA da una vasta gamma di matrici ambientali. Per l'estrazione di DNA da campioni di acqua di mare, il kit viene adattato secondo la metodica indicata da Stepanauskas et al. (2003). In breve, a ciascun filtro vanno aggiunti 1,8 ml di Buffer di lisi (da preparare in laboratorio: 0,75 M saccarosio, 40 mM EDTA, 50 mM Tris [pH 8,3]), la soluzione Bead solution, 60 µl della soluzione S1 e 200 µl della soluzione IRS (fornite con il kit). Il campione così trattato viene quindi processato in accordo alla procedura descritta nel kit.

15.4.2 Quantificazione spettrofotometrica del DNA

Utilizzare solo cuvette al quarzo (passo 1 cm, volume interno 1 ml).

Impostare lo spettrofotometro sulla lunghezza d'onda di 260 nm. Se lo spettrofotometro è a due canali, inserire in entrambe le cuvette "Bianco" e "Campione" 1 ml di acqua ultrapura e quindi azzerare lo strumento.

- Scaricare l'acqua dalla cuvetta "Campione" ed inserire 990 μl di acqua grado reagente e 10 μl di ciascun campione di DNA.
- Misurare l'assorbanza a 260 nm. (ABS 260)
- Scaricare il liquido dalla cuvetta "Campione" e ripetere la procedura per tutti i campioni.
- Al termine della procedura, la concentrazione del DNA estratto è calcolata come segue: $\text{DNA (ng } \mu\text{l}^{-1}) = \text{ABS}_{260} * 50 * 100$, dove 100 è il fattore di diluizione del DNA nelle cuvette e 50 è il fattore di conversione da assorbanza a concentrazione di DNA (i.e. un'assorbanza di una unità [1,0] a 260 nm contiene approssimativamente 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ - o 50 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ - di dsDNA). La purezza del DNA può essere controllata misurando il rapporto tra assorbanza a 260 e a 280 nm. Un rapporto > 1,8 – 2,0 indica un DNA puro (ovvero privo di interferenza da proteine).

15.4.3 Amplificazione mediante PCR della regione ITS1

Diluire gli estratti di DNA a circa 5 $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$.

Preparare, per ciascun campione di DNA estratto, quattro provette PCR sterili da 200 μl , più una per il controllo positivo e una per il controllo negativo.

Per l'amplificazione, si raccomanda di usare il kit MasterTaq® (Eppendorf AG, Germania), che riduce l'effetto di potenziali inibitori della PCR co-estratti dal campione insieme al DNA.

Ciascuna provetta PCR conterrà:

- 1 μl di Taq Polimerasi (concentrazione della soluzione madre 1 Unità μl^{-1})
- 5 μl di 10x Taq Buffer contenente Mg^{2+}
- 10 μl di 5x "TaqMaster PCR Enhancer"
- 1 μl di nucleotidi (dNTPs, alla concentrazione di 10 mM)
- 0,5 μl del *primer forward* "16S-1392F" (5' -GYACACACCGCCCGT- 3') alla concentrazione di 100 μM
- 0,5 μl del *primer reverse* "23S-125R" (5' -GGGTTBCCCCATTCRG- 3'), marcato all'estremità 5' con il fluorocromo HEX, alla concentrazione di 100 μM .
- 31 μl di acqua ultrapura.
- 1 μl di campione di DNA.

Si consiglia di preparare una singola master mix, contenente tutti gli ingredienti (ad eccezione del DNA) per tutte le provette che saranno impiegate. La master mix andrà preparata per 2 ulteriori campioni, al fine di compensare possibili errori nelle pipettate (i.e. se il numero dei campioni è 10, considerare 40 [ciascun campione di DNA va trattato in 4 repliche] + 2 [per i due controlli PCR] + 2 = 44)

- Trasferire 49 μl della master mix in ciascuna provetta, quindi aggiungere il DNA del campione (1 μl , contenente circa 5 ng di DNA).
- Nel controllo negativo, aggiungere 1 μl di acqua ultrapura.
- Nel controllo positivo, aggiungere 1 μl contenente circa 1-5 ng di DNA genomico da *Escherichia coli* (SIGMA).
- Impostare le seguenti condizioni di reazione nel termociclatore: 30 cicli (consistenti di 94°C per 1 min., 55°C per 1 min. e 72°C per 2 min.), preceduti da 3 min. di denaturazione iniziale a 94°C e seguiti da una estensione finale di 10 min. a 72°C.

15.4.4 Elettroforesi orizzontale su Gel di Agarosio dei prodotti amplificati

- Preparare il gel di agarosio come segue:
 - pesare 0,35 g di agarosio,
 - aggiungere 35 ml di TBE 1X,
 - portare ad ebollizione fino alla dissoluzione dell'agarosio,
 - lasciar raffreddare il liquido (fino a circa 60° - 70°C) e aggiungere 1 µl di Bromuro di Etidio,
 - trasferire il liquido e lasciarlo solidificare a temperatura ambiente,
 - riempire la camera elettroforetica con TBE 1X,
 - inserire il gel orizzontalmente nella camera di elettroforesi e coprire con il buffer TBE 1X,
- Una volta che il gel è pronto, mescolare, su una striscia di parafilm oppure in una provetta sterile da PCR, aliquote di 5 µl di ciascun prodotto PCR con 1 µl di colorante.
- Caricare la soluzione in ciascun pozzetto.
Nel primo pozzetto di ciascun gel, trasferire 4 µl di marcatore di peso molecolare.
Posizionare il coperchio della vaschetta ed il connettore elettrico sul sistema, e fornire una corrente di 100 V per 25 min. Questi valori sono indicativi e potranno necessitare di ulteriore ottimizzazione. Si consiglia di verificare che la corrente sia effettivamente applicata dalla comparsa di bolle in prossimità degli elettrodi. Il DNA migrerà verso l'elettrodo positivo (di norma colorato in rosso).
- Alla fine della corsa elettroforetica, trasferire il gel su trans-illuminatore e verificare la presenza degli ampliconi attesi. Dal momento che la regione ITS1 ha una lunghezza variabile in diverse specie di batteri, nel gel appariranno diverse bande aventi lunghezza differente.

15.4.5 Purificazione dei prodotti PCR

- Prima di effettuare la purificazione, mescolare insieme in una singola provetta due repliche indipendenti di PCR ottenute dal campione. Questa procedura aiuta a minimizzare possibili errori o artefatti generati durante le PCR (Polz e Cavanaugh, 1998). In accordo a questo step, da questo momento in poi saranno analizzate due repliche ARISA per ciascun campione di DNA ottenuto.
Purificare i due prodotti PCR usando il "Wizard PCR clean-up system", seguendo attentamente la procedura indicata dalla casa produttrice.
- Quantificare il DNA purificato mediante spettrofotometro come descritto sopra.

15.4.6 Elettroforesi capillare dei frammenti ITS1

- L'elettroforesi capillare va effettuata utilizzando un sequenziatore ABI Prism 310 or 3100 (Applied Biosystems).
- Diluire gli amplificati purificati alla concentrazione di circa 5 ng µl⁻¹ e mescolare con un'opportuna aliquota di Standard Interno (GS2500-ROX), procedendo come indicato dalla ditta produttrice.
- Effettuare l'analisi dei frammenti ITS1 (nel range dimensionale range 390 - 1400 bp) utilizzando il software GeneScan® o similare (ad esempio, Peak Scanner™ software).

15.5 ANALISI ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

- Al termine dell'analisi, estrarre gli output numerici generati da GeneScan® e trasferirli in Microsoft Excel.

Rimuovere, da ogni profilo ottenuto, i picchi che non sono presenti in entrambe le repliche analizzate (i.e. i picchi “non-riproducibili”; Fig. 1), che si assume rappresentino artefatti generati dalla reazione di PCR durante l’amplificazione di template misti.

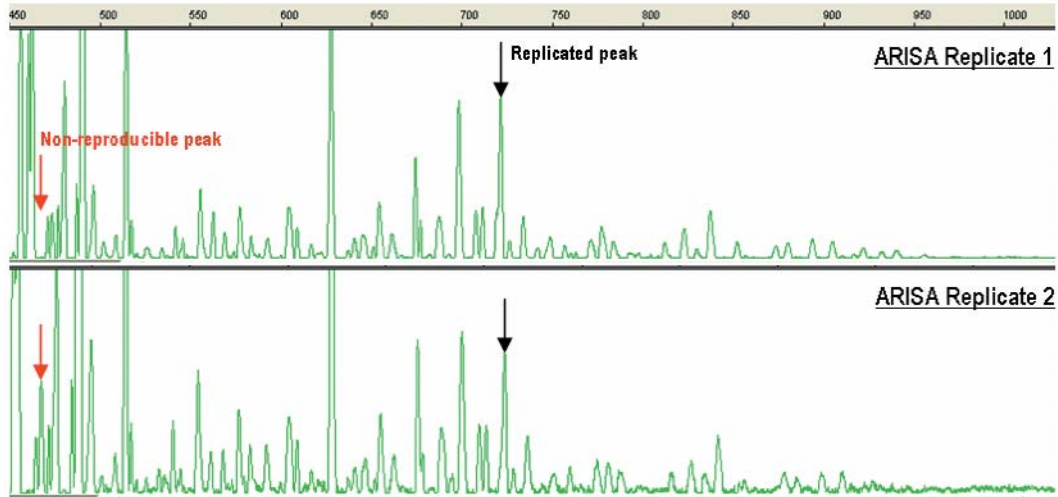


Fig. 1 - Tipico elettroferogramma duplicato ottenuto da un’analisi ARISA condotta su un campione marino. Ogni picco rappresenta un’ Unità Tassonomica Operazionale (“Operational Taxonomic Unit”, OTU), corrispondente ad un genere o una specie batterica presente nel campione. Le frecce nere indicano un esempio di picco “riproducibile” (considerato una “vera” OTU batterica), mentre quelle rosse indicano un picco “non-riproducibile” (i.e. presente solamente in una delle due repliche), che viene escluso dalle stime di biodiversità.

- Rimuovere quindi i picchi che si trovano ad una distanza inferiore di 1,5 paia di basi da un altro picco avente maggiore intensità di fluorescenza. Tali picchi sono definiti “spalla” (“shoulder peaks”, Fig. 2) e sono esclusi dalle successive analisi.

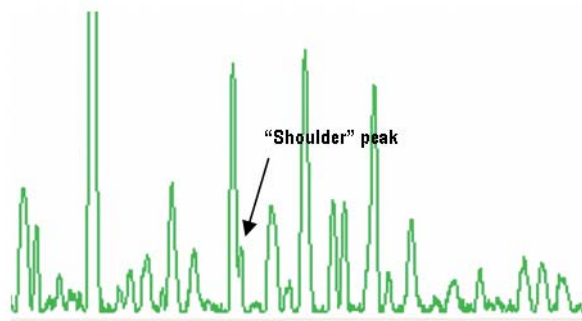


Fig. 2 - La freccia indica un tipico picco “spalla” (shoulder peak), che viene scartato dalle analisi.

- Per discriminare le OTU batteriche dalla fluorescenza di fondo, calcolare l’altezza totale integrata all’interno di ogni elettroferogramma, sommando l’altezza (“height”) di ogni picco. Quindi, calcolare l’abbondanza relativa (espressa come percentuale, %) di ogni picco ed escludere i picchi che contribuiscono per meno della 0,11% all’altezza totale integrata (Danovaro *et al.*, 2006). Al termine di questa procedura, la ricchezza di taxa batterici (“OTU richness”) viene definita come il numero di picchi rimasti nel campione. È possibile calcolare indici di diversità (ad esempio l’indice di Shannon – Wiener) oppure l’indice di equitabilità (Pielou), assumendo che l’altezza (“height”) di ogni picco rappresenti il contributo relativo di ogni OTU alla comunità batterica. Tali indici, in quanto ottenuti con tecniche di fingerprinting, devono tuttavia essere utilizzati con cautela in quanto fonte di potenziali errori, come recentemente dimostrato (Bent e Forney, 2008).

-
- I dati ottenuti con ARISA possono essere utilizzati per condurre analisi di β -diversità e confronti tra campioni in termini di composizione tassonomica e struttura di comunità, utilizzando software specifici, ad esempio Primer (Clarke, 1993).

15.6 SOLUZIONI E REAGENTI

- Buffer di lisi: 0,75 M saccarosio, 40 mM EDTA, 50 mM Tris [pH 8,3]
- Acqua ultrapura: acqua grado reagente, precedentemente autoclavata, filtrata (attraverso 0,2 μ m), dispensata in eppendorf sterili da 2 ml e conservata a 4°C o -20°C
- UltraClean™ Soil DNA Isolation Kit (MoBio, catalogo #12800-100)
- MasterTaq® kit (Eppendorf AG)
- Agarosio
- TBE 10X (può essere acquistato dalla BIORAD o da altre ditte o, in alternativa, preparato come segue: per 1 litro, pesare 108 g TRIS Base, 55 gr Boric Acid, 40 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 ed acqua grado reagente a volume)
- TBE 1X: diluire il TBE 10X (100 ml TBE 10X + 900ml di acqua grado reagente)
- Bromuro di Etidio (10 mg ml⁻¹ in acqua grado reagente)
- Colorante (“Loading dye 6X”; Promega, Fermentas o similare)
- Marcatore di peso molecolare 100 bp (Fermentas o similare)
- Wizard® PCR clean-up system (Promega)
- Standard Interno (GS2500-ROX; Applied Biosystems)

15.7 STRUMENTI

- Blocco termico ed incubatore per provette
- Centrifughe (adatte per provette da 2 ml o da 50 ml)
- Vortex
- Termociclatore
- Trans-illuminatore
- Spettrofotometro (UV-VIS)
- Apparato completo per elettroforesi orizzontale
- Sequenziatore ABI 310 o ABI 3100

15.8 NOTE/PROBLEMI

- In alcuni campioni (ad esempio quelli raccolti nel meso- e batipelagico), la quantità di DNA estratto può essere al di sotto dei limiti di detenzione dello spettrofotometro. In questo caso, si raccomanda di utilizzare metodi di quantificazione più sensibili, ad esempio metodi spettrofluorimetrici (Corinaldesi *et al.*, 2005).
- Il Bromuro di Etidio è un sospetto cancerogeno: si raccomanda di utilizzare tutte le procedure di sicurezza previste per questa classe di rischio.
- Alcuni autori hanno riportato prestazioni non ottimali dello Standard Interno GS2500-ROX, evidenti talora nella difficoltà di definire la taglia dei frammenti di maggiori dimensioni. Gli stessi autori suggeriscono di utilizzare, come alternativa, lo standard Map Marker 1000 X-Rhodamine (Bioventures; Hartmann *et al.*, 2005) oppure standard preparati in laboratorio (Fisher e Triplett, 1999; Fuhrman *et al.*, 2006).
- Differenti approcci sono riportati in letteratura riguardo la definizione della soglia di fluorescenza di fondo all'interno degli elettroferogrammi. Tale definizione è estremamente importante per di-

scriminare le vere OTU batteriche dalla fluorescenza strumentale. Tali approcci includono: 50 unità di fluorescenza come soglia minima per definire una OTU (Hartmann *et al.*, 2005), 100 unità di fluorescenza (Kent *et al.*, 2006) oppure 5 volte il livello di fondo generato da un campione non contenente DNA (Fuhrman *et al.*, 2006). L'approccio qui presentato (i.e. lo 0,11% dell'altezza totale come requisito minimo per definire una OTU) si basa su assunti di tipo ecologico riportati in Luna *et al.* (2006) e Danovaro *et al.* (2006).

15.9 BIBLIOGRAFIA

- AMANN R., FUCHS B.M., BEHRENS S. (2001) - The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**: 231-236.
- BENT S.J., FORNEY L.J. (2008) The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J.*, **2**: 689-695.
- CLARKE, K.R. (1993) - Non parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Austral. J. Ecol.*, **18**: 117-143.
- CORINALDESI C., DANOVARO R., DELL'ANNO A. (2005) - Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**: 46-50.
- DAFFONCHIO D., CHERIF A., BRUSETTI L., RIZZI A., MORA D., BOUDABOUS A., BORIN S. (2003) - Nature of polymorphisms in 16S - 23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of *Bacillus* and related genera. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 5128-5137.
- DANOVARO R., LUNA G.M., DELL'ANNO A., PIETRANGELI B. (2006) - Bacterial diversity in aquatic environments: comparison of two fingerprinting techniques (T-RFLP and ARISA). *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**: 5982-5989.
- FISHER M.M., TRIPLETT E.W. (1999) - Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 4630-4636.
- FUHRMAN J.A., HEWSON I., SCHWALBACH M.S., STEELE J.A., BROWN M.V., NAEEM S. (2006) - Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **103**: 13104-13109.
- FUHRMAN, J.A., HAGSTROM A. (2008) - Bacterial and Archaeal community structure and its patterns. In: Kirchman D.L. (ed), *Microbial ecology of the oceans*. John Wiley & Sons, Hoboken (New Jersey): 45-90.
- HARTMANN M., FREY B., KOLLIKER R., WIDMER F. (2005) - Semi-automated genetic analyses of soil microbial communities: comparison of T-RFLP and RISA based on descriptive and discriminative statistical approaches. *J. Microbiol. Meth.*, **61**: 349-360.
- HEWSON I., FUHRMAN J.A. (2004) - Richness and diversity of bacterioplankton species along an estuarine gradient in Moreton Bay, Australia. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 3425-3433.
- KENT A.D., JONES S.E., LAUSTER G.H., GRAHAM J.M., NEWTON R.J., MCMAHON K.D. (2006) - Experimental manipulations of microbial food web interactions in a humic lake: shifting biological drivers of bacterial community structure. *Environ. Microbiol.*, **8**: 1448-1459.
- LUNA G.M., DELL'ANNO A., GIULIANO L., DANOVARO R. (2004) - Bacterial diversity in deep Mediterranean sediments: relationship with the active bacterial fraction and substrate availability. *Environ. Microbiol.*, **6**: 745-753.
- LUNA G.M., DELL'ANNO A., DANOVARO R. (2006) - DNA extraction procedure: a critical issue for bacterial diversity assessment in marine sediments. *Environ. Microbiol.*, **8**: 308-320.
- MARSH T.L. (1999) - Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplicons. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**: 323-327.
- POLZ M.F., CAVANAUGH C.M. (1998) - Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3724-3730.
- STEPANAUSKAS R., MORAN M.A., BERGAMASCHI B.A., HOLLIBAUGH J.T. (2003) - Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system. *Aquat. Microb. Ecol.*, **31**: 85-98.

CAPITOLO 16. METODI MOLECOLARI PER LO STUDIO DELLA STRUTTURA E FUNZIONE DI COMUNITÀ MICROBICHE MARINE

R. Denaro, S. Cappello, M. Genovese, L. Giuliano, M.M. Yakimov

renata.denaro@iamc.cnr.it

16.1 INTRODUZIONE

La comprensione della struttura e delle proprietà metaboliche della comunità microbica naturale rappresenta una delle sfide più importanti dell'ecologia microbica.

Se si considera la straordinaria capacità di sopravvivenza dei microrganismi, vitali ma non coltivabili (VNBC, viable but not cultivable), in forme di resistenza (ultramicrobacteria, UMB; strutture sporali), risulta evidente che l'esclusiva applicazione di metodi colturali non garantisce una reale descrizione della comunità microbica. La scoperta della tecnica molecolare di PCR ha consentito nell'ultimo ventennio di approfondire significativamente la conoscenza sulla composizione delle comunità microbiche che popolano l'ambiente marino. La diretta identificazione dei microrganismi (indipendente dalla coltivazione) consente, infatti, da un lato di determinarne la presenza, dall'altro, mediante lo studio dell'RNA, di valutare l'attività del microrganismo target ed individuarne il ruolo nel comparto microbico.

Lo studio della struttura delle comunità microbiche è prevalentemente basato sull'analisi del gene ribosomiale 16S rDNA recante informazioni sulla tassonomia, mentre le analisi sulle attività metaboliche vengono solitamente effettuate su geni funzionali coinvolti in specifiche vie metaboliche.

Nonostante le moderne tecnologie molecolari della metagenomica, proteomica, trascrittomica, lipidomica metabolomica siano oggi considerate come promettenti soluzioni per l'esplorazione sulle comunità microbiche grazie alle ingenti quantità di informazioni fornite, alcune metodologie, come la *Fluorescence in situ hybridization* (FISH), la *Real Time-PCR* e la creazione di librerie di cloni del 16S rRNA, rimangono le tecniche più utilizzate, che verranno quindi di seguito trattate nel dettaglio.

In linea generale, lo studio funzionale e strutturale della comunità microbica può essere schematizzato come illustrato in Fig. 1.

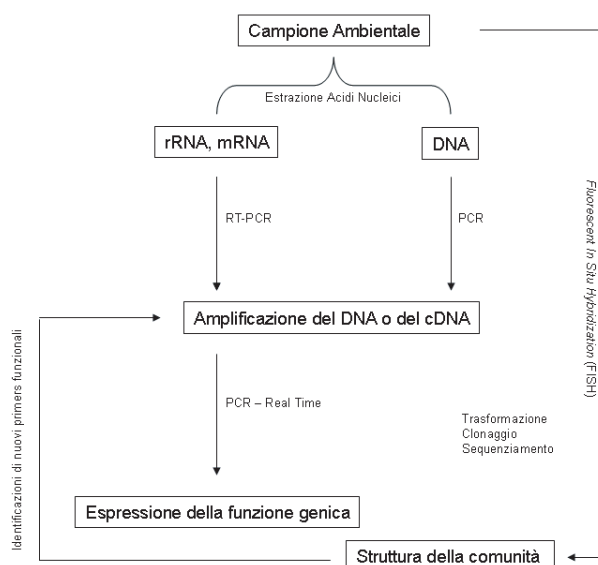


Fig. 1 – Metodi molecolari basati sull'analisi degli acidi nucleici (DNA / RNA) per lo studio della funzionalità e della diversità microbica.

16.2 FLUORESCENT IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

La FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) è una tecnica che abbina la microscopia a fluorescenza con metodiche molecolari di ibridazione *in situ* che può essere utilizzata per rilevare e localizzare la presenza (o l'assenza) di specifiche sequenze di DNA, dunque di batteri.

L'applicazione di tale tecnica prescinde dall'isolamento in coltura pura del microrganismo di interesse e ciò rappresenta un vantaggio notevole considerando i limiti derivanti dalla scarsa coltivabilità dei batteri. Il punto di forza di questo approccio risiede pertanto nella possibilità di identificare e quantificare molteplici specie microbiche contemporaneamente e direttamente nei campioni ambientali senza procedere a pre-arricchimenti o all'isolamento delle specie di interesse.

16.2.1 Principio

Il principio di questa tecnica si basa sulla capacità di specifici oligonucleotidi (sonde) di legarsi a regioni specifiche dell'RNA ribosomiale 16S o 23S (Amann *et al.*, 1995; Cottrell *et al.*, 2000). Il legame tra sonda e DNA sarà il risultato di alcune manipolazioni del campione ambientale. I microrganismi concentrati dovranno essere fissati e permeabilizzati (in modo da favorire l'entrata della sonda all'interno del corpo cellulare) ed incubati a specifica temperatura (per permettere l'ibridazione selettiva sonda-DNA).

Il campione, così preparato, potrà essere osservato tramite microscopia a fluorescenza. La presenza, nella sonda, di un rivelatore (tracciante) fluorescente permetterà il riconoscimento, una volta formatesi, dell'ibrido sonda-DNA (Fig. 2).

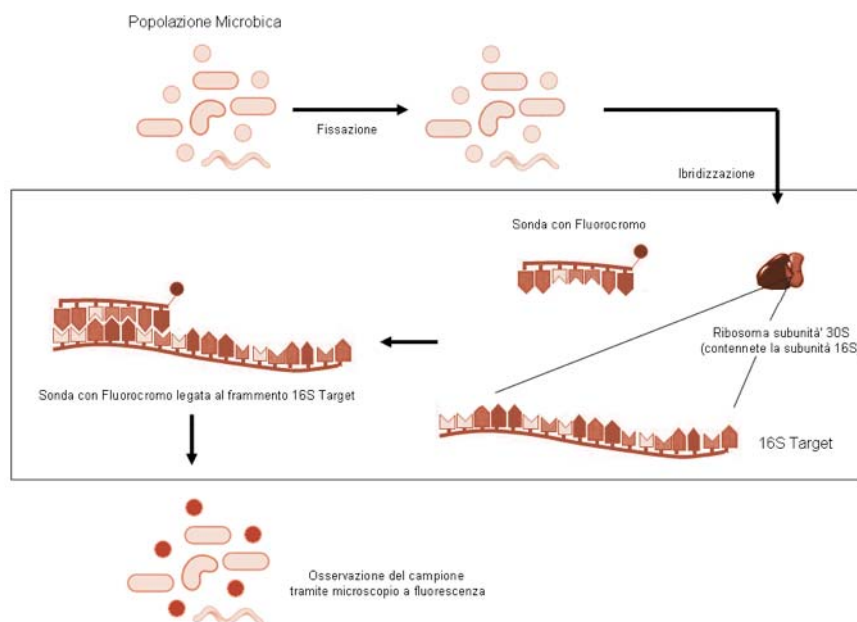


Fig. 2 - Rappresentazione schematica della Fluorescen In Situ Hybridization (FISH) per lo studio delle popolazioni batteriche naturali.

16.2.2 Schema delle operazioni

16.2.2.1 Attrezzatura

- Apparato per la filtrazione.
- Pompa da vuoto.
- Trappola per pompa da vuoto.
- Filtri in policarbonato (0,2 μm di porosità).
- Provette sterili.
- Provette (tipo Falcon) da 50 ml.
- Vetrini porta-oggetto.
- Parafilm.
- Camera di ibridazione.
- Pipette automatica di varie gradature.
- Microscopio ottico a fluorescenza.

16.2.2.2 Prodotti Chimici

- Paraformaldeide $[\text{CH}_2\text{O}]_n / \text{HO}(\text{CH}_2\text{O})_n\text{H}$.
- Cloruro di Sodio $[\text{NaCl}]$.
- Tris(idrossimetil)amminometano (Trizma-Base) $[\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3]$.
- Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) $[\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8]$.
- Sodio dodecilsolfato (SDS) $[\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4\text{Na}]$.
- Acido Cloridrico (HCl).
- Formammide $[\text{CONH}_2]$.
- 4',6-diamino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI) $[\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{N}_5]$.
- Etanolo (Et-OH).
- Citifluor Mountant Media (Ted Pella, Inc. - PELCO International, Redding, CA, USA).
- Vectashield HardSet Mounting Medium (Vector Labs, USA).

16.2.2.3 Soluzioni e reagenti

Soluzione 5M di NaCl.

Diluire 14,61 g. di NaCl (PM: 58,443 g mol^{-1}) in 50 ml di acqua distillata.

Soluzione 1M di Tris-HCl, pH 7,4.

Diluire 6,055 g. di Trizma-Base (PM: 121,1 g mol^{-1}) in 40 ml di acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,4 con HCl a 42°C. Aggiustare il volume a 50 ml.

Soluzione 0,5M di EDTA pH 8,0

Diluire 9,305 g di EDTA (PM: 372,2 g mol^{-1}) in 50 ml di acqua distillata. Aggiustare il pH a 8,0.

Tampone di ibridazione

Aggiungere 5M di NaCl (45 ml), 1M Tris-HCl pH 7,4 (5 ml), 500 mM di EDTA (2,5 ml), SDS 1% (2,5 ml, questo composto va aggiunto solo alla fine per evitare fenomeni di precipitazione), X% di Formammide (il volume dipende dal tipo di sonda utilizzata, vedere tabella) e acqua di distillata (fino al volume di 250 ml).

Tampone di lavaggio

Aggiungere X ml di una soluzione di 5M di NaCl (il volume varia in riferimento alla sonda utilizzata;

vedere tabella), 1M Tris-HCl pH 7,4 (5 ml), 500 mM di EDTA (2,5 ml), SDS 1% (2,5 ml, questo composto va aggiunto solo alla fine per evitare fenomeni di precipitazione) e acqua bidistillata (fino ad un volume di 250 ml).

16.2.3 Procedura tecnica

- Fissare i campioni in Paraformaldeide (concentrazione finale 2%).
- Filtrare un appropriato volume di acqua attraverso filtri neri in policarbonato (porosità 0,2 µm).
- Lavare per due volte i suddetti filtri con acqua distillata sterile.
- I filtri a questo punto potranno essere conservati a -20°C per successive analisi.
- Ricoprire integralmente un vetrino porta-oggetto con uno strato di parafilm,
- Preparare una soluzione di 50 µl di probe solution per ogni differente campione, utilizzando una concentrazione finale (per ogni probe) di 1,7 ng/ µl;
- Mettere 30 µl di probe solution sul parafilm che ricopre il vetrino porta-oggetto.
- Mettere il filtro capovolto goccia di probe solution, in modo tale da far entrare in contatto la soluzione con la superficie su cui sono stati filtrati i batteri.
- Incubare il tutto overnight a 42°C (al buio).
- Dopo il periodo di incubazione, prelevare il filtro e lavarlo per 15 min a 48°C con la soluzione di lavaggio.
- Aliquotare sul parafilm posto sul vetrino porta-oggetto 100 µl di una soluzione di 2 µg ml⁻¹ DAPI.
- Mettere il filtro capovolto sulla soluzione di DAPI, in modo tale da far entrare in contatto la soluzione con la superficie su cui sono stati filtrati i batteri.
- Incubare per 3 min a temperatura ambiente (al buio).
- Eliminare il colorante in eccesso e lavare il filtro con una soluzione di Etanolo all'80%.
- Asciugare il filtro a temperatura ambiente.
- Montare il filtro su di un vetrino porta-oggetti con una miscela di Citifluor and Vectashield (4:1).
- Osservazione con microscopio ottico a fluorescenza.

Tab. 1 – Alcune delle più comuni sonde utilizzate per l'identificazione dei principali gruppi batterici.

Sonde	Gruppo	Sequenza (5'- 3')	Referenza
Eub-338-R	Eubatteri	ACTCCTACGGGAGGCAGC	Wallner <i>et al.</i> , 1983 Roller <i>et al.</i> , 1994
Gam-42a	γ-Proteobatteri	GCCTTCCCACATCGTTT	Manz <i>et al.</i> , 1992
Bet-42a	β-Proteobatteri	GCCTTCCCACATCGTTT	Manz <i>et al.</i> , 1992
Arch-915	Archeobatteri	GTGCTCCCCGCCAATTCCCT	Stahl e Amann, 1991
CFC-319a	<i>Bacteroides-Chlorobi</i> group	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	Manz <i>et al.</i> , 1992

Tab. 2 - Concentrazioni di Formammide e NaCl per i tamponi di ibridazione (Hybridization Buffer) e di lavaggio (Washing Buffer).

Sonde	TAMPONE DI IBRIDAZIONE		TAMPONE DI LAVAGGIO	
	Concentrazione di Formammide (%)	Volume di formammide per 250 ml	Concentrazione finale NaCl (mM)	Volume di NaCl per 250 ml
Eub-388-R	30	75	102	5,1
Gam-42a	30	75	102	5,1
Bet-42a	30	75	102	5,1
Arch915	20	50	308	15,4
CF-319a	35	87,5	80	4

Il successo della FISH dipende da numerosi fattori quali, natura del campione, concentrazione ionica del mezzo di reazione, pH, temperatura, percentuale di formammide, tempi e temperature di ibridazione e lavaggio.

Vantaggi: la possibilità di identificare singole cellule batteriche in comunità microbiche miste, insieme alla opportunità di esaminare associazione microbiche con particolato di varia grandezza.

Svantaggi: come tutti i metodi basati sull'ibridazione l'ottimizzazione del metodo richiede particolare accuratezza.

16.3 LIBRERIE DI CLONI 16S DNA/CDNA

Una delle tecniche maggiormente utilizzate per lo studio delle comunità microbiche è quella che prevede la creazione di librerie di cloni a partire dai frammenti della sub-unità del ribosoma 16S, importante marker evolutivo e biologico. La conoscenza delle diversità delle sequenze del 16S DNA (o RNA) si propone fondamentale per la conoscenza e lo studio spazio-temporale delle dinamiche delle popolazioni microbiche naturali, intese come l'insieme della frazione dei batteri, sia in stato vegetativo che in stato quiescente o non attivo.

16.3.1 Principio

Sequenze parziali o totali del 16S DNA (o RNA) possono essere amplificate, tramite PCR, sia da campioni di DNA ambientale sia da cellule concentrate su membrane di filtrazione. Questi frammenti, una volta amplificati, dovranno essere ligati ad un vettore plasmidico ed inseriti in cellule competenti di *E. coli*. Una volta inserito il vettore, la sequenza potrà essere riamplificata e sequenziata. L'analisi di un sufficiente numero di cloni permetterà di indicare la struttura della comunità microbica in esame (Fig. 3).

In riferimento alla diversa "emivita" delle molecole di DNA ed RNA è bene ricordare come il DNA sia, a differenza dell'RNA, una molecola estremamente stabile. Il DNA estratto da uno specifico sito di analisi contiene informazioni sia sulle popolazioni microbiche presenti nel momento stesso del campionamento, sia su quelle precedentemente presenti. Inoltre, studi che si basano sull'analisi del DNA non permettono la differenziazione dei diversi stati metabolici e funzionali cellulari. Per contro essendo l'RNA una molecola molto instabile questa potrà essere ottenuta solo dalla frazione cellulare attiva (ovvero dalle cellule vitali). Le librerie di cloni ottenute tramite l'amplificazione del frammento 16S a partire da

campioni di DNA, permetteranno di ottenere informazioni sulla struttura della popolazione microbica totale (cellule vive, morte, quiescenti) presente nel sito di analisi. Per contro, le librerie di cloni ottenute tramite l'amplificazione del frammento 16S a partire dall' RNA, permetteranno di ottenere esclusivamente informazioni sulla struttura della popolazione vitale e metabolicamente attiva della stessa popolazione microbica.

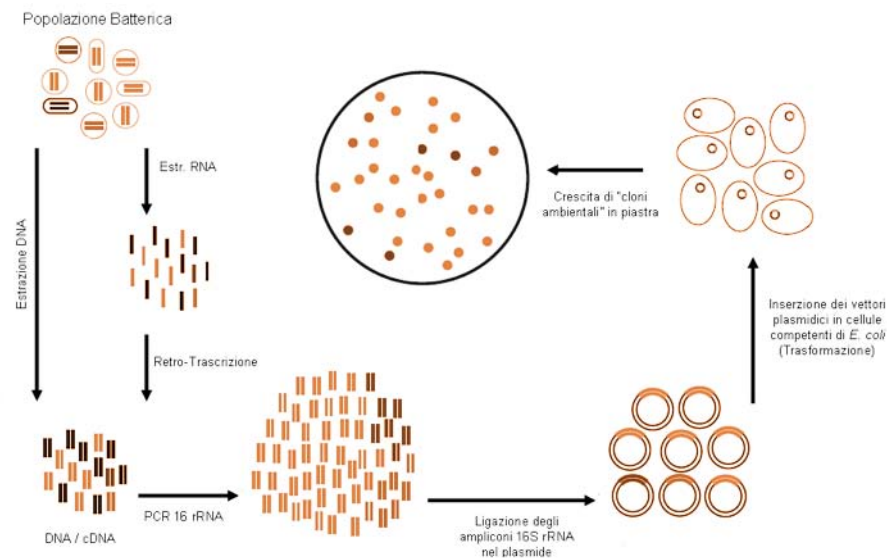


Fig. 3 – Rappresentazione schematica della realizzazione di una libreria di cloni 16S DNA/cDNA per lo studio della popolazione batterica naturale.

16.3.2 Schema delle operazioni

16.3.2.1 Attrezzatura

- Provette (tipo eppendorf) da 0,5 ml.
- Provette (tipo Eppendorf) da 1,5 ml.
- Pipette automatiche di varie gradature.
- Puntali per pipette automatiche di varie gradature.
- Piastre Petri da 90 mm.
- Piastre da 96 pozzetti.
- Termociclatore.
- Elettroporatore.
- Sequenziatore capillare.

16.3.2.2 Prodotti Chimici e Kit Commerciali consigliati

- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal).
- Acetato di Sodio ($C_2H_3O_2Na$).
- Acido Borico (H_3BO_3).
- Acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) [$C_{10}H_{16}N_2O_8$].
- Agarosio per uso Biologia Molecolare.
- Ampicillina.
- Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied BioSystems, Foster City, CA).

-
- Butanolo (C₄H₁₀O).
 - Cellule elettrocompetenti (es. E.coli 10β ElectroMAX; Invitrogen).
 - dNTPs.
 - Etanolo (Et-OH).
 - Formammide (CONH₂).
 - Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG).
 - Kit commerciale per l'estrazione del DNA da gel (es. QIAquick Gel Extraction Kit; QIAGEN, Valencia, CA).
 - Kit commerciale per l'estrazione di acidi nucleici (es. QIAGEN RNA/DNA Extraction Kit; QIAGEN, Valencia, CA).
 - Kit commerciale per la retrotrascrizione (es. SuperScript II Reverse Transcriptase; Invitrogen).
 - Taq polimerasi (es. Qiagen Taq Polymerase; QIAGEN, Valencia, CA).
 - Tris(idrossimetil)amminometano (Trizma-Base) [C₄H₁₁NO₃];
 - Vettore di ligasi (es. pGEM-T Vector System; Promega, Madison, USA);

16.3.2.3 Soluzioni e Reagenti

Miscela per la reazione di trascrizione inversa

- Aggiungere a 12 μl di acqua deionizzata, 1 μl di Primer universale (Lane, 1991) 1492-R (5'-TACG-GYTACCTTGTTACGACT-3'), 30 ng di RNA, 1 μl 10 mM di dNTPs, sterile, 4 μl di 5 First-Strand Buffer.
- Incubare a 65°C per 5 min.
- Incubare in ghiaccio per 5 min.
- Aggiungere 1 μl di DTT.
- Incubare a 25°C per 2 min.
- Aggiungere 1 μl of SuperScript II RT.
- Incubare a 42°C per 50 min.
- Inattivare la trascrittasi inversa tramite incubazione a 70°C per 15 min.

Volume finale della miscela di reazione (per singolo campione) di 20 μl.

PCR Master mix

- Aggiungere in un volume totale di 50 μl di reazione (per singolo campione) 1 solution Q (Qiagen, Hilden, Germany), 1 Qiagen reaction buffer, 1 μM di ogni primers, 10 μM di dNTPs, 2,0 ml (50-100 ng) di DNA e 2,0 U di Qiagen Taq Polymerase (Qiagen).
- Agitare delicatamente.
- Conservare in ghiaccio fino al suo utilizzo (tempo massimo 30 min).

Tampone TBE 10

- Aggiungere a 800 ml di acqua deionizzata 108 g di Tris-Base, 55 g di Acido borico e 20 ml di una soluzione di EDTA 0,5 M pH 8,0.
- Portare ad volume finale di 1000 ml.
- Sterilizzare tramite filtrazione (porosità 0,2 μm Millipore).

Gel d'agarosio 1%

- In un volume di 100 ml di tampone TBE 1x aggiungere 1 g di Agarosio.
- Portare a ebollizione fino a completa dissolvenza dell'agarosio.

Miscela di ligasi

- Aggiungere a 3,8 μl di prodotto PCR purificato, 5 μl di 2 Rapid Ligation Buffer e 0,2 μl di pGEM-T (Promega).

-
- Agitare delicatamente.
 - Aggiungere 1 μ l di T4 DNA Ligase (Promega).
 - Incubare 1 h a temperatura ambiente o alternativamente over-night a 4°C.
- Volume finale della miscela di reazione (per singolo campione) di 10 μ l.

LB agar per clonaggio

- Aggiungere 800 ml di acqua distillata 10 g di Bactotripton, 5 g di Yeast Extract, 10 g di NaCl.
- Aggiustare il pH ad un valore di 7,5.
- Aggiungere 15 g di Agar.
- Aggiustare il volume finale a 1000 ml.
- Sterilizzare in autoclave a 121°C per 20 min.
- Dopo la sterilizzazione aggiungere al terreno sterile Ampicillina (50 μ g ml⁻¹), Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG, 20 mM) e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-Gal, 200 μ g ml⁻¹).
- Miscelare il terreno così preparato.
- Distribuire in piastra.

Soluzione 2M di Acetato di Sodio

Diluire 8,203 g di Acetato di Sodio (PM: 82,03 g mol⁻¹) in 50 ml di acqua distillata.

Soluzione di BigDye per il sequenziamento

In un volume finale di 20 μ l di reazione (per singolo campione) aggiungere 4 μ l di Buffer 5, 1,5 μ l di Big Dye, 1,5 μ l di primer e 12,5 μ l di acqua distillata.

16.3.3 Procedura Tecnica

- Raccolta del campione di acqua marina.
- Filtrazione un appropriato volume di acqua attraverso filtri neri in policarbonato (porosità 0,2 μ m Millipore).
- Estrazione degli acidi nucleici (DNA o RNA) con l'utilizzo di kit commerciali (es. QIAGEN RNA/DNA Extraction Kit).

Se si lavora con il DNA si potrà direttamente passare all'amplificazione con utilizzo di primers specifici. Se si lavora con l'RNA sarà necessaria la retro trascrizione (vedere Soluzioni e Reagenti) per ottenere il cDNA.

- Amplificazione del DNA (o cDNA), tramite PCR (condizioni di amplificazione: 3 min a 95°C; 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 2 min a 72°C per 30 cicli; estensione finale 10 min a 72°C), la porzione del 16S del DNA totale della comunità totale utilizzando primers universali [es. Primer 27-F(5'-AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG-3') e 1492-R (5'TACGGYTACCTTGTTACGACT-3')];
- Visualizzazione elettroforetica del campione (corsa elettroforetica dell'amplicone o prodotto di PCR ottenuto su gel d'agarosio 1%).
- Isolamento dell'amplicone tramite taglio diretto della banda da gel.
- Purificazione del frammento di DNA estratto tramite utilizzo di kit commerciale (es. QIAquick Gel Extraction Kit).
- Reazione di ligasi del prodotto di PCR ottenuto con un vettore di clonaggio (es. tipo pGEM-T Vector System).
- Purificazione del vettore contenente l'inserito tramite lavaggi con butanolo ed etanolo al 70%.
 - Aggiungere alla miscela di ligasi 20 μ l di acqua deionizzata.
 - Aggiungere alla stessa miscela 300 μ l di butanolo.
 - Agitare delicatamente fino a completa miscelazione delle fasi.

- Centrifugazione a 10000 \leftrightarrow g per 20 min.
- Eliminare il soprannatante e risospendere il pellet in 500 μ l di etanolo al 70%.
- Centrifugazione a 10000 \leftrightarrow g per 20 min.
- Eliminazione del soprannatante, essiccazione del pellet e risospensione in 20 μ l di acqua deionizzata sterile.
- Inserzione del vettore contenente l'inserto in cellule elettrocompetenti (es. E.coli 10 β ElectroMAX) tramite elettroporazione:
 - Aggiungere 4 μ l di vettore a 10 μ l di cellule elettrocompetenti.
 - Incubare in ghiaccio per 5 min.
 - Elettroporazione a 1800V per circa 5 millisecondi.
 - Incubazione in ghiaccio per 5 min.
 - Sospensione delle cellule trasformate in 500 μ l di terreno LB sterile.
 - Incubazione delle cellule sospese in LB per 1 h a 37°C.
 - Isolamento (tramite piastratura) delle cellule trasformate su terreno LB agar selettivo.
- Incubazione a 37°C overnight delle cellule trasformate in terreno LB agar addizionato con ampicillina, X-Gal e IPTG (vedere Soluzioni e Reagenti).
- Selezione delle cellule trasformate positive.
- Amplificare, tramite reazione di PCR (condizioni di amplificazione: 3 min a 95°C; 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 2 min a 72°C per 30 cicli; estensione finale 10 min a 72°C), la porzione dell'inserto contenuto nel vettore e quindi nelle cellule trasformate utilizzando primers specifici [es. Primer M13-F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' e M13-R (5'-AACAGCTATGACCATG-3')].
- Purificazione del prodotto amplificato.
 - Aggiungere acqua deionizzata alla miscela di reazione di PCR fino ad un volume finale di 120 μ l.
 - Trasferire in una provetta (tipo Eppendorf) da 0,5 ml.
 - Aggiungere 18 μ L di soluzione 2M di Acetato di Sodio.
 - Centrifugazione a 10000 \leftrightarrow g per 20 min.
 - Eliminare il soprannatante e sospendere il pellet in 300 μ l di etanolo puro.
 - Centrifugazione a 10000 \leftrightarrow g per 20 min.
 - Eliminare il soprannatante e risospendere il pellet in 300 μ l di etanolo al 70%;
 - Centrifugazione a 10000 \leftrightarrow g per 20 min.
 - Eliminare il soprannatante e risospendere il pellet in 20 μ l di acqua deionizzata.
- Reazione di Big Dye (vedere Soluzioni e Reagenti).
- Aggiungere 3 μ l di prodotto del processo di Big Dye con 8 μ l di formammide.
- Denaturazione a 94°C per 2 min.
- Sequenziamento.
- Analisi delle sequenze (Yakimov *et al.*, 2006) ottenute tramite l'uso di programmi on-line come FASTA - Nucleotide Similarity Search (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/nucleotide.html>), BLAST Assembled Genomes (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>, Altschul *et al.*, 1997) e/o Ribosomal Database project II (<http://rdp.cme.msu.edu>, Maidak *et al.*, 1999).

16.4 REAL TIME PCR

La tecnica di Real Time PCR consente di monitorare e quantificare una molecola target mentre la reazione di amplificazione è in corso. Questo è reso possibile dall'impiego di diversi prodotti chimici fluorescenti *reporter* che correlano la concentrazione del prodotto di amplificazione con l'intensità della fluorescenza (Higuchi *et al.*, 1993).

Con particolare riferimento all'ambiente marino la Real Time PCR può essere utilizzata per:

quantificare gruppi di microrganismi o singole cellule batteriche in comunità microbiche miste;
 quantificare l'attività di alcuni microrganismi nell'ambito di specifiche vie metaboliche;
 quantificare l'espressione di geni funzionali considerati bioindicatori.

16.4.1 Principio

Teoricamente, il numero di molecole prodotte da un target durante la reazione di PCR è pari a 2^n dove n è il numero di cicli della reazione. La curva di amplificazione generata durante una reazione di Real Time PCR (Fig. 4) può essere idealmente suddivisa in 3 fasi: lineare, esponenziale o logaritmica e plateau. Trasformando in scala logaritmica il grafico che la rappresenta, siamo in grado di determinare differenze di amplificazione nei primi cicli. La determinazione quantitativa avviene durante la fase esponenziale.

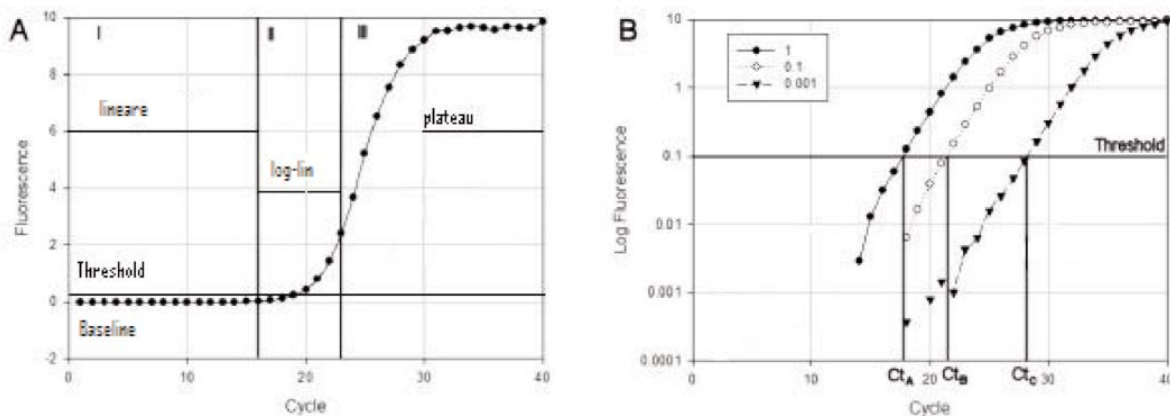


Fig. 4 - Curve di amplificazione PCR. Le tre fasi della reazione di amplificazione sono mostrate sia su una scala lineare (pannello A), che su scala semi-log (pannello B). Il pannello B rappresenta le curve di amplificazione generate da diluizioni 10 - 1000 volte dello stesso campione (indicato rispettivamente come 1, 0,1 o 0,001). (da Karlen et al., 2007 modificato).

I primi cicli della reazione di amplificazione in cui non è misurabile una variazione del segnale della fluorescenza definiscono un primo importante parametro: la linea di base (*baseline*) della curva. Un aumento della fluorescenza oltre la linea di base indica il rilevamento del prodotto di amplificazione in fase di accumulo. Un secondo parametro importante è la linea-soglia o *threshold*: tale linea, parallela alla linea di base, intercetta le curve dei campioni nella loro fase di crescita esponenziale. La curva di amplificazione di ogni campione incontra la linea-soglia in un punto chiamato ciclo-soglia (C_t) che è rappresentativo del numero di copie iniziali presenti nel campione e deve essere usato per calcolare risultati sperimentali (Heid *et al.*, 1996). Durante la fase lineare-logaritmica, la reazione raggiunge il periodo ottimale di amplificazione, mentre la fase di plateau è raggiunta quando i componenti della reazione diventano limitanti e l'intensità della fluorescenza non è più un parametro importante per i risultati. (Bustin *et al.*, 2005).

Gli strumenti per la tecnica di Real Time PCR oggi disponibili si basano in sostanza sul medesimo principio di funzionamento: i campioni vengono irradiati da una sorgente a singola o ad ampio spettro di lunghezza d'onda e, a seconda della strategia adottata, la fluorescenza emessa dai campioni viene rilevata da una telecamera CCD. Tutte le operazioni relative alle misurazioni avvengono sotto il controllo di un software che consente di collezionare raccogliere ed elaborare i dati.

La tecnologia della Real Time PCR legata alla fluorescenza prevede l'uso di:

- Fluocromi intercalanti nel DNA capaci di emettere fluorescenza, se opportunamente eccitati.

-
- Sonde ad ibridazione, di varie tipologie, legate a molecole fluorescenti “reporter” e “quencher”, con un approccio sequenza-specifico.

Tra i fluorocromi più utilizzati, il SYBR® Green è quello più diffuso. È una molecola fluorescente non specifica che si lega al solco minore del DNA a doppio filamento. L'eccitazione massima è a 494 nm, mentre l'emissione massima è a 521 nm. L'intensità della fluorescenza aumenta proporzionalmente rispetto alla concentrazione del DNA a doppio filamento. (Wittwer *et al.*, 1997). Il legame tra il colorante e il DNA a doppio filamento avviene dopo che l'amplificazione è stata completata ed in maniera specifica a tutti gli ampliconi, ciò comporta una accurata progettazione dell'esperimento a partire dal disegno dei primers. Di seguito vengono elencati alcuni fondamentali accorgimenti:

- i primers devono avere una temperatura di annealing superiore ai 58°C affinché la ricerca ed il legame con il template avvenga in maniera selettiva;
- i primers non devono avere sequenze complementari tra loro per evitare la formazione di dimeri, sarebbe infatti DNA a doppio filamento a cui il Sybr Green si lega;
- la sequenza target deve avere una lunghezza non superiore a 150bp ed una temperatura di melting superiore agli 80°C. La peculiarità della temperatura di melting consente un controllo a posteriori dei prodotti della PCR. Infatti dall'osservazione delle curve di dissociazione è possibile un'immediata valutazione della specificità del target ottenuto alla temperatura di melting attesa e, visto che i dimeri presentano solitamente una curva di dissociazione $\geq 78^\circ\text{C}$, possiamo immediatamente stimare la validità dell'esperimento.

Le strategie utilizzate con le sonde a ibridazione, ad oggi, si possono classificare in tre diverse categorie:

- le cosiddette sonde a “cleavage based” che comportano un taglio enzimatico della sonda utilizzata, che perciò viene anche detta sonda a idrolisi;
- le cosiddette sonde a “displaceable probes” in cui la sonda viene scalzata dal template a cui si era ibridata e viene utilizzata;
- sonde o particolari sequenze nucleotidiche direttamente legate a uno dei primers.

Tra le sonde a idrolisi, uno dei saggi più diffusi per Real-Time PCR è il sistema “TaqMan”, che consiste in una sequenza oligonucleotidica che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio del gene da amplificare. Presenta all'estremità 5' un fluoroforo detto “Reporter” ed all'estremità 3' una molecola “Quencher”, legati covalentemente (Wittwer *et al.*, 1997). I reporters usati più comunemente sono FAM (6-carbossifluoresceina), TET (tetracloro-6-carbossifluoresceina), JOE (2,7-dimetossi-4,5-dicloro-6-carbossifluoresceina) e HEX (esacloro-6-carbossifluoresceina), il quencher è TAMRA (6-carbossitetrametilrodamina). La sonda viene disegnata ad una lunghezza tale da permettere al quencher di neutralizzare la fluorescenza del reporter (assorbendone l'effetto) fino al momento della amplificazione. Quando la sonda specifica si va a posizionare sulla regione complementare e la polimerasi incontrando la sonda, grazie alla sua attività 5'-3' nucleasica, la scalza facendo sì che il reporter possa emettere fluorescenza rilevabile dallo strumento. La determinazione avviene ciclo per ciclo.

16.4.2 Metodi di analisi in Real-Time PCR

La quantificazione ottenibile con tale sistema può essere divisa in due categorie: assoluta o relativa. L'analisi assoluta richiede standard di concentrazioni note ad alta precisione diluiti in serie necessari per la creazione di una curva standard. La curva standard fornisce una relazione lineare tra il C_t della quantità iniziale di campione (DNA o cDNA) e le quantità note di DNA permettendo la determinazione della concentrazione dei campioni analizzati sulla base del loro ciclo-soglia. (Heid *et al.*, 1996). Questo metodo assume come presupposto che tutti gli standard e i campioni hanno approssimativamente la stessa efficienza di amplificazione (Souaze *et al.*, 1996). Durante la quantificazione relativa, vengono misurati i cambiamenti dell'espressione genica del campione sulla base di un controllo esterno o di un campione

di riferimento detto anche calibratore ed un gene di riferimento (house-keeping) la cui espressione mantiene gli stessi livelli indipendentemente da variazioni ambientali (Livak e Schmittgen, 2001). A tal proposito ci sono vari modelli matematici per calcolare il valore normalizzato dell'espressione di un gene. In base al modello utilizzato, questa misurazione può produrre risultati diversi e dare misure differenti di errore standard (Liu *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 2002). In particolare, il metodo comparativo della quantificazione relativa prevede prima la correzione del dato Ct del target in riferimento al Ct del gene considerato controllo (house-keeping) ed il risultato viene paragonato ad un tessuto o cellula che sicuramente esprime il gene secondo la formula del $\Delta\Delta Ct$

$$\Delta C_{T(c)} = C_T (\text{controllo}) - C_T (\text{house-keeping})$$

$$\Delta C_{T(t)} = C_T (\text{target sconosciuto}) - C_T (\text{house-keeping})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta C_{T(c)} - \Delta C_{T(t)}$$

$$\text{Livello espressione comparativo} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

16.4.3 Disegno sperimentale

I fase: Sviluppo del saggio	<ul style="list-style-type: none"> a. selezione della sequenza b. Selezione di primers e/o sonde c. Scelta del gene house-keeping d. Test di validazione
II fase: Setup esperimento	<ul style="list-style-type: none"> a. PCR e/o RT PCR b. Preparazione plate applicazione ordinata dei campioni in piastre da 96 pozzetti c. Setup strumento
III fase: Analisi dei dati	<ul style="list-style-type: none"> d. Set Baseline e Threshold e. Curva standard f. Normalizzazione del campione

La fase riguardante la sequenza target rappresenta un momento fondamentale nella progettazione dell'esperimento. La sequenza infatti, deve essere univocamente correlabile al target sconosciuto, ed è appunto sulla stessa che vengono disegnati primers e sonde sulla base di regole riguardanti costrizioni sulla sequenza e sulla specificità. Il gene di riferimento nel caso di un'analisi quantitativa relativa richiede inoltre operazioni preliminari di validazione. Per garantire l'attendibilità dei risultati è necessario verificare che l'efficienza dell'amplificazione del gene target e dell'house-keeping sia paragonabile e che non si verifichino problemi dovuti alla inibizione della reazione di polimerizzazione. La validazione del test viene effettuata utilizzando i valori della *slope* della curva standard secondo la seguente reazione:

$$\text{Efficienza} = -1 + 10^{(-1/\text{slope})}$$

Le curve standard costruite sui logaritmi delle quantità scalari di RNA del gene target e del gene di riferimento devono essere parallele.

Nel caso in cui venga utilizzata la chimica del Sybr Green, è necessario che la reazione venga preceduta dall'ottimizzazione della concentrazione dei primers secondo la Tab. 3. Lo scopo di questa procedura è quello di evitare amplificazioni aspecifiche scegliendo la minima concentrazione dei primers per ottenere il massimo dell'efficienza di amplificazione al più basso Ct.

Tab. 3 – Per ogni campione e coppia di primers vengono testate nove combinazioni della concentrazione dei primers forward e reverse utilizzate nella miscela di reazione.

Reverse primer (nM)		Forward primer (nM)	
50	50	300	900
50	50/50	300/50	900/50
300	50/300	300/300	900/300
900	50/900	300/900	900/900

16.4.4 Schema delle operazioni

16.4.4.1 Attrezzatura

- Bottiglie in vetro Pyrex sterili per conservare il campione di acqua a 4°C;
- apparato per la filtrazione;
- pompa da vuoto;
- trappola per la pompa da vuoto;
- filtri in nitrocellulosa;
- frigorifero e congelatore;
- kit commerciale per l'estrazione di acidi nucleici (es. QIAGEN RNA/DNA Extraction Kit; QIAGEN, Valencia, CA);
- provette di varie dimensioni e volume;
- micropipette destinate esclusivamente a tale tecnica;
- piastre MicroAmp a 96 pozzetti o Microtubi ottici;
- acqua RNase e DNase Free;
- strumento Real Time PCR;
- software per analizzare i dati (annesso allo strumento);
- spettrofotometro in grado di quantificare gli acidi nucleici e di dare informazioni sulla purezza di tali molecole.

16.4.4.2 Soluzioni e reagenti

SYBR Green PCR Master mix (2).
 TaqMan® Universal PCR Master Mix (2).
 SuperScript First-Strand Synthesis System per RT-PCR.

Tab. 4 - Esempio di protocollo operativo con sonda TaqMan in 50 µl di volume di reazione.

Reagenti	Volume (µl) per campione	Concentrazione finale
TaqMan PCR Master Mix (2)	25	1
Primer Forward	Variabile	50 a 900 nM
Primer Reverse	Variabile	50 a 900 nM
TaqMan sonda (2,5 µM)	5	250 nM
DNA/cDNA	variabile	10 a 100 ng
H2O	fino a 50	-
Volume totale	50	-

Tab. 5 - Esempio di set-up operativo con SYBR Green in 50 μ l di volume di reazione.

Reagenti	Volume (μ l) per campione	Concentrazione finale
SYBR Green Master Mix (2)	25	1x
Primer Forward	Variabile	50 a 900 nM
Primer Reverse	Variabile	50 a 900 nM
DNA/cDNA	variabile	10 a 100 ng
H2O	fino a 50	---
Volume totale	50	---

16.4.5 Procedura Tecnica

Trasferire il campione d'acqua di mare dalle bottiglie di prelievo a quelle di vetro sterili e riporle in frigorifero. Tutti i campioni vengono trattati, a bordo o in laboratorio, non oltre le tre ore dopo il prelievo. I campioni vanno filtrati su filtri 47 mm di diametro in nitrocellulosa (0,2 mm). Dopo la filtrazione è preferibile trattare i filtri con lisozima (per il taglio della parte peptidica dei peptidoglicani della parete cellulare dei batteri) e con il buffer di lisi (contenente inibitori delle RNasi e delle DNasi); conservare il suddetto filtro alla temperatura di -20°C o a -80°C .

16.4.6 Schema delle operazioni in laboratorio.

- Tutte le procedure richiedono condizioni di sterilità.
- I reagenti per la PCR devono essere conservati a -20°C .
- Tutte le attrezzature (puntali, pipette, provette) devono essere sterilizzate prima dell'uso.
- Utilizzare guanti powder-free sterili e cambiarli frequentemente.
- Le pipette devono essere controllate regolarmente e calibrate, se è necessario.
- Mantenere tutti i reagenti in ghiaccio durante la preparazione dell'esperimento.

16.4.7 Procedura di laboratorio

- Estrazione DNA e/o RNA dal campione¹;
- Conversione dell'RNA totale in cDNA²;
- Real-time PCR³;
- Analisi dei risultati⁴.

16.4.8 Note

Nota 1. È importante la qualità del RNA che deve essere libero dalle proteine (assorbanza 260 nm/280nm) con rapporto ~ 2 libero da DNA (trattamento con enzimi DNase); libero da inibitori della PCR.

Nota 2. Esistono vari kit in commercio specializzati per la retro-trascrizione dell'RNA totale in cDNA.

Di seguito viene riportato un esempio di reazione di retrotrascrizione:

Total RNA	1 ng - 5 μ g
random hexamers	50-250 ng μ l ⁻¹
dNTP mix	10 mM ciascuno
Acqua DEPC	Portare a 10 μ l

Incubare per 5 min a 65°C e poi in ghiaccio 1min.

5x buffer	4 μ l
0,1 M DTT	2 μ l
RNAaseOUT	1 μ l

- Incubare per 2 min a 25°C e aggiungere un aliquota di 200 U dell'enzima SuperScript II RT.
- Incubare per 10 min a 25°C.
- Incubare per 50 min a 42°C.
- Inattivare la reazione di trascrizione a 70°C per 15 min.

Nota 3. Importanza dei primers utilizzati nell'esperimento che devono essere: specifici, altamente efficienti, non produrre dimeri.

Sono importanti dei controlli delle fasi di reazione:

- controlli negativi (assenza di DNA non target amplificabile),
- controlli dei reagenti (assenza di contaminazioni),
- controlli positivi,
- controllo della retrotrascrizione (presenza di DNA genomico).

Nota 4. La reazione di amplificazione quantitativa ottenibile con tale sistema può essere divisa in due categorie: assoluta o relativa come precedentemente descritto.

16.4.9 Analisi dei risultati

Alla fine di ogni reazione, l'intensità della fluorescenza registrata viene utilizzata per i seguenti calcoli dal software dello strumento: R_n è il valore di fluorescenza determinato durante la reazione che viene calcolato dividendo il segnale del reporter per un segnale detto *passivo* PCR-indipendente interno alla miscela di reazione. Durante la PCR, R_n aumenta in relazione alla amplificazione del target fino al raggiungimento del plateau.

- Real Time PCR assoluta, metodo della curva standard: tale metodo determina il numero di copie del target di interesse. In questo metodo, una prima curva standard è costruita da RNA/DNA a concentrazioni note. Questa curva è quindi utilizzata come standard di riferimento per estrapolare informazioni quantitative sui campioni sconosciuti. Concentrazioni note di cDNA e plasmidi sono preferiti per la determinazione assoluta.
- Real Time PCR relativa: con questo metodo, uno dei campioni sperimentali è il calibratore, o campione 1. La quantità del target viene determinata tramite una curva standard e divisa per il target determinato nel campione calibratore di riferimento la cui espressione viene considerata a livello basale.
- Metodo Comparativo cicli soglia (CT): questo metodo non utilizza la curva standard, ma confronta la quantità relativa di espressione del gene target rispetto a quella del gene house-keeping.

L'uso della Real-Time PCR rappresenta un ottimo strumento per la diretta determinazione e quantificazione di microrganismi target in ambiente marino. È importante evidenziare comunque alcuni svantaggi derivanti dalla variabilità intra/inter-campione.

- In riferimento alle misure di espressione genica in cellule batteriche la variabilità può essere dovuta allo stato fisiologico della cellula che, come è noto, differentemente può esprimere in base alla fase di crescita il target scelto. A questo problema è possibile ovviare utilizzando dei riferimenti interni (geni house-keeping espressi in maniera costitutiva ed in qualsiasi condizione), riferimenti esterni (cellule batteriche da coltura pura di cui si conosca esattamente numero e stato fisiologico). Tali controlli sono utili alla normalizzazione dei dati ottenuti e consentono una accurata correzione del risultato.
- La variabilità può essere dovuta al numero di copie del target molecolare del ceppo o specie bat-

terica. Nel caso in cui si conosca la sequenza del genoma è necessario normalizzare con il numero noto di operoni il risultato della quantificazione. Se è ignoto il numero di copie del target molecolare la procedura richiede una scrupolosa fase di studio preliminare effettuata su coltura pura: viene disegnata una reazione di Real-Time quantitativa assoluta utilizzando quantità note di DNA (o del target molecolare) di cui sia stata verificata l'efficienza dell'amplificazione, le stesse vengono utilizzate come campioni ignoti (Caruso *et al.*, 2004). La determinazione del numero di copie avviene secondo la seguente formula :

$$N^{\circ} \text{ copie DNA} = \text{numero di Avogadro } (6 \cdot 02 \times 10^{23}) \times \text{DNA (g)/FW.}$$

16.4.10 Real Time PCR in ambiente marino

L'efficacia della Real Time PCR in ambiente marino è stata sperimentata nell'ultimo decennio mediante l'uso di sonde e primers sui geni tassonomici 16S rDNA e sui geni funzionali di microrganismi metanotrofi e solfato-riduttori ma anche Crenarchaea e batteri idrocarburoclastici, così come patogeni (Signoretto *et al.*, 2004; Takai *et al.*, 2004; Carsten *et al.*, 2006; Schippers *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007; Einen *et al.*, 2008). Entrambi gli approcci utilizzati (Syrbr Green o TaqMan) sono stati ottimizzati sia nella scelta delle sequenze che nella scelta dello stampo da utilizzare come standard. Infatti, nel caso in cui non sia disponibile la coltura pura, è possibile utilizzare un plasmide che rechi come inserto la sequenza target. Zhang e Fang (2006), riportano una sintesi sulle sonde ed i primers usati in campo ambientale, evidenziando l'uso della tecnica in diversi ecosistemi.

La Real Time PCR è una tecnica sensibile, riproducibile e rapida e, quando è ben disegnata riduce al minimo i problemi dovuti alla normale PCR o ad altre tecniche di ibridazione. L'abbattimento dei costi per la strumentazione e per i reagenti potrebbe garantirne un uso più frequente.

16.5 BIBLIOGRAFIA

- AMANN R.I., LUDWIG W., SCHLEIFER K.H. (1995) - Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.*, **59**: 143-169.
- ALTSCHUL S.F., MADDEN T.L., SCHÄFFER A.A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D.J. (1997) - Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- BUSTIN S.A., BENES V., NOLAN T., PFAFFL M.W. (2005) - Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *Journal of Molecular Endocrinol.* **34**: 597-601.
- CARSTEN J.S., COOLEN M.J.L., NERETIN L.N., SCHIPPERS A., ABBAS B., DURISCH-KAISER E., WEHRLI B., HOPMANS E.C., SINNINGHE DAMSTÉ J.S., WAKEHAM S. KUYPERS M.M.M. (2006) - Aerobic and anaerobic methanotrophs in the Black Sea water column. *Environ. Microb.*, **8**: 1844-1856.
- CARUSO G., DENARO R., GENOVESE M., GIULIANO L., MANCUSO M., YAKIMOV M.M. (2004) - New methodological strategies for detecting bacterial indicators. *Chem. Ecol.*, **20**: 167-181.
- COTTRELL M.T., KIRCHMAN D.L. (2000) - Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 5116-5122.
- EINEN J., THORSETH I.H., ØVREÅS L. (2008) - Enumeration of *Archaea* and *Bacteria* in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. *FEMS Microb. Lett.* **282**: 182-187.
- HARMS G., LAYTON A.C., DIONISI H.M., GREGORY I.R., GARRETT V.M., HAWKINS S.A., ROBINSON K.G., SAYLER G.S. (2003) - Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 343-351.
- HEID C.A., STEVENS J., LIVAK K.J. AND P.M. WILLIAMS (1996) - Real Time Quantitative PCR. *PCR Methods & Appl.*, **6** (10): 986-994.
- HIGUCHI R., FOCKLER C., DOLLINGER G., WATSON R. (1993) - Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, **11** (9): 1026-30

-
- LANE D.J. (1991) - 16S rRNA sequencing. In Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York: 115-175.
- LIVAKK.J., SCHMITTGEN T.D. (2001) - Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$. *Method. Methods* **25**: 402-408.
- LIU W.L., MARSH T.L., CHENG H., FORNEY L.J. (1997) - Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4516-4522.
- KARLEN Y., MCNAIR A., PERSEGUERS S., MAZZA C., MERMOD N. (2007) - Statistical significance of quantitative PCR. *BMC Bioinformatics*, **8**: 131
- MAIDAK B.L., OLSEN G.J., LARSEN N. (1997) - The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* **25**: 109-111.
- MANZ W., AMANN R., LUDWIG W., WAGNER M., SCHLEIFER K-H. (1992) - Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microb.*, **15**: 593-600.
- MOESENEDER M.M., ARRIETE J.M., MUYZER G., WINTER C., HERNDL G. J. (1999) - Optimization of terminal-restriction fragment length polymorphism analysis for complex marine bacterioplankton communities and comparison with denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 3518-3525.
- MULLER P.Y., JANOVJAK H., MISEREZ A.R., DOBBIE Z. (2002) - Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *BioTechniques*, **32**: 1372-1379.
- ROLLER C., WAGNER M., AMANN R., LUDWIG W., SCHLEIFER K-H. (1994) - In situ probing of grampositive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microb.*, **140**: 2849-2858.
- SCHIPPERS A., NERETIN L.N., KALLMEYER J., FERDELMAN T.G., CRAGG B.A., PARKES R.J., JORGENSEN B.B. (2005) - Prokaryotic cells of the deep sub-seafloor biosphere identified as living bacteria. *Nature*, **433**: 861-865.
- SOUAZE F., NTODOU-THOME A., TRAN C.Y., ROSTENE W., FORGEZ P. (1996) - Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *BioTechniques*, **21**: 280-285.
- STAHL D. A., AMANN R. (1991) - Development and application of nucleic acid probes. In Stackebrandt E., Goodfellow M., (eds). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley, New York: 205-248.
- SIGNORETTO C., BURLACCHINI G., DEL MAR LLEÒ M., PRUZZO C., ZAMPINI M., PANE L., FRANZINI G., CANEPARI P. (2004) - Adhesion of *Enterococcus faecalis* in the nonculturable state to plankton is the main mechanism responsible for persistence of this bacterium in both lake and seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 6892-6896.
- TAKAI K., OIDA H., SUZUKI Y., HIRAYAMA H., NAKAGAWA S., NUNOURA T., INAGAKI F., KH NEALSON K.H., HORIKOSHI K. (2004) - Spatial distribution of marine crenarchaeota group I in the vicinity of deep-sea hydrother. *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 2404-13.
- YAKIMOV M.M., GENTILE G., BRUNI V., CAPPELLO S., D'AURIA G., GOLYSHIN P.N., GIULIANO L. (2004) - Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of Rod Bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **49**: 419-432.
- YAKIMOV M.M., CAPPELLO S., CRISAFI E., TURSÌ A., CORSELLI C., SCARFÌ S., GIULIANO L. (2006) - Phylogenetic survey of metabolically active microbial communities associated with the deep-sea coral *Lophelia pertusa* from the Apulian Plateau, Central Mediterranean Sea. *Deep- Sea Res. I*, **53**: 62-75.
- WALLNER G., AMANN R., BEISKER W. (1993) - Optimizing fluorescent in situ hybridization of suspended cells with rRNA-targeted oligonucleotide probes for the flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, **14**: 136-143.
- WITTEWER C.T., HERRMANN M.G., MOSS A.A, RASMUSSEN R. P. (1997) - Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*, **22**: 130-138.
- ZHANG T., FANG H. H. (2006) - Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**: 281-289.
- ZHOU S., HOU Z., LI N., QIN Q. (2007) - Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood. *J. Appl. Microbiol.*, **103**: 1897-1906.

CAPITOLO 17. DETERMINAZIONE DELLA PRODUZIONE ETERTROFA PROCARIOTICA PLANCTONICA

A. Puddu, L.S. Monticelli, R. Danovaro

puddu@irsa.cnr.it

17.1 INTRODUZIONE

Caratteristica fondamentale di tutti gli organismi in natura è la velocità con cui convertono un substrato in nuova biomassa; questo parametro diventa particolarmente importante nel caso dei microrganismi, in quanto la stima della produzione microbica può essere utilizzata come indicatore di attività e di velocità di crescita. Dal momento che la maggior parte dei processi biologici e biogeochimici sono legati e dipendenti dal metabolismo microbico, la produzione di biomassa può essere usata per ottenere una stima di primaria importanza della velocità con cui si verificano tali processi nei quali il comparto microbico è coinvolto. Nel caso dei procarioti eterotrofi, cui è rivolto il metodo descritto nel seguito, la misura della produzione è utile alla stima della quantità di sostanza organica disciolta metabolizzata. Poiché i procarioti sono i principali utilizzatori della sostanza organica disciolta, quantificarne il ruolo significa descrivere uno dei processi fondamentali per la circolazione della biomassa, ed in particolare del C, a scala globale.

La produzione di biomassa equivale all'aumento di biomassa per unità di tempo e di volume (o area) ed è funzione sia della concentrazione di biomassa presente (B), normalmente espressa in termini di C per unità di volume (ad esempio $\mu\text{gC l}^{-1}$), che della velocità di crescita specifica (μ) per unità di tempo (ad esempio h^{-1}) (Ducklow, 2000). In assenza di mortalità, da parte di predatori o di virus, la biomassa procariotica aumenta in modo esponenziale secondo l'equazione:

$$dB/dt = \mu B$$

dove t è il tempo e μ è uguale al coefficiente angolare della retta di regressione di $\ln(B)$ verso t.

Conoscendo μ è possibile calcolare altri due importanti parametri che descrivono la crescita del popolamento batterico, rappresentati dal tempo di generazione ($g = \ln(2)/\mu$) e dal numero di duplicazioni per giorno (1/g). Nella maggior parte degli ecosistemi naturali però la produzione e la mortalità dei batteri si equivalgono, per cui $(dB/dt) = 0$ (Kirchman, 2001).

Per le sue caratteristiche specifiche il metodo che verrà descritto misura comunque la produzione che si realizzerebbe in una situazione di mortalità uguale a zero, dal momento che si basa su incubazioni di durata molto inferiore (1h) rispetto alla scala temporale con cui si verifica sia la crescita che la morte delle cellule batteriche (uno o più giorni).

Dal punto di vista metodologico la produzione procariotica può essere stimata misurando la velocità di incorporazione di vari precursori che vengono utilizzati per la sintesi delle macromolecole. Le due molecole più comunemente utilizzate a tale scopo sono le forme radioattive della timidina (^3H -timidina), precursore del DNA, e della leucina (^3H -leucina), costituente delle proteine. Le due molecole, nelle condizioni sperimentali descritte, vengono utilizzate unicamente dai procarioti.

Le due tecniche, entrambe ampiamente diffuse, differiscono oltretutto per lo specifico meccanismo fisiologico coinvolto, per la presenza di interferenze e per l'affidabilità dei coefficienti di trasformazione necessari per convertire la velocità di incorporazione del precursore marcato in numero di cellule prodotte o in biomassa, espressa in termini di carbonio (Bell, 1993; Kirchman, 1993). In estrema sintesi, la misura del tasso di incorporazione della timidina è più adatta per stimare la velocità di crescita procariotica, intesa come produzione di nuove cellule, mentre la misura del tasso di incorporazione di leucina fornisce

una stima diretta della velocità di produzione di nuova biomassa. In realtà, nelle comunità naturali, in condizioni di crescita bilanciata, le due attività sono accoppiate e le cellule non possono aumentare la loro biomassa senza dividersi, considerando intervalli temporali superiori al tempo di generazione (qualche giorno). Perciò, l'utilizzo contemporaneo delle due tecniche in osservazioni di campo non è normalmente di grande utilità a meno che non si ipotizzi una situazione in cui la crescita batterica sia sbilanciata. In tal caso la differenza tra le due misure potrebbe fornire un'informazione supplementare. Ma una diversa risposta tra i due metodi può anche derivare dall'applicazione di coefficienti di conversione non appropriati o da alterazioni nelle condizioni che influenzano la validità dei coefficienti stessi (Ducklow, 2000). Da un punto di vista operativo, la tecnica basata sull'incorporazione della ³H-leucina offre comunque maggiori vantaggi, per i seguenti motivi: a) l'estrazione viene effettuata a temperatura ambiente; b) il rapporto tra la quantità di leucina e di timidina incorporate, a parità di biomassa prodotta, è circa 10 volte maggiore nel caso della leucina, pertanto la tecnica che utilizza questo precursore è più sensibile; c) il coefficiente teorico di trasformazione di leucina in carbonio è più affidabile. Per questi motivi negli ultimi anni la tecnica basata sull'incorporazione di leucina è stata utilizzata con maggior frequenza (Kirchman, 2001).

La concentrazione ed estrazione delle macromolecole marcate può essere effettuata con due procedure diverse, mediante filtrazione o centrifugazione. Entrambe le procedure sono attualmente utilizzate, anche se la seconda, più recente, sta acquisendo una diffusione sempre maggiore. Questa procedura infatti, ha caratteristiche superiori di praticità, nonché ridotto impatto ambientale e conseguente economicità per la minor quantità di prodotti chimici richiesti e di rifiuti radioattivi prodotti. In aggiunta, la filtrazione produce frequentemente valori molto elevati di bianco, per adesione del radioattivo alla membrana filtrante, difficili da evitare. Pertanto, si è scelto di presentare unicamente la procedura che impiega la centrifugazione, ampiamente sperimentata in diversi ecosistemi, tra cui le acque costiere e pelagiche italiane. La procedura mediante filtrazione è ampiamente illustrata in Bell (1993) e Kirchman (2001).

Nel seguito verranno illustrate entrambe le tecniche, per incorporazione di timidina o leucina, evidenziandone le differenze solo quando necessario.

Il metodo descritto è applicabile ad acque marine o estuariali, ma una salinità ridotta può avere influenza sulla precipitazione delle macromolecole. Recentemente però, Kirschner e Velimirov (1999) hanno dimostrato come, nella tecnica basata sull'incorporazione della leucina, l'aggiunta di NaCl durante la precipitazione delle proteine possa ovviare a tale inconveniente. Con tale modifica il metodo è pertanto applicabile anche ad acque dolci. I tempi di incubazione e le concentrazioni aggiunte di precursore radioattivo sono adatti alla maggior parte degli ecosistemi, ma potrebbero essere modificati in situazioni di produttività particolarmente ridotte, allungando i tempi di incubazione e riducendo la concentrazione di substrato radioattivo, facendo però attenzione alle osservazioni riportate in nota.

17.2 DESCRIZIONE DEL METODO

Il metodo deriva dal protocollo Furhman e Azam (1982), che prevede la filtrazione del campione, modificato successivamente da Smith e Azam (1992) per adattarlo alla procedura di centrifugazione. Con leggere modifiche, e con particolare riferimento all'incorporazione della leucina, è riportato anche in Kirchman (2001).

17.2.1 Incorporazione di timidina

La ³H-timidina viene incorporata nel DNA cellulare per azione dell'enzima timidino-chinasi, in quantità proporzionale alla velocità di riproduzione delle cellule batteriche. Nella modalità illustrata, che prevede basse concentrazioni di timidina aggiunta e brevi tempi di incubazione, il metodo è specifico per i procarioti che sono gli unici a disporre dei meccanismi enzimatici che permettono l'incorporazione diretta

della timidina nel materiale genetico. Con coefficienti riportati in letteratura o determinati sperimentalmente è poi possibile convertire la quantità di ^3H -timidina incorporata in numero di cellule batteriche prodotte, e queste ultime in biomassa (espressa come quantità di carbonio per unità di volume).

17.2.2 Incorporazione di leucina

Incubando i procarioti in presenza di leucina marcata (^3H -leucina) è possibile determinare sperimentalmente la velocità di incorporazione della molecola nel materiale proteico cellulare e stimare quindi la velocità di sintesi proteica. Quest'ultima, in base al rapporto relativamente costante tra proteine e biomassa, pari al 60% del peso secco (Simon e Azam, 1989), potrà essere convertita in produzione di biomassa totale, espressa anche in termini di carbonio.

17.3 PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO ED ANALISI

17.3.1 Campionamento

Il campionamento può essere effettuato mediante le procedure descritte nei capitoli precedenti riguardanti il campionamento microbiologico, utilizzando eventualmente bottiglie a chiusura comandata (tipo Niskin) accuratamente pulite nel caso di prelievi in profondità. I campioni d'acqua raccolti in contenitori sterili devono essere mantenuti al riparo dalla luce. Nel caso in cui, come indicato di seguito, l'incubazione avvenga immediatamente dopo il prelievo (max 1-2 h) le condizioni di campionamento asettico possono essere evitate.

17.3.2 Preparazione ed incubazione dei campioni

Predisporre un numero appropriato di provette da 2 ml, con chiusura a tenuta, ed introdurre 1,7 ml di campione immediatamente dopo il prelievo. Introdurre in ogni provetta 20 μl di ^3H -timidina o ^3H -leucina (concentrazione finale 20 nM), omogeneizzare il contenuto ed incubare per 60 min alla temperatura *in situ* e al buio. È opportuno effettuare almeno 3 repliche per ogni campione. Per controllare l'incorporazione che avviene in assenza di attività batterica, una o più repliche ("bianchi") verranno addizionate con 90 μl di acido tricloro acetico (TCA) 100% (concentrazione finale 5%) prima dell'aggiunta del campione e poi incubate con gli altri campioni.

17.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

17.4.1 Estrazione delle macromolecole

Al termine dell'incubazione, nelle provette contenenti il campione (ad eccezione dei bianchi) aggiungere 90 μl di TCA 100% (concentrazione finale 5%) che bloccano l'incorporazione del radioattivo e precipitano le macromolecole senza idrolizzarle, permettendone la separazione per centrifugazione. Dopo circa 20-30 min procedere ad una prima centrifugazione a 16000 rcf per 10 min. Al termine della centrifugazione, aspirare accuratamente il supernatante facendo attenzione a non disturbare il precipitato che si è depositato sulla parete interna della provetta. Aggiungere 1,7 ml di TCA 5%, agitare con vortex e procedere ad una seconda identica centrifugazione. Dopo nuova aspirazione del supernatante, aggiungere 1,7 ml di etanolo 80%, agitare con vortex e centrifugare nuovamente. Al termine della terza centrifuga-

zione, dopo aspirazione del supernatante, aggiungere al precipitato 0,5-1 ml di liquido di scintillazione ed effettuare una ulteriore agitazione con vortex.

Per l'aspirazione risulta pratico utilizzare un dispositivo *ad hoc* attivato da una pompa da vuoto, collegato direttamente ad un contenitore per rifiuti liquidi mediante un tubo flessibile munito di un piccolo puntale nella estremità di aspirazione. La procedura esposta differisce nelle due tecniche unicamente per la temperatura di esecuzione. Utilizzando ³H-leucina tutte le operazioni vengono effettuate a temperatura ambiente. Utilizzando ³H-timidina l'estrazione deve essere effettuata in bagno di ghiaccio mentre la centrifugazione deve essere effettuata ad una temperatura di circa +5°C. In questo caso, i reagenti utilizzati devono anch'essi essere freddi (+4°C).

Nel caso in cui non sia possibile procedere immediatamente alla centrifugazione, al termine dell'estrazione i campioni possono essere conservati in frigo (+4°C) per 1 o 2 giorni al massimo, mentre è sconsigliato sia il congelamento che l'aggiunta di fissativi. Dopo l'aggiunta del liquido di scintillazione la lettura è invece stabile anche per periodi più lunghi, senza particolari accorgimenti per conservazione.

17.4.2 Lettura dei campioni

Dopo almeno 20-24 h i campioni vengono letti mediante scintillatore liquido utilizzando le stesse provette in cui si è proceduto all'estrazione. I colpi per minuti (CPM) vengono trasformati in disintegrazioni per minuto (DPM) tenendo conto dell'efficienza dello strumento ed eventualmente del fattore di quenching.

17.4.3 Calcoli

17.4.3.1 Velocità di incorporazione del precursore radioattivo

$$\text{DPM}_{\text{inc}} = \text{DPM}_{\text{campione}} - \text{DPM}_{\text{bianco}}$$
$$\text{pmoli l}^{-1}\text{h}^{-1} = \text{DPM}_{\text{inc}} * \frac{4.5 * 10^{-13}}{\text{SA} * t * V} * 10^9$$

dove:

4,5 10⁻¹³ = numero di curie (Ci) per DPM

SA = attività specifica della soluzione commerciale di radioattivo, specificata per ogni lotto dal produttore in Ci mmole⁻¹

t = tempo di incubazione, in ore, pari a 1 con la procedura descritta

V = volume del campione incubato, in litri, pari a 0,0017 con la procedura descritta

17.4.3.2 Trasformazione della velocità di incorporazione del precursore radioattivo in produzione procarionica di carbonio (PCP):

La trasformazione richiede l'applicazione di fattori di conversione che possono essere stimati empiricamente, caso per caso, oppure teorici. La stima empirica richiede esperimenti con il popolamento naturale, deve essere ripetuta per ogni specifico ambiente studiato (Kirchman e Ducklow, 1993) ed è, quindi, di difficile applicazione pratica. Pertanto, si suggeriscono di seguito i coefficienti di trasformazione teorici più ampiamente utilizzati, che consentono una stima della produzione batterica confrontabile con quella di molti Autori.

- Per l'incorporazione di ^3H -timidina (TdR):

La conversione si effettua attraverso due passaggi:

- conversione delle moli di timidina incorporata in numero di cellule batteriche prodotte per unità di tempo e di volume:

$$\text{cell l}^{-1} \text{ h}^{-1} = \text{pmoli}_{\text{TdRinc}} \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1} * \text{TCF}$$

- conversione delle cellule prodotte in produzione di carbonio (PCP); questa è la trasformazione più critica in quanto è influenzata dal volume cellulare:

$$\text{PCP} (\mu\text{gC l}^{-1} \text{ h}^{-1}) * \text{CCF}$$

dove:

TCF= "thymidine conversion factor" il cui valore più diffuso, sia in ambiente marino (Ducklow e Carlson, 1992) che di acqua dolce (Smits e Riemann, 1988), è pari a $2 \cdot 10^6 \text{ cell pmol}^{-1}$

CCF= *carbon conversion factor*, il cui valore più diffuso è quello proposto da Lee e Furhman (1987), pari a $2 \cdot 10^{-8} \mu\text{gC cell}^{-1}$

Utilizzando entrambi i fattori di conversione suggeriti, la trasformazione diretta da timidina incorporata in produzione di carbonio è pari a:

$$\text{PCP} (\mu\text{gC l}^{-1} \text{ h}^{-1}) = 0,04 * \text{pmoli}_{\text{TdRinc}} \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

- Per l'incorporazione di ^3H -leucina (Leu):

- Anche in questo caso la conversione si effettua attraverso due passaggi:

conversione delle moli di leucina incorporate in velocità di produzione di proteine (PPP):

$$\text{PCP} = \text{pmol}_{\text{Leu inc}} * \frac{131,2}{\% \text{Leu}} * \text{ID} * 10^9$$

- conversione della produzione di proteine in produzione di carbonio (PCP):

$$\text{PCP} (\mu\text{gC l}^{-1} \text{ h}^{-1}) = \text{PPP} * (\text{C/PR})$$

dove:

131,2 = peso molecolare della leucina

e, secondo le stime di Simon e Azam (1989) ampiamente utilizzate:

%Leu = 0,073, frazione di leucina nelle proteine

ID = 2, diluizione intracellulare dell'isotopo

C/PR = 0,86, rapporto tra C cellulare e proteine

utilizzando i coefficienti suggeriti, la trasformazione diretta da leucina incorporata in produzione di carbonio è pari a:

$$\text{PCP} (\mu\text{gC l}^{-1} \text{ h}^{-1}) = 0,0031 * \text{pmol}_{\text{Leu inc}} \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

17.4.4 Soluzioni e reagenti

Acido tricloro acetico (TCA): da una soluzione alla concentrazione del 100% W/v (1kg TCA in 452 ml H_2O = 6,1 N preparare una soluzione di TCA alla concentrazione del 5%.

^3H -timidina: il prodotto commerciale, con attività specifica compresa tra 70 e 90 Ci mmol^{-1} , deve essere

diluito in condizioni asettiche con acqua distillata sterile in modo da ottenere una soluzione di lavoro che, con l'aggiunta di 20 µL a 1,7 ml di campione, produca una concentrazione finale di ³H-timidina pari a 20 nM. Questa concentrazione è in genere saturante, cioè sufficiente per rendere massima la velocità di incorporazione (vedi note). Tale soluzione di lavoro, mantenuta sterile, può essere conservata fino a qualche mese in piccole aliquote alla temperatura di 4°C. Si faccia riferimento alla nota per il calcolo della diluizione.

³H-leucina: il prodotto commerciale, con attività specifica compresa tra 40-85 Ci mmol⁻¹, deve essere diluito in condizioni asettiche con acqua distillata sterile in modo da ottenere una soluzione di lavoro che, con l'aggiunta di 20 µl a 1,7 ml di campione produca una concentrazione finale di ³H-leucina pari a 20 nM (vedi sopra). Tale soluzione di lavoro, mantenuta sterile, può essere conservata fino a qualche mese (vedi sopra). Si faccia riferimento alla nota per il calcolo della diluizione.

Etanolo 80%: diluire v/v a partire dal prodotto assoluto o dal prodotto al 95%.

Liquido di scintillazione: si consiglia il prodotto "Ultima-Gold" MV della Perkin Elmer Life and Analytical Sciences.

17.5 APPARECCHIATURE

- termostato, se l'incubazione non è effettuata in situ,
- scintillatore liquido,
- centrifuga (refrigerata nel caso si utilizzi ³H-timidina),
- agitatore tipo vortex,
- pipette e relativi puntali sterili,
- provette sterili da 2 ml con tappo a tenuta, tipo Eppendorf Sake-Lock,
- portaprovette per provette da 2 ml,
- eventuale pompa per l'aspirazione del supernatante.

17.6 NOTE/PROBLEMI

17.6.1 Volume del campione

In presenza di un'alta attività batterica si possono adoperare volumi più ridotti del campione (1,0 - 1,5 ml) regolando, in conseguenza, i volumi aggiunti di TCA 100 % e la concentrazione della ³H-leucina per mantenere i rapporti campioni/reagenti stabiliti nel protocollo.

17.6.2 Concentrazione saturante

20 nM sono la concentrazione sia di ³H-timidina che di ³H-leucina raccomandate per la maggior parte degli ambienti. In ambienti oligotrofici, dove l'attività è particolarmente bassa, potrebbe essere sufficiente anche una concentrazione minore. In presenza di abbondante particolato la concentrazione raccomandata potrebbe invece non essere sufficiente. È pertanto consigliabile effettuare test preliminari con concentrazioni di precursore tra 2 e 50 nM per valutare quale sia, nell'ecosistema specifico, la concentrazione al di sopra della quale non si verifica ulteriore incorporazione di radioattivo (concentrazione saturante). Tali test, effettuati ripetutamente dagli Autori in acque costiere e pelagiche dell'Adriatico settentrionale, hanno portato alla scelta delle 20 nM che è la stessa concentrazione suggerita in Kirchman (2001); una concentrazione di ³H-leucina 25 nM è stata determinata ottimale in uno studio compiuto nello strato fotico dell'Ionio durante un periodo primaverile.

Con la leucina, per la maggiore sensibilità, si può anche utilizzare una miscela di ^3H -leucina e leucina non radioattiva, che rende la misura più economica. In tal caso nei calcoli deve essere considerato il rapporto tra leucina radioattiva e leucina totale.

17.6.3 Tempo di incubazione.

Il tempo proposto, 60 min, è quello più ampiamente utilizzato perché fornisce una sensibilità adeguata pur evitando la sintesi dei precursori da parte di organismi diversi dai batteri. Si trova all'interno di un intervallo di tempi, generalmente compresi tra le decine di minuti e le 2 ore, in cui la cinetica di assimilazione si mantiene costante. In particolari ecosistemi, molto o poco produttivi, il tempo di incubazione potrebbe essere diverso, per cui, in tali situazioni, è consigliabile determinare sperimentalmente la cinetica di incorporazione in funzione del tempo di incubazione.

17.6.4 Diluizione del prodotto commerciale

Calcolo della diluizione da effettuare a partire dal prodotto commerciale per ottenere una soluzione di lavoro con concentrazione tale che aggiungendo al campione un volume definito di soluzione si ottenga la concentrazione finale voluta:

1. Calcolo della quantità (nmoli) del reagente nella confezione commerciale (QRC) $QRC \text{ (nmoli)} = (ARC \cdot 10^6) / SA$
2. Calcolo della concentrazione (μM) del reagente di lavoro (Kr)
3. $Kr \text{ (}\mu\text{M)} = (Vc \cdot K_{finale}) / V_{ag}$.
4. Volume totale (ml) del reagente a preparare partendo dalla confezione commerciale (VTR) $VTR \text{ (ml)} = QRA / Kr$

ARC = Attività totale del reagente nella confezione commerciale (Ci)

SA = Attività specifica dichiarata dal produttore (Ci mmole $^{-1}$)

Vc = Volume del campione (ml)

K_{finale} = Concentrazione finale del reagente che si vuole ottenere (nM)

V_{ag} = Volume della soluzione di lavoro che si vuole aggiungere (μl)

Esempio: con ARC = 0,001 Ci (1 mCi), SA = 69 Ci mmole $^{-1}$, Vc = 1,7 ml, K_{finale} = 20 nM

V_{ag} = 20 μl .

QRC = 14,493 nmoli

Kr = 1,7 μM

VTR = 8,525 ml

17.6.5 Interferenze

Le interferenze in entrambe le tecniche sono numerose, non ancora del tutto conosciute e riguardano la diluizione isotopica, la fissazione su molecole diverse, la precipitazione, etc. Pertanto, numerose modificazioni sono state apportate ai metodi originali finalizzate a risolvere tali problematiche.

La diluizione isotopica è la principale causa di interferenza in entrambe le tecniche. I batteri infatti durante l'incubazione potrebbero anche utilizzare molecole non radioattive presenti *in situ*, oppure sintetizzarle *de novo* da altri composti. L'aggiunta di quantità elevate di radioattivo, come quelle raccomandate, volutamente superiori a quelle riscontrabili nei diversi ambienti, è voluta per ridurre tali in-

terferenze. Concentrazioni più elevate sono sconsigliate perché potrebbero provocare una diffusione del radioattivo oltretutto un utilizzo da parte di organismi diversi dai batteri. Per la leucina si è raccomandato in aggiunta l'utilizzo di un fattore di correzione (ID = 2) che deriva dalla misurazione diretta della diluizione intracellulare isotopica effettuata da Simon e Azam (1989) in presenza di 10 nM di ³H-leucina. L'utilizzo di una maggiore concentrazione di ³H-leucina potrebbe alterare il valore del suddetto fattore di correzione; una buona pratica consisterebbe nella determinazione sperimentale della ID complessiva (intra + extracellulare) in ogni ambiente di studio seguendo il protocollo proposto da Pollard e Moriarty (1984).

Altre cause di interferenza sono dovute, per la timidina, alla possibilità che il precursore radioattivo si fissi anche su molecole diverse dal DNA, ma l'estrazione a freddo indicata garantisce la precipitazione dell'intera frazione macromolecolare, DNA, RNA e proteine (Bell, 1993). Altra interferenza potenziale, particolarmente rilevante nella determinazione dell'incorporazione di leucina, è dovuta al turnover delle proteine. Infatti i batteri durante l'incubazione potrebbero degradare le proteine e riutilizzare i materiali degradati, soprattutto in condizioni di ridotte velocità di crescita e con tempi di incubazione più lunghi dei 60 min consigliati, causando una sovrastima della produzione di biomassa.

Deve essere evitata la contaminazione con materiale organico che potrebbe stimolare l'attività batterica.

17.6.6 Norme di sicurezza

L'impiego di sostanze marcate con trizio rappresenta in linea di principio un rischio da radiazioni ionizzanti per il personale. Pertanto al fine di minimizzare il rischio, la detenzione e la manipolazione sono regolate per legge (D.L.vo 17 Marzo 1995, n. 230 e successive modifiche e integrazioni).

Al fine di evitare il contatto diretto e la dispersione della radioattività nell'ambiente è necessario l'utilizzo di materiale a perdere (guanti, fiale, puntali), da smaltire tramite ditta specializzata e autorizzata.

Lo smaltimento dei liquidi di scintillazione, anche qualora non siano contaminati da materiale radioattivo, va effettuato nel rispetto della normativa che regola gli scarichi delle sostanze tossiche organiche.

17.7 BIBLIOGRAFIA

- BELL R.T. (1993) - Estimating production of heterotrophic bacterioplankton via incorporation of tritiated thymidine. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publishers, Boca Raton, **58**: 495-503.
- DUCKLOW H.W. (2000) - Bacterial production and biomass in the oceans. In: Kirchman D.L. (ed), *Microbial Ecology of the Oceans*, John Wiley and Sons, New York: 85-120.
- DUCKLOW H.W., CARLSON C.A. (1992) - Oceanic bacterial productivity. *Adv. Microb. Ecol.*, **12**: 113-181.
- FURHMAN J.A., AZAM F. (1982) - Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.*, **66**: 109-120.
- KIRCHMAN D.L. (1993) - Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publishers, Boca Raton, **58**: 509-512.
- KIRCHMAN D.L. (2001) - Measuring bacterial biomass production and growth rates from leucine incorporation in natural aquatic environments. In: Paul J.H. (ed), *Marine Microbiology. Methods in Microbiology*, Vol.30, Academic Press, San Diego, **12**: 227-237.
- KIRCHMAN D.L., DUCKLOW H.W. (1993) - Estimating conversion factors for the thymidine and leucine methods for measuring bacterial production. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, Lewis Publishers, Boca Raton, **58**: 513-517.
- KIRSCHNER A.K.T., VELIMIROV B. (1999) - Modification of the ³H-leucine centrifugation method for determining bacterial protein synthesis in freshwater samples. *Aq. Microb. Ecol.*, **17**: 201-206.

-
- LEE S., FUHRMAN J.A. (1987) - Relationships between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53** (6): 1298-1303.
- POLLARD P.C., MORIARTY D.J.W. (1984) - Validity of the tritiated thymidine methods for estimating bacterial growth rates: Measurement of isotope dilution during DNA synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48** (6): 1076-1083.
- SIMON M., AZAM F. (1989) - Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **51**: 201-213.
- SMITH D.C., AZAM F. (1992) - A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in seawater using ³H-leucine. *Mar. Microbial Food Webs*, **6** (2): 107-114.
- SMITS J.D., RIEMANN B. (1988) - Calculation of cell production from [3H]thymidine incorporation with freshwater bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** (9): 2213-2219.

CAPITOLO 18. RESPIRAZIONE PLANCTONICA

A. Zoppini, M. Azzaro, P. Del Negro, R. La Ferla, A. Pugnetti

zoppini@irsa.cnr.it

18.1 INTRODUZIONE

Negli ecosistemi marini il ciclo del carbonio avviene per gran parte attraverso l'assimilazione della CO₂ da parte degli organismi autotrofi (fotosintesi), il trasferimento del carbonio assimilato nei diversi livelli della rete trofica o la sua sedimentazione negli strati profondi, ed infine attraverso il rilascio di CO₂ (respirazione) comune sia alla componente autotrofa che a quella eterotrofa. L'intero processo è conosciuto con il termine di pompa biologica del carbonio (Volk e Hoffert, 1985) e riveste un'importanza fondamentale per i processi biogeochimici a livello globale. Si è stimato che l'emissione di CO₂ da parte delle acque oceaniche sia compresa tra 55 e 76 Gt C anno⁻¹ ed appare della stessa dimensione di quella stimata per gli ecosistemi terrestri, compresa tra 70 e 80 Gt C anno⁻¹ (del Giorgio e Duarte, 2002). Ad oggi sono ancora numerosi gli interrogativi che riguardano il ciclo globale del carbonio ed in particolare molto controverso è il ruolo svolto dagli oceani nel bilancio tra rilascio e sequestro di CO₂ (del Giorgio e Duarte, 2002; Arístegui *et al.*, 2003 e 2005; Azzaro *et al.*, 2006).

La respirazione è la funzione chiave attraverso cui tutti gli organismi, eccetto i fermentativi obbligati, ottengono energia vitale attraverso l'ossidazione di una grande varietà di composti organici ridotti. Tale processo è influenzato da diversi fattori ambientali che spesso si differenziano da quelli che regolano la produzione di sostanza organica (Arístegui e Harrison, 2002).

La respirazione è il risultato non di un singolo processo ma piuttosto della somma di diversi processi, ognuno dei quali risponde a distinte regolazioni, differentemente legato alla produttività e con diversi ruoli biogeochimici e funzionali a livello di ecosistema (del Giorgio e Williams, 2005). La respirazione può essere suddivisa in tre diverse categorie: autotrofa, eterotrofa e basale. La respirazione autotrofa è correlata in modo complesso ai processi fotosintetici ed è influenzata da diversi fattori quali la disponibilità di nutrienti e la composizione della comunità algale. La respirazione eterotrofa è alimentata dalla sostanza organica prodotta *in situ* dai processi fotosintetici o da altre fonti (ad es. apporti alloctoni, *sloppy feeding* ed escrezione). La respirazione basale riguarda infine il metabolismo ossidativo necessario per il mantenimento cellulare. Quest'ultima componente determina un consumo lento ma costante della sostanza organica ed è indipendente dalla produzione primaria.

Diversi fattori possono influenzare il processo di respirazione (tra cui temperatura, disponibilità di nutrienti, composizione della sostanza organica e struttura delle comunità biotiche) agendo sul tempo necessario per la completa ossidazione della sostanza organica (Cherrier *et al.*, 1999; del Giorgio e Williams, 2005).

Solo nell'ultima decade lo studio della respirazione ha ricevuto una notevole attenzione e quindi, a tutt'oggi, è disponibile soltanto un numero ridotto di misure sperimentali. La mancanza di protocolli standardizzati e la difficoltà ad ottenerli contribuiscono a determinare questa mancanza di informazione. Una recente pubblicazione di del Giorgio e Williams (2005), richiamando alla necessità di acquisire dati di respirazione al fine di poter valutare correttamente il ciclo biogenico del carbonio, fornisce informazioni aggiornate sullo stato dell'arte.

Il tasso di respirazione della comunità planctonica può essere stimato attraverso diversi approcci: a) misure del consumo o della produzione di composti di riferimento (ossigeno o anidride carbonica), durante un periodo di incubazione *in vitro* (Robinson *et al.*, 1999); b) misure dell'attività di enzimi specifici o di sistemi enzimatici (Packard, 1971); c) stime derivate dalla biomassa attraverso l'applicazione di tassi metabolici biomassa-specifici (ad es. Robinson *et al.*, 2002); d) utilizzo di modelli di analisi inversa (Vezina

e Platt, 1988). Per un approfondimento dell'argomento si rimanda al contributo di Robinson e Williams (2005). Nel seguito sono presentati i due metodi che hanno avuto maggiore diffusione e applicazione. La stima del tasso di respirazione dell'intera comunità planctonica, ottenuta da misurazioni del consumo di ossigeno mediante il metodo di Winkler su campioni incubati al buio, è tra i metodi più utilizzati attraverso cui è stato prodotto più del 90% dei dati disponibili. Nonostante questo, il metodo presenta diversi limiti tra cui quelli di rilevanza e di precisione della procedura analitica.

I metodi biochimici che impiegano indicatori enzimatici per la stima della respirazione potenziale stanno acquisendo notevoli consensi. Nonostante la rilevante sensibilità, tali metodi rimangono ancora poco utilizzati. Tra questi la misura dell'attività del sistema di trasporto degli elettroni (ETS) è il metodo più diffuso in oceanografia biologica (Packard e Williams, 1981), sebbene attualmente solo il 2% dei dati disponibili siano stati ottenuti con questa procedura, per gran parte applicata al bacino Mediterraneo (Denis *et al.*, 2003; La Ferla e Azzaro, 2001; La Ferla e Azzaro, 2004; Lefevre *et al.*, 1996; Savenkoff *et al.*, 1993 a, b). La semplicità di applicazione del metodo lo rende utilizzabile su un'ampia scala spaziale e temporale con la possibilità di raccogliere un elevato numero di dati. Il metodo di misura dell'attività ETS rappresenta il tasso potenziale di respirazione e quindi per ricavare il tasso di respirazione *in situ* è necessario utilizzare algoritmi ricavati empiricamente. Il rapporto respirazione/ETS per il plancton marino è ricavato da colture monospecifiche di batteri e zooplancton ottenute in condizioni di laboratorio (Christensen *et al.*, 1980), per cui l'interpretazione dei dati va valutata con cautela.

18.2 RESPIRAZIONE DA MISURE DI OSSIGENO DISCIOLTO

18.2.1 Principio del metodo

Il tasso di respirazione della comunità planctonica è stimato dalla misura *in vitro* del consumo di ossigeno disciolto durante un periodo di tempo definito e si intende comprensivo dell'attività di tutti gli organismi (autotrofi ed eterotrofi) presenti nel campione (APHA, AWWA, WEF, 2005). Dall'osservazione della distribuzione delle abbondanze dei diversi organismi planctonici e dei tassi di respirazione, è stato evidenziato che organismi di dimensioni superiori a 50 μm sono poco rappresentati negli esperimenti *in vitro* su piccoli volumi (meno di 10 individui l^{-1}) e che circa il 99% del consumo di ossigeno è dovuto ad organismi di piccola taglia (Robinson e Williams, 2005). Si stima che la sola componente procariotica contribuisca tra il 12 ed il 58% alla respirazione totale, mentre i protozoi tra l'11 ed il 36%, il fitoplancton tra l'8 ed il 70% e lo zooplancton e le larve tra il 3 ed il 9% (Robinson e Williams, 2005).

La misura della concentrazione dell'ossigeno disciolto, prima e dopo l'incubazione del campione in bottiglie schermate alla luce, è effettuata utilizzando una titolazione iodometrica basata sul metodo Winkler, modificato da Carpenter (1965), con determinazione potenziometrica automatica (vedi APAT, IRSA-CNR, 2003). Rispetto alla procedura descritta da Saggiomo *et al.* (1990) per la misura dell'ossigeno disciolto, il metodo qui proposto (Graneli e Graneli, 1991) è finalizzato alla stima dei tassi di respirazione della comunità planctonica e pertanto è caratterizzato da accuratezza e precisione elevate tali da consentire di rilevare consumi di ossigeno anche in acque poco produttive.

18.2.2 Campionamento e conservazione del campione

È importante avere particolare cura nella manipolazione del campione per evitare la contaminazione con l'ossigeno atmosferico durante il prelievo, la fissazione e la conservazione. La formazione di bolle d'aria durante le varie fasi di trattamento può rappresentare una fonte significativa di errore.

I campioni d'acqua sono prelevati attraverso le comuni bottiglie di campionamento utilizzate in ocea-

nografia. Il campione è trasferito direttamente dal rubinetto della bottiglia di campionamento alle bottiglie di incubazione tramite un tubo di silicone (vedi Procedimento).

Immediatamente dopo il prelievo, l'ossigeno disciolto è fissato in metà delle bottiglie predisposte secondo il protocollo di lavoro, mentre le rimanenti sono tappate e incubate al buio per un numero variabile di ore in funzione del grado di trofia dell'ambiente esaminato (vedi Procedimento). Un numero sufficientemente elevato di repliche (4) è necessario per poter misurare consumi di ossigeno statisticamente significativi tenendo conto delle variabilità delle misure. Le bottiglie fissate sono quindi conservate al buio, in verticale, con i bordi sigillati con acqua di mare e ad una temperatura quanto più possibile vicina a quella registrata *in situ*. Le analisi devono essere completate entro le 24 ore dalla fissazione del campione. Per ottenere informazioni sui tassi di respirazione della sola componente procariotica è possibile incubare il campione prefiltrato (Puddu *et al.*, 2003; Reinthaler *et al.*, 2006).

18.2.3 Apparecchiatura

- Bottiglie da campionamento (tipo Niskin).
- Bottiglie del tipo BOD in vetro borosilicato, con tappo smerigliato a becco di flauto. Il volume delle bottiglie (60 ml) deve essere determinato con precisione per pesata ed ogni bottiglia deve essere identificabile tramite un numero progressivo apposto sia sulla bottiglia che sul tappo.
- Matracci tarati da 250 e 1000 ml.
- Termometro, se non si dispone di misure di temperatura da CTD.
- Tubo di silicone.
- Micropipette di precisione a volume variabile da 1 ml o dispensatore (0,5-1 ml).
- Titolatore automatico completo di elettrodo combinato al platino, buretta a pistone da 5 o 10 ml e agitatore.

18.2.4 Reagenti

Tutti i reattivi sono di grado analitico e l'acqua di diluizione del tipo Millipore Milli-Q.

- *Soluzione acido cloridrico (HCl 0,1 N)*. Utilizzare questa soluzione per il lavaggio abituale della vetreria che entra in contatto con il campione.
- *Soluzione di cloruro di manganese (MnCl₂, 3 M)*. Sciogliere il sale (150 g di MnCl₂ 4H₂O in 250 ml) in acqua distillata, filtrare su filtri tipo GF/F (o similari) e conservare in una bottiglia scura.
- *Soluzione di ioduro di sodio (NaI, 4 M) e sodio idrossido (NaOH, 8 M)*. Sciogliere 150 g di NaI in circa 200 ml di acqua distillata a piccole dosi. Se il colore del preparato appare giallo-marrone, sostituire il reagente. Dopo aver raffreddato a temperatura ambiente la soluzione ottenuta, aggiungere 80 g di NaOH. Agitare fino alla scomparsa del precipitato e portare al volume finale di 250 ml. Conservare la soluzione in una bottiglia scura.
- *Soluzione di acido solforico (H₂SO₄, 28% v/v)*. Versare poca acqua distillata in un matraccio da 100 ml posto in acqua fredda. Aggiungere gradualmente 28 ml di H₂SO₄ (d=1,84), portare a volume a temperatura ambiente.
- *Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (Na₂S₂O₃, 0,01 N)*. Si consiglia di utilizzare fiale a concentrazione standard comunemente reperibili in commercio. Diluire una fiala standard subito prima dell'uso, seguendo con cura le indicazioni del produttore. Conservare a temperatura ambiente in una bottiglia scura per non più di qualche giorno. Prima dell'uso degassificare la soluzione con elio per 10 min.

18.2.5 Procedimento

Tutta la vetreria che entra in contatto con il campione è lavata accuratamente in bagno acido (HCl 0,1N) per 4 h e risciacquata più volte in acqua Millipore Milli-Q. Da evitare l'uso di detergenti. Il metodo qui descritto è stato proposto per misure di respirazione utilizzando bottiglie da 60 ml (Graneli e Graneli, 1991).

Effettuare il campionamento lungo la colonna d'acqua alle profondità stabilite sulla base degli obiettivi prefissati. Collegare il tubo di silicone al rubinetto della bottiglia di campionamento e, prima di procedere al riempimento delle bottiglie, lasciare defluire l'acqua tenendo l'altra estremità del tubo verso l'alto per eliminare le bolle d'aria. Per ogni campione disporre 8 bottiglie da incubazione e, prima di procedere al riempimento, lavarle più volte con l'acqua del campione. Al riparo dalla luce diretta procedere quindi al trasferimento del campione dalla Niskin al fondo delle bottiglie da incubazione, moderando il flusso ed evitando accuratamente di introdurre bolle di aria. Lasciare che l'acqua defluisca copiosamente dalla bottiglia in volume pari a tre volte quella contenuta nella bottiglia stessa. Sollevare il tubo lentamente senza interrompere il flusso. Fissare immediatamente 4 delle bottiglie predisposte aggiungendo in rapida successione 0,5 ml della soluzione di cloruro di manganese e 0,5 ml della soluzione alcalina di ioduro di sodio, immergendo la punta della pipetta per almeno 3 cm sotto la superficie. Tappare le bottiglie senza includere bolle d'aria sotto il tappo e agitare vigorosamente per almeno 20 sec. Dopo circa 20 min agitare nuovamente i campioni fissati. Incubare le rimanenti 4 bottiglie al buio per 12-24 h, alla stessa temperatura di origine ($\pm 1^\circ\text{C}$). I tempi di incubazione non possono essere troppo prolungati per problemi principalmente legati alla linearità del tasso di respirazione, alla limitazione del substrato e all'interruzione del ciclo nictemerale. In genere in acque profonde o poco produttive, o su campioni pre-filtrati, sono richiesti tempi di incubazione di 24 h o di poco superiori. In acque produttive possono essere utilizzati tempi di incubazione più ridotti (12 h). Al termine del tempo di incubazione i campioni sono fissati con la procedura già descritta. La titolazione verrà eseguita solo quando il precipitato, che si forma a seguito dell'aggiunta dei reattivi, è completamente sedimentato e comunque non prima di 6-8 h dalla fissazione.

18.2.6 Titolazione

Predisporre il titolatore lavando la buretta più volte con la soluzione standard di tiosolfato sodico. Al momento della titolazione asciugare l'acqua sul collo della bottiglia e rimuovere il tappo con cura, evitando di disturbare il precipitato. Introdurre immediatamente sul fondo della bottiglia 1 ml di soluzione di acido solforico, tappare e agitare energicamente. Si può scegliere di titolare l'intero contenuto della bottiglia a volume noto o aliquote di campione, non inferiori a 50 ml utilizzando una pipetta volumetrica. In entrambi i casi, l'operazione va portata a termine velocemente perché lo iodio liberato dopo l'acidificazione tende a volatilizzare, determinando indirettamente una sottostima della concentrazione dell'ossigeno disciolto. Nel caso in cui si utilizzi tutto il contenuto della bottiglia versare il campione in un beaker insieme all'acqua di lavaggio della bottiglia e del tappo. Titolare immediatamente il campione con la soluzione di riferimento di tiosolfato sodico. La titolazione automatica è effettuata sotto blanda agitazione attraverso aggiunte successive della soluzione di riferimento di sodio tiosolfato. Alcuni titolatori sono dotati della funzione di titolazione dinamica nella quale il volume del titolante aggiunto si riduce o incrementa automaticamente, durante la titolazione, in funzione della pendenza della curva del potenziale misurato. Se presente, questa modalità di titolazione è quella da preferire. Altri titolatori possono lavorare solo in modalità di titolazione monotonica, il che significa che la titolazione avviene per aggiunte successive di un volume fisso di titolante. In tali casi è opportuno impostare un volume sufficientemente piccolo per ciascuna aggiunta ($<0,1$ ml). Per ridurre il tempo di attesa alcuni titolatori dispongono di una funzione di predosaggio attraverso cui è possibile impostare il volume di titolante della prima aggiunta variabile (da 1 a 5 ml), a seconda della quantità di iodio da titolare e quindi del contenuto di ossigeno

del campione. Il volume di tiosolfato al punto di equivalenza è quindi registrato ed utilizzato successivamente per il calcolo. Il tempo di lettura è approssimativamente di 10 min per campione.

18.2.7 Calcoli

La concentrazione iniziale di ossigeno e quella misurata dopo l'incubazione sono utilizzate per stimare il tasso di respirazione della comunità planctonica. La concentrazione di ossigeno disciolto (DO) nei rispettivi campioni sarà calcolata come segue:

$$\text{DO (mg l}^{-1}\text{)} = \frac{a \cdot N \cdot f \cdot 8 \cdot 1000}{V}$$

a = volume (ml) di soluzione di tiosolfato utilizzato per la titolazione

N = normalità della soluzione di tiosolfato

8 = peso equivalente dell'ossigeno

1000 = fattore di conversione da ml a l

V = volume della bottiglia (ml)

f = V/(V-1)

dove:

l = volume totale (ml) dei reagenti aggiunti al campione per la fissazione

L'applicazione del metodo qui descritto permette di determinare la concentrazione di ossigeno disciolto in un campione naturale (7,770 mg DO l⁻¹) con un coefficiente di variazione pari allo 0,38% (n=4). L'errore tiene conto non solo di quelli derivanti dalla titolazione effettuata su diverse repliche dello stesso campione ma anche degli errori dovuti al campionamento, all'eterogeneità del campione stesso (diversa distribuzione del detrito organico e degli organismi nelle bottiglie), alla procedura di trasferimento del campione nelle diverse fasi (es. introduzione di bolle d'aria e volatilizzazione dello iodio dopo acidificazione) e all'aggiunta dei reagenti. L'insieme di questi errori può avere un peso significativo sul risultato finale se la procedura non è eseguita con cura.

Ottenuta la concentrazione di ossigeno disciolto nel campione prima e dopo l'incubazione, il tasso di respirazione sarà calcolato come segue:

$$\text{mg O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1} = \frac{\text{DO}_i - \text{DO}_f}{t}$$

DO_i = media della concentrazione iniziale di ossigeno disciolto (mg l⁻¹)

DO_f = media della concentrazione di ossigeno disciolto al termine dell'incubazione (mg l⁻¹)

t = tempo di incubazione (h)

I tassi di respirazione saranno considerati significativi se di 2 volte superiori al loro errore standard (95% dei limiti di confidenza). I principali limiti di questo metodo sono dovuti ad una combinazione di fattori che riguardano oltre alla precisione della tecnica analitica, come già ricordato, il numero di repliche, la concentrazione naturale di ossigeno disciolto ed il tempo di incubazione.

Il tasso di respirazione può essere trasformato in tasso di emissione di carbonio (CO₂) sulla base del rapporto stechiometrico esistente tra la produzione di molecole di anidride carbonica e il consumo di molecole di ossigeno definito come quoziente di respirazione (RQ= ΔCO₂/ΔO₂). L'intervallo di valori che tale rapporto assume è notevolmente variabile e funzione dell'ossidazione dei diversi substrati organici (da 0,5 nel caso del metano a 1,33 nel caso dell'acido glicolico). Nel caso in cui la sostanza organica sia di origine planctonica il coefficiente utilizzato è 0,89 (Williams e Robertson, 1991, Hedges *et al.*,

2002). In generale il coefficiente RQ più largamente utilizzato in letteratura è 1.

Dall'analisi di dati ottenuti da numerosi studi di campo effettuati in regioni a diversa trofia (Robinson e Williams, 2005) è possibile indicare tassi medi di respirazione tipici di regioni oligotrofiche $2,4 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ giorno}^{-1}$ (intervallo $<0,7-12,7$; $n=51$) ed eutrofiche $6,5 \text{ mmol O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ giorno}^{-1}$ (intervallo $0-33,4$; $n=132$).

18.3 RESPIRAZIONE DA MISURE BIOCHIMICHE (ETS, ATTIVITÀ DEL SISTEMA DI TRASPORTO DEGLI ELETTRONI)

18.3.1 Principio del metodo

Il principio di questo metodo consiste nell'accedere alla catena respiratoria presente nella membrana lipoproteica interna dei mitocondri degli eucarioti e nella membrana cellulare dei procarioti, previa rottura delle cellule, fornirgli un eccesso dei suoi substrati naturali (NADH, NADPH e sodio succinato) e un accettore artificiale di elettroni (INT: 2-(p-iodiofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio cloruro). La riduzione dell'INT a formazano è quantificata a 490 nm utilizzando uno spettrofotometro. Il tasso di utilizzazione di ossigeno come $\mu\text{l O}_2 \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ è calcolato stechiometricamente sulla base della reazione di riduzione dell'INT in INT-formazano (Packard e Williams, 1981; Kenner e Ahmed, 1975).

18.3.2 Campionamento e conservazione dei campioni

I campioni d'acqua sono prelevati dalle comuni bottiglie di campionamento (tipo Niskin) a diverse profondità lungo la colonna d'acqua. Opportune aliquote di campione sono raccolte in contenitori di polipropilene e prefiltrate attraverso un retino con maglie di $200 \mu\text{m}$. Le aliquote di campione variano da 2 fino a 20 l in base alla natura dell'ambiente in cui si opera e, quindi, alla concentrazione del particolato. I campioni sono quindi concentrati a pressione ridotta ($<1/3 \text{ atm}$) su membrane di fibra di vetro (GF/F). I filtri sono quindi conservati in provette per criogenia e immediatamente immersi in azoto liquido fino alle analisi in laboratorio (<45 giorni), al fine di prevenire la degradazione enzimatica (Ahmed *et al.*, 1976).

18.3.3 Apparecchiatura

- Bottiglie in polipropilene da 2-20 l, lavate in acido, sciacquate con acqua di mare sterile e avvinate con acqua del campione.
- Retino con maglie di $200 \mu\text{m}$.
- Filtri in fibra di vetro, 45 mm di diametro, porosità nominale $0,7 \mu\text{m}$.
- Sistema filtrante monouso sterile, porosità delle membrane $0,22 \mu\text{m}$.
- Apparato da filtrazione completo di pompa aspirante con manometro, beuta da vuoto, portafiltro e imbuto da filtrazione (diametro 45 mm), pinze a molla per fissare l'imbuto alla base e pinzetta per prelevare i filtri.
- Provette per criogenia 5-10 ml.
- Micropipette multidispensatrici da 0,5-10 ml e puntali.
- Pipette sterili monouso da 1 ml e da 10 ml.
- Cilindri graduati da 50, 500 e 1000 ml.
- Frigorifero per la conservazione dei reattivi e delle soluzioni.
- Congelatore per la conservazione dei reattivi (-20°C).

- Contenitore per azoto liquido da 20-50 l.
- Guanti monouso.
- Rastrelliera per provette.
- Spettrofotometro.
- Provette coniche in corex da 15 ml.
- Omogeneizzatore elettrico, completo di “potter” in vetro Pyrex da 10 cm³ e pestello in teflon con scanalature all'estremità.
- Termostato (0-30°C).
- Centrifuga refrigerata.
- Bilancia elettronica di precisione.

18.3.4 Reagenti

Tutti i reattivi sono di grado analitico e l'acqua utilizzata è del tipo Millipore Milli-Q.

- *Tampone fosfato*: 0,05 M, pH 8,0.
- *Soluzione di omogeneizzazione*: in 1 litro di *tampone fosfato* aggiungere 2 ml di Triton X-100, e sciogliere 18,5 mg di MgSO₄ eptaidrato (75 μM) e 1,5 g di polivinil-pirrolidone (PVP). Portare il pH a 8,0 e conservare a -20°C.
- *Tampone dei substrati*: in 1 litro di *tampone fosfato* aggiungere 2 ml di Triton X-100. Conservare a 4°C per un massimo di due settimane.
- *Soluzione dei substrati*: in 1 litro del tampone dei substrati sciogliere 0,6 g di NADH, 0,2 g di NADPH e 36 g di succinato di sodio esaidrato.
- *Soluzione INT*: una soluzione di 2-(p-iodiofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio cloruro viene preparata in acqua bidistillata ad una concentrazione pari a 2,5 mM e conservata a -20 °C.
- *Soluzione di fine reazione*: miscelare nelle proporzioni 1:1 (v:v) una soluzione 1M di formiato di sodio (pH 3,5) e formalina filtrata.

18.3.5 Procedimento

- In laboratorio i filtri vengono omogenati con pestello azionato da un rotore elettrico, in 4 ml di Soluzione di omogeneizzazione per 2 min, ad una temperatura di 0-4 °C, mediante immersione in un beacker contenente ghiaccio.
- l'omogenato viene centrifugato in provette di corex coniche (15 ml) per 10 min a 3000 rpm a 4°C;
- nella rastrelliera vengono poste tre provette di vetro per ciascuna quota campionata. In due provette vengono aggiunti 1 ml di surnatante, 3 ml della soluzione dei substrati (sodio succinato, NADH e NADPH) e 1 ml della soluzione INT. Parallelamente viene preparato un bianco privo di substrati, con 1 ml di surnatante, 3 ml del tampone dei substrati e 1 ml della soluzione INT. Nell'aspirare il surnatante dell'omogenato, bisogna fare molta attenzione a non risospendere il filtro. Le due repliche del campione ed il bianco di riferimento vengono quindi agitati sul vortex e incubati al buio per 20 min a 20°C. La temperatura di incubazione può variare se vengono trattate acque con caratteristiche termiche peculiari (ad es. di provenienza polare o termali).
- trascorsi 20 min la reazione viene bloccata aggiungendo 1 ml della soluzione di fine reazione (formalina e formiato di sodio). Il colore della mistura di reazione cambia durante il periodo d'incubazione da chiaro a rosa a causa della reazione di riduzione dell'INT in INT-formazano;
- dopo 15 min, l'assorbimento dell'INT-formazano prodotto è rilevato per lettura spettrofotometrica a 490 nm in celle con cammino ottico di 1 cm. Poiché 2 μmoli di INT-formazano, con un assorbanza

di 31,8 (A^{490}), equivalgono a 1 μ moles di O_2 ed 1 μ moles di O_2 ha un volume molare di 22,4 μ l se ne evince che 1 μ l di O_2 ha un'assorbanza di 1,42 (A^{490});

- per effettuare un controllo di qualità della procedura analitica, si allestisce un ulteriore bianco, filtrando 1 ml di acqua di mare prefiltrata e trattandolo come fosse un campione. Una lettura spettrofotometrica a 490 nm eccedente il valore di 0,05 A^{490} nm indica contaminazione batterica o bassa qualità dei reagenti.

18.3.6 Calcoli

L'attività ETS è calcolata con l'equazione:

$$ETS (\mu\text{O}_2\text{l}^{-1}\text{h}^{-1}) = (60 \cdot S \cdot H \cdot C\text{-OD}) / (1,42 \cdot f \cdot V \cdot t)$$

dove :

60 = fattore di conversione da min ad ora;

S = volume della soluzione finale di INT-formazano compresa la soluzione di fine reazione (in ml);

H = volume totale dell'omogenato (in ml);

C-OD = assorbanza della miscela di reazione finale corretta per l'assorbanza del bianco;

1,42 = fattore di conversione da INT-formazano in ossigeno;

f = volume dell'omogenato usato nel saggio (1 ml);

V = volume dell'acqua di mare filtrata (l);

t = tempo della reazione (20 min).

I valori di ETS sono corretti per i cambiamenti di attività causati dalla differenza tra la temperatura *in situ* (T_1) e la temperatura alla quale è stata misurata l'attività (T_2), entrambe in gradi Kelvin ($^{\circ}\text{k}$), mediante l'equazione di Arrhenius:

$$ETSt (\mu\text{l O}_2\text{l}^{-1}\text{h}^{-1}) = ETS \cdot e^{-K1/R \cdot (1/T1 - 1/T2)}$$

dove :

ETS = attività ETS, misurata alla temperatura di incubazione (generalmente 20 $^{\circ}\text{C}$).

ETSt = attività ETS, corretta per la temperatura *in situ*.

R = 1,987 cal $\text{mol}^{-1}\text{deg}^{-1}$, costante universale dei gas.

K1 = 15,8 Kcal mol^{-1} , energia di attivazione (Packard *et al.*, 1975).

Nella zona eufotica, il tipico algoritmo usato per convertire i dati di attività potenziale in tasso di consumo di ossigeno (OUR) è $\log \text{OUR} (\text{mg O}_2 \text{ m}^{-3} \text{ giorno}^{-1}) = 0,357 + 0,75 \log \text{ETS}$, proposto da Arístegui e Montero (1995) su un dataset di ~200 campioni proveniente da diverse regioni oceaniche. L'errore medio di predizione dell'algoritmo proposto per la zona eufotica è di $\pm 34\%$. Nell'ambiente marino profondo si fa ricorso all'equazione $\text{OUR} = \text{ETS} \times 0,086$ derivato da 5 ceppi di batteri marini (Christensen *et al.*, 1980; Packard *et al.*, 1988), con l'assunto che i batteri sono i principali microrganismi nelle acque profonde e in uno stato fisiologico di senescenza. D'altro canto l'utilizzo del saggio ETS nelle acque profonde fornisce un dettaglio fine della distribuzione del metabolismo lungo la verticale e provvede una stima del tasso istantaneo poiché non risente degli effetti della pressione (King e Packard, 1975) e *in vitro* delle lunghe incubazioni necessarie con il metodo dell'ossigeno.

I dati OUR possono essere convertiti successivamente in produzione metabolica di CO_2 (CDPR) applicando la seguente equazione:

$$\text{CDPR} (\mu\text{g C dm}^{-3} \text{ giorno}^{-1}) = (\text{OUR} \times 12/22,4) \times (122/172)$$

dove 12 è il peso atomico del carbonio, 22,4 è il volume molare dell'O₂, e 122/172 è il rapporto molare tra carbonio e ossigeno proposto da Takahashi *et al.* (1985). L'errore associato ai fattori di conversione utilizzati per convertire l'attività ETS nella zona afotica a OUR e successivamente a CDPR, è intorno al 30 % (Packard *et al.*, 1988).

18.4 BIBLIOGRAFIA

- AHMED S.I., KENNER A., KING F.D. (1976) - Preservation of enzymatic activity in marine plankton by low-temperature freezing. *Mar. Chem.*, **4**: 133-139.
- APAT, IRSA-CNR (2003) - 4120 Ossigeno disciolto. Determinazione automatica potenziometrica. In: *Metodi analitici per le acque. Manuali e linee guida* 29/2003: 589-593.
- APHA, AWWA, WEF 2005 - Metabolic rate measurements. In: Eaton A.D., Clesceri L. S., Rice E.W., Greenberg A.E. (eds), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington D.C.: 10-28-10-31.
- ARÍSTEGUI J., MONTERO W.G. (1995) - The relationship between community respiration and ETS activity in the ocean. *J. Plank. Res.*, **17**: 1563-1571.
- ARÍSTEGUI J., HARRISON W.G. (2002) - Decoupling of primary production and community respiration in the ocean: implications for regional carbon studies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **29**: 199-209.
- ARÍSTEGUI J., AGUSTÍ S., DUARTE C.M. (2003) - Respiration in the dark ocean. *Geophys. Res. Lett.*, **30**: 1041-1045.
- ARÍSTEGUI J., AGUSTÍ S., MIDDELBURG J.J., DUARTE C.M. (2005) - Respiration in the mesopelagic and bathypelagic zones of the ocean. In: del Giorgio P.A., Williams P.J. (eds), *Respiration in aquatic ecosystems*. Oxford University Press Inc., NY: 181-205.
- AZZARO M., LA FERLA R., AZZARO F. (2006) - Microbial respiration in the aphotic zone of the Ross Sea (Antarctica). *Mar. Chem.*, **99**: 199-209.
- CARPENTER J.H. (1965) - The Chesapeake Bay institute technique for the Winkler dissolved oxygen method. *Limnol. Oceanogr.*, **10**: 141-143.
- CHERRIER J., BAUER J.E., DRUFFEL E.R.M., COFFIN R.B., CHANTON J.P. (1999) - Radiocarbon in marine bacteria: evidence for the ages of assimilated carbon. *Limnol. Oceanogr.*, **44**: 730-736.
- CHRISTENSEN J.P., OWENS T.G., DEVOL A.H., PACKARD T.T. (1980) - Respiration and physiological state in marine bacteria. *Mar. Biol.*, **55**: 267-276.
- DEL GIORGIO P. A., DUARTE C.M. (2002) - Respiration in the open ocean. *Nature*, **420**: 379-384.
- DEL GIORGIO P.A., WILLIAMS P.J. le B. (2005) - The global significance of respiration in aquatic ecosystem: from single cell to the biosphere. In: Del Giorgio P. & Williams P.J. (eds), *Respiration in aquatic ecosystems*. Oxford University Press Inc., NY: 315 pp.
- DENIS M., MARTIN V., MOMZIKOFF A., GONDROY G., STEMMANN L., DEMERS S., GORSKY G., ANDERSEN V. (2003) - Pulsed remineralisation in the northwestern Mediterranean Sea: a hypothesis. *J. Mar. Syst.*, **39**: 19-41.
- GRANELI W., GRANELI E. (1991) - Automatic potentiometric determination of dissolved oxygen. *Mar. Biol.*, **108**: 341-348.
- HEDGES J.I., BALDOCK J.A., GELINAS Y., LEE C., PETERSON M.L., WAKEHAM S.G. (2002) - The biochemical and elemental composition of marine plankton: NMR perspective. *Mar. Chem.*, **78**: 47-63.
- KENNER R.A., AHMED S.I. (1975) - Measurement of electron transport activities in marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, **33**: 119-127.
- KING F.D., PACKARD T.T. (1975) - The effects of hydrostatic pressure on respiratory electron transport system activity in marine zooplankton. *Deep-Sea Res.*, **22**: 99-105.
- LA FERLA R., AZZARO M. (2001) - Microbial respiration in the Levantine Sea: evolution of the oxidative processes in relation to the main Mediterranean water masses. *Deep-Sea Res. I*, **48**: 2147-2159.
- LA FERLA R., AZZARO M. (2004) - Metabolic CO₂ production in the Mediterranean Sea: a study basin for estimating carbon budget in the sea. *Sci. Mar.* **68** (Suppl.1): 57-64.
- LEFEVRE, D., DENIS, M., LAMBERT, C.E., MIQUEL, J.C. (1996) - Is DOC the main source of organic matter remineralization in the ocean water column? *J. Mar. Syst.*, **7**: 281-291.
- PACKARD T.T. (1971) - The measurement of respiratory electron transport activity in marine phytoplankton. *J. Mar. Res.*, **29**: 235-244.

-
- PACKARD T.T., DENIS M., RODIER M., GARFIELD P. (1988) - Deep-ocean metabolic CO₂ production: calculations from ETS activity. *Deep-Sea Res. I*, **35**: 371-382
- PACKARD, T.T., DEVOL, A.H., KING, F.D. (1975) - The effect of temperature on the respiratory electron transport system in marine plankton. *Deep-Sea Res.*, **22**: 237-249.
- PACKARD T.T., WILLIAMS P.J. le B. (1981) - Rates of respiratory oxygen consumption and electron transport in surface sea water from the Northwest Atlantic. *Oceanol. Acta*, **4**: 351-358.
- PUDDU A., ZOPPINI A., FAZI S., ROSATI M., AMALFITANO S., MAGALETTI E. (2003) - Bacterial uptake of DOM released from P-limited phytoplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **46**: 257-268.
- REINTHALER T., VAN AKEN H., VETH C., ARISTEGUI J., ROBINSON C., LE B WILLIAMS. P.J., LEBARON P., HERNDL G. (2006) - Prokariotic respiration and production in the meso- and bathypelagic realm of the eastern and western North Atlantic basin. *Limnol. Oceanogr.*, **51**: 1262-1273.
- ROBINSON C., ARCHER S., WILLIAMS P.J. le B. (1999) - Microbial dynamics in coastal waters of East Antarctica: plankton production and respiration. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **180**: 23-36.
- ROBINSON C., WIDDICOMBE C.E., ZUBKOV M.V., TARTAN G.A., MILLER A.E., REES A.P. (2002) - Plankton community respiration during a coccolithophore bloom. *Deep-Sea Res. II*, **49**: 2929-2950.
- ROBINSON C., WILLIAMS P.J. le B. (2005) - Respiration and its measurement in surface marine waters. In: Del Giorgio P., Williams P.J. le B. (eds), *Respiration in aquatic ecosystems: history and background*. Oxford University Press Inc., NY: 147-180.
- SAGGIOMO V., CATALANO G., RIBERA D'ALCALÀ M. (1990) - Ossigeno disciolto. *Nova Thalassia*, **11**: 91-103.
- SAVENKOFF C., PRIEUR L., REYS J.P., LEFÈVRE D., DALLOT S., DENIS M. (1993a) - Deep microbial communities evidenced in the Liguro-Provençal front by their ETS activity. *Deep-Sea Res. II*, **40**: 709-725.
- SAVENKOFF C., LEFÈVRE D., DENIS M., LAMBERT C.E. (1993b) - How do microbial communities keep living in the Mediterranean outflow within northeast Atlantic intermediate waters? *Deep-Sea Res. II*, **40**: 627-641.
- TAKAHASHI T., BROECKER W.S. LANGER S. (1985) - Redfield ratio based on chemical data from isopycnal surfaces. *J. Geophys. Res.*, **90**: 6907-6924.
- VEZINA A.F., PLATT T. (1988) - Food web dynamics in the ocean. I. Best-estimates of flow networks using inverse methods. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **42**: 269-287
- VOLK T., HOFFERT M. I. (1985) - Ocean carbon pumps: Analysis of relative strengths and efficiencies in ocean driven CO₂ changes. In: Sundquist E. T., Broecker W. S. (eds), *The Carbon Cycle and Atmospheric CO₂ Natural Variations Archean to Present*. *Geophys. Monogr. Ser.*, **32**, Washington, D. C.: 99 -110.
- WILLIAMS P.J. le B., ROBERTSON J.E. (1991) - Overall plankton oxygen and carbon dioxide metabolism: the problem of reconciling observations and calculations of photosynthetic quotients. *J. Plank. Res.*, **13**: 153-169.

CAPITOLO 19. ATTIVITÀ ENZIMATICHE EXTRACELLULARI

G. Caruso, R. Danovaro, R. Zaccone, A. Zoppini

gabriella.caruso@iamc.cnr.it

19.1 INTRODUZIONE

La degradazione e la mineralizzazione della materia organica hanno profonde implicazioni sul funzionamento dei cicli biogeochimici e sull'efficienza del comparto microbico, contribuendo a regolare il flusso di materia ed energia attraverso la rete trofica (Azam *et al.*, 1993). Negli ecosistemi acquatici la degradazione delle molecole organiche (e.g., proteine, lipidi, carboidrati, fosfati organici) viene principalmente espletata da enzimi prodotti da microrganismi (Hoppe, 1991). Il processo di idrolisi enzimatica precede e facilita i processi di respirazione (e quindi il rilascio di anidride carbonica) e contribuisce al riciclo di azoto e fosforo necessari al sostentamento della produzione primaria e della produzione procarionica eterotrofa (Azam *et al.*, 1983; Azam *et al.*, 1993; del Giorgio e Cole, 2000). La determinazione dei tassi di idrolisi enzimatica è quindi fondamentale per quantificare il contributo dell'attività microbica al turnover della materia organica (Martinez *et al.*, 1996; Caruso e Zaccone, 2000; Hoppe *et al.*, 2002; Zaccone e Caruso, 2002; La Ferla *et al.*, 2002; 2005; Zaccone *et al.*, 2002; 2004; Caruso *et al.*, 2003; 2005; 2006; Zoppini *et al.*, 2005). Infatti, i batteri eterotrofi possono assimilare direttamente solo molecole aventi basso peso molecolare (es., aminoacidi, zuccheri semplici, acidi grassi). L'utilizzo di molecole organiche ad elevato peso molecolare richiede una preventiva idrolisi in composti più semplici (Hoppe *et al.*, 2002). Numerosi microrganismi, tra cui batteri eterotrofi, microalghe, cianobatteri, funghi e lieviti, sintetizzano enzimi, tra cui: a) enzimi intracellulari; b) ectoenzimi (enzimi legati alla parete cellulare o contenuti nello spazio periplasmico della cellula produttrice); c) enzimi extracellulari, o esoenzimi. Gli ectoenzimi rendono disponibili i composti a basso peso molecolare nelle immediate vicinanze della cellula, permettendole di competere con altri organismi soprattutto in concentrazioni limitanti di nutrienti. Gli esoenzimi sono presenti in fase disciolta nel mezzo acquoso, rilasciati da cellule lisate o adsorbiti a particelle diverse dalla cellula che li ha prodotti (Chrost, 1990). L'enzima aminopeptidasi, ad esempio, sebbene prevalentemente associato alla superficie delle cellule, in aree costiere risulta presente anche in forma disciolta nelle acque (Karner e Rassoulzadegan, 1995). I meccanismi di regolazione dei processi di sintesi consentono di distinguere fra enzimi costitutivi, sintetizzati indipendentemente dalla presenza del substrato specifico, ed enzimi inducibili, la cui sintesi dipende dalla concentrazione di substrato disponibile. Una condizione di limitazione da nutrienti può indurre le cellule batteriche alla sintesi di enzimi per l'acquisizione dell'elemento limitante (Hoppe, 1983); infatti, gli enzimi fosfatasi alcalina ed aminopeptidasi possono essere attivati rispettivamente in ambienti poveri di fosforo ed azoto (Sala *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2003). In particolare, l'aminopeptidasi, i cui prodotti finali sono aminoacidi o piccoli peptidi, è ritenuto un enzima potenzialmente importante sia per la degradazione del carbonio che per l'acquisizione dell'azoto (Findlay *et al.*, 2001). Ogni enzima è specifico per un substrato; la reazione enzima-substrato avviene a livello del sito attivo dell'enzima.

19.2 PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo fluorimetrico, sensibile e relativamente rapido, viene comunemente utilizzato per la quantificazione delle attività enzimatiche in campioni d'acqua di mare e prevede l'uso di substrati fluorogenici artificiali (Hoppe, 1993). Questi substrati sono analoghi ai composti naturali e sono formati da una molecola organica (es. glucosio, aminoacidi) legata in modo covalente (legame peptidico o esterico) ad una molecola fluorescente ("fluorocromo"). I fluorocromi maggiormente utilizzati sono il metilumbelliferone

[MUF] e la 7-amino-4-metilcumarina [MCA]). L'idrolisi del legame covalente da parte di enzimi specifici presenti nel campione libera il gruppo fluoroforo (MUF o MCA) che produce fluorescenza rilevabile per via fluorimetrica. Il meccanismo d'azione dei substrati fluorogenici è schematizzato in Fig. 1.

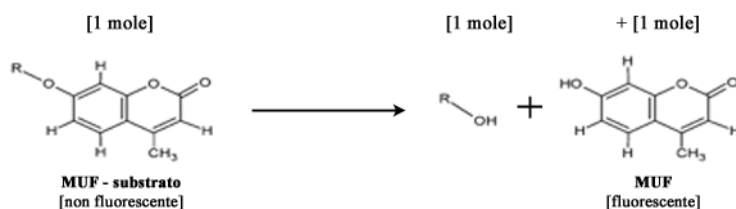


Fig. 1 - Schema del meccanismo d'azione dei substrati fluorogenici.

I substrati fluorogenici vengono aggiunti al campione in concentrazioni crescenti per determinare la velocità massima di idrolisi (V_{max}) in condizioni di saturazione enzimatica. All'aumentare dell'attività/concentrazione enzimatica viene rilasciata una quantità crescente di fluorocromo che produce un aumento della fluorescenza emessa, determinabile per via fluorimetrica a specifiche lunghezze d'onda. La V_{max} esprime l'attività enzimatica potenziale in condizioni naturali (*in situ*). L'idrolisi dei substrati segue una cinetica enzimatica di primo ordine e può essere inibita da una varietà di composti naturali con le stesse caratteristiche strutturali dei substrati fluorogenici.

19.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI

19.3.1 Attrezzatura

- Fluorimetro provvisto di filtri di eccitazione/emissione con lunghezza d'onda pari a 380/440 nm (per i substrati il cui prodotto di idrolisi è l'MCA) o 365/455 nm (per i substrati il cui prodotto di idrolisi è il MUF).
- Incubatore con sistema di controllo della temperatura.
- Congelatore, per la conservazione delle soluzioni stock di substrato e degli standard.
- Contenitori sterili per la raccolta e la conservazione del campione (da 100 o 200 ml).
- Pipetta multidispenser con capacità di 50 ml o pipetta automatica da 10 ml o, in alternativa, pipette da 10 ml sterili.
- Pipette automatiche da 100 e da 1000 μ l.
- Provette sterili tipo Falcon da 15 ml per incubazione.
- Portaprovette.
- Cuvetta in quarzo con cammino ottico pari a 1 mm.

19.3.2 Reagenti

Sono disponibili in commercio i substrati fluorogenici per i tipi più comuni di composti naturali e gli standard MCA e MUF: ogni substrato è specifico per un particolare enzima, che è capace di idrolizzarlo. La Tab. 1 riporta un elenco dei substrati più comunemente adoperati e dei relativi enzimi. In genere, in acqua di mare, svolgono un ruolo chiave l'aminopeptidasi, le glucosidasi (alfa e beta), la lipasi e la fosfatasi alcalina.

Tab.1 - Elenco dei substrati artificiali comunemente utilizzati per la misura delle attività enzimatiche extracellulari elencate.

Substrato	Enzima
MUF-N-acetyl-glucosaminide	N-acetyl-glucosaminidasi (chitinasi)
L-leucine-4-methylcoumarinyl-7-amide (Leu-MCA)	aminopeptidasi
MUF- β -D-glucopyranoside	β -D-glucosidasi
MUF- α -D-glucopyranoside	α -D-glucosidasi
MUF-butyrate-heptanoate-palmitate	lipasi
MUF-phosphate	fosfatasi

19.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

19.4.1 Prelievo del campione

Il prelievo dei campioni prevede l'utilizzo di un campionatore sterile monouso. Qualora ciò non fosse possibile si può utilizzare un campionatore di altro tipo (es., bottiglia tipo Niskin), sciacquato ripetutamente prima dell'uso con acido cloridrico diluito e quindi con acqua distillata sterile (Sieburth, 1979). Aliquote di campione vengono raccolte in contenitori sterili (100 o 200 ml), che devono essere mantenuti in condizioni refrigerate (5°C) fino al momento dell'analisi.

19.5 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

19.5.1 Preparazione ed uso delle soluzioni standard e di substrato

Le concentrazioni di substrato saturante possono variare in funzione delle caratteristiche ambientali. Per la valutazione delle cinetiche enzimatiche viene generalmente utilizzato un ampio intervallo di concentrazioni (da poche nmoli a diverse μ moli). Le soluzioni del substrato prescelto per la misura dell'attività enzimatica di interesse vengono preparate utilizzando l'acqua MilliQ come solvente. La solubilità di alcuni composti in acqua può essere limitata per cui può essere necessario utilizzare un solvente organico, come il metil-cellosolve (etilenglicol mono-metil-etero, $C_3H_8O_2$, Sigma). L'agitazione favorisce la dissoluzione del substrato. Le soluzioni degli standard vengono preparate come soluzioni stock dissolvendo i composti in acqua di mare sterile, autoclavata e pre-filtrata su membrane da 0,2 μ m in modo da ottenere una concentrazione finale pari a 5 mmoli l^{-1} . Le soluzioni stock possono essere conservate in provette sterili, al buio e a -20°C, senza subire alterazioni per diverse settimane. Appena prima del saggio, aliquote di soluzione stock vengono diluite con acqua di mare sterile per ottenere soluzioni di lavoro con concentrazione pari a 20 μ moli l^{-1} .

19.6 PROCEDURA ANALITICA

Per ogni misura di attività enzimatica è prevista l'utilizzazione di serie di provette. Ogni serie è costituita da 5 provette: in 4 provette viene dispensata un'aliquota pari a 10 ml di campione, mentre la quinta provetta rappresenta il controllo (bianco), che è costituito dal campione (10 ml) sterilizzato in autoclave e successivamente raffreddato a temperatura ambiente. In ogni provetta vengono aggiunte, mediante pipetta automatica, aliquote fisse di substrato fluorogenico a concentrazione crescente, in modo

da raggiungere la concentrazione di substrato saturante l'enzima. La fluorescenza viene misurata immediatamente dopo l'aggiunta del substrato e viene ripetuta al termine dell'incubazione. La misura dell'attività enzimatica è indipendente dal volume di campione sottoposto ad analisi, perché il prodotto di idrolisi fluorescente si trova in forma disciolta nel campione. In genere l'attività enzimatica viene misurata a concentrazioni di substrato crescenti, con molarità comprese fra 20 nmoli l⁻¹ (per campioni di acque oligotrofiche) e 40-50 μmoli l⁻¹ (ad es. per acque costiere). Le concentrazioni di substrato utilizzate devono comunque essere comparabili, per ordine di grandezza, con quelle degli standard utilizzati per la calibrazione (vedi paragrafo "Misura fluorimetrica").

19.7 MISURA FLUORIMETRICA

È necessario calibrare lo strumento di misura (fluorimetro) con concentrazioni note di standard (MCA e MUF). In genere, per campioni provenienti da aree oligotrofiche vengono utilizzate concentrazioni comprese fra 5 e 800 nmoli l⁻¹; per campioni di acque eutrofiche le concentrazioni adoperate variano fra 0,5 e 50 μmoli l⁻¹. La fluorescenza emessa dal campione viene registrata immediatamente dopo l'aggiunta del substrato e ripetuta dopo l'incubazione di cui viene registrato il tempo esatto per la successiva elaborazione dei dati. Vengono utilizzate le seguenti lunghezze d'onda di eccitazione/emissione: 380/440 nm per l'enzima leucina- aminopeptidasi e 365/455 nm per gli enzimi α-, β-glucosidasi e fosfatasi.

19.8 INCUBAZIONE

Le provette contenenti il campione ed il substrato vengono incubate al buio, alla temperatura "in situ". La durata dell'incubazione varia in base alla natura del campione. I tempi di incubazione variano tra 1 e 3 ore, rispettivamente per campioni provenienti da zone eutrofiche/costiere, a 12 ore per campioni ad attività molto bassa. L'utilizzo di tempi di incubazione relativamente brevi è generalmente raccomandabile, poiché sufficiente a effettuare misure minimizzando gli effetti di incubazione (es. cambiamenti nella struttura della comunità microbica durante l'analisi). Tuttavia, tempi di incubazione più lunghi possono rendersi necessari in sistemi a bassa attività (ambienti profondi o acque polari). Terminata l'incubazione viene misurata la fluorescenza del campione che sarà proporzionale alla quantità di fluorocromo rilasciato dal substrato modello per idrolisi enzimatica. L'intensità di fluorescenza emessa dal campione, misurata per via fluorimetrica, viene convertita in concentrazione di MCA o MUF rilasciato tramite l'utilizzo di una retta di taratura ottenuta con concentrazioni note dello standard. In genere, l'aumento di fluorescenza segue un andamento lineare entro brevi periodi dall'inizio dell'incubazione.

19.9 ELABORAZIONE DEI DATI

Le misure di fluorescenza dei campioni incubati vengono convertite in velocità di idrolisi enzimatica secondo la formula:

$$V = \frac{A_1 - A_0}{B} \times \frac{1}{C}$$

Dove: V= velocità di idrolisi (nmol MUF o MCA l⁻¹ h⁻¹)

A₁= fluorescenza emessa dal campione incubato

A₀= fluorescenza emessa dal campione subito dopo l'aggiunta del substrato

B= tempo di incubazione (ore)

C= pendenza della retta di calibrazione (concentrazioni di MUF o MCA espresse in nmoli l⁻¹).

Per convertire le concentrazioni di fluorocromo liberato, pari alle quantità molari di substrato idrolizzato, in microgrammi o nanogrammi di C rilasciato per litro e per ora ($\mu\text{g C l}^{-1} \text{ h}^{-1}$) si considerano 72 $\mu\text{g C}$ per μmole di fluorocromo liberato, nel caso in cui il composto organico rilasciato sia il glucosio o un aminoacido con 6 atomi di C. Per i composti fosforici, si considerano 31 $\mu\text{g P}$ rilasciati per μmole di fluorocromo liberato.

Dai valori di V ottenuti per ogni singola concentrazione di substrato, mediante trasformazione di Lineweaver-Burke, si risale alla velocità massima di idrolisi (V_{max}), che corrisponde al reciproco dell'intercetta della retta di regressione lineare con l'asse delle ordinate. Dall'intercetta della retta con l'asse delle ascisse è possibile invece determinare la costante di Michaelis-Menten (K_m), che fornisce una misura dell'affinità dell'enzima per il substrato (Fig. 2).

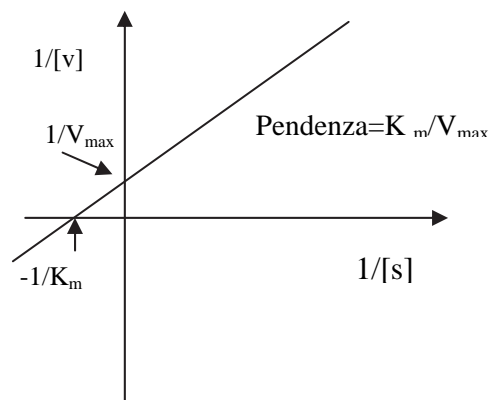


Fig. 2 - Trasformazione di una cinetica enzimatica per il calcolo della V_{max} e della K_m .

19.10 NOTE E COMMENTI

La reazione di idrolisi enzimatica dipende da diversi fattori, di cui occorre tenere conto: i) il pH; ii) il tempo; iii) la temperatura di incubazione; iv) la concentrazione del substrato; v) la presenza di inibitori (es., concentrazione di metalli pesanti).

19.10.1 Conservazione del campione per successiva analisi

Condizione ottimale per le determinazioni di attività enzimatica è effettuare le analisi su campioni di acqua mantenuti a temperatura *in situ* immediatamente dopo il prelievo. Tuttavia, qualora non esistano le condizioni sopra descritte, o sia necessario interrompere la procedura analitica posticipando la misura fluorimetrica, è possibile bloccare l'attività enzimatica con aggiunta di cloruro di mercurio a concentrazione finale 4 mM (Chrost e Velimirov, 1991) o alterazione del pH (fortemente acido o basico a seconda del substrato utilizzato) seguita da congelamento. Tuttavia, questi trattamenti devono essere controllati attentamente (Christian e Karl, 1995) per le interferenze che producono sui valori di fluorescenza. Inoltre, il congelamento dei campioni può determinare la lisi delle membrane cellulari, con rilascio degli enzimi endogeni.

19.10.2 Misure di ectoenzimi su campioni frazionati per classe dimensionale

Applicando una metodologia analoga a quella finora descritta nel presente capitolo, è possibile effettuare misure di attività enzimatica riferite a singole componenti planctoniche, al fine di distinguere fra attività ecto-enzimatica associata alla frazione picoplanctonica (taglia 0,2-2 μm), nanoplanctonica (taglia 2,0-20 μm) o microplanctonica (taglia 20-200 μm). Dopo filtrazione selettiva attraverso membrane con porosità tali da selezionare la componente desiderata viene determinata l'attività enzimatica seguendo le modalità descritte per il trattamento di campioni di acqua di mare descritto sopra.

19.11 BIBLIOGRAFIA

- AZAM F., FENCHEL T., FIELD J.G., GRAY J.S., MEYER-REIL L.A., THINGSTAD F. (1983) - The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10**: 257-263.
- AZAM F., SMITH D.C., STEWARD G.F., HAGSTROM A. (1993) - Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling. *Microb. Ecol.*, **28**: 167-179.
- CARUSO G., ZACCONE R. (2000) - Estimates of leucine aminopeptidase activity in different marine and brackish environments. *J. Appl. Microb.*, **89**: 951-959.
- CARUSO G., ZACCONE R., AZZARO M., MANCUSO M., LEONARDI M. (2003) - Stime di abbondanza ed attività microbiche in un'area oligotrofica del mar Ionio: studio stagionale. *Atti Associazione Italiana Oceanologia e Limnologia*, **16**: 67 - 77.
- CARUSO G., MONTICELLI L., AZZARO F., AZZARO M., DECEMBRINI F., LA FERLA R., LEONARDI M., ZACCONE R. (2005) - Dynamics of extracellular enzymatic activities in a shallow Mediterranean ecosystem (Tindari ponds, Sicily). *Mar. Freshwater Res.*, **56**: 173-188.
- CARUSO G., GENOVESE L., MODICA A., SCILIPOTI D., LA TORRE R. (2006) - Parametri microbici quali indicatori dell'impatto di attività di maricoltura sull'ambiente marino. *Biol. Mar. Medit.*, **13**: 294 - 304.
- CHRISTIAN J.R., KARL D.M. (1995) - Measuring bacterial ectoenzyme activities in marine waters using mercuric chloride as a preservative and a control. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **123**: 217-224.
- CHROST R.J. (1990) - Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In: Overbeck J., Chrost R.J. (eds.), *Aquatic Microbial Ecology: biochemical and molecular approaches*. Brock/Springer, New York: 47-78.
- CHROST R.J., VELIMIROV B. (1991) - Measurement of enzyme kinetics in water samples: effect of freezing and soluble stabilizer. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **70**: 93-100.
- DEL GIORGIO P.A., COLE J.J. (2000) - Bacterial energetics and growth efficiency. In: Kirchman D. (ed), *Marine Microbial Ecology*, Plenum Press, New York: 289-325.
- FINDLAY S., QUINN J. M., HICKEY C. W., BURRELL G., DOWNES M. (2001) - Land-use effects on supply and metabolism of stream dissolved organic carbon. *Limnol. Oceanogr.*, **46**: 345-355.
- HOPPE H.G. (1983) - Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **11**: 299-308.
- HOPPE H.G. (1991) - Microbial extracellular enzyme activity: a new key parameter in aquatic ecology. In: Chrost R.J. (ed), *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer Verlag, Berlin: 60-83.
- HOPPE H.G. (1993) - Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds), *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publisher, Boca Raton FL: 423-432.
- HOPPE H.G., ARNOSTI C., HERNDL G.J. (2002) - Ecological significance of bacterial enzymes in the marine environment. In: Burns R., Dick R. (eds), *Enzymes in the environment: activity, ecology and applications*. Marcel Dekker, New York: 73-108.
- KARNER M., RASSOULZADEGAN F. (1995) - Extracellular enzyme activity: indications for high short-term variability in a coastal marine ecosystem. *Microb. Ecol.*, **30**: 143-156.
- LA FERLA R., ZACCONE R., AZZARO M., CARUSO G. (2002) - Microbial respiratory and ectoenzymatic activities in the Northern Adriatic Sea. *Chem. Ecol.*, **18**: 75-84.
- LA FERLA R., AZZARO F., AZZARO M., CARUSO G., DECEMBRINI F., LEONARDI M., MAIMONE G., MONTICELLI L.S., RAFFA F., SANTINELLI C., ZACCONE R., RIBERA D'ALCALÀ M. (2005) - Microbial contribution to carbon biogeochemistry in the Mediterranean Sea: variability of activities and biomass. *J. Mar. Syst.*, **57**: 146-166.

-
- MARTINEZ J., SMITH D.C., STEWARD G.F., AZAM F. (1996) - Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, **10**: 223-230.
- SALA M.M., KARNER M., ARIN L., MARRASÈ C. (2001) - Measurement of ectoenzyme activities as an indication of inorganic nutrient imbalance in microbial communities. *Aquat. Microb. Ecol.*, **23**: 301-311.
- SIEBURTH J. McN. (1979) - *Sea Microbes*. Oxford University Press. Inc., New York: 491 pp.
- TAYLOR G.T., WAY J., YU Y., SCRANTON M.I. (2003) - Ectohydrolase activity in surface waters of the Hudson River and western Long Island Sound estuaries. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **263**: 1-15.
- ZACCONI R., CARUSO G. (2002) - Microbial hydrolysis of polysaccharides and organic phosphates in the northern Adriatic Sea. *Chem. Ecol.*, **18**: 85-94.
- ZACCONI R., CARUSO G., CALI' C. (2002) - Heterotrophic bacteria in the Northern Adriatic Sea: seasonal changes and enzyme profile. *Mar. Environ. Res.*, **54**: 1-19.
- ZACCONI R., AZZARO M., CAROPPO C., LA FERLA R., ZAMPINO D., CARUSO G., LEONARDI M., MAIMONE G., SITRAN R. (2004) - Deep-Chlorophyll Maximum time series in the Augusta Gulf (Ionian Sea): microbial community structures and functions. *Chem. Ecol.*, **20** (suppl. 1): 276-284.
- ZOPPINI A., PUDDU A., FAZI S., ROSATI M., SIST P. (2005) - Extracellular enzyme activity and dynamics of bacterial community in mucillaginous aggregates of the Northern Adriatic Sea. *Sci. Total Environ.*, **353**: 270-286.

CAPITOLO 20. CONTEGGIO IN EPIFLUORESCENZA PER LA STIMA DEL NANOPLANCTON AUTOTROFO ED ETEROTROFO

S. Vanucci, P. Del Negro, F. Bernardi Aubry

silvana.vanucci@unime.it

20.1 INTRODUZIONE

Il termine nanoplancton definisce la classe dimensionale degli organismi planctonici con dimensioni lineari comprese fra 2 e 20 μm (Sieburth *et al.*, 1978). Il nanoplancton è costituito da un insieme eterogeneo di protisti di diversa natura trofica: fototrofi, eterotrofi e mixotrofi appartenenti a diverse suddivisioni tassonomiche. Il nanoplancton fototrofo, o nanofitoplancton, rappresenta la frazione nanoplanctonica del fitoplancton, mentre il nanoplancton eterotrofo è rappresentato da protozoi fra i quali prevalgono i flagellati. Gli organismi mixotrofi, anch'essi appartenenti a numerosi gruppi tassonomici, mostrano un vasto spettro di strategie nutrizionali dipendenti dallo stato fisiologico e dalle condizioni ambientali (Raven, 1997; Caron, 2001).

La stima dell'abbondanza del nanoplancton e, più in generale, lo studio della dinamica di questi organismi nei differenti ecosistemi acquatici sono stati per molto tempo di difficile approccio per l'assenza di un metodo di facile applicazione che rendesse possibile la loro visualizzazione ed il loro conteggio. A partire dagli anni ottanta del secolo scorso, l'affinamento di alcuni protocolli in applicazione alla microscopia in epifluorescenza ha permesso di utilizzare quest'ultima quale tecnica di routine per l'osservazione diretta dei protisti in campioni naturali. È stata così evidenziata la presenza di elevate abbondanze di organismi nanoplanctonici, in particolare di quelli di più piccole dimensioni (i.e. $< 10 \mu\text{m}$), in tutti gli ambienti acquatici (Caron *et al.*, 1999 e bibliografia in esso riportata; Sherr e Sherr, 2000); ciò ha imposto una revisione e una rivalutazione del loro ruolo ecologico nella rete trofica microbica, in considerazione anche dell'ampio spettro di strategie nutrizionali che possono mettere in atto (e.g. Porter *et al.*, 1985; Caron, 1997; Caron, 2000 e bibliografia in essi riportata).

20.1.1 Principio del metodo

L'applicazione della microscopia in epifluorescenza per il conteggio diretto del nanoplancton in campioni d'acqua naturali si basa sulla possibilità di visualizzare gli organismi tramite l'emissione di fluorescenza da parte di uno o più fluorocromi aggiunti al campione naturale ed eccitati con energia luminosa di lunghezza d'onda appropriata. I fluorocromi, a seconda delle loro caratteristiche, sono specifici per alcune componenti cellulari alle quali si legano selettivamente e che evidenziano una volta eccitati. La frazione fototrofa del nanoplancton viene discriminata da quella eterotrofa tramite l'emissione naturale di fluorescenza (autofluorescenza) da parte dei pigmenti clorofilliani eccitati con luce di lunghezza d'onda opportuna. La presenza di cloroplasti non necessariamente conferma che la fotosintesi sia l'unica modalità di nutrizione di questi organismi; molte specie di alghe sono capaci di fagotrofia, così come molte specie erbivore di ciliati mantengono in stato funzionale i cloroplasti delle prede ingerite.

20.2 MATERIALE RICHIESTO

20.2.1 Attrezzatura

- Microscopio equipaggiato per l'epifluorescenza - La radiazione fluorescente emessa dal campione è spesso di bassa intensità e tende a decadere in tempi brevi, il microscopio deve quindi possedere ottiche molto luminose; in particolare deve essere dotato di: (i) lampada a vapori di mercurio ad alta pressione (100-200-W); (ii) obiettivo ad immersione 100X ad alta apertura numerica e fondo piatto tipo Neofluar, adeguato anche per l'eccitazione nell'ultravioletto (UV); (iii) oculari 8 - 12,5 X dotati di reticolo quadrettato e di micrometro; (iv) set di filtri ottici appropriati per l'epifluorescenza della clorofilla a e per quella dei fluorocromi prescelti; (v) dispositivo di scorrimento veloce per il passaggio rapido da un set di filtri all'altro; (vi) tavolino traslatore graduato;
- vetrino micrometrico;
- frigorifero e congelatore;
- autoclave;
- cappa aspirante;
- apparato di filtrazione completo di pompa aspirante con manometro, beuta da vuoto, portafiltro del diametro di 25 mm, imbuto da filtrazione e pinze per fissare l'imbuto alla base.

20.2.2 Materiale di laboratorio

- Normale materiale da laboratorio; la vetreria che entra in contatto con il campione deve essere accuratamente lavata e sterilizzata per rendere più agevole l'osservazione al microscopio (vedi anche par. 2,3);
- contenitori sterili in materiale plastico da 250 - 500 ml;
- siringhe sterili e filtri per siringa di porosità 0,22 μm ;
- filtri a membrana in policarbonato neri ("black-stained") del diametro di 25 mm e porosità nominale di 2,0 o 0,8 o 0,6 μm (Nuclepore);
- filtri in cellulosa (diametro 25 mm) di supporto ai filtri a membrana in policarbonato per facilitare una distribuzione uniforme delle cellule sulla superficie. Per non ostacolare la filtrazione è preferibile utilizzare filtri di supporto di porosità leggermente superiore a quelli di raccolta;
- pipette automatiche a volume variabile e relativi puntali monouso sterili, guanti monouso, pinzette per filtri;
- vetrini portaoggetto e coprioggetto;
- olio non fluorescente per microscopia ad immersione (e.g. Cargille tipo FF) o fluido di montaggio per la colorazione FITC.

20.2.3 Prodotti chimici e soluzioni

Tutte le soluzioni utilizzate nei diversi protocolli (soluzioni dei coloranti, soluzioni tampone e di lavaggio) devono essere filtrate su filtro di porosità 0,22 μm prima del loro utilizzo per eliminare il materiale particellato ed i batteri eventualmente presenti che, a seguito della colorazione, potrebbero aumentare la fluorescenza di background del preparato rendendo l'osservazione ed il conteggio più difficoltosi. Qui di seguito sono riportate le soluzioni stock e di lavoro dei tre fluorocromi attualmente in maggior uso per il conteggio del nanoplancton.

Soluzione per colorazione con DAPI

Soluzione stock di DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole) ($1,0 \text{ mg ml}^{-1}$) - sciogliere, in provetta sterile, 10 mg di DAPI in polvere in 10 ml di acqua distillata sterile; filtrare la soluzione tramite siringa sterile munita di filtro con porosità $0,22 \mu\text{m}$ e trasferirla in una nuova provetta sterile. Conservare la soluzione al buio a -20°C , eventualmente in aliquote di 1 ml.

Soluzione per colorazione con Proflavina

Soluzione di lavoro di Proflavina (3-6-diaminoacridina emisolfato) ($250 \mu\text{g ml}^{-1}$) - sciogliere 10 mg di proflavina in 40 ml di acqua distillata sterile quindi filtrare su filtro $0,22 \mu\text{m}$ e conservare la soluzione al buio a $+4^\circ\text{C}$.

Soluzione per colorazione con FITC

Soluzione di lavoro di FITC (fluoresceina isotiocianato) - mescolare $0,25 \text{ ml}$ di tampone carbonato $0,5 \text{ M}$ (pH 9,5) con $1,1 \text{ ml}$ di tampone fosfato di potassio $0,01 \text{ M}$ (pH 7,2), $1,1 \text{ ml}$ di cloruro di sodio $0,85\%$ e $1,0 \text{ mg}$ di FITC.

Preparazione delle soluzioni tampone:

1. Tampone carbonato – mescolare 100 ml di una soluzione preparata sciogliendo $4,2 \text{ g}$ di NaHCO_3 in 100 ml di acqua distillata con 60 ml di una soluzione preparata sciogliendo $5,3 \text{ g}$ di Na_2CO_3 in 100 ml di acqua distillata; portare a pH 9,5.
2. Tampone fosfato – mescolare 72 ml di una soluzione preparata sciogliendo $0,87 \text{ g}$ di KH_2PO_4 in 500 ml di acqua distillata con $6,2 \text{ ml}$ di una soluzione preparata sciogliendo $0,65 \text{ g}$ di K_2HPO_4 in 500 ml di acqua distillata.

Soluzione di Irgalan black

Nel caso non siano disponibili filtri a membrana neri, è necessario annerire i filtri bianchi per minimizzare la loro fluorescenza di sottofondo. La colorazione avviene per immersione dei filtri (24 ore) in una soluzione di Irgalan black (2 g l^{-1} in acido acetico al 2%), prefiltrata su $0,22 \mu\text{m}$, e successivo risciacquo ripetuto con acqua distillata prefiltrata su $0,22 \mu\text{m}$ (Hobbie *et al.*, 1977).

Soluzione fissativo

Glutaraldeide al 25% prefiltrata su $0,22 \mu\text{m}$.

20.2.4 Filtri e fluorocromi

20.2.4.1 Selezione dei filtri a membrana

Attenendosi alla definizione di nanoplancton ($2\text{-}20 \mu\text{m}$) la porosità nominale della membrana filtrante da utilizzare dovrebbe essere di $2 \mu\text{m}$ (Sherr e Sherr, 2000). Ciononostante è piuttosto frequente l'utilizzo di filtri a porosità inferiore ($0,8$ o $0,6 \mu\text{m}$) in quanto sono più facilmente reperibili in commercio nella versione "black" e adatti a trattenere eventuali flagellati di dimensioni superiori a $2 \mu\text{m}$ che, sotto la pressione di filtrazione, potrebbero passare attraverso i pori di $2 \mu\text{m}$ a seguito della loro plasticità. L'impiego di membrane a porosità inferiore a $2 \mu\text{m}$, d'altra parte, essendo soggette ad una più rapida occlusione dei pori, in alcune condizioni ambientali, potrebbero non garantire la filtrazione di un volume adeguato per la stima del nanoplancton.

In generale, l'efficienza di raccolta di un filtro dipende, oltre che dalla sua porosità, anche da molti altri fattori fra i quali: (i) la composizione delle popolazioni nanoplanctoniche (e.g. taglia e flessibilità) presenti nel campione d'acqua, (ii) la quantità di particellato, (iii) l'azione del fissativo sulle dimensioni cellulari e (iv) la pressione di filtrazione.

Nella scelta della porosità del filtro da utilizzare è necessario quindi considerare quanto summenzionato e l'eventualità di mettere in relazione i risultati ottenuti sia con altri parametri biologici (e.g. clorofille frazionate) sia con i dati disponibili in letteratura.

20.2.4.2 Selezione del fluorocromo

I fluorocromi utilizzati per la colorazione del nanoplancton differiscono fra loro principalmente per: (i) la specificità di legame a molecole differenti, (ii) il grado di selettività, ovvero la tendenza a colorare in modo aspecifico la matrice biologica ed il particellato amorfo, (iii) lo spettro di luce di eccitazione e di emissione. In particolare, dal punto di vista ottico, gli spettri di eccitazione e di emissione dei fluorocromi possono essere non sovrapponibili a quelli dei pigmenti fotosintetici (in particolare a quelli della clorofilla *a*) oppure possono sovrapporsi, anche solo parzialmente, a quelli di quest'ultimi. In generale comunque, non è possibile individuare in un unico fluorocromo tutte le caratteristiche ottimali per il conteggio del nanoplancton in campioni naturali. Inoltre, i differenti fluorocromi prevedono protocolli di colorazione di diversa complessità di esecuzione. Qui di seguito sono riportate le caratteristiche più salienti dei coloranti riportati in letteratura per l'enumerazione del nanoplancton, per una trattazione più dettagliata si rimanda a Sherr *et al.* (1993).

AO

Il fluorocromo Arancio di Acridina (Acridine Orange, AO), intercalante degli acidi nucleici (DNA e RNA), è caratterizzato da uno spettro di emissione largamente sovrapponibile a quello della clorofilla *a* (Tab. 1) e pertanto non consente la discriminazione degli organismi autotrofi dagli eterotrofi. È particolarmente adatto per il conteggio di organismi in coltura, ma meno appropriato per la maggior parte dei campioni naturali; l'AO infatti, si lega al materiale detritico ed emette fluorescenza aspecifica che rende difficoltoso il conteggio cellulare.

Vantaggi - (i) Metodo veloce.

Svantaggi - (i) Colorazione aspecifica del materiale amorfo particellato; (ii) necessità di analizzare due preparati (e relative repliche) per ogni campione: uno per l'osservazione del nanoplancton totale (fototrofo ed eterotrofo), previa colorazione con il fluorocromo, ed uno per l'osservazione del nanoplancton fototrofo ottenuto senza aggiunta del fluorocromo; (iii) colorazione dell'apparato di filtrazione e probabile contaminazione dei successivi campioni non colorati, quindi l'apparato di filtrazione dovrebbe essere usato esclusivamente per la colorazione con AO; (iv) alto grado di cancerogenità.

Proflavina

Il fluorocromo 3-6-diaminoacridina emisolfato (Proflavina), intercalante del DNA che si lega anche alle proteine, presenta uno spettro di eccitazione sovrapponibile a quello della clorofilla *a* e uno spettro di emissione ben separato da quello del pigmento; la colorazione del preparato con questo fluorocromo permette, quindi, la discriminazione contemporanea delle cellule fototrofe da quelle eterotrofe presenti nello stesso campo visivo utilizzando un unico set di filtri ottici.

Vantaggi - (i) Preparazione di un solo tipo di vetrino per campione.

Svantaggi - (i) Composto mutageno; (ii) l'autofluorescenza può essere in parte mascherata.

FITC

Il fluorocromo fluoresceina isotiocianato (FITC) si lega alle proteine fornendo una buona colorazione generale della cellula e dei flagelli. Come la proflavina, anche il FITC consente di differenziare simultaneamente le cellule autotrofe da quelle eterotrofe usando un unico set di filtri.

Vantaggi - (i) Preparazione di un solo tipo di vetrino; (ii) la FITC non si lega al detrito e non emette fluorescenza aspecifica in presenza di quest'ultimo, è quindi indicata per la valutazione del nanoplancton di acque costiere e di ambienti ricchi in materiale particellato sospeso; (iii) presenta una pericolosità per la salute inferiore rispetto ai fluorocromi che interagiscono con gli acidi nucleici.

Svantaggi - (i) Una sovra-colorazione con FITC può mascherare parzialmente l'autofluorescenza della clorofilla *a*; (ii) la fluorescenza decade velocemente (dopo 20-30 secondi di illuminazione).

DAPI

Il fluorocromo 4'6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) si lega al DNA. Il complesso DNA-DAPI presenta uno spettro di eccitazione nel campo dell'ultravioletto (UV) ed uno di emissione nel blu; ciò comporta il notevole vantaggio di non interferire sia con lo spettro di eccitazione che con quello di emissione della clorofilla *a*. La differenziazione fra autofluorescenza e fluorescenza del fluorocromo viene massimizzata dall'uso, in sequenza, di due differenti set di filtri ottici sullo stesso campo visivo, uno idoneo per l'eccitazione del DAPI e la visualizzazione del nanoplancton totale (fototrofo ed eterotrofo) e uno idoneo per l'eccitazione della clorofilla *a* e la visualizzazione del nanoplancton fototrofo. Inoltre il DAPI, sebbene sia specifico per il DNA, se usato a concentrazioni opportune consente di visualizzare la forma, i contorni della cellula, i flagelli e le ciglia.

Vantaggi - (i) Preparazione di un solo tipo di vetrino; (ii) uso di due distinti set di filtri ottici; (iii) il DAPI se eccitato con luce blu emette fluorescenza trascurabile quindi non ostacola l'individuazione anche di piccole cellule fototrofe debolmente autofluorescenti; (iv) la fluorescenza del DAPI è maggiormente persistente rispetto a quella di altri fluorocromi (e.g. AO, FITC), ciò facilita l'acquisizione di immagini. *Svantaggi* - (i) Alto grado di cancerogenità.

Primulina

La primulina (Direct yellow 59) si lega alle proteine e, analogamente al DAPI, presenta spettri di eccitazione e di emissione ben distinti da quelli della clorofilla *a*. La colorazione con primulina è stata approntata per campioni d'acqua provenienti da ambienti oceanici caratterizzati da comunità fototrofe dominate da cellule di piccole dimensioni.

Vantaggi - (i) Preparazione di un solo tipo di vetrino; (ii) utilizzo di due set di filtri ottici; (iii) possibilità di evidenziare piccole quantità di clorofilla *a*; (iv) maggiore resa nel conteggio delle cellule fototrofe rispetto all'impiego di altri fluorocromi (e.g. proflavina e FITC).

Svantaggi - (i) Elevata fluorescenza aspecifica di background nei campioni provenienti da ambienti ricchi di particellato a seguito di una colorazione aspecifica della frazione detritica.

Doppia colorazione

I campioni possono essere sottoposti anche a doppia colorazione al fine di ottimizzare la visualizzazione di parti differenti delle cellule; le doppie colorazioni più utilizzate sono DAPI in associazione con Proflavina (Sieracki *et al.*, 2004), DAPI in associazione con FITC (Sherr *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 2007) e DAPI con Primulina (Martinussen e Thingstad, 1991).

Tab. 1. Spettri di assorbimento e di emissione della clorofilla *a* e dei principali fluorocromi usati in microscopia in epifluorescenza per il conteggio del nanoplancton.

Fluorocromo	Spettro di eccitazione (nm)	Spettro di emissione (nm)	Target
AO	470-500	550-570	RNA, DNA
Proflavina	470-490	500-520	DNA, Proteine
FITC	470-490	500-520	Proteine
DAPI	365	390-400	DNA
Primulina (Direct yellow 59)	365	425	Proteine
Pigmento			
Clorofilla <i>a</i>	420-440	670-690	

20.2.4.3 Scelta dei set di filtri ottici

In base ai fluorocromi prescelti per la visualizzazione del nanoplancton è necessario impiegare uno o più set di filtri ottici atti a selezionare le lunghezze d'onda specifiche per eccitare il preparato colorato e convogliare solo la luce emessa da questo agli oculari. Ogni set di filtri è costituito da tre componenti: il filtro di banda passante (band pass filter: BP) o filtro di eccitazione, lo specchio dicroico separatore (FT) ed il filtro di sbarramento (LP= long passing). Tutte le maggiori case costruttrici di microscopi (e.g. Olympus, Zeiss, Leitz, Nikon) propongono una varietà di set di filtri specifici per i diversi fluorocromi e per l'eccitazione multipla.

20.3 PROCEDIMENTO

20.3.1 Campionamento e fissazione del campione

I campioni d'acqua prelevati con campionatore tipo Niskin devono essere immediatamente raccolti in bottiglie sterili di policarbonato, vetro o altro materiale plastico, oscurate con carta stagnola, e fissati con glutaraldeide (concentrazione finale 1%). Il volume d'acqua da prelevare dipende dal tipo di ambiente in esame, generalmente sono sufficienti volumi rappresentativi di 250-500 ml. È consigliabile prelevare due aliquote di campione. Il campione può essere conservato a +4°C e al buio (per evitare la degradazione dei pigmenti e non comprometterne l'autofluorescenza) per alcuni giorni prima della preparazione del vetrino.

20.3.2 Filtrazione, colorazione e preparazione del vetrino

Al fine di ottenere un' valutazione significativa dell'abbondanza del nanoplancton devono essere preparati tre vetrini, ovvero tre repliche per ogni campione d'acqua. Qui di seguito sono riportati i protocolli di colorazione per i tre fluorocromi maggiormente utilizzati: DAPI, Proflavina, FITC. Per i protocolli di colorazione con AO e Primulina, usati raramente, si rimanda a Sherr *et al.* (1993).

DAPI

1. Predisporre l'apparato di filtrazione ponendo, con le apposite pinze, la membrana nera (2,0, 0,8 o 0,6 μm) sopra il filtro di supporto (bagnato con acqua distillata prefiltrata su 0,22 μm). Il filtro di supporto può essere utilizzato per numerose preparazioni. Evitare accuratamente il contatto delle dita con i filtri. Fissare l'imbuto da filtrazione alla sua base con le pinze a molla.
2. Introdurre un'aliquota di campione (da 5 a 100 ml, in relazione allo stato trofico dell'ecosistema in esame) nell'imbuto di filtrazione. (i) Se l'aliquota è inferiore o uguale a 5 ml aggiungere 10-50 μl (in base alla concentrazione cellulare e alla necessità di evidenziare la forma delle cellule) di soluzione DAPI per ogni ml di campione (concentrazione finale DAPI nel campione 10-50 $\mu\text{g ml}^{-1}$). (ii) Se il volume di campione da filtrare è superiore a 5 ml, filtrare il campione fino a raggiungere un volume residuo di 5 ml, quindi chiudere il rubinetto di aspirazione e aggiungere 50-250 μl di DAPI. Assicurarsi che il DAPI raggiunga il fondo del campione e attendere 10 minuti mantenendo il campione al buio, coprendo con carta stagnola l'imbuto di filtrazione.
3. Procedere alla filtrazione esercitando una pressione di aspirazione non superiore a 5 KPa; quando il menisco del campione raggiunge la superficie del filtro aggiungere 2 ml di acqua di mare autoclavata e prefiltrata su 0,22 μm per il risciacquo.
4. Prelevare il filtro appena privo d'acqua avendo cura di non lasciarlo essiccare per evitare la compromissione delle cellule.

-
5. Appoggiare il filtro (ponendo la parte di raccolta verso l'alto) su un vetrino portaoggetto su cui è stata precedentemente posta una piccola goccia di olio per immersione a bassa fluorescenza.
 6. Porre un'altra goccia di olio sulla superficie del filtro e montare il coprioggetti esercitando una leggera pressione fino a che l'olio abbia ricoperto il filtro. L'uso di una quantità eccessiva di olio determina la fuoriuscita delle cellule dal vetrino e la distribuzione delle cellule su più piani focali. Nel caso in cui il preparato debba essere conservato è consigliabile verificare al microscopio la qualità dell'immagine controllando che questa giaccia su un solo piano focale e che le cellule siano uniformemente distribuite sul filtro.
 7. Riporre il vetrino in posizione orizzontale al buio a +4° C per qualche ora durante le quali l'olio sostituisce l'acqua negli interstizi del preparato, quindi procedere all'osservazione microscopica; oppure congelare il vetrino a -20°C fino all'analisi (entro alcuni mesi dalla preparazione del vetrino). Evitare il ricongelamento del vetrino.

Proflavina

- a) Introdurre un'aliquota del campione nell'imbutto dell'apparato di filtrazione (predisposto come riportato nel punto 1 del protocollo DAPI), aggiungere 20-28 µl di soluzione di lavoro di Proflavina per ogni ml di campione (concentrazione finale di Proflavina nel campione 5-7 µg ml⁻¹). Se il volume di campione da filtrare è superiore a 5 ml, filtrare il campione fino a raggiungere un volume residuo di 5 ml e quindi aggiungere 140 µl di soluzione di Proflavina. Attendere 3-4 minuti mantenendo il campione al buio.
- b) Proseguire come riportato nei punti 3-7 del protocollo DAPI.

FITC

- a) Filtrare il campione utilizzando una pressione di aspirazione molto bassa fino a raggiungere un volume residuo di circa 0,5 ml e quindi aggiungere la soluzione FITC fino a coprire il filtro (2-3 ml). Attendere 5-10 minuti mantenendo il campione al buio.
- b) Filtrare il campione e sciacquare due volte il filtro con 10 ml di tampone carbonato freddo.
- c) Proseguire come riportato nei punti 3-7 del protocollo DAPI utilizzando il fluido di montaggio FA (olio per immersione a pH 9, Difco. Co., Detroit).

20.3.3 Osservazione al microscopio

Il conteggio del nanoplankton in microscopia ad epifluorescenza viene effettuato a 1000 ingrandimenti; la fluorescenza decade velocemente, in particolare l'autofluorescenza, e quindi il conteggio deve essere effettuato in tempi relativamente brevi.

DAPI

L'osservazione dei vetrini colorati con DAPI viene effettuata con un set di filtri ottici ad eccitazione UV (BP365/FT395/LP420) per l'epifluorescenza del DAPI ed un set di filtri ad eccitazione blu (BP450-490/FT510/LP520) per l'autofluorescenza della clorofilla *a*. Come precedentemente accennato, il DAPI usato alle concentrazioni riportate consente di visualizzare, oltre al nucleo che appare blu-bianco brillante, anche il citoplasma che appare blu-azzurro diffuso, mettendo in evidenza forma e contorno della cellula, utili per misurarne le dimensioni. Spesso anche i flagelli e le ciglia fluorescono in blu chiaro mentre il materiale detritico appare giallo pallido (Fig. 1). L'eccitazione immediatamente successiva con luce blu visualizza l'autofluorescenza rossa della clorofilla *a*.

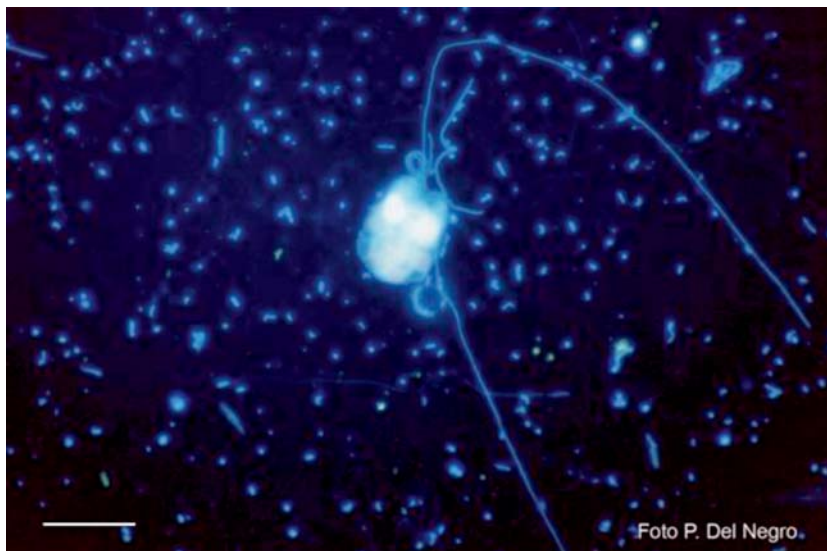


Fig. 1. Visualizzazione di un nanoflagellato in microscopia ad pifluorescenza; colorazione con DAPI ed eccitazione con luce UV (barra = 10 μ m).

Proflavina

L'osservazione dei vetrini colorati con Proflavina viene effettuata con un unico set di filtri ottici ad eccitazione blu (BP450-490/FT510/LP520). Le cellule e i flagelli appaiono verdi su fondo nero; l'autofluorescenza della clorofilla *a* varia dal rosso brillante al giallo-arancio, mentre il materiale detritico appare rosa pallido.

FITC

L'osservazione dei vetrini colorati con FITC viene effettuata con un unico set di filtri ottici ad eccitazione blu (BP450-490/FT510/LP520). Gli organismi nanoplanctonici appaiono verde mela.

20.4 STIMA DELL'ABBONDANZA CELLULARE

La stima del numero degli organismi nanoplanctonici presenti in un campione naturale raccolto su un filtro a membrana viene effettuata tramite il conteggio delle cellule di interesse su una frazione del filtro. Tale frazione può essere costituita da un numero rappresentativo di campi ottici, distribuiti con criterio di casualità su tutta l'area del filtro o di transetti, ed è determinato in base alla concentrazione del campione. Di norma è necessario un conteggio minimo di 200 cellule e comunque tale da ottenere un valore della deviazione standard dei conteggi inferiore al 15% del valore medio calcolato (Lund *et al.*, 1958). L'area del filtro da osservare può essere incrementata per il conteggio di organismi meno numerosi.

L'abbondanza degli organismi nel campione originale viene determinata tenendo in considerazione (i) il volume filtrato, (ii) il numero medio delle cellule contate per unità di area analizzata (e.g. il numero medio di cellule nanoplanctoniche per campo visivo o per transetto), (iii) l'area di filtrazione effettiva del filtro, ovvero l'area determinata dal diametro interno dell'imbuto di filtrazione, e (iv) la diluizione del campione dovuta all'aggiunta del fissativo (e.g. se il rapporto fra fissativo:campione, espresso in volumi, è pari a 1:9, il fattore di diluizione è una costante uguale a 0,9). L'area del filtro esaminato per campo visivo o per transetto varia a seconda dell'obiettivo e degli oculari utilizzati. La calibrazione di ogni lente deve essere effettuata con il vetrino micrometrico.

L'abbondanza del nanoplancton, espressa in cellule per volume di campione, nel caso si assuma come unità di osservazione il campo visivo, è calcolata tramite la seguente equazione:

$$\text{cell. ml}^{-1} = \frac{[(N) \times \text{Area effettiva di filtrazione del filtro (mm}^2)]}{[\text{Area del campo visivo (mm}^2) \times (\text{DF}) \times (\text{ml filtrati})]}$$

dove:

N = numero medio di cellule osservate per campo visivo

DF = fattore di diluizione del fissativo

20.5 STIMA DEL BIOVOLUME E DELLA CONCENTRAZIONE DI CARBONIO ASSOCIATA AL NANOPLANCTON

Le stime di abbondanza del nanoplancton possono essere convertite in biovolumi (espressi in $\mu\text{m}^3 \text{ ml}^{-1}$). Il biovolume cellulare viene determinato tramite (i) l'assegnazione di un biovolume empirico per ogni cellula contata o, più frequentemente, tramite (ii) l'assegnazione di un biovolume empirico medio per ogni singola classe di taglia individuata nell'ambito del nanoplancton (e.g. 2-5 μm , 5-10 μm , 10-15 μm , 15-20 μm). I biovolumi cellulari medi si ottengono dalla misura delle dimensioni lineari di sottosistemi di cellule per ogni classe di taglia predefinita; ad ogni cellula viene quindi assegnata una forma geometrica (e.g. sfera, sferoide prolato, cilindro) per la quale si calcola il volume tramite l'applicazione di formule standard (Strathmann, 1967; Sun e Lui, 2003). La misurazione delle dimensioni cellulari viene effettuata con oculare micrometrico previamente tarato con vetrino micrometrico, oppure tramite l'applicazione di un software appropriato per l'elaborazione di immagini acquisite con fotocamera digitale collegata al microscopio. Nella stima del biovolume deve essere considerata anche la variazione delle dimensioni cellulari dovute al fissativo (Sherr e Sherr, 1993). Il biovolume può essere convertito, non senza margine di errore difficilmente quantizzabile, in concentrazione di carbonio utilizzando fattori di conversione proposti in bibliografia e ricavati empiricamente per i differenti gruppi tassonomici (vedi Børsheim e Bratbak, 1987 per i flagellati; Verity *et al.*, 1992; Menden-Deuer e Lessard, 2000 per diatomee e dinoflagellati).

NOTE

- In base alla definizione di nanoplancton, il subcampione che viene colorato dovrebbe essere prefiltrato su retino di maglia 20 μm per escludere gli organismi di dimensioni superiori. Di fatto, nell'economia dell'analisi, la prefiltrazione può essere omessa in quanto un operatore con esperienza è in grado di rilevare con rapidità organismi maggiori di 20 μm ed escluderli dal conteggio.
- La microscopia ad epifluorescenza non permette di effettuare il riconoscimento tassonomico del nanoplancton sebbene possono essere evidenziati la forma della cellula, alcuni organuli e spesso la localizzazione ed il numero dei flagelli. Questo permette, ad un operatore con esperienza in tassonomia del nanoplancton, di effettuare, oltre al conteggio e alla distinzione fra organismi fototrofi ed eterotrofi, un riconoscimento grossolano di appartenenza a categorie generiche (e.g. diatomee, dinoficee, prasinoficee, criptoficee, coanoflagellati).
- Particolare attenzione deve essere prestata alle caratteristiche dell'olio di immersione sia in termini di indice di rifrazione che di fluorescenza; spesso l'invecchiamento dell'olio o la cattiva conservazione possono aumentarne la fluorescenza e rendere difficile la visione del preparato.

20.6 BIBLIOGRAFIA

- BORSHEIM K.Y., BRATBAK G. (1987) - Cell volume to cell carbon conversion factor for a bacterivorous *Monas* sp. enriched from seawater. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **36**: 171-175.
- CARON D.A. (1997) - Protistan community structure. In: Hurst C.J., Knudsen G.R., McInerney M.J., Stetzenbach L.D., Walter M.V. (eds), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington DC: 284-294.
- CARON D.A. (2000) - Symbiosis and mixotrophy among pelagic microorganisms. In: Kirchman D.L. (ed), *Microbial Ecology of the Oceans*. John Wiley and Sons, New York: 495-523.
- CARON D.A. (2001) - Protistan herbivory and bacterivory. In: Paul J.H. (ed), *Methods in Microbiology Volume 30 Marine Microbiology*. Academic Press: 289-351.
- CARON D.A., GAST R.J., LIM E.L., DENNET M.R. (1999) - Protista community structure: molecular approaches for answering ecological questions. *Hydrobiologia*, **401**: 215-227.
- FUKUDA H., SOHRIN R., NAGTA T., KOIKE I. (2007) - Size distribution and biomass of nanoflagellates in meso- and bathypelagic layers of the subarctic Pacific. *Aquat. Microb. Ecol.*, **46**: 203-207.
- HOBBIE J.E., DALEY R., JASPER S. (1977) - Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**:1225-1228.
- LUND J.W.G., KILPLING C., LE CREN E.D. (1958) - The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*, **11**: 143-170.
- MARTINUSSEN I., THINGSTAD T.F. (1991) - A simple double staining technique for simultaneous quantification of auto- and heterotrophic nano- and pico-plankton. *Mar. Microb. Food Webs*, **5**: 5-11.
- MENDEN-DEUER S., LESSARD E.J. (2000) - Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.*, **45**: 569-579.
- PORTER K.G., SHERR E.B., SHERR B.F., PACE M.L., SANDERS R.W. (1985) - Protozoa in planktonic food webs. *J. Protozool.*, **32**: 409-415.
- RAVEN J.A. (1997) - Phagotrophy in phototrophs. *Limnol. Oceanogr.*, **42**: 198-205.
- SHERR E.B., CARON D.A., SHERR B.F. (1993) - Staining of heterotrophic protists for visualization via epifluorescence microscopy In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J. (eds), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL: 213-228.
- SHERR E.B., SHERR B.F. (1993) - Preservation and storage of samples for enumeration of heterotrophic protists. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J. (eds), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL: 207-212.
- SHERR E.B., SHERR B.F. (2000) - Marine Microbes: an overview. In: Kirchman D.L. (ed), *Microbial ecology of the oceans*. John Wiley and Sons, New York: 13-46.
- SIEBURTH J.McN., SMETACEK V., LENZ J. (1978) - Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.*, **23**: 1256-1263.
- SIERACKI M.E., GLOBER C.J., CUCCI T.L., THIER E.C., GILG I.C., KELLER M.D. (2004) - Pico- and nanoplankton dynamics during bloom initiation of *Aureococcus* in a Long Island, NY bay. *Harmful Algae*, **3**: 459-470.
- STRATHMANN R.R. (1967) - Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 411-418.
- SUN J., LUI D. (2003) - Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J. Plankton Res.*, **25**: 1331-1346.
- VERITY P.G., ROBERTSON C.Y., TRONZO C.R., ANDREWS M.G., NELSON J.R., SIERACKI M.E. (1992) - Relationship between cell volume and the carbon and nitrogen of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **37**: 1434-1446.

CAPITOLO 21. FITOPLANCTON: METODICHE DI ANALISI QUALI-QUANTITATIVA

A. Zingone, C. Totti, D. Sarno, M. Cabrini, C. Caroppo, M.G. Giacobbe, A. Lugliè, C. Nuccio, G. Socal

adriana.zingone@szn.it

21.1 INTRODUZIONE

Le ricerche di tipo ecologico sul fitoplancton si basano in genere su conteggi ed identificazioni effettuati su campioni naturali fissati. In questo modo è possibile raccogliere una quantità elevata di campioni, ad esempio nel corso di campagne di ricerca, rimandandone l'analisi microscopica a tempi successivi. Il materiale, prelevato in genere con bottiglie Niskin oppure con retini, secchi o pompe, viene versato in bottiglie di vetro scuro ed immediatamente fissato. In laboratorio, le specie presenti nei subcampioni utilizzati per le analisi vengono osservate, identificate e conteggiate. In aggiunta all'abbondanza numerica, si possono ottenere stime della biomassa delle diverse specie e gruppi attraverso misurazioni delle principali dimensioni, calcolo dei volumi cellulari e trasformazione di questi in contenuto in carbonio. L'identificazione può richiedere l'applicazione di tecniche mirate ad evidenziare le specifiche caratteristiche morfologiche dei diversi gruppi sistematici che compongono il fitoplancton.

La fissazione del materiale consente l'identificazione solo di una parte dei popolamenti, limitatamente a specie di diatomee, dinoflagellati, in particolare tecati, e coccolitofori. Non è spesso possibile invece l'identificazione e la valutazione dell'abbondanza di altre specie flagellate, per le quali la fissazione in alcuni casi danneggia completamente o parzialmente le cellule, dissolvendole, causando la perdita dei flagelli e anche di altri caratteri morfologici utili. Per lo studio quali-quantitativo dei flagellati, le colture di diluizione seriale (SDC, vedi Capitolo 22) accoppiate al calcolo del Most Probable Number (MPN), nonostante le numerose limitazioni, costituiscono il metodo di elezione. Inoltre, valutazioni quantitative del pico- e del nanoplancton possono essere ottenute attraverso l'applicazione di tecniche di microscopia ad epifluorescenza (vedi Capitoli 14 e 20), che consentono anche di discriminare tra le componenti autotrofe ed eterotrofe delle suddette categorie dimensionali del plancton.

Per approfondimenti e confronti delle indicazioni fornite in questo capitolo con metodi standard internazionali, si rimanda alla norma europea EN 15204 (2006), che descrive con estremo dettaglio la procedura generale per la stima dell'abbondanza e per la valutazione della composizione tassonomica del fitoplancton. La suddetta norma contiene istruzioni precise sulle fasi di campionamento, conservazione, sedimentazione e conteggio dei campioni.

21.2 RACCOLTA DEI CAMPIONI

Il tipo di campionamento per lo studio del fitoplancton è scelto in base all'obiettivo del programma da svolgere:

- se lo studio prevede l'identificazione e la stima quantitativa a profondità discrete lungo il profilo verticale, i campioni vengono raccolti con bottiglie tipo Niskin. I campioni superficiali possono essere raccolti direttamente con un secchio;
- per analisi di tipo qualitativo o semi-quantitativo, o per l'isolamento di organismi da portare in coltura, è consigliato l'uso dei retini.

Altri metodi di raccolta, quali per esempio quelli che impiegano pompe che permettono di raccogliere acqua in continuo, non sono consigliati per studi sulla composizione e abbondanza del fitoplancton in quanto possono danneggiare le cellule (Beers, 1978).

21.2.1 Raccolta con bottiglie

Il campionamento con bottiglia consente di prelevare il campione a quote fisse ovvero scelte in base alla distribuzione dei profili di irradianza PAR o di fluorescenza. Le bottiglie per il campionamento a mare (bottiglie Niskin oppure del tipo Go-Flo) possono essere calate manualmente, fissate ad un cavo idrologico calato lungo la colonna d'acqua, oppure fissate ad un campionatore automatico (rosette o carousel). Una volta effettuato il campionamento, è necessario prelevare i subcampioni da analizzare in tempi molto rapidi, per evitare la sedimentazione del fitoplancton nella bottiglia di campionamento. Il subcampione va raccolto in bottiglie di vetro scuro scadente che, rilasciando silice, rallentano la dissoluzione dei frustuli delle diatomee. Il volume del campione raccolto varia generalmente da 250 ml in acque meso-eutrofiche a 500 ml in acque oligotrofiche. Le bottiglie devono essere riempite fino ad un livello poco al di sotto dell'orlo, in modo da non lasciare un eccessivo volume di aria e nello stesso tempo consentire l'agitazione e l'omogeneizzazione del subcampione prima dell'analisi microscopica.

21.2.2 Raccolta con retini

La raccolta di campioni mediante retino è indicata in studi di carattere floristico o per la raccolta di organismi da portare in coltura per studi fisiologici, tassonomici o molecolari. Questa tecnica di campionamento può essere utilizzata per ottenere informazioni di tipo semiquantitativo sull'abbondanza di specie di dimensioni elevate (es. *Ceratium*, *Protoperdinium*) e in generale di specie poco abbondanti e non campionate efficacemente con la bottiglia, quali ad esempio alcuni dinoflagellati potenzialmente tossici (appartenenti, per esempio, ai generi *Dinophysis*, *Prorocentrum*, *Alexandrium*). In questo caso all'apertura del retino va collocato un flussometro che permetta di ottenere una stima del volume d'acqua effettivamente filtrato dal retino.

La raccolta può avvenire trascinando il retino in superficie, oppure lungo tutta la verticale (in bacini poco profondi) o nella zona fotica in stazioni a profondità elevata. Durante il campionamento è sempre auspicabile mantenere basse velocità di traino. I retini da fitoplancton hanno una forma conica e dimensioni variabili. All'estremità viene sistemato un bicchiere di raccolta della capacità di 200–500 ml, fornito preferibilmente di rubinetto. Il vuoto di maglia del retino varia a seconda della frazione planctonica da raccogliere ed è generalmente compreso tra 10 μm e 40 μm . Si consideri tuttavia che, quando nei popolamenti fitoplanctonici sono abbondanti cellule provviste di spine o sete, oppure unite in lunghe colonie, si può formare un'ulteriore rete filtrante, che trattiene anche cellule di dimensioni inferiori a quelle della maglia effettiva del retino (Tangen, 1978).

21.3 FISSAZIONE

Il fitoplancton è composto sia da forme prive di rivestimento cellulare rigido e ben differenziato (ad esempio piccoli flagellati, rafidoficee e diversi dinoflagellati), sia da forme che possiedono dei rivestimenti cellulari. La composizione del rivestimento varia da gruppo a gruppo, dai frustuli silicei delle diatomee, all'anfiesma cellulosico dei dinoflagellati, alla coccosfera calcarea dei coccolitofori, ed è impossibile trovare un fissativo ideale al mantenimento di tutta questa varietà di strutture. Per esempio, i frustuli silicei si conservano meglio utilizzando fissativi acidi che causano però la dissoluzione dei coccoliti (Zingone *et al.*, 1990). Se fissate, le forme nude, difficilmente conservano i necessari caratteri diagnostici e pertanto è preferibile identificarle in vivo, in campioni freschi. I fissativi consigliati rappresentano perciò un compromesso che ha il fine di mantenere il più possibile integro il complesso delle specie fitoplanctoniche da determinare.

21.3.1 Formalina

Uno dei fissativi più largamente adoperato è la formalina (=aldeide formica al 37%) diluita 1:2 con acqua deionizzata, neutralizzata con dolomite (Carlo Erba Reagenti) oppure con esametilentetramina (100 g l⁻¹) e successivamente filtrata su filtro di carta. Il pH finale deve risultare neutro o leggermente basico. Viene aggiunta in misura di 40–80 ml per litro di campione (concentrazione finale di aldeide formica pari a circa 0,8–1,6%) a seconda dell'abbondanza fitoplanctonica prevista, con un maggior volume di fissativo (fino al 4% finale di aldeide formica) nei campioni particolarmente concentrati come quelli raccolti con il retino e per conservazione a lungo termine. Per ridurre al minimo i danni al materiale è preferibile versare la formalina nella bottiglia prima del campionamento. Tutte le operazioni vanno effettuate sotto cappa e con i guanti considerando la tossicità del fissativo. Una volta riempita la bottiglia è importante agitare delicatamente il campione per parecchie volte per garantirne una immediata fissazione.

21.3.2 Lugol

La soluzione di Lugol è meno tossica della formalina, ma si rivela meno adatta al mantenimento di tutto il popolamento fitoplanctonico, nonché a periodi di conservazione molto lunghi. La soluzione di Lugol acida è adeguata alla preservazione dei piccoli flagellati, e delle diatomee poco silicizzate, mentre è meno indicata per i coccolitofori. Per la sua preparazione si sciolgono 100 g di KI in 1 l di acqua distillata, a cui si aggiunge una soluzione ottenuta con 50 g di iodio (I₂) e 100 ml di acido acetico (Horner, 2002). Nel caso la colorazione degli organismi risulti troppo intensa, al momento delle osservazioni si può aggiungere del tiosolfato di sodio. Per la preparazione del Lugol basico, che risulta più adatto alla conservazione dei coccolitofori ma meno idoneo a quella dei flagellati, si procede come sopra, aggiungendo alla soluzione 100 g di acetato di sodio invece dell'acido acetico (Thronsen, 1978). Il fissativo viene aggiunto al campione in misura dello 0,5–1%, a seconda della abbondanza fitoplanctonica attesa.

21.4 CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni vanno conservati in frigorifero a 4 °C, oppure in luogo fresco, al buio, evitando di agitarli. Il tempo di conservazione varia a seconda del fissativo ed è mediamente maggiore per campioni fissati con formalina. Generalmente i campioni si conservano inalterati per alcuni mesi dalla loro raccolta. Tuttavia campioni costieri particolarmente ricchi, dominati da specie di piccole dimensioni, tendono a deteriorarsi nel tempo, per cui è consigliabile effettuare i conteggi nel minor tempo possibile. In ogni caso, set omogenei di campioni, ad esempio provenienti da un'unica campagna, vanno analizzati in un tempo per quanto possibile limitato, per evitare differenze provocate da tempi diversi di conservazione. Contrariamente a quanto si può pensare, sono proprio le diatomee che possono presentare problemi di conservazione a causa della dissoluzione del frustulo, mentre i dinoflagellati sembrano essere più stabili. Nonostante la presenza dei fissativi, alcuni batteri possono sopravvivere nei campioni accelerandone il deterioramento.

21.5 CONTEGGIO CON IL METODO DI UTERMÖHL

Il metodo più ampiamente usato prevede l'osservazione e il conteggio delle cellule fitoplanctoniche al microscopio invertito (Fig. 1a) in apposite camerette con fondo dello spessore di un coprioggetto (Fig. 1b) e prende il nome dal ricercatore tedesco che lo propose (Utermöhl, 1931), sebbene negli anni siano

state introdotte diverse modifiche. Vengono di seguito descritte le tre fasi del metodo, ovvero la sedimentazione, il conteggio e il calcolo dell'abbondanza delle cellule fitoplanctoniche.

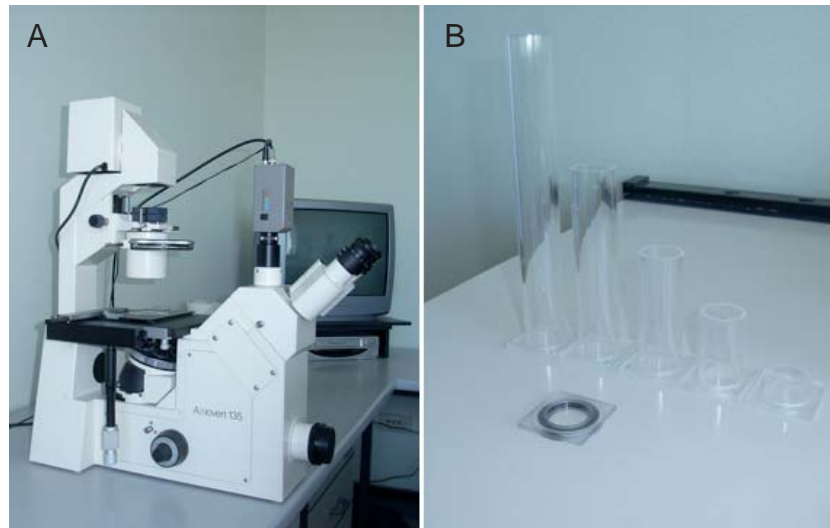


Fig. 1 - (a) microscopio invertito; (b) camera e cilindri di sedimentazione.

La sedimentazione del campione fissato rappresenta, dopo la raccolta e il prelievo del subcampione, il terzo livello di subcampionamento. È facilmente intuibile, a questo proposito, come a ciascun livello venga introdotta una componente di errore che influisce sull'attendibilità del dato finale sull'abbondanza delle cellule fitoplanctoniche nell'ambiente studiato. Molti autori hanno proposto metodi diversi per valutare l'affidabilità delle stime quantitative di fitoplancton (vedi ad esempio Venrick, 1971).

Per la sedimentazione si usano camere cilindriche fisse da 5, 10 e 25 ml o camere combinate, che consistono in un cilindro di sedimentazione di capacità di 5, 10, 25, 50, 100 ml accoppiato con una camera di base generalmente di volume di 3 ml, avente un fondo di vetro di spessore pari a quello di un vetrino coprioggetto, (di solito 0,13-0,16 mm), che consente l'osservazione del materiale con microscopio invertito. La camera fissa pone problemi legati al cammino ottico della luce dal condensatore attraverso la colonna d'acqua del subcampione (da 1 a 5 cm), mentre quella combinata, con un cammino ottico <0,5 cm, garantisce una visione più nitida e certamente migliore delle cellule sedimentate.

21.5.1 Riempimento e sedimentazione

L'abbondanza del fitoplancton può variare da 10^2 cell. l^{-1} in ambienti oceanici estremamente oligotrofici, fino a picchi eccezionali anche di 10^8 cell. l^{-1} in acque costiere, durante eventi acuti di sviluppo fitoplanctonico. Nella scelta del volume da sedimentare, si può far riferimento ai valori di concentrazione di clorofilla *a*, dai quali si può ricavare un'informazione approssimativa sull'abbondanza del fitoplancton: ad esempio concentrazioni minori di $1 \mu g l^{-1}$ di clorofilla *a* corrispondono generalmente ad abbondanze moderate. In mancanza del dato di clorofilla *a*, la scelta del volume da sedimentare può essere effettuata in base alle condizioni ambientali e stagionali relative al campione da esaminare. In alternativa, è consigliabile procedere ad un preconteggio, esaminando diversi volumi dello stesso campione.

Il numero di cellule sul fondo della camera di sedimentazione deve risultare sufficientemente elevato da essere rappresentativo dell'intero campione, ma non tanto da creare problemi di conteggio, con sovrapposizione di cellule, ovvero di eccessivo affaticamento dell'operatore, con conseguenti errori. Volendo fornire un'indicazione di carattere generale, si può considerare ottimale un numero di cellule fitoplan-

ctoniche sul fondo della camera di sedimentazione compreso tra 1×10^4 e 3×10^4 .

- Le camere di sedimentazione ed i cilindri devono essere lavati con un detergente utilizzando dei pennelli morbidi, risciacquati con acqua deionizzata e successivamente posti ad asciugare. Al momento dell'utilizzo, le camere devono essere poste su superfici perfettamente orizzontali e non soggette a vibrazioni.
- Prima di versare il campione nelle camere di sedimentazione, è indispensabile randomizzarlo, capovolgendo la bottiglia almeno 100 volte. Tale operazione va fatta lentamente, per evitare che gli organismi più delicati o coloniali siano danneggiati.
- Il campione va versato nelle camere di sedimentazione lentamente evitando la formazione di bolle e la camera deve essere chiusa con un coprioggetto, evitando il più possibile la formazione di ulteriori bolle.
- Quando l'abbondanza fitoplanctonica è particolarmente bassa occorre analizzare quantità di campione maggiori di 100 ml, preconcentrandole così come si usa per i campioni di microzooplancton. A tale scopo il campione viene lasciato decantare per diversi giorni; quindi un volume noto di surnatante viene delicatamente rimosso mediante una pipetta e il campione così concentrato viene messo a sedimentare. Un'alternativa è la doppia sedimentazione, che consiste nel lasciare sedimentare 100 ml di campione e quindi nell'applicare sulla camera un nuovo tubo da 100 ml, versandovi lentamente altro campione randomizzato. In questo modo sul fondo della camera sedimenteranno 197 ml di campione.
- Se la quantità di campione da sedimentare è pari o inferiore a 3 ml, si può utilizzare la sola camera di base, trasferendovi il campione con una pipetta tarata, possibilmente automatica. Se ancora la sovrapposizione delle cellule nel fondo della camera è troppo elevata, è necessario procedere ad una preventiva diluizione del campione.
- Per volumi inferiori ai 10 ml si consiglia di preparare almeno due diverse camere di sedimentazione e di effettuare il conteggio su entrambe.
- Il conteggio deve avvenire quando la sedimentazione di tutti gli organismi sia da ritenersi completata. Vengono comunemente ritenuti sufficienti tempi pari a 3–5 ore per ogni centimetro di altezza del cilindro, il che può comportare, per camere combinate da 100 ml, un'attesa di 3–4 giorni per la sedimentazione. Alcuni tentativi per ridurre i tempi di sedimentazione sono stati effettuati utilizzando uno stantuffo fornito alla sua estremità di un filtro Poretics, con una membrana di policarbonato da 2 μm , per spingere le cellule verso il fondo della vaschetta (Paxinos e Mitchell, 2000). In ogni caso qualsiasi manipolazione del subcampione va, per quanto possibile, evitata.
- Una volta completata la sedimentazione, il cilindro della camera combinata va fatto slittare lentamente e la camera viene coperta con un vetrino copricamera di spessore sottile. L'acqua contenuta in eccesso viene fatta sgorgare attraverso l'apertura della base della camera ovvero eliminata attraverso altri sistemi a seconda del tipo di camera.

21.5.2 Osservazione dei campioni

Il microscopio invertito o rovesciato è normalmente impiegato per lo studio del fitoplancton (Hasle, 1978a). In questo strumento la fonte luminosa (50–100 W) e il condensatore (con un'apertura numerica, NA, di almeno 0,5 e un'altezza di lavoro di circa 3 cm) illuminano il materiale in osservazione dall'alto mentre il revolver con gli obiettivi è posto al di sotto del tavolino traslatore.

L'osservazione in campo chiaro permette di ottenere informazioni sul colore, mentre il contrasto di fase e il contrasto d'interferenza differenziale (DIC) facilitano l'osservazione di strutture poco contrastate. Il condensatore dovrebbe pertanto essere dotato di un sistema che permetta il rapido passaggio da una modalità all'altra.

La normale dotazione dei microscopi prevede obiettivi $10\times$ e $20\times$, usati per le specie di maggiori dimensioni, e $32\times$, $40\times$ e $60\times$ (o $63\times$) e $100\times$ per gli organismi più piccoli.

Gli oculari impiegati sono in genere 10× o 12,5×, preferibilmente dotati di un oculare micrometrico che permette di misurare le dimensioni degli organismi osservati. Questo deve essere calibrato per ogni ingrandimento e per ogni microscopio (vedi par 7.1). Alcuni microscopi sono dotati anche di un ulteriore strumento di ingrandimento (optovar).

L'ingrandimento finale di osservazione si ricava dal prodotto fra quello dell'obiettivo e quello dell'oculare, eventualmente moltiplicati ulteriormente per quello dell'optovar. Considerando che la taglia della maggior parte degli organismi fitoplanctonici è compresa tra 3 e 20 µm si consiglia di effettuare il conteggio con ingrandimento finale di almeno 400×. Va comunque sottolineato che l'ingrandimento ottenuto attraverso gli oculari e l'optovar non aumenta la risoluzione, per cui l'ingrandimento 400× ottenuto usando un obiettivo 40× con oculare 10× dà una risoluzione di molto superiore a quello equivalente prodotto da un obiettivo 20× con un oculare 10× e un optovar 2×.

Per l'osservazione di particolari strutture (ad esempio, processi vari nel frustolo delle diatomee o cocoliti), si dovrebbe disporre anche di un obiettivo 100× ad immersione in olio (NA>0,9). Le caratteristiche morfologiche su cui si basa una corretta identificazione possono essere evidenziate attraverso metodiche specifiche (vedi par. 8). In alcuni casi, per esempio nel metodo del Calcofluor per i dinoflagellati (vedi paragrafo 8.2.1), è necessario l'utilizzo di sistema per osservazione in epifluorescenza (Vargo, 1978).

21.5.3 Conteggio

Il conteggio effettuato sull'intera superficie del fondo della camera di sedimentazione richiederebbe tempi eccessivamente lunghi e difficilmente conciliabili con il numero generalmente elevato di campioni da analizzare per studi di distribuzione o di ecologia del fitoplancton. Pertanto nella fase di conteggio si opera spesso un ulteriore subcampionamento. La scelta della superficie della camera da analizzare risulta complicata a causa della disomogeneità della distribuzione delle cellule. Sugeriamo di seguito tre opzioni - conta per transetti, per campi casuali o sull'intera camera - di cui le prime due hanno lo svantaggio di non fornire stime quantitative statisticamente attendibili delle specie meno frequenti.

Indipendentemente dal fatto che il conteggio venga effettuato su transetti o su campi casuali (vedi oltre), è opportuno calcolare la misura del diametro del campo visivo per ogni obiettivo utilizzato, con l'ausilio di un oculare micrometrico e di un vetrino graduato.

Qualunque sia il metodo prescelto, un problema fondamentale è quello del numero minimo di cellule da contare, che è stato affrontato in molte trattazioni di natura statistica. Questi aspetti sono stati ampiamente trattati da Venrick (1978) sulla base di un'approfondita disamina bibliografica. Secondo Lund *et al.* (1958) un conteggio di 100 cellule comporta un errore del ±20% con una probabilità del 95%. Una recente valutazione del controllo di qualità del metodo di Utermöhl con il sistema dei transetti o con campi casuali è stato effettuato da Rott *et al.* (2007). Stime analoghe sulla precisione del metodo e considerazioni sulla determinazione del numero di cellule da classificare (spesso stimato attorno alle 200 cellule per campione), così come i criteri di validazione delle analisi sono state discusse nelle guide standard europee (EN 15204, 2006).

21.5.3.1 Conteggio per transetti

Il sistema più largamente in uso prevede il conteggio su transetti di lunghezza pari al diametro della camera di sedimentazione (26 mm) e di larghezza pari al lato di un reticolo inserito nell'oculare, di dimensioni note, o al diametro del campo visivo. In quest'ultimo caso, tuttavia, le cellule situate agli estremi del campo rischiano di non essere viste.

Allo scopo di ridurre l'errore dovuto a distribuzioni disomogenee delle cellule sul fondo della camera, vanno esaminati almeno due transetti perpendicolari. Qualora le conte ottenute sui due transetti, in particolare quelle relative alle specie più abbondanti, risultassero molto differenti, è opportuno esaminare altri transetti della stessa camera di sedimentazione o allestire un altro preparato. Questo sistema ha il

difetto di attribuire un maggior peso alla zona centrale della camera di sedimentazione, che risulta essere la più affollata, con una conseguente sovrastima delle abbondanze.

21.5.3.2 Conteggio per campi

Questo metodo prevede il conteggio delle cellule fitoplanctoniche su un certo numero di campi di dimensioni corrispondenti al campo visivo o all'area del reticolo inserito nell'oculare. Il numero di campi da esaminare può essere prefissato oppure vengono esaminati tanti campi fino a contare un numero significativo di cellule (vedi oltre).

La scelta dei campi da analizzare deve essere casuale. Cordella e Cavolo (1988) propongono di suddividere idealmente il fondo della camera in 100 aree equivalenti, numerate da 1 a 100, delimitate dall'intersezione di 5 diametri e 10 circonferenze concentriche. Da tabelle o con generazione automatica si estraggono a questo punto una serie di numeri random, e il conteggio viene effettuato su campi all'interno delle aree del fondo della camera corrispondenti a tali numeri e identificati da una coppia di coordinate x e y.

21.5.3.3 Conteggio sull'intera camera

Questa opzione può essere utilizzata in presenza di abbondanze fitoplanctoniche particolarmente esigue, in ambienti estremamente oligotrofici. Inoltre l'esame dell'intera camera viene utilizzato anche per la ricerca delle specie rare, per completare l'elenco floristico del subcampione, o per evidenziare la presenza di specie potenzialmente tossiche. Questa metodologia di conteggio, spesso utilizzata con un ingrandimento inferiore (200×), può essere affiancata ai metodi descritti sopra al fine di stimare più correttamente l'abbondanza di specie di grandi dimensioni (>100 µm, come ad esempio quelle dei generi *Ceratium*, *Coscinodiscus*, *Rhizosolenia*, etc.) la cui distribuzione disomogenea nei transetti o nei campi casuali può portare a sovra- o sottostime.

21.5.4 Calcoli

Il calcolo dell'abbondanza delle cellule fitoplanctoniche presenti nel campione va effettuato applicando la seguente formula generale:

$$C = N \times \text{fattore} \times 1000/v$$

dove

C = concentrazione fitoplanctonica espressa come cell. l⁻¹

N = numero di cellule contate

v = volume del campione sedimentato (ml)

fattore = rapporto fra area totale della camera e area esplorata

A seconda che il conteggio sia effettuato su transetti, campi casuali, o intera camera, il fattore viene calcolato come segue:

fattore n transetti: $\pi \times r / 2 n h$

fattore c campi: $\pi \times r^2 / c \times a$

fattore intera camera: 1

dove

r = raggio della camera di sedimentazione (mm)

h = lato del reticolo o diametro del campo visivo (mm)

a = area del campo visivo (mm²)

n = numero di transetti osservati
c = numero di campi osservati

21.6 ALTRI METODI DI CONTEGGIO

Il conteggio del fitoplancton può essere anche realizzato mediante un microscopio standard, utilizzando apposite camere di conteggio. Si distinguono camere sprovviste di reticolo interno (e.g. Sedgwick-Rafter, Lund, Palmer-Maloney e di sedimentazione modificata) e camere che ne sono munite (e.g. Bürker).

Questa metodologia prevede l'utilizzo del campione tal quale solo quando le abbondanze cellulari sono piuttosto elevate. In caso contrario è necessario procedere alla stima dell'abbondanza del campione attraverso filtrazione o sedimentazione. Il volume del campione da utilizzare dipende dalla concentrazione del fitoplancton. Le cellule sono solitamente contate usando un obiettivo 10× o 20×; quando le dimensioni cellulari degli organismi da contare sono molto piccole (<30 µm) si utilizza un obiettivo 40×. In relazione alla concentrazione del campione, si effettuerà il conteggio su una frazione della camera oppure su tutta la camera (Semina, 1978). La distribuzione del campione nella camera deve essere omogenea ai fini di una corretta stima dell'abbondanza cellulare e va testata utilizzando il test del *chi*-quadrato (Lund *et al.*, 1958).

In commercio esistono diversi tipi di camere di conteggio e la scelta viene realizzata tenendo in considerazione le dimensioni cellulari e l'abbondanza delle specie fitoplanctoniche da esaminare.

21.6.1 Tipi di camera

21.6.1.1 Camera di Sedgwick-Rafter

Questo tipo di camera è rettangolare (50 × 20 mm), profonda 1 mm, con un'area di 10 cm² ed un volume di 1,0 ml. Generalmente essa è utilizzata quando nel campione sono dominanti le cellule di maggiori dimensioni (>20 µm), presenti in concentrazione non troppo elevata. Infatti, a causa dello spessore della camera, è difficile ottenere ingrandimenti molto elevati (e.g. 400×), se non con obiettivi a lunga distanza (LD). Pertanto l'identificazione di organismi di dimensioni inferiori a 10–15 µm è molto problematica ed in taluni casi impossibile.

21.6.1.2 Camera di Lund

La camera di Lund è estremamente semplice e, se non disponibile in commercio, può essere realizzata in laboratorio. È costituita da una base di vetro munita di due strisce di vetro o di ottone su cui poggia un vetrino coprioggetti standard (50 × 22 mm). Possono essere utilizzati obiettivi 32× e 40×, è possibile quindi valutare la presenza di organismi dalle diverse dimensioni, comprese quelle più ridotte. Con questo tipo di camera, talvolta si può osservare una distribuzione non omogenea del campione quando sono prevalenti organismi di maggiori dimensioni o forme coloniali.

21.6.1.3 Camera di Palmer-Maloney

La camera di Palmer-Maloney è costituita da una base di vetro su cui è disposta una base circolare, avente un diametro di 17,9 mm, una profondità di 400 µm, un'area di 250 mm² ed un volume di 0,1 ml. Con questo tipo di camera si possono utilizzare obiettivi maggiori di 40×, rendendo questa camera particolarmente utile per il conteggio del nanoplancton.

21.6.1.4 Camera di sedimentazione modificata

Hamilton *et al.* (2001) hanno recentemente descritto un tipo di camera munita di colonna di sedimentazione modificata da utilizzare con il microscopio convenzionale. Questa camera è simile alle tradizionali camere di sedimentazione combinate, essendo costruita da una camera centrale poggiante su una base di vetro rettangolare (75 × 51 mm) o circolare (70 mm) di 1 mm di spessore. La camera viene utilizzata nello stesso modo della camera tradizionale con obiettivi superiori a 40× ed è pertanto molto utile per il conteggio e l'identificazione del nanoplancton.

21.6.1.5 Camera di Bürker

Questo tipo di cella è quella maggiormente utilizzata per la stima dell'abbondanza fitoplanctonica, soprattutto in colture monospecifiche. Essa è costituita da una lastrina rettangolare di vetro con i lati rispettivamente di 7,5 e 3,5 cm e lo spessore di 4 mm (Fig. 2a e b). Nella sua parte centrale sono incisi due profondi solchi paralleli al lato minore e distanti tra loro circa 1 cm, uniti al centro da un solco più piccolo. Questi solchi delimitano due aree rettangolari nelle quali sono incisi due reticoli di conta (Fig. 2a). L'area totale di ciascun reticolo è di 3 mm × 3 mm, con fasci di linee ogni mm che delimitano 9 quadrati aventi una superficie di 1 mm². Ciascuno di questi 9 quadrati è a sua volta diviso in 16 quadrati più piccoli, separati tra loro da due linee parallele, con lato di 0,2 mm ed una superficie pari a 0,04 mm² (Fig. 2c).

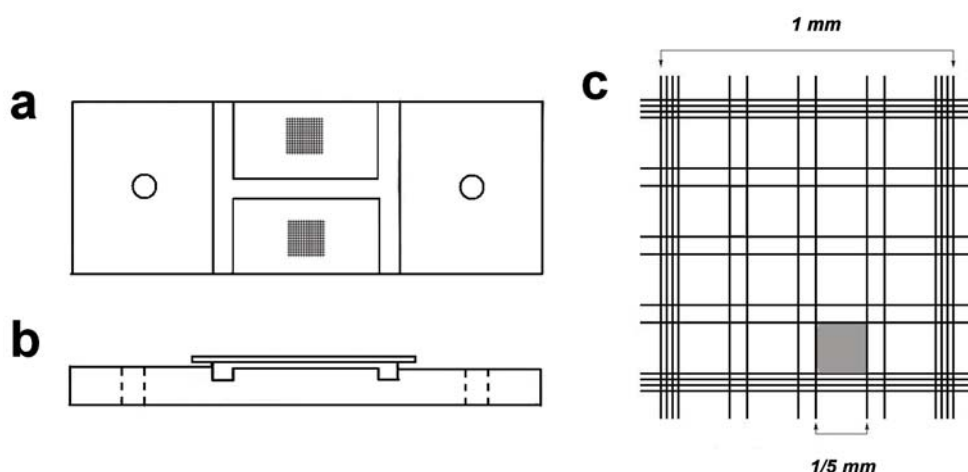


Fig. 2 - Camera di Bürker: a) vista frontale; b) vista laterale; c) particolare del reticolo di conteggio.

21.6.2 Riempimento

Per l'allestimento delle camere di conteggio cellulare si colloca un vetrino coprioggetto sugli appositi piani di appoggio e si esercita una leggera pressione sul vetrino perché ci sia una perfetta adesione. Si procede al riempimento della camera appoggiando l'estremità di una pipetta Pasteur sul bordo della cella. Il liquido defluirà nella camera per capillarità. Si deve porre particolare attenzione affinché non si formino bolle d'aria e perché il liquido non refluisca oltre i bordi dei solchi limitanti l'area della celletta. Si lascia a riposo per circa 5–10 minuti affinché le cellule fitoplanctoniche sedimentino e si osserva quindi al microscopio. Dopo l'uso, sia la camera sia il vetrino coprioggetto si lavano con acqua, quindi con alcol e si asciugano dolcemente con un panno. Al termine di queste operazioni, la camera si conserva in luogo pulito, lontano dalla polvere. La camera descritta al paragrafo 21.6.1.4 va invece riempita come una camera combinata (vedi par. 21.5.1).

21.6.3 Conteggio

Il conteggio con le camere prive di reticolo viene realizzato considerando l'intera area della camera o scegliendo casualmente un numero significativo di campi di osservazione. Si applicano quindi le formule utilizzate per le camere di sedimentazione tradizionali.

Per quanto riguarda la camera di Bürker, a seconda dell'abbondanza delle cellule nel campione, si effettuano i conteggi su 10 quadrati di 1 mm² oppure su 32 quadrati di 0,04 mm², localizzati in punti diversi della camera. Si ripetono i conteggi più volte, per raggiungere una più accurata valutazione dell'abbondanza cellulare. Quindi si riporta il numero di cellule conteggiate all'abbondanza totale fitoplanctonica tramite la seguente formula:

$$C = N \times A \times 10^4$$

dove:

C = concentrazione espressa come cellule ml⁻¹

N = valore medio cellule contate su tutti i quadrati

A = fattore relativo all'area della superficie in cui sono stati effettuati i conteggi (A = 1 per un'area pari ad 1 mm²; A = 25 per un'area pari ad 1/25 mm²)

21.7 STIMA DELLA BIOMASSA FITOPLANCTONICA

Le dimensioni delle specie fitoplanctoniche variano su una scala di diversi ordini di grandezza (da 1 µm ad oltre 1 mm, Smayda, 1978) e in alcuni gruppi, essenzialmente nelle diatomee, esiste una elevata variabilità intraspecifica della taglia cellulare, dovuta alle modalità di riproduzione vegetativa. Per questo motivo è utile affiancare alla stima dell'abbondanza quella della biomassa fitoplanctonica, in particolare in studi relativi alla produzione o alla dinamica delle reti trofiche.

Un comune descrittore della biomassa fitoplanctonica totale è la concentrazione della clorofilla *a*, ma tale parametro viene considerato impreciso, in quanto il contenuto intracellulare di clorofilla è variabile, è fortemente influenzato dalle condizioni ambientali (luce, nutrienti, stato di crescita, etc.) e, inoltre, non rappresenta la componente eterotrofa presente nei popolamenti fitoplanctonici. Inoltre la biomassa è il peso della sostanza vivente mentre la clorofilla *a* ne rappresenta solo una parte.

In molti studi ecologici dei sistemi acquatici, come quelli che prendono in considerazione il ruolo del fitoplancton nei cicli biogeochimici o le relazioni trofiche tra i diversi comparti, risulta necessario esprimere la biomassa fitoplanctonica in termini di carbonio. Tale parametro può essere ricavato dalla misura del Carbonio Organico Particellato (POC) che però non consente di distinguere il contributo della frazione vivente da quello della frazione non vivente. Sia la misura della clorofilla che quella del POC inoltre, non forniscono stime di biomassa a livello di specie, essenziali per quantificare il contributo dei diversi taxa presenti all'interno del popolamento, anche in relazione ai differenti livelli trofici di appartenenza (auto-, mixo- ed eterotrofo). A tale scopo sono utilizzati diversi metodi che ricavano la biomassa fitoplanctonica in maniera indiretta dalle abbondanze cellulari, considerando la taglia degli organismi. I più usati sono il calcolo del biovolume cellulare e del carbonio.

21.7.1 Biovolume

Il biovolume del fitoplancton viene spesso utilizzato come indicatore di biomassa in studi su ambienti di acqua dolce e nei rapporti trofici tra le diverse componenti planctoniche. Il calcolo del biovolume totale del fitoplancton in un campione presuppone la conoscenza dell'abbondanza delle singole specie (vedi par. 5 e 6) e del loro volume medio individuale, che si ottiene seguendo i passaggi descritti di seguito, ovvero da dati di letteratura (Travers, 1975; Viličić, 1985). In quest'ultimo caso si procede direttamente

al calcolo del biovolume fitoplanctonico del campione con la formula indicata nell'ultimo dei passaggi elencati di seguito.

- La forma dei singoli taxa viene approssimata ad un solido noto o ad una composizione di solidi, per i quali si individuano le formule di calcolo del volume. Le forme geometriche da associarsi ai più comuni taxa microalgali e le relative formule per il calcolo dei volumi sono riportate in diversi lavori (Trevisan, 1978; Edler, 1979; Hillebrand *et al.*, 1999; Sun e Liu, 2003; Olenina *et al.*, 2006; Vadrucci *et al.*, 2007).
- Le misure necessarie per calcolare il volume delle cellule vengono ottenute al microscopio, utilizzando un oculare micrometrico, contestualmente al conteggio ovvero successivamente, nei casi in cui sia necessario manipolare le cellule per misurarne le dimensioni. Sono anche disponibili sistemi di analisi d'immagine in grado di fornire le misurazioni direttamente.
- L'oculare micrometrico va tarato con un vetrino graduato al microscopio, facendo sovrapporre le tacche dell'oculare a quelle del vetrino. Quindi si calcola per proporzione la corrispondenza tra le tacche del vetrino, le cui misure sono note, e le tacche dell'oculare. Tale corrispondenza va calcolata separatamente per ciascun ingrandimento.
- Vengono quindi misurate le dimensioni della cellula necessarie per il calcolo del biovolume (diametro, altezza, diametro e lunghezza dei prolungamenti etc.). Per alcuni solidi di riferimento (es. sfera, mezza sfera, cilindro e cono in vista laterale, ellissoide di rotazione a 2 assi) le misure (diametro e/o altezza della cellula) possono essere direttamente acquisite al microscopio. In altri casi (es. ellissoide, ellissoide di rotazione a 3 assi, parallelepipedo, parallelepipedo $\frac{1}{2}$), una delle dimensioni richieste per calcolare il volume non può essere misurata direttamente, a causa della prospettiva bidimensionale fornita dall'osservazione al microscopio. Quando possibile, tali misure possono essere acquisite dopo aver girato le cellule con l'aiuto di un ago da microscopio. In alternativa la terza dimensione deve essere stimata basandosi possibilmente su dati e proporzioni riportati in letteratura.
- Per ogni taxon è opportuno effettuare le misurazioni su un numero rappresentativo di individui (ove possibile, almeno 20 per campione), soprattutto per quelli appartenenti a gruppi (diatomee) per i quali esista un'elevata variabilità intraspecifica della taglia cellulare.
- Si calcola il volume medio individuale utilizzando le misure e le formule relative a ciascun taxon. A seconda della finalità dello studio e della composizione dei popolamenti, il biovolume medio potrà essere calcolato separatamente per ciascun punto di campionamento (stazione/quota), ovvero sull'insieme di campioni dell'area di studio.
- La misura della biomassa, espressa come biovolume per litro, si ricava moltiplicando il biovolume medio di ciascun taxon per la sua abbondanza.

$$B = V \times A$$

dove

B = biomassa ($\mu\text{m}^3 \text{ l}^{-1}$)

V = volume cellulare (μm^3)

A = abbondanza (cell. l^{-1})

21.7.2 Stima del contenuto di carbonio dal biovolume cellulare

Il contenuto in carbonio delle singole specie presenti in campioni naturali può essere calcolato a partire dal volume cellulare medio attraverso l'applicazione di formule di conversione derivate empiricamente.

Sono stati condotti negli anni numerosi studi per determinare il rapporto tra il biovolume delle cellule e il loro contenuto in carbonio, per lo più attraverso misurazioni del carbonio contenuto in colture monospecifiche analizzate in fase di crescita esponenziale. Differenti equazioni di conversione sono state

ricavate dalle analisi dei relativi set di dati (Mullin *et al.*, 1966; Strathmann, 1967; Verity *et al.* 1992; Montagnes *et al.*, 1994; Menden-Deuer e Lessard, 2000). Va considerato che le equazioni ottenute attraverso tali studi risentono delle differenti metodologie impiegate, quali la misurazione di cellule vive o fissate, i metodi impiegati per la determinazione del carbonio (combustione a secco o ossidazione umida), e le differenti condizioni di crescita delle colture.

Alcuni autori (Lohmann, 1908; Smayda, 1965; Edler, 1979) ritengono più corretto calcolare la biomassa a partire dal volume plasmatico anziché dal biovolume cellulare totale. Il volume plasmatico è rappresentato dal volume totale della cellula sottratto del volume del vacuolo. Per tutte le specie, ad eccezione delle diatomee, si assume che il volume plasmatico coincida con il volume cellulare. Nelle diatomee, caratterizzate dalla presenza di un vacuolo di notevoli dimensioni, il volume plasmatico è rappresentato essenzialmente dalla somma del sottile strato di citoplasma che aderisce alla parete interna cellulare, che si assume di spessore compreso tra 1 e 2 μm , e della componente organica contenuta nel vacuolo, che viene arbitrariamente valutata pari al 10% del volume vacuolare (Lohmann, 1908; Smayda, 1965). Quindi:

$$VP = VC - (0,9 \times VV)$$

dove:

VP = volume plasmatico

VC = volume cellulare

VV = volume vacuolare

Il volume vacuolare è calcolato assumendo che il vacuolo abbia la stessa forma della cellula cui appartiene (ellissoide, cilindro etc.) ma dimensioni inferiori. Dunque per il volume del vacuolo di una specie si applica la stessa formula utilizzata per il calcolo del biovolume cellulare, ma sottraendo 1 o 2 μm a ciascuna delle dimensioni misurate.

Esistono tuttavia diversi problemi inerenti la conversione del biovolume in carbonio che risultano di difficile soluzione. Va innanzitutto considerato che i rapporti carbonio:volume per i diversi gruppi di organismi fitoplanctonici sono ricavati empiricamente dall'analisi di un numero ridotto di specie e che singole specie possono deviare significativamente dalla regressione generale. Inoltre vanno considerati altri fattori quali condizioni fisiologiche differenti che possono influenzare la composizione delle cellule, mancanza di accuratezza e precisione nelle misure, forma irregolare delle microalghe, effetto dei fissativi su forma e volume delle cellule.

21.7.2.1 Formule di conversione

Sono qui indicate alcune delle formule proposte in letteratura e più frequentemente utilizzate negli studi ecologici. Edler (1979) suggerisce l'utilizzo di 2 fattori di conversione costanti che permettono di stimare il contenuto in carbonio delle singole specie a partire dal volume plasmatico. Il primo è proposto per i ciliati e per tutti i protisti fitoplanctonici (Strathmann, 1967), ad esclusione dei dinoflagellati tecati, mentre l'altro è applicabile ai dinoflagellati tecati, che sono considerati organismi con un contenuto di carbonio più elevato per la presenza di una parete cellulare di notevoli dimensioni (Smetacek, 1975).

Protisti:

$$C = VP \times 0,11$$

Dinoflagellati tecati:

$$C = VP \times 0,13$$

dove

C = contenuto in C intracellulare (pg)

VP = volume plasmatico (μm^3)

Numerosi studi (Mullin *et al.*, 1966; Strathmann, 1967; Menden-Deuer e Lessard, 2000) evidenziano però che il contenuto in carbonio per unità di volume diminuisce all'aumentare delle dimensioni, per cui i fattori di conversione costanti generano un errore sistematico, sottostimando la biomassa delle specie di piccole dimensioni e/o sovrastimando quella delle specie di dimensioni maggiori. Le relazioni tra volume cellulare e contenuto in carbonio sono quindi meglio rappresentate da equazioni logaritmiche.

Strathmann (1967) ricava per le diatomee, che risultano caratterizzate da un minore contenuto in carbonio per unità di volume cellulare, una formula diversa da quella indicata per tutti gli altri organismi fitoplanctonici:

Diatomee:

$$\log C = -0,422 + 0,758 \times \log V$$

Altri organismi fitoplanctonici:

$$\log C = -0,460 + 0,866 \times \log V$$

dove

C = contenuto in C intracellulare (pg)

V = volume cellulare (μm^3)

Menden-Deuer e Lessard (2000) combinano i risultati sperimentali ottenuti su circa venti specie di dinoflagellati con i diversi dati presenti in letteratura e ricavano le equazioni per i vari gruppi filogenetici (nella Tabella 4 di Menden-Deuer e Lessard, 2000). Gli autori, considerando anche l'esiguità di informazioni disponibili per alcune classi, concludono la loro analisi confermando l'esistenza di una differenza significativa tra il contenuto in carbonio delle diatomee e quello degli altri protisti e proponendo l'utilizzo di due sole formule di conversione, una da utilizzare per le diatomee ed una valida per tutti gli altri protisti, ciliati inclusi.

Diatomee:

$$\log C = -0,541 + 0,811 \times \log V$$

Altri protisti:

$$\log C = -0,665 + 0,939 \times \log V$$

dove

C = contenuto in C intracellulare (pg)

V = volume cellulare (μm^3)

Per le diatomee con volume $>3000 \mu\text{m}^3$ è possibile applicare la formula di conversione riportata nella Tabella 4 in Menden-Deuer e Lessard (2000):

$$\log C = -0,933 + 0,881 \times \log V (\mu\text{m}^3)$$

in cui si tiene in considerazione la minore concentrazione di carbonio per unità di volume in cellule di maggiori dimensioni.

21.7.2.2 Calcolo della biomassa fitoplanctonica (contenuto di carbonio)

Per calcolare la biomassa in termini di contenuto di carbonio, si moltiplica il valore del carbonio intracellulare medio di ciascun taxon per la rispettiva abbondanza, secondo la seguente formula:

$$B = C \times A \times 10^{-6}$$

dove

B = biomassa ($\mu\text{g C l}^{-1}$)
C = C intracellulare (pg C cell.^{-1})
A = abbondanza (cell. l^{-1})

Infine la biomassa totale di un dato campione si ricava dalla somma dei valori di biomassa di tutti i taxa di quel campione.

21.8 METODI DI IDENTIFICAZIONE IN MICROSCOPIA OTTICA

Le ricerche sul fitoplancton implicano, oltre alle valutazioni quantitative, il riconoscimento degli organismi presenti nei campioni analizzati. Questo aspetto assume diversa rilevanza a seconda delle finalità dell'indagine, rispetto alle quali andrebbe definito il livello di identificazione al quale mirare. In particolare, il livello tassonomico prescelto può prevedere l'identificazione di:

- grandi gruppi (es., classi e ordini), per ottenere informazioni generali di distribuzione, dominanza e alternanza nella stagionalità annuale
- generi, ottenendo informazioni più dettagliate nei casi di generi che hanno distribuzioni ristrette o prevalenti in alcune zone geografiche o climatiche o mostrano modelli stagionali e caratteri ecologici ben definiti
- specie, raggiungendo il maggior livello di definizione tassonomica, imprescindibile ad esempio in studi di biodiversità.

Il livello tassonomico richiesto dovrebbe essere stabilito già in fase preliminare perché sono diversi anche i tempi e le capacità richieste agli analisti, così come i metodi di fissazione, concentrazione e analisi al microscopio dei campioni. In alcuni casi, per esempio, la fissazione rende oggettivamente difficile, se non impossibile, il riconoscimento di alcuni organismi fitoplanctonici per i quali è quindi necessaria l'osservazione *in vivo*.

La determinazione a qualsiasi livello della gerarchia tassonomica dovrebbe essere sempre basata sull'uso di letteratura specialistica e di chiavi dicotomiche, anche se questo materiale non è sempre facilmente reperibile. La letteratura in uso spesso si riferisce alla flora microalgale di una determinata area ed è pertanto in grado di fornire, in termini sistematici, solo un quadro limitato. In ogni caso, va evitata un'identificazione basata sulle sole illustrazioni, mentre è opportuno far riferimento a testi che descrivano i caratteri differenziali e distintivi sui quali concentrare l'attenzione per operare una corretta determinazione dell'organismo osservato. Una serie di testi largamente usati per l'identificazione dei diversi gruppi fitoplanctonici viene riportata alla fine di questo capitolo.

Se l'identificazione non è possibile, l'organismo dovrebbe essere attribuito al minimo livello tassonomico certo e dovrebbe essere collegabile, per esempio attraverso un numero identificativo, ad un'immagine o ad un disegno. Infine specie poco importanti in termini quantitativi possono invece esserlo in termini ecologici e quindi non va tralasciata l'identificazione di specie più rare, soprattutto nelle indagini sulla biodiversità.

L'identificazione delle diatomee (Bacillariophyceae, Heterokontophyta) a livello di famiglie, generi e specie è fondamentalmente basata sulle caratteristiche del rivestimento cellulare siliceo, il frustulo. Tra gli altri caratteri diagnostici rilevabili in MO si possono considerare la forma delle cellule, il numero e la forma dei plastidi e la struttura delle colonie. L'uso del contrasto di fase e del DIC è raccomandato sia per campioni non trattati in mezzo acquoso sia per materiale trattato per la pulizia dei frustuli e montato su vetrini permanenti con resine ad alto indice di rifrazione. L'osservazione con ingrandimenti di 400–500 \times è spesso sufficiente ma quando le strutture e le ornamentazioni da osservare sono particolarmente delicate e piccole, sono richiesti maggiori ingrandimenti (sino a 1000 \times), con l'uso di obiettivi ad immersione. Di seguito (par. 8.1), sono riportate tecniche specifiche per la pulizia dei frustuli e per la preparazione dei vetrini. Tuttavia l'osservazione di altri caratteri tassonomici più in dettaglio richiede in numerosi casi l'impiego della microscopia elettronica (vedi Capitolo 23).

Anche per i coccolitofori (Prymnesiophyceae, Haptophyta), la classificazione è fondamentalmente basata sull'osservazione del rivestimento cellulare (coccosfera) costituito da placche calcitiche, i coccoliti. La preservazione di tali strutture richiede una particolare attenzione al pH del campione. I coccolitofori più grandi e più facilmente riconoscibili, possono essere distinti, almeno a livello di genere, anche con ingrandimenti di 400–500× in campo chiaro e/o in contrasto di fase. Per le forme più piccole, o quando sia essenziale l'osservazione di dettagli morfologici della struttura dei coccoliti, sono necessari ingrandimenti sino a 800–1000× e l'impiego di obiettivi ad immersione. Inoltre, è segnalata l'importanza dell'uso della luce polarizzata, data la natura minerale dei coccoliti (Winter *et al.*, 1994). È però frequentemente necessario utilizzare la microscopia elettronica a scansione.

I dinoflagellati *nudi* o *atecati* (Dinophyceae, Dinophyta) condividono con le altre microalghe flagellate prive di un rivestimento cellulare rigido (per esempio, rappresentanti delle Chrysophyceae, Raphidophyceae, Prymnesiophyceae, Euglenophyceae, Cryptophyceae, Prasinophyceae e Chlorophyceae) la problematica della deformazione delle cellule, sino alla loro disintegrazione quando il campione viene fissato, in particolare con la formalina. La fissazione spesso determina anche la perdita dei flagelli. La determinazione dei dinoflagellati *atecati*, basata principalmente sull'osservazione della forma cellulare e su specifici caratteri del *solco* e del *cingolo* è quindi spesso piuttosto difficile in campioni fissati mentre, come di seguito riportato (paragrafo 8b), per le forme tecate esistono tecniche utili per evidenziare le placche cellulosiche costituenti la teca.

Per quanto riguarda le forme flagellate e coccoidi di piccole dimensioni, è generalmente impossibile nei campioni fissati attribuirle a specie, ma anche a classi, per cui è comune pratica il riunirle in categorie tassonomiche (piccoli flagellati <10 μm, coccoidi <2 μm, etc.). Un problema raramente esplicitato è che la stessa scelta degli organismi da includere in queste categorie è molto soggettiva ed è altamente influenzata dal tipo di microscopio disponibile e dall'esperienza dell'operatore: alcuni operatori considerano nei conteggi solo gli organismi con flagelli, altri solo quelli superiori a 2–3 μm, altri ancora includono tutto ciò che non può essere ricondotto ad altro che ad una cellula fitoplanctonica, per quanto piccola e/o deformata dalla fissazione. Poiché queste componenti del popolamento sono spesso le più abbondanti nei campioni, le scelte operate portano a risultati sensibilmente differenti in termini di abbondanza totale, e quindi poco comparabili fra loro. Si raccomanda di ovviare, sia pure in parte, a questo problema riportando, nei lavori scientifici e a complemento di qualsiasi set di dati fitoplanctonici, informazioni quanto più possibile dettagliate circa le procedure applicate nel conteggio e riconoscimento delle forme flagellate e coccoidi di piccole dimensioni.

21.8.1 Tecniche specifiche per le Diatomee

21.8.1.1 Pulizia dei frustuli

Sebbene per alcuni generi (es. *Chaetoceros*, *Cerataulina*, *Rhizosolenia*) sia spesso possibile l'identificazione a livello di specie senza nessun tipo di trattamento, in numerosi altri casi diventa indispensabile la pulizia del frustulo, finalizzata all'ossidazione delle componenti organiche delle cellule ed alla separazione dei diversi elementi costitutivi del frustulo. Il materiale pulito può essere utilizzato sia per l'allestimento di preparati stabili per la microscopia ottica sia per l'osservazione in microscopia elettronica in trasmissione e a scansione.

Sono disponibili numerosi metodi sia per la pulizia che per l'allestimento di preparati permanenti (Hasle, 1978b). Per la pulizia occorre decidere se si intenda separare le parti del frustulo e, nella scelta degli ossidanti, si deve tener conto del livello di silicizzazione dei frustuli, onde evitare azioni troppo aggressive (Round *et al.*, 1990). Vengono di seguito riportati due tra i possibili metodi, il primo consigliato soprattutto quando sia richiesta un'ossidazione più delicata. In ogni caso, terminata l'ossidazione, è fondamentale la totale rimozione dei reagenti dai campioni perché si potrebbero verificare reazioni tra questi

e le sostanze utilizzate per montare i vetrini. A tale scopo, i metodi di pulizia prevedono ripetute fasi di lavaggio dei frustuli per sedimentazione e risospensione in acqua distillata. La sedimentazione si può ottenere per centrifugazione o per sedimentazione passiva. In quest'ultimo caso sono richiesti tempi più lunghi rispetto all'uso della centrifuga affinché anche le forme più piccole raggiungano il fondo della provetta, ma si evitano eventuali rotture dei frustuli più grandi o più delicati.

Attrezzatura:

- cappa chimica
- centrifuga
- piastra termica e agitante
- vetreria resistente agli ossidanti utilizzati per il processo
- micropipette e pipette

Metodo 1: perossido di idrogeno ed acido acetico a caldo - metodo Schrande (modificato da Schrande, 1973)

Reagenti:

- perossido di idrogeno (H_2O_2) a 30 volumi (30%)
- acido acetico glaciale (CH_3COOH) al 99,9%

Procedura:

1. Concentrare il campione centrifugandolo per 5–10 minuti a 1000 giri o attraverso un adeguato periodo di sedimentazione.
2. Rimuovere il surnatante con una pipetta, facendo attenzione a non creare nessun tipo di turbolenza o di disturbo sul materiale sedimentato.
3. Aggiungere acqua distillata, agitare, centrifugare e ripetere a partire dal punto 1 per 3–4 volte.
4. Travasare il campione in un beaker da 200 ml, facendo attenzione a recuperare tutto il materiale sedimentato e, procedendo da questo punto in poi sotto cappa, aggiungere 50 ml di una soluzione 1:1 di perossido di idrogeno e di acido acetico.
5. Riscaldare il campione su una piastra termica, tenerlo in agitazione con un magnetino, portarlo ad ebollizione per 2 minuti, sino a quando la soluzione ossidante evapora. In questa fase, l'ossidazione provoca la formazione di una schiuma più o meno abbondante in relazione alla quantità di sostanza organica presente nel campione. Si deve quindi regolare attentamente sia la temperatura che l'agitazione, facendo in modo che la schiuma non fuoriesca dal beaker.
6. Lasciare raffreddare e travasare il campione in provette di vetro per centrifuga (preferenzialmente da 50 ml, alte 11 cm e con diametro da 4 cm), facendo attenzione a recuperare tutto il materiale sedimentato.
7. Aggiungere circa 25 ml di acqua distillata, risospendere con un bacchetta di vetro il materiale sedimentato, centrifugare per 2 minuti a 1200 giri o lasciare sedimentare per un adeguato periodo di tempo.
8. Rimuovere il surnatante con una pipetta, facendo attenzione a non creare nessun tipo di turbolenza o di disturbo sul materiale sedimentato e ripetere dal punto 7 per 7 volte. Il numero di lavaggi può essere ridotto in base alla tipologia del campione sottoposto ad analisi.
9. Portare il residuo ottenuto a volume con acqua distillata.

Poiché più campioni possono essere trattati contemporaneamente, onde evitare contaminazioni si deve prestare grande attenzione all'uso di puntali, pipette, bacchette di vetro e, in generale, vetreria differente per ogni campione.

Metodo 2: acido nitrico e acido solforico - Metodo von Stosch (von Stosch, 1974)

Reagenti:

- acido nitrico (HNO_3)
- acido solforico (H_2SO_4)

Procedura:

1. Concentrare il campione centrifugandolo a 1000 giri per 5–10 minuti.
2. Rimuovere il surnatante con una pipetta, facendo attenzione a non creare nessun tipo di turbolenza o di disturbo sul materiale sedimentato.
3. Aggiungere acqua distillata, agitare, centrifugare e ripetere a partire dal punto 1 per 3–4 volte.
4. Aggiungere acido nitrico concentrato in quantità pari a quella del campione e acido solforico concentrato in quantità pari a 4 volte quella del campione.
5. Agitare il campione e riscaldarlo su una lampada ad alcool fino a quando appare limpido.
6. Lasciare raffreddare, centrifugare e rimuovere tutto il surnatante con una pipetta.
7. Lavare ripetutamente il campione secondo quanto indicato al punto 3.

Questo metodo è molto energico e non dà buoni risultati per specie poco silicizzate.

21.8.1.2 Preparati stabili

Il materiale ‘pulito’ è utilizzabile per allestire preparati permanenti sia per la microscopia ottica che per quella elettronica. In microscopia ottica, data la comune natura silicea dei frustuli e dei vetrini porta- e coprioggetto, si utilizzano normalmente dei media ad alto indice di rifrazione (in genere, 1,6–1,7) per ottenere un contrasto adeguato tra i frustuli ed il medium stesso. In genere si procede con l’essiccamento di una goccia della sospensione ottenuta con la pulizia su un vetrino coprioggetto e con il successivo montaggio con il medium.

Attrezzatura

- vetrini portaoggetto
- vetrini coprioggetto (0,17±0,02 mm)
- piastra termica termostata
- pinzette
- micropipette

Prodotti chimici

- resina o medium prescelto (se ne trovano diversi tipi in commercio, tra i più diffusi Styrax, Storax, Naphrax, ecc.)

Procedura

1. Pulire i vetrini con alcol etilico.
2. Porre il vetrino coprioggetto sulla piastra termica a temperatura non eccessivamente alta (30–40 °C).
3. Rendere omogeneo il campione con una debita agitazione che rimetta in sospensione i frustuli.
4. Prelevare con una pipetta pulita un subcampione, possibilmente di volume noto, e depositarlo sul vetrino coprioggetto.
5. Lasciare evaporare l’acqua, al riparo dalla polvere. Sulla superficie del vetrino coprioggetto rimane un residuo più o meno visibile formato dai frustuli presenti nel subcampione.
6. Aggiungere una goccia di resina sul residuo, facendo attenzione a non creare nessun tipo di contaminazione.
7. Poggiare sulla goccia di resina il vetrino portaoggetto, facendo attenzione che non si formino bolle d’aria tra la sua superficie e quella del vetrino coprioggetto, e permettere alla resina di espandersi, ricoprendo l’intera area del residuo della goccia.

-
8. Capovolgere rapidamente il vetrino portaoggetto e poggiarlo sulla piastra con il vetrino coprioggetto verso l'alto sino a che, con il riscaldamento, la resina si espanda arrivando al bordo del vetrino coprioggetto.

A partire dal punto 6, la procedura può essere leggermente differente, in rapporto alla resina impiegata. Una trattazione particolareggiata di queste metodiche è riportata in Totti *et al.* (2003).

21.8.2 Tecniche specifiche per i Dinoflagellati

Le tecniche d'identificazione in MO dei dinoflagellati tecati prevedono l'uso di coloranti, che permettono di visualizzare le placche cellulose che compongono la teca e di osservarne la forma ed il numero (formula delle placche), e altri trattamenti come lo schiacciamento della teca (squashing), la dissociazione delle placche con metodi chimici e la preparazione di vetrini permanenti. In campioni non trattati, le suture delle placche tecali sono spesso mascherate dal citoplasma, rendendo estremamente difficoltosa l'identificazione specifica soprattutto durante le analisi di routine al microscopio invertito.

21.8.2.1 Metodo del Calcofluor

La tecnica più usata per evidenziare le placche è il metodo del Calcofluor (Fritz e Triemer, 1985), che utilizza la proprietà di questo fluorocromo di legarsi alla cellulosa e ad altri β -glucani, consentendo di evidenziare le suture anche in cellule integre. Per tale tecnica, è necessario il seguente materiale:

- microscopio fornito di sistema di osservazione in epifluorescenza, consistente di lampada UV, filtro di eccitazione BP 365/12 nm⁽¹⁾, ripartitore cromatico FT 395 nm e filtro di sbarramento/emissione LP 397 nm (per es., set di filtri Zeiss UV Fs 01, 488001-0000).
- Calcofluor White M2R o Cellofluor.

La procedura è la seguente:

1. Preparare una soluzione stock di colorante sciogliendo il Calcofluor in acqua distillata ad una concentrazione di 10 mg ml⁻¹ e conservare in frigorifero.
2. Fissare il materiale da analizzare in soluzione acida di Lugol (vedi 3b), formalina o glutaraldeide al 2%.
3. Se fissato con Lugol, il campione dovrebbe essere lavato alcune volte in acqua distillata con centrifugazione a bassa velocità o direttamente nella camera di sedimentazione.
4. Aggiungere la soluzione colorante in modo tale da avere nel campione una concentrazione finale di Calcofluor di 10–20 μ g ml⁻¹.
5. Osservare in MO con epifluorescenza.

21.8.2.2 Colorazione delle placche con il colorante di von Stosch

Per le specie di dinoflagellati con teche molto sottili, in cui le suture delle placche non risultino visibili neanche dopo colorazione con Calcofluor, è opportuno utilizzare il metodo di Von Stosch (1969) basato sull'affinità della cellulosa per coloranti a base di iodio. Il metodo richiede i seguenti prodotti chimici:

- metanolo
- acido formico
- butanolo terziario
- dioxano
- cloralio idrato
- acido iodidrico

e prevede la procedura di seguito indicata:

⁽¹⁾ il numero dietro la barra indica la larghezza di banda spettrale

-
1. Preparare il colorante aggiungendo 0,96 g di cloralio idrato a 1 ml di acido iodidrico.
 2. Fissare il materiale in una miscela di metanolo-acido formico (3:1) per 10 minuti.
 3. Risospendere il materiale in butanolo terziario, contenente 6% di dioxano.
 4. Porre il materiale su un vetrino, aggiungere una goccia di colorante, coprire con un vetrino coprioggetto ed esercitare con uno stuzzicadenti una leggera pressione per ottenere la separazione delle placche.

Si noti che i vapori di iodio possono danneggiare gli obiettivi e il tavolino traslatore del microscopio, per cui occorre adoperare quantità minime di colorante e curare molto la pulizia del microscopio dopo l'osservazione.

21.8.2.3 Squashing

L'osservazione delle placche tecali dei dinoflagellati è anche possibile utilizzando la tecnica dello squashing, che consente di ottenere teche vuote intere o in parte disaggregate.

1. Isolare con una micropipetta l'individuo da analizzare o porre il materiale fissato fra il vetrino e il coprioggetto.
2. Rimuovere il liquido in eccesso asciugando con un pezzetto di carta da filtro adiacente ad un margine del coprioggetto. La quantità di liquido fra il vetrino e il coprioggetto deve essere minima.
3. Continuando ad osservare il materiale con un obiettivo a piccolo ingrandimento (2,5×, 10×), poggiare la punta di uno stuzzicadenti sul coprioggetto in corrispondenza dell'individuo da schiacciare. La forza da applicare dipende dalla specie in esame, che può essere più o meno resistente.
4. In alcuni casi, per favorire l'espulsione del citoplasma, è consigliabile spostare leggermente il vetrino coprioggetto.

In alternativa a questo metodo, una completa separazione delle placche tecali dei dinoflagellati può essere ottenuta aggiungendo al preparato qualche goccia di ipoclorito di sodio diluito (~ 5%) deponendone una goccia lungo un margine del coprioggetto.

21.8.2.4 Vetrini permanenti

La preparazione di vetrini permanenti ha il vantaggio di ottenere preparati che si mantengono per oltre 10 anni, consentendo osservazioni successive del materiale di studio. Questa tecnica presenta allo stesso tempo lo svantaggio di non consentire la manipolazione delle cellule, come per esempio la rotazione degli esemplari e la separazione delle placche tecali. In tal senso l'uso di colture o di esemplari fissati appropriatamente risulta più conveniente rispetto ai preparati stabili.

La preparazione di vetrini permanenti prevede l'uso di diversi media, come il "glycerin jelly" (Zingone *et al.*, 1990) o biopolimeri/bioplastiche come l'alcool polivinilico (Matsuoka e Fukuyo, 2000), più stabile per la preservazione a lungo termine. Quest'ultimo metodo prevede la seguente procedura:

1. Mettere una goccia di soluzione d'alcool polivinilico (PVA) su un vetrino coprioggetto.
2. Aggiungere qualche goccia del campione contenente i dinoflagellati.
3. Miscelare bene il campione con PVA e distribuirlo sul vetrino con un ago.
4. Attendere che il materiale si asciughi completamente su una piastra calda o a temperatura ambiente.
5. Aggiungere una goccia di soluzione PVA sul vetrino, capovolgere immediatamente e riporre su un vetrino portaoggetti.
6. Lasciare il vetrino in posizione orizzontale fintanto che non sia completamente asciutto.

21.9 LETTERATURA SISTEMATICA

21.9.1 Generali

- AVANCINI M., CICERO A.M., DI GIROLAMO I., INNAMORATI M., MAGALETTI E., SERTORIO ZUNINI T. (2006) - *Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani. Volume I. Fitoplancton*. Roma, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare – ICRAM: 503 pp.
- BÉRARD-THERRIault L., POULIN M., BOSSÉ L. (1999) - *Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuarie et du golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires*: CNRC-NRC, Publication spéciale canadienne de sciences halieutiques et aquatiques, Ottawa, **128**: 387 pp.
- GRAHAM L.E., GRAHAM J., WILCOX L.W. (2008) – *Algae* 2nd Ed. Benjamin.Cummings Publishing, San Francisco: 616 pp.
- HORNER R.A. (2002) - *A taxonomic guide to some common marine phytoplankton*. Biopress Ltd., The Orchard Clange Road Bristol BS3 2JK England: 195 pp.
- LEE R.L. (1999) - *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge: 614 pp.
- SOURNIA A. (1986-1990) - *Atlas du phytoplancton marin*. Paris, CNRS: 3 vol.
- TOMAS C.R. (1997) - *Identifying marine phytoplankton*. San Diego, Academic Press: 858 pp.
- VAN DEN HOEK C., MANN D.G., JAHNS H.M. (1995) - *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge: 623 pp.

21.9.2 Diatomee

- CUPP E.E. (1943) - Marine plankton diatoms of the west coast of north America. *Bull. Scripps Inst. Oceanogr.*, **5**: 1–237.
- HASLE G.R., SYVERTSEN E.E. (1997) - Marine diatoms. In: Tomas C.R. (ed.), *Identifying marine phytoplankton*. Academic Press, San Diego: 5–385.
- HUSTEDT F. (1924) - Vom Sammeln und Präparieren der Kieselalgen sowie Angaben ber Untersuchungs- und Kulturmethoden. *Handbuch der Biologischen Arbeitsmethoden*, **11**(4): 1–99.
- HUSTEDT F. (1930) - *Die Kieselalgen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz unter Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. 1. Teil*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig: 920 pp.
- HUSTEDT F. (1959) - *Die Kieselalgen. Deutschlands, Österreichs und der Schweiz unter Berücksichtigung der übrigen Länder Europas sowie der angrenzenden Meeresgebiete. 2. Teil*. Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig: 845 pp.
- HUSTEDT F. (1961) - *Die Kieselalgen Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. Teil 3*. Dr. L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschlands, Österreichs und der Schweiz, Band 7, Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H., Leipzig: 816 pp.
- HUSTEDT F. (1985) - *The pennate diatoms, a translation of Hustedt's "Die Kieselalgen, 2 Teil", with suppl. of N.H. Jensen*. KOELTZ Scientific Books KOENIGSTEIN: 918 pp.
- PERAGALLO H., PERAGALLO M. (1897–1908) - *Diatomées marines de France et des districts maritimes voisins*. Micrographie Editeur, Grez-sur-Loing: 491 pp.
- RAMPI L., BERNHARD M. (1980) - *Key for determination of Mediterranean diatoms*. CNEN, RTB/BIO, **78** (1): 71 pp.
- RICARD M. (1987) - Diatomophycées. In: Sournia A. (ed.), *Atlas du phytoplancton marin*. Editions du CNRS, Paris: 297 pp.
- ROUND F.E., CRAWFORD R.M., MANN D.G. (1990) - *The diatoms. Biology and morphology of the genera*. Cambridge University Press, Cambridge: 747 pp.
- VAN DER WERFF A., HULS H. (1957–1974) - *Diatomeenflora van Nederland*. Deen Haag., Afl. 1-9.
- VAN HEURCK H. (1880–1885). *Synopsis des diatomées de Belgique*. (Suppl. A, B, C), Anvers: 235 pp.

21.9.3 Dinoflagellati

- BALECH E. (1988) - Los Dinoflagellados del Atlantico sudoccidental. *Publicaciones especiales Instituto Español de Oceanografía, Madrid*, **1**: 312 pp.
- DODGE J.D. (1982) - *Marine dinoflagellates of the British Isles*. Her Majesty's Stationery Office, London: 310 pp.
- FAUST M.A., GULLEDGE R.A. (2002) - *Identifying harmful marine dinoflagellates*. Contributions of the United States National Herbarium, Department of Systematic Biology - Botany, National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, DC., **42**: 144 pp.
- MATSUOKA K., FUKUYO Y. (2000) - *Technical guide for modern dinoflagellate cyst study*. WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC: 77 pp.
- RAMPI L., BERNARD M. (1980) - *Chiave per la determinazione delle peridinee pelagiche mediterranee*. CNEN, RT/BIO, **80 (8)**: 193 pp.
- SCHILLER J. (1933) - *Dinoflagellatae (Peridineae) Teil 1*. Dr. L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschlands, Österreichs und der Schweiz, Band 10, Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H., Leipzig: 617 pp.
- SCHILLER J. (1937) - *Dinoflagellatae (Peridineae) Teil 2*. Dr. L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschlands, Österreichs und der Schweiz, Band 10, Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H., Leipzig: 591 pp.
- SOURNIA A. (1986) - Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées, Raphidophycées. In: Sournia A. (ed.), *Atlas du phytoplancton marin*. Editions du CNRS, Paris: 219 pp.
- STEIDINGER K.A., TANGEN K. (1997) - Dinoflagellates. In: Tomas C.R. (ed.), *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, San Diego: 387–584.
- TAYLOR F.J.R. (1976) - Dinoflagellates from the International Indian Ocean Expedition. A report on material collected by the R.V. "Anton Bruun" 1963, 1964. *Bibliotheca Botanica*, **132**: 1–234.

21.9.4 Coccolitofori

- BORSETTI A.M., CATI F. (1972) - Il nannoplancton calcareo vivente nel Tirreno centro-meridionale. *Giornale di Geologia*, **38**: 395–452.
- BORSETTI A.M., CATI F. (1976) - Il nannoplancton calcareo vivente nel Tirreno centro-meridionale. Parte II. *Giornale di Geologia*, **40**: 209–240.
- BORSETTI A.M., CATI F. (1979) - Il nannoplancton calcareo vivente nel Tirreno centro-meridionale. Parte III. *Giornale di Geologia*, **43**: 157–174.
- CHRÉTIENNOT-DINET M.J. (1990) - Chlorarachniophycées, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Euglénophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnésiophycées, Rhodophycées et Tribophycées. In: Sournia A. (ed.), *Atlas du Phytoplancton Marin*. Editions du CNRS, Paris: 261 pp.
- CROS L., FORTUNO J.-M. (2002) - Atlas of northwestern Mediterranean coccolithophores. *Sci. Mar.*, **66**: 7–182.
- HEIMDAL B.R. (1997) - Modern Coccolithophorids. In: Tomas C.R. (ed.), *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, San Diego: 731–833.
- HEIMDAL B.R., GAARDER, K.R. (1980) - Coccolithophorids from the northern part of the eastern central Atlantic. I. Holococcolithophorids. *Meteor Forsch. Ergebnisse, Ser. D*, **32**: 1–14.
- HEIMDAL B.R., GAARDER, K.R. (1981) - Coccolithophorids from the northern part of the eastern central Atlantic. II. Heterococcolithophorids. *Meteor Forsch. Ergebnisse, Ser. D*, **33**: 37–69.
- KAMPTNER E. (1941) - Die coccolithineen der Sudwestküste von Istrië. *Annals des Naturhistorischen Museum in Wien*, **51**: 54–149.
- KAMPTNER E. (1967) - Kalkflagellaten-Skelettreste aus Tiefseeschlamm des Südatlantischen Ozeans. *Annales Naturhistorischen Museums Wien*, **71**: 117–198.
- KLEIJNE A. (1991) - Holococcolithophorids from the Indian Ocean, Red Sea, Mediterranean Sea and North Atlantic Ocean. *Marine Micropaleontology*, **17**: 1–76.
- MALINVERNO E., DIMIZA M.D., TRIANTAPHYLOU M., DERMITZAKIS M.D., CORSELLI C. (2008) - *Coccolithophores of the Eastern Mediterranean Sea: A look into the marine microworld*. Ion Publishing Group, Peristeri: 188 pp.
- NISHIDA S. (1979) - Atlas of Pacific nannoplankton. *News of Osaka micropaleontologists, Special paper*, **3**: 1–31.

-
- RAMPI L., BERNHARD M. (1981) – *Chiave per la determinazione delle coccolitoforidee mediterranee*. C.N.E.N., Roma RT/BIO, **81** (13): 98 pp.
- SCHILLER J. (1930) - *Coccolithineae*. Dr L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschlands, Österreichs und der Schweiz, Band 10, Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H. Leipzig: pp. 89–273.
- UTERMÖHL H. (1958) - Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitteilungen der Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie*, **9**: 1–38.
- WINTER A., SIESSER W.G. (1994) - Atlas of living coccolithophores. In: Winter A., Siesser W.G. (eds), *Coccolithophores*. Cambridge University Press: 107–159.
- YOUNG J., GEISEN M., CROS L., KLEIJNE A., SPRENGEL C., PROBERT I. (2003) - Guide to extant calcareous nannoplankton taxonomy. *Journal of Nannoplankton Research*, special issue: 125 pp.

21.9.5 Altri fitoflagellati

- CHRÉTIENNOT-DINET M.J. (1990) - Chlorarachniophycées, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Euglénophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnesiophycées, Rhodophycées et Tribophycées. In: Sournia A. (ed.), *Atlas du Phytoplankton Marin*. Editions du CNRS, Paris: 261 pp.
- GEMEINHARDT K. (1930). *Silicoflagellatae*. Dr L. Rabenhorst's Kryptogamen-Flora von Deutschlands, Österreichs und der Schweiz, Band 10, Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H. Leipzig: 1- 87.
- SOURNIA A. (1986) - Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées, Raphidophycées. In: Sournia A. (ed.), *Atlas du Phytoplankton Marin*. Editions du CNRS, Paris: 219 pp.
- THRONDSSEN J. (1997) - The planktonic marine flagellates. In: Tomas C.R. (ed.), *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, San Diego: 591–729.

21.10 SITI WEB PER LA TASSONOMIA DEL FITOPLANCTON

In questa sezione vengono elencati alcune risorse disponibili in internet, con i rispettivi URL, che contengono foto e informazioni tassonomiche sul fitoplancton in generale o relativamente ad aree specifiche. I siti sono stati visionati alla data del completamento del presente capitolo (aprile 2009), ma è possibile che nel tempo alcuni URL non siano più attivi. Inoltre è da tener presente che non tutti i siti sono verificati dal punto di vista della validità dell'informazione contenuta. Ad esempio, in alcuni casi si possono riscontrare evidenti errori di identificazione, o informazioni non aggiornate, che è consigliabile segnalare prontamente ai responsabili del sito. Per un elenco commentato delle risorse internet contenenti informazioni relative alla tassonomia del plancton si rimanda a Jouenne *et al.* (2008).

Si ricorda inoltre la necessità di citare i siti quando se ne usano le informazioni, anche nel caso di presentazioni, lezioni e seminari. In caso di pubblicazione di foto, è indispensabile richiedere l'autorizzazione ai proprietari dei siti, a meno che non siano esplicitate nei siti raccomandazioni diverse. In generale, si consiglia di seguire le istruzioni d'uso riportate nei siti.

21.10.1 Generali

- Encyclopedia of Life: <http://www.eol.org/index>
- Phytoplankton de Méditerranée: <http://www.com.univ-mrs.fr/PHYTOCOM/>
- AlgaeBase: <http://www.algaebase.org>
- WeMP, Website on Mediterranean Phytoplankton: http://www.szn.it/SZNWeb/showpage/124?_languageId_=2
- PlanktonNet: <http://www.planktonnet.eu/>
- Checklist of Phytoplankton in the Skagerrak-Kattegat: http://www.smhi.se/oceanografi/oce_info_data/plankton_checklist/ssshome.htm
- MICRO*SCOPE: <http://starcentral.mbl.edu/microscope/portal.php?pagetitle=index>

21.10.2 Diatomee

- Australian diatom homepage: <http://www.arts.monash.edu.au/ges/research/cpp/diatoms/>

21.10.3 Dinoflagellati

- Atlas of Dinoflagellates: http://dinos.anesc.u-tokyo.ac.jp/atlas_ver1_5/main.html
- Identifying Harmful Marine Dinoflagellates: <http://botany.si.edu/references/dinoflag/>

21.10.4 Coccolitofori

- Coccolithophorid evolutionary biodiversity and ecology network – CODENET: http://www.nhm.ac.uk/hosted_sites/ina/CODENET/
- Phycological images (testo in giapponese): http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~inouye/ino/h/hapt_pic2.html

21.10.5 Alghe tossiche

- IOC Taxonomic Reference List of Toxic Plankton Algae: <http://www.marinespecies.org/hab/index.php>
- Harmful Plankton Project: <http://www.liv.ac.uk/hab/intro.htm>

21.11 BIBLIOGRAFIA

- BEERS R.J. (1978) - Pump sampling. In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology*, **6**, UNESCO, Paris: 41–49.
- CORDELLA P., CAVOLO F. (1988) - Una proposta metodologica sul conteggio del fitoplancton. *Giorn. Bot. It.*, **122** (1): 141.
- EDLER L. (1979) - Recommendations for marine biological studies in the Baltic Sea. *Phytoplankton and chlorophyll, Baltic Mar. Biol. Publ.*, **5**: 1–35.
- EN 15204 (2006) - Water quality. *Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique)*. European Committee for Standardization, Brussels.
- FRITZ L., TRIEMER R.E. (1985) - A rapid and simple technique utilizing Calcofluor White MR2 for visualization of dinoflagellate technology, *J. Phycol.*, **21**: 662–664.
- HAMILTON P.B., PROULX M., EARLE C. (2001) - Enumerating phytoplankton with an upright compound microscope using a modified settling chamber. *Hydrobiologia*, **444**: 171–175.
- HASLE G.R. (1978a) - The inverted microscope method. In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual. Monographs on oceanographic Methodology*, **6**, UNESCO, Paris: 88–96.
- HASLE G.R. (1978b) - Diatoms. In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology*, **6**, UNESCO, Paris: 136–142.
- HILLEBRANDT H., DÜRSELEN C.D., KIRSCHTEL D., POLLINGHER U., ZOHARY T. (1999) - Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.*, **35**: 403–424.
- HORNER R.A. (2002) - *A taxonomic guide to some common marine phytoplankton*. Biopress Ltd., The Orchard Clange Road Bristol BS3 2JK England: 195 pp.
- JOUENNE F., PROBERT I., VAULOT D. (2008) - Plankton taxonomy in the computer age. *Cah. Biol. Mar.*, **49**: 365–367.
- LOHMANN H. (1908) - Untersuchungen zur Feststellung des vollständigen Gehaltes des Meeres an Plankton. *Wiss. Meeresunters. Abt. Kiel NF.*, **10**: 132–370.
- LUND J.W.G., KILPLING C., LE CREN E.D. (1958) - The inverted microscope method of estimating algal numbers, and the statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*, **11** (2): 143–170.

-
- MATSUOKA K., FUKUYO Y. (2000) - *Technical guide for modern dinoflagellate cyst study*. WESTPAC-HAB/WE-STPAC/IOC: 77 pp.
- MENDEN-DEUER S., LESSARD E.J. (2000) - Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnol. Oceanogr.*, **45**: 569–579.
- MONTAGNES D.J.S., BERGES J.A., HARRISON P.J., TAYLOR F.J.R. (1994) - Estimating carbon, nitrogen, protein, and chlorophyll *a* from volume in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **39**: 1044–1060.
- MULLIN M.M., SLOAN P.R., EPPLEY R.W. (1966) - Relationship between carbon content, cell volume, and area in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **11**: 307–311.
- OLENINA I., HAJDU S., EDLER L., ANDERSSON A., WASMUND N., BUSCH S., GOBEL J., GROMISZ S., HUSEBY S., HUTTUNEN M., JAANUS A., KOKKONEN P., LEDAINE I., NIEMKIEWICZ E. (2006) - Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. *HELCOM Balt. Sea Environ. Proc.*, **106**: 144 pp.
- PAXINOS R., MITCHELL J. (2000) - A rapid Utermöhl method for estimating algal number. *J. Plankton Res.*, **22**: 2255–2262.
- ROTT E., SALMASO N., HOEHN E. (2007) - Quality control of Utermöhl-based phytoplankton counting and biovolume estimates - an easy task or a Gordian knot? *Hydrobiologia*, **578**: 141–146.
- ROUND F.E., CRAWFORD R.M., MANN D.G. (1990) - Collecting and studying diatoms. In: Round F.E., Crawford R.M., Mann D.G. (eds), *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press, Cambridge: 8–13.
- SCHRANDER H.J. (1973) - Proposal for a standardized method of cleaning diatom-bearing deep-sea and land-exposed marine sediments. In: Simonsen R. (ed.), *2nd Symp. Rec. Fos. Diatoms*. Verlag von J. Cramer, London: 403–409.
- SEMINA H.J. (1978) - Treatment of an aliquot sample. In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology*, **6**, UNESCO, Paris: 181.
- SMAYDA T.J. (1965) - A quantitative analysis of the phytoplankton of the Gulf of Panama. II. On the relationship between ¹⁴C assimilation and the diatom standing crop. *Bull. Inter-Amer. Trop. Tuna Comm.*, **9**: 467–531.
- SMAYDA T.J. (1978) - From phytoplankters to biomass. In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology*, **6**, UNESCO, Paris: 273–279.
- SMETACEK V. (1975) - *Die Sukzession des Phytoplanktons in der westlichen Kieler Bucht*. Ph.D. thesis, University of Kiel.
- STRATHMANN R.R. (1967) - Estimating the organic carbon content of phytoplankton from cell volume or plasma volume. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 411–418.
- SUN J., LIU D. (2003) - Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J. Plankton Res.*, **25**: 1331–1346.
- TANGEN K. (1978) - Nets. In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology*, **6**, UNESCO, Paris: 50–58.
- THRONDSSEN J. (1978) - Preservation and storage. In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology*, **6**, UNESCO, Paris: 69–74.
- TOTTI C., DE STEFANO M., FACCA C., GHIRARDELLI L.A. (2003) - Il microfitobenthos. In: Gambi M.C., Dappiano M. (eds), *Manuale di metodologie di campionamento e studio del benthos marino mediterraneo. Biol. Mar. Medit.*, **10** (Suppl.): 263–284.
- TRAVERS M. (1975) - Le microplancton du Golfe de Marseille: volume, surface et volume plasmique des organismes. *Tethys*, **6** (4): 689–712.
- TREVISAN R. (1978) - Nota sull'uso dei volumi algali per la stima della biomassa. *Riv. Idrobiol.*, **17** (3): 345–357.
- UTERMÖHL H. (1931) - Neue Wege in der quantitativen Erfassung des Planktons (mit besonderer Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, **5**: 567–596.
- VADRUCCI M.R., CABRINI M., BASSET A. (2007) - Biovolume determination of phytoplankton guilds in transitional water ecosystem of Mediterranean Ecoregion. *Transit. Waters Bull.*, **2**: 83–102.
- VARGO G.A. (1978) - Using the fluorescence microscope. In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology*, **6**, UNESCO, Paris: 197–201.
- VENRICK E. (1971) - The statistics of subsamplings. *Limnol. Oceanogr.*, **16**: 811–818.
- VENRICK E. (1978) - How many cells to count? In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual. Monographs on Oceanographic Methodology*, **6**, UNESCO, Paris: 167–180.

-
- VERITY P.G., ROBERTSON C.Y., TRONZO C.R., ANDREWS M.G., NELSON J.R., SIERAKI M.E. (1992) - Relationships between cell volume and the carbon and nitrogen content of marine photosynthetic nanoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **37**: 1434–1446.
- VILIČIĆ D. (1985) - An examination of cell volume in dominant phytoplankton species of the central and southern Adriatic Sea. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, **70**: 829–843.
- VON STOSCH H.A. (1969) - Dinoflagellaten aus der Nordsee I. Über *Cachonina niei* Loeblich (1968), *Gonyaulax grindleyi* Reinecke (1967) und eine Methode zur Darstellung von Peridineenpanzen. *Helgolander wiss. Meeresunt.*, **19**: 558–568.
- VON STOSCH, H.A. (1974) - Pleurax, seine Synthese und seine Verwendung zur Einbettung und Darstellung der Zellwand von Diatomeen, Peridineen und anderen Algen, sowie für eine neue Methode zur Elektivfärbung von Dinoflagellaten-Panzern. (Pleurax: its synthesis and its application to the mounting and clearing for cell walls of diatoms, dinoflagellates and other algae, as well as for a new method of electively staining dinoflagellate armours). *Arch. Protistenkd.*, **116**: 132–141.
- WINTER A., JORDAN R.W., ROTH P.H. (1994) - Biogeography of living coccolithophores in ocean waters. In: Winter A., Siesser W.G. (eds), *Coccolithophores*. Cambridge University Press, Cambridge: 161–177.
- 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*, **11** (suppl.): 183–198.

CAPITOLO 22. COLTURE DI DILUIZIONE SERIALE (SDC)

A. Zingone, F. Cerino, I. Percopo

adriana.zingone@szn.it

22.1 INTRODUZIONE

Il fitoplancton è dominato per la maggior parte dell'anno e nella gran parte della colonna d'acqua da specie con flagelli, spesso di piccole dimensioni, che nei conteggi effettuati su materiale fissato non sono identificabili e vengono pertanto aggregate in categorie non tassonomiche. Infatti ad eccezione di pochi casi (ad esempio alcune criptofite), la fissazione comporta un cambiamento della forma cellulare e la perdita dei flagelli, non consentendo l'identificazione neanche della classe di appartenenza. Inoltre spesso gli organismi più delicati vengono distrutti completamente e pertanto non vengono inclusi nei conteggi.

Informazioni quantitative sui flagellati possono essere ottenute attraverso tecniche di epifluorescenza (vedi Capitolo 20), che consentono anche la distinzione fra specie autotrofe ed eterotrofe, mentre lo studio della diversità pigmentaria (vedi Capitolo 34) permette una stima del contributo delle diverse classi algali a questa importante componente del plancton. Per una identificazione dei flagellati a livello di specie è invece quasi sempre necessaria l'osservazione dei campioni *in vivo*, che permette di apprezzare la forma, la microanatomia e il colore degli organismi in questione, nonché le modalità del nuoto. A tale approccio va spesso accoppiato l'uso di tecniche di microscopia elettronica (vedi Capitolo 23), per le quali si rendono necessarie quantità consistenti di materiale.

La coltivazione per diluizione seriale permette di ottenere, per ogni singola specie, una quantità notevole di individui che possono essere osservati più agevolmente rispetto alle poche e sparse cellule presenti in un campione naturale non fissato. L'abbondanza del materiale si presta inoltre ad osservazioni in microscopia elettronica. Nelle colture a diluizione maggiore, o attraverso ulteriori diluizioni, è anche possibile ottenere colture monospecifiche che possono essere utilizzate per analisi di pigmenti, tossine e marcatori molecolari. Infine, in base alla presenza/assenza di singole specie nella serie di diluizioni, utilizzando le tavole del MPN (most probable number), è possibile pervenire ad una stima della loro abbondanza nei campioni di partenza.

Il metodo delle colture di diluizione associato al MPN, mutuato da tecniche batteriologiche, è stato applicato per la prima volta al fitoplancton da Knight-Jones (1951) e successivamente modificato da Throndsen (1978). In Italia, è stato usato la prima volta da Bernhard *et al.* (1967; 1969). Per ulteriori informazioni ed approfondimenti si rimanda ai vari lavori metodologici di Throndsen (Throndsen, 1978; Andersen e Throndsen, 2003). Il metodo in pratica si basa sull'individuazione, attraverso la diluizione, del volume di campione che contenga una singola cellula della specie di interesse, dal quale si risale alla concentrazione della specie nel volume.

Nonostante i vantaggi esplicitati nei precedenti paragrafi, le limitazioni di questa tecnica sono molteplici: possono essere infatti ottenute informazioni solo per le specie coltivabili nelle condizioni sperimentali prescelte, che sono una frazione non quantificabile di quelle presenti in un dato campione naturale. Inoltre non tutte le cellule di una popolazione sono ugualmente vitali e coltivabili. Infine le concentrazioni elevate di cellule nei tubi di coltura favoriscono la competizione interspecifica e la successione di specie diverse, nonché fenomeni di infezione virale, che possono portare a ulteriori sottostime dell'abbondanza di una specie. In definitiva, le stime ottenute con questo metodo hanno carattere quali/quantitativo e vanno considerate come valori minimi della reale abbondanza delle singole specie e dei flagellati nel loro complesso.

22.2 DESCRIZIONE DEL METODO

Il metodo consiste nel diluire il campione in un terreno di coltura fino a che un'unica cellula cresca in un tubo, ottenendo così colture monospecifiche. È chiaro che sarà più facile ottenere tali colture per le specie presenti a concentrazioni più elevate, mentre per le specie più rare si otterranno colture miste dalle quali sarà comunque possibile ricavare colture unialgali mediante ulteriori passaggi di diluizione. Uno dei terreni di coltura più indicati per la crescita dei flagellati è il terreno K (vedi Capitolo 24), che viene generalmente diluito (1:2 o 1:5) quando il campionamento si effettua in ambienti oligotrofici, per evitare effetti di inibizione della crescita in organismi adattati a condizioni di estrema povertà di nutrienti. Il terreno va preparato senza aggiunta di silicati, così da contenere lo sviluppo delle diatomee; queste cresceranno in ogni caso in una fase iniziale, fino ad esaurimento dei silicati contenuti nell'acqua di mare con cui si prepara il terreno.

Sebbene tre passaggi di diluizione siano sufficienti ad ottenere una stima delle abbondanze (vedi di seguito), generalmente si effettuano 5 passaggi di diluizione da 1:1 a 1:10000, ciascuno in 5 repliche. A tale scopo si preparano 25 tubi disposti in 5 serie parallele con 5 repliche ciascuna (I-V), denominando ogni tubo con il numero del passaggio di diluizione (da 1 a 5), preceduto dal segno '- ', in combinazione con il numero della replica (da I a V). Ad esempio, i tubi della prima serie sono denominati -1I, -1II, -1III, -1IV, -1V, quelli della seconda -2I, -2II, , etc. (Fig. 1).

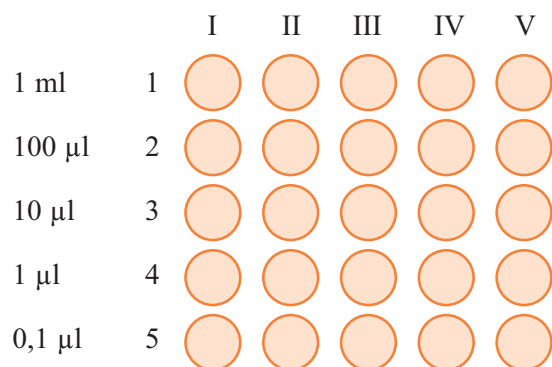


Fig. 1 - Schema della disposizione dei tubi di coltura per una SDC (1-5: passaggi di diluizione corrispondenti rispettivamente ad un inoculo di 1 ml, 100 µl, 10 µl, 1 µl e 0,1 µl; I-V: repliche per ogni passaggio di diluizione).

Il campione viene prelevato direttamente dalla Niskin e posto in bottiglie di plastica scure per evitare che la luce danneggi le cellule. La bottiglia va mantenuta al fresco (non in frigorifero), avvolgendola in carta bagnata fino all'arrivo in laboratorio. Poiché il metodo non richiede un'attrezzatura particolare o ingombrante, il campione può essere inoculato anche a bordo di piccole imbarcazioni o comunque lontano da un laboratorio. In questo caso è necessario evitare la luce solare diretta e sbalzi di temperatura.

Le serie di diluizioni possono essere effettuate in due modi:

22.2.1 Metodo con le pipette

È basato sull'allestimento di serie di diluizioni distinte per ciascuna replica.

Materiale

- bottiglia in plastica scura per la raccolta del campione
- rack porta-tubi

-
- 25 tubi contenenti 9 ml di terreno di coltura, opportunamente marcati con pennarello nero con il numero di diluizione e di replica (-1I, -1II, etc., vedi sopra).
 - 6 pipette graduate da 10 ml

Procedura

- Agitare il campione
- Prelevare almeno 6 ml di campione con una pipetta graduata da 10 ml
- Inoculare 1 ml di campione in ognuno dei 5 tubi della serie 1 (da -1I a -1V)
- Con una nuova pipetta mescolare il contenuto della prima replica della serie 1 (-1I) al fine di renderlo omogeneo
- Prelevare 1 ml di sospensione, che conterrà 100 µl del campione (diluizione 1:10) e inocularlo nella prima replica della serie 2 (-2I)
- Con la stessa pipetta mescolare e trasferire 1 ml, che conterrà 10 µl del campione (campione 1:100) da -2I a -3I
- Ripetere le operazioni di mescolamento e trasferimento fino a -5I, che conterrà 100 nl del campione (diluizione 1:10000)
- Prelevando da ognuno dei tubi riempiti nel passaggio c) come partenza, ripetere la procedura di diluizione/trasferimento per le repliche II, III, IV e V delle serie

22.2.2 Metodo con la siringa

È basato su diluizioni effettuate nella siringa invece che nei tubi, con subcampioni di ciascuna diluizione inoculati nelle repliche.

Materiale

- 1 bottiglia in plastica scura per la raccolta del campione
- 1 rack porta-tubi
- 25 tubi contenenti 9-10 ml di terreno di coltura, opportunamente marcati con pennarello nero con il numero di diluizione e di replica (-1I, -1II, etc., vedi sopra). In questo caso la quantità di terreno può variare, dal momento che la diluizione avviene nella siringa
- 4 tubi contenenti 12-15 ml di terreno di coltura per le diluizioni
- 1 siringa da 10 ml con becco eccentrico, senza ago

Procedura

- Agitare il campione
- Lavare la siringa con il campione
- Prelevare con la siringa 10 ml ed eliminare eventuali bolle d'aria
- Eliminare 1 ml
- Inoculare 1 ml di campione in ogni tubo della serie 1. Rimarranno nella siringa 4 ml di campione
- Eliminare 3 ml di campione dalla siringa, lasciandone 1 ml
- Aspirare con la siringa il terreno di coltura da uno dei 4 tubi approntati, portando a 10 ml precisi il volume del campione nella siringa. L'operazione è semplificata se si blocca con la mano sinistra la siringa sul collo della provetta, si mantiene la provetta inclinata o quasi capovolta al di sopra della siringa, e si aspira con decisione tirando lo stantuffo con la mano destra
- Eliminare le bolle di aria eventualmente formatesi nell'aspirazione
- Eliminare 1 ml
- Inoculare 1 ml in ciascun tubo/replica della serie 2 (rimarranno 4 ml)
- Ripetere punti da f) a l) fino alla serie 5

In questo caso il tubo può contenere quantità variabili di terreno di coltura, per cui tale metodo può essere adattato per inoculi in volumi più grandi di mezzo di coltura e/o in un numero maggiore di tubi per ogni passaggio (fino ad un massimo di 8 con la siringa da 10 ml). È anche possibile modificare il volume dell'inoculo o la grandezza della siringa usata per le diluizioni.

I tubi vanno incubati a una temperatura e a una intensità luminosa paragonabili a quelle misurate a mare al momento del campionamento. Il periodo di incubazione deve essere tale da ottenere concentrazioni cellulari sufficienti per l'osservazione al microscopio.

22.3 OSSERVAZIONE DELLE COLTURE

Generalmente una prima osservazione viene fatta dopo 3-4 settimane per campioni di aree temperate, dopo 2 settimane per quelli di aree tropicali e subtropicali e dopo circa 2 mesi per quelli di aree polari. È generalmente consigliato ripetere le osservazioni anche 1-2 settimane dopo la prima volta, per poter evidenziare la presenza di specie che possono diventare rilevabili in tempi differenti, dal momento che nei tubi si verifica una vera e propria successione di specie diverse.

È buona norma effettuare le osservazioni prelevando piccole gocce di coltura sia dalla parte più alta del tubo, per rilevare le specie flagellate (fitoflagellati, dinoflagellati), sia in quella più profonda, per le specie non flagellate (diatomee, forme coccoidi). Le gocce poste su vetrino portaoggetto e coperte con vetrino coprioggetto vengono osservate al microscopio ottico, possibilmente equipaggiato con lenti per campo chiaro, contrasto di fase e contrasto interferenziale, lampade UV e filtri per la fluorescenza della clorofilla, e con obiettivi fino a 100x. La presenza delle singole specie nei diversi tubi viene annotata su un apposito protocollo prestampato (Fig. 2).

L'identificazione al MO dei fitoflagellati si basa sull'osservazione dei seguenti caratteri:

- forma e dimensioni delle cellule
- numero, lunghezza e posizione dei flagelli ed eventuale presenza di aptonema
- colore
- numero e forma dei cloroplasti
- presenza di tricocisti, mucocisti, filamenti o altri corpuscoli emessi dalle cellule
- modalità di nuoto

Con il contrasto interferenziale e/o l'obiettivo 100x è anche possibile osservare altri particolari microanatomici utili, quali la presenza di teche, macchie oculari, placche visibili etc. In microscopia a fluorescenza si possono evidenziare più chiaramente i cloroplasti, e quindi distinguere con sicurezza specie autotrofe da specie eterotrofe.

Nei casi in cui questi caratteri non permettono l'identificazione a livello di specie, è possibile preparare campioni di colture (anche con più di una specie) per la microscopia elettronica a trasmissione (TEM) o a scansione (SEM), vedi Capitolo 23. Le osservazioni al TEM di cellule intere (preparazioni dirette) consentono di analizzare le strutture superficiali (scaglie) che generalmente rivestono il corpo cellulare e i flagelli, mentre le sezioni ultrasottili forniscono informazioni sulla struttura dei cloroplasti, posizione e ultrastruttura del pirenoide, struttura della macchia oculare, basi dei flagelli e radici flagellari, posizione del nucleo e altri dettagli microanatomici. Le osservazioni al SEM danno informazioni sulla forma cellulare, sulla zona di inserzione dei flagelli e, nel caso di alcuni gruppi, sulla parete cellulare e sulla microanatomia di strutture peculiari, come ad esempio il complesso gola/solco nelle criptofitiche.

22.4 STIMA DELLE CONCENTRAZIONI - CALCOLO DEL NUMERO PIÙ PROBABILE (MPN)

I dati di presenza/assenza delle specie nei tubi a diversi livelli di diluizione permettono di stimare il numero di cellule nel campione originario attraverso un metodo statistico, denominato MPN (Most Pro-

table Number).

Tale stima si effettua facendo riferimento a tabelle da cui è possibile ricavare il numero di cellule per ml in base alla presenza della specie in una data serie e in un dato numero di repliche per quella serie. Fra le tabelle utilizzabili, consigliamo l'uso di quelle incluse nel manuale per lo studio delle alghe tossiche (Andersen e Thronsdn, 2003). Si considerano le ultime 3 diluizioni in cui si osserva crescita. Tuttavia, se si osserva la crescita in un solo tubo in tutta la serie, si considerano le 3 diluizioni più basse. Per esempio, nel caso riportato in Fig. 2, per la specie A si utilizzano i valori 3, 1 e 4, per i quali il valore MPN corrispondente, in cellule per ml, si ritrova seguendo la riga delle diluizioni di 100, 10 e 1 μ l (dal momento che queste sono le diluizioni considerate) (Fig. 3).

Species	MPN	1 ml					100 μ l					10 μ l					1 μ l					100 nl				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Specie A		✓	✓				✓	✓	✓			✓					✓	✓	✓	✓						
Specie B		✓		✓	✓				✓			✓														
Specie C												✓														

Fig. 2 - Esempio di protocollo su cui annotare i dati di presenza/assenza delle colture seriali.

Per la specie B, i valori sono 3, 1 e 1, partendo dalla serie in cui è stato aggiunto 1 ml, mentre per la specie C saranno 0, 0 e 1. I valori di MPN corrispondenti alla crescita osservata saranno quindi di 23 cell. ml^{-1} (Fig. 3, in rosso) per la specie A e di 1,40 cell. ml^{-1} per la specie B (Fig. 3, in verde). Per la specie C, il valore sarà di 0,18 cell. ml^{-1} (vedi tabella in Andersen e Thronsdn, 2003).

Growth in inoculum			MPN cells ml^{-1}		
1.0 ml	100 μ l	10 μ l			
100 μ l	10 μ l	1 μ l			
10 μ l	1 μ l	100 nl			
3	1	4	230	23	2.30
3	1	3	200	20	2
3	1	2	170	17	1.70
3	1	1	140	14	1.40
3	1	0	110	11	1.10
3	0	5	230	23	2.30
3	0	4	200	20	2

Fig. 3 - Visione parziale di una tabella con i valori di MPN (modificato da Andersen e Thronsdn, 2003).

È importante sottolineare che il metodo delle SDC registra solo le cellule che riescono a sopravvivere nelle condizioni di coltura offerte, quindi il MPN è un valore minimo della loro abbondanza, con un errore standard di $\pm 20-50\%$.

22.5 BIBLIOGRAFIA

- ANDERSEN P., THRONSEN J. (2003) - Estimating cell numbers. In: Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. (eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. IOC-UNESCO, Paris: 99-129.
- BERNHARD M., RAMPI L., ZATTERA A. (1967) - A phytoplankton component not considered by the Utermöhl method. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* **35**: 170-214.
- BERNHARD M., RAMPI L. ZATTERA A. (1969) - La distribuzione del fitoplancton nel Mar Ligure. *Pubbl. Staz. Zool. Napoli* **37**: 73-114.
- KNIGHT-JONES E.W. (1951) - Preliminary studies of nanoplankton and ultraplankton systematics and abundance by a quantitative culture method. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer* **17**: 140-155.
- THRONSEN J. (1978) - The dilution culture method. In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual*, UNESCO Monographs on Methodology, Paris, France: 218-224.

CAPITOLO 23. OSSERVAZIONE DEL FITOPLANCTON AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE (SEM) E A TRASMISSIONE (TEM)

G. Honsell, M. Montresor, T. Romagnoli, D. Sarno, C. Totti, A. Zingone

giorgio.honsell@uniud.it

23.1 INTRODUZIONE

L'osservazione dei campioni al microscopio ottico rovesciato secondo il metodo di Utermöhl permette il riconoscimento a livello specifico di un numero limitato di taxa fitoplanctonici. Le caratteristiche morfologiche su cui si basa l'identificazione tassonomica a livello di genere e/o di specie in molti casi possono essere evidenziate soltanto attraverso l'osservazione al microscopio elettronico a scansione (SEM) e/o a trasmissione (TEM).

Tali caratteristiche morfologiche riguardano soprattutto la struttura della parete o del rivestimento cellulare che presenta una notevole varietà nei diversi gruppi tassonomici (dal frustulo siliceo delle diatomee alla complessa struttura dell'amphiesma nei dinoflagellati, ai rivestimenti costituiti da scaglie di diversa natura delle primnesiofitee e prasinofitee, alla pellicola delle euglenofitee, al periplasto delle criptofitee, etc). In considerazione della diversa natura e ultrastruttura dell'involucro cellulare, si rende opportuno, nella preparazione dei campioni per la microscopia elettronica, applicare tecniche differenti in funzione dei taxa di appartenenza degli individui da osservare.

La scelta dell'impiego del microscopio elettronico a scansione o a trasmissione è legata al tipo di struttura che si vuole osservare. Il SEM, pur avendo un potere di risoluzione inferiore rispetto al TEM, consente di ottenere immagini tridimensionali ed è quindi particolarmente utile per l'osservazione della superficie esterna di cellule intere quali la teca dei dinoflagellati, il frustulo delle diatomee o i coccoliti dei coccolitofori. Il TEM permette l'osservazione di campioni di spessore ridotto che si lasciano attraversare dal fascio di elettroni ed è quindi adatto all'osservazione di sezioni cellulari e di strutture molto sottili come i flagelli, le scaglie dell'involucro cellulare, i *vela* o i *septa* che occludono le areole delle valve e le bande del cingolo delle diatomee. In questi casi l'elevato potere di risoluzione consente di visualizzare dettagli morfologici importanti dal punto di vista tassonomico non visibili al SEM.

23.2 DIATOMEI

A livello morfologico la tassonomia delle diatomee si basa sulla struttura del frustulo che è il tipico rivestimento cellulare siliceo. Lo studio della morfologia del frustulo fino alla definizione dei dettagli più fini, che in molti casi è necessaria per l'identificazione tassonomica a livello di specie, richiede la rimozione della componente organica del frustulo e del protoplasma (pulizia dei frustuli). Sono stati sviluppati diversi metodi per la rimozione della materia organica che prevedono trattamenti più o meno energici del campione, a seconda che si desideri mantenere i frustuli integri e osservare la disposizione dei diversi elementi o separare valve e bande del cingolo per visualizzare anche i dettagli più fini. Le metodiche di pulitura consistono in un'applicazione sequenziale di miscele di acidi (o acqua ossigenata) fino a completa ossidazione della componente organica (vedi Capitolo 21). Il materiale pulito, simile ad una polverina biancastra, viene generalmente conservato in acqua bidistillata cui è stata aggiunta qualche goccia di acido acetico e formalina. Per una discussione e trattazione dei diversi metodi di pulizia anche in relazione alla microscopia elettronica, si può fare riferimento a Hasle (1978), Round *et al.* (1990), Hasle e Syversten (1997).

23.2.1 Microscopia elettronica a scansione

Per l'osservazione al SEM il materiale pulito va posto sugli appositi porta campioni (stubs), essiccato all'aria e metallizzato con oro, oro/palladio o platino.

Quando si vogliono ottenere immagini di cellule intere e di colonie, i campioni fissati e non puliti, o sottoposti a tecniche di pulizia più blanda (Round *et al.*, 1990) possono essere disidratati con il metodo del punto critico come indicato nella sezione "Dinoflagellati" e metallizzati con oro, oro/palladio o platino. Questo metodo tuttavia non dà sempre buoni risultati, in quanto la materia organica spesso impedisce l'osservazione della micromorfologia del frustulo. Esiste inoltre la possibilità, disponendo di un microscopio elettronico a scansione ambientale (Environmental Scanning Electron Microscope, ESEM), di osservare il campione tal quale. La perdita di risoluzione delle immagini può essere recuperata, almeno in buona parte, con l'utilizzo di sorgenti di elettroni differenti rispetto al tungsteno, per esempio con l'impiego dell'esaboruro di lantanio (LaB₆).

23.2.2 Microscopia elettronica a trasmissione

L'osservazione al TEM di campioni di diatomee permette di evidenziare forma, struttura e numero di elementi diagnostici quali pori, processi, spine, e prevede generalmente la pulizia dei frustuli. Per campioni non particolarmente ricchi e per specie molto delicate il materiale può essere osservato anche senza la loro pulizia, ottenendo immagini meno chiare ma spesso utili all'identificazione.

Per la preparazione del materiale, si seguono le seguenti fasi:

- porre una goccia di sospensione di materiale pulito e concentrato su un retino per microscopia elettronica (grid), coperto con un film di formvar e stabilizzato con carbonio;
- lasciare asciugare il retino.

Nel caso si usi un campione naturale o una coltura non pulita con acidi, sciacquare il retino con acqua distillata.

23.3 DINOFLAGELLATI

A livello morfologico la tassonomia dei dinoflagellati si basa essenzialmente sulla struttura dell'involucro cellulare, detto amphiesma, costituito dalla membrana plasmatica e da una serie di vescicole sottostanti, nelle quali si possono trovare placche di cellulosa (dinoflagellati tecati) o materiale in forma amorfa (dinoflagellati nudi). La microscopia elettronica a scansione è particolarmente adatta per ottenere immagini tridimensionali ad alto ingrandimento dell'involucro cellulare dei dinoflagellati.

23.3.1 Microscopia elettronica a scansione

La preparazione dei campioni di dinoflagellati per l'osservazione al SEM prevede diversi passaggi: fissazione dei campioni, disidratazione, essiccamento e metallizzazione.

La preparazione dei dinoflagellati tecati è relativamente semplice, in quanto le placche cellulosiche costituiscono una struttura rigida che viene ben preservata dai diversi fissativi. Nei dinoflagellati nudi invece l'amphiesma è molto più delicato, essendo formato soltanto da membrane, vescicole e materiale amorfo senza elementi rigidi che mantengano la forma della cellula. In questo caso tutte le diverse fasi elencate, dalla fissazione, alla disidratazione, all'essiccamento sono particolarmente delicate.

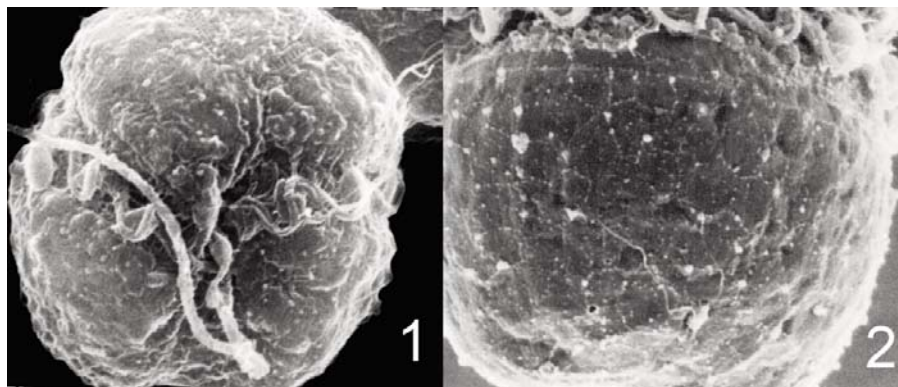
Di seguito viene illustrato il metodo largamente usato per campioni misti o da coltura. Un metodo alternativo prevede l'uso di un vetrino coprioggetto ricoperto di una sostanza adesiva, la poli-L-lisina, sul quale viene posto il campione o anche una singola cellula prelevata dal campione con una pipetta

(Takayama, 1985). I passaggi di disidratazione vengono eseguiti ponendo il vetrino nella serie di alcool e alla fine il vetrino viene montato sullo stub predisposto con scotch biadesivo. Botes *et al.* (2002) utilizzano questo metodo per dinoflagellati nudi piuttosto delicati, fissando con tetrossido di osmio (OsO_4) ed essiccando il campione con esametildisilazano (HMDS).

23.3.1.1. Fissazione

Le tecniche di fissazione per la microscopia elettronica differiscono per i dinoflagellati nudi e i dinoflagellati tecati.

Per i dinoflagellati nudi è importante preservare nel miglior modo possibile la struttura delle membrane che costituiscono l'involucro cellulare, in modo da visualizzare le vescicole dell'amphiesma e la loro disposizione, oltre che altre caratteristiche morfologiche come la forma del solco e del cingolo, l'acrobace, l'eventuale presenza di un peduncolo, la presenza di pori, etc. (Figg. 1 e 2). Le cellule vive provenienti da popolazioni naturali o da colture devono essere concentrate mediante una blanda centrifugazione (1000-1500 rpm) per pochi minuti e, dopo aver eliminato il soprannatante, fissate con OsO_4 all'1-2% disciolto direttamente in acqua di mare filtrata ($0,45 \mu\text{m}$) o in tampone cacodilato 0,1M a pH 7,4 per 15 minuti in ghiaccio. La fissazione con OsO_4 va effettuata sotto cappa con tutte le precauzioni necessarie, in quanto l'osmio è una sostanza altamente tossica. Il campione va lavato 2-3 volte in acqua distillata, centrifugando ed eliminando il soprannatante ad ogni passaggio.



Figg. 1 e 2 - *Gymnodinium chlorophorum* (cellule da popolazione naturale) fissate con OsO_4 .

Per i dinoflagellati tecati le metodiche di fissazione variano. Se si vogliono osservare le placche della teca, i campioni possono essere fissati con le stesse metodiche impiegate in microscopia ottica (formaldeide o Lugol). Pertanto possono essere analizzati al SEM anche campioni fissati, sempre che siano in buono stato di conservazione (Fig. 3). Nel caso si vogliano preservare i flagelli, le membrane esterne dell'amphiesma o eventuali rivestimenti esterni, si possono usare le metodiche di fissazione impiegate per i dinoflagellati nudi (vedi sopra). In questo caso la superficie cellulare sarà molto ben preservata, ma le placche cellulose potremmo risultare meno visibili in quanto ricoperte dalle membrane dell'amphiesma (Fig. 4).

Un caso particolare è rappresentato dai dinoflagellati che presentano placche molto sottili la cui visualizzazione può essere resa difficile dalle membrane esterne dell'amphiesma o dai loro residui (*Pfiesteria*) o hanno la teca ricoperta da abbondante materiale mucillaginoso (*Ostreopsis*). In questo caso è necessario un trattamento di *stripping*, che serve per rimuovere i materiali esterni che ricoprono le placche, eventualmente seguito da sonicazione. Lo *stripping* può essere ottenuto con vari metodi:

1. un detergente (Triton X-100) viene aggiunto direttamente al terreno di coltura in cui il campione sarà inoculato, al fine di prevenire la formazione del muco. Prima dell'osservazione, il campione va fissato in paraformaldeide al 4% in tampone cacodilato 0,1 M a pH 7,2 (Mason *et al.*, 2003).

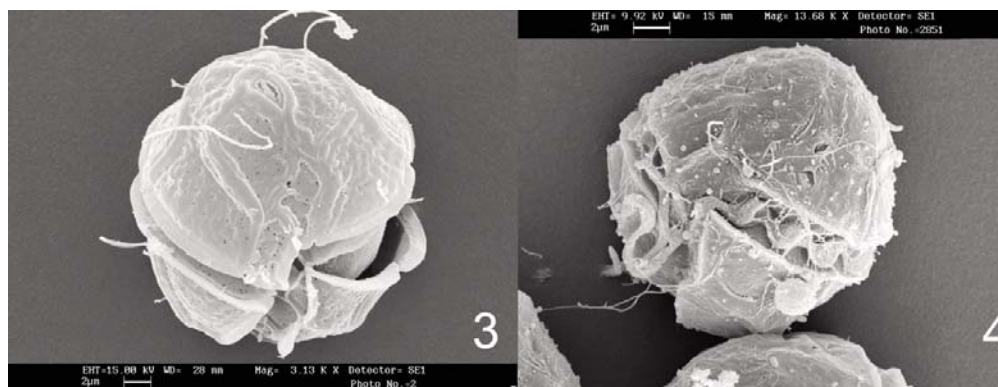


Fig. 3 - *Alexandrium minutum*: cellula di una popolazione naturale raccolta con retino e fissata con formaldeide.
 Fig. 4 - *Alexandrium lusitanicum*: cellula in coltura fissata con OsO₄.

- il campione viene trattato con HCl 1 M (6-8 μ l per 1 ml di campione), che viene lasciato agire per 5 minuti, quindi concentrato mediante centrifugazione a 1500 rpm per 3 minuti. Il supernatante viene rimosso con una pipetta e al campione concentrato si aggiunge glutaraldeide al 2% (2 ml per ml di campione) e si lascia agire per 40-45 minuti. Si procede quindi al risciacquo del campione dal fissativo, senza ricorrere alla centrifugazione che danneggerebbe le cellule: si toglie delicatamente il soprannatante e si aggiunge al campione acqua distillata; quindi il campione viene lasciato decantare per almeno 20 minuti al fine di ottenere la sedimentazione di tutte le cellule e il soprannatante viene rimosso. È opportuno ripetere i risciacqui per almeno 2-3 volte. Terminata questa prima serie di passaggi si può procedere alla disidratazione come descritto sotto.

23.3.1.2 Disidratazione

Dopo gli opportuni risciacqui, i campioni vanno sottoposti a disidratazione mediante una serie di passaggi in etanolo a diverse concentrazioni (10, 30, 50, 70, 80, 90, 95 e 100%). Tra un passaggio e l'altro il campione va concentrato mediante centrifugazione a 1000-1500 rpm per circa 3-5 minuti. In alternativa, se le cellule sono grandi e sedimentano facilmente, si consiglia di lasciarle decantare per almeno 30 minuti e togliere il soprannatante senza effettuare la centrifugazione; in questo modo è più facile preservare intere le cellule, anche se la perdita di materiale è superiore rispetto a quella che si avrebbe concentrando il campione per centrifugazione. L'ultimo passaggio, in etanolo anidro, va ripetuto 2-3 volte al fine di eliminare possibili tracce d'acqua. Ogni passaggio in alcol deve avere una durata di circa 30-40 minuti, in funzione della dimensione delle cellule. I campioni possono essere conservati in etanolo al 70% fino alla fase successiva. È comunque opportuno che, prima di passare all'essiccazione con il metodo del punto critico con l'impiego del Critical Point Dryer o all'aria, i campioni rimangano in etanolo anidro per circa 24 ore.

I lavaggi e la disidratazione possono essere effettuati anche adoperando un apparato di filtrazione su cui sono stati montati filtri Nuclepore (con pori di diametro adeguato alle dimensioni delle cellule da trattenere). Le cellule vanno concentrate, ad ogni passaggio, per filtrazione passiva o applicando una leggera depressione (Pickett-Heaps, 1998). In alternativa può essere utilizzato un porta filtri di plastica Swinnex (Millipore), in cui è inserito un filtro Nuclepore, del diametro di 13 mm che viene collegato ad una siringa di plastica a cui è stato tolto il pistone. I lavaggi e le disidratazioni vengono effettuate riempiendo la siringa di acqua distillata/alcol. Il porta filtri contenente il campione disidratato può essere conservato in etanolo anidro in un piccolo contenitore di plastica e può essere inserito nella camera del Critical Point Dryer per procedere con l'essiccazione. Questo metodo è consigliato soprattutto nei casi in cui si abbia a disposizione poco materiale.

23.3.1.3 Essiccazione e metallizzazione

Per poter osservare al SEM i campioni disidratati, occorre essicarli. L'essiccazione può essere fatta in vari modi: con il metodo del punto critico (CPD) in CO₂ liquida, o essiccando il campione con esametildisilazano (Botes *et al.*, 2002), o, nel caso di dinoflagellati con una teca molto resistente come *Ceratium*, *Dinophysis*, *Gonyaulax*, *Prorocentrum*, lasciando asciugare il campione all'aria. I campioni vanno poi montati sui supporti portacampioni (stubs) e metallizzati (sputter coated) con oro, oro/palladio o platino.

Il metodo del punto critico garantisce migliori risultati rispetto all'essiccazione all'aria, in quanto evita la deformazione delle cellule o delle parti più delicate di esse, e dovrebbe essere usato quando possibile. Occorre tener presente che durante il CPD può verificarsi perdita di materiale.

23.3.2 Microscopia elettronica a trasmissione

La microscopia elettronica a trasmissione è utile per visualizzare le scaglie che rivestono le cellule di specie appartenenti a diversi generi di dinoflagellati (*Heterocapsa*, *Oxyrrhis*, *Cachonina*, *Lepidodinium*, etc). In questo caso si effettuano preparazioni dirette di cellule intere con colorazione negativa (negative staining) o ombreggiatura (shadow-cast) come descritto nel paragrafo sui flagellati.

23.4 COCCOLITOFORI

Per l'osservazione di materiale da campioni naturali al SEM non è necessaria la disidratazione e l'essiccazione con il metodo del punto critico, in quanto la natura minerale e la conseguente struttura rigida dei coccoliti permettono di mantenere anche la forma della teca nella gran parte dei casi. È quindi sufficiente filtrare il campione, sciacquare e lasciare asciugare il filtro secondo i passaggi seguenti, che sono modificati a partire da quanto proposto da Cros e Fortuño (2002):

- porre in un porta filtri di plastica Swinnex (Millipore) un filtro Nuclepore a porosità 0,8-1 µm e di 13 mm di diametro. Per garantire una maggiore uniformità di distribuzione, necessaria se sui filtri si vuole anche effettuare il conteggio delle cellule, è opportuno montare un filtro di uguale diametro con porosità di 3 µm al di sotto di quello da 0,8 o da 1 µm;
- filtrare il campione naturale non fissato utilizzando una siringa da 10 ml. Nei casi di acque oligotrofiche, sarà necessario filtrare fino a 200 ml. In questo caso, staccare lo Swinnex, togliere lo stantuffo alla siringa, rimontare la siringa e filtrare il resto del campione 10 ml per volta. Si possono utilizzare siringhe di volume maggiore. In questo caso, la resistenza che si incontra nel premere lo stantuffo è molto più elevata;
- al termine della filtrazione, sciacquare riempiendo la siringa con 10 ml di acqua minerale naturale;
- aprire lo Swinnex, estrarre il filtro delicatamente con una pinzetta e porlo su uno stub da microscopia elettronica già predisposto con nastro biadesivo.
- lasciare asciugare il filtro;
- metallizzare con oro, oro/palladio o platino.

Nel corso di campagne oceanografiche gli stubs con i filtri, con opportune annotazioni di stazione, profondità e quantità filtrata, possono essere conservati in apposite scatole rettangolari (porta-stub), a loro volta riposte in contenitori sottovuoto fino al momento della metallizzazione.

23.5 FITOFLAGELLATI

Le tecniche riportate di seguito sono utili al riconoscimento di quelle specie flagellate non tectate provviste di scaglie (Prasinophyceae, Chrysophyceae, Prymnesiophyceae ad esclusione dei Coccolitofori),

che possono essere evidenziate con preparazioni dirette al microscopio elettronico mediante colorazione negativa (negative staining), impiegando come colorante l'acetato di uranile o con ombreggiatura (shadow-cast).

- Fissare il materiale aggiungendo, sotto cappa, poche gocce di una soluzione acquosa di OsO₄ al 5% a 10 ml di campione. Lasciare agire pochi minuti;
- centrifugare e rimuovere tutto il sovrantante;
- aggiungere acqua distillata e centrifugare di nuovo;
- con una pipetta a punta molto sottile, porre una goccia di materiale su un retino (grid) ricoperto di formvar o collodio e stabilizzato con carbonio e lasciare essiccare;
- sciacquare ripetutamente il retino in acqua distillata;
- lasciare asciugare il retino.

La fissazione e i successivi lavaggi possono essere effettuati direttamente sui retini (Moestrup e Thomsen, 1980) così come indicato di seguito:

- fissare i retini al margine di un vetrino portaoggetto mediante nastro adesivo a doppia faccia;
- centrifugare il materiale, prelevarne una goccia con una micropipetta e porla sul retino;
- porre una goccia di soluzione di OsO₄ al 5% nel coperchio di una capsula Petri e capovolgere il coperchio sul vetrino, così da esporre il retino ai vapori di osmio, per 30 secondi. Agire sotto cappa;
- agendo sempre sotto cappa, lasciare evaporare l'acqua e lavare ripetutamente il retino con acqua distillata per eliminare i sali contenuti nell'acqua di mare;
- lasciare asciugare il retino.

A questo punto i grids possono essere contrastati col metodo della colorazione negativa immergendoli per 3 minuti in una soluzione acquosa di acetato di uranile e lasciando asciugare. Lavando in acqua distillata i retini e lasciandoli asciugare si ottiene invece una colorazione positiva.

In alternativa, possono essere trattati con la tecnica dello "shadow-cast" ombreggiando con oro/palladio con un angolo di circa 20°.

Nel caso si abbia a disposizione materiale di coltura piuttosto ricco, per evidenziare i peli flagellari delle Prasinophyceae ma anche per altre strutture delicate, si può utilizzare il metodo messo a punto da Marin e Melkonian (1994), nel quale anche la fissazione avviene direttamente sul retino:

- fissare i retini al margine di un vetrino portaoggetto mediante nastro biadesivo;
- sotto cappa, porre sul retino 4 µl di glutaraldeide al 5% (in acqua di mare o mezzo di coltura);
- aggiungere sullo stesso retino 4 µl della coltura se sufficientemente ricca, ovvero centrifugare se necessario;
- dopo 5 minuti, rimuovere il liquido dal retino con il vertice di un triangolo di carta da filtro e contrastare il materiale aggiungendo subito 4 µl di acqua distillata e 4 µl di soluzione acquosa di acetato di uranile al 2%;
- dopo 90 secondi, rimuovere il liquido con carta da filtro pulita e lavare una volta con acqua distillata, aggiungendola direttamente sul retino (8 µl) e rimuovendola con carta da filtro pulita. Omettendo questo passaggio si ottiene una colorazione negativa.

In alternativa, possono essere trattati con la tecnica dello "shadow-cast" ombreggiando con oro/palladio con un angolo di circa 20°.

23.6 BIBLIOGRAFIA

- BOTES L.B., PRICE M., WALDRON G., PITCHER C. (2002) - A simple and rapid scanning electron microscope preparative technique for delicate gymnodinoid dinoflagellates. *Microsc. Res. Techniq.*, **59**: 128-130.
- CROS L., FORTUÑO J.-M. (2002) - Atlas of northwestern Mediterranean coccolithophores. *Scientia Marina*, **66**(1): 7-182.
- HASLE G.R. (1978) - Diatoms. In: Sournia A. (ed.), *Phytoplankton Manual*. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology, No. 6, Paris: 136-142.

-
- HASLE G.R., SYVERSTEN E.E. (1997) - Marine diatoms. In: Tomas C.R. (ed.), *Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates*, Academic Press, San Diego: 5–385.
- MARIN B., MELKONIAN M. (1994) - Flagellar hairs in prasinophytes (Chlorophyta): ultrastructure and distribution on the flagellar surface. *J. Phycol.*, **30**: 659-678.
- MASON P.L., VOGELBEIN W.K., HAAS L.W., SHIELDS J.D. (2003) - An improved stripping technique for lightly armored dinoflagellates. *J. Phycol.*, **39**: 253-258.
- MOESTRUP Ø., THOMSEN H.A. (1980) - Preparation of shadow-cast whole mounts. In: Gantt E. (ed.), *Handbook of Phycological Methods. Developmental and Cytological Methods*, Cambridge University Press, Cambridge: 385-390.
- PICKETT-HEAPS J.D. (1998) - A rapid, highly efficient method for collecting, fixing and embedding planktonic and other small cells for electron microscopy. *J. Phycol.*, **34**: 1088-1089.
- ROUND F.E., CRAWFORD R.M, MANN D.G. (1990) - *Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press: 747 pp.
- TAKAYAMA H. (1985) - Apical grooves of unarmored dinoflagellates. *Bull. Plankton Soc. Jap.*, **32**: 129-140.

CAPITOLO 24. ISOLAMENTO E METODI DI COLTURA DI MICROALGHE E CIANOBATTERI

R. Pistocchi, F. Guerrini, A. Beran, C. Caroppo, A. Penna, R. Siano

rossella.pistocchi@unibo.it

24.1 INTRODUZIONE

Questo capitolo tratta dell'isolamento e dell'allestimento di colture di microalghe e di cianobatteri marini. Ci si riferisce in particolar modo a colture di tipo *batch*, cioè colture di piccolo-medio volume allestite in un ambiente chiuso in cui, dopo l'allestimento iniziale, non avvengono ulteriori manipolazioni. In questo sistema le alghe crescono con il tipico andamento rappresentato dalle 4 fasi: *lag*, esponenziale, stazionaria e di declino. A partire da una coltura in fase esponenziale o stazionaria se ne può allestire una nuova prendendo un inoculo e ponendolo in terreno di coltura fresco. Le condizioni in cui gli organismi vengono fatti crescere sono artificiali e generalmente molto diverse dall'ambiente di origine, tuttavia il fatto che le colture siano costituite da un'unica specie, rappresentata solitamente da una popolazione clonale e all'occorrenza axenica, permette applicazioni che non sarebbero possibili con le popolazioni naturali.

In coltura è possibile studiare caratteristiche cellulari quali il tipo di pigmenti presenti, i prodotti di riserva, il contenuto in acidi nucleici, il profilo delle tossine, il rilascio di polisaccaridi, l'ultrastruttura cellulare e la genetica oltre che caratteristiche fisiologiche quali il ciclo vitale e, con buona approssimazione, anche la velocità di crescita in risposta a diversi fattori ambientali; per le alghe tossiche è possibile ottenere informazioni utili alla comprensione della dinamica di produzione delle tossine in risposta alle fluttuazioni dell'ambiente. Le alghe sono ampiamente utilizzate anche per produrre sostanze utili all'uomo. Le colture di dimensioni ridotte rappresentano uno strumento utile per lo *screening* delle sostanze prodotte e per la messa a punto dei metodi colturali mentre lo scopo della produzione viene raggiunto tramite colture su larga scala.

La maggior parte dei metodi presentati in questo capitolo sono comuni a microalghe e cianobatteri, fa eccezione la fase iniziale di isolamento che viene pertanto riportata in paragrafi distinti per le due categorie di organismi.

24.2 EQUIPAGGIAMENTO

Per la coltivazione di microalghe e cianobatteri sono necessarie le attrezzature tipiche di un laboratorio di microbiologia quali cappa sterile, autoclave, armadi o camere climatizzate provvisti di illuminazione e temperatura programmabili. A seconda delle dimensioni delle microalghe sono poi indispensabili uno stereomicroscopio, un microscopio invertito o un microscopio diritto.

Tutti i contenitori, provette e tubi usati per colture e terreni devono essere selezionati con cura evitando materiali potenzialmente tossici.

I materiali consigliati sono: vetro in borosilicato, teflon (PTFE, PFA, FEP), policarbonato (PC) e polistirene (PS). Per piccoli volumi, per esempio per conservare le vitamine in congelatore, sono utili contenitori di polipropilene (PP) tipo Eppendorf. Per eventuali collegamenti si consiglia l'uso esclusivo di tubature di silicone: la gomma, infatti, rilascia sostanze che possono risultare tossiche e si indurisce dopo poco tempo.

Per l'isolamento si consigliano piastre *multiwell* sterili da 24 o 12 pozzetti in PS. Per colture di mantenimento si usano provette sterili (PS, borosilicato) di diversa grandezza (16x120 mm o 20x150 mm)

e beute Erlenmeyer (borosilicato, PC) da 125 ml chiuse con tappi di cotone. Per volumi maggiori possono essere usate beute Erlenmeyer (PC, borosilicato) di grandezza da 250 ml a 2 l; in questo caso poichè l'interfaccia liquido/aria deve essere ampia, si possono aggiungere ad esempio volumi di 100 ml di liquido in un contenitore da 250 ml o di 1 l in uno da 2 l. Per la preparazione dei terreni si consiglia l'uso di bottiglie in teflon (FEP) per gli organismi sensibili, ma anche l'uso di beute di borosilicato dà buoni risultati.

Per la preparazione dell'acqua di base utilizzata per i terreni di coltura, l'acqua di mare naturale deve essere filtrata. Si possono usare filtri a membrana con porosità di 0,45 µm o in fibra di vetro GF/F della Whatman. Più affidabili sono i filtri Durapore HV (0,45 µm) o GV (0,22 µm) della Millipore in PVDF idrofilo. Per la filtrazione di pochi litri bastano filtri di un diametro di 47 mm con filtrazione sottovuoto. Per volumi più grandi si raccomanda l'uso di una pompa peristaltica in combinazione con una rampa filtrante di un diametro di 142 mm, eventualmente con prefiltro di profondità in fibra di vetro. La rampa filtrante può essere di acciaio inox, ma per la coltura di organismi delicati è meglio un modello in cui tutte le parti, che entrano in contatto con l'acqua marina, siano in teflon (PTFE), dato che l'acqua marina riesce ad aggredire anche l'acciaio inox. Un'opzione alternativa alla rampa filtrante può essere l'uso di una cartuccia filtrante (per esempio: AcroPak™ 400, porosità 0,2 µm della Pall). Per la filtrazione di piccole quantità di terreni o soluzioni, fino a 100 ml, si raccomandano filtri monouso sterili per siringa. Tutti i materiali filtranti devono essere pirogene *free*.

24.3 STERILIZZAZIONE

Il mantenimento di organismi vivi in coltura richiede che l'equipaggiamento e le soluzioni da utilizzare siano sterili e che vengano manipolati sotto cappa sterile. Queste precauzioni permettono di evitare contaminazioni da parte di microorganismi indesiderati che potrebbero determinare il deterioramento della coltura o una certa variabilità nei risultati. I metodi di sterilizzazione sono vari e di seguito vengono riportati quelli più utilizzati.

24.3.1 Sterilizzazione termica

La sterilizzazione termica è il metodo più sicuro e praticabile per l'eliminazione di spore, funghi, batteri e virus. La sterilizzazione con aria calda asciutta è adatta per vetro e per contenitori di teflon (PFA, PTFE). Per una sterilizzazione soddisfacente con aria calda asciutta bisogna esporre il materiale alla temperatura di 180 °C per 30 minuti. Per la sterilizzazione a vapore è necessario l'uso di un'autoclave che, operando alla pressione di un'atmosfera, permette di raggiungere 121 °C; il tempo di sterilizzazione necessario in queste condizioni è di 15 minuti. È adatta per vetro, teflon (PTFE, PFA, FEP), tubi di silicone e contenitori di PC ma si deve fare attenzione in quanto il PC diventa friabile dopo alcuni cicli di autoclave.

Per ottenere risultati affidabili sono importanti le seguenti considerazioni.

Il tempo di sterilizzazione di 15 minuti è sufficiente solo se l'interno dell'autoclave è riempito di vapore senza residui di aria e se le superfici da sterilizzare possono essere completamente raggiunte dal vapore. In caso contrario valgono le regole per la sterilizzazione ad aria asciutta. Il tempo di sterilizzazione non deve essere calcolato a partire dal momento in cui l'interno dell'autoclave ha raggiunto la temperatura di 121 °C, ma solo quando il materiale stesso da sterilizzare ha raggiunto questa temperatura. Per questo bisogna aggiungere i tempi necessari per il riscaldamento del materiale, che variano a seconda di quello che si vuole sterilizzare.

Alcuni valori empirici per soluzioni acquose sono:

- provette di vetro con 10 ml di liquido - tempo da aggiungere 0 min;
- contenitori di vetro con 100 ml - tempo da aggiungere 10 min;

-
- contenitori di vetro con 500 ml - tempo da aggiungere 20 min;
 - contenitori di vetro con 1 l - tempo da aggiungere 25 min.

I tempi possono variare a seconda della posizione del materiale nell'autoclave, dello spessore e del materiale dei contenitori. Il nastro adesivo che cambia colore quando il materiale dovrebbe essere sterile, posto all'esterno del contenitore, ha una pura funzione decorativa su una beuta riempita con 2 l di liquido, dato che può rilevare solo la temperatura superficiale. Se possibile, si consiglia per quantità e contenitori nuovi di fare test preliminari con il sensore dell'autoclave all'interno del contenitore.

24.3.2 Sterilizzazione con raggi ad alta energia

L'uso di raggi ad alta energia in un laboratorio si limita normalmente all'uso della cappa sterile con i raggi UV. Articoli di plastica monouso pre-sterilizzati come piastre di PS o filtri per siringa sono normalmente sterilizzati con raggi gamma. Si sconsiglia l'uso di materiale disinfettato con agenti chimici.

24.3.3 Eliminazione di batteri per filtrazione

Con la cosiddetta "filtrazione sterile", effettuata usando filtri con una porosità di 0,2 μm , si possono eliminare quasi tutti i batteri (solo pochi vibrioni riescono a passare). È importante tenere presente che questa tecnica non serve a eliminare i virus. Nonostante ciò tale sistema può essere utile per la sterilizzazione di soluzioni di sostanze sensibili al calore, come per esempio le vitamine.

24.4 ISOLAMENTO DI MICROALGHE

Al momento del campionamento l'acqua contenente il fitoplancton viene trasferita direttamente dalla bottiglia Niskin in bottiglie di plastica scura, per evitare che la luce danneggi le cellule. Tali bottiglie vengono conservate al fresco e al buio in contenitori termici o anche avvolgendoli in carta bagnata fino all'arrivo in laboratorio.

L'isolamento delle alghe deve essere effettuato nel più breve tempo possibile dopo il prelievo del campione in mare; si deve tener presente però che a volte l'insuccesso nell'allestimento di una coltura può dipendere anche dalle condizioni endogene dell'organismo, non ottimali al momento del prelievo.

Dopo il campionamento, i pretrattamenti più frequenti consistono nella concentrazione del campione su retini di nylon, nel caso in cui l'abbondanza della specie target nell'acqua in esame non sia ottimale, o nella diluizione con acqua di mare alla stessa salinità, se gli organismi presenti sono troppi. L'isolamento viene solitamente condotto utilizzando un microscopio ottico rovesciato.

Esistono vari metodi di isolamento, i più comuni sono l'isolamento di singole cellule con micropipetta e il metodo di diluizione seriale.

24.4.1 Isolamento con micropipetta

Una goccia di campione, contenente la specie da isolare, viene posta al centro di una piastra Petri (con diametro di 5 cm) o di un vetrino provvisto di più incavi. Attorno o di fianco vengono poste altre gocce di acqua di mare sterile che serviranno per il "lavaggio" delle cellule da organismi indesiderati. Per prelevare la specie di interesse di solito si usa una pipetta Pasteur, sterile e con filtro, la cui punta viene tirata in seguito a riscaldamento su fiamma: si tiene la pipetta in una mano e nell'altra si tiene una pinza con cui si prende la punta, si gira la pipetta sulla fiamma e appena si sente che il vetro si ammorbidisce si usa la pinza per tirare la punta togliendola allo stesso tempo dalla fiamma, quindi si

usano ancora le pinze per rompere la parte più estrema che potrebbe essersi chiusa. Per aspirare le cellule, si possono collegare alla pipetta apparati per aspirazione, quali bulbi di gomma o propipette di plastica rigida, avendo l'accortezza di tenerli in pressione mentre la pipetta viene immersa nell'acqua e di eliminare tale pressione solo quando la punta si trova vicina alla cellula che si vuole aspirare; in questo modo l'acqua non entra nella pipetta, quindi, servendosi del microscopio, si inquadra la cellula da isolare e quando la punta le si trova molto vicino, si rilascia la pressione favorendo la salita della cellula per capillarità. In alternativa si può aspirare con la bocca, collegando alla pipetta un sottile tubo di silicone e inserendo all'altra estremità del tubo un supporto di plastica da usare come imboccatura; tale supporto può consistere, semplicemente, in una punta per micropipetta da 1000 µl. In questo caso, per prelevare la cellula, l'operatore copre con la lingua l'apertura dell'imboccatura e la toglie quando la cellula è stata inquadrata.

Dopo aver prelevato la cellula con qualsivoglia metodo, la pipetta viene rimossa e, tramite lieve pressione o soffio, si permette il rilascio del suo contenuto in una delle gocce sterili circostanti.

La cellula viene nuovamente prelevata dalla goccia sterile e posta in un'altra goccia, utilizzando pipette pulite, fino a che l'osservazione al microscopio evidenzia che non vi siano più cellule indesiderate. Nell'ultimo passaggio la cellula viene posta all'interno di piastre *multiwell* a 24 pozzetti riempiti in precedenza con 1 ml circa di terreno di coltura. Dopo aver eseguito un certo numero di isolamenti (in genere è meglio eseguirne diversi per la stessa specie) la piastra viene chiusa con parafilm e posta nella camera termostatica. Nei giorni successivi si controlla se la cellula si sia divisa, ponendo la piastra direttamente sotto al microscopio ottico invertito. Quando le cellule hanno raggiunto una certa densità si possono trasferire in piccole bottiglie per colture o beute ingrandendo un po' alla volta le colture.

24.4.2 Isolamento tramite diluizione seriale

Il metodo delle colture di diluizione seriale (SDC: Serial Dilution Culture, vedi Capitolo 22) può essere utilizzato per l'allestimento di colture monospecifiche di specie microalgali di piccole dimensioni che possono essere facilmente danneggiate dai ripetuti isolamenti con micropipetta, necessari per allestire una coltura. Nel caso di specie presenti con densità più elevate rispetto ad altre nel campione iniziale, ovvero specie che hanno un tasso di crescita più elevato, il metodo consente di ottenere, nelle ultime diluizioni, colture monospecifiche. Diversamente, si otterranno colture miste dalle quali sarà comunque più facile ottenere colture monospecifiche attraverso ulteriori diluizioni o per isolamento. Si precisa, però, che per ottenere una coltura monoclonale è comunque necessario procedere all'isolamento di una singola cellula.

Nel caso si utilizzino per le diluizioni piastre con pozzetti al posto dei tubi, è possibile controllare la crescita direttamente al microscopio invertito. Il metodo delle colture di diluizione seriale in piastra ha però alcune limitazioni. Le specie osservate possono rappresentare solo una frazione delle specie originariamente presenti nel campione in quanto vari fattori (presenza di predatori o virus, presenza/assenza di specie competitive, diversa velocità di crescita) possono impedire la crescita di determinate specie nei pozzetti.

Utilizzando una pipetta graduata o una pipetta automatica, si pone 1 ml di terreno di coltura in ciascun pozzetto di una piastra per colture da 24 pozzetti. Si marcano le file di pozzetti della piastra con le relative diluizioni (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5}) mentre le colonne (A, B, C e D) conterranno le repliche delle rispettive diluizioni. Quindi si procede con le seguenti operazioni:

- Si riempiono 4 provette di plastica da 15 ml con 12 ml di terreno di coltura.
- Si agita dolcemente il campione di fitoplancton per permetterne l'omogeneizzazione e si utilizza un'aliquota per sciacquare 2 volte una siringa da 10 ml (senza ago). Si riempie con decisione la siringa con 10 ml di campione, evitando la formazione di bolle d'aria; la scelta di siringhe con posizione eccentrica del beccuccio faciliterà l'omogeneizzazione del campione durante l'aspirazione. Se si dovessero formare bolle, va facilitata la loro uscita capovolgendo la siringa.

- Si elimina 1 ml di campione dalla siringa e successivamente si aggiunge 1 ml di campione a ciascuno dei 4 pozzetti della prima colonna della piastra (colonna 10^{-1}). Si procede all'eliminazione di 4 dei 5 ml di campione residui, lasciando 1 ml nella siringa.
- Si riempie la siringa con 9 ml di terreno prelevandolo da una delle provette. A tale scopo, è bene bloccare con la mano sinistra la siringa sul collo della provetta e aspirare con decisione con la destra, tenendo la provetta inclinata o quasi capovolta al di sopra della siringa. Si eliminano le bolle di aria che eventualmente si sono formate.
- Si elimina 1 ml di campione dalla siringa e successivamente si riempie ciascun pozzetto della seconda colonna della piastra (colonna 10^{-2}) con 1 ml del campione.
- Si scarta il volume di campione rimanente, lasciando 1 ml di campione nella siringa. Si riempie la siringa con 9 ml di terreno prelevandolo dalla seconda provetta di plastica precedentemente preparata.

L'operazione viene ripetuta per tutte le rimanenti diluizioni.

In seguito si controlla la crescita nei pozzetti al microscopio ottico invertito, tenendo conto del fatto che nel tempo specie diverse possono diventare più abbondanti e prendere il sopravvento. Nel caso in cui si voglia ottenere colture monospecifiche da colture miste si individua la fase della coltura in cui la specie di interesse sia più abbondante e si effettuano diluizioni calibrate in base alla sua abbondanza.

24.5 ISOLAMENTO DI CIANOBATTERI

I campionamenti dell'acqua da cui isolare i cianobatteri si realizzano mediante un campionatore batteriologico tipo Niskin. Qualora ciò non fosse possibile, si può utilizzare un campionatore normale, sciacquato ripetutamente, prima dell'uso, con acido diluito e quindi con acqua distillata sterile (Sieburth, 1979). Il volume di campione da prelevare dipende dalle caratteristiche trofiche dell'ambiente in cui si opera, tuttavia in ambiente costiero mesotrofico un volume di 2 l di acqua è sufficiente per poter realizzare una buona raccolta di materiale, rappresentativa dei popolamenti di cianobatteri dell'ambiente naturale.

I campioni, appena raccolti, si versano in bottiglie di vetro o di policarbonato sterili che si dispongono al buio ed al fresco (circa 4 °C) fino al momento della filtrazione che deve avvenire in laboratorio, in tempi molto brevi. Ovviamente anche le procedure di seguito descritte ed i materiali utilizzati devono trovarsi in condizioni di sterilità per evitare contaminazioni di microrganismi provenienti dall'ambiente esterno.

In laboratorio si procede all'isolamento dei cianobatteri filtrando il campione mediante un filtro sterile Millipore con porosità di 0,2 μm . I cianobatteri si concentreranno sulla superficie della membrana filtrante che verrà posta in una piastra Petri del diametro di 5 cm. Si aggiungono 5 ml di acqua di mare, filtrata a 0,2 μm , e si procede grattando il materiale concentrato sul filtro tramite un'ansa sterile. Il campione derivato da tale operazione rappresenterà il concentrato del plancton contenuto nel volume iniziale e verrà quindi posto in una provetta sterile.

A questo punto si procede con la messa in coltura dei ceppi isolati. Generalmente i cianobatteri marini planctonici (es. *Synechococcus* spp.) crescono meglio in terreno liquido, tuttavia nelle prime fasi dell'isolamento si utilizza anche terreno solido per poter realizzare una migliore separazione dei singoli ceppi.

24.5.1 Messa in coltura su terreno liquido

Considerando la provetta contenente circa 6 ml di concentrato, si procede con le seguenti operazioni, ognuna delle quali viene ripetuta in tre repliche:

Si preleva 1 ml di concentrato e si aggiungono 9 ml di terreno di coltura in una provetta sterile (concentrazione 10^{-1})

Dalla provetta a concentrazione 10^{-1} si preleva 1 ml di coltura e si aggiungono 9 ml di terreno nella seconda serie di tre provette (concentrazione 10^{-2})

L'operazione si ripete fino ad arrivare ad una concentrazione della coltura pari a 10^{-5} .

Le provette si dispongono in un incubatore e si controlla la crescita dei ceppi.

24.5.2 Messa in coltura su terreno solido

Dalla provetta contenente il concentrato e da quelle contenenti le diluizioni decimali, si preleva 1 ml di campione che si semina sul terreno solido, preparato in precedenza aggiungendo 10 ml di agar (20 g l^{-1}) a 10 ml di terreno di coltura a concentrazione doppia. Anche in questo caso si realizzano 3 repliche delle semine. Al termine di ciascuna semina, favorita mediante l'utilizzo di 5-6 palline di vetro sterili, si ripete il rimescolamento più volte, quindi, quando la piastra appare asciutta si chiude con il parafilm e si pone nella camera termostatica.

24.5.3 Colture monospecifiche

Nel momento in cui le colonie si accrescono, sia su terreno solido sia su terreno liquido, occorre procedere all'isolamento delle singole specie. Questa operazione si realizza utilizzando preferibilmente le colture che si sono accresciute su terreno solido, poiché facilmente distinguibili le une dalle altre.

Se si utilizza il campione cresciuto nel terreno liquido, dal momento che conterrà specie che non sono cresciute nel terreno solido, si preleva il 'groviglio' di colonie che si sarà sviluppato, si sciacqua con acqua di mare sterile e si semina su piastra in modo da isolare le varie componenti.

In molti casi si renderanno necessari diversi passaggi per poter ottenere una coltura monospecifica; tecniche alternative suggerite per poter effettuare questa operazione sono rappresentate da:

- aumento dell'irradiazione luminosa (le specie caratterizzate da colorazione rosa/rossa sono più sensibili alla luce);
- aumento della salinità, in seguito all'aggiunta all'acqua di mare (S= 36-37) di 30 g l^{-1} di NaCl;
- modifiche alla composizione del terreno di coltura.

24.6 TERRENI DI COLTURA

I terreni di coltura per microalghe e cianobatteri possono essere basati su acqua di mare naturale o sintetica e preparati aggiungendo nutrienti, sotto forma chimica di sali, oppure estratti di suolo. I terreni basati su acqua di mare sintetica sono scarsamente impiegati in quanto non consentono la crescita di varie specie algali, probabilmente per l'assenza di qualche elemento chimico necessario. Sono tuttavia necessari per effettuare studi sull'effetto dei metalli nella crescita delle alghe; per la loro composizione si rimanda a Sunda *et al.* (2005) mentre nella sezione seguente si riportano metodiche che si riferiscono a terreni formulati a partire da acqua di mare naturale.

L'acqua di mare deve essere prelevata al largo per evitare la presenza di inquinanti, di elevate quantità di nutrienti e di materiale in sospensione. Dopo il prelievo, l'acqua deve essere filtrata come precedentemente riportato e conservata al fresco e al buio; al momento dell'uso si sterilizza in autoclave e si lascia riposare per 24 h prima di procedere alla preparazione del terreno.

24.6.1 Soluzioni stock

Le soluzioni stock sono solitamente preparate in base ai tipi di terreni da utilizzare e in concentrazioni adatte ai volumi che si preparano di routine. Per quest'ultimo aspetto è importante verificare che nelle

preparazioni dei terreni a base di acqua di mare l'aggiunta dei nutrienti dalle soluzioni stock non alteri significativamente la salinità del mezzo. Molti sali sono sufficientemente solubili per permettere una diluizione della soluzione stock di 500-1000 volte. Alcuni sali sono altamente igroscopici ed altri sono difficile da pesare. La concentrazione di alcune soluzioni stock è molto bassa, come per esempio quella di alcuni metalli in traccia e delle vitamine, per cui è meglio preparare delle soluzioni stock primarie, ovvero più concentrate, da cui poi si prepara per diluizione la soluzione stock definitiva (*working solution*) da utilizzare nella preparazione del terreno. Generalmente per evitare fenomeni di precipitazione, la quantità di sale richiesta va sciolta utilizzando l'80-90% del volume finale di acqua distillata; quindi si scioglie il sale per agitazione, dopo completa dissoluzione si porta, se necessario, a pH adeguato e a volume finale in cilindri graduati. Nelle preparazioni di soluzioni stock contenenti una miscela di composti si scioglie ciascun sale singolarmente in un volume minimo di acqua; quindi si combinano insieme le soluzioni dei singoli sali e infine la miscela si porta a volume finale. Le soluzioni stock vanno conservate in bottiglie di vetro o plastica a +4 °C. Alcuni sali non vengono preparati come soluzioni stock a causa della loro bassa solubilità, tra cui NaCl, MgSO₄, KCl, e Na₂SO₄. Per qualsiasi tipo di terreno arricchito in acqua di mare sono richiesti essenzialmente alcuni nutrienti base, definiti come macronutrienti e micronutrienti o metalli in traccia.

24.6.2 Macronutrienti

I macronutrienti sono generalmente l'azoto, il fosforo e, in alcuni casi, il silicio. Questi nutrienti sono generalmente richiesti dal fitoplancton in un rapporto molare di 16N:16Si:1P, anche se i terreni di coltura più utilizzati come il "medium f/2" (Guillard, 1975), hanno un rapporto N:P>16:1, determinando una limitazione da fosforo nella fase di senescenza della coltura.

L'azoto viene prevalentemente aggiunto come sale inorganico NaNO₃, ma a volte è sostituito o implementato con NH₄Cl; il fosforo viene utilizzato come NaHPO₄•H₂O oppure nella forma organica di sodio glicerofosfato; il silicio è richiesto solo per diatomee, silicoflagellati e alcune crisofite, e viene aggiunto in forma di sodio metasilicato (Na₂SiO₃•9H₂O). Un esempio delle quantità utilizzate nel terreno f/2 sono riportate in Tab. 1.

Per ottenere condizioni di crescita selettive si può agire sul tipo e sulla concentrazione dei macronutrienti aggiunti oppure possono essere impiegati trattamenti fisici e chimici che influenzano in modo differente la crescita delle diverse specie algali. Lo sviluppo nella coltura di diatomee e, presumibilmente, di silicoflagellati può essere inibito omettendo il silicio nel terreno e incubando in contenitori di policarbonato; se il campione naturale di acqua di mare, contenente le specie di interesse da selezionare e far crescere, contiene elevate concentrazioni di silicio si può aggiungere il germanio (GeO₂) a concentrazioni di 10⁻⁵-10⁻⁴ M che inibisce la crescita di diatomee non desiderate.

L'aggiunta di forme ridotte dell'azoto, come l'ammonio (NH₄Cl), a determinate concentrazioni (≤ 25 μM) può favorire la selezione di alcune specie algali, mentre ad elevate concentrazioni (da 100 μM a 250 μM) può risultare tossico per alcune specie costiere; tuttavia è stato osservato che la maggior parte delle specie tollera livelli di ammonio fino a 1000 μM. A pH 8,2, l'ammonio si trova circa al 90% nella forma NH₄⁺ e al 10% nella forma NH₃. Essendo l'NH₃ volatile, considerevoli quantità possono perdersi per evaporazione durante la sterilizzazione in autoclave; pertanto l'ammonio, in forma di NH₄Cl, dovrebbe essere aggiunto sterilmente al terreno dopo l'autoclave. Se il terreno richiede urea si deve tener presente che tale composto può decomporsi con il calore, quindi deve essere aggiunto per filtrazione sterile dopo la sterilizzazione dell'acqua in autoclave. L'aggiunta di amminoacidi, quali glutammato, arginina, asparagina o altre forme di azoto organico risulta molto efficace per la crescita selezionata di alcune specie algali.

La presenza di silicio facilita la formazione di precipitati, quindi viene omesso dal terreno se le alghe non lo richiedono per la crescita. La soluzione stock del silicio (fino a 100 mM) va conservata al buio a +4 °C, a pH di ~ 12,6, ed è raccomandabile aggiungere lentamente la quantità necessaria di silicio stock al volume di terreno, agitando la soluzione per evitare la precipitazione del sale. È consigliabile sterilizzare la soluzione stock del silicio in bottiglie di teflon.

Tab. 1 - Composizione dei macronutrienti nel terreno f/2.

Componenti	Soluzione stock (g l ⁻¹)	Quantità usata (l ⁻¹)	Concentrazione finale nel terreno (M)
NaNO ₃	75	1 ml	8,82 • 10 ⁻⁴
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	5	1 ml	3,62 • 10 ⁻⁵
Na ₂ SiO ₃ • 9H ₂ O	30	1 ml	1,06 • 10 ⁻⁴

24.6.3 Metalli in traccia

I metalli comunemente usati nei terreni, in concentrazioni molto basse, sono lo zinco, il manganese, il molibdeno, il cobalto, il rame, il ferro, il selenio, il nickel, il vanadio e il cromo. Questi elementi svolgono un importante ruolo nell'accrescimento del fitoplancton in quanto costituiscono i micronutrienti o elementi in traccia e svolgono ruoli differenti nelle vie metaboliche della cellula algale: il ferro è necessario nel sistema di trasporto degli elettroni del processo di fotosintesi e di respirazione, nella solfato-riduzione, nella fissazione di N₂; il manganese è un componente essenziale nell'apparato fotosintetico; lo zinco è presente nell'enzima anidrasi carbonica; mentre il rame è essenziale per la funzione dell'enzima citocromo ossidasi. Molti metalli come lo zinco, il rame e il cobalto sono tossici ad elevate concentrazioni, ed il ferro forma composti insolubili che precipitano, rendendosi non disponibili per le alghe. Inoltre, questi precipitati del ferro adsorbono altri metalli abbassando il loro grado di biodisponibilità. Per ovviare a questi problemi i metalli vengono miscelati con chelanti sintetici, quali l'EDTA (acido etilendiaminotetraacetico) che complessa gli ioni metallici (ad es. Cu⁺⁺ + EDTA ↔ CuEDTA). Il complesso dello ione chelato risultante non è soggetto alla formazione di precipitati né è biodisponibile per le specie algali. Ma quando le forme degli ioni metallici non chelati sono assorbite dalle alghe durante le fasi esponenziali di crescita in coltura, vengono immediatamente rimpiazzati dalla dissociazione di una equivalente concentrazione del metallo chelato. La complessazione con EDTA pertanto ha la funzione di tamponare la concentrazione dello ione metallico regolando la sua disponibilità nel terreno di coltura. I metalli in traccia sono preparati come soluzioni stock primarie ad elevate concentrazioni per permettere di pesare quantità soddisfacenti, poi sono utilizzate per ottenere la *working solution*, ovvero quella utilizzata per fare il terreno. Come per le soluzioni stock dei macronutrienti, le soluzioni stock degli elementi in traccia vanno preparate in acqua distillata. Successivamente, la soluzione stock di lavoro viene preparata sciogliendo in 900 ml di acqua distillata le quantità necessarie di Na₂EDTA•2H₂O e di ferro (sotto forma di FeCl₃•6H₂O o Fe-Na-EDTA•3H₂O o FeSO₄•7H₂O o Fe(NH₄)₂(SO₄)₂•6H₂O) e 1 ml di ciascuna soluzione stock primaria degli altri elementi; infine si porta a volume di 1 l. Le concentrazioni finali dei metalli nel terreno variano da 10⁻⁵M a 10⁻⁸M; in Tab. 2 sono riportate le quantità utilizzate nel terreno f/2 a cui viene aggiunto 1 ml della *working solution* per litro di terreno.

Tab. 2 - Composizione dei metalli in traccia nel terreno f/2.

Componenti	Soluzione stock primaria (g 100 ml ⁻¹)	Soluzione stock di lavoro (l ⁻¹)	Concentrazione finale nel terreno (M)
FeCl ₃ • 6H ₂ O	-	3,15 g	1,17 • 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	-	4,36 g	1,17 • 10 ⁻⁵
MnCl ₂ • 4H ₂ O	18	1 ml	9,10 • 10 ⁻⁷
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	2,20	1 ml	7,65 • 10 ⁻⁸
CoCl ₂ • 6H ₂ O	1	1 ml	4,20 • 10 ⁻⁸
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0,98	1 ml	3,93 • 10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0,63	1 ml	2,60 • 10 ⁻⁸

24.6.4 Vitamine

Tre tipi di vitamine sono solitamente aggiunte ai terreni per fitoplancton: la vitamina B₁₂ o cianocobalamina, la tiamina e la biotina, anche se ci sono alghe per cui non sono necessarie e altre che ne richiedono soltanto una o due per l'accrescimento. L'ordine di importanza delle vitamine per le alghe è vitamina B₁₂ > tiamina > biotina. Nell'ambito di queste vitamine quella che sembra stimolare la crescita degli organismi procariotici è la B₁₂, anche se tale effetto è ancora da dimostrare completamente.

Le vitamine sono aggiunte al terreno di coltura per filtrazione sterile (su filtro con porosità di 0,2 µm) dopo che il terreno è stato autoclavato, in quanto il calore può causare la loro decomposizione, anche se alcune specie algali sono in grado di utilizzare certi prodotti della decomposizione di alcune vitamine. Le soluzioni stock di vitamine in acqua distillata possono essere congelate per lunghi periodi senza subire degradazione e lo stock può essere ricongelato dopo l'uso. Queste tre vitamine possono essere combinate insieme in una soluzione di lavoro dopo una diluizione 1:1000. La soluzione stock di vitamine dopo sterilizzazione per filtrazione è suddivisa in aliquote in tubi da 1,2 ml o 5 ml, e congelata a -20 °C. In Tab. 3 sono riportate le quantità utilizzate nel terreno f/2 che viene preparato aggiungendo 0,5 ml della *working solution* per litro di terreno.

Tab. 3. Composizione delle vitamine nel terreno f/2.

Componenti	Soluzione stock primaria (g l ⁻¹)	Soluzione stock di lavoro (l ⁻¹)	Concentrazione finale nel terreno (M)
Tiamina	-	200 mg	$2,96 \cdot 10^{-7}$
Biotina	1,0	1 ml	$2,05 \cdot 10^{-9}$
Vitamina B12	1,0	1 ml	$3,69 \cdot 10^{-10}$

24.6.5 Tamponi

Due tipi di buffer vengono comunemente usati per prevenire o ridurre la precipitazione dei sali nei terreni di coltura: il Tris (2-amino-2[idrossimetil]-1-3-propandiolo) e la glicilglicina. Si usa generalmente una soluzione stock di Tris (1 mg l⁻¹) per avere una concentrazione di Tris pari a 10⁻³ M e quindi si aggiusta il pH del terreno con HCl. La glicilglicina è molto solubile in acqua e può essere aggiunta per pesata direttamente all'acqua di mare con cui si prepara il terreno. Essendo la glicilglicina debolmente acida potrebbe essere necessario aggiustare il pH con NaOH 1N. Per alcune specie algali il Tris risulta tossico, quindi è consigliato utilizzarlo a concentrazioni di 1–5 mM, mentre la glicilglicina non risulta tossica. Sia il Tris che la glicilglicina non sono utilizzati come fonte di azoto per l'accrescimento algale.

24.6.6 Estratto di suolo

L'estratto di suolo viene aggiunto ai terreni di coltura base per mantenere a lungo in coltura le specie algali. L'estratto di suolo può essere preparato direttamente in acqua distillata oppure per estrazione alcalina. I terreni di coltura più comunemente usati a base di estratto di suolo sono il terreno Provasoli (Provasoli *et al.*, 1957) e il terreno Plymouth Erd-schreiber. La procedura più usata è quella di combinare insieme 1 volume di suolo (non contenente fertilizzanti chimici o pesticidi) con 2 volumi di acqua distillata e autoclavare per pochi minuti; dopo raffreddamento il liquido viene decantato *over-night* e filtrato. La preparazione alcalina dell'estratto di suolo viene fatta combinando 1 volume di suolo con 2 volumi di acqua distillata e 3 g di NaOH. Si mette in autoclave per 2 ore, si lascia raffreddare, decantare *over-night* e si filtra. Questo estratto viene diluito 50:1 con acqua distillata (dH₂O) per ottenere la soluzione stock di lavoro (terreno di Provasoli). Nell'estratto di suolo del terreno preparato in dH₂O Plymouth Erd-schreiber vengono anche aggiunti nitrato e fosfato (Tab. 3).

Tab. 3 - Composizione dell'estratto di suolo del terreno Plymouth Erd-schreiber.

Componenti	Soluzione stock (g l ⁻¹)	Quantità usata (ml)	Concentrazione finale nel terreno (M)
Estratto suolo	-	50	-
Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	20	1	5,58 • 10 ⁻⁵
NaNO ₃	200	1	2,35 • 10 ⁻³

Le composizioni della maggior parte dei terreni arricchiti a base di acqua di mare si possono trovare sui siti di CCMP (Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton, <http://ccmp.bigelow.org/>) e CCAP (Culture Collection of Algae and Protozoa, <http://www.ccap.ac.uk/>) o nel volume edito da Andersen (2005).

Per quanto riguarda specificamente gli organismi procariotici marini, i terreni maggiormente utilizzati sono l'ASN-III (Rippka *et al.*, 1979) e l'AMA (De Philippis *et al.*, 1993). A questi terreni di coltura, per prevenire la crescita di organismi eucariotici viene aggiunto actidione, un composto che inibisce la sintesi proteica di tali organismi, alla concentrazione finale di 100 mg l⁻¹.

24.7 CONDIZIONI DI CRESCITA E DI MANTENIMENTO DELLE COLTURE

Il mantenimento delle colture algali ha lo scopo di farle crescere fino ad ottenere una elevata concentrazione, una determinata condizione fisiologica oppure quello di conservare i singoli stock per periodi prolungati. Nei primi due casi devono essere utilizzate le condizioni ottimali di crescita, per le quali ogni specie ha esigenze peculiari e per la cui identificazione possono essere necessari anche lunghi periodi di tempo. Di seguito vengono date alcune regole generali.

24.7.1 Scelta del terreno di coltura

La composizione del terreno di coltura è determinante per la crescita delle alghe, tuttavia non esiste un terreno ideale per tutti gli organismi e a volte sono necessarie prove con più terreni. Alcuni sono molto diffusi indicando una possibilità di successo ampia; tra questi ci sono il già citato f/2, il terreno K (Keller *et al.*, 1987) e il terreno L1 (Guillard and Hargraves, 1993). Il terreno f/2 è molto adatto per diatomee mentre il K è stato ideato per specie oligotrofiche e l'L1 per alghe costiere. Altre regole generali consistono nel fatto che al momento dell'isolamento devono essere usati terreni molto diluiti, aumentando la concentrazione dei nutrienti in seguito se si vogliono ottenere densità cellulari più elevate. I terreni a base di estratto di suolo sono invece i migliori per il mantenimento di colture algali, in quanto le componenti inorganica ed organica dell'estratto di suolo sono eccellenti nutrienti per l'accrescimento; inoltre contribuiscono a limitare i cambiamenti morfologici delle cellule che comunemente avvengono nel tempo nelle colture algali.

24.7.2 Camere di crescita

Le colture vengono incubate in armadi o camere con luce e temperatura programmabili. I criteri con cui vengono scelti i valori di questi parametri, come si è detto, variano da specie a specie e in dipendenza della zona e della stagione in cui è stata isolata la specie di interesse. Per la temperatura è necessaria una stabilità di ± 2 °C e il valore più comunemente usato è di 20 °C; in alcuni casi le alghe vengono coltivate a valori leggermente inferiori mentre temperature superiori possono essere dannose. Fanno ec-

cezione gli organismi procariotici che crescono meglio a temperature più elevate ($24\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Per quanto riguarda la luce, la fonte di illuminazione più usata consiste in lampade a fluorescenza che emettono luce bianca fredda; l'intensità adatta deve essere accuratamente selezionata e tenuta preferibilmente a valori bassi (inferiori a $100\text{ }\mu\text{moli di fotoni m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$) per evitare fenomeni di fotoinibizione. Particolarmente sensibili alla luce sono gli organismi procariotici, per i quali è consigliata un'intensità pari a $10\text{-}20\text{ }\mu\text{moli di fotoni m}^{-2}\text{ sec}^{-1}$. Molte alghe non crescono in luce continua, pertanto si deve usare un ciclo luce-buio i cui valori più comuni variano tra 12:12 e 16:8 ore.

24.7.3 Mantenimento a lungo termine

Il mantenimento a lungo termine delle colture algali richiede l'identificazione di condizioni di coltivazione che permettano la sopravvivenza della specie limitandone però la crescita, allo scopo di ridurre la frequenza con cui devono essere effettuati i trasferimenti. Come già visto, i fattori che incidono sul tasso di crescita algale sono la temperatura, l'irradianza e il fotoperiodo; pertanto, per rallentare il tasso di crescita è possibile agire su tali parametri. Le colture possono essere mantenute in celle termostate a temperatura inferiore a quella presente a mare quando la specie è stata isolata, a irradianza inferiore a $50\text{ }\mu\text{moli fotoni m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ (schermando le colture con reti metalliche o di plastica di diverso spessore) e con un fotoperiodo con non più di 12 h di luce. Nel caso in cui non si possa utilizzare una camera a temperatura e luce controllate, le colture possono essere mantenute in un laboratorio climatizzato, di fronte ad una finestra a nord, evitando l'esposizione a luce solare diretta. Le condizioni illustrate dovrebbero consentire una frequenza di trasferimento di 3-4 settimane, comunque tale periodo può variare da specie a specie. In occasione di ciascun trasferimento si consiglia di conservare la coltura madre in una camera termostata diversa, in modo da poter eventualmente ricorrere ad essa nel caso in cui si verificano problemi di crescita (per es. dovuti al terreno utilizzato), contaminazione della nuova coltura o malfunzionamento della camera termostata.

24.8 PURIFICAZIONE DELLE COLTURE

La contaminazione biologica delle colture algali con altri organismi eucarioti e procarioti può essere invalidante sul piano sperimentale che si intende condurre e in alcuni casi può determinare l'estinzione per competizione della specie algale di interesse. In questi casi per ottenere una coltura "axenica" cioè "senza la presenza dimostrabile di procarioti ed eucarioti indesiderati" è necessario effettuare nuovamente l'isolamento di una singola cellula per ricostituire un nuovo clone algale; questa procedura comunque non permette l'eliminazione dei batteri che sono epifiti sulle microalghe per cui è possibile, prima di isolare nuovamente l'alga, effettuare una sonicazione blanda della coltura in un bagno a ultrasuoni ad un'intensità di $90\text{ kilocicli sec}^{-1}$ per un tempo variabile da pochi secondi ad una decina di minuti, per potere separare fisicamente i batteri dalle alghe senza danneggiarle. Quando queste procedure fisiche non sono sufficienti per eliminare completamente i batteri è necessario effettuare un trattamento con antibiotici della sospensione algale. Nel corso degli anni sono state utilizzate varie metodiche e almeno 50 antibiotici diversi per ridurre la contaminazione batterica senza uccidere le alghe; di seguito vengono descritti tre tipi di approcci comunemente impiegati.

24.8.1 Metodo di Guillard (1973) e di Hoshaw e Rosowski (1973)

Questo tipo di approccio viene generalmente adottato immediatamente dopo l'isolamento e la costituzione della coltura e prevede il trattamento di un piccolo volume di sospensione algale in fase rapida di crescita con una miscela di tre antibiotici per un intervallo di tempo variabile dalle 18 alle 72 ore.

La soluzione di antibiotici solitamente raccomandata è la seguente: 100 mg di penicillina G, 25 mg di diidrostreptomicina solfato e 25 mg di gentamicina solfato, sciolti in 10 ml di acqua distillata; tale soluzione deve essere sterilizzata per filtrazione e può essere conservata in congelatore fino al momento dell'uso. Il trattamento viene effettuato aggiungendo 0,5 ml di tale soluzione a 50 ml di terreno di coltura fresco in modo da ottenere una concentrazione finale di antibiotici pari a: 100 mg l⁻¹ di penicillina G, 25 mg l⁻¹ di diidrostreptomicina solfato e 25 mg l⁻¹ di gentamicina solfato; a questo punto in questo terreno viene effettuato un piccolo inoculo della microalga da trattare, dopo 72 ore un piccolo inoculo di sospensione algale viene trasferito in 50 ml di terreno di coltura privo di antibiotici e dopo alcuni giorni è necessario controllare la coltura al microscopio per verificare che le alghe siano ancora vive e monitorare l'eventuale presenza batterica, attraverso il conteggio in fluorescenza con il Dapi (vedi Capitolo 13) oppure con metodi microbiologici riportati ad esempio in Guillard (2005). Se si osserva che le alghe sono molto danneggiate in seguito al trattamento, è possibile ridurre i tempi di esposizione fino a 18 ore, se al contrario il trattamento risulta inefficace e le alghe stanno bene è possibile aumentare la concentrazione degli antibiotici; alte concentrazioni di penicillina e gentamicina sono ben tollerate dalla maggior parte delle alghe, mentre la streptomicina può diventare tossica a concentrazioni più elevate. Nella soluzione originale di Guillard veniva utilizzato il cloramfenicolo al posto della gentamicina, ma questo antibiotico si è dimostrato tossico per alcune diatomee.

In generale questo tipo di trattamento è ben tollerato e risulta efficace per molte specie algali come diatomee e dinoflagellati di grandi dimensioni, altri flagellati e forme algali coloniali.

24.8.2 Metodo di Droop (1967)

Questa tecnica è adatta in particolare per colture di alghe di piccole dimensioni come piccoli flagellati che crescono molto rapidamente. Il metodo prevede il trattamento di una sospensione algale molto densa e in rapida crescita, in modo da avere una quantità molto piccola di sostanza organica extracellulare, con una miscela di antibiotici molto concentrati; dopo questo primo passaggio si effettuano varie diluizioni progressive della coltura in modo da dimezzare ad ogni passaggio la concentrazione degli antibiotici, mentre le alghe in attiva divisione rimangono pressoché uguali come numero; la metodica di Droop prevede 6 diluizioni successive a intervalli di tempo di 24-48 ore. Tutte le colture vengono controllate per verificare la crescita delle alghe e l'eventuale presenza dei batteri; in questo modo si ottiene una diluizione ottimale degli antibiotici per ogni determinata alga esaminata che impedirà la crescita batterica senza uccidere le alghe. La miscela di antibiotici utilizzata da Droop alla concentrazione più alta è la seguente: benzil penicillina G solfato 2500 mg l⁻¹, cloramfenicolo 200 mg l⁻¹, neomicina 200 mg l⁻¹, a cui viene aggiunto actidione 400 mg l⁻¹ come antimicotico. Il cloramfenicolo che è risultato molto tossico per alcune alghe può essere efficacemente sostituito dalla kanamicina, un aminoglicoside molto attivo sia contro i batteri gram- che contro quelli gram+ ma molto ben tollerato dalle alghe; come antimicotici in alternativa possono essere utilizzati anche la nistatina e la anfotericina B.

24.8.3 Metodo di Cottrell e Suttle (1993)

Con questo metodo la purificazione dai batteri viene effettuata con un trasferimento sequenziale di una coltura attraverso antibiotici o miscela di antibiotici diversi, a concentrazioni tali da non essere tossici per le alghe; con questi passaggi sequenziali è possibile ridurre il rischio che all'interno della coltura si selezionino batteri resistenti ai trattamenti, in grado di crescere in un secondo tempo. Questo metodo è stato utilizzato da Cottrell e Suttle (1993) nella purificazione del flagellato *Micromonas pusilla* con i seguenti antibiotici: penicillina 1 g l⁻¹, neomicina 250 mg l⁻¹, gentamicina 1 g l⁻¹ e kanamicina 0,5-1 g l⁻¹. La procedura consiste nel trasferire un 20% di inoculo algale da un antibiotico all'altro ad un intervallo di tempo di tre giorni. Il primo passaggio con la penicillina elimina i batteri gram+ mentre i passaggi

successivi eliminano gradualmente tutti i gram-. Per la purificazione degli organismi autotrofi procariotici, che sono gram-, ovviamente ci si limita al primo trattamento. Alcune informazioni sulle caratteristiche degli antibiotici da usare sono riportate in lavori scientifici come quello di Guillard e Keller (1984) che fa una lista di 17 antibiotici utilizzati per purificare vari ceppi di dinoflagellati o quello di Berland e Maestrini (1969) che raggruppa 25 antibiotici in famiglie basate sulla struttura chimica; informazioni utili circa la struttura e le proprietà chimiche degli antibiotici si possono ottenere anche dai cataloghi che trattano prodotti per colture cellulari (ad es. Sigma-Aldrich) o dal Merk Index.

24.9 BIBLIOGRAFIA

- ANDERSEN R.A. (2005) - *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, USA: 578 pp.
- BERLAND B.R., MAESTRINI S.Y. (1969) - Action de quelques antibiotiques sur le développement de cinq diatomées en culture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **3**: 62-75.
- COTTRELL M.T., SUTTLE C.A. (1993) - Production of axenic cultures of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) using antibiotics. *J. Phycol.*, **29**: 385-387.
- DE PHILIPPIS R., MARGHERI M.C., PELOSI E., VENTURA S. (1993) - Exopolysaccharide production by a unicellular cyanobacterium isolated from a hypersaline habitat. *J. Appl. Phycol.*, **5**: 387-394.
- DROOP M.R. (1967) - A procedure for routine purification of algal cultures with antibiotics. *Br. Phycol. Bull.*, **3**: 295-297.
- GUILLARD R.R.L. (1973) Methods for microflagellates and nannoplankton. In: Stein J.R. (ed.), *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, New York: 69-85.
- GUILLARD R.R.L. (1975) - Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith W.L., Chanley M.H. (eds), *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Plenum Press, New York: 26-60.
- GUILLARD R.R.L., HARGRAVES P.E. (1993) - *Stichocrysis immobilis* is a diatom, not a chrysophyte. *Phycologia*, **32**: 234-236.
- GUILLARD R.R.L., KELLER M.D. (1984) - Culturing dinoflagellates. In: Spector D.L. (ed.), *Dinoflagellates*. Academic Press, New York: 391-442.
- GUILLARD R.R.L. (2005) - Purification methods for microalgae. In: Andersen R.A. (ed.), *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, USA: pp. 117-143.
- HOSHAW R.W., ROSOWSKI J.R. (1973) - Methods for microscopic algae. In: Stein J.R. (ed.), *Handbook of Phycological Methods*. Cambridge University Press, New York: pp. 53-67.
- KELLER M.D., SELVIN R.C., CLAUS W., GUILLARD R.R.L. (1987) - Media for the culture of oceanic ultra-phytoplankton. *J. Phycol.*, **23**: 633-638
- PROVASOLI L., MCLAUGHLIN J.J.A., DROOP M.R. (1957) - The development of artificial media for marine algae. *Arch. Mikrobiol.*, **25**: 393-428.
- RIPPKA R., DERUELLES J., WATERBURY J.B., HERDMAN M., STANIER R.Y. (1979) - Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **111**: 1-61.
- SIEBURTH J. McN. (1979) - *Sea Microbes*. Oxford University Press Inc., New York, 491 pp.
- SUNDA W.G., PRICE N.M., MOREL F.M.M. (2005) - Trace metal ion buffers and their use in culture studies. In: Andersen R.A. (ed.), *Algal Culturing Techniques*. Elsevier Academic Press, USA: pp. 35-63.

CAPITOLO 25. METODI AUTOMATICI PER IL RILEVAMENTO DI MICRO-ALGHE PLANCTONICHE

M. Cabrini, C. Falconi, P.F. Culverhouse

mcabrini@inogs.it

25.1 INTRODUZIONE

L'identificazione del fitoplancton è generalmente svolta su campioni fissati che vengono osservati al microscopio ottico a contrasto di fase e solo in studi di morfologia strutturale le specie vengono esaminate al microscopio elettronico a scansione (SEM) e a trasmissione (TEM) per descriverne la loro ultrastruttura cellulare (vedi Capitolo 23). Le ricerche ecologiche sulla distribuzione e dinamica del fitoplancton, i monitoraggi ambientali e i controlli periodici sulle microalghe tossiche prevedono sempre un gran numero di osservazioni al microscopio ottico rovesciato a contrasto di fase e di conseguenza all'operatore vengono richieste abilità ed esperienza di sistematica per effettuare le analisi di determinazione e conteggio. La classificazione tassonomica del microfitoplancton potenzialmente tossico e la determinazione tossicologica sono inoltre le analisi richieste per stabilire la qualità dei molluschi eduli lamellibranchi. Il riconoscimento delle alghe HAB (Harmful Algal Blooms) rappresenta infatti un parametro importante per le decisioni delle autorità sanitarie che stabiliscono, in base alla loro presenza definita dalle leggi nazionali (D. L. 530/92 e D.L. 531/92 e successive modifiche) la qualità del prodotto e successivamente la commercializzazione dei mitili allevati oppure raccolti da banchi naturali. Il controllo periodico delle HAB (o più esattamente HMM Harmful Marine Microalgae) avviene in Italia dalla fine degli anni ottanta attraverso programmi di monitoraggio sulle biotossine algali operativi su tutto il territorio nazionale; ma il problema è diffuso a livello mondiale, come ampiamente documentato dalla letteratura scientifica (<http://www.ioc.unesco.org/hab/pub.htm>). I tempi d'attesa per i risultati delle analisi ottenuti con il metodo della sedimentazione o di Utermöhl (vedi Capitolo 21) sono piuttosto lunghi (alcune settimane) e, in caso di positività, comportano elevati rischi economici per i produttori costretti a bloccare la vendita. Per controllare in tempo reale la presenza delle HMM nelle acque sedi di mitilicoltura e conseguentemente contenere o mitigare la contaminazione dei molluschi, il sistema di allerta e sorveglianza delle acque resta l'unico modo, valido ed efficace. Inoltre sia per il gran numero di campioni da esaminare sia per ridurre i tempi, è sorta la necessità di sviluppare un nuovo metodo di osservazione in continuo, accurato e sicuro per la gestione automatizzata del controllo delle microalghe tossiche. È a questo scopo che in una prima fase è stato messo a punto il sistema DiCANN (*Dinoflagellate Categorisation by Artificial Neural Network*) (Culverhouse *et al.*, 2001), software capace di riconoscere e classificare automaticamente tutte le specie appartenenti al genere *Dinophysis* del tipo Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP) che dal 1989 ad oggi hanno annualmente contaminato i molluschi del mare Adriatico (Boni *et al.*, 1983; Honsell *et al.*, 1992; Sidari *et al.*, 1995; Cabrini, 1996; Sellner and Fonda Umani, 1999). Il software è inoltre in grado di identificare anche altri grandi e caratteristici dinoflagellati quali *Prorocentrum lima*, *Ceratium* e *Protoperidinium* (Culverhouse *et al.*, 2001) e potrà in futuro essere ulteriormente implementato per il riconoscimento di altri taxa della comunità planctonica. In una seconda fase è stato realizzato HAB Buoy, un sistema innovativo automatizzato che in soli 5 secondi e *in situ* (direttamente in una molluscoltura) è in grado di individuare le microalghe tossiche. Con il sistema combinato software DiCANN e macchina fotografica nello strumento HAB Buoy è possibile l'identificazione non invasiva del microplankton e mesozooplankton. L'obiettivo da raggiungere è quello che ogni laboratorio marino coinvolto in analisi di *routine* possa dotarsi di questo strumento d'identificazione automatizzata che consente di effettuare un numero maggiore di analisi altamente validate al fine di ridurre il carico di lavoro degli operatori che potranno quindi dedicarsi all'interpretazione dei risultati ed ad altri aspetti della ricerca.

25.2 IL SISTEMA HAB BUOY

HAB Buoy è un sistema innovativo sviluppato per l'identificazione automatizzata del fitoplancton potenzialmente tossico e può ulteriormente essere implementato sia in laboratorio sia *in situ* per il riconoscimento di più specie (Fig. 1). È composto da una fonte di luce vicino all'infrarosso, una cellula di flusso, un obiettivo e una macchina fotografica digitale connessa ad un computer bi-processore ad alta velocità con 2GB di RAM.(Fig. 2). La risoluzione della macchina fotografica è di 1 μm e il rendimento del sistema permette uno screening dell'acqua di mare intorno ai 400 ml h^{-1} . L'analisi automatica viene completamente e autonomamente effettuato dallo strumento che utilizza il software di DiCANN. Il sistema HAB Buoy può inoltre essere controllato e gestito a distanza con un collegamento senza fili del tipo Wireless LAN, fino ad una distanza massima di 5km. Può essere disposto su una zattera *in situ*, o direttamente nell'acqua (fino ad una profondità di 10 m) garantendo, in questo modo, il monitoraggio continuo e costante delle microalghe tra i filari galleggianti delle reste dei mitili. Le immagini acquisite ed etichettate vengono salvate localmente sul disco rigido, collocato all'interno della boa, ed inserite automaticamente nel sito Web della boa facilitando così l'accesso dall'esterno al fine di poter essere facilmente fruibili da un web browser posto in qualunque luogo del mondo.

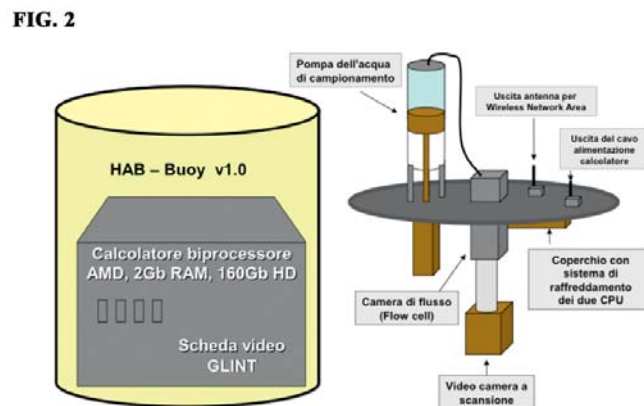


Fig. 1 –Il sistema automatico HAB Buoy per il riconoscimento delle specie tossiche DSP
Fig. 2 - Schema dei funzionamento di HAB-Buoy.

Il software DiCANN applica il cosiddetto “coarse coded channel method” per l’analisi delle immagini (Ellis *et al.*, 1997) (Fig. 3). Le immagini sono processate ad una risoluzione relativamente bassa attraverso sei canali complementari. Il descrittore numerico risultante è inserito in un classificatore automatico per addestramento e testing. Il classificatore utilizza “Support Vector Machines” (SVMs), ogni SVM prende come input uno dei sei canali “coarse” e produce un punteggio per la categorizzazione. Attualmente viene applicata la regola di maggioranza che produce una sola etichetta per ogni esemplare.

Il sistema HAB-Buoy può elaborare oggetti in una vasta gamma di dimensioni, dal diametro da 20 a 600 μm e di lunghezza fino a 1 mm e può così comprendere in un unico strumento sia il fitoplancton che il micro ed il mesozooplancton. Lo strumento può acquisire l’immagine, analizzare la specie in una sola operazione e produrre automaticamente un’etichetta per la specie acquisita. Tuttavia ad oggi il sistema HAB Buoy rappresenta un prototipo che deve essere testato prima di poter ottenere il corrispondente rilascio al fine della commercializzazione.

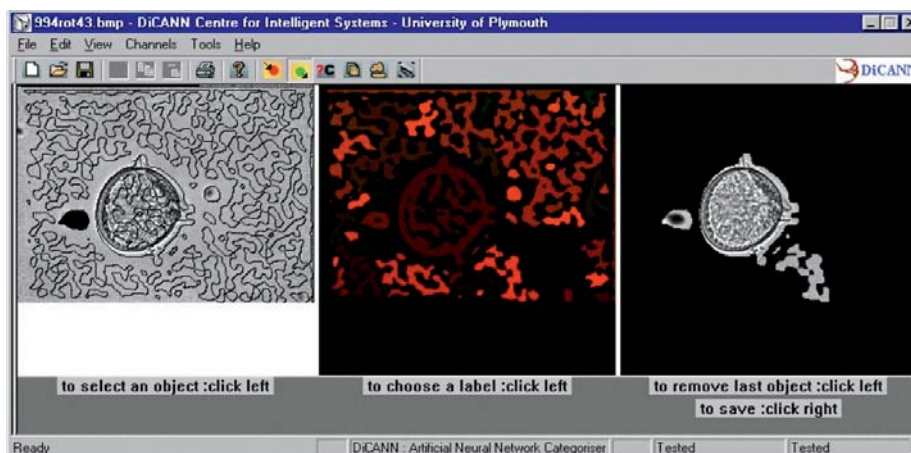


Fig. 3 - Esempio di immagine di Dinophysis riconosciuta dal programma DiCANN.

Il progetto DiCANN (Dinoflagellate Categorisation by Neural Network) è stato sostenuto dal finanziamento dell'Unione Europea MAS3-CTD98-0188. Il progetto HAB Buoy è stato sostenuto dal programma CRAFT (European Cooperative Research) finanziamento del progetto QSCR-2002-71699.

25.3 BIBLIOGRAFIA

- BONI L., POMPEI M., RETI M. (1983) - The occurrence of *Gonyaulax tamarensis* Lebour bloom in the Adriatic Sea along the coast of Emilia Romagna. *Giorn. Bot. It.*, **117**: 115-120.
- CABRINI M. (1996) - Controllo degli organismi tossici attraverso il monitoraggio delle acque costiere. *Workshop di Biologia Ambientale ed Ecotossicologia. Presidio Multizonale di Prevenzione, Pordenone, aprile 1992*: 119-123.
- CULVERHOUSE P.F., HERRY V., ELLIS R., WILLIAMS R., REGUEIRA B., GONZALEZ-GIL S., FONDA UMANI S., CABRINI M., PARISINI T. (2001) - Dinoflagellate categorisation by artificial neural network (DiCaNN). In: Hallegraeff G.M., Blackburn S.I., Bolck C.J., Lewis R.J. (eds.), *Harmful Algal Blooms 2000*. IOC-UNESCO: 195-198.
- ELLIS R.E., SIMPSON R.G., CULVERHOUSE P.F., PARISINI T. (1997) - Committees, collectives and individuals: expert visual classification by neural network. *Neural Computing and Applications* **5**: 99-105.
- HONSELL G., BONI L., CABRINI M., POMPEI M. (1992) - Toxic or potentially toxic dinoflagellates from the Northern Adriatic Sea. *Sci. Tot. Environ., Suppl.* 1992: 107-114.
- SELLNER K.G., FONDA UMANI S. (1999) - Dinoflagellate blooms and mucilage production. In: Malone T., Malej A., Harding L.W., Smolaka N., Turner E. (eds), *Ecosystems at the land-sea margin: drainage basin to coastal sea*. Coastal Estuarine Studies 55, American Geophysical Union, Washington, D.C.: 173-206.
- SIDARI L., COK S., CABRINI M., TUBARO A., HONSELL G. (1995) - Temporal distribution of toxic phytoplankton in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea) in 1991-92. In: Lassus P., Arzul G., Erard-Le Denn, Gentien P., Marcaillou-Le Baut C. (eds.), *Harmful Marine Algal Blooms*. Lavoisier Pub., Paris, Intercept Ltd, Hampshire: 231-236.

CAPITOLO 26. STADI DI RESISTENZA DEL FITOPLANCTON

M. Montresor, M. Bastianini, E. Cucchiari, M.G. Giacobbe, A. Penna, F. Rubino, C.T. Satta

marina.montresor@szn.it

26.1 INTRODUZIONE

In questo capitolo vengono illustrate le principali metodiche per lo studio di vari aspetti relativi a stadi di resistenza di organismi fitoplanctonici. Tali metodi riguardano principalmente le cisti di dinoflagellati, che sono gli organismi su cui si è accentrata gran parte della ricerca sui cicli vitali negli ultimi anni ed è, di conseguenza, il gruppo per cui sono state messe a punto varie metodiche di campionamento, identificazione, sperimentazione e quantificazione. Sono anche illustrati alcuni metodi di biologia molecolare che possono essere utilizzati per l'identificazione di cisti di dinoflagellati tramite tecniche di PCR (Polymerase Chain Reaction) e un metodo utilizzabile per la quantificazione di stadi di resistenza di diatomee nei sedimenti, basato su una modifica del metodo del MPN (Most Probable Number, vedi Capitolo 22).

26.2 CAMPIONAMENTO DEI SEDIMENTI

26.2.1 Scelta del sito

La quantità e diversità degli stadi di resistenza di organismi fitoplanctonici dipende ovviamente dalla quantità e varietà delle corrispondenti forme vegetative presenti nell'area di studio. Gli stadi di resistenza vengono prodotti nella colonna d'acqua e quindi sedimentano verso il fondo con velocità che dipendono da caratteristiche quali forma, volume, peso specifico, presenza di spine o espansioni della parete o di uno strato mucoso. Questa velocità è stata sperimentalmente stimata per le cisti di 3 specie di dinoflagellati ed è compresa tra 0,007 e 0,015 cm s⁻¹ (Anderson *et al.*, 1985). Le cisti possono essere paragonate a particelle di sedimento di piccole dimensioni e tendono quindi ad accumularsi dove il sedimento è più sottile, in zone di scarso idrodinamismo. Per questo motivo i bacini semichiusi o confinati come le baie, gli estuari, le lagune, i porti, anche grazie alle basse profondità, possono essere siti di accumulo privilegiati. Tuttavia, esse possono essere trasportate anche a notevole distanza dalla zona di produzione in presenza di fenomeni di trasporto di masse d'acqua (correnti, escursioni di marea, fenomeni di upwelling, correnti fluviali etc.) che dipendono dalle caratteristiche idrodinamiche e geomorfologiche della zona. In questi casi le cisti possono inoculare fioriture anche lontano dai siti in cui sono state prodotte.

26.2.2 Metodi di raccolta

26.2.2.1 Campioni di sedimento

Non c'è un metodo o un attrezzo universalmente valido che garantisca un'assoluta efficacia nella raccolta dei campioni di sedimento. Tutto è funzione degli obiettivi che si vogliono raggiungere e di altre variabili quali la tipologia del sedimento, la profondità del bacino, la necessità di effettuare analisi quantitative o meno, la quantità di campione che occorre, la necessità o meno di svolgere studi stratigrafici delle cisti nel sedimento. Può essere impiegata un'ampia gamma di attrezzi, ciascuno con proprie potenzialità ed efficacia (Tab. 1).

Tab. 1. Tipologia di attrezzi per la raccolta di sedimenti e loro efficacia in relazione a caratteristiche del bacino e finalità di studio.

Attrezzo	Profondità	Tipologia del sedimento	Tipo di analisi	Stratigrafia	Grado di perturbazione
Benna	Tutte	Tutte	Qualitativa	No	Elevato
Carotiere a gravità	Tutte	Fango e sabbia fine	Quantitativa	Si	Moderato o elevato
Multi-carotiere	Tutte	Fango	Quantitativa	Si	Minimo
Box-corer	Tutte	Tutte	Quantitativa	Si	Minimo
Operatore subacqueo	Limitata	Tutte	Quantitativa	Si	Minimo
Pompa	Limitata	Fango e sabbia fine	Qualitativa	No	Elevato

Il metodo che garantisce i risultati migliori prevede l'utilizzo di piccoli carotieri ad opera di un subacqueo, perché permette di controllare quello che si raccoglie e di evitare la risospensione degli strati più superficiali del sedimento, dove si accumulano gli stadi di resistenza di più recente formazione. Questa metodica è ovviamente utilizzabile solo su bassi fondali. In ambienti più profondi, l'attrezzo più efficace, anche se è il più costoso, è il multi-carotiere che permette di raccogliere campioni di sedimento praticamente indisturbato in più repliche (normalmente fino a quattro) con un'unica discesa a qualsiasi profondità. Possibili alternative sono i carotieri a gravità e i box-corer. I primi hanno però lo svantaggio di dover utilizzare un ferma-carota in testa al tubo campionatore per evitare la perdita del materiale durante la risalita e questo provoca una perturbazione durante la penetrazione nel sedimento, che si ripercuote sulla stratigrafia del campione. I box corer hanno invece lo svantaggio di non permettere un accurato campionamento della porzione superficiale del sedimento che viene dilavata durante la risalita dello strumento. Infine, un metodo molto semplice ed efficace, quando si vogliono prelevare grossi volumi di sedimento per uno studio non quantitativo, prevede l'utilizzo di una pompa elettrica con un tubo di gomma che, calato sul fondo, permette l'aspirazione della quantità di sedimento desiderata.

A parte quest'ultimo caso, per ottenere i campioni di sedimento da analizzare, le carote devono essere estruse dal liner del carotiere o dal carotatore a mano o dal tubo di piccole dimensioni utilizzato per subcampionare il materiale raccolto dal box-corer. Fino al momento dell'estrusione è consigliabile conservare i tubi in posizione verticale al buio e al freddo. L'operazione di estrusione è molto delicata e va effettuata con attenzione, specialmente se si devono ottenere strati di sedimento a diversa profondità per studi stratigrafici. Innanzitutto occorre prelevare l'acqua che è rimasta nella porzione superiore del tubo e che contiene piccole quantità di sedimento e probabilmente anche stadi di resistenza. Se nel liner di un carotiere non c'è acqua e il tubo è completamente pieno di sedimento, vuol dire che una certa quantità di materiale più superficiale è andata persa perché il carotiere è penetrato con troppa forza nel sedimento e il campionamento va ripetuto alleggerendo il carotiere o diminuendo la sua velocità di caduta. Il prelievo della quantità di acqua presente nella porzione superiore del tubo va effettuato aspirando con cautela, fino ad arrivare ad un paio di centimetri di distanza dallo strato superficiale di sedimento. La carota viene quindi spinta verso la porzione superiore del tubo utilizzando un apposito pistone, ovvero un tappo di diametro corrispondente alla dimensione interna del tubo. La pressione deve essere esercitata dolcemente, in modo da ridurre al minimo l'attrito del sedimento sulla parete interna del tubo. Quando la porzione superficiale di sedimento si trova a pochi centimetri dal bordo del tubo, si sospende l'estrusione e si preleva con attenzione l'ultima quantità di acqua rimasta, facendo attenzione a perturbare il meno possibile la parte superficiale del sedimento. A questo punto si procede all'estrusione della prima porzione di sedimento, generalmente 1 o 2 centimetri. Questa 'fetta' viene separata utilizzando una sottile lama di plastica o metallo e posta in un contenitore. Può essere necessario aggiungere una minima quantità di acqua al

campione in modo che si conservi adeguatamente idratato; per la fetta superficiale si può utilizzare l'acqua prelevata in vicinanza del sedimento, per le porzioni inferiori, utilizzare acqua filtrata. I contenitori in cui si conserva il sedimento devono essere accuratamente chiusi per evitare evaporazione. Nel caso si vogliano analizzare anche le porzioni più profonde di sedimento, si procede in successione a prelevare i campioni con la stessa modalità. Da ogni 'fetta' raccolta è consigliabile scartare la porzione più esterna che, essendo a contatto con la parete del tubo, durante l'estrusione può essere trascinata per attrito da uno strato verso quello sottostante, inquinando così il campione successivo.

26.2.2.2 Trappole di sedimentazione e trappole inverse

Le trappole di sedimentazione sono utilizzate negli studi finalizzati alla stima dei flussi di produzione delle cisti, per lo più in zone poco profonde (Rubino *et al.*, 1996; Montresor *et al.*, 1998). Nei casi più semplici, sono costituite da tubi, cilindri o provettoni con un rapporto altezza/diametro idoneo ad impedire risospensione al loro interno, con conseguente perdita del materiale sedimentato in seguito a fenomeni di turbolenza dell'acqua o durante le procedure di campionamento (Hargraves e Burns, 1979). Questo aspetto è fondamentale per garantire l'accuratezza della stima del flusso di cisti proveniente dalla colonna d'acqua; Blomqvist e Kofoed (1981) hanno dimostrato che per trappole cilindriche, nel caso di fondi fangosi e a bassa profondità, questo rapporto deve essere almeno pari a 3. Indipendentemente dalla loro forma e dal materiale di cui sono costituite, le trappole possono essere posizionate da subacquei ad alcuni metri dal fondo, in modo da limitare la raccolta di cisti derivanti da fenomeni di risospensione dei sedimenti e sono rimpiazzate a definiti intervalli di tempo. Nel caso di elevate profondità, si utilizzano strutture più complesse che consentono la stima quantitativa del materiale sedimentato a diverse profondità grazie a sistemi a revolver che, con periodicità programmabile, possono posizionare sotto l'imbuto raccoglitore nuovi contenitori e sigillare quelli precedenti (Peterson *et al.*, 2005).

Le trappole inverse consentono di catturare gli stadi vegetativi prodotti dalla germinazione delle cisti. Esse possono essere realizzate tramite sistemi abbastanza semplici, quali bottiglie di materiale plastico ancorate a stretto contatto con il sedimento e collegate ad un raccoglitore nella porzione apicale (Càceres, 1998). Si possono utilizzare anche sistemi più complessi costruiti *ad hoc*, in cui una piccola quantità di sedimento viene posta in piccole camere cilindriche che possono essere incubate in mare in condizioni naturali. L'acqua nella camera cilindrica conterrà le cellule germinate dal sedimento nell'intervallo di tempo della sperimentazione (Ishikawa *et al.*, 2007). In ogni caso è fondamentale utilizzare recipienti che permettano il passaggio della luce e adottare gli accorgimenti necessari per garantire un idoneo ricambio di acqua ma, contemporaneamente, evitare l'ingresso di cellule vegetative dalla colonna d'acqua. Le trappole inverse devono quindi essere dotate di una 'finestra' su cui è sigillato un retino di maglia adeguata in relazione alla taglia degli organismi che si vogliono studiare.

Un'alternativa all'utilizzo delle trappole inverse consiste nell'allestimento di piccoli acquari in laboratorio, ricreando dei 'microcosmi' in cui posizionare quantità adeguate di sedimento e monitorare la produzione degli stadi vegetativi (Raffaelli *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2007). Chiaramente questo approccio sperimentale implica vari livelli di alterazione delle condizioni naturali, ma dà la possibilità di ottenere preziose informazioni sulle storie vitali delle specie potendo quantificare la dinamica di germinazione nel tempo, che si effettua stimando la concentrazione delle cisti piene e vuote prima e dopo ogni esperimento e avendo come riscontro diretto la presenza degli stadi attivi nell'acqua (Rubino *et al.*, 2009).

26.2.2.3 Conservazione e fissazione

Una volta raccolti, i campioni vanno conservati al buio, per evitare l'esposizione a stimoli luminosi che ne potrebbero indurre la germinazione, e ad una temperatura di qualche grado inferiore alla temperatura annuale minima del sedimento dal quale sono stati estratti (Matsuoka e Fukuyo, 2000). Se non sono previsti esperimenti di germinazione, o se non si prevede di trattare i campioni nell'arco di pochi mesi, si procede alla fissazione del campione che viene effettuata aggiungendo formalina (il prodotto commerciale che contiene il 38% di formaldeide) neutralizzata in ragione del 10% del volume del campione.

26.3 STIMA QUANTITATIVA

La procedura utilizzata per quantificare il numero di cisti presenti nel sedimento prevede in genere l'impiego di metodi atti a separare le cisti dal sedimento stesso, onde facilitarne l'osservazione al microscopio. Si consiglia vivamente di effettuare la stima quantitativa entro il più breve tempo possibile (max qualche mese) dalla raccolta dei campioni, conservandoli al buio ed al freddo dal momento del prelievo fino al momento del trattamento in laboratorio. Infatti il trattamento di campioni fissati richiede le dovute cautele (es. il frazionamento deve essere eseguito con adeguate protezioni e sotto la cappa chimica) e la centrifugazione su gradiente di densità di campioni fissati può creare problemi dovuti all'aumentata aggregazione del materiale organico. I due metodi più comunemente usati per quantificare le cisti nei sedimenti sono la filtrazione per taglia (paragrafo 3.1) e la centrifugazione su gradienti di densità (paragrafo 3.2). In entrambi i casi, il campione viene dapprima sottoposto a sonicazione per favorire la disaggregazione degli stadi di resistenza dal materiale organico e dal sedimento minerale, e quindi frazionato in modo da separare la frazione dimensionale in cui sono contenuti gli stadi di resistenza. La stima della concentrazione di cisti nel campione così concentrato può essere effettuata utilizzando le metodiche comunemente utilizzate per i campioni di fitoplancton (ad es. il metodo Utermöhl) oppure adottando metodiche più appropriate, in base alla ricchezza del campione (paragrafo 3.3). I campioni concentrati possono essere utilizzati anche per effettuare analisi di tipo molecolare (metodo PCR, paragrafo 6).

26.3.1 Filtrazione per taglia

La filtrazione per taglia è una metodica semplice e serve ad eliminare quanto più possibile sedimento e altro materiale che non interessa, senza l'utilizzo di composti che possano alterare le caratteristiche morfologiche delle cisti o distruggerne la parete esterna. È efficace soprattutto su campioni ricchi di cisti, come quelli di lagune e aree portuali; in altri casi occorre utilizzare metodiche che permettano di concentrare le cisti, come, ad esempio, la centrifugazione su gradiente di densità (paragrafo 3.2). La filtrazione per taglia è applicabile sia a campioni fissati che non. Nel primo caso occorre effettuare tutte le procedure previste sotto cappa e utilizzare vetreria e setacci diversi da quelli utilizzati per i campioni non fissati, per evitare contaminazioni.

Attrezzature e materiale

- Cilindri in vetro graduati (10 ml)
- Bilancia
- Setacci con maglia d'acciaio (20, 63 o 75 e 125 μm)
- Spatolina d'acciaio
- Pipette Pasteur
- Cristallizzatori in vetro
- Spruzzetta
- Acqua di mare filtrata (0,45 μm)
- Bagno ad ultrasuoni

Procedura

- Il metodo prevede le seguenti operazioni:
- omogeneizzare il campione con la spatolina, prelevarne un'aliquota (2-3 cm^3) e misurarne con precisione il volume nel cilindro graduato (per poter poi esprimere la concentrazione delle cisti per cm^3 di sedimento) ed il peso umido;
- sonicare a bassa frequenza per 1 minuto, per separare le cisti dalle particelle di sedimento e disgregare il sedimento conglomerato;

- lavare con acqua di mare filtrata su una batteria di setacci in sequenza per separare le cisti di diversa taglia.
- In questa maniera sul setaccio da 20 µm si raccoglie la frazione più fine che contiene il maggior numero di cisti, la frazione intermedia (63 o 75µm) sarà quella che contiene le cisti più grandi (ad es. *Polykrikos* e *Lingulodinium*), mentre la frazione superiore a 125 µm si scarta o può essere utilizzata per enumerare gli stadi di resistenza dello zooplancton (vedi Capitolo 43). Queste frazioni vengono raccolte separatamente, diluite con un volume noto di acqua di mare ed eventualmente fissate con formalina (4% del prodotto commerciale).
- Consigliamo l'utilizzo di questo metodo nel caso in cui si affronti lo studio degli stadi di resistenza per la prima volta in una determinata area di studio. Il metodo di filtrazione per taglia permette infatti l'osservazione al microscopio di tutti i morfotipi presenti nel campione e, pur comportando un maggiore tempo di osservazione, assicura il rinvenimento e la migliore stima quantitativa possibile di cisti di specie rare o con elevato peso specifico, come quelle a parete calcarea, che potrebbero andare in parte perse utilizzando gradienti di densità. Una volta acquisita familiarità con i vari morfotipi presenti, si potrà procedere all'utilizzo di tecniche più rapide, quali la concentrazione su gradiente di politungstato di sodio. Si raccomanda comunque di condurre un'analisi comparativa di qualche campione utilizzando entrambe le metodiche nelle fasi iniziali di studio.

26.3.2 Concentrazione delle cisti tramite gradiente di densità (politungstato di sodio)

Le tecniche più usate per la separazione delle cisti dal sedimento e per la loro concentrazione, si basano sull'utilizzo di composti chimici capaci di produrre gradienti di densità (Blanco, 1986; Schwinghamer *et al.*, 1991; Bolch, 1997). Il politungstato di sodio è uno di questi composti ed il suo impiego offre numerosi vantaggi: 1) non è tossico per le cisti (ma si raccomanda di seguire le precauzioni riportate nelle istruzioni del prodotto relative al suo utilizzo e smaltimento); 2) permette di raggiungere elevati pesi specifici mantenendo bassa la viscosità; 3) il tempo di preparazione dei campioni è breve; 4) non è eccessivamente costoso; 5) può essere riciclato; 6) permette di incrementare il numero di cisti vitali rinvenute rispetto a quelle vuote, nonché il numero dei morfotipi (Munsterman e Kerstholt, 1996; Bolch, 1997).

Attrezzature e materiale

- Politungstato di sodio (SPT, $3\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 9\text{WO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Centrifuga
- Bagno o sonda ad ultrasuoni (se possibile, preferire la sonda che richiede il trattamento del campione per un periodo di tempo più limitato)
- Bilancia
- Cilindri graduati
- Setacci (possibilmente metallici) con maglia da 20 µm e 100 µm
- Acqua deionizzata
- Acqua di mare filtrata (0,45 µm)
- Provette in polietilene per centrifuga da 10-15 ml
- Pipette Pasteur

Procedura

Preparazione delle soluzioni di politungstato a differenti densità

- Per la preparazione della soluzione madre, sciogliere 75 g di SPT (densità specifica del prodotto: 5,47 g ml⁻¹) in 25 ml d'acqua deionizzata per ottenere una soluzione con densità 2,49 g ml⁻¹.
- dalla soluzione madre, per successive diluizioni, si possono ottenere soluzioni con densità inferiori.

Vengono di seguito riportati gli esempi proposti da Bolch (1997):

- 20 ml di soluzione madre+80 ml di acqua deionizzata per ottenere una soluzione a densità 1,3 g ml⁻¹.
- 30 ml di soluzione madre+70 ml di acqua deionizzata per ottenere una soluzione a densità 1,45 g ml⁻¹.
- 40 ml di soluzione madre+60 ml di acqua deionizzata per ottenere una soluzione a densità 1,6 g ml⁻¹.
- 70 ml di soluzione madre+30 ml di acqua deionizzata per ottenere una soluzione a densità 2,05 g ml⁻¹.

L'utilizzo delle soluzioni a diversa densità è utile per ottenere separazioni selettive delle cisti. La diluizione più comunemente utilizzata è quella con densità 2,05 g ml⁻¹.

Preparazione del campione

- Si consiglia di utilizzare piccoli volumi di sedimento, 1-2 cm³, prelevati con una pipetta con puntale ad apertura larga. Sospendere il campione di sedimento da analizzare in 20 ml di acqua di mare filtrata. Annotare la variazione di volume per calcolare il volume di sedimento utilizzato. Questo dato è estremamente importante per poter risalire alla concentrazione di stadi di resistenza in un'unità nota di sedimento: n° cisti cm⁻³ o n° di cisti g⁻¹ di sedimento (in tal caso si deve procedere a pesare preventivamente una replica del campione).
- Sonicare la soluzione ottenuta per 2 min circa utilizzando la sonda (150-200 watt). Sono necessari tempi più lunghi se si utilizza un bagno ad ultrasuoni. In ogni caso, il tempo di sonicazione varia a seconda del campione: si consigliano tempi più lunghi nel caso di campioni a granulometria fine.
- Setacciare e raccogliere la frazione compresa fra 20-100 µm, avendo cura di sciacquare con acqua di mare filtrata per separare ulteriormente le particelle.

Gradiente di densità

- Sospendere la frazione di sedimento compresa fra 20-100 µm in acqua di mare filtrata, portando il volume finale del campione a 7 ml. Se il campione è molto ricco, raddoppiare o triplicare il volume (14, 21 ml) e suddividerlo in due-tre tubi da centrifuga che verranno trattati separatamente. Nel caso di stime quantitative tener conto del rapporto fra il volume totale ed il volume esaminato.
- Porre il campione nei tubi da centrifuga, sistemando 7 ml di campione per tubo.
- Usando una pipetta Pasteur, aggiungere delicatamente, ad ogni tubo da analizzare (contenente 7 ml di campione), 3 ml della soluzione di SPT alla densità prescelta al di sotto del campione.
- Centrifugare a temperatura ambiente per 10 minuti a 1600 rpm. Dopo la centrifugazione, un accumulo di materiale organico e cisti indica chiaramente l'interfaccia di densità, mentre la frazione più pesante del campione, che non dovrebbe contenere cisti, si accumula sul fondo del tubo.
- Usando una pipetta Pasteur, rimuovere delicatamente lo strato all'interfaccia di densità, avendo cura di raccogliere anche parte dell'acqua sovrastante.
- Portare il volume del materiale prelevato a 5 ml con acqua di mare filtrata e centrifugare per 2 minuti a 1000 rpm.
- Usando una pipetta Pasteur, rimuovere l'acqua sovrastante il pellet e risospendere quest'ultimo in 5 ml di acqua di mare filtrata. Questo è il 'campione concentrato' che conterrà gli stadi di resistenza presenti nel volume di sedimento di partenza. Tale campione può essere fissato con formalina (4% del prodotto commerciale) e conservato ben chiuso ed al fresco fino al momento del conteggio. Se si pensa di utilizzare il materiale per esperimenti di germinazione, è consigliabile procedere ad un paio di ulteriori lavaggi con acqua di mare filtrata per rimuovere completamente il SPT.

26.3.3 Analisi quali/quantitativa

Attrezzature e materiale

- Micropipetta P1000
- Cristallizzatori in vetro
- Spruzzetta
- Acqua di mare filtrata (0,45 µm)
- Piastre per conteggi (piccole piastre tipo Petri o camere di Sedgwick-Rafter (da 1 ml) o camere di sedimentazione Utermöhl)
- Microscopio ottico invertito

Procedura

- Stabilire preventivamente il volume minimo di campione concentrato da analizzare (l'intera frazione, 1/5, 1/10). La quantità dipende dall'abbondanza degli stadi di resistenza e deve essere tale da permettere l'enumerazione di un numero significativo di stadi di resistenza (nell'ordine di 100-200).
- Questa valutazione va fatta sulla base di un'analisi preliminare che permetta di individuare tale valore soglia, oltre il quale non si ottiene un miglioramento significativo nell'accuratezza dell'analisi. Tutto questo al fine di rendere il più piccolo possibile, e soprattutto sempre uguale, l'errore che si fa nella stima quantitativa. Un semplice test che può essere utilizzato a questo scopo è quello che prevede un'analisi di dati basata sulla relazione tra l'errore standard del numero di taxa ed il volume del sub-campione (Bros e Cowell, 1987). Questa analisi va ripetuta ogni volta che si analizzano campioni di un'area non studiata in precedenza. Le frazioni di sedimento di taglia superiore – quelle che sedimentano sul fondo del tubo di centrifuga e che contengono stadi di resistenza più pesanti di organismi animali - sono di solito abbastanza pulite e possono essere osservate interamente.
- Prelevare con una micropipetta aliquote di 1 ml del campione concentrato e porle in piastre di conteggio (camere di Sedgwick-Rafter o camere Utermöhl). Il numero di repliche da analizzare dipende dalla concentrazione delle cisti nel campione.
- Rappresentare i dati di conteggio ad unità di superficie o di peso, umido e/o secco del sedimento. Esempio: si è partiti da 1 cm³ di sedimento, che è stato trattato secondo le modalità illustrate nei paragrafi precedenti ed è stato centrifugato su gradiente di densità, ottenendo un campione concentrato del volume di 5 ml. Sono state utilizzate 2 aliquote di 1 ml ciascuna per i conteggi in camera Sedgwick-Rafter: conteggio a): 109 cisti; conteggio b): 131 cisti. Cisti presenti in 1 cm³ di sedimento = $((109+131)/2) \times 5$.
- Il peso secco è utilizzato, in particolare, per gli studi stratigrafici, in quanto la quantità di acqua diminuisce scendendo in profondità negli strati di sedimento e l'utilizzo di dati rapportati al peso umido porterebbe ad errori grossolani. In questi casi, occorre calcolare la percentuale di acqua per ogni strato, calcolando il rapporto tra il peso umido e il peso secco del sedimento, ottenuto dopo aver tenuto il campione in stufa per 24 h a 70°C.

26.4 INDUZIONE DELL'INCISTAMENTO

Le cisti dei dinoflagellati hanno, a seconda della specie, diversa morfologia, funzione e modalità di formazione (Anderson *et al.*, 2003). Possiamo identificare due principali categorie: (1) stadi di resistenza che si formano generalmente in risposta a condizioni di stress (variazioni di temperatura, salinità etc.) e che hanno una quiescenza limitata nel tempo e (2) stadi di resistenza caratterizzati da un periodo di

maturazione, variabile da specie a specie, durante il quale sono refrattari alla germinazione e sono in grado di sopravvivere nei sedimenti per periodi di tempo relativamente lunghi. Esiste una notevole diversità di termini per definire il primo tipo di stadi di resistenza: cisti temporanee (*temporary cyst*), *pellicle cyst*, *ecdysal cyst*. La diversa terminologia è basata o su peculiarità morfologiche di questi stadi (*pellicle cyst*), sulla modalità con cui essi si formano (*ecdysal cyst*), o sulla loro funzione (cisti temporanee). Il secondo tipo di stadi di resistenza viene generalmente definito con il termine di ‘cisti di resistenza (*resting cyst*)’. Si riteneva che questo tipo di cisti rappresentasse necessariamente la trasformazione di un planozigote (lo stadio diploide formato in seguito alla coniugazione dei gameti), ma studi recenti hanno dimostrato che alcune specie possono formare cisti asessuate (Kremp e Parrow, 2006).

La metodica per ottenere la formazione di cisti di resistenza di seguito riportata prevede la riduzione della concentrazione dei macronutrienti azoto e/o fosforo nel terreno di coltura (Pfiester e Anderson, 1987). Benché questo sia il metodo usato più comunemente in laboratorio, diversi studi condotti in ambiente naturale non sembrano fornire supporto al fatto che la formazione di cisti sia necessariamente da mettersi in relazione con la limitazione dei nutrienti. Pertanto, se il fine della sperimentazione è quello di comprendere i fattori che inducono l’incistamento, è necessario esplorare il ruolo di altri fattori sia abiotici che biotici (Montresor e Lewis, 2006).

I dinoflagellati possono avere un ciclo vitale omotallico (la fase sessuata avviene all’interno di una coltura monoclonale), eterotallico (la fase sessuata avviene solo quando si incrociano colture di tipo riproduttivo diverso, definiti come + e -), o di tipo complesso, come nel caso di *Gymnodinium catenatum* (Blackburn *et al.*, 2001). Si può rendere quindi necessario sperimentare una matrice di incroci più complessa utilizzando varie colture monoclonali.

Colture

Le colture dei dinoflagellati su cui indurre l’incistamento dovranno essere ottenute dall’isolamento di singole cellule vegetative, in modo da disporre di colture clonali. Nel caso in cui la coltura provenga dalla germinazione di una ciste di resistenza, bisognerà effettuare l’ulteriore isolamento di una cellula vegetativa per poter ottenere un ceppo clonale (vedi sotto). Le colture sono mantenute in recipienti sterili (bottiglie Erlenmeyer di vetro o contenitori di polistirene o policarbonato trasparente per colture cellulari) riempiti con 50 ml di terreno di coltura, f/2-Si, L1-Si o altri terreni (<http://ccmp.bigelow.org/>) preparati con acqua di mare locale, regolata ad una salinità leggermente inferiore a quella della zona da cui provengono i campioni, ed autoclavata in contenitori di Teflon. Le condizioni di coltura variano a seconda della specie oggetto di studio.

Procedura

- Acclimatare per alcune generazioni le colture alla temperatura che si vuole utilizzare per condurre l’esperimento di incistamento.
- Preparare piastre sterili (per es. con diametro di 35 mm) o fiasche di coltura riempite con:
 - un terreno a ridotto regime di nutrienti (per es. f/2 con 1/15 o 1/30 della concentrazione di N e P), oppure un terreno in cui sia stato omissa l’arricchimento con N o P;
 - un terreno normale da utilizzare come controllo.
- Verificare la compatibilità sessuale ed il successo dell’incistamento sia nell’ambito dello stesso clone (a), sia attraverso incroci tra cloni diversi (b)
 - (a) Inoculare le singole colture in fase di crescita esponenziale nei suddetti terreni, in modo da ottenere una densità di 500-1000 cellule·ml⁻¹.
 - (b) Effettuare incroci multipli tra cloni diversi della stessa specie per verificare l’eterotallismo, utilizzando una concentrazione di 500-1000 cellule·ml⁻¹ (ovvero 250-500 cellule·ml⁻¹ per ogni coltura clonale).
- Riporre i contenitori contenenti gli incroci alle condizioni sperimentali a cui sono mantenute le colture.
- Controllare al microscopio invertito la produzione di cisti nelle piastre o fiasche di coltura ad in-

-
- tervalli di tempo regolari.
 - Effettuare in parallelo stime quantitative delle cellule vegetative per poter calcolare il tasso d'incistamento.
 - Confrontare i vari incroci, utilizzando un criterio di punteggio in cui per es. una combinazione che produce elevati numeri di cisti è indicata con (+++), quelle a minor produzione con (++), quelle che producono bassi numeri di cisti con (+), mentre gli incroci che non producono cisti saranno indicati come (-).
 - Per le specie che producono cisti in seguito alla trasformazione dello zigote derivante dalla coniugazione di due gameti, calcolare il tasso d'incistamento applicando la formula: $2N_{\text{cisti}}/(2N_{\text{cisti}}+N_{\text{cellule vegetative}})$.

26.5 GERMINAZIONE DELLE CISTI

Gli stadi di resistenza degli organismi fitoplanctonici presentano spesso una morfologia semplice ed i caratteri che differenziano le cisti di specie diverse sono a volte estremamente limitati (un esempio sono le cisti di specie del genere *Alexandrium*). In molti casi si rende quindi necessario indurre la germinazione delle cisti per ottenere una coltura del corrispondente stadio vegetativo e poter procedere ad una corretta identificazione. Quando si effettuano esperimenti di germinazione, si deve tener presente che una volta prodotte le cisti di dinoflagellati vanno incontro ad un periodo di maturazione di lunghezza diversa da specie a specie: solo al termine di questo intervallo di tempo le cisti sono in grado di germinare (vedi ad es. Imai *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002; Figueroa e Bravo, 2005). Inoltre, i fattori che inducono la germinazione delle cisti mature sono noti solo per un numero limitato di specie. In generale, per le specie di zone temperate un primo stimolo alla germinazione è fornito da un aumento della temperatura; a volte tuttavia la germinazione può avvenire spontaneamente senza alcuno stimolo esterno (Anderson *et al.*, 2003). L'esposizione alla luce può favorire e accelerare la germinazione di alcune specie, ma non rappresenta un requisito fondamentale, in quanto alcune specie possono germinare anche al buio. Ne consegue che le indicazioni fornite di seguito rappresentano solo dei suggerimenti generali su come indurre la germinazione di stadi di resistenza. Studi più dettagliati, che tengano in considerazione altri fattori, potranno essere pianificati in relazione alle diverse specie ed alle specifiche finalità della ricerca in corso.

Attrezzature e materiale

- Pipetta Pasteur di vetro con punta assottigliata o micro pipette
- Apparato per aspirare le singole cisti (facoltativo)
- Acqua di mare filtrata (0,45 µm)
- Piastre per colture cellulari (96 o 24 pozzetti)
- Parafilm
- Terreno di coltura (vedi Capitolo 24)
- Camera termostata
- Microscopio invertito

L'isolamento delle singole cisti dal sedimento può essere effettuato a partire dal sedimento semplicemente setacciato o dalla frazione arricchita in cisti che si ottiene dopo centrifugazione su gradiente di densità (vedi paragrafi 3.1 e 3.2). Entrambi i metodi prevedono la sonicazione del campione; tale trattamento non dovrebbe danneggiare le cisti, ma si raccomanda comunque di non utilizzare intensità elevate e di non sonicare il campione per un tempo troppo lungo (max 1 minuto a 100 watt). Il politungstato di sodio non è tossico per le forme di resistenza ma si raccomanda comunque di effettuare almeno un paio di lavaggi della frazione arricchita in cisti con acqua di mare filtrata, prima di procedere all'isolamento.

Procedura

- L'isolamento delle singole cisti viene effettuata mediante la stessa procedura utilizzata per le cellule vegetative (vedi Capitolo 24).
- Le cisti devono essere risciacquate prelevando la singola ciste con una micropipetta ed effettuando dei passaggi in pozzetti con acqua di mare filtrata,
- Le singole cisti sono poste nei pozzetti di piastre per colture cellulari (preferibilmente da 96 o 24 pozzetti) che permettono l'osservazione del materiale con microscopio invertito.
- Si utilizzano i terreni di coltura più consoni alla crescita della specie considerata (vedi Capitolo 24). È consigliabile diluire il terreno di coltura utilizzato per riempire i pozzetti delle piastre di coltura (1:10 - 1:20, v:v) con acqua di mare filtrata e sterilizzata.
- Le piastre di coltura vengono chiuse accuratamente con il parafilm; per limitare ulteriormente l'evaporazione, si possono riempire gli spazi fra le varie cellette con acqua distillata.
- La temperatura di incubazione delle cisti deve essere simile o leggermente più elevata di quella del sedimento da cui sono stati prelevati i campioni. Per cisti raccolte in sedimenti marini di acque temperate italiane, possiamo consigliare una temperatura di incubazione compresa fra 15 e 20 °C.
- L'irradianza non deve essere troppo elevata: si consiglia di mantenersi al di sotto di 50 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Per quanto riguarda la durata del fotoperiodo, di solito si adotta 12:12 h luce:buio.
- Le piastre di coltura vanno osservate 2-3 volte la settimana utilizzando un microscopio invertito, per verificare l'avvenuta germinazione. Se non si riscontra germinazione entro 2-3 settimane, è altamente probabile che le cisti siano ancora in fase di maturazione, o non vitali, ovvero non si trovino nelle condizioni ideali per germinare.
- Le cellule ottenute dalla germinazione delle cisti possono essere prelevate e utilizzate per allestire colture per ulteriori studi. Si fa presente che le cisti di dinoflagellati rappresentano – nella maggior parte dei casi studiati – lo zigote diploide (Montresor e Lewis, 2006), che compirà meiosi dopo la germinazione. In questi casi, l'isolamento della cellula che emerge dalla germinazione della cisti non dà luogo ad una coltura monoclonale, ma conterrà la progenie di entrambi i tipi riproduttivi (mating types) che l'hanno originata.
- Per avere un'informazione preliminare sugli stadi di resistenza presenti in un dato campione, è possibile porre direttamente una piccola quantità di sedimento in una capsula Petri con del mezzo di coltura diluito. Le piastre – sigillate con parafilm - sono quindi incubate in camera termostata alle condizioni di luce e temperatura illustrate sopra o a temperatura ambiente, vicino ad una fonte di luce (es. una finestra esposta a nord).

26.6 METODI MOLECOLARI PER L'IDENTIFICAZIONE DI CISTI DI RESISTENZA NEI SEDIMENTI MARINI: ANALISI MOLECOLARE CON PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

L'applicazione di metodi molecolari qualitativi basati sull'utilizzo di PCR permette l'identificazione certa e rapida degli stadi di resistenza prodotti da specie per cui siano disponibili primers genere- e specie-specifici. In tal modo si possono risolvere problemi legati all'identificazione di forme che non sono determinabili attraverso la microscopia ottica, che richiede, in ogni caso, esperienza tassonomica da parte dell'operatore. I metodi molecolari permettono, inoltre, l'identificazione di cisti in fase di dormienza, che non produrrebbero una cellula vegetativa in esperimenti di germinazione.

I metodi di purificazione del DNA permettono di estrarre DNA genomico amplificabile nelle reazioni di PCR, da cisti di resistenza in sedimenti marini eliminando la gran parte dei contaminanti presenti nel sedimento, che sono rimossi con l'uso di colonnine di purificazione. Le quantità di DNA estratto da cisti sono in genere basse e pertanto, a volte, nella prima reazione di PCR non si ottengono dei prodotti di amplificazione visualizzabili su gel d'agaroso. Per questo motivo è quasi sempre consigliabile riamplicare il primo prodotto di reazione di PCR in una successiva reazione di PCR utilizzando gli stessi primers

specie-specifici.

L'amplificazione delle regioni genomiche specie- e genere-specifiche avviene mediante l'uso di primers oligonucleotidici disegnati su sequenze nucleotidiche note delle specie di interesse. La lunghezza (in paia di basi) del frammento amplificato nella reazione di PCR e visualizzato su gel d'agaroso indica la specificità della reazione. L'amplificazione con PCR di regioni conservate e/o variabili dei geni ribosomali può essere applicata per analisi di sequenziamento diretto, quando le cisti vengono isolate dal campione di sedimento (Bolch, 2001).

Attrezzature e materiale

- Bagno ad ultrasuoni
- Azoto liquido
- Minicentrifuga (12000 rpm) refrigerata con pompa per il vuoto
- Centrifuga spin da bancone
- Macchina di PCR
- Frigo congelatore (-80°C e -20°C)
- Micropipette con puntali sterili
- Piastre Petri
- Microscopio ottico invertito
- Eppendorf
- Tubi da PCR
- Pipette Pasteur
- Vortex
- Tubi da 15 e 50 ml
- Camera elettroforetica
- Kit di estrazione UltraClean Soil DNA Kit (MoBio Laboratories Inc.; Solana Beach, California)
- Acqua di mare sterile
- Acqua distillata sterile (dH₂O)
- Etanolo 70% e 100%
- TE (10 mM Tris-1 mM EDTA), pH 8,0.

Se i campioni di sedimento non devono essere immediatamente trattati per l'estrazione degli acidi nucleici possono essere posti in tubi da 50 ml, risospesi in acqua di mare sterile (1 volume di campione:1 volume di acqua di mare sterile) e fissati con soluzione di Lugol che - contrariamente alla formalina - non causa problemi di inibizione nelle reazioni di PCR. I campioni possono essere così conservati al buio a +4°C per qualche mese. Questo metodo previene la degradazione delle cisti.

Procedura

Estrazione di DNA genomico totale da singole cisti (Bolch, 2001)

- Il campione di sedimento va trattato con il metodo del gradiente di densità con politungstato di sodio (SPT) per ottenere una frazione arricchita di cisti (vedi paragrafo 3.2).
- Una piccola quantità del materiale ottenuto viene posta su vetrino ed esaminata al microscopio ottico per poter procedere all'isolamento delle singole cisti con una pipetta Pasteur sterile o una micropipetta.
- Le cisti vanno lavate in dH₂O sterile su un nuovo vetrino e trasferite su una piastra Petri (diametro 36 mm) contenente 2 ml di dH₂O sterile. Le cisti isolate sono poi trasferite singolarmente o a gruppi di 2-8 con una pipetta sterile in tubi da PCR (da 200 µl) contenenti 5-10 µl di dH₂O sterile.
- Le pareti delle cisti sono rotte meccanicamente mediante congelamenti e scongelamenti ripetuti: i tubi contenenti le cisti vanno congelati a -20°C, poi scongelati a temperatura ambiente; quindi i tubi sono di nuovo sottoposti a congelamento in azoto liquido, seguito da uno scongelamento immediato a 95°C per 2 min in una macchina di PCR, quindi riconsgelati immediatamente sempre

in azoto liquido. La procedura deve essere ripetuta per almeno tre volte consecutive. Tubi contenenti solo 5 µl di dH₂O sterile (controllo negativo) sono congelati a -20°C e non vengono sottoposti alle procedure di scongelamento/congelamento.

- Dopo l'ultimo congelamento il tubo contenente le cisti viene scongelato a temperatura ambiente e portato a secco in centrifuga sotto vuoto (1 ora). I tubi dei controlli negativi vengono centrifugati direttamente sotto vuoto.
- La miscela di PCR contenente tutti i reagenti viene aggiunta direttamente ai tubi contenenti le cisti portate a secco e ai tubi del controllo negativo.

Estrazione di DNA genomico totale da cisti mediante l'uso del kit UltraClean Soil DNA Kit

- Il campione di sedimento concentrato (5 ml) preparato con il metodo del gradiente su SPT viene centrifugato a 4000 rpm per 10'; quindi viene eliminato il soprannatante e il pellet viene lavato con 10 ml di dH₂O sterile. Il campione viene di nuovo centrifugato a 4000 rpm per 10', viene eliminato il soprannatante ed il pellet è risospeso con 1 ml di dH₂O sterile.
- Il campione viene trasferito in Eppendorf e centrifugato a 8000 rpm per 10'; quindi il soprannatante viene eliminato ed il pellet è congelato a -80°C.
- Per l'estrazione del DNA genomico il campione è scongelato a +65°C per 15', poi ricongelato in azoto liquido per 5' e di nuovo scongelato a +65°C per 15'. Il ciclo congelamento/scongelamento va ripetuto per tre volte consecutive.
- Il campione viene poi sonicato a 150 watt per 15', quindi si segue la procedura di purificazione di DNA genomico secondo le istruzioni del kit UltraClean Soil DNA (Penna *et al.*, 2010).
- Esistono anche altri metodi di purificazione degli acidi nucleici di cisti di resistenza di taxa microalgali da sedimenti marini fra cui quelli pubblicati recentemente da Coyne *et al.* (2001), Godhe *et al.* (2002), Kamikawa *et al.* (2005; 2007) e Bowers *et al.* (2006).

Analisi di elettroforesi su gel d'agaroso

- Il DNA genomico estratto seguendo uno dei metodi illustrati qui sopra è dosato preferibilmente su gel d'agaroso su un trans-illuminatore con lampade UV, sfruttando la fluorescenza emessa dall'etidio bromuro intercalato nella doppia elica del DNA (Sambrook e Russel, 2001). Questa metodica è preferibile rispetto al dosaggio con spettrofotometro, perché le quantità di DNA estratto da cisti sono basse e il campione di DNA può contenere tracce di contaminanti o impurità.
- Il campione di DNA genomico purificato è caricato su gel d'agaroso (0,8% w/v) in 1X TAE (Tris acetato - EDTA) o 0,5X TBE (Tris borato - EDTA) buffer assieme a diluizioni scalari di uno standard a DNA come il DNA Marker L (MBI Fermentas, Germany). Poiché la quantità di fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di DNA nel campione, quest'ultima può essere stimata comparando la luce emessa a 590 nm dal DNA del campione con quella delle quantità note di DNA degli standard.
- Per il disegno e l'uso di primers genere- e specie-specifici di dinoflagellati e altri taxa microalgali in analisi di PCR (Penna *et al.*, 2007) si fa riferimento al Capitolo 27.
- I prodotti di amplificazione di PCR sono analizzati su gel d'agaroso (1,8% w/v) in 0,5X TBE buffer e visualizzati con bromuro di etidio sotto UV come descritto sopra.
- Talvolta, i prodotti di amplificazione non sono visualizzabili su gel d'agaroso essendo in genere scarse le quantità di DNA estratto da cisti; pertanto è consigliabile effettuare una seconda reazione di PCR sul prodotto di amplificazione della prima reazione di PCR (1 µl) utilizzando lo stesso protocollo di PCR e gli stessi primers specie-specifici come descritto sopra con 35 cicli di amplificazione.

26.7 METODO DEL 'MOST PROBABLE NUMBER (MPN)' PER LA VALUTAZIONE DI STADI DI RESISTENZA NEI SEDIMENTI

Il metodo del Most Probable Number (MPN) applicato a colture di diluizione seriali (SDC) utilizzato per valutare la diversità ed ottenere stime di abbondanza di fitoflagellati presenti nei campioni di plancton (Andersen e Thronsen, 2003, Capitolo 22), è stato modificato per poter stimare le specie fitoplanctoniche presenti sotto forma di stadi di resistenza nei sedimenti (Harris *et al.*, 1998; McQuoid, 2002). Il principio del metodo è quello di effettuare delle diluizioni progressive del campione di sedimento ed incubarle in camere a luce e temperatura controllate per permettere la germinazione degli stadi di resistenza. La presenza/assenza di cellule delle varie specie nelle differenti diluizioni permette di stimare il numero di cellule/stadi di resistenza presenti nel campione di partenza, applicando il metodo statistico del MPN. Questo metodo può essere utilizzato per la stima di stadi di resistenza di diatomee o flagellati, che è quasi impossibile riconoscere in un campione di sedimento, data la loro taglia ridotta.

Attrezzature e materiale

- Pipetta Gilson P1000
- Tubi di plastica graduati da 15 ml
- Terreno di coltura
- Acqua di mare filtrata ed autoclavata
- Piastre per coltura da 24 pozzetti
- Celle termostate

Dal momento del prelievo e prima di effettuare le diluizioni seriali, il campione deve essere conservato a bassa temperatura (leggermente inferiore a quella dell'ambiente in cui è stato prelevato) e al buio per 3-4 settimane. Questo per indurre la formazione di stadi di resistenza in cellule vegetative appena sedimentate, ovvero di indurre la morte in modo che, al momento dell'incubazione del sedimento per la sperimentazione, siano presenti solo stadi di resistenza e non cellule vegetative. Tutte le operazioni di trattamento del campione e di inoculo delle piastre di coltura devono essere condotte a luce bassissima, meglio se in presenza di una debole luce rossa (es. quella utilizzata nella camera oscura per fotografia). I terreni di coltura da utilizzare variano a seconda delle specie. Nel caso si voglia testare la presenza di stadi di resistenza di diatomee, si deve utilizzare un terreno di coltura contenente silicio (ad esempio il terreno F/2, vedi Capitolo 24). È consigliabile utilizzare terreni di coltura diluiti 1:1 con acqua di mare filtrata ed autoclavata (es. F/4).

Procedura

- Riempire ciascuno dei 24 pozzetti della piastra di coltura con 1,8 ml di terreno F/4.
- Pesare 1 g di sedimento e diluirlo in 10 ml di terreno di coltura F/4 in un tubo di plastica graduato da 15 ml.
- Agitare il campione e prelevare velocemente con una pipetta Gilson P1000 aliquote da 200 µl che verranno inoculate in ognuno dei 6 pozzetti della fila D della piastra da coltura. Il tubo deve essere agitato ad ogni prelievo per evitare che il materiale sedimenti.
- Le diluizioni nella fila successiva (fila C) saranno effettuate utilizzando il materiale del pozzetto D6 dal quale, dopo averne accuratamente mescolato il contenuto, verranno prelevate aliquote da 200 µl per inoculare i 6 pozzetti della fila C. Dal pozzetto C6 verranno prelevate, sempre dopo accurato rimescolamento, altre aliquote da 200 µl per inoculare ciascuno dei 6 pozzetti della fila B. Nell'ultima diluizione, dal pozzetto B6 verranno prelevate le aliquote per l'inoculo dei 6 pozzetti della fila A.
- Riempire gli interspazi fra i pozzetti con acqua distillata e sigillare le piastre per coltura con Parafilm.
- Incubare per una settimana in celle termostate ad una temperatura simile a quella del sedimenti

(es. 15 °C) e ad un'irradianza estremamente ridotta (ca. 5-10 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$), per simulare le condizioni temperatura e luce presenti sul fondo. Dopo questa prima settimana si può aumentare l'irradianza, senza comunque superare i 50 $\mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Si possono testare fotoperiodi di lunghezza diversa, ma osservazioni preliminari sembrano suggerire che il fotoperiodo non giochi un ruolo sostanziale nell'influenzare la frequenza di germinazione. Si consiglia quindi di utilizzare un ciclo luce:buio di 12:12 ore.

- Le osservazioni vanno condotte con cadenza settimanale (dopo la prima, la seconda e la terza settimana). Il controllo delle piastre va effettuato al microscopio ottico invertito per identificare le specie di dimensioni maggiori e di conseguenza più rare, integrando questa osservazione con l'esame di 2-3 gocce di coltura, prelevate dopo accurato rimescolamento del pozzetto, poste su un vetrino ed osservate al microscopio ottico. In tal modo si possono rinvenire ed identificare in modo più appropriato le specie di taglia minore e/o quelle che richiedono un esame più accurato per la loro identificazione. La presenza delle varie specie rinvenute nei pozzetti delle varie file va riportata sull'apposito modulo e la concentrazione iniziale dei rispettivi stadi di resistenza (per grammo di sedimento umido) può essere stimata utilizzando le tabelle MPN e le modalità di calcolo riportate nel Capitolo 22.

26.8 BIBLIOGRAFIA

- ANDERSEN P., THRONDSSEN J. (2003) - Estimating cell numbers. In: Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. (eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Manual and Guides IOC- UNESCO: 99-129.
- ANDERSON D.M., LIVELY J.J., REARDON E.M., PRICE C.A. (1985) - Sinking characteristics of dinoflagellate cysts. *Limnol. Oceanogr.*, **30**: 1000-1009.
- ANDERSON D.M., FUKUYO Y., MATSUOKA K. (2003) - Cysts methodologies. In: Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. (eds), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Manual and Guides IOC- UNESCO: 165-189.
- BLACKBURN S.I., BOLCH C.J., HASKARD K.A., HALLEGRAEFF G.M. (2001) - Reproductive compatibility among four global populations of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *Phycologia*, **25**: 78-87.
- BLANCO J. (1986) - Separación de quistes de dinoflagelados en gradiente de densidad. *Bol. Inst. Esp. Oceanogr.*, **3**: 81-84.
- BLOMQUIST S., KOFOED C. (1981) - Sediment trapping - A sub-aquatic in situ experiment. *Limnol. Oceanogr.*, **26**: 585-590.
- BOLCH C.J.S. (1997) - The use of sodium polytungstate for the separation and concentration of living dinoflagellate cysts from marine sediments. *Phycologia*, **36**: 472-478.
- BOLCH C.J.S. (2001) - PCR protocols for genetic identification of dinoflagellates directly from single cyst and plankton cells. *Phycologia*, **40**: 162-167.
- BOWERS H.A., TRICE T.M., MAGNIEN R.E., GOSHORN D.M., MICHAEL B., SCHAEFER E.F., RUBLEE P.A., OLDACH D.W. (2006) - Detection of *Pfiesteria* spp. by PCR in surface sediments collected from Chesapeake Bay tributaries (Maryland). *Harmful Algae*, **5**: 342-351.
- BROS W.E., COWELL B.C. (1987) - A technique for optimizing sample size (replication). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **114**: 63-71.
- CÀCERES C. (1998) - Interspecific variation in the abundance production and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology*, **79**: 1699-1710.
- COYNE K.J., HUTCHINS D.A., HARE C.E., CARY S.C. (2001) - Assessing temporal and spatial variability in *Pfiesteria piscicida* distributions using molecular probing techniques. *Aquat. Microb. Ecol.*, **24**: 275-285.
- FIGUEROA R.I., BRAVO I. (2005) - Sexual reproduction and two different encystment strategies of *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae) in culture. *J. Phycol.*, **41**: 370-379.
- GODHE A., REHNSTAM-HOLM A.S., KARUNASAGAR I., KARUNASAGAR I. (2002) - PCR detection of dinoflagellate cysts in field sediment samples from tropic and temperate environments. *Harmful Algae*, **1**: 361-373.

-
- HARGRAVES B.T., BURNS N.M. (1979) - Assessment of sediment trap collection efficiency. *Limnol. Oceanogr.*, **24**: 1124-1136.
- HARRIS A.S.D., JONES K.J., LEWIS J. (1998) - An assessment of the accuracy and reproducibility of the most probable number (MPN) technique in estimating numbers of nutrient stressed diatoms in sediment samples. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **231**: 21-30.
- IMAI I., YAMAGUCHI M., WATANABE M. (1998) - Ecophysiology, life cycle, and bloom dynamics of *Chattonella* in Seto Island Sea, Japan. In: Anderson D.M., Cembella A.D., Hallegraeff G.M. (eds), *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg: 95-112.
- ISHIKAWA A., HATTORI M., IMAI I. (2007) - Development of the 'plankton emergence trap/chamber (PET chamber)', a new sampling device to collect *in situ* germinating cells from cysts of microalgae in surface sediments of coastal waters. *Harmful Algae*, **6**: 301-307.
- KAMIKAWA R., HOSOI-TANABE S., NAGAI S., ITAKURA S., SAKO Y. (2005) - Development of a quantification assay for the cysts of the toxic dinoflagellate *Alexandrium tamarense* using real-time polymerase chain reaction. *Fish. Sci.*, **71**: 987-991.
- KAMIKAWA R., NAGAI S., HOSOI-TANABE S., ITAKURA S., YAMAGUCHI M., UCHIDA Y., BABA T., SAKO Y. (2007) - Application of real-time PCR assay for detection and quantification of *Alexandrium tamarense* and *Alexandrium catenella* cysts from marine sediments. *Harmful Algae*, **6**: 413-420.
- KIM Y.O., PARK M.H., HAN M.S. (2002) - Role of cyst germination in the bloom initiation of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) in Masan Bay, Korea. *Aquat. Microb. Ecol.*, **29**: 279-286.
- KREMP A., PARROW M.W. (2006) - Evidence for asexual resting cysts in the life cycle of the marine peridinioid dinoflagellate, *Scrippsiella hangoei*. *J. Phycol.*, **42**: 400-409.
- MATSUOKA K., FUKUYO Y. (2000) - *Technical guide for modern dinoflagellate cyst study*, WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC: 120 pp.
- MC QUOID M.R. (2002) - Pelagic and benthic environmental controls on the spatial distribution of a viable diatom propagule bank on the Swedish west coast. *J. Phycol.*, **38**: 881-893.
- MONTRESOR M., LEWIS J. (2006) - Phases, stages, and shifts in the life cycles of marine phytoplankton. In: SUBBA RAO D.V. (ed.), *Algal cultures, analogues of blooms and applications*, Science Publishers, Enfield (NH) USA: 91-129.
- MONTRESOR M., ZINGONE A., SARNO D. (1998) - Dinoflagellate cyst production at a coastal Mediterranean site. *J. Plank. Res.*, **20**: 2291-2312.
- MUNSTERMAN D., KERSTHOLT S. (1996) - Sodium polytungstate, a new non-toxic alternative to bromoform in heavy liquid separation. *Rev. Paleobot. Palynol.*, **91**: 417-422.
- PENNA A., BERTOZZINI E., BATTOCCHI C., GIACOBBE M.G., GALLUZZI L., GARCÉS E., VILA M., LUGLIÈ A., MAGNANI M. (2007) - Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular techniques. *J. Plank. Res.*, **29**: 19-38.
- PENNA A., BATTOCCHI C., GARCÉS E., ANGLÈS S., CUCCHIARI E., TOTTI C., KREMP A., SATTÀ C., GIACOBBE M.G., BRAVO I., BASTIANINI M. (2010) - Detection of microalgal resting cysts in European coastal sediments using a PCR-based assay. *Deep Sea Res. II*, **57**: 288-300.
- PÉREZ C.C., ROY S., LEVASSEUR M., ANDERSON D.M. (1998) - Control of germination of *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) cysts from the lower St. Lawrence Estuary (Canada). *J. Phycol.*, **34**: 242-249.
- PETERSON M.L., WAKEHAM S.G., LEE C., ASKEA M.A., MIQUEL J.C. (2005) - Novel techniques for collection of sinking particles in the ocean and determining their settling rates. *Limnol. Oceanogr. Meth.*, **3**: 520-532.
- PFIESTER L.A., ANDERSON D.M. (1987) - Dinoflagellate reproduction. In: Taylor F.J.R. (ed.), *The Biology of Dinoflagellates*, Blackwell, Oxford: 611-648.
- RAFFAELLI D., BELL E., WEITHOFF G., MATSUMOTO A., CRUZ-MOTTA J.J., KERSHAW P., PARKER R., PARRY D., JONES M. (2003) - The ups and downs of benthic ecology: considerations of scale, heterogeneity and surveillance for benthic-pelagic coupling. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **285-286**: 191-203.
- RUBINO F., BELMONTE M., BOERO F. (2009) - Benthic recruitment for planktonic dinoflagellates: an experimental approach. *Biol. Mar. Mediterr.*, **16**: 158-161.
- RUBINO F., SARACINO O.D., FANELLI G., BELMONTE G., BOERO F. (1996) - Plankton dynamics in the Mar Piccolo of Taranto: a pilot plan. *Giorn. Bot. It.*, **130**: 1032-1036.
- SAMBROOK J., RUSSELL D.W. (2001) - *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. CSHL Press, New York, USA.
- SCHWINGHAMER P., ANDERSON D.M., KULIS D.M. (1991) - Separation and concentration of living dinoflagellate resting cysts from marine sediments via density-gradient centrifugation. *Limnol. Oceanogr.*, **36**: 588-592.

CAPITOLO 27. METODI MOLECOLARI PER L'ANALISI DEL FITOPLANKTON MARINO

A. Penna, W.H.C.F. Kooistra, G. Procaccini, F. Cerino

antonella.penna@uniurb.it

27.1 INTRODUZIONE

La complessità genetica di un sistema è legata strettamente al livello di diversità esistente tra le sue componenti principali, le specie, e tra le popolazioni all'interno delle stesse specie. Tale diversità va intesa in senso dinamico: le specie sono in continuo stato evolutivo e l'attuale biodiversità è il risultato di effetti combinati di speciazione ed estinzione nel tempo. Una specie avrà successo se il suo potenziale adattativo potrà rispondere alle diverse forzanti evolutive tra le quali si sono aggiunte in modo drammatico gli effetti di disturbo causati dalle attività antropiche sull'ambiente. Questa complessità può essere studiata attraverso l'applicazione di varie tecniche molecolari, ciascuna delle quali più o meno adatta ad analizzare un particolare livello di biodiversità ed a rispondere ad una specifica domanda (Procaccini e Maltagliati, 2003). L'applicazione delle tecniche molecolari allo studio del fitoplancton è iniziata negli anni '70 e queste tecniche sono ora sempre più utilizzate nello studio di aspetti evolutivi ed ecologici. Questo capitolo fornirà un compendio delle principali tecniche molecolari utilizzate nello studio della diversità genetica del fitoplancton in funzione del livello di analisi inter- o intra-specifico.

Per studiare le specie con tecniche genetico-molecolari è importante definire prima di tutto il concetto di specie, che non è univoco e di facile definizione. La definizione di tale concetto passa attraverso la determinazione dei criteri secondo i quali due gruppi di individui si possano definire appartenenti alla stessa specie o a specie differenti. Tali criteri sono basati sulle differenti metodologie utilizzate e sui parametri presi in considerazione, che sono essenzialmente di tipo morfologico, biologico, ecologico e genetico.

Dal punto di vista genetico la specie può essere definita come un gruppo di individui che condividono un set di mutazioni fissate in regioni target del DNA nucleare e/o dei genomi degli organelli (Palumbi, 1994).

Le mutazioni accumulate nel tempo e la posizione geografica separano gli individui in gruppi differenti, o popolazioni, in base ai propri corredi genetici. Gli eventi microevolutivi che si svolgono all'interno di ogni singola popolazione, in base a fenomeni adattativi e di deriva genetica, influenzeranno il destino evolutivo di queste popolazioni e quindi delle specie (Feral, 2002; Avise, 2004). L'assenza di barriere evidenti in ambiente marino e lo stile di vita delle cellule fitoplanctoniche, che vivono sospese nella colonna d'acqua, ha portato a pensare in passato che esistesse una estrema omogeneità spaziale dei popolamenti ed una quasi illimitata capacità di dispersione (Finlay, 2002). In realtà, l'esistenza di masse d'acqua con caratteristiche fisico/chimiche diverse, la storia evolutiva, i ritmi stagionali, annuali o pluriannuali delle specie sono tutti fattori che portano ad una differenziazione delle popolazioni planctoniche in gruppi diversi (Kooistra *et al.*, 2007). La persistenza della deriva genetica, con l'accumulo di sostituzioni nucleotidiche irreversibili nel genoma porterà ad una maggiore separazione di questi gruppi che potranno diventare entità tassonomiche diverse. L'eventuale incompatibilità riproduttiva fra i gruppi potrà portare alla nascita di specie diverse. Nel caso in cui invece non esistano chiare barriere riproduttive fra gruppi saremo in presenza di popolazioni distinte all'interno della stessa specie. Se la barriera spaziale o temporale fra le specie scompare, queste potranno ritrovarsi in contatto e convergere in una sola specie attraverso processi di ibridazione, nel caso in cui siano riproduttivamente compatibili. L'ammontare delle differenze fra le specie permette di ricostruire l'ordine secondo il quale esse si sono separate nel tempo. L'approccio filogenetico permette la ricostruzione dell'ordine sequenziale della separazione dei gruppi all'interno di

una specie. Alberi filogenetici possono essere utilizzati anche per ricostruire la sequenza nell'acquisizione di nuovi caratteri fenetici e nuovi adattamenti ecologici. La presenza di resti fossili potrà anche permettere una stima dell'età di ogni singolo gruppo di specie e la ricostruzione di un orologio molecolare. I metodi molecolari possono essere quindi utilizzati per studiare i processi ecologici ed evolutivi che avvengono all'interno di una singola specie (Iglesias-Rodriguez *et al.*, 2006), per identificare le specie, per chiarire l'esistenza di specie criptiche e per ricostruire o verificare le classificazioni basate sui caratteri fenotipici (morfologici, fisiologici e tossicologici) ed ecologici (Penna *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2007; Kooistra *et al.*, 2008) e sui caratteri del ciclo vitale (Amato *et al.*, 2006).

L'impostazione di questo capitolo si basa sulla presentazione di una serie di approcci e sulla discussione critica della loro applicazione. Per la maggior parte degli approcci presentati, non sarà possibile fornire protocolli di analisi standard, ma l'illustrazione della metodologia, dei suoi principi e delle sue applicazioni fornirà al lettore gli strumenti per effettuare una scelta critica del piano sperimentale. Questo per il fatto che i protocolli di analisi molecolari non sono sempre estendibili genericamente a gruppi diversi di organismi. Ad esempio, i protocolli di estrazione del DNA da diatomee o dinoflagellate possono essere molto diversi rispetto ai protocolli applicati alle cisti di resistenza delle dinoflagellate. Nella stessa misura, la diversità specifica, ad esempio del genere *Chaetoceros*, è filogeneticamente molto più profonda (le specie si sono separate da un maggior numero di anni) rispetto ad altri generi di diatomee, quale ad esempio il genere *Pseudo-nitzschia*. Questo significa che i marcatori molecolari da utilizzare per risolvere la filogenesi di questi due generi non sono gli stessi, i primers da utilizzare in PCR saranno diversi e quindi le condizioni sperimentali di amplificazione dei frammenti varieranno.

Alla luce di queste considerazioni, il primo passo da effettuare nella definizione di una strategia sperimentale è quello di ricercare nella letteratura scientifica i lavori relativi agli organismi oggetto di studio o ad organismi filogeneticamente vicini, nei quali si possano ritrovare protocolli e metodiche specifiche utilizzate con successo in questi gruppi.

27.2 TIPOLOGIA DEL MARCATORE MOLECOLARE

I marcatori selezionati sulle molecole di DNA o RNA sono i principali strumenti per studiare la variazione genetica esistente tra differenti gruppi di organismi (specie) o il grado di polimorfismo all'interno di essi. La cellula eucariotica oltre al DNA nucleare (nDNA) contiene differenti genomi presenti nei vari organelli, nei plastidi (pdDNA) e nei mitocondri (mtDNA). Il DNA è composto da regioni codificanti (geni) e non codificanti che costituiscono la percentuale maggiore del genoma. Le sequenze dei geni sono generalmente utilizzate per le analisi filogenetiche. Le mutazioni possono accumularsi più facilmente nelle regioni non codificanti, che vengono considerate come marcatori più idonei per studi di variabilità intra-specifica e il cui polimorfismo viene analizzato attraverso marcatori specifici come ad esempio i microsatelliti o gli AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

I marcatori molecolari forniscono informazioni sulla variazione genetica basandosi su un alto numero di caratteri (come le posizioni variabili all'interno di un allineamento fra sequenze) e di combinazioni, risultando così più informativi per analisi filogenetiche rispetto ai marcatori fenotipici. La domanda specifica ed il livello tassonomico di analisi richiederanno l'utilizzo di marcatori con diversa capacità di accumulare mutazioni nel tempo. Negli studi di tassonomia e filogenesi sul fitoplancton marino, ad esempio, i geni nucleari ribosomali sono di gran lunga i più utilizzati. Essi sono facilmente amplificabili (i geni ribosomali sono presenti in copie multiple all'interno del genoma ed hanno regioni fiancheggianti conservate che permettono l'utilizzo di primers più o meno universali) e contengono al loro interno regioni con diverso grado di polimorfismo, permettendo analisi di relazioni filogenetiche su vasta scala tassonomica. Infine, essi possono essere paragonati tramite l'allineamento delle loro sequenze con un elevatissimo numero di sequenze nucleotidiche disponibili nelle banche dati. Le tecnologie molecolari sono comunque in rapido sviluppo e negli ultimi anni hanno portato alla possibilità di conoscere interi genomi di organismi viventi con costi ancora elevati ma in rapido decremento. La capacità di una tecnica di rilevare

una variazione genetica dipenderà dal polimorfismo delle regioni target del genoma dell'organismo oggetto di studio. Esiste una vasta gamma di tecniche molecolari utilizzate negli studi di genetica del fitoplancton marino (Tab. 1). In questo capitolo tratteremo due principali categorie di tecniche molecolari, quali quelle basate sul principio di amplificazione genica o PCR (Polymerase Chain Reaction) e quelle basate sul principio di ibridazione selettiva. Lo sviluppo della tecnica di PCR ha rivoluzionato l'intero campo della ricerca molecolare (Mullis *et al.*, 1986). Regioni target di DNA nucleare e/o di organelli citoplasmatici chiamate sequenze nucleotidiche possono essere amplificate anche da quantità molto piccole di DNA stampo. Una coppia di oligonucleotidi sintetici o primers (circa 20 paia di basi) che si trovano a monte (5') ed a valle (3') della zona bersaglio lungo la molecola di DNA fungono da iniziatori della polimerizzazione. La quantità del frammento di DNA ottenuto potrà poi essere visualizzata su un gel dopo colorazione con coloranti specifici, tra cui il più usato è il bromuro di etidio. I frammenti di DNA amplificati possono poi essere digeriti con enzimi di restrizione, analizzati su capillari, confrontati con sistemi di acquisizione/elaborazione di immagine o direttamente sequenziati. Con la tecnologia ora disponibile e con l'utilizzo di sequenziatori automatici l'intera procedura, dal materiale di partenza, cellule o tessuto, fino alla determinazione della sequenze nucleotidica richiede tempi brevissimi e può essere effettuata su un numero elevato di campioni.

In generale, prima di iniziare un'analisi molecolare è fondamentale la scelta del marcatore in modo che sia appropriato al livello tassonomico richiesto dalla domanda scientifica e che il tasso di mutazione sia appropriato al gruppo di specie considerato. Tale valutazione deve anche considerare fattori quali, i costi, la difficoltà tecnica ed i benefici della tecnica prescelta.

Tab. 1 - Principali tecniche molecolari e loro applicazione per la caratterizzazione genetica di organismi fitoplanctonici marini.

Tecnica	Marcatore	Applicazione	Livello tassonomico	Referenze
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	Regioni variabili aspecifiche ottenute con la digestione di enzimi di restrizione ed amplificazione in PCR	Genetica di popolazione, evoluzione spazio-temporale della diversità	Isolati, popolazioni	John <i>et al.</i> , 2004
DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	Sequenze geniche	Studio di polimorfismi di frammenti target amplificati in PCR	Tra isolati, popolazioni	Larsen <i>et al.</i> , 2001; McDonald <i>et al.</i> , 2007a
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	Regioni variabili aspecifiche ottenute per amplificazione in PCR	Genetica di popolazione, evoluzione temporale della diversità	Isolati, popolazioni	Bolch <i>et al.</i> , 1999
SSR (Simple Sequence Repeats) o Microsatelliti	Regioni ripetute specifiche ottenute per amplificazione in PCR	Genetica di popolazione, evoluzione temporale della diversità	Isolati, popolazioni	Evans <i>et al.</i> , 2004; 2005 Rynearson e Armbrust, 2004
RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	Regioni specifiche ottenute con la digestione di enzimi di restrizione	Genetica di popolazione, evoluzione temporale della diversità	Isolati, popolazioni, specie	Scholin <i>et al.</i> , 1994
PCR qualitativa e Analisi di sequenza	Regioni target ottenute per amplificazione in PCR	Identificazione, Filogenesi, Tassonomia, Bar-coding	Genere, specie	Penna <i>et al.</i> , 2007 Kooistra <i>et al.</i> , 2008
Real time PCR	Regioni target amplificate in PCR quantitativa	Identificazione e quantificazione	Genere, specie	Bowers <i>et al.</i> , 2000 Galluzzi <i>et al.</i> , 2004; 2008
DNA ARRAY con fluorescenza	Sequenze geniche di geni ribosomali	Identificazione	Taxon specifico	Metfies e Medlin, 2004
Electrochemical detection	Geni Ribosomali	Identificazione	Taxon specifico	Metfies <i>et al.</i> , 2005
SHA (Sandwich Hybridization Assay)	Sequenze di geni ribosomali	Identificazione	Taxon specifico	Scholin <i>et al.</i> , 1999
TSA-FISH (Tyramide Signal Amplification-Fluorescence Hybridization)	Geni Ribosomali	Identificazione	Taxon specifico	Not <i>et al.</i> , 2002 Anderson <i>et al.</i> , 2005 John <i>et al.</i> , 2005 Töbe <i>et al.</i> , 2006

27.3 CAMPIONAMENTO DEL FITOPLANCTON: PROBLEMATICHE METODOLOGICHE

Il campionamento del fitoplancton di aree costiere per studi molecolari può essere eseguito con retini (10 - 20 μm) o con bottiglie a seconda dello scopo, qualitativo o quantitativo, dell'analisi in corso. Il campionamento con retino è utile per fornire informazioni qualitative dei taxa tramite le tecniche di FISH, Sandwich Hybridization, PCR qualitativa o microarray, per isolare cellule per colture monoclonali. Il fitoplancton campionato con bottiglie di Niskin o bottiglie inserite in rosette su sonde CTD viene usato invece per studi molecolari quantitativi di distribuzione delle specie in superficie o lungo la colonna d'acqua (tecniche di FISH, Sandwich Hybridization, real-time PCR, citofluorimetria).

Singole cellule possono essere isolate dal campione per produrre colture monoclonali con terreni di coltura idonei per il loro accrescimento. L'isolamento di cellule o di colonie dal campione ambientale va fatto rapidamente al fine di evitare la degradazione del materiale raccolto ed eventuali variazioni nella composizione specifica del campione, con possibilità di perdita delle specie meno abbondanti.

Per studi di genetica di popolazione è necessario campionare un numero di individui che sia in qualche modo rappresentativo dell'intera popolazione. Nei pochi lavori esistenti sulla genetica di popolazione di specie fitoplanctoniche attraverso l'utilizzo di microsatelliti il numero di campioni analizzati variava da poche decine (Ryeneason e Armbrust, 2004) a diverse centinaia (Evans *et al.*, 2005). Chiaramente numeri più alti forniscono dati più affidabili, visto l'elevatissimo polimorfismo che i microsatelliti hanno evidenziato fino a questo momento in organismi fitoplanctonici.

Per l'identificazione di specie criptiche o studi filogenetici è sufficiente un numero minore (< 20) di campioni. In ogni caso, a seconda della domanda specifica, può essere necessario campionare in modo tale da coprire tutta la possibile variazione su scala spaziale (geografica e lungo la colonna d'acqua) e temporale (stagionale) dei taxa oggetto di studio.

Per studi sul DNA ambientale il campione d'acqua raccolto viene dapprima prefiltrato per eliminare la componente di dimensioni maggiori (mesozooplankton) e quindi filtrato su filtri con una porosità di 0,2 μm (Millipore) se si vuole analizzare l'intera comunità. Per studi più mirati, è possibile raccogliere diverse frazioni dimensionali con filtrazioni successive su porosità decrescenti. Il filtro da analizzare è poi congelato in azoto liquido e conservato a -80 °C.

27.4 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DI ACIDI NUCLEICI

L'estrazione e la purificazione di DNA genomico totale da cellule fitoplanctoniche provenienti da colture in fase esponenziale o da campioni di acqua di mare può essere eseguita utilizzando vari kits specifici per materiale vegetale. Il kit più utilizzato è il DNeasy Plant Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Le cellule fitoplanctoniche sono centrifugate o raccolte per filtrazione su filtri Millipore a differente diametro dei pori, quindi si procede con l'estrazione del DNA genomico totale secondo le istruzioni dei kits, che si basano essenzialmente sull'utilizzo di resine in colonnine di separazione con membrane di silicio, utilizzate in sistemi di centrifugazione. Le tecniche classiche di estrazione del DNA, invece, non utilizzano sistemi di filtrazione in colonnina. Il metodo più diffuso vede l'utilizzo del detergente cationico CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide). Le cellule vengono incubate nel tampone di estrazione contenente CTAB, la soluzione viene lavata successivamente con cloroformio ed il DNA viene precipitato in una soluzione di alcool e sali (Varela-Alvarez *et al.*, 2006).

27.4.1 Estrazione del DNA con il metodo CTAB

Un esempio di protocollo di estrazione del DNA con il tampone CTAB viene presentato qui di seguito:

Tampone di estrazione CTAB

Reagenti	Conc. final. in H ₂ O	Quantità 100 ml ⁻¹ tampone	Concentrazioni stock
CTAB	2% peso/volume	2 g	-
PVP	2% peso/volume	2 g	-
NaCl	1,4 M	28 ml	5 M
EDTA pH 8,0	20 mM	4 ml	0,5 M pH 8,0
Tris-HCl pH 8,0	100 mM	10 ml	1 M pH 8,0
Beta-Mercaptoetanololo	2%	Aggiungere 20 µl ml ⁻¹ prima dell'uso	

Procedimento

1. Filtrare la coltura di microalga su filtri con diametro di pori da 0,2 – 0,5 µm e inserire il filtro in un tubo Eppendorf, oppure centrifugare la coltura per 15 min a 4000-5000 rpm. Eliminare il sopranatante e trasferire il pellet in un tubo Eppendorf; spin per qualche secondo; eliminare il sopranatante.
2. Aggiungere 500 µl (o 1 - 2 ml) di tampone di estrazione CTAB e beta-mercaptoetanololo al tubo Eppendorf, vortexare vigorosamente per pochi secondi sotto cappa.
3. Incubare a +65°C per 45 min e agitare ogni 15 min.
4. Rimuovere il filtro dal tubo Eppendorf e mettere il tubo in ghiaccio per 5 min.
5. Aggiungere 500 µl di una soluzione di Cloroformio-Alcol Isoamilico (96 Clo : 4 AI, v:v) e miscelare a mano per 1 min.
6. Centrifugare a 14500 rpm in una minicentrifuga per 15 min.
7. Trasferire il sopranatante (fase acquosa) in un nuovo tubo Eppendorf facendo attenzione di non toccare la fase bianca intermedia tra la fase superiore e la fase inferiore verde col cloroformio. Eliminare il precedente tubo con le vecchie fasi.
8. Ripetere lo step Cloroformio-Alcol Isoamilico fino a che il sopranatante non è chiaro (step 5-7), almeno una volta.
9. Aggiungere 500 µl di Isopropanolo tenuto a -20°C alla fase acquosa e miscelare gentilmente a mano, quindi incubare a -20°C for 2 ore oppure overnight.
10. Centrifugare a 14500 rpm for 15 min.
11. Scaricare il sopranatante molto attentamente inclinando il tubo. Verificare la presenza di un piccolissimo pellet nel fondo del tubo sul lato della centrifugazione.
12. Lavare il pellet con 500 µl di etanolo al 75%.
13. Centrifugare a 13000 rpm per 15 min.
14. Rimuovere l'etanolo molto delicatamente, e lasciare asciugare il pellet facendo evaporare completamente le tracce di etanolo all'aria.

Il pellet di DNA può essere spedito a temperatura ambiente. Se il DNA viene utilizzato per una reazione di amplificazione di PCR procedere come indicato allo step 26 (vedi sotto). È importante eliminare tutto l'RNA presente utilizzando anche la seguente procedura:

1. Aggiungere 200 µl di acqua distillata e 4 µl di enzima RNA-asi A.
2. Incubare il tubo a +37°C per ½ - 1 ora.
3. Aggiungere un ugual volume di Cloroformio-Alcol Isoamilico (96 : 4, v:v) e agitare delicatamente.
4. Centrifugare a 14500 rpm per 15 min.

-
5. Aspirare la fase superiore in un nuovo tubo.
 6. Aggiungere 3 volumi di etanolo al 95-100% e 1/10 volume di 3,3 M Na-acetato e miscelare delicatamente.
 7. Mettere a -20°C per 2 ore oppure overnight.
 8. Centrifugare a 14500 rpm for 15 min e scaricare il sopranatante con molta attenzione.
 9. Lavare il pellet con 500 μl di etanolo al 75%.
 10. Centrifugare a 13000 rpm for 15 min.
 11. Rimuovere l'etanolo molto delicatamente, e lasciare asciugare il pellet facendo evaporare completamente le tracce di etanolo all'aria.
 12. Aggiungere al pellet di DNA 20 - 25 μl di acqua distillata.
 13. Portare in soluzione il DNA per poche ore a temperatura ambiente. La soluzione di DNA è pronta per le analisi di PCR.

Conservare il DNA in piccole aliquote, se usato di frequente, a $+4^{\circ}\text{C}$ fino a qualche giorno. Altrimenti, conservare la soluzione di DNA a -20°C per periodi più lunghi (qualche mese), oppure a -80°C per anni.

L'estrazione di DNA può essere eseguita direttamente anche da cellule singole. Questo metodo ha il vantaggio di ottenere il DNA da cellule di cui non si dispone della coltura e di poter lavorare sulla diversità individuo - specifica (vedi paragrafo sulla genetica di popolazione). Singole cellule sono isolate con una micropipetta e inserite direttamente in tubi da PCR contenenti il tampone di lisi o acqua distillata MilliQ. Per dettagli ulteriori sulla composizione dei tamponi e sulla lisi cellulare si rimanda a differenti protocolli di vari autori tra cui uno dei più recenti è quello di Gribble e Anderson (2006).

Per studi di genetica di popolazione la necessità di lavorare con un alto numero di campioni e di misurare polimorfismi individuo-specifici impone da una parte l'estrazione del DNA da singole cellule o da un numero molto ridotto di cellule e dall'altro di utilizzare molte precauzioni per evitare le contaminazioni nelle fasi di crescita delle colonie o di estrazione del DNA. La crescita delle colonie dovrebbe essere limitata al minimo tempo indispensabile e controllata per evitare che avvenga riproduzione sessuata che potrebbe portare a ricombinazione e quindi ad una variazione dei genotipi rispetto alle condizioni naturali.

Le tecniche di analisi genomica, descritte nell'ultimo paragrafo di questo capitolo, presuppongono l'estrazione di RNA e la sua trasformazione in cDNA (complementary DNA).

27.4.2 Quantificazione di DNA mediante gel di Agarosio

Il DNA genomico estratto viene visualizzato su un trans-illuminatore con lampade UV sfruttando la fluorescenza emessa dal bromuro di etidio intercalato nella doppia elica del DNA (Sambrook e Russel, 2001) e quantificato per confronto con DNA di peso molecolare noto. La quantificazione avviene mediante gel di agarosio sottoposto a carica voltaica in soluzione TAE o TBE (Sambrook e Russel, 2001) alla quale viene aggiunto bromuro di etidio. Il DNA genomico purificato viene caricato su gel parallelamente allo standard (DNA di peso molecolare noto). La quantità di fluorescenza emessa è proporzionale alla quantità di DNA nel campione, che può quindi essere stimata confrontando la luce emessa dal DNA del campione con quella delle quantità note di DNA degli standard. L'acquisizione di immagine della fluorescenza delle bande avviene tramite l'utilizzo di strumenti quali ad esempio il Gel Doc (BioRad, Hercules, CA, USA) che permette di quantificare la fluorescenza delle bande del DNA genomico contro quelle di un marcatore molecolare caricato sul gel a quantità scalari note (Sambrook e Russel, 2001).

27.4.3 Quantificazione di DNA mediante spettrofotometro

Il metodo spettrofotometrico sfrutta la capacità degli acidi nucleici di assorbire la luce UV. Lo spettro di assorbimento varia da 230 nm a 280 nm con un massimo di assorbimento ad una lunghezza d'onda

di 260 nm. I campioni di acidi nucleici possono essere contaminati da altre molecole (proteine, fenoli e altri composti organici). Poiché questi composti hanno il loro spettro di assorbimento, per stabilire la purezza del campione è possibile comparare l'assorbimento ad altre lunghezze d'onda all'assorbimento a 260 nm. Poiché le proteine assorbono a 280 nm, il rapporto 260:280 è comunemente usato per stimare la purezza degli acidi nucleici rispetto alle proteine. Un DNA puro dovrebbe avere un rapporto di circa 1,8. Il fenolo mostra un massimo d'assorbimento a 270 nm, quindi un campione non contaminato dovrebbe avere un rapporto 260:270 intorno a 1,2. L'assorbanza a 230 nm infine riflette la contaminazione del campione da parte di altre sostanze organiche. Per campioni puri il rapporto 260:230 dovrebbe essere intorno a 2,0 (Sambrook e Russel, 2001).

27.5 ANALISI DEL DNA AMBIENTALE

Tale approccio si basa sull'identificazione delle specie fitoplanctoniche attraverso l'analisi di specifici frammenti di DNA, ottenuti da campioni naturali. Le differenti tecniche permettono il riconoscimento tassonomico di quegli organismi che sono di difficile identificazione o che non hanno caratteristiche identificabili al microscopio ottico. Inoltre, utilizzando primers specifici, è anche possibile studiare la diversità di un singolo genere in una data area senza dover isolare e mantenere in coltura un gran numero di ceppi algali.

27.5.1 Analisi di PCR per l'identificazione di specie fitoplanctoniche

L'identificazione tassonomica molecolare di una specie o di un genere basata sul metodo di PCR consiste nell'amplificazione di regioni genomiche bersaglio taxon-specifiche mediante l'uso di primers disegnati su sequenze nucleotidiche note dei gruppi microalgali di interesse.

La lunghezza del frammento amplificato rappresenta il segnale di identificazione taxon specifico. I geni ribosomali, quali le regioni D1/D2/D3 del gene LSU (Large Subunit), il 5.8S, e le regioni non codificanti ITS (Internal Transcribed Spacer) ed ETS (External Transcribed Spacer) sono tradizionalmente impiegate per il disegno di primers specifici in quanto risultano idonee (regioni conservate e altamente variabili) per la discriminazione di specie e generi in campioni ambientali (Guillou *et al.*, 2002; Penna *et al.*, 2007). Inoltre, è disponibile un elevato numero di sequenze di regioni ribosomali depositate in diverse banche dati, quali Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/>) e DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>). Per il disegno della coppia di primers taxon specifica è essenziale effettuare allineamenti multipli di un numero il più elevato possibile di sequenze nucleotidiche della specie target (Tab. 2). Esistono molti programmi di allineamento in rete fra i quali uno dei più usati è CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/>).

Tab. 2 - Primers disegnati sulle regioni ITS-5.8S rDNA di differenti taxa fitoplanctonici potenzialmente tossici del Mar Mediterraneo (Penna *et al.*, 2007).

Target taxa	Forward primer (5'- 3') Reverse primer (5'- 3')	Frammento amplificato (bp)	Posizione primers
<i>Alexandrium</i> spp.	F'- GCAADGAATGTCTTAGCTCAA R'- GCAMACCTTCAAGMATATCCC	135	5.8S (5'→3') 5.8S (3'←5')
<i>Dinophysis</i> spp.	F'- GCACGCATCCAAYTATCCATAAC R'-CATAACAGACACCAACGCAGG	360	ITS1 (5'→3') 5.8S (3'←5')
<i>Pseudo-nitzschia</i> spp.	F'-CGATACGTAATGCGAATTGCAA R'-GTGGGATCCRCAGACACTCAGA	111	5.8S (5'→3') 5.8S (3'←5')
<i>A. minutum</i>	F'-CATGCTGCTGTGTTGATGACC R'-GCAMACCTTCAAGMATATCCC	212	ITS1 (5'→3') 5.8S (3'←5')
<i>A. tamarense</i>	F'- TGTTACTTGTACCTTTGGGA R'- ACAACACCCAGGTTCAAT	134	5.8S (5'→3') ITS2 (3'←5')
<i>A. taylori</i>	F'-TGGTGTTTTGAATGCGGTTGT R'-GCAMACCTTCAAGMATATCCC	297	ITS1 (5'→3') 5.8S (3'←5')
<i>Protoceratium reticulatum</i>	F'-TGCTGATTGCCATCTATCTT R'-CAGAAGCGCGTTAAACAG	382	ITS1 (5'→3') ITS2 (3'←5')

Codice degenerato D = A/G/T; M = A/C; Y = C/T; R = A/G

L'analisi di PCR su campioni in coltura e su campioni ambientali deve includere tre tipi di controllo. Un controllo positivo, contenente la sequenza del gene bersaglio clonata in un plasmide, per verificare l'efficienza della reazione; un controllo negativo, contenente solo i reagenti senza il DNA stampo per testare eventuali contaminazioni con DNA estraneo; ed infine, un controllo contenente quantità note di DNA plasmidico, contenente la regione bersaglio, aggiunto al DNA dei campioni ambientali per verificare eventuali attività inibitorie sull'enzima DNA polimerasi prodotte da vari contaminanti ambientali.

27.5.1.1 Protocollo di analisi di PCR

Il protocollo di analisi di PCR viene messo a punto in relazione a molteplici variabili della reazione stessa, quali la variabile termodinamica di riassociazione dei primers, il numero dei cicli di reazione, le concentrazioni dei reagenti e del tipo di enzima polimerasi utilizzato, ed infine la quantità di DNA stampo da amplificare. Qui viene riportato un esempio di protocollo di reazione già validato in coltura e in campioni ambientali per l'identificazione di specie fitoplanctoniche potenzialmente tossiche presenti in diverse aree del bacino del Mediterraneo (Penna *et al.*, 2007).

Procedimento

Il volume di reazione di 25 µl contiene:

- 200 µM di ciascun dNTP
- 0,4 µM di ciascun primer
- 4,0 mM MgCl₂
- 1x PCR buffer (Diatheva)
- 1,0 U di Taq Polimerasi (Diatheva)
- acqua distillata (volume finale)
- 0,5 - 1 ng di DNA.

Protocollo termico

Uno step di denaturazione iniziale di 10 min a 95°C, 35 cicli di 30 sec a 95°C (denaturazione), 30 sec a 58°C (riassociazione dei primers) e 30 sec a 72°C (estensione), e 7 min a 72°C (estensione finale). I prodotti di PCR sono visualizzati in elettroforesi su gel di agaroso al 1,8% (w/v). La presenza o assenza

di frammenti di DNA amplificati con pesi molecolari noti dei campioni analizzati indica se il taxon era presente o assente nel campione ambientale.

Controllo della specificità della reazione

La specificità delle reazioni di PCR può essere valutata amplificando DNA purificati delle specie target e su DNA di altre specie affini e sequenziando i prodotti amplificati; le sequenze ottenute dovranno corrispondere a quelle delle regioni target di DNA del genere o della specie di interesse.

Sensibilità dell'analisi di PCR

La sensibilità dell'analisi di PCR può essere testata con diluizioni seriali (10^4 , 10^3 , 10^2 e 10^1 copie) del DNA plasmidico contenente la sequenza del gene clonato della specie target e con diluizioni seriali del DNA genomico (100, 10, 1 pg) della specie target in presenza di DNA estraneo ambientale contenente popolazioni miste fitoplanctoniche in cui la specie target non è presente. L'analisi di PCR è in grado di amplificare fino a 10 copie di DNA plasmidico e 1 pg di DNA genomico. La presenza di DNA estraneo non deve influire sulla sensibilità del saggio di PCR.

27.5.1.2 Analisi di PCR su campioni ambientali

Una volta che la tecnica qualitativa di PCR è stata messa a punto su colture, si rende necessario validare il metodo in campioni ambientali per testare eventuali reazioni di falsi positivi con altri organismi. L'estrazione di DNA genomico totale (vedi paragrafo 4) e le analisi di PCR per l'identificazione specifiche di taxa microalgali (Fig. 1) possono essere applicate su campioni freschi di acqua di mare o retinate che vanno poi processate subito, oppure fissate preferibilmente in soluzione Lugol per essere conservate a +4°C prima delle analisi.

27.5.1.3 Vantaggi e svantaggi

Il metodo di PCR risulta utile per l'identificazione taxon specifica con un elevato grado di accuratezza, soprattutto per quelle specie di difficile identificazione con la microscopia ottica. L'analisi del campione richiede poco tempo (due/tre ore) rispetto all'analisi tradizionale di microscopia, e per questo il metodo può essere applicato ad un discreto numero di campioni ambientali. Gli svantaggi del metodo sono legati agli inibitori della reazione di PCR che non vengono eliminati durante la purificazione del DNA genomico o con l'inattivazione al calore, alle reazioni aspecifiche di amplificazione (prodotti aspecifici rispetto a quello taxon specifico), e al limitato numero di primers disponibili che al momento non possono coprire tutta la diversità delle specie fitoplanctoniche presenti in mare.

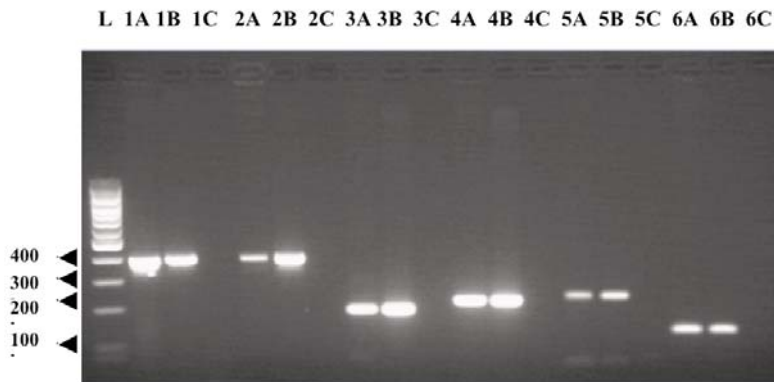


Fig. 1 - Analisi di PCR di taxa microalgali. Il DNA genomico (1 ng) di specie HABs (Harmful Algal Blooms) è stato amplificato in presenza di DNA non target con primers specifici per *Lingulodinium polyedrum* (1A), *Protoceratium reticulatum* (2A), *Fibrocapsa japonica* (3A), *O. ovata* (4A), *O. cf. siamensis* (5A), *Coolia monotis* (6A). L, standards molecolari; lane A, prodotti di amplificazione specie specifici; lane B, controllo positivo (10^3 copie di DNA plasmidico contenente la sequenza ITS-5.8S rDNA clonata della specie target); lane C, controllo negativo contenente vari DNA di specie microalgali non target provenienti da colture monoclonali (modificato da Penna *et al.*, 2007).

27.5.2 DNA ambientale e librerie clonali

Un chiaro esempio della potenzialità delle tecniche di analisi del DNA ambientale è l'analisi della componente fitoplanctonica di taglia più piccola, che è composta, oltre che da cianobatteri, anche da una frazione cospicua di eucarioti fotosintetici, che sono difficilmente classificabili anche solo a livello di classe a causa della piccola taglia e della delicatezza della loro struttura, facilmente alterabile dai fissativi. Eppure questi piccoli eucarioti fotosintetici rappresentano spesso la porzione più abbondante della comunità fitoplanctonica giocando un ruolo fondamentale nel processo di produzione primaria sia in acque costiere (Worden *et al.*, 2004) che in mare aperto (Li, 1995).

La metodica consiste nell'estrazione, da un volume definito di acqua di mare, del DNA totale, seguita dall'amplificazione attraverso una reazione di PCR del frammento desiderato utilizzando primers per il marcatore scelto e per il livello tassonomico desiderato. Il prodotto di PCR così ottenuto contiene i frammenti desiderati dei diversi organismi presenti nel campione. I singoli frammenti vengono quindi separati utilizzando la tecnica del clonaggio. Tale tecnica prevede l'inserimento dei frammenti in un'opportuna molecola vettore con formazione di una molecola di DNA ricombinante. Le molecole ricombinanti vengono poi introdotte (trasformazione) e fatte moltiplicare in cellule batteriche ospiti (ciascuna cellula che genera una colonia conterrà un solo frammento). In questo modo si possono ottenere numerose copie uguali dei frammenti di partenza e quindi grandi quantità del DNA corrispondente, che potrà poi essere analizzato.

27.5.2.1 Estrazione DNA totale

Dal campione raccolto sul filtro, il DNA può essere estratto utilizzando il metodo del CTAB (vedi paragrafo 4.1).

27.5.2.2 Scelta del gene bersaglio

Viene generalmente utilizzato il gene per la subunità minore del ribosoma (18S rDNA). Tali studi hanno messo in evidenza l'alto livello di diversità, sia in termini di numero di differenti OTUs (Operational Taxonomic Units), sia in termini di nuove linee (Diez *et al.*, 2001; Lòpez-Garcia *et al.*, 2001; Moon-van der Staay *et al.*, 2001). I primers universali per il gene 18S hanno come target sia gli organismi au-

totrofi che gli eterotrofi. Utilizzando invece geni plastidiali, quali il 16S rDNA, si ottengono informazioni sulla sola comunità fototrofa (Fuller *et al.*, 2006; McDonald *et al.*, 2007b). I primers universali per il 16S rDNA sono abbastanza specifici da riconoscere i fototrofi ossigenici ed escludere i batteri eterotrofi, ma c'è comunque il rischio di ottenere poche sequenze plastidiali rispetto a quelle dei cianobatteri, numericamente più abbondanti. Recentemente è però stato disegnato un primer specifico per i plastidi algali marini che potenzialmente esclude i cianobatteri (Fuller *et al.*, 2006). In pochi studi invece, sono stati utilizzati altri marcatori plastidiali quali il *psbA*, codificante per la proteina D1 del fotosistema II (Zeidner, 2003) e l'*rbcL* per la ribulosio-1,5- bifosfato carbossilasi (Yongjian *et al.*, 2006).

27.5.2.3 Analisi di PCR

Il DNA estratto viene amplificato con una reazione di PCR (paragrafo 8.1) utilizzando i primers universali per il marcatore scelto (Tab. 3).

Tab. 3 - Lista di alcuni primers utilizzati per differenti geni bersaglio per la costruzione di librerie clonali.

Marcatore	Primer	Sequenza del primer (5')	Bibliografia
18S	EUK-328f	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	Moon-van der Staay <i>et al.</i> , 2000
	EUK-329r	TGATCCTTCYGCAGGTTTAC	Moon-van der Staay <i>et al.</i> , 2000
16S	PLA491F	GAGGAATAAGCATCGGCTAA	Fuller <i>et al.</i> , 2006
	OXY1313R	CTTCACGTAGGCGAGTTGCAGC	West e Scanlan, 1999
<i>psbA</i>	58-VDIDGIREP-66	GTNGAYATHGAYGGNATHMGNGARCC	Zeidner <i>et al.</i> , 2003
	331-MHER-NAHNFP-340	GGRAARTTRTGNGCRRTNCKYTCRTGC-AT	Zeidner <i>et al.</i> , 2003

27.5.2.4 Clonaggio e minipreparazione

Il prodotto di PCR, una volta purificato con kit specifici (QIAquick PCR purification kit, Qiagen, CA, USA), viene clonato. Il primo passaggio è la reazione di ligasi in cui i prodotti di PCR vengono inseriti nel vettore. Le molecole ricombinanti così formate vengono trasferite in cellule batteriche rese competenti attraverso un trattamento chimico o fisico (elettroporazione). Le cellule batteriche trasformate vengono quindi piastrate e incubate per permetterne la crescita. Almeno 100 colonie per campione vengono prelevate e utilizzate per allestire le minipreparazioni con kit specifici. In questo modo si crea una libreria che includa i frammenti amplificati degli organismi presenti nell'ambiente naturale. Questi cloni vengono infine sequenziati in modo da ottenere una serie di sequenze della regione amplificata virtualmente di tutti gli organismi presenti nel campione. Tali sequenze vengono paragonate con quelle disponibili in database pubblici (GenBank o EMBL) o precedentemente prodotte da materiale di coltura per ricavare informazioni circa la loro identità e/o relazione con specie note.

Materiale richiesto

- kit per il clonaggio
- kit per le minipreparazioni
- eppendorf da 1,5 ml
- pipette automatiche
- puntali per pipette automatiche
- anse sterili

-
- tubi di plastica sterili per coltura
 - cuvette da 0,1-0,2 cm (per l'elettroporazione)
 - piastre LB contenenti 50 µg ml⁻¹ di ampicillina
 - terreno LB contenente 50 µg ml⁻¹ di ampicillina
 - X-gal (40 µg ml⁻¹) in dimetilformammide
 - IPTG (100 mM)
 - acqua distillata
 - bagno termostatico
 - elettroporatore (per l'elettroporazione)
 - incubatore con agitazione a +37 °C
 - incubatore a +37 °C

Procedimento

Il clonaggio viene effettuato con kit specifici quali TOPO-TA Cloning[®] kit (InvitrogenTM Life Technologies, Carlsbad, California) seguendo le istruzioni della ditta. Le minipreparazioni vengono allestite con i kits specifici, quali Millipore Montage Plasmid Miniprep kit (Millipore Corporate, 290 Concord Rd., Billerica, MA 0182, USA) o QIAprep Spin Miniprep Kit, seguendo le istruzioni della ditta.

Analisi delle sequenze

Molti autori hanno posto l'attenzione sulle limitazioni intrinseche di un metodo basato sulla PCR, la più insidiosa delle quali è forse la formazione di sequenze chimeriche (Acinas *et al.*, 2005). Si tratta di sequenze composte di due o più sequenze distinte che si combinano accidentalmente durante l'amplificazione. Per individuare potenziali chimere, possono essere utilizzati programmi come CHECK CHIMERA (Cole *et al.*, 2003). Tuttavia, poiché l'efficienza di questi programmi dipende dalla completezza del database, è sempre consigliato un controllo manuale di tutte le presunte nuove sequenze.

27.5.2.5 Vantaggi e svantaggi

Il metodo è utile per costruire una banca dati di sequenze genomiche per un'area geografica che viene studiata per la prima volta, ed è particolarmente vantaggioso, specie se accoppiato ad altri metodi quantitativi come la citometria a flusso e l'analisi dei pigmenti, per lo studio del fitoplancton in aree oligotrofiche, dove dominano nanoflagellati e piceocarioti non distinguibili al microscopio ottico. Tuttavia, è necessario che ci sia già disponibile un pool di sequenze di organismi noti con cui paragonare le nuove sequenze in modo da ridurre il numero di sequenze non note. Le sequenze ottenute da DNA ambientale possono essere anche una base per disegnare oligonucleotidi specifici necessari per altri metodi molecolari. Uno dei problemi è la valutazione della descrizione della diversità ottenuta con questo metodo. Si possono usare curve di rarefazione o curve di accumulo (Smith e Smith, 2007), mettendo in grafico il numero totale di specie identificate in funzione del numero di sequenze effettuate. La curva avrà un andamento esponenziale fino a raggiungere un asintoto quando tutte le specie esistenti in quell'aria saranno state identificate. In generale, il metodo è molto laborioso e richiede tempi lunghi, ed è alquanto costoso in relazione al numero di cloni da sequenziare.

27.6 DNA AMBIENTALE E TECNICHE DI FINGERPRINTING

In alternativa alla costruzione di librerie clonali, è possibile separare i frammenti amplificati direttamente su gel con varie tecniche, note come tecniche di fingerprinting.

27.6.1 TGGE/DGGE

TGGE/DGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Muyzer, 1999): piccoli frammenti di DNA (~ 500 bp) che differiscono per almeno un nucleotide, possono essere separati tramite elettroforesi attraverso un gradiente lineare di denaturante chimico, come urea o formamide (DGGE), o attraverso un gradiente lineare di temperatura (TGGE).

27.6.1.1 Vantaggi e svantaggi

Queste tecniche permettono la determinazione qualitativa e semi-quantitativa della diversità in campioni ambientali. Molti campioni possono essere comparati su un singolo gel. Limitazioni sono la scelta dei primers e l'ottimizzazione delle condizioni di corsa del gel prima che la tecnica possa essere usata per comparare polimorfismi di sequenza di un particolare gene. Inoltre, è difficile comparare gel diversi, quindi sono necessari gel multipli e diverse combinazioni di campioni in relazione al numero di campioni da analizzare. Si tratta di tecniche costose per la speciale strumentazione necessaria.

27.6.2 SSCP

SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) (Orita *et al.*, 1989). Simile alle precedenti, la tecnica consiste nel denaturare un piccolo prodotto di PCR in modo da separare i singoli filamenti, che tenderanno a ripiegarsi su se stessi per aumentare la loro stabilità. Sottoposti ad elettroforesi in un gel di poliacrilammide non denaturante, i frammenti vengono separati in base alla loro taglia e forma, dato che un cambiamento anche di una sola base ha effetto sulla struttura secondaria e quindi sulla mobilità nel gel.

27.6.2.1 Vantaggi e svantaggi

Molti prodotti di PCR possono essere analizzati contemporaneamente e, rispetto al TGGE/DGGE, richiede un'attrezzatura meno costosa. Inoltre, lavorando con un singolo filamento si riduce la probabilità di formazione di heteroduplex. La sensibilità del metodo tende a decrescere con l'aumentare della lunghezza del frammento amplificato.

27.7 APPLICAZIONE DEI METODI MOLECOLARI PER STUDI DI TASSONOMIA E FILOGENESI

Gli studi di filogenesi includono la scelta dei marcatori, l'allineamento corretto delle sequenze ottenute dagli individui diversi, la deduzione dei rapporti filogenetici fra le sequenze ed il supporto statistico del modello ottenuto.

27.7.1 La scelta del marcatore

Il marcatore preferenziale dipende dal livello filogenetico di analisi. I rapporti fra gruppi vicini sono risolti al meglio usando marcatori con un elevato tasso di sostituzione in quanto la loro sequenza è libera da costrizioni funzionali. Gli esempi sono gli spaziatori dell'RNA ribosomale (le regioni ITS) o gli spaziatori o le posizioni in terza base di geni codificanti proteine. Per la risoluzione di rapporti fra più gruppi distanti ci si serve delle sottounità grandi e piccole dell'RNA ribosomale (LSU e SSU) o di geni codificanti proteine a basso tasso di mutazione (Fig. 2).

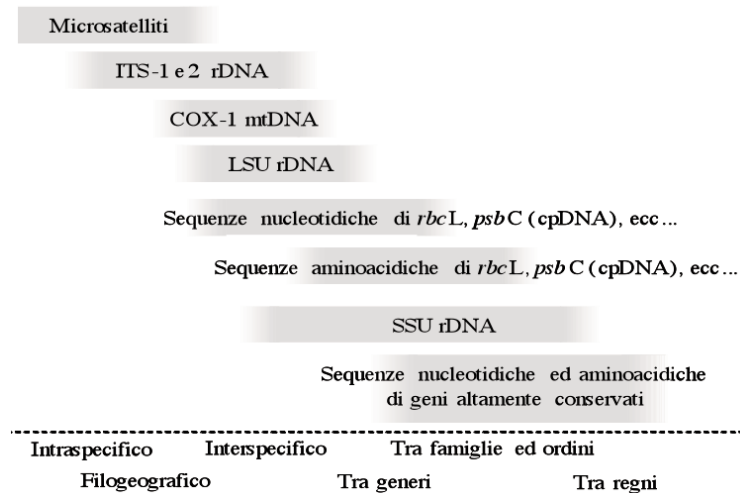


Fig. 2 -Ambito di applicazione delle regioni di DNA più utilizzate quali marcatori molecolari. In basso sono indicati i livelli di analisi.

27.7.2 Allineamento delle sequenze

L'allineamento di più sequenze implica il posizionamento relativo delle sequenze stesse in un modo tale che le basi corrispondenti in ogni colonna siano omologhe, cioè, condividano la stessa storia evolutiva. In diversi geni codificanti, l'allineamento di sequenza è semplice perché le posizioni sono funzionalmente conservate e conseguentemente la sequenza ha la stessa lunghezza in tutti gli individui inclusi nello studio. Qualunque inserimento o qualunque soppressione di una base nella catena nucleotidica, rende subito non funzionale l'intera sequenza, con effetti letali sull'organismo. Anche le sequenze dell'RNA ribosomale, nonostante non codifichino per proteine, contengono zone funzionali e quindi più conservate. Tali regioni hanno la funzione di mantenere la struttura spaziale della molecola in modo da permettere il funzionamento del ribosoma. Per allineare poche sequenze o per aggiungere nuove sequenze ad un set di sequenze già allineato, è possibile utilizzare programmi che permettono di spostare manualmente le basi in modo da creare spazi che permettano di allineare le posizioni omologhe. Questo processo manuale è sconsigliato nel caso in cui si voglia allineare un gran numero di sequenze. In questo caso si consiglia di utilizzare programmi appositi, che lavorano su assunzioni predeterminate. Un programma disponibile in rete e facile da usare può essere trovato al sito: <<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>>. Un altro programma frequentemente usato è BioEDIT www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html, che permette anche di rifinire manualmente l'allineamento ottenuto.

27.7.3 Metodi di analisi filogenetiche

Una volta che le sequenze sono allineate e che è stata effettuata una scelta sulle posizioni da includere nell'analisi filogenetica, ci troviamo di fronte alla scelta successiva di quale approccio filogenetico utilizzare. Esistono fondamentalmente quattro approcci distinti. I metodi di distanza ricostruiscono la topologia dell'albero unendo progressivamente le coppie di sequenze con le distanze più basse (Neighbor Joining). I metodi di parsimonia ricostruiscono le ipotesi di rapporti fra sequenze in base a quelli che richiedono il minor numero di sostituzioni sul DNA (Maximum Parsimony). I metodi di massima verosimiglianza (Maximum Likelihood) valutano le ipotesi evolutive in base alla probabilità che il modello proposto e la storia evolutiva ipotizzata portino alla situazione attuale. In tal modo, si calcola la probabilità

di osservare i dati presenti in base a diversi modelli evolutivi e ad una serie di alberi possibili. Il modello cerca l'albero con la più alta probabilità (likelihood). I metodi Bayesiani, invece, stimano la probabilità della filogenesi in base ai dati presenti e ad un modello pre-esistente di evoluzione dei dati. Gli ultimi due metodi richiedono un grosso sforzo computazionale, mentre il metodo di Neighbor Joining è estremamente rapido. L'analisi Bayesiana fornisce la probabilità statistica che il raggruppamento osservato sia corretto, mentre gli altri tre metodi hanno bisogno di una pesante procedura computazionale, chiamata di "bootstrapping", per ottenere i valori di supporto statistico dei cladi osservati nell'albero. Informazioni su un numero elevato di programmi di filogenesi possono essere trovate al sito: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.htm>. La maggior parte dei programmi può essere scaricata gratuitamente. I programmi frequentemente usati sono elencati più sotto ed una spiegazione più completa di ciascuno dei metodi usati può essere trovata nei manuali di:

- PAUP* <http://paup.csit.fsu.edu/>
- PHYLIP <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>
- TREECON http://bioinformatics.psb.ugent.be/software_details.php?id=3
- MrBayes <http://morphbank.ebc.uu.se/mrbayes/>
- MEGA <http://evolgen.biol.metro-u.ac.jp/MEGA/manual/default.html>
- TNT <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/TNT>.

La velocità con la quale il Maximum Likelihood e l'analisi Bayesiana forniscono un albero migliora notevolmente, se un modello di evoluzione dei dati viene fornito al programma. Il Modeltest (usato con PAUP*) ed il MrModeltest (usato con MrBayes) calcolano il miglior modello di sostituzioni di basi, dato un albero ed un set di dati pre-esistente. I programmi sono scaricabili dai siti: <http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html> e <http://www.ebc.uu.se/systzoo/staff/nylander.html>. Un programma paragonabile che calcola modelli per dati di allineamenti proteici può essere ottenuto al sito: <http://darwin.uvigo.es/software/protest.html>. Per dettagli ulteriori si faccia riferimento ai manuali di programmi.

27.7.4 Alberi filogenetici

Gli alberi filogenetici possono essere presentati in formati diversi. In tutti gli alberi filogenetici i rapporti sono presentati sotto forma di una serie di cladi collocati uno all'interno dell'altro. Un filogramma è un albero in cui la lunghezza dei rami è rapportata alle differenze di sequenza. In un cladogramma, invece, le lunghezze dei rami non hanno significato; soltanto l'ordine delle ramificazioni è pertinente. In un albero ultrametrico, le lunghezze dei rami vengono riaggiustate in modo che tutti i taxa terminali siano situati alla stessa altezza. Quest'albero assume che il tasso di evoluzione sia costante lungo tutti i rami e che la lunghezza dei rami sia direttamente correlata al tempo trascorso. Un clade rappresenta un gruppo monofiletico, cioè un gruppo di taxa con un antenato comune con le stesse caratteristiche principali (per esempio, i mammiferi). Un grado o gruppo parafiletico è un gruppo di taxa con un antenato comune, ma con parte della discendenza che ha acquisito caratteristiche diverse (ad esempio, i pesci sono parafiletici perché i rettili ed i mammiferi sono derivati da loro). Un gruppo polifiletico è un gruppo di organismi che condividono caratteri particolari, ma che non hanno un antenato comune da cui questi tratti discendono (per esempio, i pipistrelli e gli uccelli). È importante utilizzare alcune regole empiriche per ottenere un albero corretto. Primo, la topologia degli alberi dovrebbe essere orientata rispetto ad un 'outgroup' che costituisce la radice dell'albero stesso. Un outgroup viene scelto all'interno di un gruppo di taxa che è vicino a quelli oggetto di studio (ingroup), ma che manca di alcune caratteristiche dell'ingroup. Secondo, i valori di supporto statistico dei rami (valori di bootstraps) devono superare almeno il 50% e preferibilmente il 70%. I valori Bayesiani di probabilità a posteriori dovrebbero essere al di sopra di 0,95.

27.8 APPLICAZIONE DEI METODI MOLECOLARI PER ANALISI DI POPOLAZIONE

Lo studio delle popolazioni di organismi fitoplanctonici è di fondamentale importanza per chiarire la distribuzione, l'ecologia e le dinamiche spazio/temporali delle specie. Questo livello d'analisi è il campo della genetica di popolazione e della filogeografia. Per le analisi filogeografiche, ovvero per lo studio dei rapporti filogenetici fra popolazioni all'interno della stessa specie, marcatori di sequenza variabili, come spaziatori intergenici (es. ITS) o introni, possono essere analizzati con le stesse tecniche di laboratorio descritte in precedenza. La differenza però risiede nelle tecniche di analisi dei dati. Le analisi di genetica di popolazione, invece, utilizzano marcatori altamente variabili, alcuni dei quali sono in grado di individuare polimorfismi individuo-specifici (Procaccini e Maltagliati, 2003) e vanno sotto il nome di DNA fingerprinting. Fra i marcatori maggiormente utilizzati possiamo annoverare i microsatelliti e gli AFLP (Tab. 1).

27.8.1 I marcatori

Diversi tipi di marcatori sono in grado di evidenziare polimorfismi a livello di singolo genotipo ma esistono criteri diversi che bisogna considerare per la scelta del marcatore da utilizzare per un lavoro di genetica di popolazione. Per considerazioni esaustive sui marcatori da utilizzare vedi Procaccini e Maltagliati (2003). In generale va rilevato che esistono marcatori multi-locus (come gli AFLP), che analizzano contemporaneamente i polimorfismi di un numero elevato di loci genici, e marcatori single-locus (microsatelliti). I primi sono potenzialmente i più polimorfici, ma hanno lo svantaggio di fornire dati (profili di bande o di picchi elettroforetici) che non sono facilmente interpretabili e replicabili e di soffrire della possibile presenza di DNA batterico contenuto nel campione. Inoltre, il tipo di dato che essi forniscono non permette che stime indirette della eterozigosi. Per i protocolli di messa a punto dell'AFLP rifarsi alla letteratura recente. I microsatelliti invece sono marcatori co-dominanti e permettono la precisa determinazione degli alleli e la stima dell'eterozigosi (Fig. 3). Essi sono considerati al momento marcatori di elezione per lo studio della genetica di popolazione, anche in base all'ampia statistica che è stata sviluppata al riguardo.



Fig. 3 - Locus microsatellite. L'allele 1 è costituito da una ripetizione (ca/gt)₈, l'allele 2 da (ca/gt)₇. I triangoli indicano la zona di attacco di primers; lo spazio fra i primers definisce la dimensione dei prodotti di amplificazione.

I microsatelliti sono specie-specifici e la loro ricerca all'interno del genoma di una specie nuova richiede la costruzione di librerie genomiche e la loro ibridazione con oligonucleotidi sintetici. Esistono al momento ditte private che svolgono la ricerca di loci microsatelliti da specie nuove e/o la messa a punto del sistema e lo screening della diversità a prezzi relativamente contenuti (es: Merigen - sebastiano.dibiase@merigen.it; Ecogenics - <http://www.ecogenics.ch/>). Nel caso si lavori con specie microalgali per le quali i marcatori sono già disponibili in letteratura, si dovrà comunque verificare l'applicabilità del protocollo pubblicato sui ceppi algali di quella specie disponibili. Per un dettaglio sulla tecnica vedi Andreakis *et al.* (2007) o qualunque numero della rivista *Molecular Ecology Resources* (prima *Molecular Ecology Note*). Il numero di loci necessario per individuare genotipi individuo-specifici dipende

dal polimorfismo degli stessi loci e dal numero di alleli presenti nella popolazione. In genere, si usano un minimo di 6-8 loci con un minimo di 3-4 alleli per locus in una sola popolazione. Al fine di valutare il polimorfismo delle sequenze microsatelliti selezionate è necessario effettuare una sorta di esperimento pilota dove un numero variabile da 20 a 40 individui distinti provenienti possibilmente da più di una località vanno analizzati con tutti i loci disponibili.

L'applicazione della tecnica presuppone che si ottenga un DNA di buona qualità ed in quantità tale da poter effettuare tutte le reazioni di PCR richieste per valutare il polimorfismo dei loci utilizzati. Se ad esempio si pensa di lavorare con 8 loci e si utilizza una quantità di DNA pari a 20 ng per reazione, da ogni singolo individuo bisognerà avere a disposizione almeno 160 ng di DNA. In genere converrà mettere a punto reazioni di PCR in multiplex, ossia reazioni nelle quali più loci vengono amplificati contemporaneamente. In generale, il protocollo di analisi dei microsatelliti consiste nella amplificazione in PCR di regioni corte del DNA (100-400 paia di basi) contenenti le sequenze ripetute e nella valutazione dei polimorfismi esistenti in base alla taglia del frammento amplificato. Le differenze di taglia dei frammenti vengono valutate in sequenziatori automatici a gel o a capillare. La possibilità di lavorare in piastre da 96 o 384 pozzetti e la possibilità di avvalersi di stazioni robotiche di supporto ha velocizzato enormemente il lavoro di analisi. Per un protocollo di analisi specifico si consiglia di fare riferimento ai manuali delle macchine di sequenza ed alla letteratura più recente (Tomasello *et al.*, 2009, per un esempio di applicazione di procedure automatizzate all'analisi di microsatelliti).

27.8.2 Analisi dei dati

L'analisi di marcatori dominanti (quali gli AFLP) o co-dominanti (quali i microsatelliti) genera matrici di dati diverse. Nel primo caso ogni individuo sarà identificato dalla presenza/assenza dei prodotti di amplificazione (matrice 0/1); nel secondo caso le matrici di dati saranno caratterizzate dalla presenza di due valori, corrispondenti alla taglia dei due alleli, per ogni locus analizzato e per ogni individuo. I valori saranno identici per individui omozigoti. Il calcolo delle frequenze alleliche, la stima dei valori di eterozigosi attesa ed osservata, la valutazione del flusso genico fra popolazioni e delle distanze genetiche fra le stesse, sono calcolabili attraverso software specifici. Sono disponibili al momento molti programmi che effettuano analisi di genetica di popolazione e non è possibile indicare con certezza quali siano i programmi migliori. Non tutti gestiscono sia dati dominanti che codominanti.

Liste di tali programmi possono essere trovate ad esempio ai siti: www.biology.lsu.edu/general/software.html, <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html#huh>, <http://www.dorak.info/genetics/popgen.html>.

27.8.3 Problemi e possibilità

Le domande che possono essere affrontate con approcci di genetica di popolazione nel fitoplancton vanno dalla stima della variabilità delle popolazioni su scala spaziale e temporale, alla valutazione della variabilità genetica nel corso dello sviluppo delle fioriture, alla caratterizzazione delle coorti di taglia diversa nelle diatomee. Un'altra possibile applicazione vede l'utilizzo dei test di assegnazione per valutare statisticamente le popolazioni di provenienza di determinati genotipi, fra cui anche le cisti raccolte nel sedimento.

Ciononostante, i problemi da affrontare sono notevoli ed a questo punto niente è ancora realmente standardizzato. Ad esempio, come definire una popolazione e come individuarne la taglia? Come decidere il campionamento minimo significativo che sia esplicativo della genetica di una data unità di studio? Inoltre, visto che per ottenere risposte significative è importante lavorare su un alto numero di individui, l'ottimizzazione e la standardizzazione delle tecniche vanno di pari passo con l'ottimizzazione delle tecniche di prelievo e di mantenimento in coltura di individui separati e con la messa a punto di tecniche

di estrazione di DNA da un numero ridotto di cellule o da singole cellule. Per studi di riferimento sulla genetica di popolazione del fitoplancton vedi Medlin *et al.* (2000), Evans *et al.* (2005), Iglesias-Rodriguez *et al.* (2006).

27.9 TECNICHE DI IBRIDAZIONE CON SONDE

La tecnica di ibridazione più sviluppata e utilizzata è la FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) con sonde oligonucleotidiche selettive marcate. La tecnica FISH è un metodo di colorazione che permette l'identificazione genetica di specie fitoplanctoniche target con l'uso della microscopia ottica a epifluorescenza, della microscopia laser confocale o della citofluorimetria. Si tratta di una tecnica citogenetica che è utilizzata per identificare e localizzare specifiche sequenze di DNA sui cromosomi o di sequenza di RNA nei ribosomi.

Una sonda a DNA o RNA è una corta sequenza nucleotidica (10-20 paia basi) che è stata marcata con un isotopo radioattivo o con un colorante a fluorescenza o con un enzima ed è usata per localizzare una sequenza complementare nucleotidica specifica sul DNA o sull'RNA della cellula. Questa tecnica viene usata per determinazioni qualitative e quantitative di specie fitoplanctoniche potenzialmente tossiche in campioni ambientali (Anderson *et al.*, 2005). Cellule intatte e opportunamente trattate con soluzioni saline in etanolo o con glutaraldeide (Scholin *et al.*, 1999; Metfies *et al.*, 2006) vengono fatte incubare con sonde marcate con differenti coloranti fluoresciniti (fluorescina/FITC, Cyanin5, Rhodamine/Red Texas), che si legano selettivamente solo su specifiche regioni del cromosoma o del ribosoma per complementarità di sequenza. La visualizzazione dell'ibridazione specifica sonda marcata/DNA o RNA nelle cellule avviene al microscopio ottico a epifluorescenza o confocale sfruttando l'emissione e l'eccitazione selettiva dei coloranti.

La tecnica FISH può essere combinata con la citometria a flusso per identificare e quantificare le specie fitoplanctoniche tossiche, come è già stato realizzato con il picoplancton oceanico (Simon *et al.*, 1995).

27.10 TECNICHE DI ESPRESSIONE

Una serie di strumenti molecolari, che fanno parte della 'ecogenomica' (Ouborg e Vriezen, 2007) utilizzano tecniche che sono state originariamente sviluppate per organismi modello per la genomica, quali *Arabidopsis*, al fine di individuare le basi molecolari di risposte fenotipiche, quali la resistenza allo stress, la difesa dai patogeni o dagli erbivori e le fasi del ciclo vitale (Vasemägi e Primmer, 2005). Fortunatamente, queste tecniche sono sempre più facilmente applicabili ad organismi non modello, quali quelli fitoplanctonici (Procaccini *et al.*, 2007 per una review sulle applicazioni di tecniche genomiche ad organismi non modello). Mentre la maggior parte di studi di genomica su organismi modello presuppongono o mirano alla sequenza completa del genoma, esistono una serie di approcci alternativi e meno dispendiosi, applicabili in modo diretto agli organismi fitoplanctonici. Uno di questi approcci, vede la costruzione di librerie di DNA complementare (cDNA) o di EST (Expressed Sequence Tag), che rappresentano una collezione di sequenze di tutti gli RNA messaggeri (mRNA), convertiti in cDNA, che sono trascritti in un dato momento ed in una data condizione (Bouck e Vision, 2007). Il principale vantaggio tecnico è che lo sforzo di sequenza si focalizza sul numero relativamente ristretto di DNA codificato, mentre tutto il resto del genoma viene ignorato. Le librerie di EST rappresentano il punto di partenza di numerosi approcci rilevanti per l'ecologia molecolare di popolazioni naturali (Bouck e Vision, 2007). Come prima cosa, servono come punti di partenza per lo sviluppo di marcatori molecolari di seconda generazione, quali i microsatelliti legati agli EST o gli SNP (Single Nucleotide Polymorphism), che possono potenzialmente individuare segnali evolutivi e non solo processi casuali. Inoltre, essi possono fornire i dati necessari per effettuare il confronto fra librerie di cDNA ottenute in condizioni sperimentali diverse,

al fine di individuare geni candidati. Questo tipo di analisi può anche necessitare dell'utilizzo di tecniche di Real-Time PCR (PCR quantitativa) o dello sviluppo di microarrays per valutare i livelli diversi di espressione genica *cylindrus*.

I microarrays consistono di batterie di singoli cloni di cDNA organizzati su vetrino o su 'chips' fino a densità di decine di migliaia di spot in aree di pochi centimetri quadrati (Thomas e Klaper, 2004). Tali collezioni di mRNA marcati, ottenuti da organismi sottoposti a condizioni diverse, possono essere utilizzate per identificare i geni espressi in una determinata condizione e per valutarne i livelli di espressione. Un altro valido approccio consiste nel confrontare ecotipi differenti all'interno della stessa specie, al fine di identificare il livello molecolare dell'adattamento di tali ecotipi alle diverse condizioni ambientali (Whitehead e Crawford, 2006).

Nel fitoplancton, l'utilizzo di questi approcci è in continua espansione. Esistono al momento anche dati sulle librerie di EST consultabili on-line, anche da specie tossiche (<http://genome.imb-jena.de/ESTTAL/cgi-bin/Index.pl>). Le uniche sequenze complete del genoma da fitoplancton eucariotico sono delle diatomee *Thalassiosira pseudonana* e *Phaeodactylum tricornutum*, ma il sequenziamento degli interi genomi di *Pseudo-nitzschia multiseriis* e *Fragilariopsis cylindrus* sono attualmente in corso.

27.11 BIBLIOGRAFIA

- ACINAS S.G., SARMA-RUPAVTARM R., KLEPAC-CERAJ V., POLZ M. F. (2005) - PCR-induced sequence artifacts and bias: Insights from comparison of two 16S rRNA clone libraries constructed from the same sample. *Appl. Environ. Microb.*, **71**: 8966-8969.
- AMATO A., KOOISTRA W.H.C.F., LEVIALDI-GHIRON J.H., MANN D.G., PRÖSCHOLD T., MONTRESOR M. (2006) - Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist*, **158**: 193-207.
- ANDERSON D.M., KULIS D.M., KEAFER B.A., GRIBBLE K.E., MARIN R., SCHOLIN C.A. (2005) - Identification and enumeration of *Alexandrium* spp. from the Gulf of Maine using molecular probes. *Deep Sea Res.*, **52**: 2467-2490.
- ANDREAKIS M., PROCACCINI G., MAGGS C., KOOISTRA W.H.C.F. (2007) - Phylogeography of the invasive seaweed *Asparagopsis* (Bonnemaisoniales, Rhodophyta) reveals cryptic diversity. *Mol. Ecol.*, **16**: 2285-2290.
- AVISE J.C. (2004) - *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2nd ed, Chapman & Hall, New York.
- BOLCH C.J.S., BLACKBURN S.I., HALLEGRAEFF G.M., VAILLANCOURT R.E. (1999) - Genetic variation among strains of the toxic Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (Dinophyceae). *J. Phycol.*, **35**: 356-367.
- BOUCK A.M.Y., VISION T. (2007) - The molecular ecologist's guide to expressed sequence tags. *Mol. Ecol.*, **16**: 907-924.
- BOWERS H.A., TENGS T., GLASGOW H.B., BURKHOLDER J.M.J., RUBLEE P.A., OLDACH D.W. (2000) - Development of real-time PCR assay for rapid detection of *Pfiesteria piscicida* and related dinoflagellates. *Appl. Environ. Microb.*, **66**: 4641-4648.
- COLE J.R., CHAI B., MARSH T.L., FARRIS R.J., WANG Q., KULAM S.A., CHANDRA S., MCGARRELL D.M., SCHMIDT T.M., GARRITY G.M. (2003) - The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.*, **31**: 442-443.
- DÌEZ B., PEDRÒS-ALIÒ C., MASSANA R. (2001) - Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microb.*, **67**: 2932-2941.
- EVANS K.M., BATES S.S., MEDLIN L.K., HAYES P.H. (2004) - Microsatellite marker development and genetic variation in the toxic marine diatom *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **40**: 911-920.
- EVANS K.M., KÜHN S.F., HAYES P.H. (2005) - High levels of genetic diversity and low levels of genetic differentiation in North Sea *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae) populations. *Mol. Ecol. Notes*, **4**: 125-126.
- EVANS K.M., WORTLEY A.H., MANN D.G. (2007) - An assessment of potential diatom "Barcode" genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist*, **158**: 349-364.
- FERAL J.P. (2002) - How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **268**: 121-145.

-
- FINLAY B.J. (2002) - Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, **296**: 1061-1063.
- FULLER N.J., CAMPBELL C., ALLEN D.J., PITT F.D., ZWIRGLMAIER K., LE GALL F., VAULOT D., SCANLAN D.J. (2006) - Analysis of photosynthetic picoeukaryote diversity at open ocean sites in the Arabian Sea using a PCR biased towards marine algal plastids. *Aquat. Microb. Ecol.*, **43**: 79-93.
- GALLUZZI L., PENNA A., BERTOZZINI E., VILA M., GARCÉS E., MAGNANI M. (2004) - Development of Real-Time PCR assay for rapid detection and quantification of *A. minutum* species (Dinoflagellate). *Appl. Environ. Microb.*, **70**: 1199-1206.
- GALLUZZI L., BERTOZZINI E., PENNA A., PERINI F., PIGALARGA A., GRANELI E., MAGNANI M. (2008) - Detection and quantification of *Prymnesium parvum* (Haptophyceae) by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.*, **46**: 261-266.
- GRIBBLE K., ANDERSON D.M. (2006) - Molecular phylogeny of the heterotrophic dinoflagellates, *Protoperdinium*, *Diplopsalis* and *Preperidinium* (Dinophyceae), inferred from large subunit rDNA. *J. Phycol.*, **42**: 1081-1095.
- GUILLOU L., NÉZAN E., CUEFF V., ERARD-LE DENN E., CAMBON-BONAVITA M.A., GENTIEN P., BARBIER G. (2002) - Genetic diversity and molecular detection of three toxic dinoflagellate genera (*Alexandrium*, *Dinophysis* and *Karenia*) from French coasts. *Phycologia*, **32**: 234-236.
- IGLESIAS-RODRIGUEZ M.D., SCHOFIELD O.M., BATLEY J. (2006) - Intraspecific genetic diversity in the marine coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae): The use of microsatellite analysis in marine phytoplankton population studies. *J. Phycol.*, **42**: 526-36.
- JOHN U., GROBEN R., BESZTEN B., MEDLIN L. (2004) - Utility of amplified fragment length polymorphisms (AFLP) to analyse genetic structures within the *Alexandrium tamarensis* species complex. *Protist*, **155**: 169-179.
- JOHN U., MEDLIN L.K., GROBEN R. (2005) - Development of specific rRNA probes to distinguish between geographic clades of the *Alexandrium tamarensis* species complex. *J. Plankton Res.*, **27**: 199-204.
- KOOISTRA W.H.C.F., GERSONDE R., MEDLIN L.K., MANN D.G. (2007) - The origin and evolution of the diatoms: their adaptation to a planktonic existence. In: Falkowski G., Knoll A.H. (eds), *Evolution of primary producers in the sea*. Elsevier Academic Press, Burlington, USA: 207-249.
- KOOISTRA W.H.C.F., SARNO D., BALZANO S., GU H., ANDERSEN R.A., ZINGONE A. (2008) - Global diversity and biogeography of *Skeletonema* species (Bacillariophyta). *Protist*, **159**: 177-193.
- LARSEN A., CASTBERG T., SANDAA R.A., BRUSSAARD C.P.D., EGGE J.K., HELDAL M., PAULINO A., THYRHAUG R., VAN HANNEN E.J., BRATBAK G. (2001) - Population dynamics and diversity of phytoplankton, bacteria and viruses in a seawater enclosure. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **221**: 47-57.
- LI W.K.W. (1995) - Composition of ultraplankton in the central North Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **122**: 1-8.
- LÓPEZ-GARCIA P., RODRIGUEZ-VALERA F., PEDRÒS-ALIÒ C., MOREIRA D. (2001) - Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature*, **409**: 603-607.
- MCDONALD S.M., SARNO D., ZINGONE A. (2007a) - Identifying *Pseudo-nitzschia* species in natural samples using genus-specific PCR primers and clone libraries. *Harmful Algae*, **6**: 849-860.
- MCDONALD S.M., SARNO D., SCANLAN D.J., ZINGONE A. (2007b) - Genetic diversity of eukaryotic ultraplankton in the Gulf of Naples during an annual cycle. *Aquat. Microb. Ecol.*, **50**: 75-89.
- MEDLIN L.K., LANGE M., NOTHING E.M. (2000) - Genetic diversity in the marine phytoplankton: a review and a consideration of Antarctic phytoplankton. *Antarctic Sci.*, **12**: 325-333.
- METFIES K., MEDLIN L.K. (2004) - DNA microchips for phytoplankton: the fluorescent wave of the future. *Nova Hedwigia*, **79**: 321-327.
- METFIES K., HULJIC S., LANGE M., MEDLIN L.K. (2005) - Electrochemical detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* with a DNA-biosensor. *Biosens. Bioelectron.*, **20**: 1349-1357.
- METFIES K., TÖBE K., SCHOLIN C., MEDLIN L.K. (2006) - Laboratory and field applications of ribosomal RNA probes to aid the detection and monitoring of harmful algae. In: Graneli E., Turner J.T. (eds), *Ecology of Harmful Algae*. Springer, The Netherlands: 311-325.
- MOON-VAN DER STAAY S.Y., VAN DER STAAY G.W.M., GUILLOU L., VAULOT D., CLAUSTRÉ H., MEDLIN L.K. (2000) - Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton community from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences. *Limnol. Oceanogr.*, **45**: 98-109.
- MOON-VAN DER STAAY S.Y., DE WACHTER R., VAULOT D. (2001) - Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity. *Nature*, **409**: 607-610.
- MULLIS K., FALOONA F., SCHARF S., SAIKI R., HORN G., ERLICH H. (1986) - Specific enzymatic ampli-

-
- fication of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **51**: 263-273.
- MUYZER, G. (1999) - DGGE/TGGE, a method for identifying genes from natural communities. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**: 317-322.
- NOT F., SIMON N., BIEGALA I.C., VAULOT, D. (2002) - Application of fluorescent in situ hybridization coupled with tyramide signal amplification (FISH-TSA) to assess eukaryotic picoplankton composition. *Aquat. Microb. Ecol.*, **28**: 157-166.
- ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWA H., HAYASHI K., SEKIYA T. (1989) - Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, **86**: 2766-2770.
- OUBORG N.J., VRIEZEN W.H. (2007) - An ecologist's guide to ecogenomics. *J. Ecol.*, **95**: 8-16.
- PALUMBI S.R. (1994) - Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, **25**: 547-572.
- PENNA A., VILA M., FRAGA S., GIACOBBE M.G., ANDREONI F., RIOBÒ P., VERNESI C. (2005) - Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and ITS - 5.8S rDNA sequences. *J. Phycol.*, **41**: 212-225.
- PENNA A., BERTOZZINI E., BATTOCCHI C., GIACOBBE M.G., GALLUZZI L., GARCÉS E., VILA M., LUGLIÈ A., MAGNANI M. (2007) - Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular techniques. *J. Plankton Res.*, **29**: 19-38.
- PROCACCINI G., MALTAGLIATI F. (2003) - Approcci metodologici all'analisi della diversità genetica di organismi bentonici. In: Gambi M.C., Dappiano M. (eds), *Manuale di Metodologie di Campionamento e Studio del Benthos Marino Mediterraneo*. SIBM, Genova: 509-548.
- PROCACCINI G., OLSEN J.L., REUSCH T.B.H. (2007) - Contribution of genetics and genomics to seagrass biology and conservation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **350**: 234-259.
- RYNEARSON T.A., ARMBRUST E.V. (2004) - Genetic differentiation among populations of the planktonic marine diatom *Ditylum brightwellii*. *J. Phycol.*, **40**: 34-43.
- SAMBROOK J., RUSSELL D.W. (2001) - *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- SCHOLIN C.A., HERZOG M., SOGIN M., ANDERSON D.M. (1994) - Identification of group- and strain-specific genetic markers from globally distributed *Alexandrium* (Dinophyceae). II. Sequence analysis of fragments of the LSU rRNA gene. *J. Phycol.*, **30**: 999-1011.
- SCHOLIN C.A., MARIN R., MILLER P., DOUCETTE G., POWELL C., HOWARD J., HAYDOCK P., RAY J. (1999) - Application of DNA probes and a receptor binding assay for detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species and domoic acid activity in cultured and natural samples. *J. Phycol.*, **35**: 1356-1367.
- SIMON N., LEBOT N., MARIE D., PARTENSKY F., VAULOT D. (1995) - Fluorescent in situ hybridization with rRNA targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Appl. Environ. Microb.*, **61**: 2506-2513.
- SMITH T.M., SMITH R.L. (2007) - *Elementi di ecologia*. 6 ed. Pearson Paravia Bruno Mondadori: 728 pp.
- THOMAS M.A., KLAPER R. (2004) - Genomics for the ecological toolbox. *Trends Ecol. Evol.*, **19**: 439-445.
- TÖBE K., ELLER G., MEDLIN L. (2006) - Automated detection and enumeration for toxic algae by solid-phase cytometry and the introduction of a new probe for *Prymnesium parvum* (Haptophyta: Prymnesiophyceae). *J. Plankton Res.*, **28**: 643-657.
- TOMASELLO A., DI MAIDA G., CALVO S., PIRROTTA M., BORRA M., PROCACCINI G. (2009) - Seagrass meadows at the extreme of environmental tolerance: the case of *Posidonia oceanica* in a semi-enclosed coastal lagoon. *Mar. Ecol. Evol. Persp.*, **30**: 288-300.
- VARELA-ÁLVAREZ E., ANDREAKIS N., LAGO-LESTÓN A., PEARSON G.A., SERRÃO E.A., PROCACCINI G., DUARTE C.M., MARBÁ N. (2006) - Genomic DNA isolation in green and brown algae (Caulerpales and Fucales) for microsatellite library construction. *J. Phycol.*, **42**: 741-745.
- VASEMÄGI A., PRIMMER C.R. (2005) - Challenges for identifying functionally important genetic variation: the promise of combining complementary research strategies. *Mol. Ecol.*, **14**: 3623-3642.
- WEST N.J., SCANLAN, D.J. (1999) - Niche-partitioning of *Prochlorococcus* populations in a stratified water column in the Eastern North Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microb.*, **65**: 2585-2591.
- WHITEHEAD A., CRAWFORD D.L. (2006) - Neutral and adaptive variation in gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**: 5425-5430.
- WORDEN A.Z., NOLAN J.K., PALENIK, B. (2004) - Assessing the dynamics and ecology of marine picophy-

-
- toplankton: the importance of the eukaryotic component. *Limnol. Oceanogr.*, **49**: 168-79.
- YONGJIAN J., YANG G.P., GUAN X.J., MEN R. (2006) - Genetic diversity and its seasonal variation of Jiaozhou Bay phytoplankton determined by rbcL gene sequencing. *Acta Oceanol. Sin.*, **25**: 125-134.
- ZEIDNER G., PRESTON C.M., DELONG E.F., MASSANA R., POST A.F., SCANLAN D.J., BÉJÀ O. (2003) - Molecular diversity among marine picophytoplankton as revealed by psbA analyses. *Environ. Microbiol.*, **5**: 212-216.

CAPITOLO 28. LA CITOMETRIA A FLUSSO PER LO STUDIO DEI MICRO-ORGANISMI PLANCTONICI

R. Casotti

raffaella.casotti@szn.it

28.1 INTRODUZIONE

La citometria a flusso è la tecnica che permette di misurare proprietà fisiche e chimiche di cellule che scorrono in un mezzo liquido. Nell'analisi più comune le cellule incontrano individualmente una o più sorgenti di luce (tipicamente laser) e la diffondono. Dalla luce diffusa (*scatter*) si ottengono indicazioni su taglia, forma e struttura interna delle cellule. Inoltre, se queste possiedono fluorocromi primari (quali clorofilla o ficoeritrina) e/o secondari (DAPI, SYBRGreen, SYTO), il cui spettro di eccitazione è compatibile con la lunghezza d'onda della sorgente luminosa, emetteranno fluorescenza la cui intensità e lunghezza d'onda fornirà indicazioni sulla quantità e distribuzione della molecola o del processo di cui la sostanza è indicatore.

La caratteristica che rende unica la citometria a flusso è la capacità di misurare rapidamente, quantitativamente e simultaneamente diversi parametri su ogni singola cellula (*single cell analysis*) e su un grande numero di esse (migliaia di cellule al secondo). L'enorme sensibilità di questi strumenti rende inoltre possibile l'identificazione di cellule relativamente rare e con fluorescenze molto basse, quali ad esempio, il cianobatterio *Prochlorococcus sp.*

Alcuni citometri a flusso possono anche separare fisicamente (*sorting*) cellule che rispondono a criteri predeterminati che possono essere raccolte su vetrini o tubi per successive analisi con altri metodi. Per questa proprietà il termine più comune per indicare un citometro a flusso è FACS, cioè *Fluorescent Activated Cell Sorter*, anche se il nome viene usato anche per strumenti che non offrono la possibilità di separare le cellule.

La citometria a flusso è una tecnica indispensabile soprattutto nel campo dell'oncoematologia, delle cellule staminali e dell'immunologia. Nondimeno, la citometria a flusso è uno strumento ideale per la microbiologia marina, il cui potenziale è del resto ampiamente riconosciuto (Dubelaar *et al.*, 2007), in quanto permette misure rapide, riproducibili, sensibili e quantitative di proprietà strutturali e funzionali di batteri e fitoplancton. La citometria a flusso è oggi uno strumento indispensabile per studi di struttura e dinamica ad alta risoluzione delle comunità planctoniche inclusi i virus (ad es. Campbell *et al.*, 1998; Landry *et al.*, 1995; Dubelaar *et al.*, 2007). Nonostante infatti il conteggio di alcuni componenti del picoplancton (virus, batteri eterotrofi, altri cianobatteri e piceoeucarioti) sia possibile anche utilizzando la microscopia ad epifluorescenza su filtro, l'elevata rapidità di analisi di questa tecnica permette di analizzare un grande numero di campioni e di cellule per campione offrendo una più accurata rappresentazione del sistema studiato, insieme ad una maggiore riproducibilità dei dati. Inoltre, l'elevata sensibilità del metodo permette di distinguere sottopopolazioni che sfuggirebbero all'analisi visiva quali, ad esempio, i diversi ecotipi di *Prochlorococcus* o di batteri eterotrofi (Casotti *et al.*, 2000).

Le prime applicazioni della citometria a flusso sul fitoplancton risalgono agli anni '80 per lo studio della distribuzione del DNA su colture al fine di analizzare gli effetti dei fattori ambientali sulla crescita e la divisione cellulare (Chisholm *et al.*, 1986; Olson *et al.*, 1986; Vault *et al.*, 1986). Successivamente, queste osservazioni sono state applicate anche a popolazioni naturali e hanno permesso la stima di tassi di crescita *in situ* (Vault e Marie, 1999). Lo studio del DNA e della sua distribuzione all'interno delle cellule è ancora uno dei principali campi di applicazione della citometria a flusso su fitoplancton e batteri in coltura, dal quale si ottengono, tra le altre, informazioni sul contenuto in DNA (Veldhuis *et al.*, 1997),

sul ciclo cellulare e sui processi di danno e riparazione (Casotti *et al.*, 2005). Le continue scoperte di nuovi coloranti e sonde fluorescenti usate come indicatori di processi biochimici o attività funzionali rappresentano un enorme potenziale anche per lo studio del fitoplancton tramite citofluorimetria, anche se i protocolli di applicazione devono essere adattati a campioni marini, molto diversi da quelli di cellule di mammifero per i quali tali protocolli sono in genere disegnati.

L'analisi citometrica del fitoplancton può essere applicata anche a studi di *grazing* sfruttando l'autofluorescenza delle alghe come tracciante di ingestione. L'animale che ha ingerito l'alga, infatti, mostra con il tempo una fluorescenza rossa che è proporzionale al numero di prede ingerite, almeno nelle fasi iniziali (Jonker *et al.*, 1995). In questa maniera è possibile stimare tassi di *grazing*, selettività, endocitosi in diversi organismi uni- o multi-cellulari (Cucci *et al.*, 1989).

Per quanto riguarda i campioni naturali, la citometria a flusso viene utilizzata soprattutto per lo studio del picoplancton sia autotrofo che eterotrofo, in quanto gli organismi che lo compongono possiedono caratteristiche di taglia e concentrazione ideali per l'applicazione dei più comuni strumenti disponibili in commercio. La scoperta di *Prochlorococcus marinus* è stata resa possibile proprio grazie alla citometria a flusso (Chisholm *et al.*, 1988) ed il riconoscimento dell'ubiquità e l'abbondanza numerica di questo organismo è stata fondamentale per la comprensione del ruolo del picoplancton nelle reti trofiche marine (Li, 1994; Li, 2002). Più recentemente, la citometria a flusso ha permesso lo studio della più piccola alga eucariota (Courties *et al.*, 1994) e di cianobatteri azotofissatori unicellulari ancora non coltivati (Zehr *et al.*, 2008).

Combinando i dati di scatter e fluorescenza è possibile distinguere diversi gruppi di alghe, stimarne il contenuto pigmentario per ognuno di essi e studiarne la variabilità in funzione dei fattori ambientali (Brunet *et al.*, 2006). La clorofilla è un fluorocromo naturale che permette di distinguere gli autotrofi dagli eterotrofi. Le ficocianine (ficoeritrina e alloficocianina) permettono di distinguere i cianobatteri del genere *Synechococcus* e le criptofite (Yentsch *et al.*, 1983; Olson *et al.*, 1991). L'ulteriore discriminazione di specie o gruppi algali si avvale di proprietà ottiche intrinseche (è il caso dei coccolitoforidi, Olson *et al.*, 1989), di anticorpi (Vrieling e Anderson, 1996) o sonde oligonucleotidiche (ad es. Biegala *et al.*, 2003). Anche gli organismi eterotrofi, che non possiedono autofluorescenza, possono essere identificati e contati dopo colorazione del DNA (batteri) o di specifiche componenti cellulari (nanoflagellati eterotrofi, Rose *et al.*, 2004), mentre diversi gruppi batterici possono essere distinti con tecniche di ibridazione fluorescente *in situ* accoppiata alla citometria a flusso (FISH-in-flow, Amann *et al.*, 1990). Il *sorting*, infine, permette la misura di attività specifiche, quali la produzione primaria, a livello di specifiche popolazioni (Li, 1994; Zubkov *et al.*, 2003), o anche la stima delle concentrazioni cellulari di metaboliti quali DMSP al fine di comprenderne il ruolo nelle reti trofiche (Burkill *et al.*, 2002; Archer *et al.*, 2001).

28.2 STRUMENTAZIONE

I tre componenti principali di un citometro a flusso sono: la fluidica, l'ottica e l'elettronica.

La parte **fluidica** comprende un sistema pressurizzato in cui il campione liquido viene iniettato all'interno di un altro liquido denominato "*sheath*", al fine di allineare le cellule del campione lungo un piano ottico estremamente sottile in un'unica fila. I due liquidi fluiscono in condizioni di flusso laminare senza mescolarsi e la pressione differenziale tra campione e *sheath* determina la velocità del flusso del primo e la durata dell'esposizione della cellula al laser. In molti strumenti la velocità del flusso del campione è predeterminata dal costruttore in 1-3 velocità fisse (comunemente 20, 50 e 100 $\mu\text{l min}^{-1}$). Moltiplicando la velocità del campione per il tempo dell'analisi si calcolano le concentrazioni delle cellule analizzate (vedi sezione dei protocolli).

La componente **ottica** include una sorgente luminosa (comunemente uno o più laser a lunghezza d'onda definita), una o più lenti che concentrano la luce e una serie di filtri ottici (dicroici, a banda passante, "passa-alto" o "passa-basso") che suddividono la luce diffusa o emessa dalle cellule nelle diverse com-

ponenti in termini di lunghezza d'onda e la dirigono ai fotomoltiplicatori (PMT) che la raccolgono. La sorgente luminosa deve essere ben focalizzata ed intensa in modo da colpire efficacemente le cellule che vi restano esposte per un tempo brevissimo (microsecondi). La luce diffusa nella stessa direzione del laser (Forward Angle Light Scatter, FALS) viene raccolta da apposite lenti e da un fotodiode o un PMT, mentre quella diffusa ad angoli compresi tra i 75 e i 90 gradi (Right Angle Light Scatter, RALS o Side Scatter, SSC) viene raccolta da un PMT. Questi due parametri vengono comunemente denominati "parametri fisici" e sono influenzati, il FALS, dalla taglia delle particelle ed il RALS, dalla taglia ed anche dalla struttura interna (granulosità) e dall'indice di rifrazione della cellula (Salzman, 1982). Bisogna notare che la relazione tra FALS e taglia non è una relazione lineare, perchè dipende dalla composizione e dalla struttura delle particelle. Per tale motivo, per stimare la taglia di una cellula dal suo valore di scatter, è necessario calibrare lo strumento con cellule di taglia nota, preferibilmente dello stesso tipo delle cellule da analizzare (Shalapyonok *et al.*, 2001). La luce emessa come fluorescenza viene raccolta in direzione perpendicolare alla direzione del laser e passa attraverso filtri ottici che la selezionano e la dirigono a diversi PMT. Tipicamente questi raccolgono la fluorescenza rossa (> 650 nm), quella verde (530 nm), e quella arancione (585 nm), ma è possibile utilizzare altri filtri che selezionano diverse lunghezze d'onda, anche in funzione del o dei laser disponibili ed ovviamente delle applicazioni desiderate. I più moderni strumenti permettono di misurare fino a 16 fluorescenze contemporaneamente. Anche i valori di fluorescenza vengono espressi in unità relative a quelli di uno standard interno, generalmente biglie fluorescenti di taglia nota.

Nella parte **elettronica** la luce viene convertita in segnale elettrico da un fotomoltiplicatore (PMT) o un fotodiode. In genere i PMT vengono utilizzati per il RALS e le fluorescenze, che sono segnali poco intensi, mentre per il FALS si usa un fotodiode, a meno che non sia richiesta un'elevata sensibilità, ad esempio per cellule di taglia molto ridotta quali virus e batteri. Il voltaggio del PMT permette di modulare l'amplificazione del segnale, che in genere è logaritmica con almeno 4 decadi. Il segnale analogico viene poi convertito in valore digitale, in genere su 256 canali per decade. I valori di altezza del picco emesso (*pulse peak height*) o i segnali integrati raccolti da ogni PMT sono memorizzati come una lista di dati multiparametrici (*listmode file*) in cui ad ogni evento corrispondono i dati raccolti e registrati in sequenza.

28.3 ANALISI

Lo scopo dell'analisi è quello di distinguere popolazioni con proprietà ottiche simili tra tutti gli eventi acquisiti e di misurarne le proprietà medie. La caratteristica di multiparametricità della citometria a flusso permette di distinguere le popolazioni sulla base di parametri correlati di taglia, forma, granulosità, qualità e quantità di fluorescenza. I dati vengono visualizzati in grafici mono- bi- o triparametrici in cui ogni punto rappresenta un evento e cellule con caratteristiche simili sono rappresentate insieme. Il *gating* è la procedura che permette di separare graficamente popolazioni che rispondono a determinati criteri sulla base di operatori booleani. Un esempio di analisi viene mostrato in Fig. 1.

Le ditte produttrici di citometri a flusso forniscono il software di acquisizione ed analisi insieme allo strumento, ma esistono anche alternative gratuite ad esempio, i software WinMDi (<http://facs.scripps.edu/software.html>) o CytoWin (http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/index.php?option=com_content&task=view&id=72&Itemid=123) (Vaulot 1989) o altri software più sofisticati, ma a pagamento. L'analisi dei componenti principali o la clustering analysis (Watson, 1992; Wilkins *et al.*, 1994) rappresentano gli approcci di base utilizzati da questi software, ma quelli più recenti usano le reti neurali (Frankel *et al.*, 1989; Boddy *et al.*, 2000) e l'analisi discriminante non-parametrica (Collins e Krzanowski, 2002).

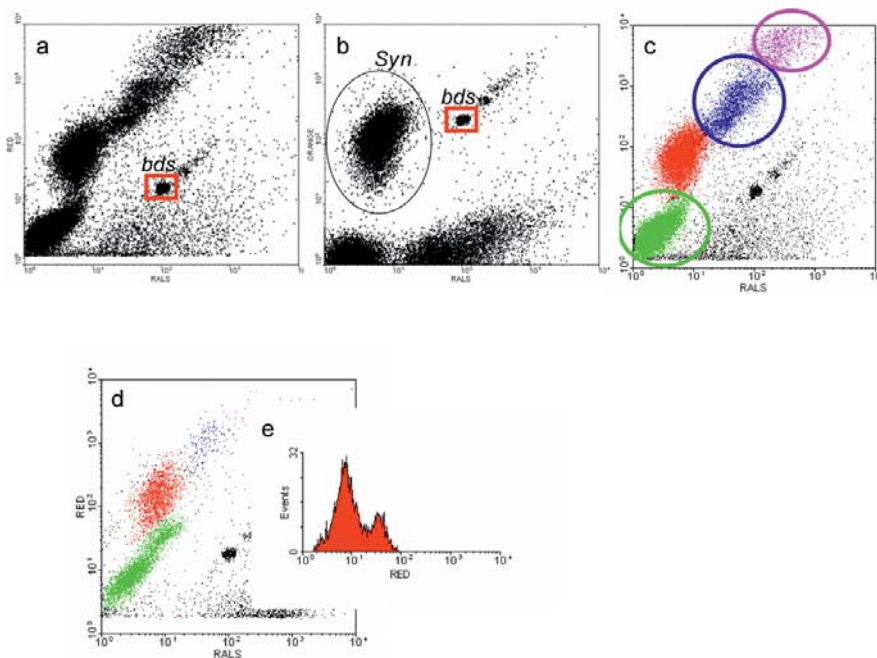


Fig.1 - Analisi di un campione di acqua di mare proveniente da una stazione costiera del Golfo di Napoli (10 m). a) citogramma di RALS (Taglia) vs RED (fluorescenza rossa dalla clorofilla), in cui si evidenziano diverse “nuvole” di cellule con clorofilla e le biglie usate come standard interno (*bds*). b) le stesse cellule sono rappresentate sul citogramma di RALS vs ORANGE (fluorescenza arancione dalla ficoeritrina). Solo *Synechococcus* (*Syn*) possiede la fluorescenza arancione e pertanto può essere separato dalle altre cellule (gating) di taglia paragonabile alle biglie (*bds*) c) citogramma iniziale con *Synechococcus* colorato in rosso e pertanto distinto dal *Prochlorococcus*, più piccolo e meno fluorescente (in verde) e da due popolazioni di piccoeucarioti (in blu e rosa) che sono di taglia maggiore e più fluorescenti. d) campione proveniente dalla stessa stazione ma da 60 m di profondità. Il *Prochlorococcus* è numericamente dominante rispetto al campione di superficie ed inoltre presenta due sotto-popolazioni, ritenute “ecotipi” (Moore et al., 1998), con distribuzione bimodale di taglia e fluorescenza rossa (in e, grafico monoparametrico con la proiezione dei valori di fluorescenza rossa relativi al *Prochlorococcus*).

28.4 STRUMENTI

La scelta di un citometro a flusso dipende dalle applicazioni desiderate e dalle risorse economiche disponibili. Una lista non esaustiva di modelli e relativi costruttori è fornita in Tab. 1.

Non bisogna dimenticare che gli strumenti disponibili in commercio, con pochissime eccezioni, sono ottimizzati per l’analisi di cellule di mammifero in coltura o di particelle ematiche, le quali presentano un’elevata omogeneità di taglia, forma e struttura, oltre ad essere molto concentrate (10^6 cell ml^{-1}). L’analisi di campioni marini risulta invece complicata dall’enorme variabilità di taglia, forma, composizione chimica e concentrazione degli organismi presenti. Basti pensare che in un campione di acqua di mare coesistono virus, batteri eterotrofi ed autotrofi, alghe unicellulari isolate o in aggregati o in catena, micro-, meso- e macrozooplancton, in concentrazioni variabili dall 10^0 ai 10^9 individui ml^{-1} .

La maggior parte degli strumenti utilizzati nel campo della microbiologia marina sono strumenti da banco di facile uso e manutenzione, in genere delle ditte Becton-Dickinson o Beckman-Coulter (Dubelaar e Jonker, 2000), che possono essere trasportati ed utilizzati a bordo di imbarcazioni da ricerca. Questi strumenti presentano anche caratteristiche di sensibilità tali da permettere l’analisi di *Prochlorococcus* e batteri marini e non richiedono lunghe e laboriose procedure di allineamento. Molti strumenti di dimensioni e performance maggiori prevedono la possibilità di separare fisicamente le popolazioni di interesse (sorting), l’utilizzo di laser modulabili o di più laser contemporaneamente.

Tab. 1 - Lista di produttori, modelli e caratteristiche di citometri a flusso disponibili in commercio al 2009.

Ditta	Modello	Principali caratteristiche	Note
AMNIS (distribuito da Instrumentation Laboratories) www.il-italia.it	ImageStream	Da banco	Analisi di immagine, Coulter volume
ApoGee http://www.apogeeflow.com/	A40	Compatto, trasportabile	
Beckman Coulter http://www.beckmancoulter.com	Cytomics FC500	Da banco	
	EPICS XL	Da banco, compatto	
	MoFlo	Modulare	Sorter ad alta performance
	CellLab-QUANTA	Da banco, compatto	Coulter Volume
	CyAn	Da banco e trasportabile	
Becton-Dickinson www.bdeurope.com	FACScalibur	Da banco, compatto, modulare	Sorter
	FACSCanto	Da banco, Sistema a prismi, molte fluorescenze, modulare	
	FACSARIA	Da banco, modulare	Sorter ad alta performance
	Influx (ex- Cytopeia)	Da banco, modulare	Sorter ad alta performance
CytoBuoy Inc http://www.cyto buoy.com/	CytoSense	Da banco, analisi in continuo	
	CytoBuoy	Ad immersione	Trasmissione dati via radio
iCyt www.i-cyt.com	Reflection	Da banco	Sorter
Fluid Imaging http://www.fluidimaging.com	FlowCAM	Compatto, adatto al microfitoplancton	Analisi di immagine
Miltenyi http://www.miltenyibiotec.com	MACSQuant Analyser	compatto, 3 lasers	
PARTEC http://www.partec.com/	CyFlow series	Da banco, compatti	
Stratedigm http://www.stratedigm.com/	S1000	Da banco, trasportabile, modulare	
Union Biometrica www.unionbio.com	COPAS	Da banco per grandi volumi di analisi (40-250 ml)	Sorter per cellule di taglia > 10 µm

Per quanto riguarda la sorgente luminosa, oggi sono comunemente utilizzate sorgenti laser, in quanto forniscono luce polarizzata, altamente concentrata, di elevata potenza e estremamente stabile. Non mancano però strumenti con lampade al mercurio, che presentano il vantaggio di un costo inferiore ed una più vasta gamma di lunghezze d'onda, con lo svantaggio però di essere meno precise e stabili. La scelta del o dei laser dipende dalle applicazioni previste. Nella maggior parte dei casi il laser fornito con lo strumento emette luce visibile a 488 nm che pur non eccitando in maniera ideale la clorofilla rappresenta un buon compromesso per l'utilizzo di diversi fluorocromi. Un secondo laser a 633 nm offre la possibilità di eccitare anche la ficocianina e quindi di distinguere anche quella parte di criptofitee ed altre alghe che contengono questo pigmento. Per alcuni fluorocromi, quali il DAPI e l'Hoechst 33342 è necessaria l'eccitazione UV che richiede laser di grandi dimensioni e raffreddamento ad acqua. Nonostante esistano laser a stato solido che emettono nel violetto (405 nm), la piena sostituibilità per l'utilizzo di tutti i fluorocromi eccitabili nell'UV non è ancora pienamente provata. Per una lista di fluorocromi e relativi picchi di eccitazione ed emissione, si rimanda al sito <http://flowcyt.salk.edu/fluo.html>.

Nonostante la richiesta del mercato ambientale sia limitata sia numericamente che economicamente rispetto al campo biomedico, recentemente si è assistito ad una notevole attività di ricerca e sviluppo di strumenti dedicati all'analisi di batteri e fitoplancton marino, soprattutto per rispondere alle aumentate necessità di monitorare gli ambienti costieri e gli eventi tossici dovuti a batteri o fitoplancton (Bouma *et al.*, 2009). Una delle difficoltà maggiori da affrontare in questo campo è il range dinamico di taglia presente in un campione (dal pico < 1 µm al micro-< 1 mm), unitamente al fatto che lo spettro dimensionale in mare è inversamente proporzionale allo spettro di abbondanza. Infatti, le cellule di plancton di taglia maggiore sono diversi ordini di grandezza meno abbondanti di quelle di taglia inferiore, mentre gli strumenti disponibili in commercio analizzano volumi di campione inferiore al ml. Pertanto, diverse modifiche, sia della parte fluidica che di quella ottica sono state applicate a strumenti già esistenti per aumentarne il potere risolutivo ed analitico (Cavendar-Bares *et al.*, 1998; Dusenberry e Frankel, 1994; Olson *et al.*, 1993). Inoltre, nuovi prototipi sono stati sviluppati per l'analisi del plancton marino. Tra questi, l'Optical Plankton Analyzer (Dubelaar *et al.*, 1989) e le sue successive versioni commerciali CytoSense, CytoSub e CytoBuoy (www.cytobuoy.com), che permettono l'analisi di elevati volumi di campione (oltre 50 ml min⁻¹), di cellule di taglia comprese tra 1 e 600 µm, possiedono un intervallo di amplificazione di diversi ordini di grandezza e sono in grado di acquisire parametri ottici complessi quali la forma dell'impulso e lo spettro di diffrazione, permettendo la discriminazione e ricostruzione di forme complesse quali colonie o catene. Questi strumenti possono essere usati analizzando campioni discreti o in continuo a bordo di navi, sfruttando le *ships of opportunity* quali traghetti o navi commerciali, oppure possono lavorare in immersione come profilatori, o situati su AUVs (Autonomous Underwater Vehicles, Cunningham *et al.*, 2003; Dubelaar *et al.*, 2007). Il CytoBuoy inoltre, può funzionare in immersione su boe oceanografiche e trasmettere i dati a breve distanza via radio (Dubelaar *et al.*, 2007).

Un altro prototipo di citometro a flusso per l'analisi del fitoplancton è attualmente in corso di sviluppo presso l'Università di Washington a Seattle, USA (Swalwell *et al.*, 2009) e prevede l'utilizzo di due detettori incrociati focalizzati su un preciso piano ottico, il che permette di funzionare senza sheath. Questa modifica risulta molto interessante per l'ulteriore miniaturizzazione dello strumento ed il suo utilizzo in continuo in sistemi dedicati al monitoraggio (Ribalet *et al.*, 2009). Altri prototipi prevedono inoltre l'accoppiamento con l'analisi di immagine, per permettere l'analisi visiva delle cellule ed il loro riconoscimento a livello di genere o specie. Diversi strumenti sono in vendita per applicazioni biomediche (ad es. ImageStream dell'Amnis Corp.), ma l'unico strumento dedicato al plancton e disponibile in commercio è la FlowCAM della FluidImaging Inc. (Sieracki *et al.*, 1998; <http://www.fluidimaging.com>). Un altro prototipo con le stesse finalità ma non ancora in commercio è il FlowCytoBot (Olson e Sosik, 2007; Sosik e Olson, 2007) che viene attualmente utilizzato nel Martha's Vineyard Coastal Observatory e nel Golfo del Messico (<http://www.whoi.edu/oceanus/viewArticle.do?id=46486>).

28.5 PROTOCOLLI DI ANALISI

Vengono indicati qui di seguito semplici e generici protocolli di analisi di picofitoplancton, batteri e virus marini, che possono essere utilizzati su qualunque strumento disponibile in commercio. Si raccomanda però di ottimizzare ed adattare il protocollo ai propri campioni. Per quanto riguarda il sorting, le specifiche sono strettamente dipendenti dallo strumento utilizzato e pertanto per i protocolli è necessario rifarsi alle indicazioni dei costruttori.

28.5.1 Procedure di verifica e messa a punto dello strumento

- Il liquido manicotto (*sheath*) deve essere adeguatamente filtrato (0,22 µm) poco prima dell'uso, in modo da fornire un adeguato background senza particelle. È necessario usare uno sheath che sia lo stesso del campione da analizzare, in quanto il FALS è sensibile alla natura dello sheath.
- Filtrare su 0,22 µm un campione di sheath in cui diluire le biglie da usare come standard interno. Queste consistono in sfere di materiale plastico di taglia definita e calibrata e ricoperte di sostanze fluorescenti. Sono utilizzate come standard interno per controllare l'allineamento dello strumento e per poter paragonare dati ottenuti con strumenti diversi. Le biglie vengono inoltre usate per normalizzare i valori dei diversi parametri ed esprimerli in unità relative (*relative units*, r.u. o *bead units*, b.u.). Nell'analisi del picoplancton le biglie più comunemente usate sono le Fluoresbrite da 0,95 µm della Polysciences, ma esiste un'ampia scelta di biglie di taglia e intensità di fluorescenza in commercio (ad esempio, Coulter, Clontech, Sphaerotech, Microspheres-Nanospheres).
- Verificare che il set di filtri ottici sia adeguato all'applicazione desiderata. I filtri ottici **non** sono identici su ogni strumento.
- Il rumore di fondo deve essere mantenuto al minimo. Passare un campione di acqua distillata filtrata e mantenere i voltaggi dello strumento in modo da ottenere il minimo numero di eventi al secondo. Questo dipenderà anche dallo stato di pulizia dello strumento ed è un fattore critico per l'analisi di batteri e virus.
- Verificare l'allineamento del laser e l'operatività del citometro usando le biglie di calibrazione, che devono mostrare un picco molto stretto e posizionarsi sempre nello stesso punto dei citogrammi, in relazione ad un protocollo di riferimento.
- Definire i settings dei fotomoltiplicatori, che vuol dire fornire al PMT la giusta quantità di energia elettrica per la detezione delle alghe di interesse. Per "vedere" alghe relativamente più grandi e con elevata fluorescenza, il PMT potrà funzionare a livelli bassi, mentre per vedere alghe più piccole e poco fluorescenti, ad esempio il *Prochlorococcus* (0,6 µm), questo dovrà essere usato spesso al massimo della sua potenza. In superficie e nei mesi estivi, quando il campo luminoso è al massimo dell'intensità, le cellule di *Prochlorococcus* contengono pochissima clorofilla, la cui fluorescenza si trova al di sotto del limite di detezione della maggior parte degli strumenti e nonostante i notevoli miglioramenti tecnici, la loro detezione è ancora impossibile. Quando il picco in fluorescenza è almeno parzialmente visibile, è possibile estrapolarne la parte nascosta nel rumore di fondo assumendo una distribuzione gaussiana (Partensky *et al.*, 1996).
- Calibrare la velocità di flusso per la determinazione delle concentrazioni cellulari. Alcuni strumenti sono predisposti per la conta assoluta, mentre altri devono essere calibrati. In quest'ultimo caso, è possibile usare campioni con biglie a concentrazione nota, e risalire al volume analizzato dalla conta delle stesse nel campione. In pratica, se in 1 ml di campione sono state inoculate 1000 biglie e nell'analisi finale ne sono contate 100, il volume di campione analizzato sarà di 0,1 ml. Questo metodo è molto utilizzato ma espone ad alcuni rischi, dovuti alla natura elettrostatica delle biglie che possono attaccarsi ai tubi dello strumento e può dare origine ad errori ed artefatti. Per questo motivo, si consiglia invece di pesare un tubo contenente un campione o acqua di mare prima e dopo averlo analizzato al citometro per un tempo determinato (almeno 10 min). La differenza di

peso, divisa per il tempo di analisi e corretta per la densità del liquido usato, darà il volume di campione analizzato per unità di tempo (*Flow rate*), secondo la formula:

$$\text{Flow Rate} = (P_i - P_f) / T * d$$

Dove

P_i = peso iniziale

P_f = peso finale

T = tempo

d = densità dell'acqua (1,00 per acqua distillata, 1,03 per acqua di mare)

È possibile applicare la stessa formula per misure precise di volume invece che di peso (senza tener conto della densità), ma il metodo del peso è più preciso. La calibrazione deve essere ripetuta almeno ogni 5-10 campioni.

28.5.2 Picofitoplancton

Generalmente tre gruppi principali di picofitoplancton sono distinguibili in un citogramma di un campione proveniente da acque marine comprese tra 41° Lat N e S (ad eccezione del Mar Adriatico Settentrionale): due cianobatteri appartenenti ai generi *Synechococcus* e *Prochlorococcus* ed i picoeucarioti, questi ultimi rappresentati da alghe appartenenti a diversi gruppi tassonomici. Questi tre gruppi sono spesso rappresentati da 2 o più sottogruppi, definiti “ecotipi” nel caso dei cianobatteri (Fig. 1 d-e). I sottogruppi dei picoeucarioti rappresentano invece alghe tassonomicamente diverse la cui identità deve essere confermata con altri mezzi, ad esempio analisi dei pigmenti su campioni frazionati (Brunet *et al.*, 2007), sorting seguito da ispezione molecolare o microscopica, oppure ibridazione con sonde fluorescenti (Simon *et al.*, 1995).

Idealmente, i campioni dovrebbero essere analizzati subito dopo il prelievo, ma siccome non è sempre possibile trasportare uno strumento a bordo delle imbarcazioni, esistono diversi protocolli di fissazione (ad es. Lepesteur *et al.*, 1993), il più comune dei quali prevede fissazione con Paraformaldeide 1% e Glutaraldeide 0,05% (concentrazioni finali), congelamento in azoto liquido e conservazione a -80°C (Marie *et al.*, 1999). Questo protocollo preserva efficacemente la fluorescenza dei cianobatteri, ma non è ideale per tutti i picoeucarioti, alcuni dei quali sono sensibili alla fissazione (Biegala *et al.*, 2003).

28.5.2.1 Protocollo

1. Se il campione è fissato e congelato, scongelarlo immergendolo in un contenitore di acqua di rubinetto a temperatura ambiente e conservarlo a 4 °C al buio fino all'analisi, che deve essere effettuata entro le 4 ore successive. I campioni scongelati non possono essere ricongelati.
2. Se il campione è fresco, è sempre consigliabile analizzarlo il più presto possibile dopo il prelievo, ma è anche possibile conservarlo a 4 °C al buio per almeno 6 ore senza alterarne significativamente la fluorescenza (Marie *et al.*, 1999). Se il campione proviene da aree costiere in cui è possibile siano presenti cellule in colonia o in catene o aggregati, è consigliabile filtrare il campione prima dell'analisi in modo da evitare di otturare il sistema di aspirazione del citometro.
3. trasferire 1 ml di campione in un tubo adatto (alcuni citometri ne richiedono esclusivamente di una certa marca o tipo, altri invece accettano anche tubi eppendorf o altri contenitori).
4. aggiungere le biglie di calibrazione al campione ed agitarlo delicatamente.
5. inserire il campione nel dispositivo di analisi. A seconda dello strumento, questo verrà prima aspirato e poi iniettato nel sistema, oppure iniettato direttamente nella camera di flusso. In questo ultimo caso si dovrà iniziare manualmente l'acquisizione dei dati ritardandola di almeno 15 secondi dal momento dell'inserimento del campione, in modo da permettere l'equilibratura della fluidica.

-
6. predisporre lo strumento ad acquisire solo i segnali che oltrepassano una certa soglia di fluorescenza rossa (trigger sulla clorofilla). Questo serve ad eliminare dall'acquisizione particelle inerti o eterotrofe che possono interferire con l'analisi. Predisporre tutti i detettori all'amplificazione logaritmica, in modo da poter includere nell'analisi il più grande numero di particelle di taglie diverse.
 7. Per evidenziare cellule di piccole dimensioni e poco fluorescenti (ad es. *Prochlorococcus*), occorre aumentare il voltaggio dei PMT, per quelle più grandi e più fluorescenti occorre invece diminuirlo per evitare che siano situate fuori scala. Sarà necessario modificare il voltaggio della fluorescenza anche per campioni di fondo rispetto a quelli di superficie, per la maggiore concentrazione di clorofilla per cellula dovuta alla fotoacclimatazione.
 8. Iniziare l'analisi, che tipicamente dura dai 3 ai 5 min per un flusso di analisi di 70-100 $\mu\text{l min}^{-1}$. È importante fare attenzione a non sovraccaricare il sistema con un numero superiore ai 600 eventi totali per secondo, in quanto oltre questa soglia i detettori potrebbero essere affetti da sovraccarico ed ignorarne alcuni. Ogni strumento possiede infatti una diversa soglia di tolleranza, che viene determinata dal cosiddetto *dead time* che è l'intervallo di tempo (generalmente in μsec) che passa tra l'acquisizione di un evento e la nuova disponibilità del detettore ad acquisirne un altro. Nella pratica, se due cellule passano attraverso la zona di acquisizione troppo ravvicinate, la seconda verrà ignorata perché il sistema è ancora impegnato a registrare i valori della prima. È buona pratica calibrare il proprio strumento per determinarne la soglia di tolleranza (Marie *et al.*, 1999).
 9. Calcolo delle concentrazioni assolute di ogni popolazione. Si divide il numero degli eventi relativi ad una popolazione per il volume analizzato, calcolato moltiplicando il Flow Rate per il tempo di analisi, correggendolo per la diluizione effettuata aggiungendo le biglie, o l'eventuale fissativo (Marie *et al.*, 1999).
 10. I valori di scatter e fluorescenza vengono calcolati utilizzando in genere la media geometrica della popolazione normalizzata per quella delle biglie, ed espressi in unità relative (*relative units*, r.u.) o *bead units* (b.u.)

28.5.3 Batteri eterotrofi

I batteri liberi eterotrofi non posseggono autofluorescenza e pertanto è necessario colorarli per poterli distinguere dal rumore di fondo. Più comunemente se ne colora il DNA con fluorocromi specifici. Il metodo è lo stesso che prevede la filtrazione dei campioni ed il loro conteggio con il microscopio a fluorescenza (Hobbie *et al.*, 1977), ma offre il vantaggio di una maggiore velocità e precisione, permettendo l'analisi di un numero più elevato di campioni. Oltre alla rapidità, sensibilità e riproducibilità dei conteggi, la citometria a flusso offre il vantaggio di poter distinguere diverse popolazioni batteriche sulla base del loro contenuto relativo in DNA. Almeno due sottogruppi sono sempre presenti in ogni campione, e sono stati attribuiti a batteri vitali (quelli a più alto contenuto relativo di DNA) e non-vitali (quelli a più basso contenuto in DNA; Fig. 2; ad es. Bouvier *et al.*, 2007 e citazioni contenute nell'articolo). A questi due si aggiungono spesso, soprattutto in ambienti costieri, altri sottogruppi (Fig. 2, Li *et al.*, 1995), la cui identità tassonomica non si può determinare sulla base dei soli citogrammi e richiede altri metodi di indagine, ad esempio quelli molecolari (Amann *et al.*, 1990).

I classici coloranti quali DAPI e Hoechst sono stati rimpiazzati per l'analisi citometrica da una vasta gamma di coloranti eccitabili nel visibile, in maniera da poter essere utilizzati dai più comuni ed economici strumenti che non offrono l'eccitazione UV. Attualmente il più utilizzato è il SYBR Green I della Molecular Probes, la cui fluorescenza non è dipendente dal pH ed è adatto all'analisi di batteri marini (Marie *et al.*, 1999).

Esistono però protocolli che usano coloranti della serie SYTO, TO-TO o TO-PRO (Molecular Probes Inc. <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/brands/Molecular-Probes.html>), anche se questi ultimi

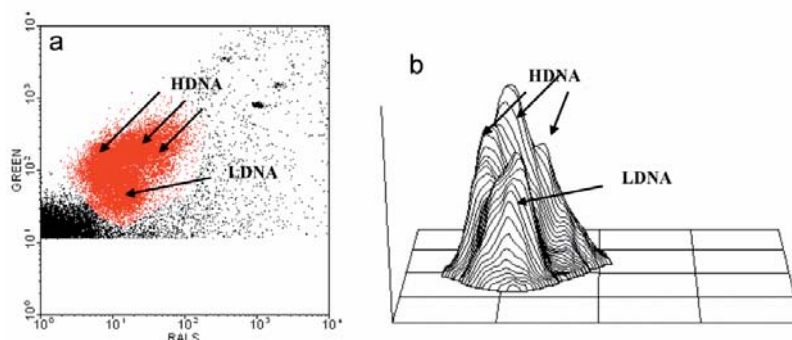


Fig.2 - Analisi di batteri eterotrofi in un campione proveniente da una stazione costiera del Golfo di Napoli (40 m) dopo colorazione con il colorante DNA-specifico SYBR Green I. a) citogramma di RALS (taglia) vs GREEN (fluorescenza verde dal colorante), in cui si possono distinguere diverse popolazioni di batteri sulla base del loro contenuto apparente in DNA, in particolare quelli definiti Low DNA (LDNA) o High DNA (HDNA). b) proiezione tridimensionale del citogramma in a).

non sembrano essere ottimali per l'analisi di campioni marini (Marie *et al.*, 1996). Anche in questo caso si raccomanda di ottimizzare il protocollo di analisi ai propri campioni, testando diversi coloranti, in diverse concentrazioni e per diversi tempi di incubazione.

L'analisi si effettua su campioni fissati (in genere con Paraformaldeide 1% e glutaraldeide 0,1% per almeno 20 min, ma anche con altri fissativi). Tutte le soluzioni usate devono essere filtrate su filtri di porosità 0,2 μm , ad eccezione del colorante.

28.5.3.1 Protocollo

1. trasferire 1 ml di campione in un tubo adatto (alcuni citometri richiedono esclusivamente di una certa marca o tipo, altri invece accettano anche tubi eppendorf o altri contenitori)
2. predisporre lo strumento ad acquisire solo i segnali che oltrepassano una certa soglia di fluorescenza verde, che è la più comune fluorescenza emessa dai coloranti usati per i batteri (trigger sul verde), in maniera da acquisire solo le cellule che hanno assorbito il colorante, e pertanto classificabili come batteri. Predisporre tutti i detettori all'amplificazione logaritmica, in modo da ampliare l'intervallo di detezione per includere nell'analisi il più grande numero di particelle di taglie diverse.
3. È da notare che anche le alghe autotrofe presenti nel campione possiedono DNA, ma queste presentano anche una fluorescenza rossa dovuta alla clorofilla e pertanto potranno essere separate in fase di elaborazione dei dati.
4. Iniziare l'analisi, che tipicamente dura dai 1 ai 2 min per un flusso di 30-50 $\mu\text{l min}^{-1}$. È consigliabile fermare l'acquisizione se il numero totale di eventi supera il valore di 80000, per evitare di generare un file di dimensioni eccessive e poco gestibili dal computer.
5. Per calcolare le concentrazioni di ogni popolazione si divide il numero degli eventi relativi alla stessa per il volume analizzato, calcolato moltiplicando il Flow Rate per il tempo di analisi, e correggendolo per le eventuali diluizioni dovute all'uso di biglie o di fissativo.
6. I valori di scatter e fluorescenza vengono calcolati utilizzando in genere la media geometrica della popolazione normalizzata per quella delle biglie, ed espressi in unità relative (*relative units*, r.u.) o *bead units* (b.u.)

28.5.4 Virus

L'analisi dei virus viene effettuata usando lo stesso protocollo dei batteri, ma i campioni vengono diluiti tra 100 e 10000 volte con tampone TE (Tris-EDTA) filtrato su filtri da 0,05 μm prima della colorazione con SYBR Green o altro colorante (Marie *et al.*, 1999). Il tampone TE migliora il segnale e potenzia la fluorescenza. Si consiglia inoltre di preparare sempre almeno tre diverse diluizioni di ogni campione, in quanto i virus sono molto abbondanti (10^9 ml^{-1}) ed è necessario raggiungere un rapporto ottimale tra colorazione e concentrazione del campione. Infatti, se il campione è troppo diluito, può verificarsi perdita del segnale da parte del complesso acido-nucleico-colorante; se invece il campione è troppo concentrato, si può verificare coincidenza e sottostima delle concentrazioni (vedi anche sopra). È stato notato che campioni fissati rivelano abbondanze virali da 3 a 10 volte maggiori degli stessi campioni analizzati senza fissazione. Ciò suggerisce che alcuni virus possiedono capsidi o sistemi di protezione che impediscono la penetrazione del colorante e pertanto è consigliabile sottoporre il campione a detergenti o elevate temperature (95 °C). Qualora si lavori con campioni contenenti virus sconosciuti occorre ottimizzare sia la concentrazione di detergente che la temperatura da usare, anche se in generale, una diluizione di SYBRGreen di 5:100000 ed un riscaldamento di 15 min a 70-80 °C risulta adatto alla maggior parte dei campioni (Marie *et al.*, 1999).

28.6 PROSPETTIVE E NUOVI CAMPI DI APPLICAZIONE

La citometria a flusso fornisce informazioni meno complesse rispetto alla microscopia, ma può essere accoppiata con tecniche di analisi morfologiche e/o fisiologiche quali l'analisi di diffrazione, l'analisi della forma dell'impulso e l'analisi visiva classica. Il potere discriminatorio dipende dal numero di proprietà indipendenti misurate per ogni particella in modalità multiparametrica e dalla loro parametrizzazione (Dubelaar *et al.*, 2007). Un interessante sviluppo è rappresentato dal citometro *Pump-during-Probe* che permette di ottenere stime di efficienza fotosintetica a livello di singole cellule (Olson *et al.*, 1999).

I citometri a flusso sono ad oggi gli unici sensori biologici a livello cellulare che possano essere utilizzati in piattaforme automatizzate di monitoraggio. È naturale dunque che molti dei nuovi sviluppi siano rivolti a queste applicazioni, come è già stato trattato nella sezione dedicata agli strumenti. Oltre ai sistemi in continuo (Thyssen *et al.*, 2008), quelli senza sheath (Swalwell *et al.*, 2009) e quelli accoppiati alla microscopia (Sieracki *et al.*, 1998; Olson e Sosik, 2007), o alla detezione della fluorescenza a livello della singola cellula (Olson *et al.*, 1999), le nuove prospettive riguardano strumenti che permettano l'analisi dei batteri e dei virus *in situ* (G. Dubelaar, pers. comm.), la detezione di specie tossiche con metodi molecolari (Greenfield *et al.*, 2006), oltre che l'analisi di catene e aggregati. Enorme interesse suscita inoltre l'applicazione della citometria a flusso all'analisi delle acque di galleggiamento delle navi (Joachimsthal *et al.*, 2003; Veldhuis *et al.*, 2006), in accordo con le nuove direttive internazionali sulla qualità delle acque. Inoltre, lo sforzo di innovazione si dirige verso la completa automatizzazione sia dello strumento che dell'analisi, tramite robot e metodi statistici ed informatici avanzati (Jeffries *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda il sorting, la sempre maggiore sofisticazione ed efficienza dell'isolamento di cellule di interesse si applica anche agli organismi marini, ad esempio con l'isolamento di singole cellule batteriche marine ed il successivo sequenziamento del genoma (Stepanauskas e Sieracki, 2007).

28.7 SITI WEB E MATERIALE DIDATTICO

Per una lista esauriente e continuamente aggiornata di materiale informativo e didattico su ogni aspetto della citometria, si rimanda al sito

<http://flowcyt.cyto.purdue.edu>. Su questo sito è anche disponibile una lista di libri sulla citometria <http://flowcyt.cyto.purdue.edu/flowcyt/books/refgen.htm> e di articoli sulla microbiologia (in fondo alla pagina quelli dei microbi acquatici): <http://flowcyt.cyto.purdue.edu/flowcyt/research/micrflow/index.htm>, nonché link ad altri siti di utenti e società che si occupano di citometria.

In Italia la Società Italiana di Citometria (ex-Gruppo Italiano di Citometria GIC) promuove attività di ricerca e formazione in campo biomedico, ma anche ambientale, incluso il marino (<http://biotec.casaccia.enea.it/GIC/>). Anche su questo sito è possibile reperire materiale informativo nonché link ad altri siti di interesse.

Ringraziamenti

Si ringraziano Cecilia Balestra e Fabrizio Bernardi-Aubry per i loro commenti su questo manoscritto e Giorgio Socal per la pazienza e la fiducia.

28.8 BIBLIOGRAFIA

- AMANN R.I., BINDER B.J., OLSON R.J., CHISHOLM S.W., DEVEREUX R., STAHL D.A. (1990) - Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 1919-1925.
- ARCHER S., WIDDICOMBE C.E., TARRAN G.A., REES A.P., BURKILL P.H. (2001) - Production and turnover of particulate dimethylsulphoniopropionate during a coccolithophore bloom in the northern North Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, **24**: 225-241.
- BIEGALA I.C., NOT F., VAULOT D., SIMON N. (2003) - Quantitative assessment of picoeukaryotes in the natural environment by using taxon-specific oligonucleotide probes in association with tyramide signal amplification-fluorescence in situ hybridization and flow cytometry *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 5519-5529.
- BODDY L., MORRIS C.W., WILKINS M.F., AL-HADDAD L., TARRAN G.A., JONKER R.R., BURKILL P.H. (2000) - Identification of 72 phytoplankton species by radial basis function neural network analysis of flow cytometric data. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **195**: 47-59.
- BOUMA J.A., VAN DER WOERD H.J., KUIK O.J. (2009) - Assessing the value of information for water quality management in the North Sea (2009) – *J. Environ. Manage.*, **90**: 1280-1288.
- BOUVIER T., DEL GIORGIO P.A., GASOL J.M. (2007) - A comparative study of the cytometric characteristics of High and Low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems. *Environ. Microbiol.*, **9**: 2050-2066.
- BRUNET C., CASOTTI R., VANTREPOTTE V., CORATO F., CONVERSANO F. (2006) - Picophytoplankton diversity and photoadaptation in the Strait of Sicily (Mediterranean Sea) in summer. I. Mesoscale variations. *Aquat. Microb. Ecol.*, **44**: 127-141.
- BRUNET C., CASOTTI R., VANTREPOTTE V., CONVERSANO F. (2007) - Vertical variability and diel dynamics of picophytoplankton in the Strait of Sicily, Mediterranean Sea, in summer. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **346**: 15-26.
- BURKILL P.H., ARCHER S.D., ROBINSON C., NIGHTINGALE P.N., GROOM S.B., TARRAN G.A., ZUBKOV M.V. (2002) - Dimethyl sulphide biogeochemistry within a coccolithophore bloom (DISCO): an overview. *Deep-Sea Res. II*, **49**: 2863-2885.
- CAMPBELL L., LANDRY M.R., CONSTANTINOU J., NOLLA H.A., BROWN S.L., LIU H., CARON D.A. (1998) - Response of microbial community structure to environmental forcing in the Arabian Sea. *Deep-Sea Res. II*, **45**: 2301-2325.
- CASOTTI R., BRUNET C., ARONNE B., RIBERA D'ALCALÀ M. (2000) - Mesoscale features of phytoplankton and planktonic bacteria in a coastal area as induced by external water masses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **195**: 15-27.
- CASOTTI R., MAZZA S., BRUNET C., VANTREPOTTE V., IANORA A., MIRALTO A. (2005) - Growth autoinhibition and genotoxicity of the diatom aldehyde 2-trans-4-trans decadienal on *Thalassiosira weissflogii* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, **41**: 7-20.
- CAVENDAR-BARES K., FRANKEL S.L., CHISHOLM S.W. (1998) - A dual sheath flow cytometer for shipboard analyses of phytoplankton communities from the oligotrophic oceans. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 1383-1388.

-
- CHISHOLM S.W., ARMBRUST E.V., OLSON R.J. (1986) - The individual cell in phytoplankton ecology: Cell cycles and flow cytometry. In: Platt T., Li W.K.W. (eds), Photosynthetic picoplankton. *Can. Bull. Fish Aquat. Sci.*, **214**: 343-369.
- CHISHOLM S.W., OLSON R.J., ZETTLER E.R., GOERICKE R., WATERBURY J.B., WELSCHEMEYER (N.A. 1988) - A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. *Nature*, **334**: 340-343.
- COLLINS G.S., KRZANOWSKI W.J. (2002) - Nonparametric discriminant analysis of phytoplankton species using data from analytical flow cytometry. *Cytometry*, **48**: 26-33.
- COURTIES C., VAQUER A., TROUSSELLIER M., LAUTIER J., CHRÉTIENNOT-DINET M.J., NEVEUX J., MACHADO C., CLAUSTRE H. (1994) - Smallest eukaryotic organism. *Nature*, **370**: 255.
- CUCCI T.L., SHUMWAY S.E., BROWN W.S., NEWELL C.R. (1989) - Using phytoplankton and flow cytometry to analyze grazing by marine organisms *Cytometry*, **10**: 659-670.
- CUNNINGHAM A., MCKEE D., CRAIG S., TARRAN G., WIDDICOMBE C. (2003) - Fine-scale variability in phytoplankton community structure and inherent optical properties measured from an autonomous underwater vehicle. *J. Mar. Syst.*, **43**: 51-59.
- DUBELAAR G.B.J., JONKER R.R. (2000) - Flow cytometry as a tool for the study of phytoplankton and other applications. *Sci. Mar.*, **64** : 135-156.
- DUBELAAR G.B.J., GROENEWEGEN A.C., STOKDIJK W., VAN DEN ENGH G.J., VISSER J.W.M. (1989) - Optical Plankton Analyser: a flow cytometer for plankton analysis, II: specifications. *Cytometry*, **10**: 529-539.
- DUBELAAR G., CASOTTI R., TARRAN G., BIEGALA I. (2007) - Phytoplankton and their analysis by flow cytometry. In: Dolezel J., Greilhuber J., Suda J. (eds), *Flow Cytometry with Plant Cells*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim: 287-322.
- DUSENBERRY J.A., FRANKEL S.L. (1994) - Increasing the sensitivity of a FACScan flow cytometer to study oceanic picoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **39**: 206-209.
- FRANKEL D.S., OLSON R.J., FRANKEL S.T., CHISHOLM S.W. (1989) - Use of a neural net computer system for analysis of flow cytometric data of phytoplankton populations. *Cytometry*, **10**: 540-550.
- GREENFIELD D.I., MARIN R., JENSEN S., MASSION E., ROMAN B., FELDMAN J., SCHOLIN C.A. (2006) - Application of environmental sample processor (ESP) methodology for quantifying *Pseudo-nitzschia australis* using ribosomal RNA-targeted probes in sandwich and fluorescent in situ hybridization formats. *Limnol. Oceanogr. Meth.*, **4**: 426-435.
- HOBBIE J.E., DALEY R.J., JASPER S. (1977) - Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **3**: 1225-1228.
- JEFFRIES D., ZAIDI I., DE JONG B., HOLLAND M.J., MILES D.J.C. (2008) - Analysis of flow cytometry data using an automatic processing tool. *Cytometry*, **73**: 857-867.
- JOACHIMSTHAL E.L., IVANOV V., TAY J.H., TAY S.T.L. (2003) - Flow cytometry and conventional enumeration of microorganisms in ships' ballast water and marine samples. *Mar. Poll. Bull.*, **46**: 308-313.
- JONKER R.R., MEULEMANS J.T., DUBELAAR G.B.J., WILKINS M.F., RINGELBERG J. (1995) - Flow cytometry: a powerful tool in analysis of biomass distributions in phytoplankton *Wat. Sci. Technol.*, **32**: 177-182.
- LANDRY M.R., KIRSHTEIN J., COSTANTINOU J. (1995) - A refined dilution technique for measuring the community grazing impact of microzooplankton, with experimental tests in the central equatorial Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **120**: 53-63.
- LEPESTEUR M., MARTIN J.M., FLEURY A. (1993) - A comparative study of different preservation methods for phytoplankton cell analysis by flow cytometry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **93**: 55-63.
- LI W.K.W. (1994) - Primary production of prochlorophytes, cyanobacteria, and eukaryotic ultraphytoplankton: measurements from flow cytometric sorting. *Limnol. Oceanogr.*, **39**: 169-175.
- LI W.K.W. (2002) - Macroecological patterns of phytoplankton in the northwestern North Atlantic Ocean. *Nature*, **419**: 154-157.
- LI W.K.W., JELLETT J.F., DICKIE P.M. (1995) - DNA distributions in planktonic bacteria stained with TOTO and TO-PRO. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 1485-1495.
- MARIE D., VAULOT D., PARTENSKY F. (1996) - Application of the novel nucleic acid dyes YOYO-1, YO-PRO-1, and PicoGreen for flow cytometric analysis of marine prokaryotes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**: 1649-1655.
- MARIE D., PARTENSKY P., VAULOT, D. BRUSSAARD C. (1999) - Enumeration of phytoplankton, bacteria and viruses in marine samples. In: Robinson J.P. (ed), *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley and Sons Inc, New York:11.11.1-11.11.15.

-
- MOORE L.R., ROCAP G., CHISHOLM S.W. (1998) - Physiology and molecular phylogeny of coexisting *Prochlorococcus* ecotypes. *Nature*, **393**: 464-467.
- OLSON R.J., VAULOT D., CHISHOLM S.W. (1986) - Effects of environmental stresses on the cell cycle of two marine phytoplankton species. *Plant Physiol.*, **80**: 918-925.
- OLSON R.J., ZETTLER E.R., ANDERSEN K.O. (1989) - Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry*, **10**: 636-643.
- OLSON R.J., ZETTLER E.R., CHISHOLM S.W., DUSENBERRY J.A. (1991) - Advances in oceanography through flow cytometry. In: Demers S. (ed.), NATO ASI Series G, Ecological Sciences. *Particle Analysis in Oceanography*. Springer-Verlag, Berlin: 351-399.
- OLSON R.J., ZETTLER E.R., DURAND M.D. (1993) - Phytoplankton analysis using flow cytometry. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.V., Cole J.J. (eds), *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton: 175-186.
- OLSON R.J., SOSIK H.M., CHEKALYUK A.M. (1999) - Photosynthetic characteristics of marine phytoplankton from pump-during probe fluorometry of individual cells at sea. *Cytometry*, **37**: 1-13.
- OLSON R.J., SOSIK H.M. (2007) - A submersible imaging-in-flow instrument to analyze nano and micro-plankton: imaging FlowCytoBot. *Limnol. Oceanogr. Meth.*, **5**: 195-203.
- PARTENSKY F., BLANCHOT J., LANTOINE F., NEVEUX J., MARIE D. (1996) - Vertical structure of picophytoplankton at different trophic sites of the tropical northwestern Atlantic Ocean. *Deep Sea Res. I*, **43**: 1191-1213.
- RIBALET F., MORALES R., SWALWELL J., MARCHETTIA., DURKIN C.A., SCHRUTH D., VAN DEN ENGH G., ARMBRUST E.V. (2009) - Patchiness and diel variability of phytoplankton communities in the NE Subarctic Pacific Ocean revealed by continuous monitoring flow cytometry. ASLO Aquatic Sciences Meeting, Nice, France, 221.
- ROSE J.M., CARON D.A., SIERACKI M.E., POULTON N. (2004) - Counting heterotrophic nanoplanktonic protists in cultures and aquatic communities by flow cytometry. *Aquat. Microb. Ecol.*, **34**: 263-277.
- SALZMAN G.C (1982) - Light scattering analysis of single cells. In: Catsimpoalas N. (ed.), *Cell Analysis*. Plenum Press, New York: 111-143.
- SHALAPYONOK A., OLSON R.J., SHALAPYONOK L.S. (2001) - Arabian Sea phytoplankton during Southwest and Northeast Monsoons 1995: composition, size structure and biomass from individual cell properties measured by flow cytometry. *Deep Sea Res. II*, **48**: 1231-1261.
- SIERACKI C.K., SIERACKI M.E., YENTSCH C.S. (1998) - An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **168**: 285-296.
- SIMON N., LEBOT N., MARIE D., PARTENSKY F., VAULOT D. (1995) - Fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry. *Appl. Envir. Microbiol.*, **61**: 2506-2513.
- SOSIK H.M., OLSON R.J. (2007) - Automated taxonomic classification of phytoplankton sampled with imaging-in-flow cytometry. *Limnol. Oceanogr. Meth.*, **5**: 204-216.
- STEPANAUSKAS R., SIERACKI M.E. (2007) - Matching phylogeny and metabolism in the uncultured marine bacteria, one cell at a time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**: 9052-9057.
- SWALWELL J.E., PETERSEN T.W., VAN DER ENGH G.J., ARMBRUST E.V. (2009) - A position sensitive detector for sheathless flow cytometry. ASLO Aquatic Sciences Meeting, Nice, France, 258.
- THYSSEN M., TARRAN G., ZUBKOV M.V., HOLLAND R.J., GRÉGORI G., BURKILL P.H., DENIS M. (2008) - The emergence of automated high-frequency flow cytometry: revealing temporal and spatial phytoplankton variability. *J. Plank. Res.*, **30**(3): 333-343.
- VAULOT D. (1989) - CYTOPC: Processing software for flow cytometric data. *Signal and Noise*, **2**: 8.
- VAULOT D., OLSON R.J., CHISHOLM S.W. (1986) - Light and dark control of the cell cycle in two marine phytoplankton species. *J. Plankton Res.*, **167**: 38-52.
- VAULOT D., MARIE D. (1999) - Diel variability of photosynthetic picoplankton in the equatorial Pacific. *J. Geoph. Res.*, **104**: 3297-3310.
- VELDHUIS M.J.W., CUCCI T.L., SIERACKI M.E. (1997) - Cellular DNA content of marine phytoplankton using two new fluorochromes: taxonomic and ecological implications. *J. Phycol.*, **33**: 527-541.
- VELDHUIS M.J.W., FUHR F., BOON J.P., TEN HALLERS-TJABBES C.C. (2006) - Treatment of ballast water; how to test a system with a modular concept? *Environ. Technol.*, **27**: 909-921.

-
- VRIELING E.G., ANDERSON D.M. (1996) - Immunofluorescence in phytoplankton research applications and potential. *J. Phycol.*, **32**: 1-16.
- WATSON J.V. (1992) - *Flow Cytometry Data Analysis. Basic concepts and statistics*. Cambridge University Press, Cambridge: 175 pp.
- WILKINS M.F., MORRIS C.W., BODDY L. (1994) - A comparison of radial basis function and back propagation neural networks for identification of marine phytoplankton from multivariate flow cytometry data. *Comput. Appl. Biosci.*, **10**: 285-294.
- YENTSCH C.M., HORAN P.K., MUIRHEAD K., DORTCH Q., HAUGEN E., LEGENDRE L., MURPHY L.S., PERRY M.J., PHINNEY D.A., POMPONI S.A., SPINRAD R.W., WOOD M., YENTSCH C.S., ZAHURANEC B.J. (1983) - Flow cytometry and cell sorting: a technique for analysis and sorting of aquatic particles. *Limnol. Oceanogr.*, **28**: 1275-1280.
- ZEHR J.P., BENCH S.R., CARTER B.J., HEWSON I., NIAZ F. I, SHI T., TRIPP H.J., AFFOURTIT J.P. (2008) - Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic Photosystem II. *Science*, **322**: 1110-1112.
- ZUBKOV M.V., FUCHS B.M., TARRAN G.A., BURKILL P.H., AMANN R. (2003) - High Rate of Uptake of Organic Nitrogen Compounds by Prochlorococcus Cyanobacteria as a Key to Their Dominance in Oligotrophic Oceanic Waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**: 1299-1304.

CAPITOLO 29. PRODUZIONE PRIMARIA

V. Saggiomo, A. Pugnetti, M. Saggiomo, I. Santarpia, O. Mangoni

saggiomo@szn.it

29.1 INTRODUZIONE

La fotosintesi è, a livello globale, il processo metabolico più efficiente, diffuso e conosciuto per trasformare il carbonio inorganico in sostanza organica. In un ecosistema gli organismi capaci di svolgere la fotosintesi forniscono sostanza organica a tutti gli altri e, perciò, sono chiamati “produttori primari”. Non tutti i produttori primari sono fotosintetici, ma tutti gli organismi che fanno la fotosintesi sono produttori primari. Il tasso di produzione di sostanza organica attraverso la fotosintesi determina il tasso di produzione di tutti gli altri livelli trofici nella stragrande maggioranza degli ecosistemi.

Il 35-45% dei processi fotosintetici del pianeta avviene in ambiente acquatico (Falkowski e Raven, 2007), con un flusso di carbonio stimato in circa 50 gigatonnellate per anno (Platt e Sathyendranath, 1993). L'interesse per il ciclo biogeochimico del carbonio e le implicazioni che ha sui cambiamenti climatici hanno reso le stime di produzione primaria marina un argomento estremamente attuale su scala sia globale che regionale (Hanson *et al.*, 1999; Chisholm *et al.*, 2001; Falkowski, 2002).

È noto che molti processi metabolici e fisiologici sono strettamente influenzati dalle dimensioni degli organismi in essi coinvolti. In particolare, esiste una relazione molto stretta tra la distribuzione del fitoplancton nelle diverse classi dimensionali e il flusso di carbonio nelle reti trofiche pelagiche (Legendre e Michaud, 1998). Pertanto, negli ultimi anni si è sempre più affermata la necessità di valutare non solo la produzione primaria totale, ma anche quella ascrivibile alle differenti classi di taglia (Joint *et al.*, 1993).

Nonostante la centralità di questo settore, c'è talvolta confusione, anche tra gli addetti ai lavori, per le terminologie e i metodi utilizzati ed è, quindi, necessario chiarire alcune definizioni prima di descrivere le procedure per la determinazione dei tassi di produzione primaria.

29.2 DEFINIZIONI E PRINCIPIO DEL METODO

La produttività primaria è un tasso che esprime la velocità con cui viene fissato il carbonio durante la fotosintesi. Com'è noto, benché la fotosintesi sia un processo molto complesso che implica numerose reazioni e composti intermedi, essa viene spesso schematizzata in una forma semplificata, nella quale viene evidenziata la caratteristica fondamentale, cioè l'utilizzo dell'energia solare per catalizzare una reazione redox:



La fotosintesi è distinta in una fase luminosa iniziale, che comprende i processi di cattura e trasferimento dell'energia luminosa e la sua trasformazione in energia chimica ed una fase oscura in cui avvengono i processi di organizzazione del carbonio con la formazione, essenzialmente, di carboidrati. Per una trattazione completa dei processi fotosintetici in ambiente acquatico si rimanda al volume Aquatic Photosynthesis (Falkowski e Raven, 2007).

La produzione primaria può essere espressa, in termini assoluti, come moli di carbonio fissate per cellula o per unità di volume in un determinato intervallo di tempo.

Il processo fotosintetico ha una scala temporale dell'ordine dei 10ms, ma tale intervallo temporale ha scarso valore da un punto di vista ecologico: ecco perché l'unità di tempo utilizzata comunemente è l'ora oppure il giorno, mentre l'unità di volume è generalmente il dm³ o il m³.

Il tasso di conversione dell'energia luminosa in energia chimica di legame contenuta nei composti è definita produzione lorda (P_g) (Platt et al., 1984).

La produzione primaria netta (P_n) è invece il tasso netto di accumulo del carbonio, escludendo le perdite dovute alla respirazione degli stessi autotrofi (R_a):

$$P_n = P_g - R_a$$

Platt *et al.* (1989), introducono un ulteriore termine, la produzione netta di comunità (P_c) data dal tasso di accumulo del carbonio escluse tutte le perdite di respirazione della comunità, della componente sia autotrofa che eterotrofa (R_h):

$$P_c = P_g - (R_a + R_h)$$

Partendo dal ruolo svolto dai nutrienti, in particolare dall'azoto, è possibile introdurre altri due concetti: la produzione nuova (P_{new}) e la produzione rigenerata (P_r). Il primo termine definisce una produzione primaria in cui la principale fonte di azoto è il nitrato (NO_3^-), il secondo indica una produzione basata su altri composti azotati, primo fra tutti l'ammonio (NH_4^+) e tipica di aree oligotrofiche, dove non vi è apporto di nutrienti dall'esterno e l'intera comunità funziona sul riciclo (Kaiser *et al.*, 2005).

La produzione primaria totale (P_T) è data da:

$$P_T = P_{new} + P_r$$

Per una revisione critica dei termini utilizzati per definire la produzione primaria si rimanda ai lavori di Williams (1993a) e di Falkowski *et al.* (2003).

Esistono numerosi metodi per la stima del tasso fotosintetico (Tab. 1) che possono essere distinti in due categorie principali. Con il termine di metodi *in vitro* si indicano tutti i metodi in cui il campione è contenuto in una bottiglia di vetro o di altro materiale trasparente. In questo caso il tasso metabolico è determinato in base all'assimilazione di traccianti isotopici (es.: ^{14}C) o, meno comunemente, da cambiamenti nella composizione chimica del mezzo (es.: evoluzione di O_2).

Nei metodi basati sulle "proprietà dell'insieme" (*bulk properties*), si considerano i cambiamenti nella composizione chimica del mezzo libero dovuti all'attività degli organismi (es.: variazioni della concentrazione di ossigeno nelle acque, rapporto $^{238}U/^{234}Th$).

È poi possibile riconoscere un terzo gruppo di metodi, comparso in anni più recenti, basato sulle proprietà ottiche (es. fluorescenza *in vivo*, vedi capitolo 31).

Data la grande varietà di tecniche, di scale temporali e di sensibilità, è evidente che ciascun metodo può portare a diversi significati ed interpretazioni della misura di produzione primaria, come riassunto nella Tab. 1.

Tab. 1 - Metodi per la stima della produzione primaria delle microalghe planctoniche e relative scale temporali: P_g (produzione lorda), P_n (produzione netta) e P_c (produzione netta della comunità); quelle basate sull'azoto sono P_T (produzione totale), P_r (produzione rigenerata) e P_{new} (produzione nuova) (ripresa e modificata da Platt e Sathyendranath, 1993).

Metodi	Tipo di Misura	Scala temporale	Bibliografia
<i>In vitro</i>			
assimilazione ^{14}C	$P_T \equiv P_n$	ore - 1 giorno	Steemann-Nielsen, 1952
assimilazione ^{15}C	$P_T \equiv P_n$	ore - 1 giorno	Slawyk et al., 1977, 1979
evoluzione O_2	P_T	ore - 1 giorno	Williams e Jenkinson, 1982
assimilazione $^{15}\text{NO}_3$	P_{new}	ore - 1 giorno	Dugdale e Goering, 1967
assimilazione $^{15}\text{NH}_4$	P_r	ore - 1 giorno	Dugdale e Goering, 1967
evoluzione $^{18}\text{O}_2$	$P_n \equiv P_c$	ore - 1 giorno	Bender et al., 1987
<i>Proprietà dell'insieme (bulk properties)</i>			
flusso di NO_3 nella zona eufotica	P_{new}	ore - giorni	Altabet e Deuser, 1985; Lewis et al., 1986; Jenkins, 1988
tasso di utilizzazione di O_2 al di sotto della zona fotica	P_{new}	Stagione - anni	Jenkins, 1982
accumulo netto di O_2 nella zona fotica	P_{new}	Stagione - anni	Jenkins e Goldman, 1985
$^{238}\text{U}/^{234}\text{Th}$	P_{new}	1-300 giorni	Coale e Bruland, 1987
<i>Proprietà ottiche</i>			
Doppio-flash di fluorescenza	P_T	< 1 sec	Falkowski e Kolber, 1990
Fluorescenza passiva	P_T	< 1 sec	Kiefer et al., 1989
Fluorescenza variabile modulata	P_T	< 1 sec	Kolber e Falkowski, 1993
Sensori remoti	P_T, P_{new}	giorni - anni	Morel, 1991

Ne consegue che riuscire a comparare tra loro le diverse tecniche comporta serie difficoltà. Questo problema è in parte superato dalla tendenza, ormai ampiamente standardizzata e diffusa, di adottare il metodo che prevede l'assimilazione del ^{14}C , sotto forma di bicarbonato di sodio marcato ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$), da parte delle alghe.

Il metodo del carbonio radioattivo è stato proposto da Steemann-Nielsen nel 1952 e, sebbene con qualche modifica apportata successivamente, è tuttora il più utilizzato in ricerche nell'ambito sia della limnologia che dell'oceanografia. Barber e Hilting (2002) propongono un'interessante revisione critica della storia e dei passaggi fondamentali che hanno portato alla visione attuale delle misure di produzione primaria.

Il metodo consiste nell'incubare dei campioni di acqua di mare in due bottiglie chiare ed una scura in cui viene inoculata una quantità nota di soluzione radioattiva ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$). Le due bottiglie chiare ser-

vono a mediare le eventuali differenze dovute alla non omogeneità del campione e danno, come risultato, la misura della produzione primaria. La bottiglia scura permette di stimare valori di ^{14}C organico di “background” e l’eventuale fissazione di C che può avvenire al buio, principalmente per cause fisiche e chimiche. L’interpretazione dei processi che possono avvenire nella bottiglia scura è molto controversa (Legendre *et al.*, 1983; Harris *et al.*, 1989; Banse, 1993). Per questo alcuni autori (Chavez e Barber, 1987; Richardson, 1987) propongono di utilizzare semplicemente un tempo zero, cioè una bottiglia filtrata immediatamente dopo l’inoculo, che permette di valutare la presenza di ^{14}C organico nell’inoculo stesso e di escludere eventuali errori dovuti a contaminazioni e rumori di fondo. In ogni caso il protocollo riportato da Knap *et al.*, 1996 raccomanda l’utilizzo sia del tempo zero che della bottiglia scura.

Il metodo si basa sull’assunto che l’assimilazione del ^{14}C -DIC è proporzionale a quella del ^{12}C -DIC, tenendo conto di un fattore di correzione che compensi la differente velocità di assimilazione della ^{14}C rispetto al ^{12}C (vedi di seguito).

29.3 PRODOTTI CHIMICI

- Bicarbonato di sodio radioattivo ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) in soluzione acquosa
- Cloruro di sodio (NaCl)
- Carbonato di sodio anidro (Na_2CO_3)
- Idrossido di sodio in pasticche (NaOH)
- Acido cloridrico (HCl) 0,5 N
- Liquido di scintillazione

29.4 PREPARAZIONE DELLA SOLUZIONE DI BICARBONATO DI SODIO MARCATO ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$)

La soluzione madre (A) di bicarbonato marcato ($\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$) libera da sostanze tossiche, è fornita dalle aziende produttrici e, in relazione alle specifiche richieste, può avere un’attività compresa tra 1 e 5 mCi ml^{-1} (da 37 a 185 MBq).

Al fine di ottenere una soluzione di inoculo (B) con attività compresa tra 1 e 20 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$ (da 37 a 740 kBq), la soluzione A deve essere diluita in relazione alla concentrazione presunta di biomassa fitoplanctonica presente in acqua. La soluzione B è preparata aggiungendo ad acqua ultrapura libera da metalli, NaCl con il 0,3% di carbonato di sodio con concentrazione finale tale da ottenere una salinità simile o leggermente superiore a quella del campione di acqua di mare. La soluzione B, prima dell’aggiunta del bicarbonato marcato, dovrà essere portata ad un pH compreso tra 9 e 10,5 con l’aggiunta di una pasticca di NaOH (in genere circa 0,2 g per ogni dm^3 di soluzione), per evitare eventuali fughe di CO_2 marcata nell’ambiente. Dopo l’aggiunta della soluzione A, la soluzione B deve essere sterilizzata in autoclave e conservata in frigorifero in contenitori non contaminati da metalli in tracce (preferibilmente di teflon e precedentemente puliti con HCl 10%). La soluzione B è stabile per diversi mesi ma è consigliabile controllare, prima di ogni esperimento, l’eventuale presenza di precipitati. In questo caso la soluzione deve essere filtrata con apparati sterili (porosità 0,2 μm) e ne deve essere rideterminata, con la metodologia di seguito riportata, l’attività.

29.5 CAMPIONAMENTO E INOCULO DELLA SOLUZIONE RADIOATTIVA

Per decidere le quote di campionamento è indispensabile definire, mediante sensori ottici, i profili di irradianza subacquea e di fluorescenza, utilizzata quale indicatore di biomassa fitoplanctonica. Da irradianza e fluorescenza è possibile, stimare, con buona approssimazione, l’ampiezza della zona eufotica (Innamorati, 1990) e l’estensione potenziale della zona produttiva. Le quote di campionamento variano,

generalmente, da 5 a 8 e sono comprese in un intervallo di luce che va, approssimativamente, dal 95% allo 0,6% dell'irradianza incidente. La scelta delle quote è, comunque, strettamente legata alle diverse esigenze sperimentali. Alcuni ricercatori utilizzano, come criterio di campionamento, quote ottiche fisse e predeterminate: questa metodologia, per ovvie ragioni, è molto utilizzata in condizioni sperimentali di incubazione *in situ* simulato.

Il sistema di raccolta del campione deve essere tale da ridurre al minimo ogni possibile contaminazione: per tale motivo sono preferite delle bottiglie Niskin di tipo GoFlo, prive di meccanismi interni e dotate di un sistema di chiusura in teflon. Le bottiglie Niskin devono essere acidificate e sciacquate abbondantemente prima del campionamento (Knap *et al.*, 1996).

Il prelievo del campione di acqua di mare dalle bottiglie Niskin deve essere effettuato il più rapidamente possibile, per evitare la sedimentazione delle cellule algali. Al fine di ottenere campioni rappresentativi ed omogenei nelle bottiglie di incubazione, si consiglia di prelevare, in una bottiglia di plastica scura un campione unico di circa 1-2 litri. Prima di distribuirlo nelle bottiglie di incubazione, il campione deve essere agitato con cautela e filtrato su di un retino con maglie da 200 μm per eliminare gli organismi zooplanctonici di taglia maggiore. La prefiltrazione è sconsigliata durante fioriture primaverili con dominanza di diatomee coloniali.

Per ciascuna quota sono utilizzate 2 bottiglie chiare ed una scura. In genere, si utilizzano bottiglie di incubazione da 100 ml (di vetro o policarbonato trasparente) per la misura dei tassi di produzione primaria dell'intero popolamento fitoplanctonico e bottiglie da 300 ml per le misure dei tassi di produzione primaria delle diverse classi dimensionali del fitoplancton [micro- (> 20 μm), nano- (20-2 μm) e pico-fitoplancton (< 2 μm)]. Per ridurre al minimo la contaminazione da metalli in tracce, prima dell'uso le bottiglie devono essere acidificate e sciacquate abbondantemente con acqua Milli-Q (Fitzwater *et al.*, 1982).

L'acqua di mare raccolta nelle bottiglie di incubazione viene inoculata con una soluzione radioattiva con attività variabile (da 1 a 20 $\mu\text{Ci ml}^{-1}$) in dipendenza della concentrazione della biomassa fitoplanctonica. L'inoculo della soluzione radioattiva deve essere effettuato in condizioni di luce bassa e con micropipette ad alta precisione, tali da assicurare la maggiore riproducibilità possibile dei risultati.

Le bottiglie devono essere mantenute al buio fino al momento d'inizio dell'incubazione. La durata dell'incubazione è argomento piuttosto discusso. Per il calcolo della produzione giornaliera è, infatti, consigliabile un'incubazione che copra l'intero fotoperiodo (dall'alba al tramonto), ma, d'altro canto, incubazioni troppo lunghe (> 6 ore) aumentano i problemi legati al cosiddetto effetto bottiglia (vedi par. 9). In ogni caso la durata minima della sperimentazione che consente una misura affidabile è di 2 ore, ma, anche in relazione alla disponibilità di tempo - nave, si preferisce, generalmente, un intervallo di 3-4 ore, intorno a mezzogiorno.

Per effettuare misure dei tassi di produzione primaria bisogna incidere il meno possibile nel modificare le condizioni naturali del popolamento fitoplanctonico. Attualmente sono utilizzati due differenti tipi di incubazione: l'incubazione *in situ* oppure l'incubazione *in situ* simulato. Quest'ultima può essere condotta sul ponte della nave in vasche con circolazione di acqua termostata e schermi neutri per simulare le condizioni di luce delle quote di campionamenti oppure in incubatori con luce artificiale.

29.6 SISTEMA DI INCUBAZIONE

Il volume delle bottiglie di incubazione da utilizzare è dipendente dalla scelta di effettuare misure dei tassi di produzione primaria totale (100 ml) oppure di definire il contributo delle differenti classi dimensionali alla produzione totale (300 ml).

Per quanto riguarda l'incubazione *in situ*, dopo aver raccolto il campione ed effettuato l'inoculo con la soluzione di carbonio marcato, le bottiglie sono collocate, in apposite strutture di mantenimento e posizionate, lungo una cima metrata, alle rispettive profondità di campionamento. All'estremità inferiore della cima è agganciato un peso per garantirne la perpendicolarità, mentre la parte superiore è assicurata

ad un'asta di circa 2 metri di lunghezza alle cui estremità sono posizionate due boe. Una volta terminata l'incubazione, la cima viene salpata e i campioni sottoposti alle procedure analitiche che saranno descritte di seguito.

L'incubazione *in situ* consente di rispettare, al meglio, le condizioni ideali, ovvero, la sperimentazione è effettuata in condizioni simili a quelle reali attraverso l'esposizione dei campioni ad intensità di luce naturali con le stesse fluttuazioni e le stesse lunghezze d'onda e ai valori di temperatura propri della profondità a cui sono stati prelevati. L'incubazione *in situ* facilita anche la scelta della quota di campionamento poiché non necessita di apparati particolari per simulare le condizioni naturali.

Sebbene questo sistema sia certamente il più corretto, presenta alcuni svantaggi di tipo logistico tra cui l'allungamento del "tempo nave" sulle stazioni di prelievo, con la conseguente impossibilità di effettuare stime di produzione su più stazioni nella stessa giornata e la necessità di particolari dispositivi di sicurezza (Lohrenz, 1993).

L'alternativa è l'incubazione *in situ* simulato. In questo caso, la sperimentazione viene condotta in incubatori di PVC scuro per ciascuna quota ottica, opportunamente schermati con filtri neutri per riprodurre le intensità luminose delle varie profondità e termostatati alle temperature delle quote di campionamento (Lohrenz *et al.*, 1992). Questo metodo consente il mantenimento delle condizioni di temperatura, ma certamente è affetto dall'errore di non schermare qualitativamente la luce. Laws *et al.* (1989) consigliano, per ridurre almeno in parte il problema della qualità della luce, l'utilizzo di schermi con una correzione per il blu.

L'incubazione *in situ* simulato oltre ai vantaggi in termini di tempo nave, risulta l'unico sistema possibile in alcune situazioni estreme, quale possono essere le misure di produzione primaria in aree polari con lastroni di ghiaccio marino vaganti.

29.7 TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Sulla base degli obiettivi dell'attività di ricerca che si sta svolgendo, una volta terminata l'incubazione, è possibile determinare la produzione primaria particellata, sia totale sia frazionata (metodi di filtrazione), quella totale (senza filtrazione) e quella essudata.

È importante comunque che, al termine delle incubazioni, le bottiglie chiare vengano rapidamente schermate fino al momento del trattamento successivo che deve essere effettuato direttamente a bordo, nel più breve tempo possibile e a bassa luce.

29.7.1 Determinazione della produzione particellata totale e frazionata

Questo metodo permette di determinare la quota di carbonio che è stato organicato e che si trova all'interno delle cellule algali, sia complessivamente (produzione particellata totale) sia nelle varie frazioni dimensionali (produzione particellata frazionata).

Per la determinazione della produzione particellata totale, il campione viene filtrato su filtri di lana di vetro (Whatman GF/F), mentre per la valutazione del contributo delle classi dimensionali, uguali aliquote di campione vanno filtrati su filtri di lana di vetro (Whatman GF/F) e su membrane di polycarbonato a differenti porosità a secondo delle frazioni prescelte (es.: 20, 10, 5, 3, 2 o 1 μm).

Durante la filtrazione, per evitare perdite di materiale, le bottiglie (e il tappo) di incubazione e gli imbuto vanno sciacquati accuratamente con acqua di mare filtrata. Il filtro, al termine della filtrazione, deve essere delicatamente lavato sul supporto di filtrazione con acqua di mare filtrata allo scopo di eliminare l'acqua contenente carbonio inorganico marcato. Infine, il filtro va posto sul fondo di una fiala da scintillazione e congelato a -20°C per le successive misure allo scintillatore.

In laboratorio, sui filtri posti in fiale da scintillazione vanno aggiunti 100 μl di HCl 0,5 N per eliminare eventuali tracce di ^{14}C inorganico oppure esponendo i filtri a vapori di HCl concentrato. Queste

operazioni, che prevedono un contatto o un'esposizione a vapori di HCl dei filtri per almeno 12 ore, devono essere rigorosamente effettuate, in area controllata, sotto cappa aspirante con sistema di filtri per intrappolare la CO₂ marcata. Dopo questa fase, si aggiungono, con un dosatore, 10 ml di liquido da scintillazione,

Le fiale, dopo essere state agitate vigorosamente, si lasciano equilibrare al freddo (4 °C) e al buio per un'ora, dopodichè è determinata la radioattività con uno scintillatore in fase liquida.

Nella maggior parte delle tecniche di scintillazione liquida, è necessario determinare l'estinzione (*quenching*) del segnale dovuto allo stesso *cocktail* di scintillazione e alle particelle presenti in soluzione o a sostanze colorate dovute (pigmenti disciolti). A tale scopo, alcuni scintillatori presentano una sorgente esterna di raggi γ , che permette di calcolare un fattore di conversione che trasformi i conteggi per minuto (CPMs) nel numero effettivo di disintegrazioni per minuto (DPMs). Esistono in commercio diversi tipi di *cocktails* per scintillazione e ciascuno ha una sua specifica efficienza e grado di *quenching*, che vanno testati prima di effettuare le analisi.

29.7.2 Determinazione della produzione totale ed essudata

Il metodo per determinare la produzione totale ed essudata è il medesimo (Schindler *et al.*, 1972). Ciò che varia fra le due determinazioni, è solo il campione di partenza: tal quale nel primo caso, filtrato nel secondo.

Per produzione totale, si intende la quota di produzione che comprende sia quella particellata (il carbonio che è stato organicato e che si trova nelle cellule algali) sia quella essudata (il carbonio che è stato organicato ed è stato essudato dalle cellule algali), senza possibilità di distinguere fra le due. La sua analisi ha il vantaggio di essere rapida e semplice e di permettere di evitare gli artefatti e i danni alle cellule che spesso accompagnano le filtrazioni (Lignell, 1992). La produzione totale sarà tanto più simile, come risultato, alla produzione particellata (da filtrazione), quanto minore è la quota di produzione essudata. Il volume di campione che può essere analizzato, come si vedrà in seguito, è inferiore ai 10 ml. Ciò rende questo metodo più adatto ad acque meso-eutrofe, per ovvie ragioni di concentrazione della biomassa algale e di rappresentatività del campione.

La produzione primaria essudata, la cui determinazione comporta la raccolta del campione filtrato (vedi paragrafo precedente), dà informazioni molto utili relative allo stato fisiologico delle alghe (Wood e Van Valen, 1990) e alla potenziale intensità dell'accoppiamento fra produzione primaria e produzione batterica. Specialmente in ambienti oligotrofi gli essudati algali possono, infatti, sostenere quasi totalmente la produzione batterica e, quindi, il cosiddetto "microbial loop" (Baines e Pace, 1991).

Da ciascuna bottiglia di incubazione (per la produzione totale) oppure dall'acqua filtrata attraverso ciascun filtro (per la produzione essudata), si prelevano due subcampioni da 5 – 7 ml in fiale da scintillazione che, dopo l'aggiunta di 0,5 ml di HCl 6N, vengono messe in agitazione per un'ora sotto cappa per radiochimica. In questa fase, l'azione dell'acido e dell'agitazione meccanica permette di eliminare, sotto forma di ¹⁴CO₂, tutto il ¹⁴C inorganico ancora presente nei campioni, lasciando nel campione il solo ¹⁴C organico. Al termine dell'agitazione si aggiungono 0,5 ml di NaOH 6N e 10-20 ml di cocktail, scelto tra quelli idonei per il trattamento dei campioni in fase liquida.

La liberazione della ¹⁴CO₂ deve avvenire in condizioni controllate, sotto cappa per radiochimica, e osservando le normative di radioprotezione, in vigore a livello regionale e nazionale.

Per le determinazioni della radioattività con lo scintillatore valgono le stesse raccomandazioni descritte nel paragrafo precedente per la produzione particellata.

29.8 CALCOLI

Il calcolo per determinare il tasso di assimilazione del carbonio prende in considerazione la concentrazione iniziale del DIC nel campione, la quantità di ^{14}C -DIC aggiunto e il ^{14}C incorporato (o essudato) alla fine dell'incubazione. Inoltre, nel calcolo è introdotto il fattore di correzione moltiplicativo (1,05) che compensa la differente velocità di assimilazione della $^{14}\text{CO}_2$ che è inferiore del 5% rispetto a quella del ^{12}C .

$$\text{Produzione primaria (mgC m}^{-3} \text{ h}^{-1}) = \frac{\text{DIC} * ^{14}\text{C-POC} * 1,05}{^{14}\text{C-DIC} * h}$$

dove:

DIC [mgC l^{-1}] = carbonio inorganico disciolto nell'acqua di mare

$^{14}\text{C-POC}$ = attività del filtro in DPM

$^{14}\text{C-DIC}$ = attività inoculata in DPM

1,05 = fattore di correzione per la più bassa velocità di assimilazione del ^{14}C rispetto al ^{12}C

h = tempo di incubazione

Per la stima del DIC si rimanda a Catalano (1992).

Per la stima dell'attività inoculata ($^{14}\text{C-DIC}$) si diluisce, in un matraccio da 100 cm^3 contenente acqua distillata basica o la soluzione di diluizione, la stessa quantità di $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ inoculata nei campioni (1 ml della sol. B). Dalla soluzione così preparata si prelevano, con una pipetta automatica, almeno 5 aliquote di campione tali che il valore della loro lettura allo scintillatore ricada nella parte più lineare della curva di efficienza dell'apparecchio. Ogni aliquota è posta in fiale di vetro alla quale è aggiunto il liquido da scintillazione. Il campione deve essere stabilizzato come sopra descritto prima della lettura allo scintillatore.

Il calcolo è fatto per le due bottiglie chiare (valore medio) a cui è sottratto il valore ottenuto per la bottiglia scura.

Disponendo di un numero adeguato di campionamenti nello strato eufotico (5-8 quote), è possibile calcolare la produzione integrata nello strato analizzato ed esprimere il risultato finale per m^2 . La produzione è, quindi, espressa in mgC m^{-3} per le singole quote oppure in mgC m^{-2} integrata nell'intera zona eufotica.

La produzione primaria giornaliera può essere calcolata moltiplicando i valori di produzione durante il periodo di incubazione per un fattore derivato dal rapporto tra la quantità di luce PAR dell'intera giornata e quella misurata durante il periodo di incubazione. Per poter effettuare tali calcoli è indispensabile disporre di un sensore quantico che registri la PAR durante l'intero arco della giornata. Tale procedimento non tiene conto della variazioni circadiane dei processi di fotosintesi.

Un'accurata stima del tasso fotosintetico non può prescindere dalla determinazione della distribuzione della biomassa fitoplanctonica lungo la colonna d'acqua (vedi Capitolo 33), in maniera da poter calcolare i rapporti produzione/biomassa (P/B) e avere una stima dell'effettiva capacità fotosintetica del popolamento fitoplanctonico in relazione a fattori di stress o di limitazione di risorse.

29.9 VANTAGGI E SVANTAGGI

Grazie alla sua sensibilità e riproducibilità, le misure basate sull'incorporazione del ^{14}C costituiscono di gran lunga il sistema più utilizzato per la determinazione del tasso fotosintetico delle comunità fitoplanctoniche naturali. Gli scintillatori a fase liquida, infatti, garantiscono una notevole precisione anche

per concentrazioni di biomassa ridotte, tipiche ad esempio degli ambienti oligotrofici. Proprio per la sua ampia diffusione e per le moderate modifiche alle quali è andato incontro negli ultimi 50 anni, questo metodo è, pertanto, quello che permette la maggior confrontabilità fra dati raccolti su ampie scale spaziali e temporali.

Tuttavia il principale problema nelle misure di produzione primaria con il metodo del carbonio radioattivo su campioni naturali è che, in relazione principalmente alla durata dell'incubazione ed al tasso di crescita e di respirazione delle cellule algali, ciò che si ottiene è una misura ambigua tra produzione netta e lorda (Geider e Osborne, 1989; Williams, 1993b; Banse, 2002). Con questo metodo, infatti, non è possibile ottenere stime di respirazione della comunità algale. Queste stime possono essere acquisite con altri metodi (vedi Capitolo 18), che anche se utilizzati contemporaneamente a quello del carbonio radioattivo, sono di difficile confrontabilità.

Inoltre, le cellule algali hanno uno spettro dimensionale che spesso si sovrappone a quello degli eterotrofi che vivono nello stesso ambiente: all'interno delle bottiglie di incubazione, permangono le interazioni funzionali fra gli uni e gli altri e ciò costituisce un'ulteriore complicazione nell'interpretazione dei dati di produzione primaria. In particolare, la respirazione, il riciclo del carbonio fra alghe e batteri e la predazione, nel loro complesso, interferiscono inevitabilmente con le misure di produzione, in modo tanto più forte, quanto più lunga è la durata delle incubazioni ("effetto bottiglia": Leftley *et al.*, 1983).

Un altro problema è rappresentato dalla conversione del risultato ottenuto attraverso un'incubazione con durata generalmente di 2-6 ore in un tasso di produzione giornaliero. Di fatto la scelta della durata dell'incubazione rappresenta un compromesso tra un'incubazione sufficientemente lunga da fornire una risposta integrata su un'opportuna scala temporale ed un'incubazione sufficientemente breve da ridurre gli effetti del confinamento sul popolamento. Inoltre un'estrapolazione lineare del tasso di produzione sull'intero fotoperiodo determina una certa percentuale d'errore dovuta, come sopra detto, alla presenza di cicli circadiani (Harding *et al.*, 1982). A tal proposito Lohrenz (1993) suggerisce di utilizzare, ove possibile, una combinazione di strategie d'incubazione per determinare la sensibilità delle stime di produzione agli effetti della durata dell'incubazione.

Infine, sono da evidenziare le problematiche legate al rispetto delle normative vigenti per la radioprotezione e lo smaltimento dei rifiuti radioattivi. L'utilizzo del ^{14}C comporta, infatti, l'osservazione di precise normative di sicurezza, in laboratori appositamente attrezzati, anche sulle navi oceanografiche, e lo smaltimento dei rifiuti radioattivi da parte di ditte autorizzate, con costi complessivi che possono incidere pesantemente sulle attività di ricerca.

29.10 BIBLIOGRAFIA

- ALBET M.A., DEUSER W.G. (1985) - Seasonal variations in natural abundance of ^{15}N in particles sinking to the deep Sargasso Sea. *Nature*, **315**: 218-219.
- BAINES S.P., PACE M.L. (1991) - The production of dissolved organic matter by phytoplankton and its importance to bacteria: patterns across marine and freshwater systems. *Limnol. Oceanogr.*, **36**: 1078-1090.
- BANSE C. (1993) - On the dark bottle in the ^{14}C method for measuring marine phytoplankton production. *ICES Marine Science Symposium*, **197**: 132-140.
- BANSE C. (2002) - Should we continue to measure ^{14}C uptake by phytoplankton for another 50 years? *Limnol. Oceanogr. Bull.*, **11**: 45-46.
- BARBER R.T., HILTING A.K. (2002) - History of the study of plankton productivity. In: *Phytoplankton Productivity - Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems*. Williams P.J.le B., Thomas D.N., Reynolds C.S. (eds), Blackwell Science: 16-43.
- BENDER M., GRANDE K., JOHNSON J., MARRA J., WILLIAMS P.J. LEB., SIEBURTH J., PILSON M., LANGDON C., HITCHCOCK G., ORCHARDO J., HUNT C., DONAGHAY P., HEINEMANN K. (1987) - A comparison of four methods for determining planktonic community production. *Limnol. Oceanogr.*, **32**: 1085-1098.
- CATALANO G. (1992) - Alcalinità e carbonio inorganico totale. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera d'Alcalà M. (eds), *Metodi nell'ecologia nel plancton marino*. Nova Thalassia, LINT, Trieste: 115-122.

-
- CHAVEZ F.P., BARBER R.T. (1987) - An estimate of new production in the Equatorial Pacific. *Deep Sea Res.*, **34**: 1229-1243.
- CHISHOLM S. W., FALKOWSKI P. G., CULLEN J. J. (2001) - Dis-crediting ocean fertilization. *Science*, **294**: 309-310.
- COALE K.H., BRULAND K.W. (1987) - Oceanic stratified euphotic zone as elucidated by ^{234}Th : ^{238}U disequilibria. *Limnol. Oceanogr.*, **32**: 189-200.
- DUGDALE R.C., GOERING J.J. (1967) - Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 196-206.
- FALKOWSKI P.G. (2002) - On the evolution of the carbon cycle. In: *Phytoplankton Productivity – Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems*. Williams P. J. le B., Thomas D. N., Reynolds C.S. (eds), Blackwell Science, pp. 318-349.
- FALKOWSKI P.G., KOLBER Z. (1990) - Phytoplankton photosynthesis in the Atlantic Oceans measured from a submersible pump and probe fluorometer in situ. In: Baltscheffsky, (ed), *Current Research in Photosynthesis IV*, Kluwer, London: 923-926.
- FALKOWSKI P.G., EDWARDS A., LAWS R.T., BARBER J.W., MURRA Y. (2003) - Phytoplankton and their role in primary, new and export production. In: *Ocean Biogeochemistry: the Role of the Ocean Carbon Cycle in Global Change*. M.J.R. Fasham (ed), International Geosphere-Biosphere Programme Book Series, Springer-Verlag: 99-122.
- FALKOWSKI P.G., RAVEN J.A. (2007) - *Aquatic photosynthesis*. Blackwell Science: 486.
- FITZWATER S.E., KNAUER G.A., MARTIN J.H. (1982) - Metal contamination and its effects on primary production measurements. *Limnol. Oceanogr.* **27**: 544-551.
- GEIDER R.J., OSBORNE B.A. (1989) - Respiration and microalgal growth: a review of the quantitative relationship between dark respiration and growth. *New Phytol.*, **112**: 327.
- HANSON R., DUCKLOW H.W., FIELD J. (1999) - *The Changing Ocean Carbon Cycle, a midterm synthesis of Joint Global Ocean Flux Study*. In: Hanson R., Ducklow H.W., Field J. (eds), International Geosphere-Biosphere Programme Book Series Nr. 5., Cambridge University Press: 378.
- HARDING L.W. JR., PREZELIN B.B., SWEENEY B.M., COX J.L. (1982) - Primary production as influenced by diel periodicity of phytoplankton photosynthesis. *Mar. Biol.*, **67**: 179-186.
- HARRIS G.P., GRIFFITHS F.B., THOMAS D.P. (1989) - Light and dark uptake and loss of ^{14}C : methodological problems with productivity measurements in oceanic waters. *Hydrobiologia*, **173**: 95-105.
- INNAMORATI M. (1990) - Misurazione dell'irradianza. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera d'Alcalá M. (eds), *Metodi nell'ecologia nel plancton marino*. Nova Thalassia, LINT, Trieste: 11-67.
- JENKINS W.J. (1982) - Oxygen utilization rates in North Atlantic subtropical gyre and primary production in oligotrophic systems. *Nature*, **300**: 246-248.
- JENKINS W.J. (1988) - Nitrate flux into the euphotic zone near Bermuda. *Nature*, **331**: 521-523.
- JENKINS W.J., GOLDMAN J.C. (1985) - Seasonal oxygen cycling and primary production in the Sargasso Sea. *J. Mar. Res.*, **43**: 465-491.
- JOINT I., POMROY A., SAVIDGE G., BOYD P. (1993) - Size-fractionated primary productivity in the northeast Atlantic in May-July 1989. *Deep Sea Res. II*, **40**: 423-440.
- KAISER M.J., ATTRILL M.J., JENNINGS S., THOMAS D.N., BARNES D.K.A., BRIERLEY A.S., POLUNIN N.V.C., RAFFAELLI D.G., WILLIAMS P.J.LEB. (2005) - *Marine Ecology, Processes, systems and Impacts*. Oxford University Press, Oxford: 558 pp.
- KIEFER D.A., CHAMBERLIN W.S., BOOTH C.R. (1989) - Natural fluorescence of chlorophyll a: relationship to photosynthesis and chlorophyll concentration in the Western South Pacific gyre. *Limnol. Oceanogr.*, **34**: 868-881.
- KNAP A., MICHAELS A., CLOSE A., DUCKLOW H., DICKSON A. (1996) - Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements. JGOFS Report No. 19, Reprint of the IOC manuals and guides, No. 29, UNESCO, Paris: 170 pp.
- KOLBER Z., FALKOWSKI P.G. (1993) - Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis in situ. *Limnol. Oceanogr.*, **38**: 1646-1665.
- LAWS E.A., DI TULLIO G.R., BETZER P.R., KARL D.M., CARDER K.L. (1989) - Autotrophic production and elemental fluxes at 26°N , 155°W in the North Pacific subtropical gyre. *Deep-Sea Res.*, **36**: 103-120.
- LEFTLEY J.W., BONIN D.J., MAESTRINI S.Y. (1983) - Problems in estimating marine phytoplankton growth, productivity and metabolic activity in nature: an overview of methodology. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **21**: 23-66.

-
- LEGENDRE L., MICHAUD J. (1998). Flux of biogenic carbon in oceans: size-dependent regulation by pelagic food webs. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **164**: 1-11.
- LEGENDRE L., DEMERS S., YENTSCH C.M., YENTSCH C.S. (1983) - The ^{14}C method: patterns of dark CO_2 fixation and DCMU correction to replace the dark bottle. *Limnol. Oceanogr.*, **28**: 996-1003.
- LEWIS M.R., HARRISON W.G., OAKEY N.S., HEBERT D., PLATT T. (1986). Vertical nitrate fluxes in the oligotrophic ocean. *Science*, **234**: 870-873.
- LIGNELL R. (1992) - Problem in filtration fractionation of ^{14}C primary productivity samples. *Limnol. Oceanogr.*, **37**: 172-178.
- LOHRENZ S.E. (1993) - Estimation of primary production by the simulated *in situ* methods. *ICES Marine Science Symposia*, **197**: 159-171.
- LOHRENZ S.E., WIESENBURG D.A., REIN C.R., ARNONE R.A., TAYLOR C.T., KNAUER G.A., KNAPA H. (1992) - A comparison of *in situ* and simulated *in situ* methods for estimating oceanic primary production. *J. Plankton Res.*, **14**: 201-221.
- MOREL A. (1991) - Light and marine photosynthesis: a spectral model with geochemical and climatological implications. *Progr. Oceanogr.*, **26**: 263-306.
- PLATT T., SATHYENDRANATH S. (1993) - Fundamental issues in measurement of primary production. *ICES Marine Science Symposia*, **197**: 3-8.
- PLATT T., LEWIS M., GEIDER R. (1984) - Thermodynamics of the pelagic ecosystem: elementary closure conditions for biological production in the open ocean. In: Fasham M.J.R. (ed.), *Flows of energy and materials in marine ecosystems*. Plenum Press, New York: 49-84.
- PLATT T., HARRISON W.G., LEWIS M., LI W.K.W., SATHYENDRANATH S., SMITH R.E. AND VENZINA A.F. (1989) - Biological production in the oceans: the case for a consensus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **52**: 77-88.
- RICHARDSON K. (1987) - Primary production: guidelines for the measurements by ^{14}C incorporation. *ICES Tech. Mar. Environ. Sci.*, **5**: 21.
- SCHINDLER D.W., SCHMIDT R.W., REID R.A. (1972) - Acidification and bubbling a san alternative to filtration in determining phytoplankton production by the ^{14}C method. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **29**: 1627-1631.
- SLAWYK G., COLLOS Y., AUCLAIR J.C. (1977) - The use of the ^{13}C and ^{15}N isotopes for the simultaneous measurements of carbon and nitrogen turnover rates in marine phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **22**: 925-932.
- SLAWYK G., COLLOS Y., AUCLAIR J.C. (1979) - Reply to comment by Fishen et al. *Limnol. Oceanogr.*, **24**: 595-597.
- STEEMAN-NIELSEN E. (1952) - The use of radioactive carbon (C^{14}) for measuring organic production in the sea. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, **18**: 117-140
- STRICKLAND J.D.H., PARSONS T.R. (1972) - A practical hadbook of seawater analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, **167**: 311.
- WILLIAMS P.J. LE B. (1993a) - On the definition of plankton production terms. *ICES Marine Science Symposia*, **197**: 9-19.
- WILLIAMS P.J. LE B. (1993b) - Chemical and tracer methods of measuring plankton production. *ICES Marine Science Symposia*, **197**: 20-36.
- WILLIAMS P.J..LE B., JENKINSON N.W. (1982) - A transportable microprocessor-controlled precise Winkler titration suitable for field station and shipboard use. *Limnol. Oceanogr.*, **34**: 1300-1305.
- WOOD A.M., VAN VALEN L.M. (1990) - Paradox lost? On the release of energy-rich compounds by phytoplankton. *Mar. Microb. Food Webs*, **4**: 103-116

CAPITOLO 30. PARAMETRI FOTOSINTETICI: CURVE FOTOSINTESI-IRRADIANZA (P vs E - METODO ¹⁴C)

V. Saggiomo, L. Lazzara, O. Mangoni, F. Fani, I. Santarpia

saggiomo@szn.it

30.1 INTRODUZIONE

Al fine di stimare i flussi di carbonio su scala mondiale, diversi autori hanno centrato l'attenzione sui parametri legati all'assorbimento delle radiazioni luminose durante la fotosintesi e, quindi, sull'utilizzo del carbonio da parte del fitoplancton (Platt e Sathyendranath, 1988; Barber e Hilting 2002; Behrenfeld *et al.*, 2002).

Nei sistemi acquatici le stime di produzione primaria a scala globale richiedono modelli che prendano in considerazione la distribuzione profondità-dipendente della biomassa fitoplanctonica e dell'irradianza lungo la colonna d'acqua. Indipendentemente dal tipo di modello utilizzato, tutte le stime si basano sul concetto che la produzione primaria è principalmente funzione dell'irradianza.

Per la costruzione e l'applicazione di questi modelli sono fondamentali i parametri fotosintetici calcolati dalle curve P vs. E.

Come verrà ampiamente discusso nel paragrafo successivo, questi parametri, sono strettamente correlati allo stato fisiologico del fitoplancton e, quindi, forniscono un prezioso strumento per la comprensione delle sue risposte ai principali parametri ambientali (regime luminoso, dinamica dei nutrienti, temperatura, etc.) e dei meccanismi di controllo e di *feedback* della fotosintesi (Lewis *et al.*, 1984; Geider *et al.*, 1996; Sakshaug *et al.*, 1997).

30.2 PRINCIPIO DEL METODO

Sono stati sviluppati numerosi modelli matematici per descrivere il tasso di fotosintesi (P) di un popolamento fitoplanctonico sottoposto a diverse intensità luminose (E) e per calcolare i parametri fotosintetici (Smith, 1936; Jassby e Platt, 1976; Dubinsky *et al.*, 1986). Una curva-tipo fotosintesi-irradianza (curve P vs. E) può essere distinta in tre regioni: una dove la fotosintesi è limitata dalla luce, una dove è saturata ed un'ultima dove è fotoinibita (Fig. 1).

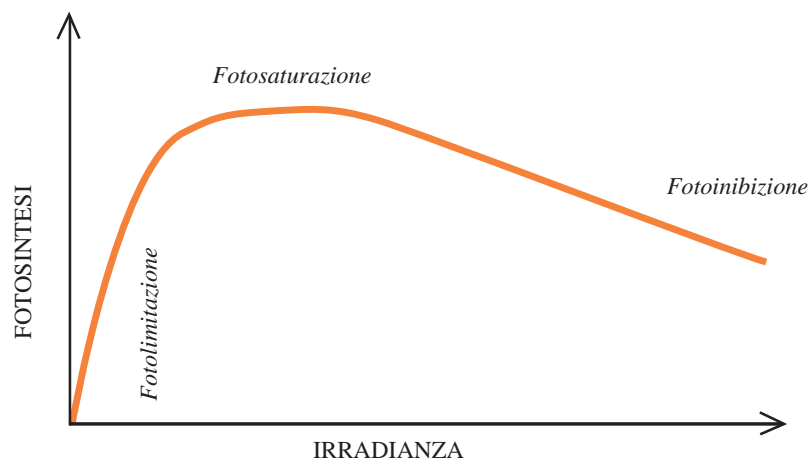


Fig. 1 - Andamento della fotosintesi con l'irradianza (curva P vs. E). La funzione passa attraverso l'origine perché non considera le perdite dovute alla respirazione cellulare.

Attualmente l'algoritmo più utilizzato nel campo dell'oceanografia e della limnologia, per descrivere le curve P vs. E e stimarne i parametri fotosintetici, è quello proposto da Platt *et al.* (1980):

$$P^B = P_s^B [1 - \exp(-\alpha^B E / P_s^B)] \exp(-\beta E / P_s^B) \quad (1)$$

dove:

- P^B (capacità fotosintetica) è il tasso di produzione specifica espresso in $\text{mgC (mgChla)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, normalizzato per la biomassa (B) intesa come clorofilla a (Chla);
- P_s^B è il massimo tasso fotosintetico teorico in assenza di fotoinibizione;
- α^B (efficienza fotosintetica) è il coefficiente angolare della parte lineare (regione fotolimitata) della curva, espressa in $\text{mgC (mgChla)}^{-1} \text{ h}^{-1} / \mu\text{moli fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$;
- β (indice di foto inibizione) è il coefficiente angolare negativo della retta ad alta irradianza, espresso in $[\text{mgC (mgChla)}^{-1} \text{ h}^{-1}] / \mu\text{ moli fotoni m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Se si deriva l'equazione (1) rispetto all'irradianza, si ottiene:

$$\partial P^B / \partial E = (\alpha + \beta) \exp(-\alpha E / P_s^B + \beta E / P_s^B) - \beta \exp(-\beta E / P_s^B) \quad (2)$$

per $E \rightarrow 0$, $\partial P^B / \partial E \rightarrow \alpha$, una costante.

Ponendo $\partial P^B / \partial E = 0$, si ottiene E_m , il valore di irradianza al quale la fotosintesi è massima:

$$E_m = P_s^B / \alpha \log_e [(\alpha + \beta) / \beta] \quad (3)$$

Sostituendo l'equazione (3) nella (1), si ottiene l'equazione:

$$P_m^B = P_s^B (\alpha / \alpha + \beta) (\beta / \alpha + \beta)^{\beta / \alpha} \quad (4)$$

dove per $\beta \rightarrow 0$, $P_m^B \rightarrow P_s^B$, cioè P_m^B e P_s^B coincidono se non c'è inibizione della fotosintesi. Per $\beta > 0$, $P_s^B > P_m^B$, e, quindi, P_s^B è il tasso massimo di fissazione del carbonio a luce saturante e in assenza di fotoinibizione (Fig. 2).

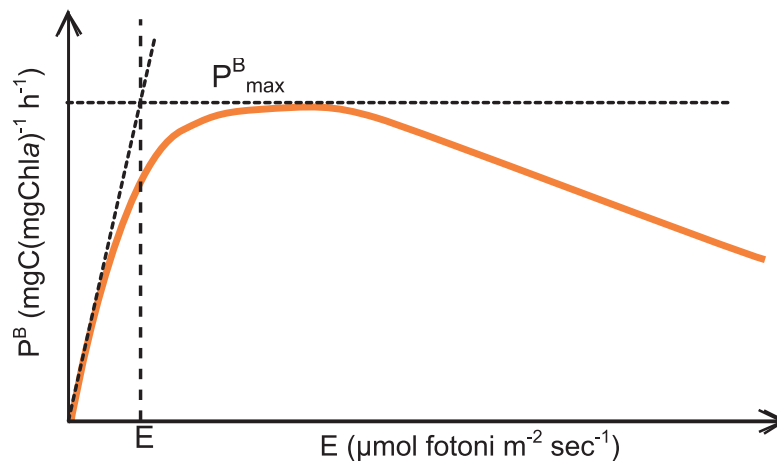


Fig. 2 - Una curva P vs. E tipo e i relativi parametri fotosintetici.

Analizzando nel dettaglio l'andamento delle curve P vs. E , per bassi livelli di luce, i tassi fotosintetici sono linearmente proporzionali all'irradianza, in quanto è il tasso di assorbimento dei fotoni a determinare il tasso fotosintetico (regione limitata dalla luce). L'efficienza fotosintetica (α^B) rappresenta, quindi, la capacità di utilizzazione dell'energia fotonica a bassa irradianza ed è funzione dei processi fotochimici, per cui dipende dalla resa quantica e dall'abilità delle cellule ad intrappolare la luce incidente. Come riportato da Sakshaug *et al.* (1997) α^B è direttamente proporzionale alla sezione di assorbimento funzionale del PSII (σ_{PSII}) e al numero di unità fotosintetiche (n) secondo la relazione:

$$\alpha^B = n \cdot \sigma_{PSII}$$

Diversi studi, inoltre, indicano che l'efficienza dipende dalla dimensione delle cellule, dalla composizione pigmentaria, dalla qualità della luce (Falkowsky e Raven, 2007).

Nella seconda parte della curva il tasso fotosintetico aumenta in maniera non lineare fino a raggiungere un livello di saturazione, indicato dal valore della capacità fotosintetica P_m^B (Fig. 2).

P_m^B è correlato al numero di unità fotosintetiche (n) presenti nella cellula ed al tasso massimo di trasporto degli elettroni dall'acqua alla CO_2 ($1/\tau$) dalla seguente relazione:

$$P_m^B = n(1/\tau)$$

Diversamente da α^B , P_m^B non è spettralmente dipendente e quindi non può essere derivato direttamente da misure di assorbimento di luce, ma solo da relazioni empiriche. Le evidenze sperimentali suggeriscono che sia legato a processi enzimatici della fotosintesi e a fattori ambientali (es. temperatura, macro- e micro-nutrienti).

L'intersezione di α^B e P_m^B individua, analiticamente, E_k ($\mu\text{moli fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$), l'indice di fotoadattamento, definito come limite tra foto limitazione e foto saturazione.

Per $E < E_k$, il tasso di assorbimento dei fotoni è minore di $1/\tau$, e quindi il tasso fotosintetico è inferiore alle capacità del sistema; per $E > E_k$, il tasso di assorbimento dei fotoni eccede $1/\tau$ con conseguenti possibili danni all'apparato fotosintetico.

Nella terza parte della curva i livelli di irradianza sono talmente elevati, da determinare una riduzione del tasso fotosintetico (fotoinibizione). L'elevata intensità luminosa determina la formazione di O_2 estremamente reattivo e, quindi, l'ossidazione delle clorofille dei centri di reazione con conseguente riduzione dell'efficienza fotochimica del fotosistema. Il fenomeno dipende dall'intensità della luce, ma anche dalla durata dell'esposizione. Si veda Adir *et al.*, (2003) per una *review* completa sulla fotoinibizione.

La maggior parte degli organismi fotoautotrofi ha evoluto dei meccanismi di protezione per rimanere, il più vicino possibile al valore d'irradianza saturante (E_k) (Garcia-Mendoza *et al.*, 2002; Behrenfeld *et al.* 2004; Falkowsky e Raven, 2007).

30.3 STRUMENTAZIONE

Per le misure di produzione primaria a diverse intensità luminose (curve P vs. E) viene utilizzato un apparato chiamato "fotosintetron" radiale, costituito da un numero variabile di camere d'incubazione (da 1 a 10) che poggiano su un piano in alluminio (o in PVC) e da una fonte luminosa posta in posizione centrale (Fig. 3), così come descritto da Babin *et al.* (1994).

Le camere d'incubazione (comunemente in PVC) sono di colore scuro per impedire il passaggio della radiazione luminosa e la parte esposta alla lampada è chiusa con un diffusore di plexiglas opaco. Ciascuna camera deve contenere circa 10-12 *flasks*, disposte l'una dietro l'altra. Sono consigliate *flasks* sterili da 50ml in polistirene trasparente comunemente usate per le colture di fitoplancton (Falcon, Corning, Nunc, Costar sono le principali ditte fornitrici). Questo tipo di *flasks* sono geometricamente identiche e hanno un indice di rifrazione molto vicino a quello dell'acqua, per cui non sono soggette a fenomeni di rifrazione significativi. Tutto ciò garantisce un gradiente di luce estremamente regolare che è funzione della distanza dalla faccia frontale (curva di estinzione della luce). Il gradiente d'irradianza che si crea è in genere tale che il rapporto tra la parte frontale e quella posteriore della camera è circa 33:1.

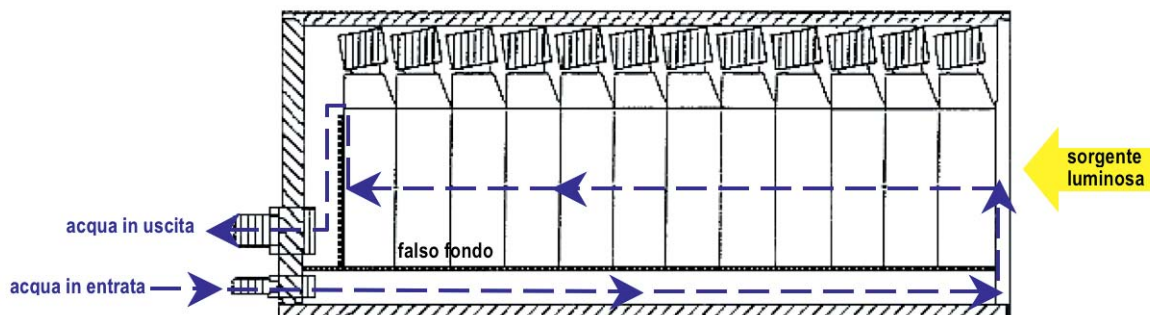


Fig. 3 - Schema di una camera di incubazione del fotosintetron radiale (da Babin et al., 1994 modificato).

La fonte luminosa è costituita da una lampada capace di emettere luce fino a $2000 \mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (le HQI-T 250W/D Osram sono molto utilizzate) così da sottoporre il popolamento anche a livelli di luce inibenti. Se l'intensità iniziale della lampada è troppo elevata è consigliato schermare le camere con dei filtri neutri (LEE Filters Ltd).

La curva di estinzione della luce può essere misurata utilizzando un sensore PAR 4π della Biospherical Instruments (mod. QSL-101). Il collettore è costituito da una sfera di teflon del diametro di 1,3 cm e consente, quindi, di effettuare le misure direttamente all'interno delle bottiglie d'incubazione riempite con il campione d'acqua. La misura del valore d'irradianza all'interno di ciascuna *flask* deve essere eseguita nella maniera più accurata possibile, avendo cura che il sensore sia orientato sempre nello stesso modo (stessa altezza e stessa distanza dalle pareti della *flask*).

Durante il periodo di incubazione la temperatura è mantenuta costante dalla circolazione continua di acqua di mare, termostata allo stesso valore di temperatura al quale i campioni sono stati raccolti. La circolazione dell'acqua di mare è assicurata dalla presenza, in ciascuna camera, di un doppio fondo e di un foro d'ingresso e di uscita collegati con un termostato. Nella parte finale della camera d'incubazione è posto un set di PVC di troppopieno collegato direttamente con il doppio fondo. Tale sistema assicura che il livello dell'acqua sia costante durante l'incubazione (Fig. 3).

30.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI

Il campione d'acqua di mare, raccolto ad una determinata profondità, è conservato sin dal momento del prelievo in bottiglie scure in PVC (1 lt). Per assicurare la maggiore omogeneità possibile, la bottiglia è agitata dolcemente e, successivamente, il campione è suddiviso, tramite un dispenser da 50 ml, in 10-12 *flasks*.

In ciascun subcampione è inoculato, tramite un pipettatore automatico, 1 ml di soluzione acquosa di $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$, con un'attività di 10-20 μCi . La durata dell'incubazione deve essere compresa tra 30-60 min in maniera da ridurre l'effetto dei fenomeni di fotoacclimatazione.

Quando si lavora su campioni naturali è opportuno effettuare un profilo dell'irradianza sottomarina (Innamorati, 1990) per interpretare i risultati in relazione alla qualità e quantità dell'irradianza effettivamente sperimentata dal popolamento fitoplanctonico.

Al termine dell'incubazione i campioni vengono rapidamente filtrati su filtri Whatman GFF (\varnothing 25mm), posti in fiale da scintillazione e trattati con le stesse procedure descritte per le misure di produzione primaria (vedi Capitolo 29).

Come indicato nei paragrafi precedenti, per costruire le curve P vs. E, è necessario che il tasso fotosintetico (carbonio organicato) sia normalizzato per la biomassa fitoplanctonica, espressa come Clorofilla *a* (Chl*a*). Per la determinazione della concentrazione di Chl*a* per via spettrofluorimetrica (Lazzara et

al., questo volume, capitolo 33) è necessario che un'aliquota di acqua di mare (150-300 ml) sia prelevata dalla bottiglia in PVC prima che il campione sia suddiviso nelle *flasks*. Per una corretta determinazione del rapporto produzione/biomassa (P^B) si consiglia di eseguire almeno tre repliche nella stima della concentrazione di Chla.

30.5 UTILIZZO DEI PARAMETRI FOTOSINTETICI PER LE STIME GLOBALI DI PRODUZIONE PRIMARIA

I modelli più utilizzati per le stime di produzione primaria a scala globale sono i cosiddetti *WRMs* (*Wavelength-Resolved Models*), che risolvono, spettralmente, il campo di luce sommersa e, applicando una relazione empirica tra luce assorbita e fotosintesi, calcolano la produzione primaria netta integrata (*NPP – Net Primary Production*) nel tempo (giornaliera) e lungo la colonna d'acqua (Morel, 1991; Platt e Sathyendranath, 1988; Antoine *et al.*, 1996).

Per la costruzione e l'applicazione di questi modelli sono fondamentali i parametri fotosintetici calcolati dalle curve P vs. E . In pratica, il tasso di fotosintesi è calcolato in funzione della luce secondo la seguente relazione:

$$P_{z,t}^B = P_m^B (1 - e^{-E_{z,t}/E_k}) f(E_{z,t})$$

dove:

$P_{z,t}^B$ è il tasso di fotosintesi alla profondità z e al tempo t , normalizzato per la biomassa (B);

P_m^B è il tasso di fotosintesi massimo a luce saturante;

$E_{z,t}$ è l'irradianza al tempo t e alla profondità z ;

E_k è l'indice di fotoadattamento.

La funzione $f(E_{z,t})$ è un termine di correzione opzionale per descrivere la diminuzione del tasso di fotosintesi ad alti valori d'irradianza (fotoinibizione). Quando la fotoinibizione è considerata trascurabile questo termine ha valore unitario, altrimenti è parametrizzato come una funzione lineare di $E_{z,t}$, che però si applica solo per valori di irradianza maggiori di quella di saturazione della fotosintesi (Behrenfeld *et al.*, 2002).

Se si calcola $P_{z,t}^B$ per il fotoperiodo, è possibile definire P_{opt}^B come il tasso di fotosintesi massimo calcolato lungo la colonna d'acqua. Esso risulta sempre minore del tasso massimo di fotosintesi P_m^B e quanto più grande è il tasso di fotoinibizione maggiore sarà la differenza tra P_{opt}^B e P_m^B (Behrenfeld e Falkowski, 1997a,b). Dal momento che E_k è dato da P_m^B / α^B è evidente che variazioni nella regione fotolimitata delle curve P vs. E , alterano il profilo di $P_{z,t}^B$. In pratica, però, la variabilità nei profili di $P_{z,t}^B$ in natura è spiegata, essenzialmente, dai cambiamenti del P_m^B dato il maggior intervallo di variabilità di quest'ultimo rispetto ad α^B (Behrenfeld *et al.*, 2002).

30.6 VANTAGGI E SVANTAGGI

Per una descrizione dei vantaggi e svantaggi legati all'utilizzo del ^{14}C si rimanda al Capitolo sulla produzione primaria (vedi Capitolo 29).

In aggiunta, tra gli svantaggi, bisogna tener presente che esiste la possibilità reale che, durante l'incubazione, abbiano luogo meccanismi di fotoprotezione, legati a cambiamenti nel *pool* delle xantofille (Demming and Bjorkman, 1987), con conseguente modifica dei parametri fotosintetici, rispetto alla condizione *in situ*. Ad esempio, nel subcampione soggetto ad alti livelli d'irradianza l'aumento dello stato di deossidazione del *pool* delle xantofille può determinare una riduzione dell'efficienza fotosintetica α^B , con conseguente variazione anche dell'indice di fotoadattamento (E_k).

Questo problema può essere ovviato eseguendo misure estremamente rapide, quali quelle basate sulla fluorescenza in vivo. Ecco perché vi è un interesse, sempre crescente, per le tecniche di fluorescenza modulata, descritte nel capitolo successivo (Lazzara *et al.*, questo volume, capitolo 31).

Diversi studi (Kaftan *et al.*, 1999; Prezelin, 1992; Behrenfeld *et al.* 2004) hanno, inoltre, evidenziato

la presenza di variazioni giornaliere dei parametri fotosintetici, in relazione alla presenza di cicli circadiani geneticamente codificati e correlati alla durata del fotoperiodo.

Queste variazioni riguardano soprattutto i due parametri α^B e P_m^B ed è evidente che tale variabilità debba essere presa in considerazione nel calcolo della *NPP* giornaliera o nel confronto tra risultati diversi.

30.7 Bibliografia

- ADIR N., ZER H., SHOCHAT S., OHAD I. (2003) - Photoinhibition – a historical perspective. *Phot. Res.*, **76**: 343-370.
- ANTOINE D., ANDRÉ J.M., MOREL A. (1996) - Oceanic primary production 2. Estimation at global scale from satellite (coastal zone color scanner) chlorophyll. *Global Biogeochem. Cy.*, **10**: 57-69.
- BABIN M., MOREL A., GAGNON R. (1994) - An incubator designed for extensive and sensitive measurements of phytoplankton photosynthetic parameters. *Limnol. Oceanogr.*, **39**: 694-702.
- BARBER R.T., HILTING A.K. (2002) - History of the study of plankton productivity. In: Williams P.J. le B., Thomas D.N., Reynolds C.S. (eds), *Phytoplankton Productivity – Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems*. Blackwell Science: 16-43.
- BEHRENFELD M.J., FALKOWSKI P.G. (1997a) - Photosynthetic rates derived from satellite-based chlorophyll concentration, *Limnol. Oceanogr.*, **42**: 1-20.
- BEHRENFELD M.J., FALKOWSKI P.G. (1997b) - A consumer's guide to phytoplankton primary productivity models. *Limnol. Oceanogr.*, **42**: 1479-1491.
- BEHRENFELD M.J., ESAIAS W.E., TURPIE K.R. (2002) - Assessment of primary production at the global scale. In: Williams P.J. le B., Thomas D.N., Reynolds C.S. (eds), *Phytoplankton Productivity – Carbon assimilation in marine and freshwater ecosystems*. Blackwell Science: 156-186.
- BEHRENFELD M.J., PRASIL O., BABIN M., BRUYANT F. (2004) - In search of a physiological basis for covariations in light-limited and light-saturated photosynthesis. *J. Phycol.*, **40**: 4-25.
- DEMMING B., BJORKMAN O. (1987) - Comparison of the effect of excessive light on chlorophyll fluorescence (77 K) and photon yield of O₂ evolution in leaves of higher plants. *Planta*, **171**: 171-184.
- DUBINSKY Z., FALKOWSKI P.G., WYMAN K. (1986) - Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant Cell Physiol.* **27**: 1335-1349.
- FALKOWSKI P.G., RAVEN J. (2007) - *Aquatic photosynthesis*. Princeton University Press: 486 pp.
- GARCIA-MENDOZA E., MATTHIJS H.C.P., SCHUBERT H., MUR L.R. (2002) - Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in *Chlorella fusca* acclimated to constant and dynamic light conditions. *Phot. Res.*, **74**: 303-315.
- GEIDER R.J., MACINTYRE H.L., KANA T.M. (1996) - A dynamic model of photoadaptation in phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **41**: 1-15.
- INNAMORATI M. (1990) - Misurazione dell'irradianza. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribeira d'Alcalá M. (eds.), *Metodi nell'ecologia nel plancton marino*. Nova Thalassia, LINT, Trieste: 11-67.
- JASSBY A.D., PLATT T. (1976) - Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **21**: 540-547.
- KAFTAN D., MESZAROS T., WHITMARSH J., NEBDAL L. (1999) - Characterization of Photosystem II activity and heterogeneity during the cell cycle of the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Plant Physiol.*, **120**: 433-441.
- LEWIS M.R., HORNE E.P.W., CULLEN J.J., OAKLEY N.S., PLATT T. (1984) - Turbulent motions may control phytoplankton photosynthesis in the upper ocean. *Nature*, **311**: 49-50.
- MOREL A. (1991) - Light and marine photosynthesis: a spectral model with geochemical and climatological implications. *Prog. Oceanogr.*, **34**: 1545-1562.
- PLATT T., SATHYENDRANATH S. (1988) - Oceanic primary production: estimation by remote sensing at local and regional scales. *Science*, **241**: 1613-1620.
- PLATT T., GALLEGOS C.L., HARRISON W.G. (1980) - Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.*, **38**: 687-701.
- PREZELIN B.B. (1992) - Diel periodicity in phytoplankton productivity. *Hydrobiologia*, **238**: 1-35.
- SAKSHAUG E., BRICAUD A., DANDONNEAU Y., FALKOWSKI P.G., KIEFER D.A., LEGENDRE L., MOREL A., PARSLOW J., TAKAHASHI M. (1997) - Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. *J. Plankton Res.*, **19**: 1637-1670.
- SMITH E.L. (1936) - Photosynthesis in relation to light and carbon dioxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **22**: 504-511.

CAPITOLO 31. PARAMETRI FOTOSINTETICI DA FLUORESCENZA VARIABILE MODULATA (PAM)

L. Lazzara, V. Saggiomo, F. Fani, O. Mangoni, I. Santarpia

luigi.lazzara@unifi.it

31.1. INTRODUZIONE

Le misure di fluorescenza variabile modulata costituiscono un metodo di stima del tasso di fotosintesi alternativo a quelli per scambio gassoso, specifico per gli organismi capaci di fotosintesi ossigenica (nei quali solo la clorofilla *a* del fotosistema PSII emette fluorescenza nel rosso), molto sensibile e non invasivo. *In situ* le misure della concentrazione di ossigeno e anidride carbonica presenti nel mezzo acquoso non sono specifiche per i produttori primari: da un lato sia fitoplancton che macroalghe producono ossigeno e fissano anidride carbonica, dall'altro zooplancton, bentos, necton e gli stessi produttori primari respirano, risulta perciò spesso difficile quantificare in modo univoco il tasso di fotosintesi della popolazione fitoplanctonica nella colonna d'acqua. Le misure di fluorescenza variabile sono invece attribuibili esclusivamente agli organismi fotoautotrofi (gli altri componenti del mezzo contribuiscono alla fluorescenza totale in modo trascurabile, con diverse caratteristiche spettrali e comunque non con una componente "variabile"). Infatti è la clorofilla *a* del fotosistema PSII, presente in tutti gli organismi capaci di fotosintesi ossigenica, ad emettere la maggior parte della fluorescenza a temperatura ambiente.

I fluorimetri tradizionali sono dotati di una sorgente di luce nel blu-verde, mentre al rivelatore sono preposti dei filtri colorati che lasciano passare solo luce rossa emessa. La fluorescenza emessa è quindi proporzionale alla radiazione assorbita che dipende anche dalla luce attinica ambientale (Schreiber *et al.*, 1986). Questi limiti sono superati dai fluorimetri a impulsi modulati, in cui la debole sorgente modulata di intensità costante ($1-2 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) è incapace di indurre fluorescenza variabile mentre il detector rileva solo i segnali modulati, dotati della stessa frequenza e della stessa fase della sorgente. Questo fa sì che l'emissione di fluorescenza sia indipendente dall'irradianza attinica, cioè dalla luce continua presente nell'ambiente, indipendentemente dalla sua intensità (Geider e Osborne, 1992).

Dalle misure dei tassi di fotosintesi per fluorescenza ad impulsi modulati (*Pulse Amplitude Modulated*) effettuate in un gradiente di luce ambientale, si possono quindi ottenere curve analoghe alle curve produzione - irradianza (curve PE) derivate da misure di scambi gassosi e stimare analoghi parametri fotosintetici (α , P_{max} , E_k e β , vedi Capitolo 30).

31.2 PRINCIPIO DEL METODO

Fluorescenza, reazioni fotochimiche ed emissione di calore competono per l'uso dell'energia assorbita dai sistemi antenna dell'apparato fotosintetico. La diminuzione di fluorescenza è detta quenching ed il quencher è la molecola di plastochinone accettrice di elettroni nella catena di trasporto plastidiale. La fluorescenza dipende dallo stato di ossidazione del quencher infatti, quando il plastochinone è in forma ossidata, il centro di reazione è aperto, assorbe un fotone e poi si ossida cedendo un elettrone al quencher. Il centro di reazione è ora chiuso, non in grado di accettare elettroni, dunque è molto più probabile che l'energia in eccesso sia emessa per fluorescenza (Falkowski e Raven, 1997). La fluorescenza dunque è massima (F_m) se tutti i centri di reazione hanno il plastochinone ridotto ed è minima (F_o) se il plastochinone è ossidato.

L'adattamento di un campione al buio, o ad una radiazione nel rosso lontano, apre tutti i centri di reazione, così è molto probabile che una luce di intensità bassa ($<1-2 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$), tale da non attivare i processi fotochimici (measuring light) determini un'emissione di fluorescenza minima, F_o (Fig. 1). Per

determinare un'emissione di fluorescenza massima F_m , si invia, al campione, un impulso saturante, ovvero una luce molto intensa (almeno $800-1000 \mu E m^{-2}s^{-1}$) ma di breve durata (compresa tra gli 0,3 e gli 1,2 sec, ma generalmente 0,6-0,8 sec), capace di saturare tutti i fotosistemi senza modificare la dissipazione di energia in calore, né produrre variazioni irreversibili di efficienza fotochimica. La differenza tra F_m ed F_o è la fluorescenza variabile massima o F_v (Krause e Weis, 1991).

Al buio una luce attinica costante (fotosinteticamente attiva e non saturante) determina un aumento immediato di fluorescenza (Kautsky *et al.*, 1960). Quando l'attinica ha chiuso i centri di reazione, la fluorescenza diviene costante e pari a F_t (Fig.1), per quel valore di luce attinica (Geider e Osborne, 1992). La luce chiude parte dei centri di reazione e, se è sufficientemente intensa da far sì che la velocità di riduzione dei chinoni sia maggiore di quella di riossidazione, la probabilità che sia emessa fluorescenza è alta ed $F_t > F_o$. Inviando un impulso saturante, la fluorescenza aumenta fino al valore massimo F_m' per poi decadere a F_t (per una review, vedi Maxwell e Johnson, 2000). In genere $F_m' < F_m$ perché l'attinica attiva i meccanismi di dissipazione di energia, ed $F_t > F_o$ perché alla luce alcuni centri di reazione si chiudono. In realtà, nelle microalghe si può anche misurare $F_m' > F_m$ con luce attinica $< 100 \mu E m^{-2}s^{-1}$ e ciò sarebbe dovuto ad una rapida riorganizzazione delle antenne (Mouget e Tremblin, 2002).

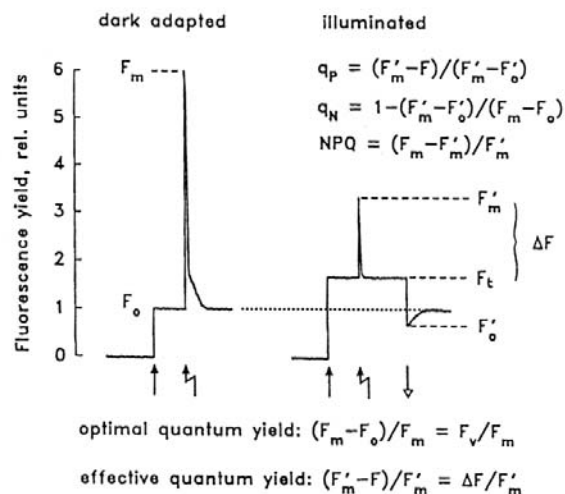


Fig. 1 - Variazioni temporali della fluorescenza variabile in organismi fotosintetici e terminologia dei parametri di fluorescenza (F_o , F_m , F_t ed F_m'). Nota che F_o' è utilizzato nella quenching analysis per il calcolo dei parametri q_p e q_N (ridisegnata da Schreiber *et al.*, 1995).

31.2.1 Terminologia e definizioni

La diminuzione di fluorescenza (*quenching*) può essere di tipo non fotochimico (NPQ) e fotochimico (PQ).

Il *quenching* non fotochimico è legato ai meccanismi di fotoprotezione / fotoinibizione, quindi alla conversione di parte dell'energia in calore:

- **NPQ** (*non - photochemical quenching* di fluorescenza) quantifica il *quenching* di F_m alla luce attinica e può essere quantificato secondo Bilger e Björkman (1990) con la seguente formulazione:

$$NPQ = \frac{F_m - F_m'}{F_m'}$$

Esso è linearmente proporzionale all'emissione di calore (Schreiber *et al.*, 1995) e nelle piante ha un valore compreso tra 0 e 0,5-3,5 a luce saturante.

- **PQ** (*photochemical quenching*) indica la frazione di energia effettivamente utilizzata per la fotosintesi, è causato dallo smaltimento dei chinoli ed è quantificabile per mezzo dei seguenti parametri: F_v/F_m , Yield ed ETR (*Electron Transport Rate*, vedi oltre).
- **F_v/F_m** è l'efficienza potenziale massima (*optimal quantum yield*) di cattura della luce da parte del PSII ed è, quindi, legato allo stato funzionale dell'apparato fotosintetico (Krause e Weis, 1991):

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{F_m - F_o}{F_m}$$

in condizioni ottimali F_v/F_m è pari a 0,7-0,8; valori inferiori indicano *stress* di varie origini.

- **Yield (Y)** è il rendimento quantico del trasporto elettronico al PSII a $PAR \neq 0$ (*effective quantum yield*), ed è espresso da F_v'/F_m' (Rohacek, 2002):

$$Y = \frac{F_m' - F_t}{F_m'}$$

Quindi il rendimento quantico di trasporto elettronico si stima misurando la fluorescenza emessa dai PSII (Genty *et al.*, 1989).

- **ETR** (*Electron Transport Rate*) è la velocità di trasporto elettronico (Falkowski e Raven, 1997) ottenuta dal prodotto del rendimento y con il flusso fotonico PAR:

Inoltre, particolarmente per le sospensioni microalgali, va introdotto nel calcolo del flusso elettronico assoluto da fluorescenza, come proposto da Hartig *et al.* (1998), il coefficiente di assorbimento specifico medio (\bar{a}^*) per unità di clorofilla a (vedi Capitolo 35). Si ottiene così l'indice di produzione primaria PPR (*Primary Productivity Rate*):

$$PPR = ETR PAR \bar{a}^*$$

Misurando il tasso di trasporto elettronico a diverse intensità luminose è possibile quindi ottenere curve di produzione irradianza (curve PE) ed i relativi parametri fotosintetici (α , P_{max} , E_k , β). Da notare che le curve PE da fluorescenza variabile non hanno mai valori negativi, perché ETR è sempre ≥ 0 e, quindi, non si può apprezzare l'equivalente di una intensità di compensazione (E_c).

31.3 PROCEDURA

31.3.1 Strumentazione

I fluorimetri ad impulsi modulati misurano i parametri F_o , F_m , F_t , F_m' e consentono di calcolare i parametri di fluorescenza e di conseguenza quelli fotosintetici.

Il fluorimetro PAM-101/102/103 (Pulse Amplitude Modulation, della Walz) è uno dei primi e più diffusi fluorimetri ad impulsi modulati. Possiede un diodo (L450, L590 o L655) che emette una luce di eccitazione pulsata (measuring light, con frequenza da 1,6 a 100 KHz) ed un rivelatore (ED 101-US o

PM-101) munito di filtri passa-alto (Schott RG9) che rileva ed amplifica, selettivamente, solo il segnale pulsato di fluorescenza. L'unità PAM 101 controlla l'intensità della *measuring light* e l'intensità, la frequenza e la durata dell'impulso saturante; rileva e amplifica il segnale di fluorescenza e lo invia all'unità digitalizzatrice PDA-100. Il campione fitoplanctonico da analizzare è posto in una cuvetta a base quadrata di quarzo con cammino ottico di 1 cm. La cuvetta è chiusa dall'alto dal sensore sferico di PAR del quantmetro (LI-250, LI-COR) e le terminazioni delle fibre ottiche sono a contatto diretto con le pareti della cuvetta. Una di queste terminazioni convoglia la luce attinica proveniente da una sorgente esterna (esempio KL-1500) ed un'altra la luce di saturazione proveniente da una seconda sorgente (KL-1500 o HPL-L470).

Il fluorimetro PHYTO-PAM (Walz) utilizza invece contemporaneamente 4 diodi in eccitazione (L470, L520, L645, L665) ed il detector rileva, separatamente, i 4 segnali di risposta in fluorescenza. Questo, se opportunamente corretto, consente di distinguere e quantificare il contributo di tre principali gruppi fitoplanctonici (cloroficee, diatomee e cianobatteri) al segnale di fluorescenza in un popolamento naturale. Il PHYTO-PAM, oltre alla *measuring light*, può essere dotato di un altro diodo (PHYTO-AL) in grado di emettere luce attinica anche ad alta intensità (fino a $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ circa) e che si colloca a 180° rispetto all'altra sorgente. Il suo fotomoltiplicatore (PM-101P) è munito di uno speciale set di filtri che include oltre all'RG9, anche una combinazione di BG3, R65 e RG9 che garantiscono migliori prestazioni.

31.3.2 Misura delle curve PE col metodo dell'impulso saturante

Il campione è mantenuto al buio fino al momento della misura (comunque almeno 3-5 minuti), l'intensità della *measuring light*, scelta attraverso la regolazione del settaggio, deve essere $<1 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. Dopo tale esposizione viene inviato il primo impulso saturante, quindi misurati F_0 ed F_m . Il campione è ora illuminato con luce attinica e mantenuto a tale intensità luminosa per un determinato periodo di tempo (vedi la discussione successiva), segue il secondo impulso saturante e la simultanea misura di F_t e F_m' a quella PAR, poi l'esposizione ad una terza intensità luminosa, e così via per l'intero gradiente previsto. I valori di ETR misurati ad una serie di 6-10 PAR di intensità crescente comprese generalmente tra 0 e $2000 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ consentono la costruzione di una curva PE.

Per ottenere una misura accurata e precisa, è necessario che il campione ed il campo luminoso nella cuvetta siano omogenei. Dal momento che il campione tende a sedimentare durante il corso della misura, tutti i fluorimetri a impulsi modulati sono dotati di un agitatore magnetico con cui mescolare la sospensione algale. Tuttavia Cosgrove e Borowitzka (2006) suggeriscono di usare l'agitatore magnetico con cautela, eventualmente solo per brevi periodi in quanto, in presenza di un gradiente verticale di luce nella cuvetta, l'agitatore aumenterebbe l'eterogeneità del campo luminoso sperimentato dalla sospensione, causando la sovrastima di F_t e F_m' .

La durata dell'acclimatazione/esposizione del campione a ciascuna luce attinica è variabile: generalmente è compresa tra 10 secondi (si parla allora di RLC = *Rapid Light Curve*, White e Critchley, 1999) e 5 minuti. Dopo ogni impulso saturante, la fluorescenza massima (F_m o F_m') decade progressivamente fino ad un valore stazionario (F_0 o F_t) per mezzo dei meccanismi di quenching non-fotochimico (NPQ), che procedono con cinetiche di rilassamento di durata variabile. In particolare il qE (*energy-dependent quenching*) si completa nell'arco di pochi secondi dalla saturazione, il qT (*state-transition quenching*) entro pochi minuti (Müller *et al.*, 2001). La scelta del tempo di acclimatazione determina il momento dell'interruzione del rilassamento, quindi, la determinazione del valore di fluorescenza considerato stazionario (F_t). Entro i 10 secondi solo il qE si è completato, mentre gli altri processi di NPQ sono ancora in atto; di contro, dopo 5 minuti il rilassamento si è quasi completamente realizzato, perciò solo se il tempo di acclimatazione scelto è sufficientemente lungo il valore di fluorescenza misurato può considerarsi effettivamente stazionario. Alle diverse intensità di luce attinica, questi meccanismi si sommano ai meccanismi di quenching fotochimico per cui, variare l'intervallo di tempo tra due impulsi equivale a interrompere tutti i meccanismi di quenching in momenti diversi della cinetica. Questo si traduce, in pratica,

in un segnale più stabile ad un tempo di acclimatazione maggiore. Di conseguenza va notato che le curve PE misurate su uno stesso campione con intervalli di acclimatazione diversa, hanno generalmente forma diversa.

I parametri fotosintetici così ottenuti indicano sia la capacità di quel campione di rispondere alla diversa velocità di variazione del fattore luce, sia l'efficienza dell'NPQ. La scelta del tempo di acclimatazione deve essere fatta sulla base della scala temporale delle variazioni del campo luminoso naturale che si intendono riprodurre. Bisogna considerare infatti che, in condizioni naturali, la dinamica della colonna d'acqua, le variazioni dell'altezza del sole e della copertura nuvolosa possono produrre variazioni del fattore luce nella scala temporale che va dalle ore ai minuti, fino ai secondi.

31.4 VALUTAZIONI CRITICHE

Le misure di fluorescenza variabile modulata come già detto sono specifiche per i fotoautotrofi (Falkowski e Raven, 1997) al contrario nei metodi per scambio gassoso bisogna tener presente che, *in situ*, le misure della concentrazione di O₂ e CO₂ disciolti non sono solo il risultato dell'attività dei produttori primari. Questo limite al confronto può essere superato effettuando le stesse misure su colture fitoplanctoniche axeniche, anche se resta il problema di stimare separatamente respirazione e fotorespirazione (Hunt, 2002).

Per indurre la fluorescenza è sufficiente utilizzare una fonte monocromatica (Kirk, 1994). La misura è rapida, non invasiva, infatti uno stesso campione può essere riacclimatato al buio e riutilizzato per più curve PE (anche se andrà considerata una eventuale diversa interpretazione delle misure, che dipenderà dal tempo intercorso tra le stesse) infine è più sensibile dei metodi ossimetrici. Secondo il costruttore è infatti impiegabile fino a concentrazioni di clorofilla di 0,1 µg l⁻¹, a seconda del modello di fluorimetro (es. WATER-PAM) e di rilevatore (PM) utilizzati (<http://www.walz.com/support/downloads/pdfs/pam-table.pdf>, Walz). Tuttavia, per la nostra esperienza, il limite di concentrazione indicato dal costruttore va considerato valido, per le sole misure di Fv/Fm sui campioni adattati al buio, mentre per la misura di curve PE complete le concentrazioni devono essere da 10 a 100 volte più alte. A questo proposito può essere utilizzata la tecnica di concentrazione descritta per la spettrofluorimetria *in vivo* in Massi e Lazzara (Capitolo 35).

La forma del grafico P-E ad alta PAR può discostarsi da quella teorica, a causa di valori di ETR molto variabili, che oscillano ben al di sopra o al di sotto della curva attesa (quella estrapolabile dai soli valori a bassa PAR). Ciò è dovuto anche alla amplificazione implicita nella modalità di calcolo (= Y*PAR): valori di Y bassi e variabili abbinati ai valori di PAR maggiori. Nei popolamenti naturali inoltre questa variabilità può essere dovuta all'eterogeneità del campione. La conseguenza più immediata di queste oscillazioni è la difficile determinazione del parametro di fotoinibizione, β (Platt *et al.*, 1980). Per una stima di ETRmax è preferibile tracciare la migliore curva PE per interpolazione grafica o analitica (con curve polinomiali di ordine variabile) o calcolando la migliore approssimazione statistica alla curva tangente iperbolica (Jassby e Platt, 1976) includendo eventualmente anche il parametro di fotoinibizione (β).

Se si confrontano i tassi fotosintetici da misure di scambio gassoso (carbonio fissato e/o ossigeno prodotto) con quelli da fluorescenza variabile, limitandosi ai valori della zona di fotolimitazione e fotosaturazione delle curve PE si osserva solitamente una forte covariazione ovvero una correlazione lineare, tra ETR e P^B (¹⁴C) così come tra ETR e P^B (O₂) (con r² compresi tra 0,87 e 0,97; Fani e Lazzara, 2006; Carr e Bjork, 2003). In genere alle alte PAR, invece, i valori di tasso fotosintetico misurati coi metodi di scambio gassoso sono inferiori ai valori dei tassi misurati per fluorescenza variabile, sia in specie fitoplanctoniche (Hartig *et al.*, 1998; Geel *et al.*, 1997; Masojídek *et al.*, 2001) sia in macroalghe (Carr e Björk, 2003). La causa è da ricercarsi nei meccanismi di quenching non fotochimico (NPQ) che, ad alta intensità luminosa, costituiscono una trappola per gli elettroni alternativa alla catena di trasporto non ciclico, riducendo il danno

potenziale dovuto all'assorbimento di luce in eccesso: il flusso elettronico ciclico al PSII, la reazione di Mehler (Falkowski e Raven, 1997; Flaming e Kromkamp, 1998; Masojídek *et al.*, 2001), la EPIR (*Enhanced Post-Illumination Respiration*, Gilbert *et al.*, 2000) e i meccanismi di riduzione dell'azoto (Hartig *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 2000; Maxwell e Johnson, 2000).

È possibile comunque anche misurare ad alta PAR valori di ETR relativo inferiori ai corrispondenti valori di produzione di ossigeno (Fani e Lazzara, 2006). Carr e Björk (2003) e Beer e Axelsson (2004) ipotizzano che questo si verifichi quando il tempo di acclimatazione scelto è insufficiente a determinare il completo rilassamento della cinetica da F_m a F_t , con la conseguente sottostima di Y . Questa sottostima sarebbe dunque strettamente legata alla modalità di utilizzo del fluorimetro PAM e quindi indipendente dalla specie in esame.

Il confronto dei tassi misurati per scambio gassoso con i tassi per fluorescenza variabile consente, dunque, di evidenziare i meccanismi di quenching relativi alla fase di fotoinibizione ed anche di quantificarne gli effetti, per cui è evidente che i due tipi di metodo sono da considerare complementari.

31.5 BIBLIOGRAFIA

- BEER S., AXELSSON L. (2004) – Limitations in the use of PAM fluorometry for measuring photosynthetic rates of macroalgae at high irradiances. *Eur. J. Phycol.*, **39**: 1-7.
- BILGER W., BJÖRKMAN O. (1990) – Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth. Res.*, **25**: 173-186.
- CARR H., BJÖRK M. (2003) – A methodological comparison of photosynthetic oxygen evolution and estimated electron transport rate in tropical *Ulva* (Chlorophyceae) species under different light and inorganic carbon conditions. *J. Phycol.*, **39**: 1125 – 1131.
- COSGROVE J., BOROWITZA M. (2006) - Applying Pulse Amplitude Modulation (PAM) fluorometry to microalgae suspensions: stirring potentially impacts fluorescence. *Photosynth. Res.*, **88**: 343-350.
- FALKOWSKI P. G., RAVEN J. (1997) – *Aquatic photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford: 375 pp.
- FANI F., LAZZARA L. (2006) - Parametri fotosintetici di microalghe planctoniche, per via fluorimetrica e ossimetrica, per la stima della produzione primaria pelagica. *Atti XVI Congr. Naz. Società Italiana di Ecologia, Cambiamenti globali, diversità ecologica e sostenibilità*. Viterbo, 19-22 Settembre 2006 (<http://www.ecologia.it/congressi/XVI/articles/fani-290.pdf>).
- FLAMELING I. A., KROMKAMP J. (1998) – Light dependence of quantum yields for PSII charge separation and oxygen evolution in eucaryotic algae. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 284-297.
- GEEL C., VERSLUIS W., SNEL J. F. H. (1997) – Estimation of oxygen evolution by marine phytoplankton from measurement of the efficiency of Photosystem II electron flow. *Photosynth. Res.*, **51**: 61-70.
- GEIDER R. J., OSBORNE B. A. (1992) – *Algal photosynthesis*. Chapman and Hall, New York: 256 pp.
- GENTY B., BRIANTAIS J.M., BAKER N.R. (1989) – The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Bioch. Biophys. Acta.*, **990**: 87-92.
- GILBERT M., WILHELM C., RICHTER M. (2000) – Bio-optical modelling of oxygen evolution using in vivo fluorescence: comparison of measured and calculated photosynthesis/irradiance (P/I) curves in four representative phytoplankton species. *J. Plant Physiol.*, **157**: 307 – 314.
- HARTIG P., WOLFSTEIN K., LIPPEMEIER S., COLIJN F. (1998) - Photosynthetic activity of natural microphytobentos populations measured by fluorescence (PAM) and ^{14}C -tracer methods: a comparison. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **166**: 53-62.
- HUNT S. (2002) – Measurements of photosynthesis and respiration in plants. *Physiol. Plantarum*, **117**: 314 – 325.
- JASSBY A.D., PLATT T. (1976) - Mathematical formulation of the relationship between photosynthesis and light for phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **21**: 540-547.
- KAUTSKY H., APPEL W., AMANN H. (1960) – Chlorophyll fluoreszenz und kohlenzure assimilation. *Biochemische Zeitschrift*, **322**: 277-292.
- KIRK J.T.O. (1994) - *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge: 509 pp.

-
- KRAUSE G.H., WEIS E. (1991) – Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**: 313-49.
- MASOJÍDEK J., GROBBELAAR J.U., PECHAR L., KOBLIZEK M. (2001) – Photosystem II electron transport rates and oxygen production in natural waterblooms of freshwater cyanobacteria during a diel cycle. *J. Plankton Res.*, **23**: 57-66.
- MAXWELL K., JOHNSON G. N. (2000) – Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.*, **51**: 659-668.
- MOUGET J.L., TREMBLIN G. (2002) – Suitability of the fluorescence monitoring system (FMS, Hansatech) for measurement of photosynthetic characteristics in algae. *Aquat. Bot.*, **74**: 219-231.
- MÜLLER P., LI X.P., NIYOGI K.K. (2001) – Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.*, 1558-1566.
- PLATT T., GALLEGOS C.L., HARRISON W.G. (1980) – Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. *J. Mar. Res.*, **38**: 687-701.
- ROHACEK K. (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica*, **40**: 13-29.
- SCHREIBER U., SCHLIWA U., BILGER W. (1986) – Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.*, **10**: 51-62.
- SCHREIBER U., BILGER W., NEUBAUER C. (1995) – Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze E.D., Caldwell M.M. (eds), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Ecological Studies, vol. 100. Springer-Verlag, Berlin: 49-70.
- WHITE A.J., CRITCHLEY C. (1999) – Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynth. Res.*, **59**: 63-72.

CAPITOLO 32. ASSIMILAZIONE DEI NUTRIENTI AZOTATI E DELL'AZOTO MOLECOLARE NEL PARTICELLATO VIVENTE MEDIANTE TECNICA DI ARRICCHIMENTO ISOTOPICO (¹⁵N)

C. Cantoni, S. Cozzi, V. Ibello, M. Lipizer

carolina.cantoni@ts.ismar.cnr.it

32.1 INTRODUZIONE

Il ciclo dell'azoto negli ambienti acquatici è costituito da molteplici trasformazioni, principalmente di carattere ossido-riduttivo mediate da microrganismi, che interessano i composti azotati inorganici ed organici in fase disciolta, colloidale e particellata, così come le forme gassose quali N₂ e N_xO_y (Wada e Hattori, 1991; Jaffe, 1992; Wetzel, 2001).

All'interno di tale ciclo, la misura dell'assimilazione dei macronutrienti azotati (nitrato, ammonio, nitrito e urea) e della fissazione dell'azoto molecolare nel particellato vivente riveste un notevole interesse per quanto concerne gli studi sul metabolismo del fitoplancton e dei batteri, la valutazione dell'effetto degli apporti antropici nelle aree marine costiere, la biogeochimica dei nutrienti azotati negli ecosistemi marini e la produzione primaria negli oceani.

In questo ultimo caso, si è interessati a stimare quella particolare frazione di produzione primaria definita come "produzione nuova", cioè quella sostenuta da composti azotati di origine alloctona (Dugdale e Goering, 1967). Su lunghe scale temporali, la produzione primaria nuova è uno degli indici utilizzati per valutare il trasferimento di anidride carbonica dall'atmosfera verso l'oceano, sotto forma di carbonio organico particellato, e dell'export di sostanza organica al di sotto della zona eufotica (Eppley e Peterson, 1979).

Il più importante nutriente azotato alloctono è il nitrato che deriva dagli apporti continentali e dalla risalita delle acque profonde. Tuttavia, anche la deposizione atmosferica e gli scambi gassosi all'interfaccia oceano-atmosfera sono fonti esterne di azoto combinato per l'ambiente marino. Più recentemente, è stato evidenziato che anche la fissazione nel particellato dell'azoto molecolare gassoso (N₂) disciolto nell'acqua di mare, ad opera di alcuni procarioti (*Bacteria* ed *Archea*) costituisce una ulteriore fonte di azoto nuovo che viene reso disponibile per i processi di produzione nell'ambiente marino, stimata a livello globale nell'ordine di 100-200 Tg N yr⁻¹ (Karl *et al.*, 2002).

Al contrario, ammonio e urea sono nutrienti azotati di origine principalmente autoctona, che vengono prodotti *in situ* durante i processi di demolizione e rimineralizzazione della sostanza organica disciolta e particellata. La frazione di produzione primaria che viene definita "produzione rigenerata" e non determina aumenti netti della biomassa su lunga scala temporale. Fanno ovviamente eccezione i siti, essenzialmente costieri, in cui forme ridotte di azoto possono essere veicolate da acque reflue, scarichi fognari etc., e contribuiscono, per definizione, alla produzione nuova.

32.2 PRINCIPIO DEL METODO

Il tasso d'assimilazione dei nutrienti azotati è determinato generalmente mediante incubazioni *in vitro*, effettuando aggiunte in tracce di nutrienti marcati con l'isotopo stabile ¹⁵N e misurando l'arricchimento isotopico del particellato organico alla fine dell'incubazione (Knap *et al.*, 1996). Tali incubazioni sono condotte *in situ* o in laboratorio, in condizioni di temperatura, luce e disponibilità dei nutrienti quanto più simili a quelle ambientali, per non introdurre artefatti sperimentali nella misura stessa. In modo analogo, nel caso della determinazione del tasso di fissazione dell'azoto molecolare

nel particolato vivente, il campione è arricchito con una quantità nota di gas $^{15}\text{N}_2$ prima dell'incubazione.

La durata dell'incubazione è variabile e dipende dalla finalità dello studio, dalla trofia del sistema e dal tipo di ambiente marino considerato. In linea generale, alle medie latitudini e negli ambienti costieri quando l'obiettivo è quello di valutare la cinetica dell'assimilazione dei diversi nutrienti in funzione di diversi parametri ambientali, sono effettuate incubazioni di 2 - 6 ore, sia durante le ore diurne che in quelle notturne (Harrison *et al.*, 1996; Elskens *et al.*, 1997; Maguer *et al.*, 2000) al fine di non incorrere in problemi di diluizione isotopica (Glibert *et al.*, 1982; Kanda *et al.*, 1987) e di esaurimento del substrato. Negli ambienti polari, ma anche alle medie latitudini, per lo studio dei cicli biogeochimici vengono generalmente condotte incubazioni di 24 ore (Smith e Harrison, 1991; Owens *et al.*, 1993; Lee Chen *et al.*, 1999; Goeyens *et al.*, 2000; Lipizer *et al.*, 2000; Cozzi *et al.*, 2002; Cantoni *et al.*, 2003). Nel caso di incubazioni di durata inferiore alle 24 ore, sono stati proposti diversi modelli per il calcolo del tasso giornaliero di assimilazione in considerazione della luce disponibile (Olson, 1980; Dugdale *et al.*, 1992; Gentilhomme e Rimbault, 1994). Tuttavia, non c'è ad oggi un consenso generale sull'esatta relazione tra i processi di assimilazione dei nutrienti e la luce, anche in considerazione del fatto che parte dell'assimilazione dell'azoto è operata dal batterioplancton eterotrofo (Fouilland *et al.*, 2007), ed i fattori che ne influenzano le cinetiche di assimilazione sono ancora poco conosciuti e variabili a seconda dell'ambiente (Dugdale e Goering, 1967; Nelson e Smith, 1986; Kanda *et al.*, 1989; Smith e Harrison, 1991; Collos *et al.*, 1997; Flynn, 1998).

Per determinare il tasso di assimilazione di un nutriente azotato è necessario conoscere la sua concentrazione iniziale nella fase acquosa, la concentrazione finale dell'azoto particolato e l'arricchimento in ^{15}N del materiale particolato al termine dell'incubazione. La determinazione delle concentrazioni iniziali dei nutrienti azotati disciolti (nitrato, nitrito, ammonio ed urea) viene generalmente effettuata, entro breve tempo dal campionamento, su un campione prelevato appositamente. La quantità iniziale di N_2 disciolto in un campione acquoso può essere calcolata tenendo conto della solubilità termodinamica di tale gas.

Si definisce come *tasso di assimilazione specifico* la quantità di nutriente o N_2 assimilato per unità di azoto particolato e per unità di tempo (V oppure v ; espresso in h^{-1} oppure in d^{-1}), come *tasso di assimilazione assoluto* (Q oppure ρ ; espresso in $\text{nmol N dm}^{-3} \text{h}^{-1}$ oppure in $\text{nmol N dm}^{-3} \text{d}^{-1}$) la quantità totale di nutriente assimilato per unità di tempo, corrispondente al prodotto tra V e l'azoto particolato (Dugdale e Goering, 1967).

32.3 SCHEMA DELLE OPERAZIONI PRELIMINARI ED IN MARE

32.3.1 Attrezzatura

Per la misura dell'assimilazione del nitrato, nitrito, ammonio e urea si utilizza la seguente attrezzatura:

- matracci da 500 ml (classe A);
- bilancia analitica;
- stufa per l'essiccazione degli standard primari (110°C);
- bottiglie di vetro borosilicato scuro da 250 ml dotate di tappo a tenuta per la conservazione delle soluzioni dei nutrienti marcati ^{15}N ;
- bottiglie di campionamento in policarbonato trasparente, di volume noto compreso tra 500 e 2000 ml, dotate di tappo a vite a tenuta, in numero sufficiente da coprire le quote di campionamento, i diversi nutrienti azotati d'interesse, le repliche dei campioni ed i bianchi.
- buste nere per la schermatura delle bottiglie di campionamento durante le operazioni alla stazione;
- micropipette o dispensers in materiale plastico adatti per l'inoculo degli standard marcati ^{15}N , di volume 50-1000 μl ;

- ancoraggio dotato di boa di galleggiamento e zavorra, munito di morsetti per il fissaggio delle bottiglie di campionamento alle profondità desiderate, per le incubazioni *in situ*;
- vasche termostate coperte con filtri ottici neutri per le incubazioni *on deck* in condizioni simulate.

Per la misura della fissazione di N_2 nel particellato vivente si utilizza la seguente attrezzatura:

- siringa di precisione a tenuta di gas con valvola, di volume di 5 ml;
- bombola di gas standard $^{15}N_2$, dotata di manometro e riduttore della pressione;
- sacchetti per il sub-campionamento del gas $^{15}N_2$ a pressione atmosferica di volume pari a 50 ml e dotati di valvola con setto di silicone;
- bottiglie di campionamento in policarbonato trasparente di volume noto intorno a 5000 ml, dotate di tappo a vite munito di un setto di silicone, in numero sufficiente da coprire le quote di campionamento, le repliche dei campioni, i bianchi e i controlli.
- buste nere per la schermatura delle bottiglie di campionamento durante le operazioni alla stazione;
- ancoraggio dotato di boa di galleggiamento e zavorra e con morsetti per il fissaggio delle bottiglie di campionamento alle profondità desiderate, per le incubazioni *in situ*;
- vasche termostate e coperte con filtri ottici neutri per le incubazioni *on deck* in condizioni simulate.

32.3.2 Prodotti chimici

Per la misura dell'assimilazione del nitrato, nitrito, ammonio ed urea nel particellato vivente si preparano le soluzioni di nutrienti marcati utilizzando i seguenti reagenti arricchiti in ^{15}N :

- sodio nitrato [$Na^{15}NO_3$], ≥ 98 atom% ^{15}N ;
- sodio nitrito [$Na^{15}NO_2$], ≥ 98 atom% ^{15}N ;
- ammonio cloruro [$^{15}NH_4Cl$], ≥ 98 atom% ^{15}N ;
- urea [$(^{15}NH_2)_2CO$], ≥ 98 atom% ^{15}N ;

Per la misura della fissazione di N_2 nel particellato vivente si utilizza:
gas $^{15}N_2$ in bombola da 1 litro, ≥ 99 atom% ^{15}N .

32.3.3 Preparazione delle soluzioni dei nutrienti marcati con ^{15}N ed inoculo del gas $^{15}N_2$

Le soluzioni dei nutrienti marcati ^{15}N di nitrato, nitrito, ammonio ed urea sono preparate per pesata diretta su bilancia analitica (precisione = $\pm 0,01$ mg). Allo scopo di ottenere una soluzione a concentrazione esatta, il relativo sale azotato viene essiccato in stufa ($110^\circ C$, 24 ore), pesato e sciolto in acqua ultrapura da laboratorio in matracci da 500 ml (classe A). Le soluzioni sono poi travasate in bottiglie di vetro borosilicato con tappo a vite a tenuta, adatte per la conservazione in ambiente buio e refrigerato ($+4^\circ C$) e per l'utilizzo sul campo.

La concentrazione delle soluzioni dei nutrienti marcati ^{15}N deve essere regolata secondo la concentrazione ambientale del nutriente azotato presente nel campione d'acqua di mare. L'aggiunta di azoto marcato deve corrispondere, infatti, a circa il 10% del nutriente presente nel campione. Tale criterio è un compromesso tra la necessità di ottenere un arricchimento dell'azoto particellato misurabile con una buona precisione alla fine dell'incubazione, e la necessità di non introdurre artefatti sperimentali dovuti a significativi incrementi della concentrazione del nutriente stesso nel campione.

La Tab. 1 riporta un esempio di valori di volume e concentrazione per l'analisi dell'assimilazione di nutrienti azotati in acque mesotrofiche:

Tab. 1 – Valori di concentrazione, volume dei campioni incubati e volumi delle soluzioni standard ^{15}N aggiunte al campione per l'analisi dell'assimilazione dei nutrienti azotati in acque mesotrofiche.

Nutriente azotato	Concentrazione naturale nel campione	Volume campione incubato	Standard ^{15}N	Concentrazione standard ^{15}N	Volume aggiunto standard ^{15}N	^{15}N aggiunto / N campione
	$\mu\text{mol N dm}^{-3}$	ml	g /500 dm^{-3}	$\mu\text{mol N dm}^{-3}$	μl	%
Nitrato	4,0	1000	0,03869	900	500	11
Ammonio	1,0	1000	0,01090	400	250	10
Urea	1,0	1000	0,01862	1200	100	12
Nitrito	0,2	1000	0,01380	400	50	10

Per la misura della fissazione di N_2 si applica il medesimo principio. Dal momento che la concentrazione di N_2 disciolto nell'acqua di mare corrisponde sostanzialmente al valore di solubilità termodinamica (per esempio: $9,4 \text{ ml N}_2 \text{ dm}^{-3}$ a $T = 20^\circ\text{C}$ e Salinità = 37,00), si aggiunge al campione un volume di gas $^{15}\text{N}_2$ pari a 1 ml, a pressione atmosferica, per litro di campione.

32.3.4 Procedura di campionamento

I campioni per la misura dell'assimilazione dei nutrienti azotati e della fissazione di N_2 devono essere prelevati dalle bottiglie del sistema di profilazione nel minore tempo possibile, in modo da limitare la sedimentazione del particellato contenuto all'interno delle stesse bottiglie ed eventuali modifiche dell'attività dei microrganismi indotte principalmente da variazioni della loro temperatura. Il campionamento può essere effettuato con un tubetto di plastica o silicone, di lunghezza tale da raggiungere il fondo della bottiglia d'incubazione, in modo che essa sia riempita evitando moti turbolenti dell'acqua.

Le bottiglie d'incubazione devono essere state precedentemente lavate con HCl (10%) e sciacquate abbondantemente con acqua ultrapura e con il campione stesso in modo da eliminare residui di azoto marcato. Il volume di campione introdotto nella bottiglia d'incubazione deve essere noto. Nel caso della misura dell'assimilazione dei nutrienti azotati mediante incubazione *on deck*, si possono riempire le bottiglie con un volume fisso di campione lasciando dello spazio vuoto in testa. Per le incubazioni *in situ*, le bottiglie dei campioni devono essere riempite completamente, lasciando solamente uno spazio libero minimo sufficiente per l'aggiunta dello standard marcato. Il riempimento completo della bottiglia evita la sua implosione nel caso d'incubazioni condotte ad elevata profondità.

Nel caso della misura della fissazione di N_2 , le bottiglie dei campioni devono essere riempite completamente, senza lasciare alcuna bolla d'aria al loro interno, in modo da evitare l'equilibratura del gas N_2 disciolto nel campione dalla fase acquosa all'aria.

Durante la raccolta del campione da incubare, si può effettuare una filtrazione preliminare utilizzando un retino con maglie a varia dimensione, nel caso si vogliano condurre esperimenti di frazionamento dimensionale dell'azoto particellato e delle velocità d'assimilazione dell'azoto. Dal momento che i campioni sono raccolti direttamente nelle bottiglie trasparenti utilizzate per l'incubazione, è opportuno che essi non siano esposti alla luce solare diretta durante le operazioni di campionamento, in modo da evitare il possibile foto-danneggiamento del plancton. A questo scopo le bottiglie devono essere coperte con buste di plastica nera.

32.3.5 Aggiunta del substrato marcato

I campioni raccolti nelle bottiglie d'incubazione devono essere arricchiti mediante l'aggiunta di aliquote note di soluzione del nutriente azotato marcato con ^{15}N (nitrato, nitrito, ammonio o urea). L'inoculazione

è effettuata con micropipette o dispenser di materiale plastico, in modo da evitare possibili avvelenamenti del campione dovuti all'introduzione di metalli pesanti.

Nel caso della determinazione della fissazione di N_2 nel particellato, il campione viene arricchito mediante l'iniezione di un volume noto gas $^{15}N_2$ alla pressione atmosferica. Il gas contenuto nella bombola viene sub-campionato con un sacchetto per il campionamento dei gas munito di valvola con setto siliconico. Da questo ultimo, si estrae con una siringa a tenuta di gas con valvola un volume di $^{15}N_2$ pari a 1 ml di gas per litro di campione. La valvola della siringa va chiusa dopo aver prelevato il gas dal sacchetto, in modo da evitare scambi tra gas marcato e gas atmosferico, si effettua poi l'iniezione del gas nella bottiglia d'incubazione attraverso il setto di silicone presente sul tappo. Dopo l'arricchimento isotopico, i campioni sono agitati con cautela e posti nel sistema d'incubazione. Il momento dell'arricchimento isotopico è considerato come il tempo iniziale dell'incubazione.

I campioni possono essere analizzati in repliche allo scopo di valutare la significatività della misura. Ulteriori repliche dei campioni possono essere incubate senza l'arricchimento di ^{15}N ed analizzati come controllo della procedura sperimentale (controlli). È opportuno filtrare anche dei campioni senza alcun arricchimento isotopico e senza incubazione (bianchi) per avere una misura diretta, e non stimata, dell'abbondanza isotopica naturale, dato importante nei casi di tassi di azoto fissazione molto bassi.

32.3.6 Incubazione

L'incubazione può essere effettuata *in situ* oppure *on deck* in condizioni controllate mediante l'utilizzo d'incubatori.

L'incubazione *in situ* è effettuata immergendo i campioni alle quote desiderate mediante un ancoraggio dotato di boa di galleggiamento e zavorra. Questo sistema permette un'ottimale riproduzione delle condizioni naturali nel corso dell'incubazione, quali l'esposizione ai livelli naturali di luce, la temperatura propria della quota di campionamento e le fluttuazioni delle bottiglie nella colonna d'acqua. Gli svantaggi del metodo sono il prolungamento delle operazioni a mare nella stazione di campionamento e le possibili limitazioni dovute a condizioni meteo-marine non idonee a tale attività.

L'incubazione in condizioni simulate deve riprodurre le condizioni ambientali di esposizione alla luce e temperatura nella colonna d'acqua. A tale scopo, i campioni sono immersi in vasche di plastica bianca di dimensione opportuna, termostatate mediante un sistema di ricircolo forzato di acqua. Se nello strato fotico la differenza di temperatura è consistente, è necessario che ogni vasca sia termostatata ad una temperatura uguale a quella della relativa quota di campionamento. L'esposizione dei campioni ai diversi livelli di luce è realizzata schermando la luce solare che penetra nelle vasche con filtri ottici neutri.

I tempi d'incubazione variano in genere da 2 a 24 ore. L'incubazione deve essere sufficientemente lunga da permettere un arricchimento di ^{15}N nel particellato vivente sufficientemente elevato da ottenere valori affidabili nella successiva analisi spettrometrica. Incubazioni troppo prolungate sono tuttavia sconsigliate, per l'acuirsi dei problemi indotti dalla segregazione della popolazione nella bottiglia d'incubazione. In ambiente eutrofico o mesotrofico, incubazioni di 2-6 ore sono generalmente sufficienti ad ottenere un arricchimento consistente del particellato. In ambiente fortemente oligotrofico, incubazioni di 24 ore possono essere preferite.

L'assimilazione dei nutrienti azotati nel particellato vivente è influenzata dalla luce solare (Middelburg e Nieuwenhuize, 2000b; Cozzi e Cantoni, 2006). Allo scopo di ottenere una corretta valutazione della loro assimilazione integrata per giorno è consigliabile condurre un'incubazione di 2-6 ore intorno a mezzogiorno, estesa a tutte le ore di luce, ed un'incubazione di 2-6 ore intorno a mezzanotte, estesa alle ore di buio.

Nel caso della fissazione di N_2 nel particellato vivente, incubazioni di 24 ore possono essere preferite in presenza di bassi tassi di assimilazione.

32.3.7 Conservazione dei campioni

Alla fine dell'incubazione, le bottiglie dei campioni sono riposte in buste di plastica nera e portate rapidamente in laboratorio per la filtrazione.

32.4 SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

32.4.1 Attrezzatura

- Muffola
- Acqua ultrapura da laboratorio
- Filtri in fibra di vetro borosilicato da 25 mm di diametro, porosità 0,7 μm
- Rampe filtranti a 3-9 posizioni per filtrazioni in depressione, dotate di portafiltri da 25 mm di diametro, di polmone di raccolta del filtrato e di pompa elettrica da vuoto
- Pinzette di plastica o acciaio inossidabile
- Capsule portafiltro
- Spruzzetta di plastica
- Stufa per l'essiccamento dei filtri
- Spettrometro di massa per l'analisi del rapporto isotopico $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ in campioni solidi accoppiato ad un analizzatore elementare
- Fogli di stagno circolari da 30 mm di diametro ultrapuri per analisi elementare
- Pressa per incapsulare i filtri nel foglio di stagno o strumento autocostruito con funzione analoga.

32.4.2 Prodotti chimici

I prodotti chimici necessari al funzionamento dello spettrometro di massa e dell'analizzatore elementare vengono reperiti ed utilizzati secondo le specifiche riportate nei manuali d'uso dello strumento.

32.4.3 Filtrazione

I filtri in fibra di vetro borosilicato utilizzati per questa tecnica devono essere trattati in muffola a 450°C per 24 ore, allo scopo di eliminare la materia organica adsorbita sulla loro superficie. Vengono poi conservati in pacchetti sigillati fino all'utilizzo e manipolati con le pinzette. Il sistema di filtrazione deve essere lavato prima dell'uso con acqua ultrapura grado reagente.

I campioni contenuti nelle bottiglie d'incubazione vengono filtrati rapidamente, mantenendo una depressione nel sistema filtrante minore o uguale a -30 KPa (Montoya *et al.* 1996). Il tempo d'inizio e fine filtrazione viene riportato per ogni campione su appositi tabulati. La durata della filtrazione deve essere trascurabile rispetto al tempo d'incubazione. Nel caso non sia possibile filtrare l'intero campione per dell'occlusione del filtro, si interrompe la filtrazione e si riporta il volume di campione effettivamente filtrato.

La filtrazione viene condotta senza essiccare mai il particellato raccolto sul filtro. Alla fine della filtrazione, tale particellato viene lavato sul filtro, mediante l'aggiunta con una spruzzetta di piccole aliquote d'acqua di mare filtrata (0,2 μm), allo scopo di eliminare dal filtro tutto il mezzo acquoso arricchito con ^{15}N . La filtrazione dei bianchi e di eventuali campioni di controllo non arricchiti con ^{15}N deve essere condotta in una parte separata del laboratorio rispetto a quella dei campioni arricchiti, utilizzando attrezzatura da laboratorio distinta, in modo da evitare la loro possibile contaminazione.

La filtrazione in serie su filtri a diversa porosità (per esempio 5 µm e 0,2 µm) può essere effettuata nel caso si vogliano condurre esperimenti di frazionamento dimensionale dell'azoto particellato e delle velocità d'assimilazione dell'azoto. Il frazionamento della popolazione per classi dimensionali è in genere la tecnica più utilizzata per questo scopo (Tremblay *et al.*, 2000; Bury *et al.*, 2001). L'avvelenamento dei campioni incubati mediante inibitori specifici può essere una tecnica alternativa per il frazionamento dell'assimilazione dell'azoto in diverse classi funzionali di microrganismi (Middelburg e Nieuwenhuize, 2000; Cozzi e Cantoni, 2006; Fouilland, 2007).

Dopo la filtrazione, i filtri sono riposti in capsule portafiltro aperte ed essiccati in stufa a 60°C; vengono quindi sigillati e conservati in congelatore a -20°C fino all'analisi spettrometrica. Il congelamento permette la conservazione dei filtri per diversi mesi.

32.4.4 Analisi dei campioni arricchiti

Lo strumento più diffuso per l'analisi dei campioni arricchiti è un analizzatore elementare interfacciato ad uno spettrometro di massa a rapporto isotopico e flusso continuo (CF-IRMS; vedi capitolo "Metodologie analitiche per la misura dei valori di composizione isotopica di carbonio, azoto e ossigeno in differenti comparti del sistema marino"). Questa metodica analitica permette la determinazione simultanea dell'azoto particellato e dell'arricchimento isotopico in ¹⁵N ed è stata descritta per la prima volta da Owens (1988) e Owens e Rees (1989).

Prima dell'analisi i campioni sono scongelati e asciugati in stufa a 60°C per qualche ora. Il filtro completamente essiccato viene ripiegato, avvolto strettamente in un foglio di stagno e compresso in forma di *pellet* delle dimensioni adatte ad essere inserito nell'autocampionatore dello strumento.

Al momento dell'analisi, il campione viene introdotto in un reattore di ossidazione, dove avviene la combustione ad alta temperatura, in presenza di ossigeno e catalizzatori, in condizioni tali da ottenere una completa conversione dei composti azotati in ossidi di azoto. Un flusso di elio trasporta quindi tutti i prodotti della combustione attraverso successivi stadi di riduzione e purificazione, allo scopo di ridurre la miscela di ossidi di azoto ad N₂ ed eliminare tutte le sostanze interferenti (O₂, CO₂, H₂O, Cl₂, SO_x ecc.). L'azoto molecolare viene quindi analizzato dallo spettrometro di massa che fornisce sia la quantità totale di azoto particellato contenuto nel filtro combusto (in µg N o µmol N) sia il valore del suo arricchimento isotopico (in δ‰ o atom%). L'assimilazione dell'azoto si calcola a partire dall'arricchimento isotopico in ¹⁵N espresso come percentuale rispetto all'azoto totale (atom%):

$$^{15}\text{N atom\%} = \left(\frac{^{15}\text{N}}{^{15}\text{N} + ^{14}\text{N}} \right) \times 100$$

Lo strumento utilizzato deve avere una precisione non inferiore a ±0,0003 atom%, e va calibrato rispetto a standards con arricchimenti isotopici sia bassi sia elevati, forniti dalle agenzie internazionali (IAEA, NBS) o dalla stessa ditta costruttrice.

Per ottenere una buona misura è necessario, in genere, che i campioni abbiano un contenuto di azoto tra 10 e 100 µg N, ma questo intervallo può essere ampliato verificando la risposta strumentale per quantità inferiori o superiori.

È opportuno, in oltre, che i bianchi procedurali ed i campioni dove ci si aspetta un minor arricchimento isotopico siano analizzati prima di quelli fortemente arricchiti, per evitare effetti di *carry over*. Per ulteriori accorgimenti e suggerimenti volti ad ottenere una misura affidabile di arricchimento isotopico si rimanda al capitolo sull'analisi degli isotopi stabili, ma va comunque considerato che l'analisi di campioni arricchiti necessita generalmente di una precisione di un ordine di grandezza inferiore rispetto a quella dei campioni naturali.

32.5 CALCOLI

La determinazione del tasso di assimilazione di un nutriente azotato in un campione necessita della conoscenza della concentrazione iniziale del nutriente stesso nel campione acquoso. Nel caso del nitrato, ammonio e nitrito si rimanda il lettore ai metodi analitici descritti nel presente volume. Nel caso dell'urea, esistono in letteratura vari metodi analitici manuali ed automatici, descritti da Cozzi e Giani (2007).

Nel caso della fissazione di N_2 nel particellato vivente, si assume che la concentrazione iniziale di azoto molecolare disciolto nel campione acquoso sia pari al valore di solubilità all'equilibrio termodinamico, calcolabile nota la temperatura e salinità del campione (Weiss, 1970).

La formula proposta per il calcolo del tasso di assimilazione specifico (V) e assoluto (Q) dei nutrienti azotati deriva dal modello di trasporto costante di Dugdale e Goering (1967), come pubblicata da Dugdale e Wilkerson (1986), e si basa sui valori di azoto particellato e arricchimento isotopico determinati a fine incubazione (t).

$$(1) \quad Q_{(t)} = V_{(t)} \times PON_{(t)}$$

$$(2) \quad V_{(t)} = \frac{{}^{15}N_{xs}}{({}^{15}N_{enr} - {}^{15}N_{nat}) \times T}$$

dove:

$Q_{(t)}$ = tasso di assimilazione assoluto al tempo t ;

$V_{(t)}$ = tasso di assimilazione specifico al tempo t ;

$PON_{(t)}$ = azoto organico particellato al tempo t ;

${}^{15}N_{xs}$ = arricchimento in ${}^{15}N$ (atom%) del particellato dopo l'incubazione, calcolato rispetto all'arricchimento naturale iniziale;

${}^{15}N_{enr}$ = arricchimento in ${}^{15}N$ (atom%) del nutriente azotato disciolto presente nel campione all'inizio dell'incubazione, dovuto all'aggiunta del substrato marcato;

${}^{15}N_{nat}$ = abbondanza naturale ${}^{15}N$ (atom%) del particellato presente nel campione prima dell'incubazione;

T = tempo di incubazione

A loro volta, l'arricchimento del particellato dopo l'incubazione (${}^{15}N_{xs}$) e l'arricchimento del disciolto all'inizio dell'incubazione (${}^{15}N_{enr}$) sono dati rispettivamente da:

$${}^{15}N_{xs} = {}^{15}N_s - {}^{15}N_{nat}$$

$${}^{15}N_{enr} = \frac{{}^{15}N_{tot}}{{}^{15}N_{tot}} \times 100 - \text{rapp.nat}$$

dove:

${}^{15}N_s$ = abbondanza in ${}^{15}N$ (atom%) del campione a fine incubazione: ottenuta dall'analisi allo spettrometro di massa;

rapp.nat = arricchimento isotopico naturale in ${}^{15}N$ del nutriente disciolto. Si considera usualmente pari a 0,3663 atom% considerando trascurabili le variazioni naturali.

N_{tot} = quantità totale del nutriente azotato all'inizio dell'incubazione nella fase disciolta, corrispondente alla somma del nutriente presente nel campione naturale (N_{Nx}) e quello aggiunto con lo standard marcato (N_{st})

$$N_{\text{tot}} = N_{\text{N}_x} + N_{\text{st}} = [C_{\text{N}_x} \times V_{\text{bott}} \times 1000] + [C_{\text{st}} \times V_{\text{st}}]$$

C_{N_x} = concentrazione del nutriente naturale ($\mu\text{mol N dm}^{-3}$);

V_{bott} = volume della bottiglia di incubazione (ml);

C_{st} = concentrazione dello standard marcato in ($\mu\text{mol N dm}^{-3}$);

V_{st} = volume di standard aggiunto (μl). Ai fini dei calcoli questo volume aggiunto è considerato trascurabile rispetto al volume totale del campione.

$^{15}\text{N}_{\text{tot}}$ = quantità totale di ^{15}N presente nel nutriente azotato all'inizio dell'incubazione nella fase disciolta, dato dalla somma del ^{15}N naturalmente presente nel nutriente azotato disciolto ($^{15}\text{N}_{\text{N}_x}$) e da quello aggiunto con lo standard marcato ($^{15}\text{N}_{\text{st}}$).

$$^{15}\text{N}_{\text{tot}} = ^{15}\text{N}_{\text{N}_x} + ^{15}\text{N}_{\text{st}} = \frac{N_{\text{N}_x} \times \text{rapp.nat}}{100} + \frac{N_{\text{st}} \times \text{rapp.st}}{100}$$

rapp.st = arricchimento isotopico in ^{15}N dello standard aggiunto (atom%).

Oltre alle modalità di calcolo qui presentate, sono state sviluppate altre formule che tengono conto anche dell'aumento del PON nel corso dell'incubazione e necessitano anche del valore del PON all'inizio dell'incubazione. Le discrepanze nei risultati ottenuti con i vari metodi di calcolo sono significative se il risultato che interessa principalmente è V, e se i valori di assimilazione sono particolarmente elevati. Per maggiori dettagli si rimanda a Dugdale e Wilkerson (1986).

Lo stesso modello concettuale è anche alla base del calcolo dei tassi di fissazione di N_2 , come riportato da Montoya *et al.* (1996). Il tasso specifico di azoto fissazione (V) è calcolato utilizzando la formula (2) nella quale l'arricchimento isotopico dell'azoto molecolare costituisce il termine di arricchimento del substrato ($^{15}\text{N}_{\text{enr}}$). Il tasso di azoto fissazione assoluto o volumetrico (Q) viene calcolato utilizzando la formula seguente che differisce dalla (1) per un fattore 2, introdotto per esprimere il tasso come moli di N_2 .

$$Q_{(t)} = \frac{V_t}{2} \times \text{PON}_{(t)}$$

32.6 RACCOMANDAZIONI E NOTE

Il metodo d'analisi mediante analisi elementare accoppiata alla spettrometria di massa necessita che il particolato contenuto nei campioni sia raccolto su filtri in microfibra di vetro borosilicato. Tali filtri assicurano elevate velocità di filtrazione, buona resistenza meccanica e valori di bianco dell'azoto molto bassi. Tuttavia questo tipo di filtri ha una porosità meno costante e riproducibile rispetto a quella dei filtri a membrana. La porosità nominale minima disponibile in commercio ($0,7 \mu\text{m}$) corrisponde ad una capacità reale di ritenzione del particolato variabile, in genere stimata $0,2 \mu\text{m}$, a seconda del grado di occlusione del filtro stesso durante la filtrazione. Per questo motivo, una frazione del picoplancton presente nel campione può non essere trattenuta dai filtri in microfibra di vetro, determinando un errore nella determinazione dell'azoto particolato e dell'assimilazione dell'azoto (Altabet, 1990).

La presenza di *detritus* nel campione, cioè azoto particolato non vivente che non partecipa all'assimilazione del nutriente, altera il valore del tasso specifico d'assimilazione (V), ma non ha effetto sul calcolo di quello assoluto (Q).

Incubazioni prolungate dei campioni possono introdurre artefatti nell'assimilazione dei nutrienti azotati indotti dalla segregazione della popolazione (Harris, 1986). Tra essi si ricordano:

- modifiche delle popolazioni indotte dall'assenza di processi che si verificano nella colonna d'acqua (sedimentazione, emigrazione, immigrazione, pascolo, aumento dell'attività batterica nella bottiglia);
- assimilazione non lineare dei nutrienti durante il periodo d'incubazione;
- possibile esaurimento dei nutrienti disciolti nella bottiglia durante l'incubazione.

Diversi studi hanno anche evidenziato che una frazione di ^{15}N assimilato nel particolato vivente può essere rilasciato durante l'incubazione dalle cellule planctoniche, principalmente sotto forma organica disciolta (DO^{15}N), determinando una sottostima dell'assimilazione reale del nutriente azotato. Tale perdita ha una consistenza variabile, essendo dipendente dalle condizioni d'incubazione e filtrazione dei campioni e dallo stato fisiologico della popolazione (Bronk *et al.*, 1994; Slawik *et al.*, 1998).

Un altro fenomeno che può introdurre una sottostima del tasso di assimilazione dell'ammonio (e più in generale dei nutrienti rigenerati) è noto come "diluizione isotopica". L'arricchimento isotopico iniziale del substrato viene, cioè, diluito dall'ammonio prodotto nel corso dell'incubazione ad opera dei processi rigenerativi in atto. Tanto più attivi sono questi processi e più lunghi i tempi di incubazione, tanto maggiore è la sottostima introdotta. Per correggere i tassi di assimilazione da questo effetto è necessario misurare anche l'arricchimento isotopico dell'ammonio a fine incubazione (Gilbert *et al.*, 1982). Alternativamente è stato proposto un metodo di calcolo per una correzione "a posteriori" (Kanda *et al.*, 1987), che può fornire indicazioni utili anche se meno precise.

È da sottolineare quindi, che i metodi sopra descritti permettono di stimare solo l'accumulo netto di azoto nel PON (assimilazione *netta*), mentre l'assimilazione totale di azoto (assimilazione *lorda*) dovrebbe prendere in considerazione anche i termini mancanti dovuti al rilascio di DON e NH_4^+ . Per quanto riguarda la fissazione di azoto atmosferico, l'assimilazione totale o *lorda* è stimabile utilizzando il metodo indiretto detto "della riduzione dell'acetilene" (Mulholland *et al.*, 2004) sviluppato da Stewart *et al.* (1967) e Hardy *et al.* (1968), ai quali si rimanda per una trattazione approfondita.

32.7 BIBLIOGRAFIA

- ALTBET M.A. (1990) - Organic C, N, and stable isotopic composition of particulate matter collected on glass-fiber and aluminum oxide filters. *Limnol. Oceanogr.*, **35**: 902-909.
- BRONK D.A., GLIBERT P.M., WARD B.B. (1994) - Nitrogen uptake, dissolved organic nitrogen release, and new production. *Science*, **265**: 1843-1846.
- BURY S.J., BOYD P.W., PRESTON T., SAVIDGE G., OWENS N.J.P. (2001) - Size-fractionated primary production and nitrogen uptake during a North Atlantic phytoplankton bloom: implications for carbon export estimates. *Deep Sea Res. I*, **48**: 689-720.
- CANTONI C., COZZI S., PECCHIARI I., CABRINI M., MOZETIĆ P., CATALANO G., FONDA UMANI S. (2003) - Short-term variability of primary production and inorganic nitrogen uptake related to the environmental conditions in a shallow coastal area (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea). *Oceanol. Acta* **26**: 565-575.
- COLLOS Y., VAQUER A., BIBENT B., SLAWYK G., GARCIA N. SOUCHU P. (1997) - Variability of nitrate uptake kinetics of phytoplankton communities in a Mediterranean coastal lagoon. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **44** (3): 369-375.
- COZZI S., CANTONI C. (2006) - Partition nitrogen uptake in phytoplankton and bacteria using bactericidal agents and light-dependent incubations. *Period. Biologorum*, **108**: 145-150.
- COZZI S., GIANI M. (2007) - Determination of organic nitrogen and urea. In: Nollet L.M.L. (ed), *Handbook of Water Analysis - Second Edition*. CRC Press, New York: 367-392.
- COZZI S., LIPIZER M., CANTONI C., CATALANO G. (2002) - Nutrient balance in the ecosystem of the North Western Adriatic Sea, *Chem. Ecol.*, **18**: 1-12.
- DUGDALE R.C., GOERING J.J. (1967) - Uptake of new and regenerated forms of nitrogen in primary productivity. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 196-206.

-
- DUGDALE R.C, WILKERSON F.P. (1986) - The use of ^{15}N to measure nitrogen uptake in eutrophic oceans: experimental considerations. *Limnol. Oceanogr.*, **31**: 673-689.
- DUGDALE R.C, WILKERSON F.P., BARBER R.T., CHAVEZ F.P. (1992) – Estimating new production in the Equatorial Pacific Ocean at 150°W . *J. Geophys. Res.*, **97**: 681-686.
- ELSKENS M., BAEYENS W., GOEYENS L. (1997) - Contribution of nitrate to the uptake of nitrogen by phytoplankton in an ocean margin environment. *Hydrobiologia*, **353**: 139-152.
- EPPLEY R.W., PETERSON B.J. (1979) - Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature*, **282**: 677-680.
- FLYNN K.J. (1998) - Estimation of kinetic parameters for the transport of nitrate and ammonium into marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **169**: 13-28.
- FOUILLAND E., GOSSELIN M., RIVKIN R.B., VASSEUR C., MASTAJIR B. (2007) – Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in Arctic surface waters. *J. Plankton Res.*, **29**: 369-376.
- GENTILHOMME V., RAIMBAULT P. (1994) - Absorption et regeneration de l'azote dans la zone frontale du courant Algerien (Mediterranee Occidentale). *Oceanol. Acta*, **17**: 555-562.
- GLIBERT P.M., LIPSCHULTZ F., MCCARTHY, J.J., ALTABET M.A. (1982) - Isotope dilution models of uptake and remineralization of ammonium by marine plankton. *Limnol. Oceanogr.*, **27**: 639– 650.
- GOEYENS L., ELSKENS M., CATALANO G., LIPIZER M., HECQ J.H., GOFFART A. (2000) - Nutrient depletions in the Ross Sea and their relation with pigment stocks. *J. Mar. Systems*, **27**: 195-208.
- HARDY R.W.F., HOLSTEN R.D., JACKSON E.K., BURNS R.C. (1968) - The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, **43**: 1185.
- HARRIS G.P. (1986) - *Phytoplankton Ecology – Structure, Function and Fluctuation*. Chapman and Hall, London: 384 pp.
- HARRISON W.G., HARRIS L.R., IRWIN B.D. (1996) - The kinetics of nitrogen utilization in the oceanic mixed layer: nitrate and ammonium interactions at nanomolar concentrations. *Limnol. Oceanogr.*, **41**: 16-32.
- JAFFE D.A. (1992) - The Nitrogen Cycle. In: Butcher S.S., Charlson R.J., Orians G.H., Wolfe G.V. (eds), *Global Biogeochemical Cycles*. Academic Press, London: 263-284.
- KANDA J., LAWS E.A., SAINO T., HATTORI A. (1987) – An evaluation of isotope dilution effect from conventional data sets of ^{15}N uptake experiments. *J. Plankton Res.*, **9**: 79-90.
- KANDA J., ZIEMANN D.A., CONQUEST L.D., BIENFANG P.K. (1989) - Light-dependency of nitrate uptake by phytoplankton over the spring bloom in Auke Bay, Alaska. *Mar. Biol.*, **103**: 1432-1793.
- KARL D., MICHAELS A., BERGMAN B., CAPONE D., CARPENTER E., LETELIER R., LIPSCHULTZ F., PAERL H., SIGMAN D., STAL L. (2002) - Dinitrogen Fixation in the World's Oceans. *Biogeochemistry*, **57**: 47-98.
- KNAP A., MICHAELS A., CLOSE A., DUCKLOW H., DICKSON A. (1996) - *Protocols for the Joint Global Ocean Flux Study (JGOFS) Core Measurements*. UNESCO, JGOFS Report 19: 170 p.
- LEE CHEN Y.L., LU H.B., SHIAH F.K., GONG G.C., LIU K.K., KANDA J. (1999) - New production and f-ratio on the continental shelf of the East China Sea: comparison between nitrate inputs from the subsurface Kuroshio Current and the Changjiang River. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **48**: 59-75.
- LIPIZER M., MANGONI O., CATALANO G., SAGGIOMO E. (2000) - Phytoplankton uptake of ^{15}N and ^{14}C in the Ross Sea during austral spring 1994. *Polar Biol.*, **23**: 495-502.
- MAGUER F.F., L'HELGUEN S., LE CORRE P. (2000) - Nitrogen uptake by phytoplankton in a shallow water tidal front. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **51**: 349-357.
- MIDDELBURG J.J., NIEUWENHUIZE J. (2000a) - Nitrogen uptake by heterotrophic bacteria and phytoplankton in the nitrate-rich Thames estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **203**: 13-21.
- MIDDELBURG J.J., NIEUWENHUIZE J. (2000b) - Uptake of dissolved inorganic nitrogen in turbid, tidal estuaries. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **192**: 79-88.
- MONTOYA J.P., VOSS M., KÄHLER P., CAPONE D.G. (1996) - A simple, high-precision, high-sensitivity tracer assay for N_2 fixation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62** : 986-993.
- MULHOLLAND M.R., BRONK D.A., CAPONE D.G. (2004) - Dinitrogen fixation and release of ammonium and dissolved organic nitrogen by *Trichodesmium* IMS101. *Aquat. Microb. Ecol.*, **37**: 85–94.
- NELSON D.M., SMITH W.O. (1986) - Phytoplankton bloom dynamics of the western Ross Sea ice-edge 2. Mesoscale cycling of nitrogen and silicon. *Deep Sea Res.*, **33**: 1389-1412.
- OLSON R.J. (1980) - Nitrate and ammonium uptake in Antarctic waters. *Limnol. Oceanogr.*, **25**: 1064-1074.
- OWENS N.J.P. (1988) - Rapid and total automation of shipboard ^{15}N analysis: examples from the North Sea. *J.*
-

-
- Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **122**: 163-171.
- OWENS N.J.P., BURKIILL P.H., MANTOURA R.C.F, WOODWARD E.M.S., BELLAN I.E., AIKEN J., HOWLAND R.J.M., LEWLLYN C.A. (1993) - Size-fractionated primary production and nitrogen assimilation in the northwestern Indian Ocean. *Deep Sea Res. II*, **40**: 697-709.
- OWENS N.J.P., REES A.P. (1989) - Determination of ^{15}N at sub-microgram levels of nitrogen using automated continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. *Analyst*, **114**: 1655-1657.
- SLAWIK G., RAIMBAULT P., GARCIA N. (1998) - Measuring gross uptake of ^{15}N -labeled nitrogen by marine phytoplankton without particulate matter collection: evidence of low ^{15}N losses to the dissolved organic nitrogen pool. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 1734-1739.
- SMITH W.O., HARRISON W.G. (1991) - New production in polar regions: the role of environmental controls. *Deep-Sea Res.*, **38**: 1463-1479.
- STEWART W.D.P., FITZGERALD G.P., BURRIS R.H. (1967). *In situ* studies on N_2 fixation, using the acetylene reduction technique. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**: 2071.
- TREMBLAY J.E., LEGENDRE L., KLEIN B., THERRIAULT J.C. (2000) - Size-differential uptake of nitrogen and carbon in a marginal sea (Gulf of St. Lawrence, Canada): significance of diel periodicity and urea uptake. *Deep Sea Res. II*, **47**: 489-518.
- WADA E., HATTORI A. (1991) - Nitrogen in the Sea: forms, abundances and rate processes. CRC Press, Boston: 208 pp.
- WEISS R.F. (1970) - The solubility of nitrogen, oxygen and argon in water and seawater. *Deep Sea Res.*, **17**: 721-735.
- WETZEL R.G. (2001) - *Limnology: lake and river ecosystems*. 3rd ed, Elsevier, Academic Press, San Diego: 1006 pp.

CAPITOLO 33. PIGMENTI CLOROFILLIANI PER LA STIMA DELLA BIOMASSA FOTOTROFA

L. Lazzara, F. Bianchi, L. Massi, M. Ribera d'Alcalà

33.1 INTRODUZIONE GENERALE AI METODI BASATI SUI PIGMENTI

L'obiettivo di questa sezione è descrivere i principali metodi biochimici e biofisici per la stima della biomassa fototrofa marina e di alcuni dei suoi aspetti funzionali. Questi metodi sono sostanzialmente complementari a quelli basati sui conteggi diretti o indiretti degli organismi ed i loro risultati si riferiscono a proprietà dell'intera comunità naturale o di alcune delle sue frazioni dimensionali.

I primi metodi proposti (fotometrico, fluorimetrico ed HPLC del capitolo 34) sono basati su una caratteristica comune a tutti gli organismi autotrofi, la presenza di pigmenti che permettono di catturare la luce per trasferirla ai centri di reazione dove ha inizio la fotosintesi. Nell'oceano attuale, tranne che per una piccola frazione di batteri molto antichi (Kolber *et al.*, 2001 e riferimenti ivi inclusi), tutti gli organismi fototrofi, ovvero quelli che usano la luce per vivere, posseggono o la clorofilla *a* o un pigmento molto simile, la divinil-clorofilla *a*, mentre i pigmenti accessori, per lo più carotenoidi, possono cambiare da gruppo a gruppo.

I metodi riportati in questo e nei prossimi due capitoli si basano sulla presenza ubiquitaria di un ristretto numero di pigmenti e sulla risposta da loro mediata alle stimolazioni luminose. Questi metodi si possono dividere in due gruppi: quelli che stimano la quantità di uno o più pigmenti presenti nella sospensione algale, dopo averli preliminarmente estratti con un solvente (metodi *in vitro*) e quelli che stimano indirettamente la loro quantità, misurando l'ampiezza della risposta ad un'eccitazione luminosa della sospensione cellulare (metodi *in vivo*, vedi Capitolo 35).

Ambedue si basano sull'evidenza che la quantità di pigmenti presenti in un organismo planctonico covariano con la sua biomassa totale. In particolare la quantità di clorofilla *a* contenuta in una cellula è proporzionale alla quantità di carbonio nella cellula stessa. Tuttavia tale rapporto di proporzionalità può variare fino a circa 10 volte in relazione alla specie, al suo stato fisiologico ed alla sua storia luminosa (tra gli altri Falkowski e Raven, 1997).

Ad esempio Anning *et al.* (2000) riportano per una diatomea coltivata in laboratorio (*Skeletonema costatum* clone CCMP 1332) un genere che produce intense fioriture costiere, una diminuzione del rapporto clorofilla-carbonio di quattro volte (da 0,08 a 0,02 g·g⁻¹), per sospensioni cresciute rispettivamente a 50 e 1200 μE m⁻² sec⁻¹. Quindi il non tenere conto della variazione del rapporto clorofilla-carbonio in ambienti naturali, può comportare differenze nella stima della biomassa fitoplanctonica se questa è basata sul dosaggio della clorofilla *a*, di almeno un fattore 3. Un'analisi di dettaglio della variazione del rapporto clorofilla-carbonio in differenti condizioni di crescita è stata condotta in numerosi studi, tra questi quello di Geider *et al.* (1998), che può essere preso come punto di partenza per un approfondimento.

Nonostante questi limiti va detto che, le specifiche caratteristiche di assorbimento dei pigmenti, che sono alla base del colore delle alghe, hanno consentito, da più di 40 anni nella maggior parte degli studi di ecologia acquatica, di dosare la clorofilla con metodi *in vitro* per la stima della biomassa planctonica. I metodi *in vivo*, d'altro canto, permettono anche di valutare tale biomassa dallo spazio, seguendone gli andamenti a scala globale e su intervalli di tempo giornalieri. Anche questo giustifica, se non altro a scopi di comparazione, la loro applicazione.

C'è da aggiungere inoltre che le metodiche utilizzate per la raccolta della biomassa fitoplanctonica (essenzialmente rappresentate dalla filtrazione) non consentono di separare il carbonio fitoplanctonico da quello non-fitoplanctonico (detrito organico), contemporaneamente presente nell'acqua marina.

Riassumendo, si può affermare che nonostante le misure di carbonio siano quelle più corrette per

una stima della biomassa fitoplanctonica, quelle basate sulla clorofilla risultano ancora le più utilizzate, sia per motivi storici che pratici. Infatti le prime, nonostante i recenti progressi tecnici, sono più costose e complicate di quelle dei pigmenti qui proposte.

Queste metodiche, sia fotometriche che fluorimetriche (vedi oltre), risultano ottimali quando si prevede un impegno economico e temporale limitato, mentre le recenti tecniche di separazione cromatografica della miscela pigmentaria (essenzialmente per HPLC: Robinson, 1979; Capitolo 34) prevedono costi e tempi molto superiori e non sempre sostenibili da tutti i laboratori. Inoltre, anche nel caso si adottino metodiche cromatografiche, è preferibile eseguire in parallelo queste misure dei pigmenti fitoplanctonici, in modo da assicurare la necessaria continuità con i dati pregressi e con gli algoritmi bio-ottici storici ed, eventualmente, estendere il numero dei campioni analizzati con tecniche molto meno costose ed impegnative (Trees *et al.*, 2003).

La grande diffusione del dosaggio spettrofotometrico è motivata anche dal fatto che lo strumento utilizzato (spettrofotometro) è quasi sempre presente in un laboratorio analitico, per le molteplici determinazioni basate sulla misura dell'assorbanza di sostanze colorate prodotte in maniera selettiva e quantitativa in presenza delle specie chimiche da dosare, ed è questo il motivo principale per cui il metodo viene riportato in questo manuale. La controindicazione del metodo spettrofotometrico è la sua ridotta sensibilità, rispetto ai metodi basati sulla fluorescenza. Questo comporta o l'uso di celle a maggiore cammino ottico (10 cm), che generano comunque il problema di disporre di un volume più alto di solvente per l'estrazione e di attendere la stabilizzazione della lettura, o la filtrazione di volumi di acqua maggiori. Questo non sempre è possibile dato che, in condizioni di acque blu (cioè in mare aperto ed in periodi diversi da quelli di fioriture intense), 4-5 l sono la quantità minima necessaria per ottenere risultati attendibili. Filtrare grandi volumi di acqua presenta sempre molte difficoltà, sia per il campionamento, che per l'incremento del tempo di filtrazione che per la necessità di utilizzare filtri di dimensioni maggiori e/o di apparati di filtrazione *ad hoc*.

Per converso, il metodo fluorimetrico permette di ottenere dati attendibili filtrando quantità di acqua minori, utilizzando filtri di diametro più piccolo e ottenendo volumi di estratto inferiori. Tutti questi aspetti rendono il dosaggio con la misura della fluorescenza complessivamente più pratico ed economico, escludendo l'acquisizione iniziale di un fluorimetro, sia esso a filtri che con monocromatore, anche se recentemente sono stati immessi sul mercato strumenti a costi accessibili, di poco superiori a quelli di uno spettrofotometro. Tuttavia è bene considerare che questi strumenti analitici si prestano ad un minor numero di applicazioni per analisi di tipo ambientale. Va ricordato infine che tutti i metodi di misura delle concentrazioni pigmentarie, incluse le tecniche HPLC e quelle fluorimetriche, si basano su calibrazioni che, necessariamente, utilizzano misure di densità ottica, il che rende insostituibile l'uso dello spettrofotometro.

Infine, per quanto nell'ambito di osservazioni sistematiche dell'ambiente, le misure di biomassa algale basate sulla clorofilla siano sempre più sostituite da misure automatiche o remote basate su sensori bio-ottici, il disporre di una consolidata procedura di dosaggio dei pigmenti clorofilliani è essenziale per ogni laboratorio che si occupi di ambiente marino. Questo sia per produrre dati di "verità-mare", che per ricondurre negli intervalli reali di variazione le misure basate su strumentazione ottica, che fornisce valori assoluti solo di grandezze ottiche, peraltro prodotte da pigmenti che sono organizzati in strutture attive, cellulari e subcellulari (vedi *package effect* in Capitolo 35).

33.2 CAMPIONAMENTO E FILTRAZIONE

33.2.1 Attrezzatura e reagenti

- Bottiglie in plastica scure, da 1 l (acque costiere) a 5 l (mare aperto)
- Retino da plancton con maglia di 250 µm

-
- Imbuto in plastica adatto per bottiglie
 - Apparato di filtrazione (per filtri con diametro da 25 o 47 mm)
 - Pompa da vuoto e trappola
 - Filtri in fibra di vetro Whatman GFF da 25 o 47 mm (consigliati)
 - Provette da centrifuga tarate da 10 ml
 - Congelatore o frigorifero
 - Spruzzetta o pipetta automatica per acetone
 - Cilindri graduati da 1 litro
 - Imbuto per filtrazione e carta da filtro
 - Acetone ppa [(CH₃)₂CO]
 - Carbonato di sodio anidro [Na₂CO₃]
 - Acetone neutralizzato: all'acetone puro (ppa) aggiungere carbonato di sodio anidro in eccesso ed agitare vigorosamente. Filtrare, dopo almeno 24 ore, su carta da filtro e travasare nella spruzzetta o bottiglia a chiusura ermetica.

33.2.2 Procedura di campionamento

Travasare il campione d'acqua dalle bottiglie di prelievo nelle bottiglie di plastica scura, interponendo il retino con maglie di 250 µm e riporre al fresco, lontano dai raggi solari. La prefiltrazione del campione ha lo scopo di trattenere lo zooplankton e frammenti di macroalghe eventualmente presenti (Strickland e Parsons, 1968; Lenz e Fritsche, 1980).

33.2.3 Procedura di filtrazione

Filtrare i campioni prelevati con filtri in fibra di vetro, Whatman GF/F; è consigliabile effettuare la filtrazione entro breve tempo dal prelievo (max 1-2 ore), specialmente quando i campioni siano stati raccolti in ambienti eutrofici. Il filtro in fibra di vetro è meno soggetto ad intasamento ed è più economico del filtro a membrana sintetica ed i filtri GF/F vengono utilizzati anche per la loro elevata capacità di ritenzione, la facilità di omogeneizzazione e la versatilità di impiego in una serie di altre analisi che possono essere effettuate in parallelo sullo stesso campione (sostanza sospesa, produzione primaria, POC, analisi biochimiche varie, vedi i capitoli seguenti).

Qualora lo scopo sia stimare precise frazioni dimensionali del particellato, in sostituzione dei filtri in fibra di vetro si possono utilizzare filtri a base di membrane sintetiche (policarbonato). Questi filtri, ad impronta di enucleazione, hanno il vantaggio di avere pori calibrati e quindi garantiscono una separazione molto precisa delle particelle secondo la taglia. Presentano però alcuni svantaggi, quali la scarsissima capacità di ritenzione (il flusso di filtrazione risulta molto più lento, rendendo necessario ripartire il campione su più filtri se si vuole accrescere la sensibilità del metodo), la loro scarsa omogeneizzazione (l'estrazione può avvenire, in questo caso, mediante shock osmotico), la possibilità di rilasciare in soluzione composti che assorbono nel visibile.

- Dopo aver collocato il filtro nell'apposito alloggiamento dell'apparato, bagnarlo e far partire la pompa a vuoto con lieve depressione, così che aderisca uniformemente al supporto.
- Col cilindro graduato versare nell'imbuto dell'apparato di filtrazione un volume di campione, variabile tra 0,5 e 5 litri.
- Attivare la pompa da vuoto, assicurandosi che la differenza di pressione fra la parte inferiore e quella superiore del filtro non superi -25 KPa (circa 150 mm Hg), al fine di evitare la rottura delle cellule vegetali con la conseguente perdita di pigmenti.
- Alla fine della filtrazione, prosciugare il filtro, mantenendo la pompa in funzione ancora per qualche secondo, per evitare che una parte del materiale vada perduta. La quantità di acqua da filtrare di-

pende dalla concentrazione presunta dei pigmenti (in mare aperto per concentrazioni di clorofilla pari a circa $1 \mu\text{g l}^{-1}$ vanno filtrati generalmente circa 3 l di acqua di mare ed in acque costiere-lagunari, possono essere sufficienti 0,5 – 1 l).

Come detto in precedenza la filtrazione delle sospensioni algali deve essere eseguita con una differenza di pressione tra le due facce del filtro molto ridotta per minimizzare la rottura delle cellule stesse. Poiché la filtrazione con il metodo della depressione comporta l'uso di contenitori stagni in cui viene ridotta la pressione (le cosiddette trappole) che occasionalmente possono travasare il loro contenuto nel circuito di aspirazione dell'aria, incidente sperimentato dalla totalità degli operatori, è possibile utilizzare un sistema a sovrappressione. Ovvero mantenere la parte inferiore del filtro alla pressione ambientale, potendo canalizzare il filtrato sia in contenitori *ad hoc* per un suo possibile riutilizzo o verso uno scarico, e creare una leggera sovrappressione sull'acqua del campione. Considerando la bassa sovrappressione necessaria, anche una pompa di circolazione d'aria per un acquario è sufficiente. Cosa che dà il vantaggio di costi molto ridotti, della limitazione automatica della pressione, dell'uso di basse tensioni di alimentazione, sempre preferibile in operazioni con acqua di mare, e l'azzeramento del rischio di danneggiare la pompa. L'unica difficoltà consiste nella selezione di contenitori che garantiscano la tenuta alla sovrappressione applicata e nell'opportuno inserimento dei portagomme necessari all'ingresso dell'aria ed alla fuoriuscita del liquido: nel caso di filtrazione in pressione il supporto di filtrazione più accessibile è quello volante (Sweenex). È consigliabile utilizzare supporti di filtrazione che abbiano una valvola per la fuoriuscita dell'aria in modo da non limitare la superficie filtrante per la presenza di bolle d'aria e che vengano stretti con la rotazione di una ghiera indipendente dalla faccia superiore del supporto. Questo per evitare la lacerazione del filtro nella fase di montaggio o smontaggio del supporto. Il sistema di filtrazione in sovrappressione risulta alla fine molto più economico e facilmente trasportabile rispetto ai sistemi a depressione.

33.2.4 Conservazione dei campioni

La conservazione dei campioni risulta un punto critico della procedura analitica, che può determinare l'instaurarsi di processi di degradazione delle clorofille che comportano una loro sottostima (Rai e Marker, 1982). Di conseguenza è sempre preferibile eseguire l'estrazione e l'analisi dei pigmenti clorofilliani subito dopo la filtrazione del campione. Tuttavia, se ciò non fosse possibile, è necessario conservare il campione come indicato di seguito:

- immediatamente dopo la filtrazione riporre il filtro in una provetta da centrifuga con chiusura ermetica e aggiungere un volume noto di acetone puro neutralizzato tale da garantire la completa immersione del filtro (indicativamente 5 ml).
- conservare la provetta al buio a -20°C (o comunque a temperature comprese tra -20 e $+4^{\circ}\text{C}$) ponendo particolare attenzione alla ermeticità della chiusura.

La conservazione del materiale filtrato per un periodo di tempo che si prolunghi da pochi giorni a diverse settimane può avere un effetto negativo, comportando la degradazione dei pigmenti clorofilliani (Yanagi e Koyama, 1971; Blasco, 1973; Neveux, 1979; Lenz e Fritsche, 1980; Wood, 1985; Lazzara *et al.*, 1990; vedi inoltre Mantoura *et al.*, 2005 che riportano quanto ottenuto dallo SCOR Working Group 78; e Trees *et al.*, 2003).

Sono state utilizzate modalità alternative di conservazione dei filtri, che tuttavia vengono sconsigliate, quali la conservazione a -20°C previo congelamento dei filtri umidi o essiccati (Panella e Magazzù, 1978) o la tecnica di essiccazione e congelamento (*freeze-drying*) che secondo Lenz e Fritsche (1980), non dà risultati di conservazione soddisfacenti.

La conservazione della clorofilla *a*, nei campioni di microalghe raccolte su filtro, è stata finora argomento di un numero di studi assai esiguo, se consideriamo la diffusione della pratica di conservazione dei filtri, anche per tempi prolungati (Mantoura *et al.*, 2005). La quasi totalità degli studi risalgono a prima degli anni '80, non riguardano analisi separate dei pigmenti estratti e presentano spesso risultati

contrastanti (Marker *et al.*, 1980), così da non consentire di raccomandare con sicurezza alcuna pratica di congelamento.

Tuttavia, sono state eseguite allo scopo in questa occasione alcune nuove prove su diatomee coltivate, che hanno confermato le indicazioni già date in Lazzara *et al.* (1990) sulla forte perdita di clorofilla *a* in filtri congelati umidi e conservati in aria a -20°C; perdita del 19-20% dopo solo due settimane e del 41% dopo 120 giorni. Invece, filtri conservati nel solvente puro (acetone 100%) a -20°C non presentano variazioni statisticamente significative dopo 13 e dopo 28 giorni (-3% e -6% rispettivamente), ma queste lo divengono dopo 73 e 120 giorni (-11% e -30% rispettivamente).

Le prove condotte confermano quindi quanto già osservato da altri autori (Blasco, 1973; Nusch, 1980; Wood, 1985), che cioè sia da preferire la pratica di conservazione del filtro immerso in acetone e al freddo. Va osservato infine che la conservazione in acetone puro, dà migliori garanzie rispetto a quella in acetone al 90%, in quanto inibisce l'azione delle clorofillasi, il cui effetto è maggiore in ambiente acquoso (Barrett e Jeffrey, 1971; Jeffrey e Hallegraeff, 1980).

Si consiglia, in conclusione, di effettuare misure immediate sugli estratti oppure, nella impossibilità, la conservazione del filtro immerso nell'acetone puro a -20° o meglio a -80 °C solo per periodi inferiori al mese, o del filtro umido congelato in aria (tra -20° e -80°C) ma solo se per periodi inferiori alla settimana.

33.3 PREPARAZIONE DEGLI ESTRATTI

Dopo che il particellato sospeso contenente pigmenti liposolubili, è stato concentrato su di un filtro in fibra di vetro mediante una filtrazione eseguita in presenza di una leggera depressione, i pigmenti clorofilliani vengono estratti (insieme ai carotenoidi) a freddo dalle cellule, triturando ed omogeneizzando i filtri, immersi in una miscela di acetone ed acqua.

33.3.1 Attrezzature specifiche

- Centrifuga per provette da 12 mm di diametro, capace di raggiungere 4000 rpm, possibilmente refrigerata.
- Omogeneizzatore (*potter*) con pestello in vetro smerigliato o teflon.

33.3.2 Prodotti chimici e reagenti

- Acetone ppa [(CH₃)₂CO]
- carbonato di sodio [NaCO₃]
- acido cloridrico [HCl]
- Acetone neutro al 90% v/v: mescolare 100 ml di acqua grado reagente e 900 ml di acetone neutro (vedi sopra) separatamente misurati. Mantenere sempre la soluzione lontana dalla luce e in presenza di carbonato di sodio.
- Acido cloridrico 0,66 mol l⁻¹: versare lentamente sotto agitazione 55 ml di acido cloridrico concentrato (HCl 37% v/v) in 950 ml di acqua grado reagente.

33.3.3 Procedura

Triturare ed omogeneizzare il filtro, conservato in acetone puro, per un massimo di 2 min sciacquando più volte accuratamente il pestello dell'omogeneizzatore.

Tale operazione va condotta adoperando un volume di acetone uguale a quello dell'acetone puro usato per conservare il filtro. Siccome l'estratto finale deve essere in acetone al 90% e tenendo conto che il filtro trattiene acqua (per un filtro GFF da 47 mm circa 0,7 ml), generalmente ai 5 ml di acetone puro si aggiungono 5 ml di acetone al 90%).

Se il campione viene analizzato subito dopo la filtrazione, le operazioni di triturazione ed omogeneizzazione vanno eseguite direttamente con acetone al 90%. La omogeneizzazione del filtro mediante potter provoca un graduale riscaldamento del liquido di estrazione, con possibile parziale degradazione dei pigmenti. Questo inconveniente può essere limitato usando acetone freddo (4 °C) o ponendo la provetta in un becker con ghiaccio, in ogni caso contenendo l'operazione entro un tempo massimo di 2 minuti.

È possibile omogeneizzare il campione anche mediante triturazione manuale con bacchetta di vetro, direttamente all'interno della provetta usata per la conservazione; in questo caso è opportuno stimare quantitativamente quale sia la eventuale diminuzione di efficienza, rispetto alla triturazione strumentale.

L'uso degli ultrasuoni, infine, sembra non dare buoni risultati (Nusch, 1980) in quanto produce eccessivo riscaldamento dell'estratto.

La provetta accuratamente tappata con la sospensione ottenuta (10 ml di acetone al 90%) deve essere posta a 4°C al buio per 24h a completare l'estrazione. Centrifugare le provette chiuse per 10 minuti a 4000 rpm (o 3500 per 12 min, se non refrigerate).

33.4 SPETTROFOTOMETRIA SU ESTRATTI

Lo spettrofotometro da usare dovrebbe preferenzialmente essere munito di reticolo interferenziale ed una larghezza di banda 1-2 nm, con cellette da almeno 50 mm (preferibilmente 100 mm) di cammino ottico e di volume ridotto (max 7 ml). È importante che la lunghezza d'onda sia accuratamente regolata, per cui occorre effettuare frequenti controlli seguendo le indicazioni della casa costruttrice dell'apparecchiatura. Se si dispone di spettrofotometri con lampada a idrogeno o mercurio, si può ad esempio, controllare che la riga dell'idrogeno sia situata a 656 nm e quella del mercurio a 546 nm.

Con le nuove generazioni di spettrofotometri a reticolo di diodi, disponibili ormai a prezzi contenuti, le misure divengono anche più rapide perché, come chiarito nel seguito, il metodo richiede letture a diverse lunghezze d'onda che in un sistema a diodi vengono fatte simultaneamente. In aggiunta la nuova generazione di spettrofotometri dispone di porte per il collegamento con un PC che permette la memorizzazione dei dati in formato digitale e quindi immediatamente utilizzabili per i calcoli necessari alla stima delle concentrazioni.

33.4.1 Lettura e calcoli

Dopo la centrifugazione finale dell'estratto prelevare il soprannatante, mediante una pipetta o siringa, avvinare con una piccola quantità le cellette dello spettrofotometro e quindi riempirle.

Di seguito vengono indicate tre diverse metodiche di stima dei pigmenti fotosintetici:

- metodo per la stima della clorofilla *a* con feopigmenti (clorofeopigmenti);
- metodo per la stima separata delle clorofille *a*, *b* e *c*;
- metodo per la stima separata della clorofilla *a* e dei feopigmenti.

La prima metodica riportata comporta un errore di entità variabile, per la presenza sia di pigmenti accessori (clorofille *b* e *c*) che presentano una coda di assorbimento anche a 664 nm, che di feofitine e feoforbidi, principali prodotti di degradazione delle clorofille. Tuttavia questo metodo è da preferire quando si desidera abbassare la soglia di sensibilità della stima (ad es. per concentrazioni inferiori agli 0,4 µg l⁻¹), in quanto consente una stima più "robusta" e attendibile della biomassa pigmentaria (vedi anche nota finale).

Le altre due metodiche consentono di ottenere una stima più precisa della sola clorofilla *a* in presenza di significative quantità di clorofilla *b* e *c*, utilizzando rispettivamente letture a più lunghezze d'onda (Jeffrey e Humphrey, 1975; Lorenzen e Jeffrey, 1980) oppure in presenza di significative quantità dei suoi prodotti di degradazione (feopigmenti), avendo trattato l'estratto con acido cloridrico (Lorenzen, 1967).

33.4.1.1 Concentrazione dei clorofeopigmenti

Questo metodo si basa sull'assunto che il picco di massimo assorbimento della clorofilla *a* si trova a 664 nm con coefficiente di assorbimento specifico di 87,67 cm⁻¹g⁻¹ (Jeffrey e Humphrey, 1975) ed i feopigmenti non siano presenti in elevate quantità.

Leggere allo spettrofotometro l'assorbanza del campione alle lunghezze d'onda di 664 e 750 nm contro un bianco di acetone (non neutralizzato) al 90%; qualora lo strumento preveda la contemporanea utilizzazione di più cellette, è necessario leggere il valore del bianco per ciascuna di esse, tenendone conto nella procedura di calcolo.

Calcolare la concentrazione dei clorofeopigmenti (Chl) applicando la seguente formula:

$$\text{Chl } (\mu\text{g l}^{-1}) = \{[A(s,664)-A(b,664)]-[A(s,750)-A(b,750)]\} \cdot v \cdot 10^6 / (a^* \cdot \text{co} \cdot V)$$

dove:

A(s,664) = densità ottica del campione a 664 nm;

A(s,750) = densità ottica del campione a 750 nm;

A(b,664) = densità ottica del bianco a 664 nm;

A(b,750) = densità ottica del bianco a 750 nm;

a* = coefficiente di assorbimento specifico della clorofilla *a* in acetone 90% a 664 nm (87,67 cm⁻¹g⁻¹l);

co = cammino ottico della celletta (cm);

v = volume dell'estratto (ml);

V = volume di campione filtrato (ml).

33.4.1.2 Concentrazioni delle clorofille *a*, *b* e *c*

Questa metodica spettrofotometrica va usata per fornire stime accurate delle clorofille *a*, *b* e *c*₁+*c*₂ su campioni fitoplanctonici di popolamenti misti, quando non sono presenti significative quantità dei loro prodotti di degradazione (Jeffrey e Welschmeyer, 2005; Humphrey e Jeffrey, 2005).

Leggere l'estratto in acetone, alle lunghezze d'onda di 630, 647, 664 e 750 nm, per stimare la concentrazione delle clorofille *b* e *c* e per determinare la loro incidenza sul valore della concentrazione della clorofilla *a* (Lorenzen e Jeffrey, 1980). Applicando questa metodica occorre leggere anche i valori del bianco alle varie e rispettive lunghezze d'onda.

Determinare l'assorbanza netta dell'estratto a ciascuna lunghezza d'onda [A(λ)] secondo la formula:

$$A(\lambda) = [A(s, \lambda) - A(b, \lambda)] - [A(s, 750) - A(b, 750)]$$

dove:

A(b,λ) = densità ottica del bianco alla λ nm;

A(s, λ) = densità ottica del campione alla λ nm;

A(b,750) e A(s,750) sono definite come sopra.

Calcolare le concentrazioni delle clorofille (Chl *a*, *b* e *c*) applicando le seguenti formule:

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g dm}^{-3}) = [11,85 \cdot A(664) - 1,54 \cdot A(647) - 0,08 \cdot A(630)] \cdot v \cdot 10^3 / (\text{co} \cdot V)$$

$$\text{Chl } b \text{ } (\mu\text{g l}^{-1}) = [-5,43 \cdot A(664) + 21,03 \cdot A(647) - 2,66 \cdot A(630)] \cdot v \cdot 10^3 / (\text{co} \cdot V)$$

$$\text{Chl } c_1 + c_2 \text{ (}\mu\text{g l}^{-1}\text{)} = [-1,67 \cdot A(664) - 7,60 \cdot A(647) + 24,52 \cdot A(630)] \cdot v \cdot 10^3 / (co \cdot V)$$

dove:

$A(\lambda)$, co , v e V hanno il significato già sopra espresso.

I valori delle concentrazioni delle clorofille b e c possono risultare negativi quando questi pigmenti sono presenti in concentrazioni molto basse e non possono essere determinati con questo metodo (vedi nota successiva), oppure se sono presenti molti feopigmenti che disturbano la specificità delle letture.

33.4.1.3 Concentrazioni della clorofilla a e dei feopigmenti

Il metodo permette di determinare le concentrazioni della clorofilla a e dei feopigmenti (feofitine, feoforbidi, clorofillidi) assumendo che il rapporto tra i loro coefficienti di assorbimento specifico, sia uguale a quello tra clorofilla a e feofitina a (Lorenzen, 1967).

Sui campioni naturali questa tecnica fornisce i risultati migliori quando i prodotti di degradazione sono essenzialmente costituiti dalla feofitina a . Inoltre fornisce un range di errore potenziale variabile in relazione ai rapporti fra le concentrazioni di clorofilla a e feofitina a , permettendo una migliore stima della concentrazione della clorofilla a quando questo pigmento sia dominante rispetto alla feofitina. Al contrario quando i rapporti si invertono la stima dei feopigmenti sarà più accurata di quella della clorofilla a (Jeffrey e Welschmeyer, 2005; Lorenzen e Newton-Downs, 1986). Infine questo metodo, come del resto quello fluorimetrico descritto di seguito, soffre dell'interferenza della clorofilla b , che dopo acidificazione si degrada a feofitina b , non distinguibile dalla feofitina a , e stimata nei calcoli finali come feopigmento.

La procedura analitica prevede l'aggiunta di 50 mm³ di HCl (0,66 mol l⁻¹) per ogni 5 ml di estratto direttamente nella celletta dello spettrofotometro subito dopo le letture a 665 e 750 nm. La celletta va agitata ripetutamente ed occorre attendere da 30 a 60 sec prima di ripetere le letture alle stesse lunghezze d'onda. In questo modo, tutta la clorofilla a presente nell'estratto si converte in feofitina a . È importante tenere presente che la concentrazione finale dell'acido nell'estratto non deve superare di molto il valore di 3·10⁻³ mol l⁻¹ (30 mm³ di HCl 0,66 mol l⁻¹ per ogni ml di estratto), per evitare che i carotenoidi presenti si trasformino in un composto che assorbe nel rosso, alterando così il valore della lettura dei feopigmenti (Riemann, 1978).

Determinare l'assorbanza netta dell'estratto prima dell'acidificazione [$A(665o)$] e dopo acidificazione [$A(665a)$] secondo la formula:

$$A(665\alpha) = [A(s, 665\alpha) - A(b, 665\alpha)] - [A(s, 750\alpha) - A(b, 750\alpha)]$$

dove:

$A(b, 665)$ = densità ottica del bianco a 665 nm ; $A(b, 750)$ = assorbanza del bianco a 750 nm;

$A(s, 665\alpha)$ = densità ottica del campione a 665 nm prima ($\alpha=o$) o dopo acidificazione ($\alpha=a$);

$A(s, 750\alpha)$ = densità ottica del campione a 750 nm prima ($\alpha=o$) o dopo acidificazione ($\alpha=a$).

Calcolare quindi le concentrazioni della clorofilla a (Chl a) e dei feopigmenti applicando le seguenti formule:

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g l}^{-1}\text{)} = 26,73 \cdot [A(665o) - A(665a)] \cdot v \cdot 10^3 / (co \cdot V)$$

$$\text{Feopigmenti (}\mu\text{g l}^{-1}\text{)} = 26,73 \cdot [1,7 \cdot A(665a) - A(665o)] \cdot v \cdot 10^3 / (co \cdot V)$$

dove:

$A(665o)$ = densità ottica netta del campione a 665 nm prima dell'acidificazione;

$A(665a)$ = densità ottica netta del campione a 665 nm dopo acidificazione;

co , v e V hanno il significato già sopra espresso.

33.4.2 Note sui dosaggi spettrofotometrici

- Il dosaggio spettrofotometrico con strumenti a reticolo interferenziale ha un intervallo ottimale di lettura, rispetto all'errore di misura, compreso tra 0,2 e 0,8 unità di assorbanza (Strickland e Parsons, 1968). La concentrazione minima di clorofilla *a* che, utilizzando cellette da 100 mm di cammino ottico, il metodo consentirebbe di dosare nell'estratto è di 228 $\mu\text{g l}^{-1}$, che equivale ad una concentrazione *in situ* di 0,46 $\mu\text{g l}^{-1}$, nel caso siano stati filtrati 5 l di campione. Tuttavia, se le condizioni ottiche della misura e l'accuratezza sono soddisfacenti ($\pm 0,002 A$), si hanno letture valide anche con assorbanze, a 664 nm, di 0,050 (Neveux, 1979) corrispondente *in situ* a 0,11 $\mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$.
- Se l'assorbanza dei bianchi supera il valore di 0,008 occorre pulire accuratamente l'esterno delle cellette e nel caso il valore delle letture sia ancora elevato, è necessario immergere le cellette stesse in miscela solfocromica per 10 minuti e sciacquarle poi abbondantemente con acqua prima di ripetere la lettura. Qualora l'assorbanza non diminuisca, verificare che il disturbo non sia dovuto ad impurezze presenti nell'acetone e nel caso filtrarlo accuratamente.
- La lettura a 750 nm dà una stima della torbidità del campione e non deve superare il valore di 0,010 di assorbanza (cioè 0,002 per ogni cm di cammino ottico); in caso contrario è necessario ripetere la centrifugazione o filtrare il campione con una siringa munita di supporto "Sweenex" nel quale sia inserito un filtro in teflon di 13 mm di diametro e con porosità di 0,2 μm .

33.5 SPETTROFLUORIMETRIA SU ESTRATTI

La stima della concentrazione di clorofilla *a* e feopigmenti con i metodi fluorimetrici si basa sulla misura della fluorescenza dei pigmenti in estratto acetone, prima e dopo acidificazione con acido cloridrico. Si misura così la frazione fotosinteticamente attiva (clorofilla *a*) ed inattiva (feopigmenti) dei pigmenti clorofilliani presenti (Yentsch e Menzel, 1963; Holm-Hansen *et al.*, 1965). Rispetto a quelli spettrofotometrici i metodi fluorimetrici risultano più sensibili, precisi e rapidi, tuttavia l'uso è consigliato solo quando la concentrazione dei pigmenti è bassa, poiché, per valori elevati, la relazione tra fluorescenza e concentrazione non è più lineare. Il limite superiore entro il quale la relazione si mantiene tale è di ca. 750 $\mu\text{g l}^{-1}$ nell'estratto acetone (Neveux, 1979) e di ca. 1,5 $\mu\text{g l}^{-1}$ nell'acqua di mare (Bianchi, 1986). In ogni caso, tale intervallo di linearità va verificato per ciascuno strumento. Inoltre la validità di questi metodi è fortemente condizionata dalla eterogeneità della miscela di pigmenti, in particolare dalla concentrazione di clorofilla *b* nell'estratto acetone (Yentsch, 1965; Loftus e Carpenter, 1971; Gibbs, 1979). Infatti la feofitina *b* prodotta dalla degradazione di questo pigmento mostra un picco di emissione a 651 nm che, inversamente a quello delle feofitine *a* e *c*, presenta un forte aumento rispetto alla corrispondente clorofilla, causando quindi, se presente, una sovrastima dei feopigmenti.

Non è da sottovalutare infine, la presenza nei campioni, di altri composti che fluorescono nel rosso, poiché possono condurre a stime erronee di clorofilla e feopigmenti.

Per ovviare a ciò, sono stati proposti numerosi metodi di analisi per via fluorimetrica, che affinano la selezione spettrale con tecniche abbastanza complesse: Loftus e Carpenter (1971) utilizzano in successione tre filtri di emissione per selezionare differenti lunghezze d'onda; Boto e Bunt (1978) quantificano le clorofille *a*, *b* e *c* e loro rispettive feofitine utilizzando 5 letture ad altrettante coppie di valori di eccitazione ed emissione; Neveux e Panouse (1987) incrementano a 6 le combinazioni di eccitazione ed emissione durante le letture fluorimetriche. Più recentemente Moberg *et al.* (2001) hanno utilizzato analisi multivariate applicate alle matrici di eccitazione-emissione per identificare i costituenti principali della miscela pigmentaria di campioni di fitoplancton. Tuttavia, l'esame approfondito di questi metodi esula dagli scopi di questo manuale, poiché essi risultano improponibili per le analisi di routine dei pigmenti fotosintetici fitoplanctonici.

33.5.1 Attrezzature specifiche

- *Spettrofotometro*, vedi considerazioni nei precedenti paragrafi;
- *Fluorimetro a filtri o spettrofluorimetro*.

Nel caso si adoperi un fluorimetro a filtri, si raccomanda di usare come fonte luminosa una lampada F474-BL, un filtro di eccitazione Corning CS.5-60 o Kodak Wratten 47B e un filtro di emissione Corning CS.2-64. Lo strumento deve essere dotato di fotomoltiplicatore con sensibilità estesa alla banda degli 800 nm (ad es. Hamamatsu R446). Anche nel caso in cui si effettuino le misure con uno spettrofluorimetro, è necessario utilizzare un fotomoltiplicatore con sensibilità estesa nella regione del rosso. Inoltre è necessario calibrare/controllare le lunghezze d'onda dei monocromatori; la calibrazione più semplice consiste nella scansione in emissione di un campione di acqua deionizzata, ponendo il monocromatore di eccitazione a 350 nm: il picco massimo (detto "picco Raman dell'acqua") deve risultare a 397 ± 2 nm. Come ampiezza di banda passante, la regolazione consigliata è di 4-5 nm in eccitazione e di 10 nm in emissione.

33.5.2 Procedura

Le principali tappe del metodo fluorimetrico (Yentsch e Menzel, 1963; Holm-Hansen *et al.*, 1965) sono le seguenti.

33.5.2.1 Filtrazione, conservazione ed estrazione

Filtrare i campioni ed estrarre i pigmenti come già indicato nei precedenti paragrafi 2.3, 2.4 e 3.

33.5.2.2 Misure fluorimetriche

Dopo la chiarificazione dell'estratto (vedi paragrafo 3.3):

- trasferire gli estratti in cuvette da fluorimetria;
- effettuare le letture con spettrofluorimetro ai massimi delle lunghezze d'onda propri della clorofilla *a*, ($\lambda_{exc} = 430$ nm, $\lambda_{ems} = 665$ nm);
- condurre su ogni campione due letture fluorimetriche: i) F_o : lettura del campione tal quale; ii) F_a : lettura del campione dopo aggiunta di 1 goccia di una soluzione di HCl 1N;
- annotare il range di fluorescenza in cui sono compresi tutti i campioni misurati.

33.5.2.3 Preparazione dello standard iniziale

- preparare una soluzione standard di clorofilla *a* commerciale pura (soluzione madre) sciogliendo lo standard, fornito in forma cristallina, in una soluzione di acetone 90% (v/v);
- leggere la densità ottica di tale soluzione con uno spettrofotometro (in genere si ottiene un'assorbanza a 664 nm pari a circa 0,09 unità con celletta da 10 mm),
- calcolare la concentrazione della soluzione madre (in mg/l) mediante la seguente equazione:

$$\text{Chl } a_{\text{std}} (\mu\text{g/l}) = [A(664) - A(750)] \cdot (a^* \cdot \text{CO})^{-1} \cdot 10^6$$

dove:

$A(664)$ = densità ottica a 664 nm;

$A(750)$ = densità ottica a 750 nm;

a^* = coefficiente di assorbimento specifico della clorofilla *a* in acetone 90% a 664 nm ($87,67 \text{ cm}^{-1} \text{g}^{-1}$);

CO = cammino ottico della cuvetta, in cm.

- se possibile eseguire una scansione prima (SPT_o) e dopo (SPT_a) acidificazione della soluzione

- madre, ottenuta con una goccia di HCl 1N; salvare gli spettri ottenuti, annotandone i massimi di eccitazione e di emissione (vedi punto 5.2.2.b);
- verificare la congruità degli spettri con quelli propri della clorofilla *a* e della feofitina *a* riportati in letteratura, ripetere queste scansioni frequentemente per verificare l'eventuale esistenza di processi degradativi in atto nella soluzione standard;
 - per verificare la linearità della risposta strumentale, preparare una serie di substandards per un ambito di tre ordini di grandezza, utilizzando pipette automatiche o vetreria tarata, con diluizioni 1:2 in successione;
 - porre le lunghezze d'onda dello spettrofluorimetro ai massimi già verificati di eccitazione e di emissione della clorofilla *a* ($\lambda_{exc} = 430 \text{ nm}$, $\lambda_{ems} = 665 \text{ nm}$);
 - seguendo le stesse modalità di lettura dei campioni, per ciascun substandard eseguire una lettura prima (Fo) e dopo (Fa) acidificazione ;
 - preparare una tabella contenente le diluizioni effettuate, le concentrazioni ottenute, la fluorescenza letta prima (Fo) e dopo (Fa) l'acidificazione ;
 - portare le coppie di valori concentrazione/fluorescenza su un grafico x-y; si noterà una relazione lineare ai bassi valori ed una perdita di linearità ai valori più elevati, causata da fenomeni di autoassorbimento (*self-quenching*) presenti nelle molecole di composti fluorescenti, come le clorofille (Lakowicz, 2006);
 - è necessario che ciascun operatore annoti il limite oltre il quale si perde la linearità per il proprio strumento;
 - qualora i campioni discreti mostrino valori di fluorescenza oltre questo valore, diluire il campione per riportarlo nel *range* di linearità della risposta strumentale.

33.5.2.4 Standardizzazione di routine dopo la misura fluorimetrica dei campioni

- dopo ciascun lotto di analisi, a partire dalla soluzione madre, preparare una serie di 3-5 substandards tramite diluizioni, che cadano entro il range di fluorescenze ottenute dalle letture dei campioni;
- per ciascun substandard eseguire una lettura prima (Fo) e dopo (Fa) acidificazione con HCl.

33.5.2.5 Calcoli delle concentrazioni dei campioni

- calcolare il fattore C, media dei rapporti tra le 3-5 concentrazioni di ogni substandard (Ca) ed i relativi valori di fluorescenza prima dell'acidificazione (Fo) (paragrafo 5.2.4);
- calcolare il fattore R, come media dei rapporti tra Fo e Fa per ciascuno dei 3-5 substandards misurati (paragrafo 5.2.4);
- calcolare le concentrazioni della clorofilla *a* e dei feopigmenti a partire dalle misure del paragrafo 5.2.2, utilizzando le seguenti equazioni proposte da Holm-Hansen *et al.* (1965).

$$\text{Chl } a \text{ } (\mu\text{g l}^{-1}) = R \cdot (R-1)^{-1} \cdot C \cdot (F_o - F_a) \cdot v \cdot V^{-1}$$

$$\text{Feofitina } a \text{ } (\mu\text{g l}^{-1}) = R \cdot (R-1)^{-1} \cdot C \cdot [(R \cdot F_a) - F_o] \cdot v \cdot V^{-1}$$

dove:

- R = Fo/Fa medio;
- C = C(Chl)/Fo medio;
- Fo = fluorescenza del campione tal quale;
- Fa = fluorescenza del campione dopo acidificazione;
- v = volume dell'estratto (ml);
- V = volume di campione filtrato (ml).

33.6 BIBLIOGRAFIA

- ANNING T., MACINTYRE H.L., PRATT S.M., SAMMES P.J., GIBB S., GEIDER R.J. (2000) - Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.*, **45**: 1807–1817.
- BARRETT J., JEFFREY S.A. (1971) - A note on the occurrence of chlorophyllase in marine algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **7**: 255-262.
- BIANCHI F. (1986) - Relazioni fra misure di clorofilla in Adriatico settentrionale. *Arch. Oceanogr. Limnol.*, **20**: 287-292.
- BLASCO D. (1973) – Estudio de las variaciones de la relacion fluorescencia in vivo chl a, y su aplicacion en oceanografia. Influencia de la limitacion de diferentes nutrientes, efecto del dia y noche y dependencia de la especie estudiada. *Inv. Pesq.*, **37**: 533-536.
- BOTO K.G., BUNT J. S. (1978) - Selective excitation fluorometry for the determination of chlorophylls and pheophytins. *Anal. Chem.*, **50**: 392-395.
- FALKOWSKI P.G., RAVEN J. (1997) - *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford: 375 pp.
- GEIDER R.J., MACINTYRE H.L., KANA T.M. (1998) - A dynamic regulatory model of phytoplanktonic acclimation to light, nutrients, and temperature. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 679–694.
- GIBBS C.F. (1979) - Chlorophyll *b* interference in the fluorometric determination of chlorophyll *a* and pheopigments. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, **30**: 597-606.
- HOLM-HANSEN O., LORENZEN C.J., HOLMES R.W., STRICKLAND J.D.H. (1965) - Fluorimetric determination of chlorophyll. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, **30**: 3-15.
- HUMPHREY G.F., JEFFREY S.W. (2005) - Test of accuracy of spectro-photometric equations for the simultaneous determination of chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂. In: Jeffery S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 616-621.
- JEFFREY S.W., HALLEGRAEFF G.M. (1980) - Studies of phytoplankton species and photosynthetic pigments in a warm core eddy of the East Australian Current. II A note on pigment methodology. *Mar. Ecol.*, **3**: 295-301.
- JEFFREY S.W., HUMPHREY G.F. (1975) - New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, **167**: 191-194.
- JEFFREY S.W., WELSCHMEYER N.A. (2005) – Spectrophotometric and fluorometric equations in common use in oceanography. In: Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 597-615.
- KOLBER Z.S., GERALD PLUMLEY F., LANG A.S., BEATTY T.J., BLANKENSHIP R.E., VANDOVER C.L., VETRIANI C., KOBLIZEK M., RATHGEBER C., FALKOWSKI P.G. (2001) - Contribution of Aerobic Photoheterotrophic Bacteria to the Carbon Cycle in the Ocean. *Science*, **292**: 2492-2495.
- LAKOWICZ J. R. (2006) – *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3rd ed. Springer, Berlin: 954 pp.
- LAZZARA L., BIANCHI F., FALCUCCI M., HULL V., MODIGH M., RIBERA D'ALCALÀ M. (1990) - Pigmenti clorofilliani. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera d'Alcalà M. (eds), *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. Nova Thalassia, LINT, Trieste: 207-223.
- LENZ J., FRITSCHÉ P. (1980) - The estimation of chlorophyll *a* in water samples: a comparative study on retention in a glass-fibre and membrane filter and on the reliability of two storage methods. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, **14**: 46-51.
- LOFTUS M.E., CARPENTER J.H. (1971) - A fluorometric method for determining chlorophylls *a*, *b* and *c*. *J. Mar. Res.*, **29**: 319-338.
- LORENZEN C.J. (1967) - Determination of chlorophyll and pheopigments spectro-photometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, **12**: 343-346.
- LORENZEN C.J., JEFFREY S.W. (1980) - Determination of chlorophyll in sea water. *UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci.*, **35**: 1-20.
- LORENZEN C.J., NEWTON-DOWNS J. (1986) – The specific absorption co-efficient of chlorophyllide *a* and pheophorbide *a* in 90 % acetone, and comments on the fluorometric determination chlorophyll and pheopigments. *Limnol. Oceanogr.*, **31**: 449-459.
- MANTOURA R.F.C., WRIGHT S.W., BARLOW R.G., CUMMINGS D.E. (2005) - Filtration and storage of pigments from microalgae. In: Jeffery S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. 2nd ed. SCOR UNESCO, Paris: 283-305.
- MARKER A.F.H., NUSCH E.A., RAI H., RIEMANN B. (1980) - The measurement of photosynthetic pigments

-
- in fresh waters and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, **14**: 91-106.
- MOBERG L., ROBERTSSON G., KARLBERG B. (2001) - Spectrofluorimetric determination of chlorophylls and pheopigments using parallel factor analysis. *Talanta*, **54**: 161-170.
- NEVEUX J. (1979) - Pigments chlorophylliens. In: Jacques G. (ed), *Phytoplankton, Biomasse, Production, Numeration et Culture*. Edition du Castellet, Perpignan: 1-107.
- NEVEUX J., PANOUSE M. (1987) - Spectrofluorimetric determination of chlorophylls and phaeophytins. *Arch. Hydrobiol.*, **109**: 567-581.
- NUSCH E. (1980) - Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, **14**: 14-35.
- PANELLA S., MAGAZZÙ G. (1978) - Analisi dei pigmenti fitoplanctonici. In: Magazzù G. (ed.), *Metodi per lo studio del plancton e della produzione primaria*. Edizioni GM: 19-33.
- RAI H., MARKER A.F.M. (1982) - The measurements of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, **16**: 1-130.
- RIEMANN B. (1978) - Carotenoid interference in the spectrophotometric determination of chlorophyll degradation products from natural population of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **23**: 1059-1066.
- ROBINSON A.L. (1979) - HPLC: the new king of analytical chemistry. *Science*, **203**: 1329-1332.
- STRICKLAND J.D.H., PARSONS T.R. (1968) - A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, **167**: 1-310.
- TREES C.C., BIDIGARE R.R., KARL D.M., VAN HEUKELEM L. (2003) - Fluorometric Chlorophyll *a*: Sampling, Laboratory Methods, and Data Analysis Protocols. In: Muller J.L., Fargion G., McClain C.R. (eds), *Ocean Optics Protocols For Satellite Ocean Color Sensor Validation*, Rev. 5, NASA/TM-2003: 15-25.
- WOOD L.W. (1985) - Chloroform-methanol extraction of chlorophyll *a*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **42**: 38-43.
- YANAGI K., KOYAMA T. (1971) - Thin layer chromatographic method for determining plant pigments in marine particulated matter, and ecological significance of the results. *Geochem. J.*, **5**: 23-37.
- YENTSCH C.S. (1965) - Distribution of chlorophyll and phaeophytine in the open ocean. *Deep Sea Res.*, **12**: 653-666.
- YENTSCH C.S., MENZEL D.W. (1963) - A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytine by fluorescence. *Deep Sea Res.*, **10**: 221-231.

CAPITOLO 34. DETERMINAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DEI PIGMENTI FITOPLANCTONICI MEDIANTE HPLC

C. Brunet , O. Mangoni

christophe.brunet@szn.it

34.1 INTRODUZIONE

La cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*), applicata allo studio dei pigmenti del fitoplancton marino, è stata introdotta, per la prima volta, da Mantoura e Llewellyn (1983) e da Gieskes e Kraay (1983). Il metodo permette di separare e quantificare i pigmenti clorofilliani e quelli accessori (carotenoidi) e, quindi, di valutare l'intero spettro pigmentario, con l'eccezione dei pigmenti idrosolubili (ficobiliproteine). Questa recente metodologia è stata applicata in differenti ecosistemi marini, da quelli oligotrofici a quelli eutrofici costieri (inclusi gli estuari, le lagune e i laghi) oltre che su colture in laboratorio. Attualmente costituisce un'analisi di *routine* in molti laboratori.

Lo spettro pigmentario si è rivelato un valido strumento nello studio dell'ecologia del fitoplancton e può essere impiegato per ottenere indicazioni di diverso tipo. Alcuni carotenoidi sono considerati indicatori chemotassonomici dei principali gruppi algali, altri danno indicazioni sulla fotofisiologia e su eventuali stress fisiologici e i prodotti di degradazione delle clorofille possono essere utilizzati come indicatori di senescenza e di *grazing*.

Nella Tab. 1, sono riportati i principali pigmenti utilizzati come marcatori di gruppi algali e/o di altri processi ecofisiologici.

34.1.1 Indicatori chemotassonomici

Lo spettro pigmentario può essere impiegato come indicatore tassonomico, costituendo una vera e propria "impronta digitale" a diverso livello (Jeffrey e Vesk 1997; Mangoni *et al.*, 2004; Zapata *et al.*, 2004; Rodríguez, 2006; Wright e Jeffrey, 2006, Jeffrey e Wright, 2006; Laza-Martinez *et al.*, 2007; Mangoni *et al.*, 2008). La chemotassonomia non sostituisce l'identificazione al microscopio ottico ma, per la sua rapidità, si è rivelata uno strumento efficace ed integrativo alle metodiche classiche. Inoltre, consente di valutare il contributo della frazione pico-fitoplanctonica (< 2-3 μm , costituita da procarioti e piccoli eucarioti) alla biomassa totale e, associata alla citometria a flusso, permette uno studio approfondito di questa componente (Veldhuis e Kraay 2004; Brunet *et al.*, 2006, 2007).

Negli ultimi anni, si utilizzano dei coefficienti di conversione ottenuti dalla concentrazione del pigmento *marker* tassonomico di un gruppo fitoplanctonico per stimare la biomassa in termini di clorofilla *a* (Chl*a*) del gruppo stesso (Casotti *et al.*, 2000). Inoltre, è stato sviluppato un programma "ChemTax" che utilizza una serie di iterazioni statistiche per stimare il contributo dei differenti gruppi algali. Il vantaggio di un tale programma è il riscontro statistico del risultato, e cioè la possibilità di avere il dato sulla significatività dell'analisi (Wright *et al.*, 1996; Latasa, 2007).

Recentemente, la relazione tra pigmenti e bio-ottica ha aperto nuovi orizzonti per l'utilizzo dei pigmenti su larga scala spaziale attraverso immagini satellitari della biomassa fitoplanctonica permettendo anche la stima dei differenti gruppi funzionali (Sathyendranath *et al.*, 2004; Uitz *et al.*, 2008).

Inoltre, i pigmenti possono aiutare a risolvere problemi di rapporti filogenetici per la caratterizzazione tassonomica di specie poco conosciute e che si presentano come "difficili" all'approccio semplicemente morfologico (Zingone *et al.* 2002, Bergholtz *et al.*, 2006; Mangoni *et al.*, in press, Tomas *et al.*, in press).

Tab. 1 – Pigmenti chemotassonomici delle microalghe da Wright e Jeffrey (2006) modificato.

Pigmento	Significato
Clorofilla <i>a</i> (Chl <i>a</i>)	Indice della biomassa algale, escluso le Prochlorophyta
Markers non ambigui per i gruppi algali	
Divinil-clorofilla <i>a</i> (Div-Chl <i>a</i>)	Indice della biomassa delle Prochlorophyta (associato alla Divinil-Chl <i>b</i>)
Prasinoxantina (Prasino)	Indice delle Prasinophyceae (associata a luteina, neoxantina, Vx e Zx)
Sifonaxantina estere (Siphonax)	Indice delle Prasinophyceae (Chl <i>b</i> , MgDVP, neoxantina)
Peridinina (Perid)	Indice delle Dinophyta (associata alla Chl <i>c</i> ₂ , e Dt)
Alloxantina (Allox)	Indice delle Cryptophyta (associata alla Chl <i>c</i> ₃ , crocoxanthin e monadoxanthin)
Gyroxantina diestere (Gyrox)	Indice di <i>Gymnodinium galatheanum</i> (Dinophyta)
Clorofilla <i>b</i> (Chl <i>b</i>)	Distintiva delle alghe verdi (Chlorophyceae, Prasinophyceae) e delle Euglenophyta. La predominanza di questi gruppi può essere dedotta dalla proporzione relativa degli altri carotenoidi. Alcune Prasinophyceae sono distinguibili per la presenza di siphonaxantina esters e/o prasinoxantina. Le Chlorophyceae e altre Prasinophyceae possono essere identificate dal rapporto tra luteina e Chl <i>b</i> .
Serie delle Clorofilla <i>c</i> (Chl<i>c</i>)	
Distinguono le alghe brune dalle altri gruppi algali	
Chl <i>c</i> ₁	Utilizzata come marker per i popolamenti fitoplanctonici dominate da Bacillariophyceae e Haptophyta contenenti anche Chl <i>c</i> ₃ e Hex.
Chl <i>c</i> ₂	Maggior componente delle Chl <i>c</i> delle alghe brune
Chl <i>c</i> ₃	Componente significativo delle Haptophyta inclusi i coccolitoforidi, <i>Chrysochromulina</i> sp. e <i>Phaeocystis</i> sp. La Chl <i>c</i> ₃ è spesso presente nelle Chrysophyceae (Pelagophyceae) e in alcune Bacillariophyceae (in particolare nella specie tossica <i>Pseudo-nitzschia</i>).
Chl <i>c</i> ₂ –MGDG	Indice di alcune Haptophyta tra cui <i>Chrysochromulina</i> spp.
MgDVP	Indice delle Prasinophyceae, ma presente in molti altri gruppi
Fucoxantina e derivati	
Fucoxantina (Fuco)	Erroneamente considerata come un unico marker per le Bacillariophyceae. È anche presente nelle Haptophyta, in alcune Heterokontophyta (Chrysophyceae, Raphidophyceae) e in qualche Dinophyta.
19'Hexanoiloxifucoxantina (Hex)	Presente nelle Haptophyta (<i>Emiliana huxleyi</i> , <i>Chrysochromulina polylepis</i> , <i>Phaeocystis antarctica</i>) e nella Dinophyta (<i>Gymnodinium galatheanum</i> , in cui è presente anche la Gyrox)
19'Butanoiloxifucoxantina (But)	Chrysophyceae (Pelagophyceae) contengono But, ma non hanno Hex. Limitata alle Haptophyta (es. <i>Phaeocystis antarctica</i>); in altre Haptophyta è presente in tracce (es. <i>Emiliana huxleyi</i> e <i>Chrysochromulina polylepis</i>) e spesso associata con la Hex.
Zeaxantina (Zeax)	Indice delle Cyanophyta. È presente in basse concentrazioni nelle Chlorophyceae, Prasinophyceae, Euglenophyta, Chrysophyceae, Raphidophyceae ed Eustigmatophyta.
Vaucherixantina estere (Vaucheria)	Marker per le Eustigmatophyta
Loroxantina (Lorox)	Componente occasionale delle Chlorophyceae; spesso presente nelle Chlorophyceae antartiche.

34.1.2 Indicatori fotofisiologici

Alcuni carotenoidi danno indicazioni sulla fotofisiologia e su eventuali stress fisiologici cui è soggetto il popolamento algale (Demers *et al.*, 1991; Brunet *et al.*, 1992 e 2003, Mangoni *et al.*, 2009 a e b).

I pigmenti cambiano in risposta alla variazione dell'irradianza (quantità, composizione spettrale e fotoperiodo) al fine di massimizzare la fotosintesi nei differenti campi luminosi sperimentati delle microalghe. Gli aggiustamenti del corredo pigmentario riguardano sia i pigmenti fotosinteticamente attivi (che assorbono la luce e la trasferiscono ai centri di reazione – RCs - del fotosistema II) che i pigmenti fotoprotettori, e cioè quelli che non trasferiscono l'energia ai RCs. I pigmenti delegati alla fotoprotezione sono la diatoxantina (Dt), la diadinoxantina (Dd), la zeaxantina (Zx), il β -carotene (β -car), l'antheraxantina (Ax) e la violaxantina (Vx). Per evitare danni all'apparato fotosintetico in condizioni di elevata intensità luminosa, la maggior parte degli organismi fotoautotrofi hanno sviluppato dei meccanismi di protezione, come ad esempio il cosiddetto "Ciclo delle Xantofille" (CX), che è responsabile del processo di dissipazione del *surplus* di energia noto come *quenching* di fluorescenza non fotochimico (NPQ = *Non-Photochemical fluorescence Quenching*). Il CX è caratterizzato da reazioni enzimatiche di de-epossidazione e epossidazione delle xantofille. Un primo ciclo coinvolge la Vx, la Ax e la Zx e si riscontra nelle Chlorophyta, Phaeophyceae, Eustigmatophyceae e Chrysophyceae; un altro ciclo coinvolge la Dd e la Dt ed è presente nelle Bacillariophyceae, Xanthophyceae, Haptophyta e Dinophyta. Per maggiori dettagli sulla regolazione e il funzionamento del CX, vedere le recenti *reviews* di Lavaud (2007) e Brunet *et al.* (in press).

È importante sottolineare che anche la quantità di clorofilla *a* (Chl*a*) varia con la quantità di luce disponibile nell'ambiente (aumenta in presenza di luce bassa e diminuisce con luce alta) per cui, pur essendo un indicatore di biomassa fitoplanctonica, non è indipendente dalle condizioni di luce e questo aspetto non è da trascurare nell'interpretazione del suo dato quantitativo (vedi Capitolo 33).

34.1.3 Pigmenti di degradazione

I pigmenti degradati possono essere utilizzati come indicatori di *grazing* e, quindi, del trasferimento di carbonio nella rete pelagica dal fitoplancton allo zooplancton. I feoforbidi *a*, pigmenti di degradazione della Chl*a*, sono principalmente sintetizzati dall'azione del pascolo da parte degli erbivori sul fitoplancton (Gieskes *et al.*, 1978; Barlow *et al.*, 1993). La Chl*a*, infatti, sottoposta al pH acido del tubo digerente dello zooplancton e agli enzimi digestivi tende a perdere sia il magnesio che il gruppo fitolo e si trasforma in feoforbide *a*.

A tale proposito, bisogna precisare che esiste una differenza tra l'impatto del meso-zooplancton e del micro-zooplancton sulla degradazione della Chl*a* (Barlow *et al.*, 1993) e sulla senescenza (Brunet *et al.*, 1996; Casotti *et al.*, 2000).

34.2 CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Per la determinazione dello spettro pigmentario, i campioni d'acqua di mare (e/o salmastra, dolce, etc.), in quantità variabile (da 0,5 a 8 l) in relazione alla concentrazione del particolato microalgale, vengono filtrati su filtri di fibra di vetro *GFF Whatman* (diametro 25 o 47 mm). Per la valutazione del contributo delle diverse classi dimensionali, i campioni vengono filtrati, in modo sequenziale, su filtri a membrane di policarbonato con differente porosità. Per maggiori dettagli sulle procedure di filtrazione si rimanda al Capitolo 33.

Dopo la filtrazione, i filtri, posti in crio-vials, vengono rapidamente congelati in azoto liquido, e conservati a -80°C fino al momento delle analisi. Per evitare la degradazione dei pigmenti è consigliabile effettuare le analisi entro 3-5 mesi dalla raccolta dei campioni.

Tutte le operazioni di campionamento, filtrazione ed analisi devono essere effettuate a luce molto bassa, poiché i pigmenti sono fotosensibili e, quindi, fotodegradabili. Questo aspetto costituisce una delle fonti di maggiore errore nell'analisi dei pigmenti.

34.3 METODO E PRINCIPIO DI ANALISI

La separazione dei pigmenti è possibile grazie alla loro differenza di polarità che determina l'affinità tra una fase mobile (solventi d'eluizione) ed una stazionaria (colonna). In pratica, essa è determinata dalla loro differente velocità di attraversamento della colonna (composta da un supporto costituito da silicio e molecole di C18 o C8) che rappresenta la fase stazionaria, mentre la miscela di solventi e di pigmenti, che attraversa la colonna, costituisce la fase mobile. La fase stazionaria è meno polare della fase mobile e, quindi, si parla di HPLC in fase inversa. La polarità della fase mobile varia nel tempo, così i pigmenti adsorbiti sulla fase stazionaria sono eluiti e dunque separati sequenzialmente dalla fase mobile secondo il loro gradiente di polarità. In genere, si utilizza un gradiente di eluzione che permette di diminuire il tempo di ritenzione dei composti meno polari e, conseguentemente, di aumentare la sensibilità del metodo.

Una volta separati, i pigmenti sono rilevati e quantificati secondo le metodologie spettrofotometriche e/o fluorimetriche. Il risultato dell'analisi è un cromatogramma (spettrofotometrico e/o fluorimetrico), in cui la posizione dei picchi sull'asse dei tempi consente di identificare i diversi pigmenti presenti nel campione, mentre dalle aree dei picchi è possibile effettuare la quantificazione. Il cromatogramma ottenuto con un rivelatore spettrofotometrico consente l'identificazione e la quantificazione sia delle clorofille che dei carotenoidi, mentre il cromatogramma in fluorescenza permette l'identificazione solo delle clorofille e dei loro prodotti di degradazione. In Fig. 1 è riportato a titolo di esempio un cromatogramma ottenuto con un rivelatore spettrofotometrico.

Attualmente, i rivelatori spettrofotometrici più accurati sono quelli a diodi (*Diode Array Detector: DAD*) che permettono la determinazione dello spettro di assorbimento di ciascun pigmento; ciò consente, non solo di determinare quantitativamente le clorofille e i carotenoidi, ma anche di valutarne la purezza. In mancanza di un rivelatore spettrofotometrico DAD è consigliabile utilizzare metodi con tempi di analisi più lunghi che limitano la sovrapposizione dei picchi.

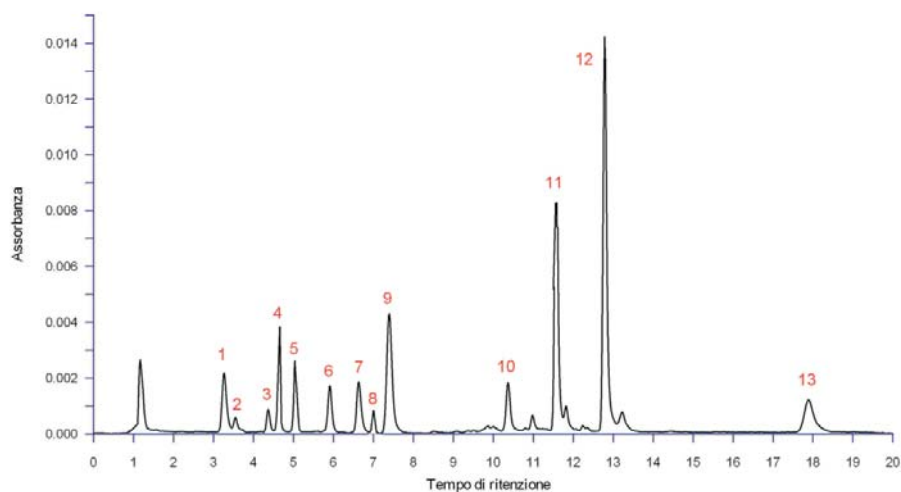
Il gradiente dei solventi, il flusso ed il tempo della corsa (20-40 min) sono caratteristiche del metodo selezionato. È comunque opportuno cercare l'ottimizzazione del metodo per minimizzare il tempo e la quantità di solventi e massimizzare la risoluzione dei pigmenti.

Per le metodologie di analisi applicate all'identificazione dei pigmenti si rimanda ai capitoli 9 e 10 della "Monograph on Oceanographic methodology (Unesco Publishing, Editori: Jeffrey SW, Mantoura RFC e Wright SW, 1997)" (Wright *et al.*, 1997 e Mantoura *et al.*, 1997, rispettivamente).

34.3.1 Strumentazione analitica

In genere, per le analisi dei pigmenti, viene utilizzato un HPLC costituito dai seguenti componenti:

- una pompa (binaria o terziaria o quaternaria) con programmatore di gradienti,
- un sistema di degasaggio dei solventi,
- una colonna per cromatografia in fase inversa (si consiglia una colonna ultrasphere ODS 5 μm , 150 x 4,6 mm oppure Sigma-Aldrich, 3 μm , 100x4,6 mm),
- un rivelatore spettrofotometrico a diodi (DAD) settato a 440 nm per la determinazione delle clorofille e dei carotenoidi (per ogni picco è possibile determinare lo spettro di assorbimento, specifico di ciascun pigmento, compreso tra 350 e 750 nm),
- un rivelatore spettrofluorimetrico con la lunghezza d'onda di eccitazione a 410 nm e di emissione tra 420-700 nm per l'identificazione dei prodotti di degradazione delle clorofille.



N° picco	Pigmenti e abbreviazioni
1	clorofilla c_1+c_2 (Chlc)
2	peridinina (Perid)
3	19'butanoiloxifucoxantina (But)
4	fucoxantina (Fuco)
5	19'esanoiloxifucoxantina (Hex)
6	diadinoxantina (Dd)
7	alloxantina (Allo)
8	diatoxantina (Dt)
9	zeaxantina (Zx)
10	cantaxantina (Cantha)
11	clorofilla b (Chlb)
12	clorofilla a (Chla)
13	β,β -carotene (β -car)

Fig. 1 - Cromatogramma in assorbanza di 13 pigmenti standard. La posizione dei picchi sull'asse dei tempi consente di identificare i diversi pigmenti.

34.3.2 Trattamento del campione

Per l'estrazione dei pigmenti i filtri vengono immersi in metanolo al 100%; il filtro in fibra di vetro viene tritato ed omogeneizzato manualmente con una bacchetta di vetro smerigliata per un massimo di 2 minuti, sciacquando più volte la bacchetta. È possibile eseguire anche una triturazione mediante *potter*, ma questo determina un possibile riscaldamento dell'estratto con conseguente degradazione dei pigmenti (per maggiori dettagli vedi Capitolo 33). Nel caso di membrane in polycarbonato, il filtro deve essere tagliato in piccoli pezzetti, facendo molta attenzione che non vada perso nemmeno un frammento e sciacquando la forbicina con metanolo più volte. I frammenti devono poi essere pestati con una bacchetta di vetro e lasciati al buio per almeno 3- 5 min per completare l'estrazione. Successivamente, l'estratto viene filtrato su filtro *GFF Whatman* (diametro 25 mm) e il volume recuperato e quantificato con siringhe di precisione.

Il campione viene iniettato nell'apposito *loop* dello strumento utilizzando una siringa con ago a punta piatta. L'utilizzo dell'ago a punta piatta è indispensabile per evitare il danneggiamento delle parti interne dell'iniettore.

In molti metodi, prima dell'iniezione, al campione viene aggiunta una soluzione di acetato d'ammonio, per migliorare la capacità di separazione dei pigmenti (vedi ad esempio Vidussi *et al.*, 1996).

34.4 CALCOLI E STANDARDIZZAZIONE

L'area del picco viene trasformata in peso di pigmento, grazie a un coefficiente di calibrazione ottenuto dalla standardizzazione dello strumento con pigmenti standard.

In Europa una delle aziende produttrici di una larga gamma di pigmenti è la ditta International Agency for ¹⁴C Determination, VKI Water Quality Institute. I pigmenti standard vengono analizzati, con lo stesso metodo adottato per i campioni naturali; per ogni singolo pigmento sono calcolate le rette di calibrazione dalle correlazioni tra le aree dei picchi e le quantità in peso del pigmento iniettato (Fig. 2). I coefficienti ottenuti per ogni singolo pigmento sono utilizzati per calcolare la concentrazione dei pigmenti dei campioni naturali a partire dalle aree dei cromatogrammi. Questa procedura è riportata in modo esteso da Mantoura e Repeta (1997).

Dal peso di pigmento si ricava la concentrazione per unità di volume applicando una formula che prende in considerazione il volume filtrato e la diluizione del campione. Il calcolo della concentrazione di pigmento da un campione d'acqua si ricava dalla formula:

$$C_p = \frac{(\text{Area del picco} \times \text{coefficiente specifico del pigmento} \times \text{Vol estratto})}{(\text{Vol iniettato} \times \text{Vol filtrato})}$$

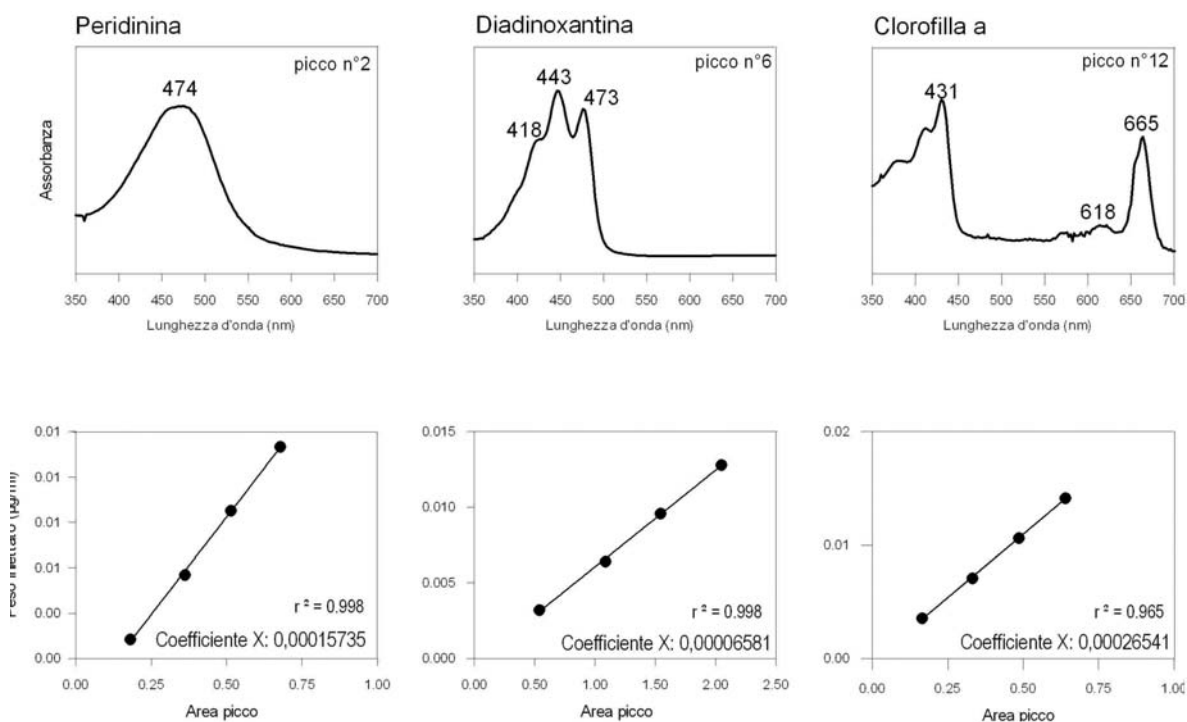


Fig. 2 – Spettri di assorbimento e rette di calibrazione di alcuni pigmenti utilizzati per la calibrazione dell'HPLC.

34.5 LIMITI, RACCOMANDAZIONI E SVILUPPO

La possibilità di separare e determinare quali-quantitativamente i pigmenti fotosintetici rappresenta uno dei vantaggi del metodo HPLC. È da tener presente che le tecniche spettrofotometriche e spettrofluorimetriche, senza avere a monte la cromatografia liquida analizzano miscele di pigmenti, le cui interazioni non consentono un'accurata determinazione quantitativa. Infatti, le formule di calcolo riportate in letteratura sono empiriche e costruite sulla base di una composizione media delle comunità fitoplanctoniche, che obiettivamente, è difficilmente ritrovabile in natura.

Non esiste un unico metodo HPLC, alcuni sono più efficienti per la separazione di alcuni pigmenti rispetto ad altri. Per cui, è importante utilizzare i metodi "più adatti" all'ambiente nel quale si conducono le indagini. Ad esempio le aree oligotrofiche sono caratterizzate in prevalenza da pico-fitoplancton, in cui il contributo delle Cyanophyta e Prochlorophyta è rilevante; in questo caso, bisogna prediligere un metodo che consente di separare la Zx dalla Luteina (Lut) e la divinil-clorofilla-a dalla Chla, che costituiscono i pigmenti distintivi di *Synechococcus* e *Prochlorococcus*, rispettivamente. Per questo ultimo aspetto, tra i metodi disponibili in letteratura, possiamo citare quello di Vidussi *et al.* (1996).

Bisogna comunque tener presente che si può incorrere in un certo numero di errori facendo ricorso generalizzato ed acritico dei pigmenti diagnostici come indicatori chemotassonomici. Infatti, molti carotenoidi sono comuni a diversi gruppi algali, anche se in quantità differenti. Ad esempio, la Fucoxantina (Fuco) è il pigmento distintivo delle Bacillariophyceae, ma non esclusivo; molti membri della divisione delle Heterokontophyta contengono la Fuco, incluse le Chrysophyceae e le Raphidophyceae, le Dytiochophyceae e le Haptophyta (Schluter e Havskum, 1997). La 19'exanoiloxifucoxantina (Hex) è il pigmento distintivo delle Haptophyta, ma è presente anche in alcune Dinophyta.

Inoltre, quando si studiano popolamenti fitoplanctonici naturali con l'obiettivo di avere informazioni sul contributo dei diversi gruppi tassonomici, i pigmenti *marker* tassonomici, non sono valutati come quantità assolute, ma sempre in rapporto alla concentrazione del pigmento principale, la Chla. Quest'ultima, infatti, è presente in tutti i gruppi ed è, come ampiamente indicato nei capitoli precedenti, un *proxy* della biomassa fitoplanctonica totale. Dal momento che la quantità di Chla può variare in base al diverso stato fisiologico in molti casi si preferisce utilizzare il rapporto di ciascun pigmento rispetto alla somma di tutti i pigmenti diagnostici presenti. Un altro approccio, già descritto nel par.1.1, è basato sull'utilizzo del ChemTax.

Recentemente per verificare la riproducibilità della tecnica e soprattutto il grado di variabilità e di errore tra i diversi metodi è stato condotto uno studio internazionale che ha coinvolto diversi laboratori. In pratica campioni di diversi ambienti sono stati raccolti in repliche ed analizzati simultaneamente, ma con metodi diversi nei laboratori coinvolti (Claustre *et al.*, 2004).

Infine, per una critica comparata dei diversi metodi che si basano sulla determinazione dei pigmenti si rimanda a Lazzara *et al.*, 2009 stesso volume.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dott. Vincenzo Saggiomo per la revisione critica del manoscritto.

34.6 BIBLIOGRAFIA

- BARLOW R.G., MANTOURA R.F.C., GOUGH M.A., FILEMAN T.W. (1993) - Phaeopigment distribution during the 1990 spring bloom in the North Eastern Atlantic. *Deep Sea Res. II*, **40**: 2229-2242.
- BERGHOLTZ T., DAUGBJERG N., MOESTRUP Ø., FERNÁNDEZ-TEJEDOR M. (2006) - On the identity of *Karlodinium veneficum* and description of *Karlodinium armiger* sp. nov. (Dinophyceae), based on light and electron microscopy, nuclear-encoded LSU rDNA, and pigment composition. *J. Phycol.*, **42**: 170-193.
- BRUNET C., BRYLINSKY J.M., FRONTIER S. (1992) - Productivity, photosynthetic pigments and hydrology in the coastal front of the Eastern English Channel. *J. Plankton Res.*, **14**: 1541-1552.

-
- BRUNET C., DAVOULT D., CASOTTI R. (1996) - Physiological reactions to a change in light regime in cultured *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): implications to estimation of phytoplankton biomass. *Hydrobiologia*, **333**: 87-94.
- BRUNET C., CASOTTI R., ARONNE B., VANTREPOTTE V. (2003) - Measured photophysiological parameters used as tools to estimate vertical water movements in the coastal Mediterranean. *J. Plankton Res.*, **25**: 1413-1425.
- BRUNET C., CASOTTI R., VANTREPOTTE V., CORATO F. e CONVERSANO F. (2006) - Picophytoplankton diversity and photophysiology in the Strait of Sicily (Mediterranean Sea) in summer. I. Mesoscale variations. *Aquatic Microb. Ecol.*, **44**: 127-141
- BRUNET C., CASOTTI R., VANTREPOTTE V., CONVERSANO F. (2007) - Vertical variability and diel dynamics of picophytoplankton in the Strait of Sicily (Mediterranean Sea) in summer. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **346**: 15-26.
- BRUNET C., JOHNSEN G., LAVAUD J., ROY S. (in stampa) - *Pigments and photoacclimation processes. Phytoplankton pigments in Oceanography*, Vol. 2, Unesco.
- CASOTTI R., BRUNET C., ARONNE B., RIBERA D'ALCALÀ M. (2000) - Mesoscale features of phytoplankton and planktonic bacteria in a coastal area as induced by external water masses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **195**: 15-27.
- CLAUSTRE H., HOOKER S.B., VAN HEUKELEM L., BERTHON J.-F., BARLOW R., RAS J., SESSIONS H., TARGA C., THOMAS C.S., VAN DER LINDE D., MARTY J.-C. (2004) – An intercomparison of HPLC phytoplankton pigment methods using *in situ* sample: application to remote sensing and database activities. *Mar. Chem.*, **85**: 41-61.
- DEMERS S., ROY S., GAGNON R., VIGNAULT C. (1991) - Rapid light-induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae) a photo-protection mechanism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **76**: 185-193.
- GIESKES W.W.C., KRAAY G W, TIJSEN S.B. (1978) - Chlorophylls and their degradation products in the deep pigment maximum layer of the Tropical north Atlantic. *Neth. J. Sea Res.*, **12**: 195-204.
- GIESKES W.W.C., KRAAY G.W. (1983) - Dominance of Cryptophyceae during the phytoplankton spring bloom in the central North Sea detected by HPLC analysis of pigments. *Mar. Biol.*, **75**: 179-185
- JEFFREY S.W., VESK M. (1997) - Introduction to marine phytoplankton and their pigment signatures In: Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Wright, S.W. (eds), *Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods*, UNESCO Paris: 37–84.
- JEFFREY S.W., WRIGHT S.W. (2006) - Photosynthetic pigments in marine microalgae: insights from cultures and the sea. In: Subba Rao D.V. (ed), *Algal cultures, analogues of blooms and applications*. Science Publishers, Enfield: 33–90.
- LATASA M. (2007) - Improving estimations of phytoplankton class abundances using CHEMTAX. *Mar Ecol. Prog. Ser.*, **329**: 13-21.
- LAVAUD J. (2007) - Fast regulation of photosynthesis in diatoms: Mechanisms, Evolution and Ecophysiology. *Funct. Plant Sci. Biotech.* **1**: 267-287.
- LAZA-MARTINEZ A., SEOANE S., ZAPATA M., ORIVE E. (2007) - Phytoplankton pigment patterns in a temperate estuary: from unialgal cultures to natural assemblages. *J. Plankton Res.*, **29**: 913-929.
- MANGONI O., MODIGH M., CONVERSANO F., CARRADA G.C., SAGGIOMO V. (2004) - Effects of summer ice coverage on phytoplankton assemblages in the Ross Sea, Antarctica. *Deep Sea Res. I*, **51**: 1601-1617.
- MANGONI O., MODIGH M., MOZETIC P., BERGAMASCO A., RIVARO P., SAGGIOMO V. (2008) - Structure and photosynthetic properties of phytoplankton assemblages in a highly dynamic system, the Northern Adriatic Sea. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **77**: 633-644.
- MANGONI O., CARRADA G.C., MODIGH M., CATALANO G., SAGGIOMO V. (2009 a) - Photoacclimation in Antarctic bottom ice algae: an experimental approach. *Polar Biol.*, **23**: 325-335.
- MANGONI O., SAGGIOMO M., MODIGH M., CATALANO G., ZINGONE A., SAGGIOMO V. (2009 b) - The role of platelet ice microalgae in seeding phytoplankton blooms in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica): a mesocosm experiment. *Polar. Biol.*, **23**: 311-323.
- MANGONI O., IMPERATORE C., TOMAS C.R., COSTANTINO V., SAGGIOMO V., MANGONI A. (in stampa) - Moraxanthin, a species-specific carotenoid of the newly described toxic alga *Chloromorium toxicum* (Raphidophyceae). *J. Nat. Prod.*
- MANTOURA R.F.C., LLEWELLYN C.A. (1983) - The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid

-
- pigments and their breakdown products in natural waters by reverse phase HPLC. *Anal. Chem. Acta*, **151**: 297-314.
- MANTOURA R.F.C., WRIGHT S.W., JEFFREY S.W., BARLOW R.G., CUMMINGS D.E. (1997) – Filtration and storage of pigments from microalgae. In: Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. Guidelines to Modern Methods, UNESCO, **10**: 283-305.
- RODRÍGUEZ F., CHAUTON M., JOHNSEN G., ANDRESEN K., OLSEN L.M., ZAPATA M. (2006) - Photo-acclimation in phytoplankton: implications for biomass estimates, pigment functionality and chemotaxonomy. *Mar. Biol.*, **148**: 963–97.
- SATHYENDRANATH S., WATTS L., DEVRED E., PLATT T., CAVERHILL C., MAASS H. (2004) - Discrimination of diatoms from other phytoplankton using ocean-colour data. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **272**: 59-68.
- SCHLUTER L., HAVSKUM H. (1997) - Phytoplankton pigments in relation to carbon content in phytoplankton communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **155**: 55-65.
- TOMAS C.R., MANGONI O., STUERCKE B., MISNER I., WHEREAT E. (in stampa) - *Chloromorium toxicum* gen. et sp. nov. (Raphidophyceae, Heterokonta) - A new toxic flagellate species from U.S. coastal waters. *J. Phycol.*
- UITZ J., HUOT Y., BRUYANT F., BABIN M., CLAUSTRE H. (2008) - Relating phytoplankton photophysiological properties to community structure on large scales. *Limnol. Oceanogr.*, **53**: 614-630.
- VELDHUIS M.J., KRAAY G.W. (2004) - Phytoplankton in the subtropical Atlantic Ocean: towards a better assessment of biomass and composition. *Deep Sea Res. I*, **51**: 507-530.
- VIDUSSI F., CLAUSTRE H., BUSTILLOS-GUZMAN J., CAILLIAU C., MARTY J.-C. (1996) - Determination of chlorophylls and carotenoids of marine phytoplankton: separation of chlorophyll a from divinyl-chlorophyll a and zeaxanthin from lutein. *J. Plankton Res.*, **18**: 2377-2382.
- WRIGHT S.W., THOMAS D.P., MARCHANT H.J., HIGGINS H.W., MACKEY M.D., MACKEY D.J. (1996) - Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean: comparisons of microscopy and size frequency data with interpretations of pigment HPLC data using the CHEMTAX matrix factorisation program. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **144**: 285-298.
- WRIGHT S.W., JEFFREY S.W., MANTOURA R.F.C. (1997) – Evaluation of methods and solvents for pigment extraction. In: Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W. (eds), *Phytoplankton Pigments in Oceanography*. Guidelines to Modern Methods, UNESCO, **9**: 261-282.
- WRIGHT S.W., JEFFREY S.W. (2006) - Pigment markers for phytoplankton production. In: Volkman J.K. (ed), *Marine Organic Matter: Biomarkers, Isotopes and DNA*. Springer-Verlag, Berlin: 71–104.
- ZAPATA M., JEFFREY S.W., WRIGHT S.W., RODRÍGUEZ F., GARRIDO J.L., CLEMENTSON L. (2004) - Photosynthetic pigments in 37 species (65 strains) of Haptophyta: implications for oceanography and chemotaxonomy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **270**: 83–102.
- ZINGONE A., BORRA M., BRUNET C., FORLANI G., KOOISTRA W.H.C.F, PROCACCINI G. (2002) - The phylogenetic position of *Crustomastix stigmatica* sp. nov. and *Dolichomastix tenuilepis* in relation with the Mamiellales (Prasinophyceae, Chlorophyta). *J. Phycol.* **38**: 1024-1039.

CAPITOLO 35. MISURE SPETTRALI DI ASSORBIMENTO E FLUORESCENZA *IN VIVO* DEL FITOPLANCTON

L. Massi, L. Lazzara

luca.massi@unifi.it

35.1 INTRODUZIONE

Le tecniche per le misure di assorbimento e fluorescenza *in vivo* proposte consentono di determinare le principali proprietà spettrali del fitoplancton. Uno degli aspetti cruciali, in comune alle due misure, consiste nel fornire risultati che approssimano al meglio i reali valori *in vivo* di queste grandezze. Infatti, sia l'assorbimento che la fluorescenza del fitoplancton sono molto sensibili alle condizioni ambientali ed ai possibili artefatti di misura, perciò è necessario operare con la minima invasività, nel caso della fluorescenza o con robusti protocolli di misura valutati nel corso del tempo, nel caso dell'assorbimento.

Entrambe le tecniche posseggono una elevata sensibilità così da rendere possibile le misure anche negli ambienti più oligotrofici; per la fluorescenza l'alta sensibilità è legata alla misura diretta di un flusso fotonico piuttosto che ad un rapporto tra due flussi, e per l'assorbimento con il metodo *filter-pad* può essere raggiunta semplicemente aumentando i volumi di acqua filtrata.

Sia l'assorbimento che la fluorescenza del fitoplancton sono proprietà fondamentali anche in relazione agli studi di produzione primaria in mare (Lazzara, 1995; Kromkamp e Foster, 2003). In un recente lavoro Marra *et al.* (2008) affermano che le variazioni di produzione primaria sono più strettamente correlate con le misure dell'assorbimento fitoplanctonico, che con quelle di clorofilla *a* totale.

Entrambe le proprietà sono stimabili negli strati superficiali dei corpi idrici, utilizzando sensori ottici remoti, attivi nel caso della fluorescenza e passivi per l'assorbimento. Si tratta perciò di misure utili e necessarie allo sviluppo ed affinamento delle metodiche di telerilevamento delle risorse biologiche marine (Mueller *et al.*, 2002).

Infine va sottolineato, che negli studi di bio-ottica marina un opportuno completamento alle misure oggetto di questa descrizione è costituito dalle misure di irradianza *in situ*, di queste una trattazione approfondita sia dal punto di vista teorico che metodologico è riportata in Innamorati (1990) che evidenzia in particolare le relazioni fra proprietà ottiche apparenti, generalmente misurate *in situ*, e proprietà ottiche inerenti.

35.2 ASSORBIMENTO

Per comprendere i processi fotobiologici nelle acque naturali ed interpretarne le variazioni di colore (riflettanza spettrale) è essenziale la misura dell'assorbimento della radiazione visibile (PAR) ed in particolare quello della componente fitoplanctonica. La misura della frazione di PAR assorbita è di fondamentale importanza per la valutazione della produzione primaria degli ecosistemi acquatici. Solitamente in acqua la radiazione visibile risulta profondamente alterata (quantitativamente e spettralmente) rispetto a quella solare, tanto da risultare limitante per la fotosintesi. La disponibilità luminosa e le sue caratteristiche spettrali sono variabili e dipendono dalla composizione del mezzo acquoso e dalla profondità. Gli organismi vegetali che vivono in questi ambienti hanno molto ampliato, durante il processo evolutivo, la loro dotazione pigmentaria, differenziando nei diversi gruppi algali il contenuto pigmentario e quindi le caratteristiche spettrali dell'assorbimento.

Il coefficiente di assorbimento misurabile nei vari punti di un corpo d'acqua naturale è una proprietà ottica inerente che risulta dalla somma dei contributi di ognuno dei suoi componenti otticamente attivi: $a(\lambda) = a_w(\lambda) + a_p(\lambda) + a_y(\lambda)$; dove a_w è l'assorbimento dell'acqua, a_y è quello della sostanza organica di-

sciolta colorata (sostanza gialla o gilvina), a_p è l'assorbimento delle sostanze particellate ($a_p(\lambda) = a_{ph}(\lambda) + a_{NAP}(\lambda)$) ed è costituito dalla somma di quello fitoplanctonico a_{ph} e di quello, a_{NAP} , del particellato non algale (*non algal particles*, NAP). Il NAP nelle acque di caso 1 (Morel, 1988) è prevalentemente di natura organica ed è chiamato detrito (*detritus*), mentre in quelle di caso 2 spesso è prevalente la frazione inorganica ed è designato come sedimento in sospensione (*suspended sediments* o *suspended mineral*).

L'assorbimento *in vivo* del fitoplancton risulta assai differente dalla semplice somma degli assorbimenti in soluzione dei vari pigmenti presenti. Infatti questi nelle strutture cellulari modificano le loro proprietà ottiche, sia spostando i massimi di assorbimento verso le lunghezze d'onda maggiori (Bidigare *et al.*, 1990), sia riducendo la somma dei loro assorbimenti in maniera variabile in relazione a dimensioni e forme cellulari e alle concentrazioni intracellulari degli stessi. Questi effetti sono determinati dalle modalità con cui i pigmenti si associano all'interno delle cellule fitoplanctoniche e consistono nel cosiddetto "package-effect" (Duysens, 1956; Morel e Bricaud, 1981).

35.2.1 Principio del metodo

Le sospensioni fitoplanctoniche sono otticamente più complesse delle soluzioni, in quanto oltre ad assorbire la luce la diffondono (Duntley, 1942), così la legge di Lambert-Beer non può essere applicata semplicemente come nelle soluzioni. Le misure spettrofotometriche di densità ottica in assetto standard (*absorbance* o *optical density*, $A = \log(I/T)$) delle sospensioni si riferiscono ad una grandezza intermedia fra assorbimento e attenuazione (la somma di assorbimento e diffusione) in relazione all'angolo di accettazione e alla distanza fra cuvetta e detector dello spettrofotometro usato. Per meglio stimare l'assorbimento occorre: 1) convogliare verso il detector quanti più fotoni possibile, per esempio avvicinando il detector al campione (Privoznik *et al.*, 1978); 2) utilizzare un vetro diffusore (Shibata *et al.*, 1954) per rendere omogeneamente diffuso il flusso in uscita, e raccoglierne una frazione per il tutto.

Nella maggior parte dei casi la concentrazione fitoplanctonica nei campioni naturali è largamente insufficiente per una misura diretta (e quindi auspicabile) dell'assorbimento sulla sospensione, così l'approccio più utilizzato per effettuare le misure di assorbimento del fitoplancton prevede di concentrare su un filtro il particellato marino di cui fa parte il fitoplancton (Yentsch, 1957). Il filtro così ottenuto consente di effettuare misure allo spettrofotometro anche nelle acque marine più oligotrofiche. Inoltre Yentsch (1962) ha mostrato che il filtro stesso può essere utilizzato come diffusore.

Le differenti proprietà diffusive dei campioni dovute alla loro concentrazione, alle dimensioni, al contenuto pigmentario ed all'indice di rifrazione possono generare errori nelle misure di assorbimento del particellato e del fitoplancton. Questi errori possono essere fortemente ridotti facendo le misure di trasmittanza (*transmittance*, $T = I_t / I_0$ e cioè il rapporto fra il flusso radiante trasmesso e quello incidente) con uno spettrofotometro munito di sfera integratrice che consente di raccogliere tutti i fotoni diffusi (Geider e Osborne, 1992; Kirk, 1994). Inoltre, l'utilizzo di sfere integratrici che permettano di effettuare sia misure di trasmittanza che di riflettanza (*reflectance*, $R = I_r / I_0$ e cioè il rapporto fra il flusso radiante retrodiffuso e quello incidente) ed ottenere l'assorbanza (*absorbance*, $\alpha = I_a / I_0$ e cioè il rapporto fra il flusso radiante assorbito e quello incidente) consente di effettuare misure di assorbimento tenendo in debito conto gli effetti della retrodiffusione dell'insieme particellato + filtro (metodo *T-R*, Tassan e Ferrari, 1995). Questi effetti possono essere molto importanti sia nelle acque oligotrofiche, dove è significativa la presenza di picoplancton, che in quelle di caso 2 ricche di sedimenti in sospensione.

Il confronto quantitativo fra le misure effettuate sul particellato concentrato sui filtri e quelle effettuate direttamente su sospensione ha evidenziato che le prime risultano circa doppie, e quindi la necessità di una loro correzione. La differenza è relativa all'amplificazione del cammino ottico (fattore β) legato all'elevata probabilità di diffusioni multiple che si verificano a causa dell'introduzione nelle misure di un mezzo fortemente diffondente come i filtri in fibra di vetro (Butler, 1962; Kiefer e SooHoo, 1982). Il fattore β in realtà risulta variabile in relazione alla composizione del particellato e del fitoplancton ed in particolare rispetto alle loro dimensioni prevalenti (β maggiore con dimensioni minori). Recentemente

è stato introdotto un metodo che aggira questo problema trasferendo il particellato raccolto sul filtro su un vetrino da microscopia sul quale viene analizzato (Allali *et al.*, 1995). Senza la forte diffusione dei filtri vengono meno i problemi derivanti dall'amplificazione del cammino ottico e gli assorbimenti ottenuti sono comparabili con quelli delle sospensioni.

La stima dell'assorbimento del fitoplancton non può essere effettuata senza una distinzione della frazione fitoplanctonica dal resto del particellato. Questo problema di notevole interesse ecologico e biogeochimico è stato affrontato con varie metodologie principalmente di tipo chimico e matematico (Kishino *et al.*, 1985; Bricaud e Stamski, 1990; Cleveland e Perry, 1994). Attualmente la più utilizzata è quella chimica che prevede misure di assorbimento del particellato totale da effettuare prima e dopo l'estrazione dei pigmenti fitoplanctonici in metanolo (Kishino *et al.*, 1985). Lo spettro di assorbimento del fitoplancton è ottenuto per differenza. L'estrazione pigmentaria può essere incompleta o parziale, come nel caso dei pigmenti idrosolubili. Queste evenienze si configurano come un incremento dell'assorbimento della frazione non fitoplanctonica rispetto alla fitoplanctonica. In alternativa può essere utilizzato per depigmentare le cellule fitoplanctoniche l'ipoclorito di sodio (NaClO), che risulta efficace sia sui pigmenti liposolubili che sugli idrosolubili (Tassan e Ferrari, 1995), ma richiede una elevata accortezza nei dosaggi del cloro in relazione alla quantità di fitoplancton. In realtà questi metodi mantengono qualche ambiguità riguardo sia all'assorbimento del particellato depigmentato che include quello delle strutture cellulari residue e viene fatto coincidere con quello del *NAP*, sia per una possibile incertezza sull'assorbimento del fitoplancton ottenuto per differenza che include quello dei feoforbidi presenti nelle *fecal pellets*.

Ad oggi una notevole attività di ricerca è stata sviluppata in questo campo tanto da mettere a punto robusti protocolli che consentono di ottenere stime abbastanza accurate dell'assorbimento del fitoplancton e della frazione particellata non fitoplanctonica (Mitchell *et al.*, 2000; Mitchell *et al.*, 2002).

Le procedure per la misura dell'assorbimento del fitoplancton di seguito riportate, che in parte differiscono da quelle dei citati protocolli, sono risultate, sulla base dell'esperienza (Massi *et al.*, 1997; Maselli *et al.*, 2009), una sintesi accettabile fra il rigore teorico e la semplificazione pratica.

Un'alternativa al metodo di misura dell'assorbimento del fitoplancton proposto e di seguito descritto può essere quella della ricostruzione dello spettro di assorbimento basata sulla conoscenza del contenuto pigmentario ottenuto con analisi HPLC (Bidigare *et al.*, 1990). Questa tecnica risulta certamente vantaggiosa per la sua semplicità e per la sua precisione nell'includere solo i pigmenti fitoplanctonici, ma poiché le misure non sono effettuate con i pigmenti collocati nelle strutture cellulari intatte non tiene conto del *package-effect*, che è una importante fonte di variabilità (Bricaud *et al.*, 1995) e generalmente non fornisce una realistica quantificazione dell'assorbimento *in vivo*.

Attualmente per le misure di assorbimento totale, sono anche disponibili strumenti capaci di effettuare misure spettrali di assorbimento *in situ* anche in ambienti oligotrofici. Il più conosciuto è la sonda ac-9 (WetLabs) che possiede due tubi di misura a luce collimata, uno con le pareti a riflessione interna per le misure di assorbimento, mentre l'altro è del tipo a pareti oscurate per misure di attenuazione. Le misure sono effettuate su 9 lunghezze d'onda selezionate con filtri interferenziali. Inoltre sono disponibili altri nuovi strumenti come a-Sphere (HobiLabs) con cui le misure di assorbimento ad alta risoluzione spettrale sono effettuate in una sfera integratrice dove viene pompata l'acqua marina.

35.2.2 Metodo

35.2.2.1 Materiale occorrente

- Bottiglie in plastica scure con capacità da 1 a 6 l, tubi in tygon® Ø 6-8 mm
- Filtri Whatman GF/F™ Ø 25 mm, filtri Nuclepore PC porosità 0,2 µm, Ø 25 o 47 mm
- Vetreria da laboratorio, cilindri graduati, pipette ecc.
- Apparato di filtrazione con pompa a vuoto regolabile, trappola
- Pinzette per filtri, capsule porta filtri

-
- Spettrofotometro con sfera integratrice per misure di trasmittanza e riflettanza
 - Metanolo puro per analisi
 - Azoto liquido, congelatore -80 °C, frigorifero

35.2.2.2 Schema delle operazioni

Filtrazione

I campioni di acqua marina raccolti usando bottiglie tipo Niskin e trasferiti immediatamente tramite tubi puliti in tygon® in recipienti oscurati, puliti ed avvinati devono essere velocemente filtrati su filtri in fibra di vetro Whatman GF/F™ (porosità nominale di 0,7 µm) Ø 25 mm. Questi filtri prima della loro utilizzazione vanno imbibiti in acqua di mare filtrata (0,2 µm) per almeno 30 minuti per favorire un'omogenea sedimentazione del particellato.

Per ottimizzare le misure spettrofotometriche e facilitare la correzione del fattore di amplificazione del cammino ottico, le densità ottiche del particellato sui filtri devono essere superiori (perlomeno sui massimi) di 0,2-0,3 (Bricaud e Stramski, 1990; Mitchell, 1990); sono inoltre da evitare anche concentrazioni di particellato che determinano densità ottiche superiori di 0,5 – 0,6. Per questo volumi variabili di acqua marina (da qualche ml fino a 5-6 l) devono essere filtrati in relazione al loro contenuto di particellato.

È necessario fare attenzione alla faccia del filtro dove viene fatto sedimentare il particellato ed usare sempre la stessa sia per i campioni che per i bianchi (si consiglia quella a trama meno regolare che generalmente è la faccia concava). Le due facce dei filtri GF/F presentano proprietà filtranti analoghe, ma caratteristiche ottiche leggermente differenti.

La procedura di filtrazione deve avvenire secondo le indicazioni riportate in Lazzara *et al.* (vedi Capitolo 33) e comunque sempre a luce soffusa, con deboli depressioni (max 150 mm Hg), senza fare andare a secco il filtro ed interrompendo prontamente il vuoto al termine. A filtrazione conclusa, oltre che prendere nota del volume di acqua marina filtrata, occorre conoscere la superficie del filtro dove si è depositato il particellato. Questa può essere calcolata dal diametro dell'apparato di filtrazione che deve essere accuratamente misurato. È necessario inoltre che questo diametro risulti sufficientemente più grande di quello delle finestre di misura della sfera integratrice che si intende usare.

Dopo la filtrazione, le misure spettrofotometriche devono essere effettuate più velocemente possibile per evitare artefatti dovuti alla rapida decomposizione pigmentaria che può avvenire sul filtro (Stramski, 1990). Quando questo non è possibile, il filtro deve essere posto su una apposita capsula Petri (es. Milipore™ o Pall-Gelman™) e subito messo in congelatore a -80°C o meglio immerso in azoto liquido con contenitori adeguati (es. capsule Fisher Histoprep™). In queste condizioni il campione può essere conservato anche per un periodo prolungato (massimo alcuni mesi).

In ogni sessione giornaliera di misure devono essere predisposti alcuni filtri bianchi di riferimento. Questi filtri devono essere utilizzati per filtrare, sugli stessi apparati, acqua marina precedentemente filtrata su membrane di 0,2 µm e saranno trattati prima e dopo la filtrazione esattamente come i campioni. I bianchi ed i campioni della stessa sessione di filtrazione devono essere letti allo spettrofotometro nella stessa sessione di misure.

Misure allo spettrofotometro

La bontà delle misure spettrofotometriche con la sfera integratrice dipendono sia dalle condizioni dello standard di diffusione con cui vengono calibrate, sia da quelle delle pareti della sfera (entrambi rivestiti con sostanze diffondenti quali ad es. BaSO₄ o Spectralon®). Occorre quindi controllare periodicamente l'efficienza della sfera che con l'età diminuisce, seguendo le procedure suggerite dal costruttore.

I filtri congelati devono essere scongelati al buio ed inumiditi per almeno 30 minuti con alcune gocce di acqua marina filtrata (0,2 µm). Siccome le proprietà ottiche dei filtri dipendono anche dal loro grado di idratazione è necessario assicurarsi che tutti i campioni siano completamente ed omogeneamente idratati per tutto il tempo necessario allo svolgimento delle misure. A questo proposito anche disponendo di sfere

integratrici che consentano di effettuare misure dei campioni contro i bianchi, è preferibile effettuare le due misure separatamente, in quanto i bianchi usati come riferimento per più campioni possono disidratarsi con il tempo ed alterare le loro proprietà ottiche. Inoltre, durante le misure si consiglia di orientare i filtri sempre allo stesso modo, sfruttando a questo fine la trama abbastanza regolare della faccia non utilizzata.

Le misure da effettuare sono quelle di trasmittanza ($T(\lambda)$) e di riflettanza ($R(\lambda)$) nella banda spettrale del visibile, generalmente fra 350 e 750 nm e devono essere eseguite sia sui filtri con il particellato ($T_{fp}(\lambda)$, $R_{fp}(\lambda)$) che sui bianchi ($T_{bp}(\lambda)$, $R_{bp}(\lambda)$). Nelle più comuni sfere integratrici del tipo di Taylor queste misure prevedono spostamenti dell'ubicazione del campione e dell'illuminatore (Geider e Osborne, 1992). Il campione deve essere collocato nelle porte di entrata della sfera con la faccia del filtro con il particellato sempre rivolta verso il raggio luminoso. Nelle misure di trasmittanza il campione è disposto fra la sfera e la sorgente luminosa, mentre nelle misure di riflettanza la sfera separa la sorgente dal campione (LICOR, 1984). Sono inoltre da effettuare ulteriori misure di trasmittanza rigirando il filtro rispetto alle precedenti, cioè rivolgendo verso la sorgente luminosa la faccia bianca del filtro ($T'_{fp}(\lambda)$).

Molta cura deve essere impiegata nelle manovre di cambiamento della disposizione del filtro, in quanto possono facilmente verificarsi alterazioni o perdite di materiale.

Estrazione dei pigmenti

Successivamente i filtri (sia campioni che bianchi) vengono sottoposti alla procedura di estrazione pigmentaria secondo Kishino *et al.* (1985). Ogni filtro dopo la prima serie di misure deve essere posto in un recipiente adeguato nel quale verranno aggiunti, facendo attenzione a non alterare la disposizione del particellato, 3 ml di metanolo assoluto. Il recipiente chiuso deve essere tenuto in frigorifero a 4 °C al buio per alcune ore. Per completare l'estrazione dei pigmenti è necessario ripetere la procedura, recuperando tutto il metanolo, aggiungendone di nuovo 2 ml e lasciare ancora per circa 30 minuti in frigorifero a 4 °C. Recuperato il metanolo, prima delle ulteriori misure di trasmittanza e riflettanza, il filtro deve essere fatto asciugare e nuovamente inumidito con acqua di mare filtrata per almeno 30 minuti al buio.

Analogamente, sui filtri con il particellato non algale e sui rispettivi bianchi, devono essere effettuate le misure di trasmittanza ($T_{fNAP}(\lambda)$, $T_{bNAP}(\lambda)$, $T'_{fNAP}(\lambda)$) e quelle di riflettanza ($R_{fNAP}(\lambda)$, $R_{bNAP}(\lambda)$).

35.2.2.3 Calcoli

Per favorire la comprensione della seguente sezione tutta la simbologia utilizzata è riportata in Tab. 1. La procedura di calcolo dell'assorbanza, $\alpha(\lambda)$, si basa sull'equazione del bilancio radiativo:

$$\alpha(\lambda) = 1 - T(\lambda) - R(\lambda) \quad (1)$$

Dalle misure effettuate sul filtro bianco ($T_{bp}(\lambda)$, $R_{bp}(\lambda)$) e da quelle sull'insieme filtro + particellato ($T_{fp}(\lambda)$, $R_{fp}(\lambda)$) seguendo Tassan e Ferrari (2002) si ottengono (Fig. 1 a-d):

$$\text{la trasmittanza del particellato,} \quad T_p(\lambda) = T_{fp}(\lambda) / T_{bp}(\lambda) \quad (2)$$

$$\text{la riflettanza del particellato,} \quad R_p(\lambda) = R_{fp}(\lambda) / R_{bp}(\lambda) \quad (3)$$

$$\text{l'assorbanza del particellato,} \quad \alpha_p(\lambda) = \frac{1 - T_p(\lambda) + R_{bp}(\lambda)(T_p(\lambda) - R_p(\lambda))}{1 + R_{bp}(\lambda)T_p(\lambda)\tau_p(\lambda)} \quad (4)$$

Analogamente, dalle misure effettuate sul filtro bianco passato in metanolo ($T_{bNAP}(\lambda)$, $R_{bNAP}(\lambda)$) e sul filtro con il particellato decolorato ($T_{jNAP}(\lambda)$, $R_{jNAP}(\lambda)$), si ottiene (Fig. 1 a-d):

$$\text{la trasmittanza del } NAP, \quad T_{NAP}(\lambda) = T_{jNAP}(\lambda) / T_{bNAP}(\lambda) \quad (5)$$

$$\text{la riflettanza del } NAP, \quad R_{NAP}(\lambda) = R_{jNAP}(\lambda) / R_{bNAP}(\lambda) \quad (6)$$

$$\text{l'assorbanza del } NAP, \quad \alpha_{NAP}(\lambda) = \frac{1 - T_{NAP}(\lambda) + R_{bNAP}(\lambda)(T_{NAP}(\lambda) - R_{NAP}(\lambda))}{1 + R_{bNAP}(\lambda)T_{NAP}(\lambda)\tau_{NAP}(\lambda)} \quad (7)$$

In entrambi i casi la trasmittanza e la riflettanza dei bianchi sono quelle medie di ogni sessione di lavoro ottenute ripetendo le misure su alcuni filtri bianchi.

$\tau(\lambda)$ è un fattore che tiene conto che la radiazione retrodiffusa dal filtro non è parallela come quella proveniente dalla sorgente luminosa, ma è diffusa. Questo fattore si rende necessario in quanto una frazione dell'assorbimento riguarda la radiazione diffusa, e la trasmittanza a luce diffusa e quella a luce parallela incidente ortogonalmente non sono uguali (così come gli assorbimenti). Tale fattore deve essere introdotto sia per il particellato che per il *NAP*. Il loro rapporto è espresso dal termine $\delta(\lambda)$, che si ottiene dividendo la trasmittanza del particellato o del *NAP*, ottenuta misurando con la faccia bianca del filtro verso la sorgente, con quella ottenuta con il campione verso la sorgente: $\delta(\lambda) = T'(\lambda)/T(\lambda)$. Questo rapporto per i filtri bianchi che sono un mezzo fortemente diffondente risulta circa uguale a 1 (Tassan e Ferrari, 2002):

$$\tau_p(\lambda) = (1 - T_p(\lambda)\delta_p(\lambda)) / (1 - T_p(\lambda)), \text{ con } \delta_p(\lambda) = T'_{fp}/T_{fp} \quad (8)$$

$$\tau_{NAP}(\lambda) = (1 - T_{NAP}(\lambda)\delta_{NAP}(\lambda)) / (1 - T_{NAP}(\lambda)), \text{ con } \delta_{NAP}(\lambda) = T'_{jNAP}/T_{jNAP} \quad (9)$$

Nel caso che le misure di trasmittanza con il particellato rivolto verso l'interno della sfera non fossero state effettuate, possono essere utilizzate le stime di τ_p , τ_{NAP} di Tassan e Ferrari (2002). A questo punto tenendo conto che

$$A(\lambda) = -\log(1 - \alpha(\lambda)) \quad (10)$$

si può calcolare (Fig. 1 e-f) l'assorbimento (m^{-1}) del particellato $a_p(\lambda)$:

$$a_p(\lambda) = 2,303 A_p(\lambda)sf / (v\beta) \quad (11)$$

e analogamente quello del particellato non algale, $a_{NAP}(\lambda)$:

$$a_{NAP}(\lambda) = 2,303 A_{NAP}(\lambda)sf / (v\beta) \quad (12)$$

dove A_p e A_{NAP} sono rispettivamente la densità ottica del particellato e del particellato non algale, β è il fattore di amplificazione del cammino ottico, sf è la superficie sulla quale si è depositato il particellato sul filtro (m^2) e v è il volume di acqua filtrata (m^3).

L'eventuale incompleta estrazione dei pigmenti presenti nel materiale particellato può essere individuata dalle seguenti caratteristiche dello spettro di $a_{NAP}(\lambda)$: 1) presenza di massimi nelle bande del rosso o del blu caratteristici degli spettri di assorbimento della clorofilla; 2) evidenza della firma spettrale (massimi caratteristici dal verde al giallo-arancio) delle ficobiline e ficocianine insolubili in metanolo, per la presenza nel popolamento fitoplanctonico di cianobatteri o criptofite. In entrambi i casi la procedura

di separazione chimica può essere integrata con una procedura di tipo matematico (Fig. 1 e-f). $a_{NAP}(\lambda)$ presenta una forma assimilabile ad una esponenziale (Roesler *et al.*, 1989) e può essere interpolata nella banda fra 350 e 380 nm, dove il contributo fitoplanctonico residuo è trascurabile, con l'equazione seguente:

$$a'_{NAP}(\lambda) = a_{NAP}(\lambda_0) e^{-S(\lambda-\lambda_0)} + k \quad (13)$$

si ottengono così i parametri per la correzione dell'intero spettro: $a_{NAP}(\lambda_0)$ è l'assorbimento alla lunghezza d'onda di riferimento, generalmente 350 nm, S esprime la pendenza della curva fra 350 e 380 nm e k , che indica il parametro di background, corrisponde al valore $a_{NAP}(750)$. Inserendo nell'equazione (13) questi parametri, la correzione $a'_{NAP}(\lambda)$ può essere estesa a tutto lo spettro. Lo spettro così ricostruito è quello che, in questi casi, approssima in maniera migliore l'assorbimento del particolato depigmentato (Fig. 1 f).

Il coefficiente di assorbimento del fitoplancton ($a_{ph}(\lambda)$) viene calcolato sottraendo allo spettro di assorbimento del particolato quello del *NAP* (Fig. 1 e-f):

$$a_{ph}(\lambda) = a_p(\lambda) - a_{NAP}(\lambda) \quad (14)$$

L'assorbimento specifico del fitoplancton $a^*_{ph}(\lambda)$ ($m^2 mg^{-1}$ di Chl) si ottiene dividendo $a_{ph}(\lambda)$ (m^{-1}) o per la relativa concentrazione di clorofilla a (Chl a) oppure per la somma di clorofilla a + feopigmenti (Chl) in $mg m^{-3}$. Se le misure di concentrazione dei pigmenti sono ottenute tramite HPLC, generalmente invece della sola clorofilla a si usa la somma di clorofilla a + divinil clorofilla a + clorofillide a (Chl a_{tot}), mentre al posto dei feopigmenti si usa la feofitina a .

Nei campioni naturali (specialmente quelli di acque di caso 2) può verificarsi che, nell'infrarosso vicino, il particolato presenti un assorbimento residuo e siccome in questa banda l'assorbimento del fitoplancton può essere assunto uguale a zero, questo assorbimento deve essere attribuito interamente al particolato non algale. In pratica, l'assorbimento del particolato non algale alla lunghezza d'onda di 750 nm (o meglio la sua media in un intervallo spettrale di almeno 10 nm centrato su questa λ) deve essere aggiustato al valore di quello del particolato alla solita λ , slittando di questo valore l'intero spettro.

Per la correzione del fattore β di amplificazione del cammino ottico si consiglia di effettuare, quando possibile, dei confronti fra le misure su filtro e su sospensione il cui rapporto dà β . Nell'impossibilità di svolgere queste misure si possono adottare le stime ottenute da vari autori per specie fitoplanctoniche ed ambienti differenti (Tab. 2 di Mitchell *et al.*, 2000). I valori di β differiscono in relazione alle proprietà diffusive dei campioni e si possono commettere errori anche gravi utilizzando stime non opportune. I campioni più problematici sono quelli con frazioni variabili e significative di particolato inorganico o di cellule picofitoplanctoniche. Comunque utilizzando il metodo *T-R* gli errori relativi alla scelta del fattore β hanno una criticità ridotta, in quanto le sue variazioni sono molto minori rispetto a quelle legate al metodo che prevede esclusivamente misure di trasmittanza (Tassan *et al.*, 2000). Secondo la nostra esperienza è consigliabile l'utilizzazione delle stime di Bricaud e Stramski (1990) secondo cui:

$$\beta(\lambda) = 1,63A(\lambda)^{-0,22} \quad (15)$$

in quanto nei casi in cui sono state confrontate, sono risultate molto simili a quelle ottenute sulle sospensioni.

Tab. 1 - Simbologia utilizzata.

Termine	Definizione
λ	Lunghezza d'onda, (nm)
β	Rapporto fra l'assorbimento del particellato concentrato sul filtro rispetto a quello della rispettiva sospensione
δ	Rapporto fra la trasmittanza a luce diffusa e quella a luce parallela incidente ortogonalmente, dato dal rapporto fra la trasmittanza misurata con il particellato rivolto verso l'interno della sfera e quella misurata con il particellato rivolto verso la sorgente luminosa ($T'(\lambda)/T(\lambda)$). Le due trasmittanze sono praticamente uguali nei filtri bianchi. Questo rapporto viene calcolato sia per il particellato (δ_p), che per il NAP (δ_{NAP})
τ	Fattore che dà conto che la radiazione retrodiffusa dal filtro è diffusa e che δ può essere $\neq 1$
T_{fp}	Trasmittanza misurata dell'insieme filtro + particellato
T'_{bp}	Trasmittanza misurata dei filtri bianchi
T'_{fp}	Trasmittanza del particellato (T'_{fp}/T'_{bp})
T''_{fp}	Trasmittanza di particellato + filtro misurata con il particellato rivolto verso l'interno della sfera
T_{fNAP}	Trasmittanza misurata dell'insieme filtro + particellato depigmentato in metanolo (NAP)
T_{bNAP}	Trasmittanza misurata dei filtri bianchi passati in metanolo
T_{NAP}	Trasmittanza del particellato non algale (T_{fNAP}/T_{bNAP})
T''_{fNAP}	Trasmittanza di NAP + filtro misurata con il particellato rivolto verso l'interno della sfera
R_{fp}	Riflettanza misurata dell'insieme filtro + particellato
R_{bp}	Riflettanza misurata dei filtri bianchi
R_p	Riflettanza del particellato (R_{fp}/R_{bp})
R_{fNAP}	Riflettanza misurata dell'insieme filtro + particellato depigmentato in metanolo (NAP)
R_{bNAP}	Riflettanza misurata dei filtri bianchi passati in metanolo
R_{NAP}	Riflettanza del particellato non algale (R_{fNAP}/R_{bNAP})
α_p	Assorbanza del particellato
α_{NAP}	Assorbanza del particellato depigmentato (NAP)
A_p	Densità ottica del particellato
A_{NAP}	Densità ottica del particellato non algale
a_p	Assorbimento del particellato, (m^{-1})
a_{NAP}	Assorbimento del particellato non algale, (m^{-1})
a'_{NAP}	Assorbimento del particellato non algale corretto (m^{-1}) ricostruito con l'equazione (13)
k	Parametro di background di $a'_{NAP}(\lambda)$ corrispondente ad $a_{NAP}(750)$, (m^{-1})
a_{ph}	Assorbimento del fitoplancton (m^{-1})
a'_{ph}	Assorbimento corretto del fitoplancton, $a'_{ph} = a_p - a'_{NAP}$, (m^{-1})
a^*_{ph}	Assorbimento specifico (cross section) del fitoplancton, ($m^2 \text{ mg}^{-1}$ di Chl)
S	Fattore di decremento esponenziale di a'_{NAP} all'aumentare di λ , (nm^{-1})
sf	Superficie del filtro su cui si è distribuito il particellato, (m^2)
v	Volume di acqua marina filtrata, (m^3)

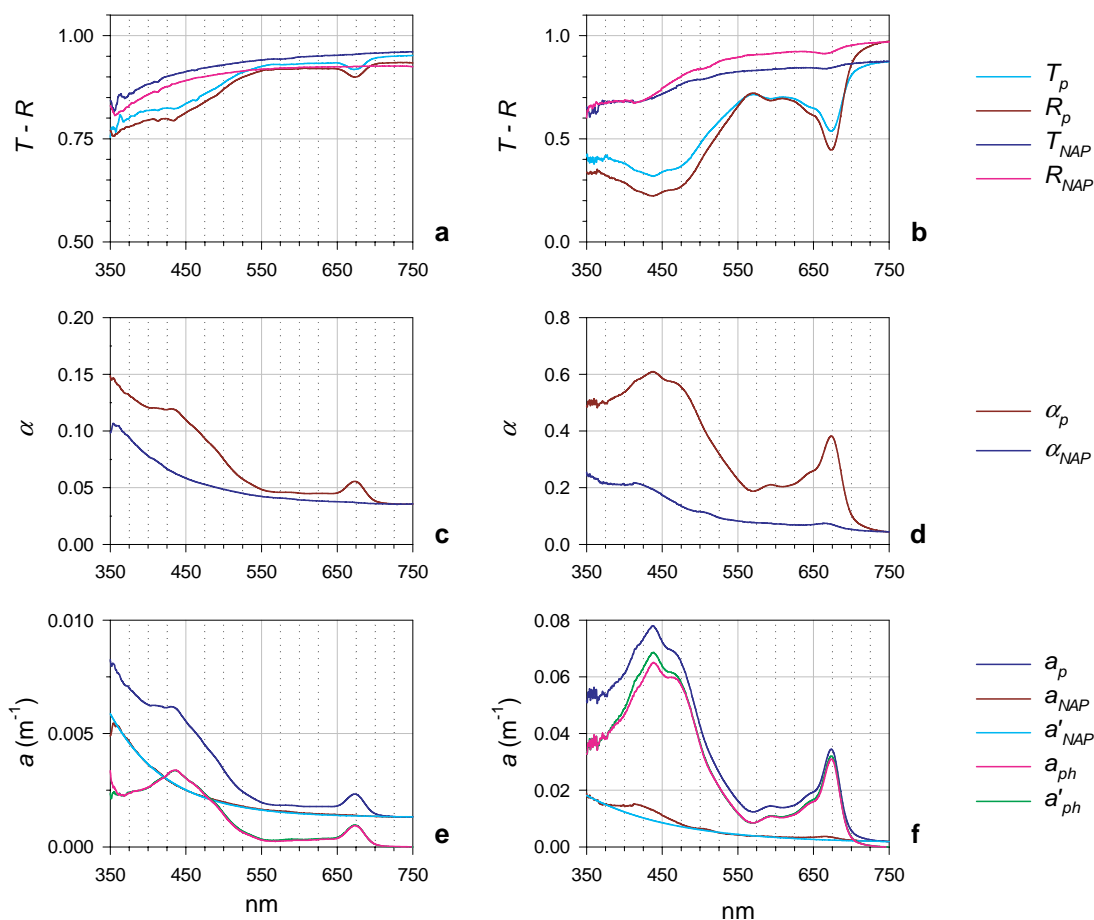


Fig. 1 - Spettri esemplificativi dei vari passaggi nel calcolo degli assorbimenti in due campioni naturali, oligotrofico (a,c,e) ed eutrofico (b,d,f): a,b trasmittanze e riflettanze di particolato e NAP (eq. 2, 5 e 3, 6); c, d assorbimenti di particolato e NAP (eq. 4, 7); e, f assorbimenti di particolato, NAP e fitoplancton (eq. 11, 12, 14). In f sono riportati a_{NAP} (eq. 12) in cui risulta evidente la non completa estrazione pigmentaria, e la funzione interpolante a'_{NAP} (eq. 13) usata per eliminare questo problema; sono inoltre mostrati 2 spettri di assorbimento del fitoplancton, quello con massimi più elevati a'_{ph} è stato ottenuto sottraendo (eq. 14) ad a_p lo spettro del NAP corretto (a'_{NAP}).

35.3 FLUORESCENZA FITOPLANCTONICA

Le proprietà biofisiche dei pigmenti fitoplanctonici e la loro strutturazione in unità fotosintetiche funzionali determinano, a temperatura ambiente, emissione di fluorescenza rossa da parte dei centri di reazione del fotosistema PSII, in seguito ad eccitazione nel visibile. In ecologia acquatica questa proprietà viene utilizzata da decenni (Lorenzen, 1966) per rilevare in modo rapido e sensibile la presenza di organismi fototrofi. Una strumentazione ormai consolidata che sfrutta queste proprietà, si è diffusa e sviluppata sia in campo oceanografico che limnologico, per indagini sulla distribuzione spaziale e temporale del fitoplancton. Grazie essenzialmente a questo tipo di misure si è potuta ad esempio analizzare la caratteristica distribuzione a chiazze del fitoplancton oceanico (Platt, 1972; Ascoti *et al.*, 1993) o rivelare la presenza dei massimi di clorofilla profondi (DCM). Alle prime sonde con sorgenti di eccitazione potenti (xenon) e rilevatori sensibili (PM) i progressi della tecnologia elettronica hanno affiancato strumenti basati su fotodiodi e filtri interferenziali per eccitare e rilevare il segnale (Beutler *et al.*, 1998). Sonde di questo tipo sono state recentemente abbinate anche a misure XBT di temperatura e profondità da nave in mo-

vimento (Marcelli *et al.*, 2007). Vanno tuttavia considerati due principali motivi di cautela nell'uso delle misure di fluorescenza fitoplanctonica: 1) l'efficienza di emissione *in vivo* della fluorescenza è bassa (<5%) ed assai variabile in funzione di un elevato numero di fattori sia ambientali che fisiologici; 2) le misure di fluorescenza sono in unità relative perché dipendono dalle caratteristiche dello strumento utilizzato. Le principali cause ambientali di variabilità dell'efficienza sono la luce, la temperatura e la concentrazione di nutrienti (Falkowski e Raven, 1997); alcune delle cause fisiologiche sono la composizione pigmentaria, la presenza di bioritmi, l'induzione di fluorescenza variabile e l'entità del *non photochemical quenching* (Falkowski e Raven, 1997; Muller *et al.*, 2001).

Possono interferire, inoltre, le fluorescenze di altri fluorocromi presenti in mare, come la sostanza gialla o gilvina. Infine, alle elevate concentrazioni, si possono verificare fenomeni di interazione della fluorescenza con l'assorbimento, in quanto una parte della radiazione emessa viene riassorbita dalle stesse strutture pigmentarie.

Successivamente, con l'aumentare delle conoscenze relative a questo processo, vari aspetti della variabilità dell'efficienza di emissione della fluorescenza in rapporto alla clorofilla *a* sono stati utilizzati per la stima di alcune caratteristiche eco-fisiologiche del fitoplancton; due in particolare:

1) La presenza di alcuni dei principali gruppi tassonomici del fitoplancton può essere individuata mediante misure di emissione della fluorescenza, eccitando alle lunghezze d'onda specifiche dei pigmenti accessori (clorofille *b* e *c*, carotenoidi, ficobiline) caratterizzanti questi gruppi (Yentsch e Yentsch, 1979; Yentsch e Phynney, 1985; Lazzara e Innamorati, 1985). Sulla base delle caratteristiche spettrali di eccitazione ed emissione si possono identificare 5 diversi gruppi pigmentari riassunti in Tab. 2 (Lazzara, 1995; Beutler *et al.*, 1998). Con questo scopo di discriminazione sono state costruite e commercializzate delle sonde spettrali che dispongono di una serie di coppie eccitazione/emissione calibrate per individuare i differenti pigmenti accessori sulla base di una architettura a diodi e filtri interferenziali (WetLabs, Safire; Walz, Fito-PAM; bbe-Moldaenke, Fluoro Probe), che possono essere in grado di individuare anche altri fluorocromi in soluzione come gli acidi umici (gilvina). In Tab. 2 sono riportate le caratteristiche spettrali specifiche dei pigmenti accessori che consentono l'attribuzione del segnale di fluorescenza ad organismi di un particolare taxon fitoplanctonico.

2) Lo studio della cinetica dell'emissione di fluorescenza su cellule fotosintetiche dopo la loro esposizione al buio ha evidenziato la presenza di alcune differenti fasi del processo (*Kautsky Curve*) in stretto legame con lo svolgimento del processo fotosintetico e quindi la complementarità dei due processi. Su questa base può essere stimata la frazione dell'energia radiante assorbita che andrà ad alimentare il processo fotochimico (*photochemical quenching*) e quella che andrà dissipata come calore (*non photochemical quenching*), come descritto nel capitolo 31.

La modalità di misura più completa degli spettri di eccitazione ed emissione di fluorescenza di una complessa matrice acquosa, tuttavia, si realizza con spettrofluorimetri da laboratorio, generalmente più sensibili e nei quali è assai maggiore il controllo delle caratteristiche spettrali delle diverse componenti strumentali.

35.3.1 Fluorescenza spettrale

La misura degli spettri di eccitazione della fluorescenza emessa *in vivo* dalla clorofilla *a* fornisce al tempo stesso informazioni sulla composizione pigmentaria e sul funzionamento dell'intero sistema fotosintetico. Quindi gli spettri di eccitazione della fluorescenza solo apparentemente danno informazioni analoghe agli spettri di assorbimento, piuttosto consentono una valutazione dello spettro di azione della fotosintesi attraverso una stima diretta del trasferimento di energia dai pigmenti accessori al centro di reazione del PSII (Neori *et al.*, 1986). Diviene così possibile un riconoscimento funzionale della presenza di pigmenti inattivi nella fotosintesi, come i carotenoidi fotoprotettori. Queste misure sono adatte dunque ad approfondire gli studi sulle capacità di fotoadattamento e sulla produzione primaria. Infine dalle misure spettrali congiunte di eccitazione della fluorescenza con quelle di assorbimento del fitoplancton, possono

essere ricavati gli spettri del rendimento quantico di fluorescenza che in certe condizioni risulta variare in modo diretto e lineare con il rendimento quantico della fotosintesi, un parametro di fondamentale importanza sia per la definizione di stime corrette della produzione primaria che per la comprensione delle strategie di fotoadattamento (Lazzara, 1995; Lazzara *et al.*, 1996).

La notevole variabilità delle caratteristiche spettrali dei popolamenti fitoplanctonici può essere schematizzata in pochi “gruppi pigmentari” come suggerito da vari autori (Yentsch e Phinney, 1985; Lazzara, 1999).

In Tab. 2 vengono descritti cinque gruppi pigmentari con i corrispondenti gruppi tassonomici di fitoplancton marino, con i pigmenti caratterizzanti e le specifiche coppie di eccitazione/emissione che costituiscono la loro firma spettrale in fluorescenza.

Tab. 2 - Taxa fitoplanctonici, gruppi pigmentari e pigmenti, con le caratteristiche coppie di eccitazione/emissione della fluorescenza in vivo dei popolamenti fitoplanctonici marini, separabili con spettrofluorimetria.

Taxa fitoplanctonici	Gruppo pigmentario	Pigmenti caratterizzanti	Coppie ex/em di Fl <i>in vivo</i> (nm)	
Bacillariofitee	A-C	Chl <i>a</i>	435/682	
Dinofitee		Chl <i>c</i>	465/682	
Rafidofitee		Carotenoidi PS		
Prinnesiofitee				520/682
Clorofitee	A-B	Chl <i>a</i>	435/685	
Prasinofitee		Chl <i>b</i>	475/685	
Criptofitee	A-C-PE	Chl <i>a</i>	445/682	
		Chl <i>c</i>	470/682	
		PE	555/592	
Cianofitee	A-PC-PE	Chl <i>a</i>	432/682	
		PE	550/590	
		PC	625/660	
<i>Prochlorococcus</i>	DVA-B	DVChl <i>a</i>	445/680	
		DVChl <i>b</i>	475/680, 600/680	

35.3.2 Metodo

35.3.2.1 Materiale occorrente

- Membrane Nuclepore 0,2 µm, Ø 25 mm
- Filtri in fibra di vetro GF/C da Ø 25 mm
- Vetreria da laboratorio, cilindri graduati, pipette, pinzette per filtri, tubi in tygon® φ 6-8 mm, ecc.
- Apparato di filtrazione con pompa a vuoto regolabile, trappola
- Spettrofluorimetro con correzione quantica dell'eccitazione ed elevata sensibilità nel rosso
- Cuvette da fluorimetria a quattro pareti ottiche, in quarzo
- Soluzione di DCMU in metanolo (10⁻³ M).

35.3.2.2 Schema delle operazioni

Campionamento e concentrazione

I campioni di acqua marina necessari per le analisi vengono ottenuti usando bottiglie di campionamento tipo Niskin. L'acqua va trasferita immediatamente tramite tubi puliti in tygon® in bottiglie di vetro scuro di circa 1 l mantenute prima delle misure (che comunque devono avvenire immediatamente dopo il campionamento) a luce bassa e ad una temperatura non troppo dissimile da quella a cui erano sottoposte in mare.

Dato lo scarso rendimento della fluorescenza *in vivo* (sempre inferiore al 10 % di quella degli stessi pigmenti in soluzione), le misure spettrali di eccitazione della fluorescenza sono più agevolmente effettuate in seguito a concentrazione del campione naturale. La procedura di concentrazione risulta necessaria per ottenere spettri sufficientemente accurati a tutte le lunghezze d'onda, ad esempio su popolamenti naturali con concentrazioni di clorofilla *a* < 10 mg m⁻³ e con uno strumento che abbia un rapporto segnale rumore (S/N) > 70. Questa procedura consiste in una leggera concentrazione del campione, aumentando da 3 a 10 volte quella iniziale, mediante delicata filtrazione (membrane in policarbonato Nuclepore porosità 0,2 µm, sovrapposta al filtro GF/C) da effettuare a bassa depressione (100 mm Hg) in luce soffusa e mantenendo la continua risospensione del campione tramite pipetta, così da impedire la formazione di una patina sul filtro.

Misure allo spettrofluorimetro

La fluorescenza dei popolamenti fitoplanctonici deve essere misurata allo spettrofluorimetro direttamente sulla sospensione. Lo strumento utilizzato è opportuno che consenta una correzione quantica della eccitazione, che generalmente avviene mediante un riferimento basato sulla risposta stabile della rodamina B. Questa tecnica consente di ottenere spettri di eccitazione della fluorescenza corretti fino a 630-640 nm, lunghezze d'onda che costituiscono il limite superiore per la correzione quantica ottenibile con la rodamina B, a causa della deformazione spettrale della risposta dello strumento. Inoltre lo spettrofluorimetro dovrebbe essere dotato di un fotomoltiplicatore particolarmente sensibile nel rosso dove si colloca l'emissione della clorofilla *a*.

Durante le misure e specialmente se queste si protraggono per alcune ore, la deriva temporale della risposta dello strumento deve essere controllata (anche ogni ora) ed eventualmente corretta ad esempio leggendo la fluorescenza di feopigmenti inclusi in resine di polimetacrilato (J. Neveux, comunicazione personale, 1991) utilizzando sempre le stesse lunghezze d'onda come eccitazione/emissione.

Prima di effettuare le misure di fluorescenza, al campione deve essere aggiunto l'inibitore della fotosintesi DCMU (3-(3,4-diclorofenil) – 1,1-dimetilurea) alla concentrazione finale di 20 µM, ed essere sottoposto per circa 1 minuto ad una irradianza saturante (Neori *et al.*, 1986; Johnsen e Sakshaug, 1993) cosicché si misuri un valore prossimo alla fluorescenza massima (F_m) e relativamente costante (Samuelsson e Oquist, 1977).

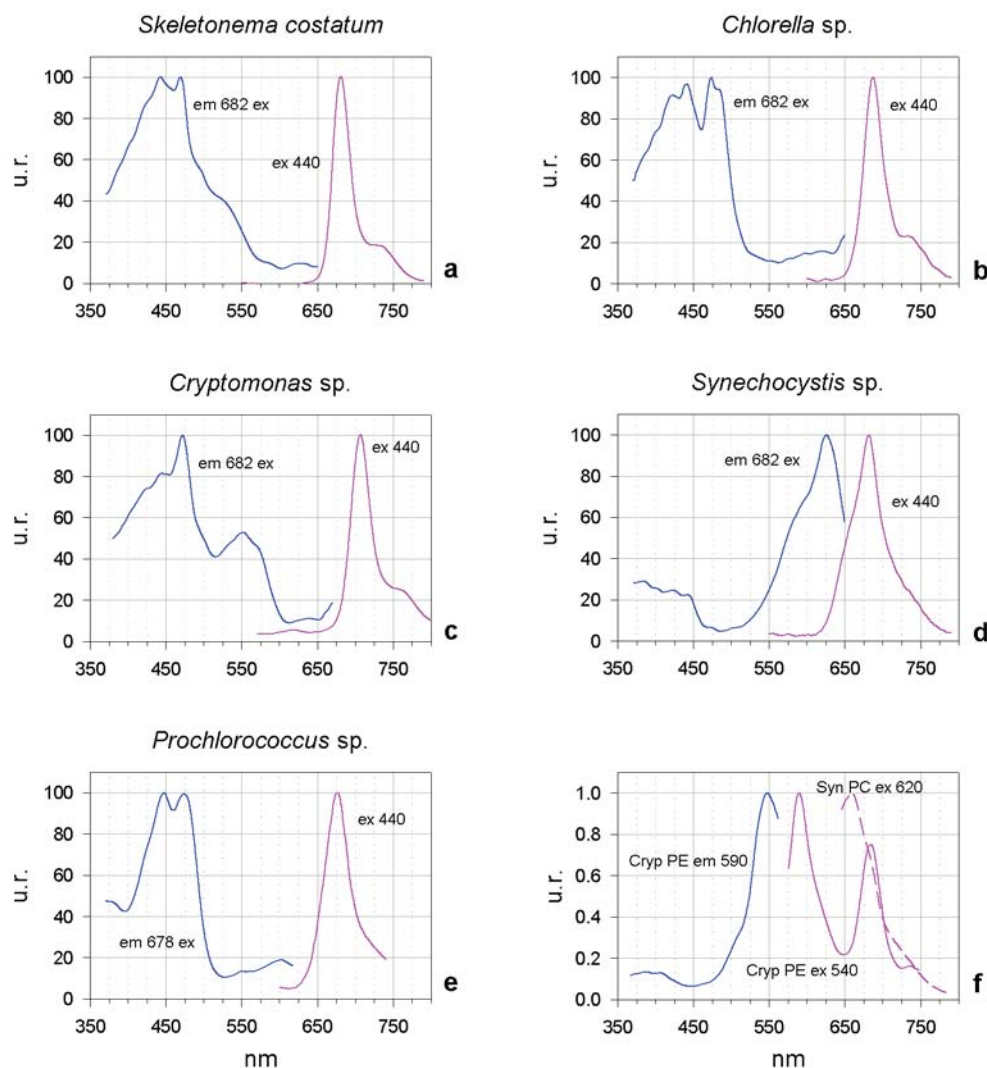


Fig. 2 - Spettri normalizzati al massimo, della eccitazione ed emissione *in vivo* di fluorescenza, da parte di colture mono-specifiche di fitoplancton. Le specie sono rappresentative dei cinque gruppi pigmentari di Tab. 2. a) *Skeletonema costatum* del gruppo A-C; b) *Chlorella* sp. gruppo A-B; c) *Cryptomonas* sp. gruppo A-C-PE; d) *Synechocystis* sp. gruppo A-PC-PE; e) *Prochlorococcus* sp. gruppo DVA-B. In f) gli spettri di fluorescenza sono dovuti principalmente alla emissione da parte di ficobiline disaccoppiate dai centri di reazione, così che sono messe in evidenza le specifiche caratteristiche spettrali dei loro fluorocromi.

Le misure sui campioni naturali allo spettrofluorimetro devono partire da una serie effettuata a coppie di eccitazione/emissione a lunghezze d'onda fisse: ad es. 440/682 nm per evidenziare la presenza della clorofilla *a*; 490/590 nm quella della ficourobilina (PUB); 540/590 nm per la ficoeritrobilina (PEB). In queste misure può essere opportuno mediare (o integrare) il segnale di fluorescenza per un certo tempo (anche 3 minuti). Le stesse misure alle coppie di eccitazione/emissione suddette, devono essere ripetute dopo la procedura di concentrazione. Il rapporto fra le misure ottenute dopo la concentrazione e quelle precedenti dà il valore di quanto devono essere scalate le misure spettrali per riportarle alla concentrazione del campione naturale.

Per ogni campione le misure devono essere effettuate sottraendo la fluorescenza emessa nelle stesse condizioni di eccitazione data dal campione filtrato (Nuclepore 0,2 μm), in particolare per eliminare la diffusione Raman e la fluorescenza della sostanza organica disciolta.

Poiché la diffusione della luce di eccitazione supera di alcuni ordini di grandezza quella emessa per fluorescenza, in quasi tutti gli spettrofluorimetri non provvisti di una apposita correzione del segnale, va evitata con cura la sovrapposizione dello spettro di eccitazione con quello di emissione. Gli intervalli opportuni per la scansione degli spettri dipendono anche dalla ampiezza delle fenditure dei rispettivi monocromatori.

A titolo di esempio, con le fenditure dei monocromatori di eccitazione ed emissione poste a 10 nm, gli spettri di fluorescenza della clorofilla *a*, che ha emissione massima a 682 nm, si misurano in eccitazione tra 360 e 640 nm, mentre quelli in emissione tra 600 e 780 nm, con eccitazione a 440 nm (Fig. 2a-e). Gli spettri di fluorescenza della ficoeritrina (PE) invece, che ha emissione massima a 592 nm, si misurano in eccitazione tra 360 e 560 nm ed in emissione tra 570 e 780 nm eccitando a 540 nm (con il massimo che si trova a 550 nm, Fig. 2c). Gli spettri di fluorescenza della ficocianina (PC) con il massimo di emissione a 660 nm si misurano in eccitazione tra 360 e 640 nm ed in emissione tra 650 e 780 nm, eccitando a 620 nm (con il massimo posto a 625 nm, Fig. 2d).

Ringraziamenti

Si ringraziano il Dott. Emanuele Organelli e la Dott.ssa Chiara Melillo per la collaborazione.

35.4 BIBLIOGRAFIA

- ALLALI K., BRICAUD A., BABIN M., MOREL A., CHANG P. (1995) - A new method for measuring spectral absorption coefficients of marine particles. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 1526-1532.
- ASCIOTI F.A., BELTRAMI E., CARROLL T.O., WIRICK C. (1993) - Is there chaos in plankton dynamics? *J. Plankton Res.*, **15**: 603-617.
- BEUTLER M., WILTSHIRE K.H., MEYER B., MOLDAENKE C., DAU H. (1998) - Rapid depth-profiling of the distribution of 'spectral groups' of microalgae in lakes, rivers and in the sea. In: Garab G. (ed), *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands: 4301-4304.
- BIDIGARE R.R., ONDRUSEK M.E., MORROW J.H., KIEFER D.A. (1990) - *In vivo* absorption properties of algal pigments. *Ocean Optics X*, **1302**: 290-302.
- BRICAUD A., STRAMSKI D. (1990) - Spectral absorption coefficients of living phytoplankton and non-algal biogenous matter: a comparison between the Peru upwelling area and the Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.*, **35** : 562-582.
- BRICAUD A., BABIN M., MOREL A., CLAUSTRE H. (1995) - Variability in the chlorophyll-specific absorption coefficients of natural phytoplankton: analysis and parameterization. *J. Geophys. Res.*, **100**: 13321-13332.
- BUTLER W.L. (1962) - Absorption of light by turbid material. *J. Opt. Soc. Am.*, **52**: 292-299.
- CLEVELAND J., PERRY M.J. (1994) - A model for partitioning particulate absorption into phytoplanktonic and detrital components. *Deep Sea Res.*, **41**: 197-221.
- DUNTLEY S.Q. (1942) - The optical properties of diffusing materials. *J. Opt. Soc. Am.*, **32**: 61-70.
- DUYSENS L.N.M. (1956) - The flattening of the absorption spectrum of suspensions as compared to that of solution. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**: 1-12.
- FALKOWSKI P.G., RAVEN J.A. (1997) - *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science, Oxford: 375 pp.
- GEIDER R.J., OSBORNE B.A. (1992) - *Algal Photo-Synthesis. The Measurement of Algal Gas Exchange. Current Phycology 2*. Chapman and Hall, New York: 256 pp.
- JOHNSEN G., SAKSHAUG E. (1993) - Bio-optical characteristics and photoadaptive responses in the toxic and bloom-forming dinoflagellates *Gyrodinium aureolum*, *Gymnodinium galatheanum*, and two strains of *Prorocentrum minimum*. *J. Phycol.*, **29**: 627-642.
- KIEFER D.A., SOOHOO J.B. (1982) - Spectral absorption by marine particles of coastal waters of Baja California. *Limnol. Oceanogr.*, **27**: 492-499.
- KIRK J.T.O. (1994) - *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. Cambridge University Press, New York: 509 pp.
- KISHINO M., TAKAHASHI M., OKAMI N., ICHIMURA S. (1985) - Estimation of the spectral absorption coefficient of phytoplankton in the sea. *Bull. Mar. Sci.*, **37**: 634-642.

-
- KROMKAMP J.C., FOSTER R.M. (2003) - The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. *Eur. J. Phycol.*, **38**: 103-112.
- INNAMORATI M. (1990) - Misurazione dell'irradianza. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera D'Alcalà M. (eds), *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. Nova Thalassia, LINT, Trieste: 11-67.
- LAZZARA L. (1995) - Phytoplankton pigments: photoadaptation, *in vivo* optical properties and primary production estimates. *Gio. Bot. Ital.*, **129**: 1244-1255.
- LAZZARA L. (1999) - *In vivo* optical properties and characterisation of phytoplankton pigments for algal bloom detection and monitoring. *Rapp. ISTISAN 99*, **8**: 25-34.
- LAZZARA L., INNAMORATI M. (1985) - Spectres de fluorescence *in vivo* et composition des peuplements phytoplanktoniques dans l'Adriatique Septentrionale. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, **29**: 111-114.
- LAZZARA L., BRICAUD A., CLAUSTRE H. (1996) - Spectral absorption and fluorescence excitation properties of phytoplanktonic populations at a mesotrophic and an oligotrophic site in the Tropical North Atlantic (EUMELI program). *Deep Sea Res. I*, **43**: 1215-1240.
- LI-COR (1984) - *LI 1800 Portable Spectroradiometer Instruction Manual*. Publication No. 8405-0037: 152 pp.
- LORENZEN C.J. (1966) - A method for the continuous measurements of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep Sea Res.*, **13**: 223-227.
- MARCELLI M., DI MAIO A., DONIS D., MAINARDI U., MANZELLA G.M.R. (2007) - Development of a new expendable probe for the study of pelagic ecosystems from voluntary observing ships. *Ocean Sci.*, **3**: 311-320.
- MARRA J., TREES C.C., O'REILLY J.E. (2008) - Phytoplankton pigments absorption: A strong predictor of primary productivity in surface ocean. *Deep Sea Res. I*, **154**: 155-163.
- MASELLI F., MASSI L., PIERI M., SANTINI C. (2009) - Spectral angle minimization for the retrieval of optically active seawater constituents from MODIS data. *Photogramm. Eng. Rem. S.*, **75**: 595-605.
- MASSI L., BIONDI N., INNAMORATI M., LAZZARA L. (1997) - L'assorbimento della luce da parte del fitoplancton e del detrito. *Biol. Mar. Mediterr.*, **4**: 66-73.
- MITCHELL B.G. (1990) - Algorithms for determining the absorption coefficient of aquatic particulates using the quantitative filter technique (QFT). *Ocean Optics X*, **1302**: 137-148.
- MITCHELL B.G., BRICAUD A., CARDER K., CLEVELAND J., FERRARI G., GOULD R., KAHRU M., KISHINO M., MASKE H., MOISAN T., MOORE L., NELSON N., PHINNEY D., REYNOLDS R., SOSIK H., STRAMSKI D., TASSAN S., TREES C., WEIDMANN A., WEILAND J., VODACEK A. (2000) - Determination of spectral absorption coefficients of particles dissolved material and phytoplankton for discrete water sample. In: Fargion G., Mueller J.L. (eds), *Ocean Optics protocols for satellite ocean colour sensor validation, Revision 2*, NASA/TM-2000: 125-153.
- MITCHELL B.G., KAHRU M., WEILAND J., STRAMSKA M. (2002) - Determination of spectral absorption coefficients of particles dissolved material and phytoplankton for discrete water sample. In: Mueller J.L., Fargion G., McClain C.R. (eds), *Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Color Sensor Validation, Revision 4*, NASA/TM-2003: 39-59.
- MOREL A. (1988) - Optical modeling of the upper ocean in relation to its biogenous matter content (case I waters). *J. Geophys. Res.*, **93**: 10749-10768.
- MOREL A., BRICAUD A. (1981) - Theoretical results concerning light absorption in a discrete medium, and application to specific absorption of phytoplankton. *Deep Sea Res.*, **28**: 1375-1393.
- MUELLER J.L., FARGION G., MC CLAIN C.R. (2002) - *Ocean Optics Protocols for Satellite Ocean Colour Sensor Validation, Revision 4*, NASA/TM-2003: 76 pp.
- MULLER P., LE X.P., NIYOGI K.K. (2001) - Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiol.*, **125**: 1558-1566.
- NEORI A., HOLM-HANSEN O., HAXO F.T. (1986) - Relationship between action spectra for chlorophyll *a* fluorescence and photosynthetic O₂ evolution in algae. *J. Plankton Res.*, **8**: 537-548.
- PLATT T. (1972) - Local phytoplankton abundance and turbulence. *Deep Sea Res.*, **19**: 183-187.
- PRIVOZNIK K.G., DANIEL K.J., INCROPERA F.P. (1978) - Absorption, extinction and phase function measurements for algal suspensions of *Chlorella pirenoidosa*. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Trans.*, **20**: 345-352.
- ROESLER C.S., PERRY M.J., CARDER K. (1989) - Modelling *in situ* phytoplankton absorption from total absorption spectra in productive inland marine waters. *Limnol. Oceanogr.*, **34**: 1510-1523.
- SAMUELSSON G., OOQUIST G. (1977) - A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant.*, **40**: 315-319.

-
- SHIBATA K., BENSON A.A., CALVIN M. (1954) - The absorption spectra of suspension of living microorganism. *Biochim. Biophys. Acta.* **15**: 461-470.
- STRAMSKI D. (1990) - Artifacts in measuring absorption spectra of phytoplankton collected on a filter. *Limnol. Oceanogr.*, **35**: 1804-1809.
- TASSAN S., FERRARI G.M. (1995) - An alternative approach to absorption measurements of aquatic particles retained on filters. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 1358-1368.
- TASSAN S., FERRARI G.M. (2002) - A sensitivity analysis of the "Transmittance-Reflectance" method for measuring light absorption by aquatic particles. *J. Plankton Res.*, **24**: 757-774.
- TASSAN S., FERRARI G.M., BRICAUD A., BABIN M. (2000) - Variability of the amplification factor of light absorption by filter retained aquatic particles in the coastal environment. *J. Plankton Res.*, **22**: 659-668.
- YENTSCH C.S. (1957) - A non extractive method for the quantitative estimation of chlorophyll in algal cultures. *Nature*, **179**: 1302-1304.
- YENTSCH C.S. (1962) - Measurements of visible light absorption by particulate matter in the ocean. *Limnol. Oceanogr.*, **7**: 207-217.
- YENTSCH C.S., PHINNEY D.A. (1985) - Spectral fluorescence: an ataxonomic tool for studying the structure of phytoplankton population. *J. Plankton Res.*, **7**: 617-632.
- YENTSCH C.S., YENTSCH C.M. (1979) - Fluorescence spectral signature: the characterization of phytoplankton populations by use of excitation and emission spectra. *J. Mar. Res.*, **37**: 471-483.

CAPITOLO 36. QUANTITÀ E COMPOSIZIONE BIOCHIMICA DELLA MATERIA ORGANICA PARTICELLATA IN ACQUA E NEGLI AGGREGATI MUCILLAGINOSI

A. Pusceddu A. Dell'Anno, M. Fabiano, R. Danovaro, M. Mecozzi, N. Penna, F. Ricci, S. Capellacci

a.pusceddu@univpm.it

36.1 INTRODUZIONE

La sostanza particellata sospesa (seston) comprende una frazione organica (POM, *Particulate Organic Matter*) ed una inorganica (PIM, *Particulate Inorganic Matter*). La POM è la principale sorgente alimentare per quegli organismi (sospensivori) di grandezza e modalità di nutrizione tali da poter utilizzare particelle organiche di piccole dimensioni, comprese tra gli 0,2 μm ed i 200 μm , vale a dire quel *pool* di particelle organiche che passano tra le maglie dei retini per la raccolta del meso-zooplankton e che vengono trattenute da membrane filtranti di porosità nominale in grado di trattenere la maggior parte del batterioplancton (Parson, 1977).

La sostanza organica particellata è generalmente presente in concentrazioni da 7 a 20 volte inferiori rispetto alla frazione disciolta (DOM, *Dissolved Organic Matter*) che attraversa una maglia da 0,45 μm e rappresenta, generalmente, tra il 40 e il 95% del materiale sospeso totale (Parson *et al.*, 1997).

La materia organica particellata è costituita da una frazione vivente ed una frazione detritale (non vivente). La frazione vivente comprende organismi planctonici unicellulari singoli o raggruppati in colonie, autotrofi ed eterotrofi e piccoli metazoi planctonici di taglia variabile (nano- e micro-zooplankton, rispettivamente 2,0-20 e 20-200 μm). La frazione più piccola della POM (picoplancton) comprende il picofitoplancton e procarioti planctonici eterotrofi. La materia organica vivente deriva da proliferazione cellulare o riproduzione degli organismi, mentre la materia organica particellata di natura detritale può avere origine alloctona, nel caso di particelle trasportate in mare da sorgenti esterne al sistema (e.g. acque continentali, deposizione atmosferica), od autoctona, derivante dalla morte, degradazione secrezione ed escrezione degli organismi presenti nel sistema (Wetzel, 1995).

Le due frazioni, vivente e detritale possono assumere maggiore o minore importanza a seconda del tipo di ambiente o di momento in cui ci si trova, ma, generalmente, la POM, ad eccezione che durante le fioriture fitoplanctoniche (Posedel e Faganeli, 1991; Velimirov, 1991), è tipicamente dominata dalla frazione detritale.

I metodi utilizzati nello studio della POM non consentono di quantificare direttamente la frazione vivente da quella detritale. È tuttavia possibile stimarne la relativa importanza sottraendo dalla concentrazione totale di POM la frazione identificata come biomassa. Ad esempio, alcuni autori hanno stimato il contributo della frazione vivente autotrofa sottraendo alle concentrazioni di POM quelle di biomassa algale stimate a partire dalle concentrazioni di clorofilla *a* o quelle di procarioti totali (Danovaro *et al.*, 2000; Fabiano *et al.*, 2001). Studi condotti nelle acque costiere del Mediterraneo indicano che la percentuale di POM associata a biomassa è massima fino a circa 30 m di profondità, mentre oltre i 60 m la componente detritale diventa dominante (Bode *et al.*, 1994).

La POM può derivare da diversi processi quali: i) produzione primaria fitoplanctonica e produzione secondaria batterica; ii) formazione diretta di detrito da frammenti di organismi morti o loro prodotti di escrezione; iii) formazione di agglomerati e aggregazione di molecole organiche; iv) flocculazione o adsorbimento di sostanze organiche su particelle inorganiche.

La POM viene rapidamente decomposta od utilizzata nelle zone più superficiali della colonna d'acqua e solo una minima parte di questa raggiunge le grandi profondità. Il trasporto verticale della POM, tuttavia,

dipende anche dalle relative dimensioni delle particelle, dalle caratteristiche fisiche e dinamiche della colonna d'acqua nonché dai tassi di utilizzo da parte dei pascolatori.

Formazione di macro-aggregati e produzione di particelle fecali (*faecal pellet*), cioè i prodotti di escrezione dello zooplancton, sono i due processi fondamentali attraverso i quali si producono particelle aventi una velocità di sedimentazione maggiore di 100 m d⁻¹. Queste particelle, anche se riescono a raggiungere grandi profondità (Wassman, 1991; Graf, 1992), sono, comunque, soggette all'azione degli organismi eterotrofi (Bauerfeind *et al.*, 1994). Questa "pioggia" di POM rappresenta la principale fonte di energia per gli organismi degli ambienti afotici e di conseguenza la principale connessione trofica tra il comparto pelagico e quello bentonico (*pelagic-benthic coupling*). Una porzione variabile della POM che arriva sul fondo marino può subire un processo di "burial" ovvero di infossamento, attraverso il quale viene immobilizzata nei sedimenti.

Gordon (1970) ha proposto una suddivisione generale delle particelle in quattro gruppi fondamentali: aggregati (60-80%), fiocchi (10-20%), frammenti (3-5%) e particelle non identificabili. Gli aggregati sono formazioni amorfe ed eterogenee legate da una matrice gelatinosa ricca in carboidrati e presentano dimensioni variabili (10-200 µm). Questi aggregati sono lo stadio iniziale di formazione della "neve marina", la cui formazione è stata riconosciuta come uno dei più importanti meccanismi di trasporto del carbonio organico particellato dalle acque superficiali verso le acque profonde (Alldredge e Silver, 1988). Esacerbati della neve marina possono portare alla formazione di aggregati mucilluginosi di dimensioni superiori al metro, per lo più composti di carboidrati complessi (Mecozzi *et al.*, 2005). I fiocchi sono formazioni con bordi irregolari, possono essere globulari (0,02-0,6 µm) o lamellari e sono prevalentemente costituiti da particelle di natura proteica (Fabiano *et al.*, 1994). Si ritrovano in profondità, in forma singola o agglomerata, ma, diversamente dagli aggregati, presentano una frazione inorganica meno rilevante e sono più resistenti alla degradazione batterica. Le particelle più piccole, difficili da classificare, ed i frammenti non identificabili sono abbondanti a tutte le profondità.

L'importanza trofica della POM ha attratto diverse centinaia di studi. Molti di questi hanno riguardato lo studio del contenuto di carbonio organico totale (POC; *Particulate Organic Carbon*; es. Smaal *et al.*, 1986; Berg e Newell 1986; Painchaud e Therriault, 1989; Fabiano e Povero, 1992). Altri hanno studiato le particelle sospese mettendo in relazione le dimensioni con il potenziale utilizzo da parte dei filtratori (Muschenheim, 1987a; 1987b; Mayer *et al.*, 1993; Arfi e Bouvy, 1995). Altri ancora si sono interessati della composizione biochimica del particellato (Tanoue, 1985; Poulet *et al.*, 1986; Mayzaud *et al.*, 1989; Fichez, 1991a, 1991b; Roy *et al.*, 1991; Fabiano *et al.*, 1993; Navarro *et al.*, 1993; Navarro e Thompson, 1995; Pusceddu e Fabiano, 1996; Pusceddu *et al.*, 1996, 1997; Sarà *et al.*, 1999; Pusceddu *et al.*, 2005).

La quantità di carbonio ed azoto organici particellati (POC, *Particulate Organic Carbon*; PON *Particulate Organic Nitrogen*) sono eccellenti stimatori della quantità di materiale organico in sospensione, ed il rapporto C:N nelle particelle è spesso utilizzato come descrittore della qualità alimentare e/o origine delle particelle. Valori di questo rapporto tra 4 e 10 indicano la presenza di POM di elevata qualità alimentare (in ragione della maggiore disponibilità di azoto) e dominata da componenti viventi (procarioti e fitoplancton); valori >10 ed oltre indicano una POM di qualità alimentare decrescente e progressivamente dominata da materiale detritale. Tuttavia, sia POC sia PON sono pool organici assai eterogenei composti da combinazioni differenti e variabili delle tre principali classi di composti organici: proteine, carboidrati e lipidi, la cui somma, in equivalenti di C, è sovente riportata come frazione biopolimerica della POM (Danovaro e Fabiano, 1997; Fabiano e Pusceddu, 1998).

Sin dalla seconda metà degli anni '70, numerosi studi hanno riguardato il valore trofico ed alimentare della POM considerata cibo potenziale per gran parte degli organismi sospensivori e detritivori del benthos (Bianchi e Levington, 1984; Tenore, 1975, 1977; Tenore *et al.*, 1982). Tali studi misero in evidenza che la quantità della POM spesso non coincide con la sua reale "disponibilità alimentare" (*food availability*) se non in particolari condizioni (Jumars e Wheatcroft, 1989). La qualità alimentare della POM oltre che stimata dai valori del rapporto C:N, è stata stimata anche in termini dei valori del rapporto tra proteine e carboidrati, utilizzato in letteratura come indice qualitativo della materia organica (Fabiano *et al.*, 1993;

Pusceddu *et al.*, 1999; Sarà *et al.*, 1999; Pusceddu *et al.*, 2000). Valori bassi (<1) del rapporto indicano una limitata qualità alimentare, mentre valori >1 indicano la presenza di POM di recente formazione e di valore alimentare più elevato. Un altro stimatore della qualità alimentare della POM è il rapporto tra concentrazione della POM e seston (Navarro *et al.*, 1993; Sarà *et al.*, 1999).

36.2 MATERIA ORGANICA PARTICELLATA IN ACQUA

36.2.1 Metodi di campionamento e conservazione dei campioni

Il campionamento della POM si effettua preferibilmente mediante bottiglie di tipo Niskin o, laddove la profondità dell'acqua non lo consenta, mediante qualsiasi dispositivo di raccolta manuale, purché debitamente e preventivamente pulito con risciacqui ripetuti delle pareti interne con una soluzione di HCl 0,1 N e successivi risciacqui con acqua grado reagente. Una volta a bordo, al fine di evitare la sedimentazione delle particelle più pesanti, il campionatore deve essere agitato delicatamente per qualche minuto, per poi procedere alla spillatura di aliquote variabili di acqua, il cui volume dipenderà dalla concentrazione attesa di POM (da 100 a 2000 ml). Il campione viene quindi rapidamente filtrato su membrane di porosità nominale di 0,45 µm (GF/F Whatman, diametro 23 mm, precedentemente calcinate a 450°C per 4 ore e reidratate con qualche mL di acqua grado reagente) in pressione da vuoto non superiore a 20 kPa (150mm Hg) al fine di evitare la disgregazione delle particelle. Al termine della filtrazione, la membrana viene analizzata immediatamente o, ripiegata in due a mezzaluna, conservata in freezer a -20°C. In tale evenienza, le analisi devono essere effettuate entro una-due settimane.

36.2.2 Carboidrati totali nel particellato

36.2.2.1 Protocollo Dubois *et al.* (1956)

La concentrazione dei carboidrati totali è normalmente determinata secondo il metodo di Dubois *et al.* (1956). Questo metodo colorimetrico sfrutta la reazione tra gli zuccheri ed il fenolo in presenza di acido solforico concentrato. La metodica è aspecifica e permette di determinare i glucidi totali compresi quelli strutturali.

La membrana contenente il filtrato viene posta in una provetta di vetro di volume non inferiore a 15 ml. Al campione vengono aggiunti 0,5 ml di acqua grado reagente. Con l'ausilio di una bacchetta di vetro con la punta smussata e molata, la membrana viene disgregata dentro la provetta fino ad ottenere una poltiglia lattiginosa. La bacchetta di vetro viene risciacquata dentro la provetta utilizzando altri 0,5 ml di acqua grado reagente, così che il volume d'acqua dentro la provetta raggiunge 1 ml. Al campione si aggiunge 1 ml di una soluzione al 5% in acqua di fenolo distillato. La miscela viene quindi agitata mediante vortex per 1 min e lasciata reagire a temperatura ambiente per 10 minuti. Trascorsi i 10 minuti si aggiungono alla miscela acqua-fenolo 5 ml di acido solforico concentrato (96% titolo minimo) al fine di favorire l'idrolisi di tutti i composti glucidici. La reazione che si verifica è fortemente esotermica e funge da agente idrolitico dei carboidrati nel campione (Dubois *et al.*, 1956). La violenza della reazione esotermica è tale che l'aggiunta dell'acido solforico deve essere effettuata molto lentamente, possibilmente con l'ausilio di un dosatore automatico. Per garantire una soddisfacente idrolisi dei vari oligo- e poli-saccaridi presenti nel campione la provetta può essere lasciata a temperatura ambiente per 24 ore. Questa procedura di mantenimento in ambiente acido è stata suggerita da differenti studi i quali hanno mostrato recuperi di carboidrati più elevati (Pakulski e Benner, 1992; Borch e Kirchmann, 1997). I migliori recuperi ottenuti prolungando il tempo di permanenza in ambiente acido a temperatura ambiente dipendono dal fatto che altre procedure di idrolisi con H₂SO₄ o HCl a temperature più elevate (tra 100

e 150°C) producono comunque l'ossidazione parziale dei carboidrati con conseguente perdita di accuratezza analitica del metodo (Ledl e Schleicher, 1990).

Dopo questo periodo di permanenza in ambiente acido, la provetta contenente la miscela di reazione va agitata mediante vortex per almeno 1 minuto. Questa fase della procedura va anch'essa effettuata con estrema cautela a causa dell'elevata temperatura che si sviluppa in seguito alla reazione. Al termine dell'agitazione la miscela di reazione avrà assunto una tonalità di colore compresa tra il giallo paglierino ed il marrone scuro. Le provette sono infine centrifugate per 30 minuti a 1500 x g. Alla stessa maniera dei campioni sono trattati anche un bianco reagente (1 ml di acqua grado reagente) ed una serie di soluzioni standard di D(+) glucosio a concentrazione decrescente (a partire da 1 mg ml⁻¹, limite massimo oltre il quale la relazione tra assorbanza e concentrazione non è più lineare).

Al termine della centrifugazione si può quindi procedere alla lettura mediante spettrofotometro. Mediante una pipetta Pasteur in vetro, privata dell'apice sottile, un'aliquota di circa 2,5 ml del soprannatante è introdotta in una cuvetta in vetro ottico (5- 10 mm di passo ottico). L'assorbanza del campione è letta alla lunghezza d'onda di 490 nm contro un bianco di acqua grado reagente. Il calcolo della concentrazione viene effettuato sulla base di curve di taratura ottenute facendo reagire soluzioni standard di D(+)Glucosio secondo la metodica descritta. Il limite di rilevazione del metodo è intorno a 2,5 µg di D(+)glucosio per mL di soluzione reagente. La riproducibilità del metodo è tale da ridurre la variabilità tra repliche di standard di D(+)Glucosio entro un coefficiente di variazione (CV) pari al 6%.

La concentrazione di carboidrati ottenuta nella miscela di reazione va infine rapportata al volume di acqua filtrata, ed espressa in termini di µg equivalenti di D(+)Glucosio per Litro, secondo l'equazione seguente:

$$\text{CHO } (\mu\text{g l}^{-1}) = \{[(A_{490} - A_{490\text{bks}}) \cdot C] + K\} \cdot V_f^{-1}$$

dove:

A_{490} = assorbanza del campione a 490 nm

$A_{490\text{bks}}$ = assorbanza del bianco reagente (media di 3 repliche)

C = coefficiente della retta ottenuta mediante interpolazione lineare tra assorbanza (variabile indipendente) e concentrazione (variabile dipendente, in µg ml⁻¹) delle soluzioni standard di D(+)glucosio. C assume normalmente un valore intorno a 100, se l'interpolazione è del tipo CONCENTRAZIONE (µg ml⁻¹) = [ASSORBANZA · C] + K

K = costante della retta ottenuta dall'interpolazione lineare tra assorbanza (variabile indipendente) e concentrazione (variabile dipendente, in µg ml⁻¹) delle soluzioni standard di D(+)glucosio.

V_f = volume d'acqua filtrata in litri

In taluni casi è possibile che l'assorbanza sia talmente elevata da portare fuori scala la lettura del campione allo spettrofotometro. È bene evitare tale condizione, ma qualora si verificasse si consiglia di ripetere l'analisi con campioni ottenuti per filtrazione di volumi d'acqua inferiori. Qualora questa procedura portasse al medesimo problema o non fosse possibile (e.g. per l'impossibilità di recuperare il campione), è possibile ricorrere alla diluizione del campione, utilizzando il prodotto della reazione del bianco reagenti o acqua deionizzata. In entrambi i casi, però, la risposta dell'assorbanza alla diluizione non è mai lineare, motivo per il quale si consiglia di ricorrere, in tali evenienze, al calcolo di un fattore di correzione determinato sperimentalmente.

Il protocollo Dubois, causa la sua semplice metodica di esecuzione, è stato a sua volta sottoposto ad alcune modifiche. Una di queste consiste nell'effettuare l'idrolisi dei polisaccaridi prima della derivatizzazione con fenolo mediante ultrasuoni (Mecozzi *et al.*, 1999). Questo metodo consente una consistente riduzione dei tempi di analisi conservando comunque l'accuratezza analitica ottenibile con i prolungati tempi di idrolisi ottenuti con H₂SO₄ a temperatura ambiente.

Altri metodi per la determinazione dei carboidrati totali in campioni sono quello mediante 3-methyl-2-benzothiazolinone idrazone hydrochloride (Johnson e Sieburth, 1977) e quello mediante 2,4,6 tri-

pyridil-s-triazine (Myklestad *et al.*, 1997). Questi metodi sono certamente più sensibili del metodo di Dubois ma presentano comunque una procedura operativa più complessa. Per completezza si riporta di seguito il protocollo di Parsons *et al.* (1984), a sua volta basato sulla metodica di colorazione MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate). Per completezza di informazione si riporta che le due metodiche: 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride (MBTH) e 2,4,6 trypiridil-s-triazine (TPTZ) messe a confronto danno risultati soddisfacenti per l'uniformità dei valori ottenuti riguardo alla determinazione dei carboidrati totali nelle acque di mare (Penna *et al.*, 2000; 2003)

36.2.2.2 Protocollo Parsons et al. (1984)

Un'altra metodica di riferimento per la determinazione dei carboidrati nel materiale organico particellato è quella proposta da Parsons *et al.* (1984). Il filtro contenente materiale particellato viene posto in provette pirex con 10 ml di HCl 0,1 M. Dopo essere stati sigillati con tappi in silicone rivestiti in teflon, si effettua un trattamento idrolitico per 20 ore a 100°C. Dopo l'idrolisi, il campione viene filtrato su membrana GF/C pre-combusta (500°C per 4 ore). Il filtrato viene quindi neutralizzato con sodio idrossido 2M fino a pH alcalino (circa 9) e successivamente ridotto con potassio boroidruro al 2%. La reazione di riduzione viene terminata con l'aggiunta di HCl 2M.

Si procede poi alla determinazione colorimetrica secondo la metodica di colorazione MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride monohydrate) descritta in dettaglio nel paragrafo 3.3. Per la calibrazione strumentale si impiegano soluzioni standard di glucosio nel range di concentrazione 1-10 mg l⁻¹ di glucosio. Tutti i campioni vengono analizzati in tre repliche. Il coefficiente di variazione (CV) per la metodica suddetta è generalmente inferiore al 5%. La concentrazione dei carboidrati totali particellati (espressa in mg l⁻¹) viene quindi rapportata al volume di acqua filtrata secondo la seguente espressione:

$$\text{Concentrazione di carboidrati (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(Ec - Eb) \times F}{V}$$

dove:

Ec = estinzione media (in tre repliche) del campione estratto.

Eb = estinzione media (in due repliche) del bianco analitico.

V = volume in litri di acqua di mare filtrata.

$$F = \text{fattore colorimetrico} = \frac{Cst}{Ast - Ab}$$

dove:

Cst = concentrazione standard utilizzato (glucosio)

Ast = estinzione media (in tre repliche) dello standard

Ab = estinzione media (in due repliche) del bianco analitico.

Il volume filtrato dipenderà dalla concentrazione attesa di carboidrati particellati (in genere da 200 a 1000 ml). Se l'assorbanza dovesse essere talmente elevata da portare fuori scala la lettura spettrofotometrica del campione, sarà necessario ripetere l'analisi con campioni ottenuti per filtrazione di volumi d'acqua inferiori.

36.2.2.3 Determinazione di carboidrati uronici totali

Il metodo di Dubois precedentemente illustrato presenta una diversa sensibilità analitica rispetto alle tipologie di carboidrati presenti nell'ambiente acquatico. Infatti gli acidi uronici, che rappresentano una non trascurabile frazione dei carboidrati totali, quando trattati con il metodo di Dubois danno a parità di concentrazione con i carboidrati neutri, un segnale di intensità inferiore di circa un terzo. Differenti

sensibilità sono riportate anche per il metodo di determinazione dei carboidrati totali conosciuto come metodo al 2,4,6 tripiridil-s-triazine (Myklestad *et al.*, 1997). Per un altro metodo utilizzato per la determinazione dei carboidrati totali, conosciuto come metodo al methyl-2-benzothiazolinone idrazone idrocloride (Johnson e Sieburth, 1977), non sono riportati studi specifici per la reattività degli acidi uronici. La differente sensibilità analitica degli acidi uronici rispetto ai carboidrati neutri comporta così che ogni altro metodo tenda a sottostimare il quantitativo totale di carboidrati presenti nel campione.

Per una più accurata stima dei carboidrati può quindi essere utile determinare i carboidrati totali con un metodo come quello di Dubois ed associarvi la determinazione del tenore in carboidrati totali di tipo uronico.

Un metodo analitico adatto allo scopo è il metodo di Blumenkranz e Asboe-Hansen (1973) il quale sostanzialmente consiste in una modifica del metodo di Dubois. Infatti tale metodo sostituisce il fenolo previsto dal metodo di Dubois con il 3-fenilfenolo. Con questo reagente reagiscono solo gli acidi uronici mentre i carboidrati neutri tipo glucosio non danno luogo ad alcuna reazione e quindi a nessun prodotto colorato.

Per l'applicazione del metodo di Blumenkranz e Asboe-Hansen si può procedere utilizzando una seconda aliquota di campione mediante una procedura analoga a quella del metodo di Dubois secondo quanto segue:

1. sostituire il fenolo con una soluzione di pari concentrazione di 3-fenilfenolo;
2. calibrare lo spettrofotometro con soluzioni di acido glucuronico in un intervallo di concentrazione analogo a quello del glucosio utilizzato per il metodo di Dubois.;
3. effettuare la lettura spettrofotometrica a 470 nm.

Dato che la stabilità dei polimeri degli acidi uronici è addirittura superiore a quella dei carboidrati neutri, è comunque fondamentale lasciare il campione nell'ambiente acido da H_2SO_4 per alcune ore (~ 3 ore) come già raccomandato nell'analisi dei carboidrati totali mediante metodo di Dubois.

36.2.3 Proteine totali nel particellato

Esistono diverse metodiche per l'estrazione ed il dosaggio delle proteine in campioni naturali (Bradford, 1976; Rice, 1982; Mayer *et al.*, 1986,. Tra questi, i metodi più comunemente utilizzati sono, certamente, quello di Bradford (1976) e quello di Hartree (1972), quest'ultimo, a sua volta, derivato dall'originario metodo di Lowry *et al.*, (1951), modificato da Rice (1982). Dati sperimentali prodotti in laboratorio hanno dimostrato che i due protocolli producono risultati simili in termini di equivalenti di albumina di siero bovino (Berges *et al.*, 1993). In questo contributo si riporta, con l'aggiunta di alcune modifiche, la procedura prevista dal metodo di Hartree (1972), adattato da Rice (1982) per eliminare le interferenze dei composti fenolici. Questo metodo colorimetrico sfrutta la proprietà delle proteine di reagire in una prima reazione con il tartrato rameico (un atomo di Cu si lega ogni circa quattro residui aminoacidici) ed in una seconda reazione con il reattivo di Folin-Ciocalteu in ambiente basico (pH 10). L'aggiunta di reattivo Folin-Ciocalteu, a base di fenolo e di fosfomolibdato, permette di ottenere una colorazione blu stabile e proporzionale al tenore proteico nella miscela di reazione.

La membrana contenente il filtrato viene posta in una provetta di vetro di volume non inferiore a 15 ml. Al campione vengono aggiunti 0,5 ml di acqua grado reagente. Con l'ausilio di una bacchetta di vetro con la punta smussata e molata, la membrana viene disgregata dentro la provetta fino ad ottenere una poltiglia lattiginosa. La bacchetta di vetro viene risciacquata dentro la provetta utilizzando altri 0,5 ml di acqua grado reagente, così che il volume d'acqua dentro la provetta raggiunge 1 ml. La composizione e le ricette per la preparazione delle tre soluzioni (A, B e C) necessarie al dosaggio delle proteine sono riportate in Tab. 1. Al campione si aggiungono 0,9 ml di una soluzione (A) contenente Na-K tartrato e Na_2CO_3 anidro in ambiente basico. La provetta, debitamente tappata ed agitata mediante vortex è messa in bagno termostatico ($50^\circ C$) per 10 minuti, al termine dei quali si aggiungono 0,1 ml di una soluzione (B) contenente $CuSO_4$ pentaidrato. La provetta contenente il campione è, a questo

Tab. 1 - Composizione e preparazione delle tre soluzioni necessarie al dosaggio delle proteine secondo Hartree (1972).

Soluzione A

- 2 g di sodio potassio tartrato + 100 g di carbonato di sodio (Na_2CO_3) anidro sono sciolti in 500 ml di una soluzione di soda (NaOH) 1 N (20 g in 500 ml di acqua grado reagente)
- la soluzione ottenuta, che deve risultare incolore e limpida, viene portata a 1000 ml con acqua grado reagente

La soluzione dovrebbe essere conservata preferibilmente in frigorifero (4 °C) ed è stabile per 2-3 mesi, dopo i quali, il carbonato tende a precipitare e la soluzione non è più utilizzabile.

Soluzione B

- 2 g di sodio potassio tartrato + 1 g di solfato di rame (CuSO_4) sono sciolti in 90 ml d'acqua grado reagente
- alla soluzione così preparata, di un blu leggermente opaco, si aggiungono 10 ml di una soluzione di NaOH 1 N

La soluzione finale, di un limpido blu, conservata in frigorifero è stabile pressoché indefinitamente

Soluzione C

- 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu vengono diluiti con 15 ml di acqua grado reagente

La soluzione, di un limpido giallo paglierino, è particolarmente instabile e va preparata pochi minuti prima dell'utilizzo

punto, agitata vigorosamente mediante vortex e lasciata riposare per 10 minuti a temperatura ambiente. Trascorsi questi ultimi, si aggiungono 3 ml di una soluzione (C) contenente il reattivo di Folin-Ciocalteu. Dopo l'aggiunta del reattivo di Folin-Ciocalteu, la provetta è agitata mediante vortex e messa in bagno termostatico (50°C) per altri 10 minuti, trascorsi i quali le provette sono centrifugate per 15 minuti a 800 x g.

Al termine della centrifugazione si può quindi procedere alla lettura mediante spettrofotometro. Mediante una pipetta Pasteur in vetro, un'aliquota di circa 2,5 ml del soprannatante è introdotta in una cuvetta in vetro ottico (1 cm di passo ottico). L'assorbanza del campione è letta alla lunghezza d'onda di 650 nm contro un bianco d'acqua grado reagente. Alla stessa maniera dei campioni sono trattati anche un bianco reagente (1 ml di acqua grado reagente) ed una serie di standard di albumina bovina (BSA) a concentrazione decrescente (a partire da 1 mg ml⁻¹, limite massimo oltre il quale la relazione tra assorbanza e concentrazione non è più lineare).

La concentrazione proteica nel campione è determinata sulla base delle rette di taratura ottenute facendo reagire soluzioni acquose di albumina bovina (BSA) secondo la metodica descritta. Il limite di detezione del metodo è di circa 2,5 µg di BSA per mL⁻¹ di soluzione reagente. La riproducibilità del metodo tra repliche di standard di albumina bovina presenta normalmente un coefficiente di variazione (CV) inferiore al 7%.

La concentrazione di proteine (PRT) nella miscela di reazione va infine rapportata al volume di acqua filtrata ed espressa in termini di µg l⁻¹:

$$\text{PRT } (\mu\text{g L}^{-1}) = \{[(A_{650} - A_{650\text{bikr}}) \cdot C] + K\} \cdot V_f^{-1}$$

dove:

A_{650c} = assorbanza del campione a 650 nm

A_{650bkr} = assorbanza del bianco reagente (media di 3 repliche)

C = coefficiente della retta ottenuta dall'interpolazione lineare tra assorbanza (variabile indipendente) e concentrazione (variabile dipendente, in $\mu\text{g ml}^{-1}$) delle soluzioni standard di albumina bovina.

C assume normalmente un valore intorno a 300, se l'interpolazione è del tipo
CONCENTRAZIONE ($\mu\text{g ml}^{-1}$) = [ASSORBANZA · C] + K

K = costante della retta ottenuta dall'interpolazione lineare tra assorbanza (variabile indipendente) e concentrazione (variabile dipendente, in $\mu\text{g ml}^{-1}$) delle soluzioni standard di albumina bovina.

V_f = volume d'acqua filtrata in litri

In taluni casi è possibile che l'assorbanza sia talmente elevata da portare fuori scala la lettura del campione allo spettrofotometro. È bene evitare tale condizione, ma qualora si verificasse si consiglia di ripetere l'analisi con campioni ottenuti per filtrazione di volumi d'acqua inferiori. Qualora questa procedura portasse al medesimo problema o non fosse possibile (e.g. per l'impossibilità di recuperare il campione), è possibile ricorrere alla diluizione del campione, utilizzando il prodotto della reazione del bianco reagenti o acqua deionizzata. In entrambi i casi, però, la risposta dell'assorbanza alla diluizione non è mai lineare, motivo per il quale si consiglia di ricorrere, in tali evenienze, al calcolo di un fattore di correzione determinato sperimentalmente.

36.2.4 Lipidi totali nel particellato

L'analisi dei lipidi totali è effettuata previa estrazione mediante solventi organici (Bligh e Dyer, 1959) e determinazione colorimetrica dopo carbonizzazione (Marsh e Wenstein, 1966).

La membrana viene posta in una provetta di vetro di volume non inferiore a 15 ml. Al campione vengono aggiunti 0,5 ml di acqua grado reagente. Con l'ausilio di una bacchetta di vetro con la punta smussata e molata, la membrana viene disgregata dentro la provetta fino ad ottenere una poltiglia lattiginosa. La bacchetta di vetro viene risciacquata dentro la provetta utilizzando altri 0,5 ml di acqua grado reagente, così che il volume d'acqua dentro la provetta raggiunge 1 ml. Al campione così trattato si aggiungono 1,25 ml di cloroformio e 2,5 ml d'alcool metilico a temperatura ambiente. Le provette vigorosamente agitate mediante vortex (1 min) ed adeguatamente tappate, sono lasciate reagire per 10 minuti in frigorifero (4°C), dopo i quali si centrifugano (800 x g per 10 min). Il sovratanante è recuperato con l'uso di una pipetta Pasteur in vetro e trasferito in provette in vetro Pyrex, nelle quali si aggiungono 1,25 ml di cloroformio e 1,25 ml di acqua grado reagente. Dopo vigorosa agitazione (mediante vortex per almeno 1 minuto) necessaria alla formazione dell'emulsione tra acqua, metanolo e cloroformio, le provette vengono centrifugate a 800 x g per 5 minuti per separare la frazione idroalcolica sovratanante (acqua e metanolo) dalla frazione in cloroformio. La frazione idroalcolica è scartata ed il residuo in provetta posto ad evaporare in bagno termostatico a secco, ad una temperatura compresa tra 90 e 100°C. Al residuo lipidico così ottenuto e lasciato raffreddare a temperatura ambiente si aggiungono 2 ml di acido solforico concentrato (96% titolo minimo). Le provette sono quindi poste a reagire in bagno a secco termostatico (200°C per 15 minuti). Nel corso della reazione di carbonizzazione l'acido assume una colorazione dal giallo paglierino al marrone scuro. Dal bagno a secco le provette sono immediatamente trasferite prima in bagnomaria a temperatura ambiente (15 sec), e successivamente in un bagno di ghiaccio (5 min). Al campione così carbonizzato si aggiungono 3 ml di acqua grado reagente. Le provette sono agitate vigorosamente mediante vortex. Un bianco reagente (1 ml di cloroformio) ed una serie di soluzioni standard di tripalmitina a concentrazione decrescente (a partire da 1 mg ml⁻¹, limite massimo oltre il quale la relazione tra assorbanza e concentrazione non è più lineare) sono trattate come i campioni.

Mediante una pipetta Pasteur in vetro, un'aliquota di circa 2,5 ml del sovratanante è introdotta in una cuvetta in vetro ottico (1 cm di passo ottico). L'assorbanza del campione è letta alla lunghezza d'onda di 375 nm contro un bianco d'acqua grado reagente. Il calcolo della concentrazione lipidica nel campione

è effettuato in funzione di curve di taratura, ottenute facendo reagire soluzioni standard (in cloroformio) di tripalmitina secondo la metodica descritta. Il limite di detezione del metodo è di circa 5 µg di tripalmitina per ml. La riproducibilità del metodo è tale da ridurre la variabilità tra repliche di standard di tripalmitina, entro un coefficiente di variazione (CV) inferiore al 8 %.

La concentrazione di lipidi (LIP) nella miscela di reazione va infine rapportata al volume di acqua filtrata ed espressa in termini di µg equivalenti di tripalmitina per litri:

$$\text{LIP } (\mu\text{g l}^{-1}) = \{[(A_{375} - A_{375\text{blkr}}) \cdot C] + K\} \cdot V_f^{-1}$$

dove

A_{375} = assorbanza del campione a 375 nm

$A_{375\text{blkr}}$ = assorbanza del bianco reagente (media di 3 repliche)

C = coefficiente della retta ottenuta dall'interpolazione lineare tra assorbanza (variabile indipendente) e concentrazione (variabile dipendente, in µg ml⁻¹) delle soluzioni standard di tripalmitina. C assume normalmente un valore compreso tra 230 e 300, se l'interpolazione è del tipo CONCENTRAZIONE (µg ml⁻¹) = [ASSORBANZA · C] + K

K = costante della retta ottenuta dall'interpolazione lineare tra assorbanza (variabile indipendente) e concentrazione (variabile dipendente, in µg ml⁻¹) delle soluzioni standard di tripalmitina

V_f = volume d'acqua filtrata in litri

36.2.5 Coefficienti di conversione

Le concentrazioni di carboidrati, proteine e lipidi sono trasformati in equivalenti di carbonio usando i coefficienti 0,40, 0,49 e 0,75 µg C µg⁻¹ rispettivamente (Fabiano *et al.*, 1995), ottenuti in funzione degli standard utilizzati (glucosio, albumina bovina, tripalmitina). In letteratura la somma delle concentrazioni degli equivalenti in carbonio delle tre principali componenti biochimiche della sostanza organica è di sovente riportata come frazione biopolimerica del carbonio organico (BPC, Fabiano *et al.*, 1995; Pusceddu *et al.*, 2000). La differenza tra carbonio organico totale (*Total Organic Carbon*, TOC) e il carbonio biopolimerico (*biopolymeric carbon*, BPC) è definita carbonio geopolimerico (*geopolymeric carbon*, GPC).

36.2.6 DNA nel particolato

Gli acidi nucleici particellati possono essere quantificati attraverso metodi spettrofotometrici (Fabiano *et al.*, 1993; Fabiano *et al.*, 1996) o metodi fluorometrici in cui vengono impiegati fluorocromi (Paul e Myers 1982; Paul e Carlson 1984; Berdalet e Dortch, 1991; Boehme *et al.*, 1993; Fara *et al.*, 1996; Jeffrey *et al.*, 1996; Dell'Anno *et al.*, 1999) o specifici reagenti (i.e. acido diamminobenzoico, Karl e Bailiff 1989). Jones *et al.* (1995) confrontando tre differenti metodi (spettrofotometrico con difenilamina; fluorometrico con Hoechst e fluorometrico con acido diamminobenzoico) per la determinazione degli acidi nucleici in colture algali ed in campioni di acqua di mare, hanno dimostrato che le concentrazioni di DNA ottenute con l'acido diamminobenzoico (DABA) non sono significativamente differenti da quelle ottenute con la difenilamina, ma presentano un coefficiente di variazione decisamente inferiore (CV = 5-6% e CV = 13-42%, rispettivamente), mentre le concentrazioni di DNA ottenute con l'Hoechst 33258 sono significativamente più basse. Analoghi risultati sono stati ottenuti dal confronto tra le concentrazioni di DNA nei sedimenti marini ottenute attraverso metodi colorimetrici basati sull'utilizzo della difenilamina e quelli fluorometrici basati sull'utilizzo di fluorocromi specifici (i.e. Hoechst 33258; Dell'Anno *et al.* 1998). Le differenze tra le due metodologie sono da attribuire sia alle differenti procedure di estrazione del DNA necessarie per le successive determinazioni analitiche sia alle differenti reazioni coinvolte tra DNA e

composto chimico. In particolare, è noto che la difenilamina, così come il DABA, reagisce con i deoxipentosi del DNA, mentre i fluorocromi interagiscono con la doppia elica del DNA. Affinché avvenga la reazione tra difenilamina/DABA e deoxipentosi del DNA è necessario che il DNA sia preventivamente idrolizzato a caldo ed in ambiente acido. Questa idrolisi chimica del DNA non può essere utilizzata per determinazioni delle concentrazioni del DNA attraverso l'impiego di fluorocromi specifici dal momento che la loro interazione dipende dall'integrità strutturale del materiale genetico stesso. Inoltre l'intensità della fluorescenza con i fluorocromi (i.e. Hoechst 33258) è anche funzione della composizione in basi del DNA (A+T e G+C) e della presenza di DNA frammentato/denaturato nel campione (i.e. DNA detritale non associato a biomassa), che, al contrario, non influenzano i composti che reagiscono con i deoxizuccheri (Dell'Anno *et al.*, 1998; Dell'Anno e Danovaro 2001). Tuttavia il limite di rilevabilità dei metodi colorimetrici è molto minore rispetto a quelli fluorimetrici (tipicamente di 1 o 2 ordini di grandezza) e per tale ragione, i metodi fluorimetrici dovrebbero essere privilegiati per la determinazione del DNA particellato in campioni provenienti da aree oligotrofe.

In tale contesto qui di seguito viene descritta la metodica fluorimetrica basata sull'utilizzo del DABA per la determinazione del DNA particellato che rappresenta il migliore compromesso tra limite di rilevabilità analitico e stima del *pool* totale di DNA presente nel campione, inclusa la frazione di DNA detritale (Dell'Anno *et al.*, 2002).

36.2.7 Analisi del DNA particellato

L'estrazione del DNA particellato viene effettuata secondo il metodo descritto da Bailiff e Karl (1991). Tale procedura di estrazione prevede che i campioni d'acqua di mare (500-2000 ml) siano filtrati su membrane in acetato di cellulosa da 0,2 μm (e.g. Millipore GS), dal momento che la filtrazione su filtri in fibra di vetro può interferire nelle successive operazioni di estrazione e quantificazione degli acidi nucleici.

La membrana viene posta in una eppendorf di volume 2 ml. Ai campioni vengono aggiunti 1,6 ml di acetone al 100% ed i campioni incubati per un'ora a -20°C . Al termine dell'incubazione i campioni vengono centrifugati a 10000 x g per 10 minuti. Al termine della centrifugazione, viene eliminato il sovrantante ed il pellet viene risospeso in 1,6 ml di acetone 100%, incubato per 30 minuti a -20°C e centrifugato a 10000 x g per 10 minuti. Questa operazione deve essere ripetuta per altre due volte. Al termine dell'ultima centrifugazione, il sovrantante viene ancora eliminato ed il pellet viene risospeso in 1,6 ml di una soluzione di acetone al 90% ed immediatamente centrifugato a 10000 x g per 10 minuti. Al termine della centrifugazione il sovrantante viene eliminato ed il pellet viene risospeso in 1,5 ml di una soluzione di acido tricloroacetico al 10% e sonicato per tre minuti (con interruzione di 30 secondi ogni minuto). Dopo centrifugazione a 10000 x g per 10 minuti, il pellet viene lavato due volte in 1,5 ml di etanolo al 95% ed infine asciugato con una centrifuga da vuoto o alternativamente a temperatura ambiente sotto cappa a flusso laminare (per evitare contaminazioni da DNA esogeno). In seguito il pellet viene risospeso in 200 μl di una soluzione di idrossido di ammonio 1M ed i campioni trasferiti in provette sterili da almeno 10 ml. I campioni vengono quindi portati a secco in stufa ad una temperatura non superiore a 60°C . Ai campioni vengono aggiunti 100 μl di acido 3,5-diaminobenzoico di-idrocloridrico (DABA 2HCl, 400 mg ml^{-1} di acqua grado reagente Milli-Q) ed incubati per un'ora a 60°C , agitando gentilmente ogni 10 minuti per ottimizzare la reazione. Al termine dell'incubazione, ai campioni vengono aggiunti 4,9 ml di una soluzione di HCl 1N ed i campioni centrifugati a 3000 x g per 10 minuti.

Mediante una pipetta Pasteur in vetro, un'aliquota di circa 2,5 ml del sovrantante è introdotta in una cuvetta in vetro ottico (1 cm di passo ottico). La fluorescenza del campione è letta con una lunghezza d'onda di eccitazione di 405 nm ed una di emissione di 520 nm. Il calcolo della concentrazione di DNA nel campione è effettuato in funzione di curve di taratura, ottenute facendo reagire soluzioni standard di DNA (e.g., di salmone o di *Escherichia coli*) secondo la metodica descritta. Il limite di detezione del

metodo è di circa 100 ng di DNA per ml. La riproducibilità del metodo è tale da ridurre la variabilità tra repliche di standard di DNA entro un coefficiente di variazione (CV) inferiore al 5 %.

La concentrazione di DNA nella miscela di reazione va infine rapportata al volume di acqua filtrata ed espressa in termini di $\mu\text{g DNA per litri}$:

$$\text{DNA } (\mu\text{g l}^{-1}) = \{[(\text{Fluo}_{\text{sample}} - \text{Fluo}_{\text{blkr}}) \cdot C] + K\} \cdot V_f^{-1}$$

dove:

$\text{Fluo}_{\text{sample}}$ = fluorescenza del campione

$\text{Fluo}_{\text{blkr}}$ = fluorescenza del bianco reagente (media di 3 repliche) costituito da 100 μl di DABA e 4,9 ml di HCl 1N.

C = coefficiente della retta ottenuta dall'interpolazione lineare tra fluorescenza (variabile indipendente) e concentrazione (variabile dipendente, in $\mu\text{g ml}^{-1}$) delle soluzioni standard di DNA.

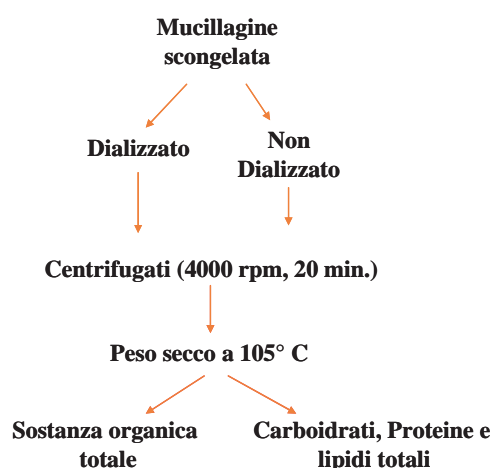
K = costante della retta ottenuta dall'interpolazione lineare tra fluorescenza (variabile indipendente) e concentrazione (variabile dipendente, in $\mu\text{g ml}^{-1}$) delle soluzioni standard di DNA.

V_f = volume d'acqua filtrata in litri

36.3 MATERIALE ORGANICO PARTICELLATO NEGLI AGGREGATI MUCILLAGINOSI

36.3.1 Campionamento e pre-trattamento dei campioni

Gli aggregati mucilluginosi sono campionati, limitatamente agli aggregati superficiali, e trasferiti immediatamente in bottiglie scure di polietilene. In laboratorio si procede immediatamente al congelamento a -20°C del materiale tal quale. Ciascun campione è suddiviso in due aliquote allo scopo di esaminare le differenze di composizione fra il campione dializzato e non dializzato secondo il protocollo illustrato di seguito (Penna *et al.*, 2000).



Un'aliquota di ciascun campione dopo scongelamento a temperatura ambiente viene sottoposta a dialisi (membrana Spectra/Pore MWCO:12-14000 Dalton) per 24 ore contro 10 l di acqua bidistillata allo scopo di eliminare i sali inorganici. Si procede poi, dopo centrifugazione a 4000 rpm per 20 min e scolamento su net (*cut-off* 10 μM) per 45 min, ad essiccamento in stufa a 105°C fino a raggiungimento di peso costante (Standard Methods, 2005). L'altra aliquota viene sottoposta agli stessi trattamenti ad eccezione della dialisi.

36.3.2 Determinazione della sostanza organica totale

Viene effettuata per incenerimento dei campioni di mucillagine dializzati e non dializzati in muffola a 500°C per un'ora (Standard Methods, 2005) e quantificazione percentuale del residuo volatile.

36.3.3 Carboidrati totali negli aggregati

Un metodo abbastanza recente e fra i più usati è l'MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinone idrazone hydrochloride monohydrate) (Filella, 2007). I Carboidrati totali contenuti nei campioni di mucillagine vengono determinati secondo la metodica di estrazione Pakulski-Benner (Pakulski e Benner, 1992). Tale metodica viene applicata su campioni dializzati e non dializzati con risultati differenti. Si effettua un pre-trattamento idrolitico di 10-15 mg di mucillagine allo stato secco con 1 ml di acido solforico concentrato (12 M) per 2 ore a temperatura ambiente seguito da un ulteriore trattamento per 3 ore a temperatura di 100°C con acido solforico diluito alla concentrazione finale 1,2 M. Tale diluizione viene effettuata con acqua "persolfata" (1 g di persolfato di potassio per litro di acqua distillata) e successivamente distillata. Dopo centrifugazione a 4000 rpm per 20 min, sul soprannatante i carboidrati si determinano spettrofotometricamente secondo la metodica di colorazione MBTH (Johnson e Sieburth, 1977; Johnson *et al.*, 1981; Parsons *et al.*, 1984). Secondo tale metodica gli idrolizzati (monosaccaridi) vengono neutralizzati con sodio idrossido 2M fino pH alcalino (circa 9) e ridotti a zuccheri alcolici con potassio boridruro al 2%. La reazione di riduzione viene terminata con l'aggiunta di HCl 2M. Gli zuccheri alcolici vengono poi ossidati ad aldeidi con acido periodico 0,0025 M. L'ossidazione viene terminata con l'aggiunta di sodio arsenico 0,025 M. Le aldeidi vengono poi fatte reagire con MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinone idrazone hydrochloride monohydrate) cloruro ferrico ed acetone. L'assorbanza viene misurata spettrofotometricamente a 635 nm dopo azzeramento con una miscela acqua:acetone (1,8:1). Per la calibrazione strumentale si impiegano soluzioni standard di glucosio nel range di concentrazione 1-10 mg l⁻¹ di glucosio. Il limite di determinazione del metodo è 2,37 µg ml⁻¹ di glucosio. Il coefficiente di variazione (CV) per la procedura analitica suddetta si aggira attorno al 5%. La concentrazione dei carboidrati totali (T-CHO, espressa in mg g⁻¹) viene quindi calcolata secondo la seguente espressione:

$$T-CHO \text{ (mg l}^{-1}\text{)} = (E_c - E_b) \times F \times g^{-1}$$

dove:

E_c = estinzione media (in tre repliche) del campione estratto.

E_b = estinzione media (in due repliche) del bianco analitico.

$$F = \text{fattore colorimetrico} = \frac{C_{st}}{A_{st} - A_b}$$

dove

C_{st} = concentrazione standard utilizzato (glucosio)

A_{st} = estinzione media (in tre repliche) dello standard

A_b = estinzione media (in due repliche) del bianco analitico

g^{-1} = peso in grammi del campione.

Se l'assorbanza dovesse essere talmente elevata da portare fuori scala la lettura spettrofotometrica del campione, sarà necessario ripetere l'analisi pesando una quantità minore di mucillagine poiché la risposta dell'assorbanza ad un eventuale diluizione del campione, generalmente, non è lineare.

36.3.4 Proteine totali negli aggregati

Le proteine totali sono state analizzate secondo la metodica di Bradford (Bradford, 1976) leggermente modificata (Setchell, 1981) in cui il volume del cromogeno (Coomassie Brilliant Blue G 250) dipende dal livello di sensibilità richiesto (Spector, 1978). L'estrazione viene effettuata sottoponendo 10-20 mg di mucillagine allo stato secco a trattamento idrolitico con 5-6 ml di NaOH 0,5 N per 2 ore alla temperatura di 60 °C in un bagno termostatico (Mayer *et al.*, 1986). Sull'estratto ottenuto dopo centrifugazione a 4000 rpm per 20 min., le proteine totali vengono determinate spettrofotometricamente. 100 µl di estratto proteico vengono fatti reagire con 2 ml di cromogeno opportunamente diluito (1:10) con acqua bidistillata. Tale cromogeno esiste in due differenti forme (di colorazione rossa e blu) e, con un meccanismo di reazione ancora non ben chiarito, la forma rossa di questo viene convertita in forma blu in quantità direttamente proporzionale al contenuto proteico dell'estratto. L'assorbanza viene misurata alla lunghezza d'onda di 595 nm dopo azzeramento con acqua bidistillata. Per la calibrazione strumentale si impiegano soluzioni standard di γ -globulina bovina (BSA) nel range di concentrazione 0,2-0,8 mg/l di BSA. Tutti i campioni vengono analizzati in tre repliche. Il limite di determinazione del metodo è 1,83 µg ml⁻¹ di BSA. La riproducibilità del metodo presenta normalmente un coefficiente di variazione (CV) inferiore al 6%.

La concentrazione delle proteine totali (PRT), espressa in mg l⁻¹, viene quindi calcolata secondo la seguente espressione:

$$PRT \text{ (mg g}^{-1}\text{)} = (E_c - E_b) \times F \times g^{-1}$$

dove:

E_c = estinzione media (in tre repliche) del campione estratto.

E_b = estinzione media (in due repliche) del bianco analitico.

$$F = \text{fattore colorimetrico} = \frac{C_{st}}{A_{st} - A_b}$$

dove

C_{st} = concentrazione standard utilizzato (BSA)

A_{st} = estinzione media (in tre repliche) dello standard

A_b = estinzione media (in due repliche) del bianco analitico

g^{-1} = peso in grammi del campione.

Se l'assorbanza dovesse essere talmente elevata da portare fuori scala la lettura spettrofotometrica del campione, sarà necessario ripetere l'analisi pesando una quantità minore di mucillagine poiché la risposta dell'assorbanza ad un eventuale diluizione del campione, generalmente, non è lineare.

36.3.5 Lipidi totali negli aggregati

L'estrazione dei lipidi viene effettuata secondo la metodica Folk (Folk *et al.*, 1957). In tale procedura viene utilizzata una miscela cloroformio-metanolo (2:1) il cui volume (in ml) deve essere 20 volte il peso (in mg) della mucillagine. Nella risultante miscela bifasica il campione viene agitato per 30 min. (tale procedura va effettuata in ambiente freddo). Si centrifuga poi a 2000 rpm per 20 min. e la fase superiore, contenente l'estratto lipidico, viene purificata con NaCl 0,9 N (il cui volume deve essere 0,2 volte il volume dell'estratto ottenuto). Tale procedura serve per allontanare dalla fase lipidica superiore gli acidi lipidici che in tal modo rimangono confinati nella fase cloroformica inferiore. Dopo una vigorosa agitazione ed una successiva centrifugazione la fase superiore viene rimossa per sifonamento. Si eseguono poi 2-3 lavaggi dell'interfaccia con una miscela di cloroformio:metanolo 1:1. Infine la fase inferiore, contenente l'estratto lipidico, viene fatta evaporare sottovuoto. I lipidi totali vengono quindi quantificati gravimetricamente. Il coefficiente di variazione (CV) del metodo suddetto è generalmente inferiore al 10%.

36.4 BIBLIOGRAFIA

- ALLDREDGE A.L., SILVER M.W. (1988) - Characteristics, dynamics and significance of marine snow. *Deep Sea Res.*, **20**: 41-82.
- ARFI A., BOUVY M. (1995) - Size, composition and distribution of particles related to wind-induced resuspension in a shallow tropical lagoon. *J. Plankton Res.*, **17**: 557-574.
- BAILIFF D.M., KARL D.M. (1991) - Dissolved and particulate DNA dynamics during a spring bloom in the Antarctic Peninsula region, 1986-87. *Deep Sea Res. I*, **38**: 1077-1095.
- BAUERFEIND E., BODUNGEN V., ARNDT K., KOEVE W. (1994) - Particle flux, and composition of sedimenting matter, in the Greenland Sea. *J. Mar. Syst.*, **5**: 411-423.
- BERDALET E., DORTCH Q. (1991) - New double-staining technique for RNA and DNA measurement in marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **73**: 295-305.
- BERG J.A., NEWELL R.I. (1986) - Temporal and spatial variations in the composition of seston available to the suspension feeder *Crassostrea virginica*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **23**: 375-386.
- BERGES J.A., FISHER A.E., HARRISON P.J. (1993) - A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Mar. Biol.*, **115**: 187-193.
- BIANCHI T.S., LEVINGTON J.S. (1984) - The importance of microalgae, bacteria and particulate matter in the somatic growth of *Hydrobia totteni*. *J. Mar. Res.*, **42**: 431-443.
- BLIGH E.G., DYER W.J. (1959) - A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**: 911-917.
- BLUMENKRANTZ N., ASBOE-HANSEN G. (1973) - A quick and specific assay for hydroxyproline. *Anal. Biochem.*, **55**: 288-291.
- BODE A., FIGUEROA F.L., RUIZ J. (1994) - Estimating the photosynthetic and detrital fractions of seston: a comparison of methods. Working Group 5 Report. *Sci. Mar.*, **58**: 59-65.
- BOHEME J., FRISHER M.E., JIANG S.C., KELLOGG C.A., PICHARD S., ROSE J.B., STEINWAY C., PAUL J.H. (1993) - Viruses, bacterioplankton, and phytoplankton in the south-eastern Gulf of Mexico: distribution and contribution to oceanic DNA pools. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **97**: 1-10.
- BORCH N.H., KIRCHMAN D.L. (1997) - Concentration and composition of dissolved combined neutral sugars (polysaccharides) in seawater determined by HPLC-PAD. *Mar. Chem.*, **57**: 85-95.
- BRADFORD M. (1976) - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- DANOVARO R., DELL'ANNO A., PUSCEDDU A., MARRALE D., DELLA CROCE N., FABIANO M., TSELEPIDES A. (2000) - Biochemical composition of pico-, nano- and micro- particulate organic matter and bacterioplankton biomass in the oligotrophic south Aegean Sea (NE Mediterranean). *Progr. Oceanogr.*, **46**: 279-310.
- DANOVARO R., FABIANO M. (1997) - Seasonal changes in quality and quantity of food available for benthic suspension feeders in the Golfo Marconi (North. Western Mediterranean). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **44**: 723-736.
- DELL'ANNO A., MARRALE D., PUSCEDDU A., FABIANO M., DANOVARO R. (1999) - Particulate nucleic acid dynamics in a highly oligotrophic system: the Cretan Sea (Eastern Mediterranean) *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **186**: 19-30.
- DELL'ANNO A., FABIANO M., DUINEVELD G. C. A., KOK A., DANOVARO R. (1998) - Nucleic acid (DNA, RNA) quantification and RNA/DNA ratio determination in marine sediments: Comparison of spectrophotometric, fluorometric and High-Performance Liquid Chromatography methods and estimation of detrital DNA. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 3238-3245.
- DELL'ANNO A., DANOVARO R. (2001) - Nucleic acid turnover in aquatic environments: 1. Determination of total and extracellular DNA in marine sediments. In: Akkermans A.D.L., van Elsas J.D., De Bruijn F.J. (eds), *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands:1-9.
- DELL'ANNO A., BOMPADRE S., DANOVARO R. (2002) - Quantification, base composition, and fate of extracellular DNA in marine sediments. *Limnol. Oceanogr.*, **47**: 899-905.
- DUBOIS M., GILLES K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. (1956) - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.
- FABIANO M., PUSCEDDU A. (1998) - Total and hydrolyzable particulate organic matter (carbohydrates, proteins

-
- and lipids) at a coastal station in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Polar Biol.*, **19**: 125-132.
- FABIANO M., PUSCEDDU A., DELL'ANNO A., ARMENI M., VANUCCI S., LAMPITT R., WOLFF G., DANOVARO R. (2001) - Fluxes of phytopigments and labile organic matter to the deep ocean in the NE Atlantic Ocean. *Progr. Oceanogr.*, **50**: 89-104.
- FABIANO M., MISIC C., DANOVARO R. (1994) - Chemical and microscopic study of particulate proteins in Ligurian coastal waters. *Atti Ass. Ital. Oceanol. Limnol.*, **10**: 355-366.
- FABIANO M., POVERO P. (1992) - Particulate carbon and nitrogen in Ligurian coastal waters (October, 1985). *Boll. Ocean. Teor. Appl.*, **10**: 65-71.
- FABIANO M., POVERO P., DANOVARO R. (1993) - Distribution and composition of particulate organic matter in the Ross Sea (Antarctica). *Polar Biol.*, **13**: 525-533.
- FABIANO M., POVERO P., DANOVARO R. (1996) - Particulate organic matter composition in Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica) during summer 1990. *Ant. Sci.*, **8**: 7-13.
- FABIANO M., DANOVARO R., FRASCHETTI S. (1995) - A three-year time series of elemental and biochemical composition of organic matter in subtidal sandy sediments of the Ligurian Sea (northwestern Mediterranean). *Cont. Shelf Res.*, **15**: 1453-1469.
- FARA A., BERDALET E., ARIN L. (1996) - Determination of RNA and DNA concentrations in natural plankton samples using Thiazole Orange in combination with DNase and RNase digestions. *J. Phycol.*, **32**: 1074-1083.
- FICHEZ R. (1991a) - Composition and fate of organic matter in submarine cave sediments; implications for the biogeochemical cycle of organic carbon. *Oceanol. Acta*, **14**: 369-377.
- FICHEZ R. (1991b) - Suspended particulate organic matter in a submarine cave. *Mar. Biol.*, **108**: 167-174.
- FILELLA M. (2007) - Colloidal properties of submicron particles in natural waters. *Environment Colloids and Particles - IUPAC Ser. Anal. Phy. Chem. Environ. Syst.*, **10**: 52.
- FOLCK J., LEES M., SLOANE S., STANLEY G.H. (1957) - A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**: 497-509.
- GORDON D.C. JR. (1970) - Some studies on the distribution and composition of particulate organic carbon in the North Atlantic Ocean. *Deep Sea Res. I*, **17**: 233-243.
- GRAF G. (1992) - Benthic-pelagic coupling: a benthic view. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, **30**: 149-190.
- HARTREE E.F. (1972) - Determination of proteins: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, **48**: 422-427.
- JEFFREY W.H., VON HAVEN R., HOCH M.P., COFFIN R.B. (1996) - Bacterioplankton RNA, DNA, protein content and relationships to rates of thymidine and leucine incorporation. *Aquat. Microb. Ecol.*, **10**: 87-95.
- JOHNSON K.M., BURNEY C.M., SIEBURTH J.M. (1981) - Doubling the Production and Precision of the MBTH. Spectrophotometric assay for dissolved carbohydrates in seawater. *Mar. Chem.*, **10**: 467-473.
- JOHNSON K.M., SIEBURTH J. (1977) - Dissolved carbohydrate in seawater. I, a precise spectrophotometric analysis for monosaccharides. *Mar. Chem.*, **5**: 1-13.
- JONES D.R., KARL D.M., LAWS E.A. (1995) - DNA:ATP ratios in marine microalgae and bacteria: implications for growth rate estimates based on rates of DNA synthesis. *J. Phycol.*, **31**: 215-233.
- JUMARS P.A., WHEATCROFT R.A. (1989) - Responses of benthos to changing food quality and quantity, with a focus on the deposit feeding and bioturbation. In: Berger W.H., Smetacek V.S., Wefer W. (eds), *Productivity of the oceans and paste*, John Wiley and Sons: 235-253.
- KARL D.M., BAILIFF M.D. (1989) - The measurement and distribution of dissolved nucleic acids in aquatic environments. *Limnol. Oceanogr.*, **34**: 543-558.
- LEDL F., SCHLEICHER E. (1990) - New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body. *Angewandte Chemie*, **29**: 565-594.
- LOWRY O.H., ROSENBOUGH N.S., FARR A.L., RANDALL R.J. (1951) - Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
- MARSH J.B., WENSTEIN D.B. (1966) - A simple charring method for determination of lipids. *J. Lipid Res.*, **7**: 574-576.
- MAYER L.M., SCHICK L., SETCHELL W. (1986) - Measurement of protein in nearshore marine sediment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **30**: 159-165.
- MAYER L.M., JUMARS P.A., TAGHON G.L., MACKO S.A., TRUMBORE S. (1993) - Low density particles as potential nitrogenous foods for benthos. *J. Mar. Res.*, **51**: 373-389.
- MAYZAUD P., CHANUT J.P., ACKMAN R.G. (1989) - Seasonal changes of the biochemical composition of marine particulate matter with special reference to fatty acids and sterols. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **56**: 189-204.

-
- MECOZZI M., PIETRANTONIO E., DI NOTO V., PÁPAI Z. (2005) - The humin structure of mucilage aggregates in the Adriatic and Tyrrhenian seas: hypothesis about the reasonable causes of mucilage formation. *Mar. Chem.*, **95**: 255-269.
- MECOZZI M., AMICI M., PIETRANTONIO E., ACQUISTUCCI R. (1999) - Ultrasound-assisted analysis of total carbohydrates in environmental and food samples. *Ultrason. Sonochem.*, **6**: 133-139.
- MUSCHENHEIM D.K. (1987a) - The dynamics of near-bed seston flux and suspension feeding benthos. *J. Mar. Res.*, **45**: 473-496.
- MUSCHENHEIM D.K. (1987b) - The role of hydrodynamic sorting of seston in the nutrition of a benthic suspension feeder. *Spio setosa* (Polychaeta: Spionidae). *Biol. Oceanogr.*, **4**: 265-288.
- MYKLESTAD S.M., SKÅNØY E., HESTMANN S. (1997) - A sensitive and rapid method for analysis of dissolved mono- and polysaccharides in seawater. *Mar. Chem.*, **56**: 279-286.
- NAVARRO J.M., CLASING E., URRUTIA G., ASENCIO G., STEAD R., HERRERA C. (1993) - Biochemical composition and nutritive value of suspended particulate matter over a tidal flat of Southern Chile. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **37**: 59-73.
- NAVARRO J.M., THOMPSON R.J. (1995) - Seasonal fluctuations in the size spectra, biochemical composition and nutritional value of the seston available to a suspension feeding bivalve in a sub-arctic environment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **30**: 205-214.
- PAINCHAUD J., THERRIault J.C. (1989) - Relationship between bacteria, phytoplankton and particulate organic carbon in the Upper St. Lawrence Estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **56**: 301-311.
- PAKULSKI J.D., BENNER R. (1992) - An improved method for the hydrolysis and MBTH analysis of dissolved and particulate carbohydrates in seawater. *Mar. Chem.*, **40**: 143-160.
- PARSONS T.R. (1977) - Particulate organic carbon in the sea. *Chem. Oceanogr.*, **3**: 365-383.
- PARSONS T.R., TAKAHASHI M., HARGRAVE B. (1977) - *Biological oceanographic processes*. Pergamon Press, Oxford: 332 pp.
- PARSONS T.R., MAITA Y., LALLI C.M. (1984) - *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*, Pergamon Press, New York: 52-71.
- PAUL J.H., MYERS B. (1982) - Fluorometric determination of DNA in aquatic microorganisms by use of Hoechst 33258. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 1393-1399.
- PAUL J.H., CARLSON D. (1984) - Genetic material in the marine environment implication for bacterial DNA. *Limnol. Oceanogr.*, **29**: 1091-1097.
- PENNA N., BERLUTTI S., PENNA A., RIDOLFI F. (2000) - Study and monitoring of mucilage in the Adriatic Sea. *Wat. Sci. Technol.*, **42**: 299-304.
- PENNA N., CAPELLACCI S., RICCI F., KOVAC N. (2003) - Characterization of carbohydrates in mucilage sample from the Northern Adriatic Sea. *Anal. Bioanal. Chem.*, **376**: 436-439.
- POSEDEL N., FAGANELLI J. (1991) - Nature and sedimentation of suspended particulate matter during density stratification in shallow coastal waters (Gulf of Trieste, northern Adriatic). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **30**: 205-214.
- POULET S.A., COSSA D., MARTY J.C. (1986) - Combined analyses of size spectra and biochemical composition of particles in St. Lawrence Estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **30**: 205-214.
- PUSCEDDU A., DELL'ANNO A., FABIANO M. (2000) - Organic matter composition in coastal sediments at Terra Nova Bay (Ross Sea) during summer 1995. *Polar Biol.*, **23**: 288-293.
- PUSCEDDU A., GRÉMARE A., ESCOUBERYROU K., AMOUROUX J.M., FIORDELMONDO C., DANOVARO R. (2005) - Effects of natural and anthropogenic sediment resuspension on particulate organic matter dynamics in shallow coastal environments. *Cont. Shelf Res.*, **25**: 2506-2520.
- PUSCEDDU A., SERRA E., SANNA O., FABIANO M. (1996) - Seasonal fluctuations in the nutritional value of particulate organic matter in a lagoon. *Chem. Ecol.*, **13**: 21-37.
- PUSCEDDU A., SARÀ G., MAZZOLA A., FABIANO M. (1997) - Relationships between suspended and sediment organic matter in a semi-enclosed marine system: the Stagnone di Marsala sound (western Sicily). *Water Air Soil Poll.*, **99**: 343-352.
- PUSCEDDU A., FABIANO M. (1996) - Changes in the biochemical composition of *Tetraselmis suecica* and *Isochrysis galbana* during growth and decay. *Chem. Ecol.*, **12**: 199-210.
- PUSCEDDU A., SARÀ G., ARMENI M., FABIANO M., MAZZOLA A. (1999) - Seasonal and spatial changes in the sediment organic matter of a semi-enclosed marine system (W-Mediterranean Sea). *Hydrobiologia*, **397**: 59-70.
- PUSCEDDU A., SARÀ G., MANINI E., PUCCIA E. (1996) - Short-term changes in the biochemical composition

-
- of particulate organic matter in a Mediterranean shallow sound (Western Sicily). *Atti XII^o Congresso Associazione Italiana di Oceanologia e Limnologia*, **11**: 299-310.
- RICE D.L. (1982) - The detritus nitrogen problem: new observations and perspectives from organic geochemistry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **9**: 153-162.
- ROY S., MAYZAUD P., SOUCHU P. (1991) - Environnement physico-chimique et trophique d'un site mytilicole, Iles-de-la-Madeleine (Québec). II. Matière particulaire, composition biochimique et productivité primaire. In Therriault J-C (Editor) *Le Golfe du Saint-Laurent: petit océan ou grand estuaire?* *Can. Sp. Publ. Fish. Aquat. Sci.*, **113**: 219-230.
- SARÀ G., MANGANARO A., CORTESE G., PUSCEDDU A., MAZZOLA A. (1999) - The relationship between food availability and the growth in *Mytilus galloprovincialis* in the open-sea (southern Mediterranean). *Aqua-culture*, **167**: 1-15.
- SETCHELL F. (1981) - Particulate protein measurement in oceanographic samples by dye binding. *Mar. Chem.*, **10**: 301-313.
- SMAAL A.C., VERHAGEN J.H.G., COOSEN J., HAAS H.A. (1986) - Interaction between seston quantity and quality and benthic suspension feeders in the Oosterschelde, the Netherlands. *Ophelia*, **26**: 385-399.
- SPECTOR T. (1978) - Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantification. *Anal. Biochem.*, **86**: 142-146.
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTEWATER (2005) - 21th. Edition, APHA AWWA WPCF.
- TANOUE E. (1985) - Distribution and chemical composition of particulate organic matter in the Pacific sector of the Antarctic ocean. *Trans. Tokyo Univ. Fish.*, **5**: 65-83.
- TENORE K.R. (1975) - Detrital utilization by the polychaete *Capitella capitata*. *J. Mar. Res.*, **33**: 261-274.
- TENORE K.R. (1977) - Differential availability of aged detritus from different sources to the polychaete *Capitella capitata*. *Mar. Biol.*, **44**: 51-55.
- TENORE K.R., CAMMEN S., FINDLAY S., PHILLIPS N. (1982) - Perspectives of research on detritus: do factors controlling availability of detritus to consumers depend on its source? *J. Mar. Res.*, **25**: 553-558.
- VELIMIROV B. (1991) - Detritus and the concept of non-predatory loss. *Arch. Hydrobiol.*, **121**: 1-20.
- WASSMANN P. (1991) - Dynamics of primary production and sedimentation in shallow fiords and polls of western Norway. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, **29**: 87-154.
- WETZEL R.G. (1995) - Death, detritus, and energy flow in aquatic ecosystems. *Fresh. Biol.*, **33**: 83-89.

CAPITOLO 37. STIMA DELLA BIOMASSA TOTALE DA MISURE DI ATP CELLULARE

A. Zoppini, F. Azzaro

zoppini@irsa.cnr.it

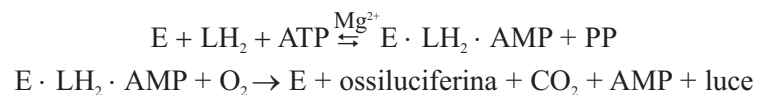
37.1 INTRODUZIONE

L'adenosina-5'-trifosfato (ATP) è un nucleotide indispensabile al metabolismo cellulare. La misura dell'ATP è stata utilizzata sin dagli anni '60 per stimare la biomassa totale vivente negli ecosistemi acquatici per via delle sue importanti peculiarità: la presenza in tutte le cellule (autotrofe ed eterotrofe) e la rapida idrolisi dopo la loro morte (Holm-Hansen e Booth 1966; Karl, 1980; Mincks *et al.*, 2005; Azzaro *et al.*, 2006).

In letteratura sono proposte varie metodologie per la misura dell'ATP che differiscono essenzialmente per le diverse modalità con cui viene effettuata l'estrazione del nucleotide (Karl, 1980). Il metodo di estrazione a freddo proposto di seguito (Jakubczak *et al.*, 1980) è stato preferito, rispetto a quello introdotto da Holm-Hansen e Booth (1966), per le ottime caratteristiche di resa e per l'estrema semplicità che ne permette l'applicazione anche in indagini di campo (Zoppini *et al.*, 1988). L'analisi dell'estratto effettuata tramite la misura dell'emissione di bioluminescenza è oggi ampiamente utilizzata (Minks *et al.*, 2005; Bjorkman e Karl, 2006; Velten *et al.*, 2007). In alternativa, soprattutto nel caso della misura degli adenilati, è applicata la tecnica della cromatografia liquida ad alta prestazione (Thebault *et al.*, 2000).

37.2 PRINCIPIO DEL METODO

Per la stima della biomassa totale il campione d'acqua, prefiltrato su un retino con maglia 200 µm, è concentrato su un filtro di porosità 0,2 µm. Si possono ottenere informazioni sui contributi delle singole classi dimensionali alla biomassa planctonica totale effettuando una filtrazione seriale su filtri di porosità appropriata agli scopi dell'indagine. Si utilizzeranno quindi filtri a porosità 20, 2,0 e 0,2 µm per ottenere rispettivamente la separazione dimensionale del micro- (200 – 20 µm), nano- (20-2 µm) e pico- (2-0,2 µm) plancton. L'estrazione del nucleotide dalle cellule depositate sul filtro è effettuata tramite l'utilizzo di un solvente (dimetilsolfossido, DMSO). L'estratto tamponato in presenza del complesso enzimatico luciferina-luciferasi, emette fotoni proporzionalmente all'ATP in esso contenuto secondo la reazione così schematizzata:



dove:

E= luciferasi

LH= luciferina

E · LH₂ · AMP = complesso luciferiladenilato

PP= pirofosfato

AMP= adenosin-monofosfato

La reazione avviene dopo una latenza di 25 msec ed il massimo dell'emissione luminosa si ottiene ad una temperatura di 25°C.

Il picco dell'emissione luminosa è misurata tramite un luminometro. Dalla comparazione tra le letture del campione e quelle ottenute da soluzioni a concentrazione nota di ATP si risale alla concentrazione di quest'ultimo nel campione in esame. La stima della biomassa è calcolata applicando un fattore di conversione (vedi Calcoli).

37.3 CAMPIONAMENTO E CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I campioni di acqua sono prelevati attraverso le comuni bottiglie di campionamento utilizzate nella pratica oceanografica.

Il tempo di dimezzamento dell'ATP è estremamente rapido (<1 h) e molte sono le cause che possono alterarne il contenuto cellulare (ad es. l'esposizione alla luce diretta, variazioni di ossigeno, temperatura, pH, il congelamento o un'inaccurata filtrazione).

Il tempo che intercorre tra il prelievo del campione e l'estrazione deve essere breve al fine di ridurre le alterazioni delle condizioni naturali e limitare l'attività degli enzimi idrolitici intracellulari (ATPasi, adenilatochinasi, fosfatasi). Tali enzimi, così come la presenza nei campioni naturali di metalli pesanti o di ioni alcalino-terrosi, possono essere causa di una sottostima della concentrazione di ATP nel campione. Alcuni di questi inconvenienti vengono ridotti nel corso delle operazioni analitiche dalla presenza del DMSO, che inibisce le attività degli enzimi idrolitici, e dell'EDTA per le specifiche capacità complessanti nei confronti di ioni alcalino-terrosi (ad esempio Ca^{2+}) e alcuni metalli pesanti. L'estratto tamponato può essere conservato a -20°C .

37.4 APPARECCHIATURA

- Bottiglie di campionamento (tipo Niskin).
- Retino da zooplancton (maglia 200 μm)
- Accessori per filtrazione: pompa dotata di manometro, beuta da vuoto in Pirex, sistema filtrante con setto poroso in vetro sinterizzato, imbuto di capacità 250 ml, pinza di serraggio, pinzette a punte piatte.
- Filtri a membrana in policarbonato (diametro 47 mm, porosità 0,22 μm).
- Beute da 25 ml a collo largo provviste di tappo.
- Filtri in fibra di vetro (GF/F)
- Luminometro

37.5 REAGENTI

Tutti i reattivi sono di grado analitico e l'acqua di diluizione del tipo Millipore Milli-Q.

- *Soluzione acquosa di acido cloridrico* (HCl 0,1 N). Utilizzare questa soluzione per il lavaggio abituale della vetreria che entra in contatto con il campione
- *Soluzione tampone* (MOPS 10 mM, EDTA 2 mM, pH 7,40). Sciogliere in circa 800 ml di acqua 2,09 g di acido 3-morfolinpropansolfonico (MOPS) e 0,74 g di acido etilendiaminotetracetico, sale disodico (EDTA). Portare il pH della soluzione così ottenuta a 7,40. Successivamente portare il volume a 1000 ml avendo cura di controllare il pH finale. Conservare le soluzioni in una bottiglia per reagenti alla temperatura di $+4^{\circ}\text{C}$.
- *Dimetilsolfossido* (DMSO, $d=1,10$).
- *Soluzione acquosa di solfato di magnesio* (MgSO_4 0,04 M). Sciogliere 1,97 g di sale in 200 ml di acqua.
- *Soluzione acquosa di Na-Arseniato* (Na_2HAsO_4 0,1M). Sciogliere 6,24 g di sale in di 200 ml di acqua. Portare il pH finale a 7,40.

- *Complesso enzimatico luciferina-luciferasi*. Per migliorare il limite di rivelabilità della misura dell'ATP nell'estratto è indispensabile usare un prodotto di alta qualità. L'estratto essiccato di addome di lucciola (250 mg), conservato secondo le indicazioni del produttore, è reidratato in 25 ml di acqua. La sospensione è agitata energicamente e tenuta per 12 ore al buio a +4°C. Poco prima dell'uso aggiungere 50 ml della soluzione di MgSO₄ e 50 ml della soluzione di Na-Arseniato. Filtrare la soluzione su filtri GF/F e lasciare al buio 1 ora a +4°C. Il preparato deve essere conservato al buio e solo per qualche ora.
- *Soluzione di riferimento di ATP*. Sciogliere 11,9 mg di adenosin-5'-trifosfato, sale bisodico triidrato (C₁₀H₁₆N₅O₁₃P₃Na₂·3H₂O, P.M. 605,2) corrispondente a 10 mg di acido adenosintrifosforico (C₁₀H₁₆N₅O₁₃P₃, P.M. 507,2) in 1000 ml di acqua. Preparare una soluzione di lavoro diluendo 1 ml in 100 ml di soluzione tampone (0,2 ml = 0,02 µg di ATP). Quest'ultima soluzione, se non usata immediatamente, può essere conservata a -20°C per qualche mese.

37.6 PROCEDIMENTO

La vetreria che entra in contatto con il campione deve essere accuratamente lavata in bagno acido (HCl 0,1N) per 4 ore e risciacquata più volte in acqua Millipore Milli-Q. Si raccomanda di curare tale procedura specialmente per campioni prelevati in zone oligotrofiche e afotiche ove la concentrazione di biomassa è ridotta.

Predisporre tre beute per ogni campione da analizzare e introdurre in ciascuna 1,8 ml di DMSO. Filtrare il campione attraverso il retino da zooplancton e successivamente attraverso l'apparato di filtrazione sul cui setto poroso è stato posto il filtro a membrana (porosità 0,22 µm) utilizzando le apposite pinze. Se si procede alla filtrazione frazionata, utilizzare una filtrazione seriale su filtri appropriati (vedi *Principio del metodo*).

In genere in base alle caratteristiche di trofia del campione si consiglia di filtrare volumi di 250-500 ml per acque eutrofiche o costiere, 1000 ml per acque oligotrofiche e 2000 ml per acque di profondità. Durante la filtrazione la pressione del vuoto non deve superare i 100 mm Hg e va interrotta un momento prima che l'ultimo strato di acqua passi attraverso il filtro. Recuperare il filtro con le apposite pinze e introdurlo rapidamente nella beuta contenente il DMSO. Il tempo che intercorre tra la filtrazione e l'estrazione deve essere breve, tenendo conto che la distruzione dell'ATP inizia entro 15 secondi dall'essiccazione del filtro. Estrarre il nucleotide dalle cellule agitando per 5 minuti il filtro nel solvente e al termine aggiungere 10 ml di soluzione tampone MOPS-EDTA. Introdurre un'aliquota di 0,2 ml di estratto tamponato nella cuvetta e porla nella camera di lettura. Iniettare 0,2 ml del complesso enzimatico luciferina-luciferasi e registrare il valore del picco dell'emissione luminosa. Ripetere la lettura più volte sullo stesso campione. Per la determinazione del bianco eseguire la procedura di estrazione su un filtro pulito e leggere l'emissione dell'estratto così ottenuto.

37.7 Calcoli

Effettuare una serie di diluizioni della soluzione di lavoro di ATP fino ad ottenere letture prossime al campione. Il fattore di taratura si ricava dalla seguente espressione:

$$F = \frac{C}{Lr}$$

dove:

F = fattore di taratura per la scala di riferimento;

C = concentrazione (µg ml⁻¹) di ATP della soluzione di riferimento;

Lr = lettura media dell'emissione luminosa (mV) della soluzione di ATP di riferimento corretta per quella del bianco.

Calcolare la concentrazione di ATP del campione nel modo seguente:

$$\text{ATP } (\mu\text{g l}^{-1}) = \frac{\text{Lc} \cdot 11,8 \cdot \text{F}}{\text{Vc}}$$

dove:

Lc = lettura media (mV) del picco dell'emissione luminosa del campione sottratta per quella del bianco;

11,8 = volume (ml) dell'estratto

F = fattore di taratura

Vc = volume (l) di campione filtrato.

In campioni naturali di acqua di mare con concentrazione di ATP intorno a 0,30 $\mu\text{g l}^{-1}$ si è ottenuto un coefficiente di variazione pari al 4% (n= 10). Con la procedura esposta è possibile rivelare 0,20 $\mu\text{g l}^{-1}$ di ATP come concentrazione minima nell'estratto, con probabilità 95% di ottenere un risultato diverso dal valore zero. Per concentrazioni comprese tra 0,70 e 700 $\mu\text{g l}^{-1}$ la risposta è lineare (r = 0,99; n = 10).

La concentrazione di ATP può essere trasformata in carbonio utilizzando un appropriato fattore di trasformazione. Tale valore è variabile e funzione di diversi fattori tra cui le condizioni nutrizionali, le caratteristiche strutturali delle comunità, il grado di trofia e la profondità della colonna d'acqua. Il rapporto C:ATP pari a 250 è quello più utilizzato in letteratura (Karl, 1980).

37.8 BIBLIOGRAFIA

- APHA, AWWA, WEF (2005) - Metabolic rate measurements. In: Eaton A.D., Clesceri L.S., Rice E.W., Greenberg A.E. (eds.), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association, Washington D.C.: 10-31.
- AZZARO M., LA FERLA R., AZZARO F. (2006) - Microbial respiration in the aphotic zone of the Ross Sea (Antartica). *Mar. Chem.*, **99**: 199-209.
- BJORKMAN K.M., KARL D.M. (2006) - Presence of dissolved nucleotides in the North Pacific Subtropical Gyre and their role in cycling of dissolved organic phosphorus. *Aquat. Microb. Ecol.*, **39**: 193-203.
- HOLM-HANSEN O., BOOTH C.R. (1966) - The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance. *Limnol. Oceanogr.*, **11** : 510-519.
- JAKUBCZAK E., LECLERCH H., SECRETIN P. (1980) - Mésure de l'ATP bacterien par bioluminescence: étude critique des méthodes d'extraction. *Ann. Biol. Clin.*, **38**: 297-304.
- KARL D.M. (1980) - Cellular Nucleotide Measurements and Applications in Microbial Ecology. *Microbiol. Rev.*, 739-796.
- MINCKS S.L., SMITH C.R., DEMASTER D.J. (2005) - Persistence of labile organic matter and microbial biomass in Antarctic shelf sediments: evidence of a sediment 'foodbank'. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **300**: 3-19.
- THEBAULT M. T., RAFFIN J. P., PICADO A. M., MENDONIA E., SKORKOWSKI E. F., LE GAL Y. (2000) - Coordinated changes of adenylate energy charge and ATP/ADP: use in ecotoxicological studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **46**: 23-28.
- VELTEN S., HAMMES F., BOLLER M., EGLI T. (2007) - Rapid and direct estimation of active biomass on granular activated carbon through adenosin tri-phosphate (ATP). *Wat. Res.*, **41**: 1973-1983.
- ZOPPINI A., PAGNOTTA R., PUDDU A. (1988) - Misure di ATP cellulare per la stima delle biomasse di microrganismi acquatici: confronto di metodologie. *Inquinamento*, **10**: 60-63.

CAPITOLO 38. METODOLOGIE ANALITICHE PER LA MISURA DEI VALORI DI COMPOSIZIONE ISOTOPICA DI CARBONIO, AZOTO E OSSIGENO IN DIFFERENTI COMPARTI DEL SISTEMA MARINO

M. Sprovieri, C. Cantoni, M. Giani, V. Ibello, L. Langone, M. Ribera d'Alcalà

mario.sprovieri@iamc.cnr.it

38.1 INTRODUZIONE

Lo studio dell'abbondanza naturale e delle variazioni degli isotopi stabili di un selezionato gruppo di elementi chimici della tabella periodica, intimamente legati ai processi biologici (H, O, C, e N) sono attualmente considerati strumento essenziale per una più profonda comprensione dei processi che regolano i cicli naturali degli stessi elementi.

In questo capitolo verranno presentate alcune delle metodiche analitiche più usate per la misura degli isotopi stabili di ossigeno, carbonio e azoto in comparti diversi dell'ambiente marino.

Dopo una breve introduzione (i cui concetti sono sostanzialmente tratti da Bowen, 1988; Clark e Fritz, 1997; Craig e Gordon, 1965; Criss e Taylor, 1986; Faure, 1986; Hoefs, 2006, a cui si fa riferimento per ulteriori approfondimenti) utile per un inquadramento sintetico sulla geochimica isotopica (in termini di notazioni convenzionali e dei processi chimico-fisici che regolano la distribuzione degli isotopi nei diversi sistemi considerati) verranno descritte in dettaglio le metodologie analitiche per la misura dei valori di composizione isotopica di:

- a. carbonio della frazione inorganica disciolta in acqua di mare;
- b. carbonio e azoto del particolato e dei sedimenti marini;
- c. azoto dei nitrati presenti nella colonna d'acqua;
- d. carbonio e azoto di organismi marini appartenenti a diversi livelli della catena trofica;
- e. ossigeno e carbonio del carbonato biogenico di organismi marini.

Per ognuno degli argomenti trattati verrà proposta una breve panoramica delle possibili applicazioni e un elenco sintetico delle pubblicazioni di riferimento, utili per approfondimenti successivi, sempre legati alla dimensione analitica delle tecniche proposte. È al di là degli scopi di questo lavoro, l'approfondimento sulla teoria e le potenziali applicazioni delle metodiche proposte per cui si rimanda a testi specifici.

Preferiamo inoltre rinviare a testi specifici (tra gli altri, Hoefs, 2004 e Sharp, 2005) per un'accurata e completa descrizione fisica e strumentale dello spettrometro di massa, che nel nostro caso, rappresenta il comune "detector" a conclusione dei diversi processi di preparazione dei campioni e la cui descrizione più propriamente costituisce l'obiettivo di questo capitolo. Tuttavia riteniamo necessario illustrare sinteticamente almeno i principi su cui si basa la spettrometria di massa per rapporti isotopici (IRMS). I diversi isotopi di un elemento si comportano chimicamente in maniera quasi identica. Se gli atomi vengono però ionizzati, accelerati a velocità elevate e inseriti, sotto vuoto, tra le espansioni polari di un elettromagnete subiscono deflessioni diverse per le diverse masse; ciascun isotopo percorrerà una traiettoria diversa dagli altri, consentendo un'analisi cosiddetta dispersiva. All'uscita del magnete i vari isotopi incideranno in regioni spazialmente separate e la rispettiva intensità potrà essere misurata fornendo la relativa abbondanza isotopica. L'andamento del numero di ioni al variare della posizione di impatto sul rivelatore viene detto spettro di massa.

Lo spettrometro IRMS comprende tre parti fondamentali: una sorgente di ioni, un analizzatore di massa e un contatore di ioni (Fig. 1). La *sorgente di ioni* ha lo scopo di ionizzare le molecole del campione

(generalmente introdotto in forma gassosa) per interazione con un fascio di elettroni che causa la formazione di ioni positivi dai composti del campione. Gli ioni positivi sono poi accelerati e condotti all'interno dell'*analizzatore di massa*, ovvero un campo elettromagnetico dove gli ioni sono separati a seconda del loro rapporto massa/carica (m/z). Infine gli ioni sono raccolti e contati da un *rivelatore/elettromoltiplicatore*.

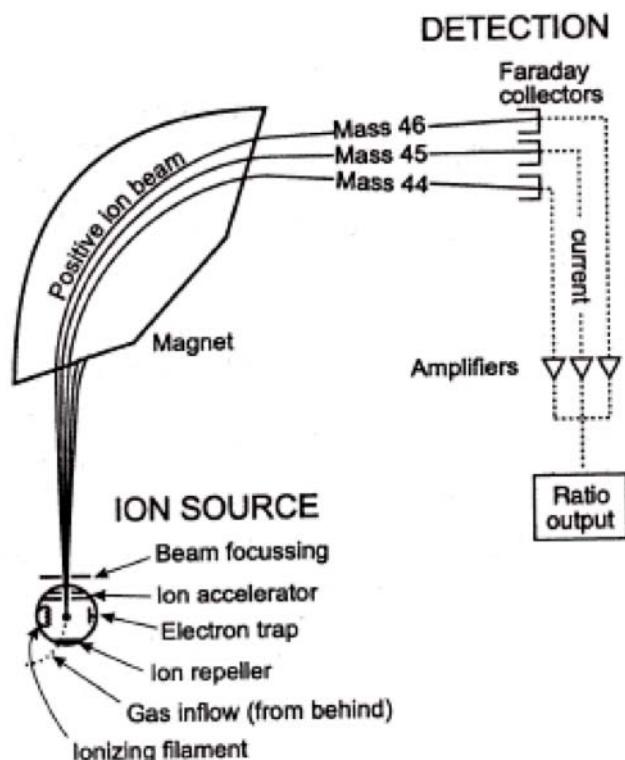


Figura 1. Schema di uno spettrometro di massa

38.2 BASI TEORICHE E NOTAZIONI CONVENZIONALI

La geochimica degli isotopi stabili considera le variazioni di composizione isotopica di un gruppo di elementi chimici dovute a processi chimico-fisici piuttosto che interazioni di tipo nucleare. Pertanto, questa disciplina non riguarda lo studio di elementi con comportamento radiogenico, la cui distribuzione e abbondanza naturale risultano principalmente regolate da processi nucleari.

L'interesse per lo studio degli isotopi stabili degli elementi è legato al fatto che le piccole differenze nel comportamento chimico dei diversi isotopi stessi possono fornire un gran numero di informazioni circa i processi fisici e chimici che interessano un sistema nel suo insieme.

Gli isotopi di uno stesso elemento hanno uguale numero di protoni (e quindi di elettroni) ma diverso numero di neutroni. Hanno lo stesso numero atomico (Z) ma un diverso numero di massa (A). Gli isotopi di uno stesso elemento hanno quindi proprietà chimiche simili, in ragione dello stesso numero di protoni, ma proprietà fisiche diverse, in ragione della massa differente. Tutti gli elementi ad eccezione di 12, esistono in almeno due forme isotopiche.

Lo sviluppo della geochimica isotopica è riconducibile allo sviluppo della fisica moderna già dalla metà del XX secolo, in particolare dalla scoperta del "neutrone" da parte di H. Urey nel 1932 e la dimostrazione delle variazioni nella composizione isotopica degli elementi leggeri da parte di A. Nier negli anni Trenta. Comunque, il definitivo sviluppo della geochimica degli isotopi stabili si ha nel 1947 con

la pubblicazione da parte di H. Urey del lavoro dal titolo *The Thermodynamic Properties of Isotopic Substances* dove, per la prima volta, viene dimostrato su base teorica l'effetto del frazionamento isotopico dell'idrogeno in base alle variazioni di temperatura del sistema.

Gli elementi di interesse nell'ambito della geochimica isotopica sono vari (H, Li, B, C, O, N, S e Cl) anche se particolare attenzione è stata storicamente rivolta al gruppo dei seguenti elementi: H, C, N, O e S.

Tutti gli elementi sopra citati hanno in comune:

la bassa massa atomica;

un'elevata differenza percentuale di massa tra i diversi isotopi;

la capacità di formare forti legami covalenti;

la presenza in natura in più stati di ossidazione con la potenzialità di formare un'ampia gamma di composti;

un'abbondanza sufficiente di tutti gli isotopi tale da poter essere quantificata con le tecniche analitiche disponibili.

Le variazioni nei rapporti degli isotopi stabili sono generalmente dell'ordine delle parti per migliaia e sono riportate convenzionalmente in notazione ‰ per mille dove:

$$\delta^n X = \left(\frac{\left(\frac{{}^n X}{{}^m X} \right)_{\text{campione}} - \left(\frac{{}^n X}{{}^m X} \right)_{\text{std}}}{\left(\frac{{}^n X}{{}^m X} \right)_{\text{std}}} \right) \times 10^3 \quad (\text{in } \text{‰})$$

Nella formula ${}^n X$ e ${}^m X$ rappresentano rispettivamente gli isotopi più pesanti e più leggeri di un elemento, mentre il suffisso 'campione' e 'std' si riferiscono al rapporto isotopico del materiale da misurare e dello standard di riferimento.

Gli standard di riferimento per gli isotopi di ossigeno e idrogeno sono vari anche se è generalmente utilizzato SMOW (Standard Mean Ocean Water) con $R_{\text{ossigeno}} = (2005,20 \pm 0,452) \cdot 10^{-6}$ e $R_{\text{idrogeno}} = 155,60 \pm 0,12 \cdot 10^{-6}$ ($\delta^{18}\text{O}_{\text{SMOW}} = 0\text{‰}$, $\delta\text{D}_{\text{SMOW}} = 0\text{‰}$) dove R rappresenta il rapporto tra isotopo più pesante e più leggero dell'elemento. Per quanto riguarda i valori di composizione isotopica dell'ossigeno e, soprattutto del carbonio, è anche usato (principalmente per lo studio di campioni di carbonato) lo standard V-PDB ($R_{\text{carbonio}} = 0,00112372$ e $\delta^{18}\text{O}_{\text{VPDB}} = 0\text{‰}$, $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = 0\text{‰}$). Lo standard di riferimento per la composizione isotopica dell'azoto è l' N_2 atmosferico ($R = 0,0036765$, $\delta^{15}\text{N} = 0\text{‰}$).

L'indice che convenzionalmente è usato per valutare l'intensità e studiare la dinamica dei processi di variazione isotopica di un elemento nei sistemi naturali è il fattore di frazionamento (α) calcolato come il rapporto dell'isotopo più pesante sull'isotopo più leggero (R) tra due fasi (reagenti e prodotti) in equilibrio chimico

$$\left(\alpha = \frac{R_{\text{prodotto}}}{R_{\text{reagente}}} \right).$$

In sostanza, qualsiasi processo che comporta un frazionamento isotopico è direttamente legato alla differenza di energia necessaria per rompere i legami chimici dei diversi elementi considerati (nel processo di trasformazione tra reagenti e prodotti) e che risultano termodinamicamente più stabili (e quindi più energetici) per gli isotopi più pesanti degli elementi stessi.

Il frazionamento isotopico può essere legato a processi all'equilibrio chimico o ad effetti cinetici associati alle differenti reazioni chimiche.

Per quanto riguarda il frazionamento chimico in processi all'equilibrio, è noto che le proprietà chimiche di un elemento sono sostanzialmente legate alla struttura elettronica dell'elemento stesso, con un ruolo assolutamente secondario giocato dalla struttura nucleare. La teoria della meccanica quantistica prevede che la massa di un atomo determini primariamente i moti dello stesso (vibrazionale, traslazionale e ro-

tazionale) e quindi anche la forza del legame chimico. Dalla quantificazione di questi effetti quantistici sullo stato degli elementi è possibile predire le piccole differenze nelle proprietà chimiche degli isotopi degli stessi elementi.

Il frazionamento isotopico all'equilibrio in sistemi naturali è sostanzialmente determinato dalla combinazione dei moti quantistici degli atomi nelle diverse fasi (gas, liquido e solido) in funzione della massa atomica dell'elemento. Universalmente, i sistemi naturali tendono a minimizzare la loro energia interna e, pertanto, anche la distribuzione degli isotopi dei diversi elementi sarà funzionale alla minimizzazione dell'energia associata al sistema. All'equilibrio chimico, sarà possibile calcolare la distribuzione degli isotopi in una reazione chimica, come per qualsiasi convenzionale reazione, dalla costante all'equilibrio (nel caso specifico, il fattore di frazionamento) a sua volta funzione (in accordo all'equazione di Arrhenius) della temperatura e dell'energia di attivazione associata alla reazione stessa.

Il frazionamento isotopico legato a processi cinetici è invece associato a reazioni naturali veloci, unidirezionali e generalmente incomplete (quindi non all'equilibrio chimico). Tra questi processi sono generalmente considerati l'evaporazione, la diffusione, le reazioni di dissociazione, le reazioni mediate da meccanismi biologici, etc.

Le molecole che contengono gli isotopi più pesanti sono più stabili e sono caratterizzate da energie di dissociazione più elevate rispetto alle molecole che contengono gli isotopi più leggeri. Pertanto, gli isotopi più leggeri saranno preferenzialmente concentrati nei prodotti delle reazioni chimiche associate, poiché i legami che coinvolgono proprio gli isotopi più leggeri nei reagenti sono meno energetici.

Effetti cinetici importanti sono per esempio quelli legati a reazioni mediate biologicamente (fotosintesi, reazioni batteriche, etc.) (tra gli altri Park e Epstein, 1960) quanto quelle legate ai diversi passaggi di fase del ciclo idrologico (tra gli altri Clark e Fritz, 1997; Craig e Gordon, 1965; Dansgaard, 1964; Ferrowsky e Polyakov, 1982).

Per definizione, se i reagenti e i prodotti mantengono lo stesso rapporto isotopico nessun frazionamento si verifica ed $\alpha=1$. Durante una reazione, il valore di composizione isotopica del reagente residuo (δ_s) rispetto alla composizione isotopica del prodotto (δ_0) cambia in accordo al modello unidirezionale (applicabile solo a sistemi chiusi) di Rayleigh $\delta_s = \delta_0 + \epsilon \ln(1-f)$, dove $\epsilon = 1000(\alpha - 1)$ ed f rappresenta la frazione dei reagenti che sono stati consumati durante la reazione. Sebbene i sistemi naturali non possano mai essere considerati assolutamente chiusi ed unidirezionali, il modello di Rayleigh può essere applicato per una buona comprensione dei sistemi considerati e viene generalmente applicato per lo studio del comportamento di ossigeno e idrogeno nel ciclo idrologico, nel ciclo dell'azoto in ambiente marino, ecc.

38.3 MISURA DEI VALORI DI $\delta^{13}\text{C}$ NEL CARBONIO INORGANICO DISCIOLTO (DIC) IN ACQUA DI MARE

Lo studio della composizione isotopica del carbonio del pool di carbonio inorganico disciolto in acqua di mare è attualmente considerato uno strumento di particolare interesse per indagini sui processi legati a:

- l'evoluzione del sistema carbonatico all'interfaccia aria/mare per effetto dei processi di interazione tra il Carbonio Organico Disciolto (DIC) e la CO_2 atmosferica,
- il ruolo giocato sul budget di carbonio dalla pompa biologica,
- il ruolo giocato dal sistema di circolazione oceanico e dalla distribuzione del DIC legato a masse d'acqua diverse (Kroopnick, 1974).

Fin dagli anni '90 le concentrazioni di DIC in campioni di acqua di mare sono stati misurati allo scopo di valutare e quantificare le sorgenti e i flussi di carbonio in ambiente oceanico (Aravena *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1996). Sebbene queste misure risultino importanti per caratterizzare i sistemi ambientali nel loro insieme, esse non danno nessuna specifica informazione sulla sorgente vera e propria di carbonio. A tale scopo, oltre alla concentrazione assoluta di carbonio risulta necessario misurare il rapporto degli isotopi stabili del DIC ($\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$) che più strettamente riflette la sorgente di carbonio al sistema (per esempio, McCorkle *et al.*, 1985; Blair *et al.*, 1994).

38.3.1 Principio del metodo

I metodi più comuni per la misura di $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ sono quelli relativi all'estrazione sotto vuoto di CO_2 prodotta dall'acidificazione del campione, alla seguente raccolta del gas a seguito di congelamento e intrappolamento della CO_2 e all'inserimento del gas stesso nello spettrometro di massa (Tane *et al.*, 1973). Alternativamente Swinnerton e Linnenbom (1967) e quindi Kroopnick (1974) hanno proposto il metodo di estrazione diretto del gas dal campione di acqua, con inserimento diretto in un sistema "purge and trap" e quindi nello spettrometro di massa. Infine, metodi alternativi (Miyajima *et al.*, 1995) hanno proposto l'uso di sistemi di campionamento in configurazione "spazio di testa" con acidificazione con HCl del campione di acqua, equilibratura per 40 h e quindi passaggio in spettrometro di massa.

Tutti i metodi analitici citati, sebbene generalmente assicurino buona riproducibilità e accuratezza, necessitano di costose e complesse linee di estrazione per i campioni nonché di lunghi tempi di equilibratura della CO_2 .

Il metodo che viene riportato in questo paragrafo consente di ottenere altrettanto buoni risultati (in termini di riproducibilità ed accuratezza delle misure), con un dispendio molto inferiore di tempo e con un sistema di acquisizione innovativo recentemente sviluppato da ThermoFisher (sistema di preparazione automatica di campioni con GasBenchII) utile alla preparazione in automatico di 96 campioni, in "continuous flow", di CO_2 estratta da matrici solide e liquide (per ulteriori approfondimenti vedi Salata *et al.*, 2000).

Di seguito vengono riportati i dettagli relativi alla metodica di campionamento ed analisi del $\delta^{13}\text{C}_{\text{DIC}}$ in acqua di mare.

38.3.2 Schema delle operazioni in mare

Dato il ridotto volume d'acqua del campione necessario per le analisi, un massimo di 30 ml di campione vengono direttamente raccolti dalle bottiglie Niskin, GoFlo, etc. con la sola accortezza di evitare la formazione di bolle d'aria all'interno del vial di raccolta (generalmente in vetro con tappo e setto in silicone a doppio strato). L'ideale è il campionamento con tubo di Tygon direttamente collegato alla bottiglia di campionamento e che assicura un flusso più regolare e controllabile di acqua all'interno del vial.

Il campione viene quindi "avvelenato" con una soluzione satura di HgCl_2 in proporzione $\sim 1/1200$. Il campione viene quindi accuratamente sigillato e mantenuto a $\sim 4^\circ\text{C}$ sino al momento dell'analisi. Una serie di esperienze effettuate da diversi laboratori assicurano il mantenimento adeguato del campione per diversi mesi dal momento della raccolta.

38.3.3 Schema delle operazioni in laboratorio

La metodologia proposta prevede l'inserimento di circa 30 μl di H_3PO_4 (100%) in un vial da 10 ml con setto in silicone. Il gas atmosferico presente all'interno del volume del vial viene quindi sostituito, tramite insufflaggio con ago a due vie, di He (99,99999%) che rappresenterà il gas di trasporto nel sistema di misura isotopica in "continuous flow". L'elio verrà insufflato all'interno del vial alla pressione di circa 1,4 bar per 10 min.

Un'aliquota di circa 2 ml di acqua di mare viene quindi inserita all'interno del vial, lasciando il campione ad equilibrare per 4 h alla temperatura di 25°C .

Una serie di standard (costituiti dalla miscela di acqua MilliQ con carbonato di calcio a composizione isotopica nota) vengono preparati con la stessa procedura ed analizzati per verificare la riproducibilità analitica e stabilità dell'apparato strumentale.

Alla fine del tempo di equilibratura (circa 4 h), viene estratta la miscela di CO_2 -He, prodotta dall'attacco da parte dell'acido ortofosforico con il DIC dell'acqua di mare, e trasportata allo spettrometro di

massa da un flusso continuo di He ancora una volta insufflato all'interno del vial da un ago a doppia via. La miscela viene fatta fluire all'interno di una colonna cromatografica (PoraplotQ da 7 m, 0,53 mm ID) per la separazione della CO₂ da una serie di composti (soprattutto H₂O, CO, CH₄ e C₂H₆) che potrebbero prodursi per effetto della reazione in ambiente acido e che potrebbero interferire con la misura finale. La misura della composizione isotopica finale della CO₂ viene effettuata sulla media di tre picchi cromatografici confrontati con almeno tre picchi di standard interno. Quest'ultimo è costituito da CO₂ ultrapura (99,99999%) precedentemente misurata e riferito allo standard internazionale VPDB.

I risultati vengono riportati in notazione δ contro lo standard internazionale VPDB. L'accuratezza della misura stimata sulla base di un set di misure effettuate su standard certificato è del 99% e la riproducibilità delle misure è di 0,08‰ (2 σ).

38.4 MISURA DEI VALORI DI COMPOSIZIONE ISOTOPICA $\delta^{15}\text{N}$ E $\delta^{13}\text{C}$ NEL POM E NEL SEDIMENTO

La sostanza organica nei sedimenti di **piattaforma continentale** si origina sia nella zona fotica per produzione algale sia da input terrestri. La composizione isotopica del carbonio organico è stata largamente utilizzata come un indicatore per determinare il contributo relativo marino e terrestre della materia organica. Le piante terrestri sono impoverite in ¹³C rispetto al fitoplancton marino (-28/-26‰ contro -18/-20‰) in relazione alla diversità delle fonti di CO₂ ed aspetti legati al metabolismo. Altri fattori, come temperatura e composizione delle specie fitoplanctoniche possono produrre differenze nel frazionamento isotopico (Wong e Sackett, 1978; Fontugne e Duplessy, 1981), ma in aree costiere la provenienza della sostanza organica è di gran lunga il parametro più importante.

In **oceano**, il trend più importante osservato nel carbonio organico marino è una diminuzione del $\delta^{13}\text{C}$ del plancton all'aumentare della latitudine, fino a -26/-31‰ nelle regioni polari. La diminuzione di ¹³C nel plancton di alta latitudine all'inizio fu attribuita all'influenza della temperatura sui processi metabolici intracellulari, ma successivamente è stato dimostrato che la composizione isotopica del C dipende dalla *p*CO₂ delle acque superficiali (Rau *et al.*, 1992), tanto che ne fu suggerito l'uso come possibile paleobarometro di CO₂ atmosferica. In particolare, il valore di $\delta^{13}\text{C}$ della frazione organica del plancton marino decresce all'aumentare della concentrazione di CO₂ disciolta [CO₂(aq)]. Studi più recenti (Laws *et al.*, 1995; Rau *et al.*, 1997) hanno mostrato che altri fattori sono importanti nel controllare la composizione isotopica del carbonio, tra cui la velocità di crescita algale, il frazionamento specie-specifico, l'assimilazione e respirazione eterotrofa nella colonna d'acqua, reazioni microbiche all'interfaccia acqua-sedimento, e la diagenesi. In ambienti di alta latitudine, occorre prendere in considerazione anche l'apporto dal ghiaccio marino di comunità arricchite in ¹³C. Per quanto tutti questi fattori probabilmente contribuiscono a determinare il valore di $\delta^{13}\text{C}$ del carbonio organico particolato, un recente studio (Villinski *et al.*, 2000) condotto nel Mare di Ross (Antartide), un'area con apporti trascurabili di sostanza organica terrestre, favorisce l'ipotesi che il fattore più importante di regolazione sia l'alta velocità di rimozione di CO₂[aq] legata a fioriture fitoplanctoniche. In questo caso quindi un aumento del valore di $\delta^{13}\text{C}$ nel sedimento dovrebbe essere messo in relazione ad un aumento della produzione primaria al momento della deposizione.

La composizione isotopica dell'azoto particellato (PN) presente in ambiente marino è determinata da molteplici fattori: le condizioni nelle quali è avvenuta la crescita del fitoplancton, i livelli trofici attraverso cui è passata la materia organica analizzata, il suo livello di degradazione ad opera delle comunità batteriche e la sua origine: marina o terrestre (per una trattazione più dettagliata si rimanda a testi più specifici ES. Altabet, 1996b). Fortunatamente però spesso prevalgono solo alcuni di questi fattori, e ciò permette di ricavare informazioni sull'origine della frazione organica analizzata e sulla biogeochimica del ciclo dell'azoto, difficilmente ottenibili con altri traccianti.

Su scala globale i valori di $\delta^{15}\text{N}$ del PN variano indicativamente da -5 ‰ a +6 ‰ in oceano e mare aperto, mentre raggiungono valori più elevati (anche fino a 14 ‰) in zone costiere o dove siano presenti forti tassi di denitrificazione nella colonna d'acqua.

I valori di $\delta^{15}\text{N}$ del particolato sospeso sono stati utilizzati per studiare l'apporto di nutrienti alla zona eufotica in oceano aperto (Mino *et al.*, 2002), l'influenza delle strutture di mesoscala (gyre e cicloni) su questo processo (Altabet e Mc Carthy, 1986), per identificare la presenza di zone ad elevati tassi di azoto-fissazione (Mahaffey *et al.*, 2003), per tracciare l'assimilazione di azoto prodotto per denitrificazione nella colonna d'acqua (Voss *et al.*, 2001) e valutare l'importanza degli apporti atmosferici sulla produttività marina (Paerl e Fogel, 1994).

L'analisi del $\delta^{15}\text{N}$ nel PN esportato dalla zona eufotica permette di ottenere una informazione su lunga scala temporale, riguardante l'azoto che ha sostenuto i processi produttivi ed i processi che sono intercorsi fra la produzione e l'esportazione della materia organica particellata (Voss *et al.*, 1996; Altabet *et al.*, 1999; Holmes *et al.*, 2002).

Il trasferimento di questo segnale al sedimento può invece essere complicato da modificazioni diagenetiche, che risultano però essere generalmente poco rilevanti in presenza di alti flussi di sedimentazione (Altabet e Francois, 1994). Il valore del $\delta^{15}\text{N}$ nel sedimento può quindi essere usato come tracciante delle modificazioni nell'utilizzo dei nutrienti azotati su scala geologica ed indice della paleoproduttività marina (Holmes *et al.*, 1997; Schubert *et al.*, 2001). Può così fornire importanti informazioni sulle modificazioni dei cicli biogeochimici marini in relazione ai cambiamenti climatici avvenuti nel passato, soprattutto se combinato con altri traccianti quali i valori di $\delta^{13}\text{C}$.

38.4.1 Principio del metodo

Il metodo di determinazione degli isotopi stabili di C ed N in campioni solidi o liquidi (Bulk Sample Isotope Analysis BSIA, o Elemental Analyzer Isotope Ratio Mass Spectrometry EA-IRMS) si basa sull'ossidazione ad alta temperatura dei composti organici ed azotati, sulla riduzione degli ossidi di azoto ad N_2 , sulla separazione di CO_2 e N_2 mediante gascromatografia e la successiva determinazione dei rapporti isotopici con uno spettrometro di massa a settore magnetico.

I primi studi utilizzarono tecniche a colonna cromatografica off-line per la separazione e purificazione delle singole molecole per analisi isotopiche. Recentemente l'interfacciamento di un gascromatografo o di un Elemental Analyzer CHN ad uno spettrometro di massa ha permesso la separazione dei prodotti molecolari di combustione e la determinazione dei rapporti isotopici on-line. Questa tecnica, detta a flusso continuo (*continuous flow*), è diventata standard e permette la determinazione simultanea su un singolo campione di materia organica combustibile dei rapporti isotopici $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$. Nel metodo "*continuous flow*" la preparazione del campione e la successiva analisi avvengono in un flusso continuo di gas inerte (He). L'uso di tecniche on-line ha svariati vantaggi rispetto a quella off-line: minimizza la possibilità di contaminazione del campione nella fase di distillazione, è più rapida e richiede una minore quantità di campione. D'altra parte necessita di un'apposita interfaccia che colleghi l'analizzatore elementare allo spettrometro di massa. L'interfaccia (es., CONFLO per quanto riguarda Thermo Scientific) ha essenzialmente 3 funzioni: 1) trasferisce in modo efficiente il gas in uscita dall'analizzatore elementare verso la sorgente ionica dello spettrometro; 2) aggiusta la sensibilità del sistema totale in rapporto all'abbondanza relativa di carbonio e azoto presente nel campione, diluendo eventualmente l'elemento più abbondante con He; 3) permette la calibrazione dei rapporti isotopici di C e N in modo indipendente, mediante l'iniezione controllata dei gas di riferimento.

I maggiori problemi per la progettazione di uno spettrometro di massa che funzioni a flusso continuo sono quelli di far percorrere il minor spazio possibile agli ioni a parità di dispersione e di rimuovere dall'analizzatore quanto più possibile l'elio usato come gas di trasporto. Il sistema di vuoto applicato alla sorgente rimuove l'elio, consentendo di ottimizzare la ionizzazione ed evitando l'abbattimento degli ioni utili.

38.4.2 Schema delle operazioni in mare

Per la raccolta dei campioni di POM e sedimento si utilizzano le stesse attrezzature e gli stessi accorgimenti descritti nel capitolo dedicato all'analisi del carbonio e azoto organico. Per una buona analisi isotopica sono necessari almeno 10-14 $\mu\text{g-N}$ (0,7 - 1 μ moli-N) oppure 10-12 $\mu\text{g-C}$ (0,8 - 1 μ moli-C) per ogni campione, anche se la quantità ottimale è circa 10 volte superiore.

38.4.3 Schema delle operazioni in laboratorio

38.4.3.1 Attrezzatura

- Fogli circolari (\varnothing 30 mm) o capsule (\varnothing 10 mm, h 10 mm) di stagno (Sn) ultrapuri per analisi elementale (Analisi filtri).
- capsule (\varnothing 5 mm, h 9 mm) di stagno (Sn) o argento (Ag) ultrapuri per analisi elementale (Analisi sedimenti).
- Pressa per incapsulare i campioni o strumento con funzione analoga auto-costruito.
- Stufa per asciugare i filtri o i sedimenti.
- Microbilancia con sensibilità 1 μg (Analisi sedimenti).
- Capsule Petri in vetro ed eventualmente essiccatore (decarbonatazione).

Il sistema di misura a flusso continuo degli isotopi stabili di C e N è essenzialmente costituito da:

- Elemental Analyzer CHN o un gascromatografo, dotato di autocampionatore da 32-50 campioni,
- Spettrometro di massa a settore magnetico
- Interfaccia tra EA-CHN e Spettrometro,
- Personal Computer con software dedicato per configurazione, calibrazione, analisi, acquisizione e processing dei dati.

38.4.3.2 Prodotti chimici

- Decarbonatazione: HCl (grado reagente)
- Composti chimici necessari per il funzionamento dell'analizzatore elementare.
- Colonna di ossidazione: ossidi di cromo Cr_2O_3
- Colonna di riduzione: trucioli di rame (Cu)
- Trappola acqua: perclorato di magnesio anidro granulare ($\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$)
- Trappola CO_2 : Carbosorb, in alternativa, calce sodata (solo se si analizza unicamente l'azoto).

I prodotti utilizzati per l'analisi degli isotopi stabili sono essenzialmente gas illustrati in tabella insieme alla loro funzione e al grado di purezza richiesta.

GAS	FUNZIONE	Grado / Tipo	Titolo
He	Gas di trasporto entro EA-CHN e CONFLO	5,5/Ricerche	>99,9995%
O_2	Favorisce la combustione a flash entro EA-CHN	5/Transistor	>99,999%
Aria compressa	Start rotazione campionatore EA-CHN, Regola apertura/chiusura valvole pneumatiche CONFLO	5/Cromatografia	> 99,999%
CO_2^*	Gas di riferimento entro spettrometro	4,8/Ricerche	>99,998%
N_2^*	Gas di riferimento entro spettrometro	5,5/Transistor	>99,9995%

(*) Se lo strumento prevede il loro utilizzo.

38.4.3.3 Preparazione dei campioni

I campioni raccolti mediante trappole di sedimentazione vengono preventivamente risciacquati dal preservante (usualmente soluzione di formalina) e sottoposti alla rimozione manuale degli swimmers. A questo punto vengono risospesi in acqua e suddivisi in varie aliquote da destinare alla determinazione degli analiti ricercati. Per la misura dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ la sospensione acquosa viene filtrata con le stesse modalità ed accorgimenti descritti per la raccolta del particellato sospeso. Gli studi fino ad ora eseguiti non evidenziano alterazioni particolarmente significative delle abbondanze isotopiche di carbonio e azoto, su questo tipo di campioni, dovute all'effetto della formalina ed alle successive manipolazioni (Altabet *et al.*, 1999).

I filtri di particellato sospeso e da campioni di trappole vengono asciugati in stufa a 60°C, ripiegati in quattro e racchiusi in capsule o avvolti in dischi di stagno (Sn) per analisi elementale e compressi in modo da formare un "pellet".

I campioni di sedimento vengono essiccati in stufa a bassa temperatura (50-60°C) o liofilizzati, quindi disaggregati in un mortaio e setacciati su un retino con maglia di 2 mm. I campioni di sedimento vengono pesati con una microbilancia direttamente dentro alle capsule di stagno utilizzate per l'analisi, vengono poi richiusi e compressi. In genere, si pesa una quantità compresa fra 5 e 25 mg in relazione ai contenuti di sostanza organica attesi.

Per misurare l'abbondanza isotopica del ^{15}N nella componente organica, non è necessario alcun trattamento preliminare, in quanto, comunemente, in ambiente marino non vi sono minerali di azoto che possano interferire con l'analisi (Karl *et al.*, 1991).

Per misurare anche l'abbondanza isotopica del ^{13}C è necessario eliminare ogni traccia di carbonio inorganico dai campioni prima dell'analisi, in quanto i carbonati sono arricchiti in ^{13}C anche del 30% rispetto alla sostanza organica ed anche un piccolo residuo porta, pertanto, ad un grosso errore sulla misura.

In letteratura vengono riportati numerosi metodi per la decarbonatazione: tutti prevedono un trattamento con acido forte (H_3PO_4 , HCl , H_2SO_4) che varia nel tipo usato, nella concentrazione, nella modalità di esposizione del campione, ed una successiva fase di eliminazione dell'acido in eccesso. Ad oggi non c'è un generale consenso su una singola metodica. Di seguito ne presentiamo due fra le più utilizzate, che hanno dato buoni risultati in esperimenti condotti "ad hoc", ma si raccomanda di scegliere e testare di volta in volta quella più adatta al tipo di campioni ed al tipo di analisi da eseguire.

Decarbonatazione "in situ" per aggiunta diretta di acido.

In questo caso, occorre pesare il sedimento in una capsula di **argento** (Ag) per analisi elementale. Aggiungere goccia a goccia sul campione, una piccola aliquota (fino a 500 μl) di HCl 1-2 M o 20-25% e lasciar asciugare in stufa a 40-60°C. Ripetere il trattamento più volte, fino a completa scomparsa dell'effervescenza; far quindi asciugare il campione in stufa a 60°C per eliminare tutto l'acido in eccesso per evaporazione (scomparsa dell'odore acre) (Nieuwenhuize *et al.*, 1994; Kennedy *et al.*, 2005).

I **filtri** di particellato sospeso e di trappole di sedimentazione ricchi in carbonato vengono collocati in capsule petri di vetro e trattati con acido con le stesse modalità.

Decarbonatazione per esposizione a vapori di HCl.

Sul fondo di un essiccatore in vetro perfettamente pulito versare 10 -20 ml di HCl concentrato. Mettere i filtri in capsule Petri di vetro e collocarle nell'essiccatore esposte ai vapori ma non a diretto contatto con l'acido per 4 - 12 ore, eliminare quindi l'acido in eccesso facendo asciugare i campioni in stufa a 60°C (Lorrain *et al.*, 2003). Controllare tutto il trattamento con dei bianchi procedurali (filtri senza campione sottoposti alle stesse manipolazioni) in quanto questa metodica presenta un elevato rischio di contaminazione dei campioni e si deve evitare di usare grassi siliconici per la tenuta degli essiccatori (Schubert e Nielsen, 2000).

38.4.3.4 Procedura analitica

Al momento dell'analisi, il campione viene introdotto in un reattore di ossidazione, dove avviene la combustione ad alta temperatura (1000-1050°C), in presenza di ossigeno e catalizzatori (in genere ossidi di cromo Cr₂O₃), in condizioni tali da ottenere una completa conversione dei composti azotati in ossidi di azoto e del carbonio in CO₂. La reazione esotermica della combustione, anche per effetto dell'ossidazione del metallo delle capsule in cui è inserito il campione, causa una combustione a flash portando la temperatura fino a 1600-1800°C. Segue poi il passaggio attraverso la colonna di riduzione (rame ridotto, 600-650°C) che ha il duplice scopo di ridurre la miscela di ossidi ad azoto molecolare e di assorbire l'ossigeno in eccesso, e attraverso la trappola per l'eliminazione dell'acqua ed eventualmente della CO₂. I gas arrivano poi nella colonna gascromatografica (Porapak, 4m) mantenuta a 40°C per separare i picchi di CO₂ e N₂. I due gas vengono quindi rilevati dallo spettrometro di massa che è in grado di determinare sia la quantità totale di azoto e carbonio presenti nel campione che il loro arricchimento isotopico.

Un'analisi tipica degli isotopi di C e N inizia con il peak center dello spettrometro sulle masse 28, 29 e 30, per la misura del δ¹⁵N. Il CONFLO permette quindi una triplice iniezione di N₂ precedentemente misurato e riferito allo standard internazionale air-N₂. Viene poi attivato lo start dell'Elemental Analyzer ed un campione viene introdotto nella colonna di combustione. Dopo un certo tempo (tempo di ritenzione) il picco relativo all'azoto arriva al detector. L'acquisizione dei dati si interrompe, lo spettrometro ora si posiziona sulle masse 44, 45 e 46 e fa ripartire una nuova analisi. Non essendoci abbastanza tempo per effettuare il peak center, la macchina userà una coppia di valori fissi di corrente del magnete e di tensione della sorgente basandosi su una procedura di calibrazione del *fast jumping* che dovrà essere aggiornata con una frequenza almeno settimanale. Poiché nella sostanza organica il C è più concentrato dell'N di circa un fattore 10, verrà abilitata una diluizione del segnale del CO₂ mediante un'ulteriore iniezione di He dal CONFLO. Dopo l'arrivo del picco del CO₂ del campione, l'analisi si conclude con una triplice iniezione di CO₂ usato come gas di riferimento, anch'esso precedentemente misurato e riferito allo standard internazionale VPDB.

38.4.3.5 Standardizzazione e calcoli

Bianchi

I dati così ottenuti vengono corretti per quella porzione di segnale isotopico non proprio del campione analizzato ma dovuto alla capsula di stagno e al filtro (bianchi procedurali) e/o all'analisi in se: impurità nell'elio, effetto memoria, ecc (bianchi strumentali). L'entità delle correzioni da effettuare varia molto a seconda delle condizioni strumentali, del tipo di campioni e dalle loro quantità di carbonio e azoto, va comunque valutata con delle misure "ad hoc". In alcuni casi il contributo del bianco può essere del tutto trascurabile, in altri è necessario fare una correzione a "bilancio di massa", vedi Fry *et al.* (1992) per una descrizione più dettagliata.

Standard certificati e materiale di riferimento da laboratorio

Le bombole di gas di riferimento vengono tarate con opportuni standard primari o secondari (vedi tabella). In genere si scelgono standard con valori isotopici vicini a quelli dei campioni da analizzare. Recentemente sono state presentate nuove linee guida per la misura del δ¹³C con un miglioramento della consistenza delle misure di δ¹³C superiore al 40% (Coplen *et al.*, 2006). Questo approccio si basa sull'ancoraggio alla scala del δ¹³C non di 1 ma di 2 standard che differiscono in modo sostanziale nel rapporto ¹³C/¹²C (carbonato di litio L-SVEC, -46,6 ‰ e carbonato di calcio NBS19, +1,95 ‰). Alla luce di questo approccio innovativo, il valore di alcuni standard hanno subito shift significativi. I valori aggiornati possono essere trovati all'indirizzo internet della IAEA (<http://curem.iaea.org/catalogue/SI/index.html>).

SRM	Tipo di matrice	Stato	$\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}_{\text{air}}$ (‰)
NBS-19	Carbonato di calcio	Per definizione	+1,95	
IAEA - CH-6	Saccarosio	certificato	-10,449±0,033	
NBS22	Oil	certificato	-30,031±0,043	
USGS24	Grafite	certificato	-16,049±0,035	
IAEA – CH-7	Polietilene	certificato	-32,151±0,050	
USGS40	Acido L- glutammico	$\delta^{13}\text{C}$, certificato/		
	$\delta^{15}\text{N}$, raccomandato	-26,389±0,042	-4,52±0,12	
IAEA-N-1	(NH ₄) ₂ SO ₄	certificato		+0,4±0,2
IAEA-NO-3	KNO ₃	certificato		+4,7±0,2

Iniezioni ripetute dei gas di riferimento sono uno strumento utile per monitorare la risposta strumentale dello spettrometro di massa ma non danno alcuna informazione sul funzionamento e sulla resa del processo preparativo di combustione e purificazione. Diventa quindi necessario introdurre dei campioni di riferimento da laboratorio, da analizzare assieme ai campioni, che possano monitorare tutta l'analisi strumentale (Werner Brand, 2001). Questi standard da laboratorio vanno calibrati rispetto ad uno standard certificato di riferimento, devono essere simili al materiale da analizzare come composizione chimica ed arricchimento isotopico, stabili ed isotopicamente omogenei; per campioni marini vengono usati, ad esempio, l'acetanilide, la caffeina, il peptone o un campione di sedimento.

Precisione e accuratezza

La riproducibilità della procedura analitica si può determinare analizzando almeno 10 aliquote indipendenti di uno standard di laboratorio e quindi si calcola la media e la deviazione standard della serie di misure; buone precisioni sono $\pm 0,2\%$ per $\delta^{15}\text{N}$ e $\pm 0,05\%$ per $\delta^{13}\text{C}$. Tale test può essere usato anche per valutare l'accuratezza di un metodo se viene usato un materiale certificato di riferimento. È buona norma analizzare quotidianamente alcune aliquote di standard da laboratorio per valutare, nell'arco di più mesi, la precisione a lungo termine della procedura analitica (Werner e Brand, 2001).

Pesando aliquote differenti di un campione noto in un range di almeno un ordine di grandezza di variazione si può controllare se i rapporti isotopici ottenuti sono costanti, cioè indipendenti dalla quantità del campione dopo la correzione per il bianco. Questo test permette di valutare la quantità di campione minima necessaria per raggiungere una certa riproducibilità.

38.4.3.6 Raccomandazioni e possibili problemi

La determinazione simultanea del carbonio organico e dell'azoto è problematica poiché può introdurre errori dovuti al procedimento di acidificazione utilizzato per la rimozione dei carbonati prima della determinazione del carbonio organico. I metodi di acidificazione per esposizione ai vapori acidi possono causare contaminazione da composti organici (Schubert e Nielsen, 2000) oppure da composti azotati (Ryba *et al.*, 2002, Harris *et al.*, 2001, Giani, dati non pubblicati) che possono influenzare anche i valori di $\delta^{15}\text{N}$ (Harris *et al.*, 2001). Il metodo di acidificazione diretta può causare perdite di carbonio organico per volatilizzazione (King *et al.*, 1998) o decarbossilazione e perdite di azoto (Lohse *et al.*, 2000; King *et al.*, 1998; Lorrain *et al.*, 2003; Ryba *et al.*, 2002), in particolare utilizzando acido solforoso (King *et al.*, 1998).

Va osservato che i campioni con un elevato contenuto della frazione argillosa possono contenere azoto ammoniacale associato a tali frazioni (Müller, 1977; De Lange, 1992, Giordani e Angiolini, 1983) che può contribuire a determinare il valore finale del $\delta^{15}\text{N}$ misurato assieme alla frazione azotata nelle molecole

organiche. Tuttavia questo pool non è considerato essere significativo e viene normalmente trascurato (Karl *et al.*, 1991). Nel caso in cui tale contributo debba essere considerato, il $\delta^{15}\text{N}$ dell'azoto inorganico nel sedimento può essere misurato dopo aver eliminato l'azoto organico mediante trattamento con una soluzione di KOB_r-KOH (Schubert e Calvert, 2001). Il $\delta^{15}\text{N}$ dell'azoto organico può essere calcolato dal bilancio di massa conoscendo $\delta^{15}\text{N}_{\text{tot}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{inorg}}$ ed il contenuto di N_{tot} , N_{inorg} e N_{org} ($\text{N}_{\text{tot}} - \text{N}_{\text{inorg}}$).

Le impurità di azoto contenute nell'ossigeno possono costituire un limite alle quantità minime di azoto analizzabili, che dovrebbero non essere inferiori a 1 μmol per mantenere il contributo dell'errore dovuto alle impurità sotto il 10 % (Owen e Rees, 1989).

Può succedere che si debba analizzare una serie di campioni che presenta grosse variazioni di massa e/o di rapporto isotopico, tali da uscire dall'intervallo di linearità della risposta strumentale. In questo caso si analizzano assieme ai campioni alcuni standard con quantità e/o arricchimento isotopico tali da coprire l'intervallo desiderato e si utilizzano i valori così ottenuti per la correzione dei dati derivati dall'analisi dei campioni (Werner e Brand, 2001).

38.5 MISURA DEI VALORI DI COMPOSIZIONE ISOTOPICA DEL NITRATO IN ACQUA DI MARE

Il nitrato (NO_3^-) è la principale forma di azoto (N) biodisponibile in oceano. Le naturali variazioni isotopiche di questa specie forniscono indicazioni sia sulle sorgenti di N, che sulle sue fondamentali trasformazioni in oceano.

L'assimilazione del NO_3^- da parte del fitoplancton produce un frazionamento isotopico dell'N, evidente sia nel particellato (PN) sospeso e sedimentato che nel NO_3^- (Miyake e Wada, 1971; Wada e Hattori, 1976; Altabet, 1996b; Waser *et al.*, 1998). Durante l'assimilazione, l'arricchimento isotopico nelle diverse specie varia con il grado di utilizzo dei nutrienti presenti in superficie. Generalmente, diminuzioni del $\delta^{15}\text{N}$ nel PN sono accompagnate da un aumento di $\delta^{15}\text{N}$ nel NO_3^- (Altabet e Deuser, 1985; Voss *et al.*, 1996, Lourey *et al.*, 2003).

La denitrificazione, analogamente, produce un frazionamento isotopico. Nelle regioni d'ipossia, i batteri denitrificanti consumano preferenzialmente $^{14}\text{NO}_3^-$ lasciando il substrato arricchito di $^{15}\text{NO}_3^-$ (Altabet *et al.*, 1999; Cline e Kaplan, 1975). Valori di $\delta^{15}\text{NO}_3^-$ tipici nelle zone di minimo di ossigeno variano tra 8 e 16‰ (Sigman *et al.*, 2005, Brandes e Devol, 1997), mentre i valori medi di $\delta^{15}\text{NO}_3^-$ nell'oceano profondo (>2000m) sono intorno a 4,5-5 ‰ (Liu e Kaplan, 1989; Sigman *et al.*, 2000).

Un fenomeno rilevante in termini di alterazione dei rapporti di $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ è l'azoto fissazione. Alcuni procarioti (*Bacteria* ed *Archea*) assimilano N_2 atmosferico, introducendo nell'oceano azoto con un $\delta^{15}\text{N}$ di 0‰ (Carpenter *et al.*, 1997; Delwiche *et al.*, 1979; Hoering e Ford, 1960). Questo input di N nuovo può portare ad una locale diminuzione di $^{15}\text{NO}_3^-$ nelle acque sub-superficiali (Karl *et al.*, 2002; Pantoja *et al.*, 2002).

Un effetto analogo si registra in caso di deposizione atmosferica di N nelle forme organiche ed inorganiche. Le diverse fonti, antropiche o naturali, determinano un'ampia variazione del loro $\delta^{15}\text{N}$ (valori tra -10 e 0‰) come osservato da Paerl e Fogel (1994), e Kendall (1998).

Qui di seguito è descritto il metodo per l'analisi isotopica del NO_3^- detta "della diffusione dell'ammoniaca", messa a punto da Sigman *et al.* (1997). Si rimanda alla letteratura specifica (Cline e Kaplan, 1975; Slawyk e Raimbault, 1995; Sigman *et al.*, 2001; Casciotti *et al.*, 2003) per un approfondimento delle metodiche alternative.

38.5.1 Principio del metodo

L'estrazione del NO_3^- attraverso la diffusione dell'ammoniaca (NH_3), prevede due fasi cruciali: (1) la riduzione del NO_3^- (e NO_2^-) ad NH_3 usando la lega di Devarda e (2) la diffusione dell' NH_3 su un filtro acidificato. Entrambi questi passaggi devono avvenire in una bottiglia sigillata, a tenuta di gas. Per evitare

processi di frazionamento isotopico, è essenziale che tutto il NO_3^- sia convertito in ammoniaca e che quest'ultima sia totalmente trasferita sul filtro.

Il trattamento del campione prevede un'iniziale rimozione di NH_4^+ e DON labile attraverso un innalzamento del pH per spostare la reazione di equilibrio tra $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$ a favore dell' NH_3 . La successiva incubazione in stufa o ebollizione hanno lo scopo di rompere il DON labile e allontanare l' NH_4^+ e l' NH_3 ancora presente nel campione. L'ebollizione inoltre, per i campioni a basse concentrazioni, ha la funzione di diminuire il volume, aumentando la concentrazione di NO_3^- . La mancata rimozione di NH_4^+ e DON labile può compromettere il risultato finale dell'analisi in quanto il segnale isotopico di queste due specie si sommerebbe a quello del NO_3^- .

La riduzione di NO_3^- ad NH_3 avviene aggiungendo la lega di Devarda, una miscela di zinco, alluminio e rame, con elevato potere riducente. L' NH_3 prodotta diffonde nell'atmosfera sopra il liquido e viene assorbita da una soluzione acida (imbevuta su filtro). La reazione avviene in ambiente alcalino e necessita di un apporto minimo di calore per essere innescata. Il controllo della temperatura, della durata d'incubazione e del pH garantiscono una completa conversione di NO_3^- .

È da sottolineare che il metodo qui descritto, non distingue tra la composizione isotopica del nitrito e del nitrato. Questa approssimazione per campioni di oceano aperto non costituisce un problema, vista le concentrazioni trascurabili di nitrito. Per ambienti ricchi di nitrito, come le zone di minimo di ossigeno, è utile applicare il metodo indicato da Granger *et al.*, (2006).

38.5.2 Schema delle operazioni in mare

38.5.2.1 Attrezzatura

- bottiglie di campionamento in HDPE da 1l;
- HCl 6 M;
- pipetta automatica 1 ml;
- filtri in fibra di vetro, porosità $0,7\mu\text{m}$ (GF/F) precombusti per 3-4 h a 500°C ;
- sistema di filtrazione a raccolta.

38.5.2.2 Procedura di campionamento

I campioni di acqua di mare devono essere filtrati velocemente. Il volume da raccogliere varia a secondo della concentrazione di nitrato nel campione. Si consiglia per concentrazioni di $2\text{-}3\mu\text{M}$ di raccogliere almeno 1l di acqua. Il sistema di filtrazione deve essere lavato prima dell'uso con acqua bi-deionizzata, e possibilmente sciacquato con il campione. I filtri in fibra di vetro utilizzati devono essere stati precedentemente trattati in muffola a 500°C per 3-4 ore. Le bottiglie usate per la conservazione devono essere state precedentemente lavate con HCl (10%) e risciacquate abbondantemente con acqua bi-deionizzata.

I campioni possono essere congelati -20°C fino al momento dell'analisi, o avvelenati con 1-2 ml l⁻¹ di HCl (6M), omogeneizzati e conservati al buio a temperatura ambiente. Entrambi i metodi garantiscono un perfetto mantenimento del campione per molti mesi.

38.5.3 Schema delle operazioni in laboratorio

38.5.3.1 Attrezzatura

- filtri in fibra di vetro (GF) da 10 mm di diametro, precombusto per 3-4 h a 500°C ;
- pinzette di plastica o acciaio inossidabile;

-
- cilindro graduato da 1l;
 - boiling chips in vetro (3 mm) o in teflon;
 - pipetta da 3 ml;
 - pipetta da 0,35 μ l;
 - cilindri cavi da 15 e 20 mm di diametro, dal bordo smussato, per sigillare i pacchetti di diffusione;
 - filtri a membrana Mitex, PTFE, idrofobi, porosità 10 μ m, di 25 mm di diametro, bianchi, piani;
 - capsule porta filtro;
 - bottiglie con sottotappo in teflon a tenuta di gas, da 250, 500 o 1000 ml;
 - palloni a fondo sferico da 500-1000 ml o beute 1000 ml;
 - isomantelli o piastra riscaldante;
 - muffola;
 - stufa a circolazione d'aria per incubazione campioni;
 - pH-metro;
 - agitatore oscillante o bagno termostato con agitatore;
 - 2 essiccatori;
 - spettrometro di massa per l'analisi del rapporto isotopico $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ in campioni solidi accoppiato a un analizzatore elementare;
 - fogli di stagno circolari da 30 mm di diametro ultrapuri per analisi elementare;
 - pressa per incapsulare i filtri nel foglio di stagno o strumento con funzione analoga.

38.5.3.2 *Prodotti chimici*

- monossido di magnesio (MgO), precombusto per 3 h a 800 °C;
- soluzione di NaOH (10%);
- acido cloridrico (10%) HCl;
- cloruro di sodio (NaCl) precombusto per 3 h a 500 °C;
- lega di Devarda, precombusto per 3 h a 500 °C;
- acido solforico H_2SO_4 (2M);
- soluzione standard di NO_3^- 3 μ M;
- etanolo;
- acqua bi-deionizzata (milliQ).

L'acqua bi-deionizzata e tutti i reagenti, tranne le soluzioni di NO_3^- e l' H_2SO_4 , devono essere preparati subito prima dell'uso.

38.5.4 Preparazione dei campioni

La preparazione dei campioni è la fase più delicata del metodo. In Fig. 2 è schematizzata la sequenza delle operazioni in laboratorio prima dell'analisi allo spettrometro di massa.

È importante misurare un'adeguata quantità di campione in modo da garantire sufficiente N per lo spettrometro di massa. La quantità di NO_3^- ottimale è compresa tra 1 e 7 μ mol.

In caso di concentrazioni troppo elevate, diluire il campione con acqua bi-deionizzata. In caso contrario, aumentare la concentrazione attraverso l'ebollizione.

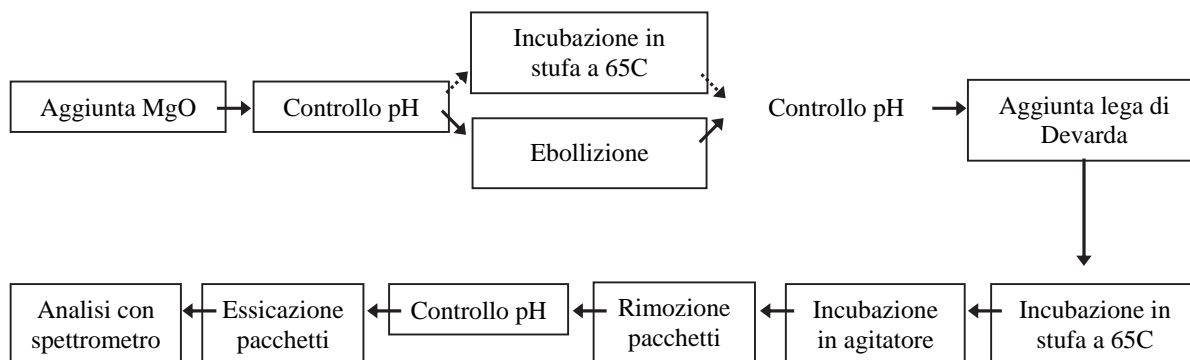


Fig. 2. Sequenza delle operazioni per la preparazione dei campioni.

Qui di seguito è descritta schematicamente la procedura con e senza ebollizione.

Tutta la vetreria utilizzata deve essere lavata con HCl 10% e sciacquata con acqua bi-deionizzata.

38.5.4.1 Rimozione NH_4^+ e DON labile (procedura con ebollizione)

- Trasferire il campione nella beuta o nel pallone a fondo sferico. Annotare il volume.
- Aggiungere 1 g di MgO per 100 ml di campione.
- Misurare il pH. Deve essere circa 11. Se inferiore, aggiungere NaOH (10%).
- Aggiungere le boiling chips e posizionare il campione su piastra riscaldante o in un isomantello.
- Continuare il riscaldamento fino ad una riduzione di volume pari al 15-20% del campione iniziale.
- Trasferire la soluzione rimanente in bottiglie di vetro a tenuta di gas. Risciacquare la beuta, o il pallone, con acqua bi-deionizzata e trasferire il contenuto nella bottiglia.
- Ricontrollare il pH.

38.5.4.2 Rimozione NH_4^+ e DON labile (procedura con ebollizione)

- Trasferire il campione in una bottiglia di vetro a tenuta di gas di volume opportuno. Annotare il volume.
- Aggiungere 1 g di MgO per 100 ml di campione.
- Misurare il pH. Deve essere circa 11. Se inferiore, aggiungere NaOH (10%).
- Incubare per 5 giorni in una stufa a circolazione d'aria a 60C.
- Ricontrollare il pH.

38.5.4.3 Riduzione del nitrato ad ammoniaca e diffusione

- Per bianchi e standard: aggiungere NaCl per arrivare circa alla salinità del campione. attenzione: le membrane del pacchetto di diffusione si apriranno in caso di salinità inferiore a 30.
- Prendere una membrana di teflon (precedentemente lavata con HCl (10%), sciacquata con acqua bi-deionizzata e asciugata in stufa) e mettere un filtro GF su di essa.
- Pipettare 30-35 μ l di H₂SO₄ sul filtro.
- Posizionare la seconda membrana (lavata analogamente) sopra la prima membrana ed il filtro e sigillare il pacchetto con i due cilindri dal bordo smussato.
- Aggiungere la lega di Devarda (75mg per 100 ml di campione finale) nella bottiglia a tenuta di gas. La lega è stata precedentemente pesata e conservata in eppendorf.
- Aggiungere i pacchetti di diffusione e chiudere velocemente e strettamente!

- Incubare per 8 giorni in stufa a 65 °C.
- Rimuovere i campioni dalla stufa ed incubare per 8 giorni in un shaker a circa 70 rpm.
- Rimuovere i campioni dallo shaker, e prelevare i pacchetti dalle bottiglie.
- Sciacquare i pacchetti con HCl (10%) e acqua bi-deionizzata.
- Mettere i pacchetti di diffusione nelle capsule porta filtro e poi in un essiccatore per 2 giorni.
- Nell'essiccatore deve essere presente un cilindro con H₂SO₄ per rimuovere tracce di NH₃.
- Subito dopo la rimozione del pacchetto, controllare il pH della soluzione e annotarlo.
- Aprire il pacchetto ed impacchettare il filtro in capsule di stagno (se analizzato in giornata) o di argento se conservate per giorni.
- Conservare le capsule in essiccatore fino al momento dell'analisi allo spettrometro di massa.

38.5.4.4 Preparazione di bianchi e standard

L'analisi dei campioni deve essere sempre accompagnata da analisi di bianchi e standard.

I bianchi permettono di valutare l'inquinamento di N a carico dei reagenti, in special modo della lega di Devarda. Generalmente, i valori risultano inferiori a 0,5-0,7 µmol di N. Per tali quantità, non viene effettuata una correzione sul valore isotopico finale, ma viene semplicemente sottratta la quantità di N del bianco all'N totale dei campioni.

Gli standard permettono di valutare la buona riuscita dell'analisi, ovvero il totale recupero di NO₃⁻ e l'assenza di processi di frazionamento.

La preparazione di bianchi e standard è analoga a quella dei campioni, se non per l'aggiunta di NaCl (bianchi e standard) e di nitrato (standard) a concentrazione e marcatura isotopica nota. La marcatura isotopica del NO₃⁻ della soluzione madre si ottiene analizzando NO₃⁻ solido o in soluzione. In questo secondo caso, le capsule di stagno vanno riempite della quantità opportuna di soluzione, e vanno evaporate in stufa tutta la notte e poi analizzate allo spettrometro.

38.5.5 Note e raccomandazioni

1. L'analisi dei campioni deve essere sempre accompagnata da analisi di bianchi e standard. La preparazione è analoga a quella dei campioni, se non per l'aggiunta di NaCl (per bianchi e standard) subito dopo l'ebollizione e di nitrato (per gli standard) a concentrazione e marcatura isotopica nota.
2. Il controllo del pH è essenziale affinché la reazione tra NH₄⁺ e NH₃ sia spostata verso NH₃. Verificare che sia sempre intorno ad 11 durante le varie fasi della procedura e correggerlo con HCl (10%) in caso di eccessive variazioni. Valori troppo elevati (>11,5) possono favorire la rottura del DON ed inquinare il campione. Verificare sempre la quantità di N recuperato con l'analizzatore elementare.
3. La lega di Devarda utilizzata deve essere in polvere. Test di confronto con lega di Devarda granulata mostrano che la reazione di riduzione non avviene perfettamente. La polvere, avendo un rapporto tra superficie e volume maggiore, permette una maggiore efficienza di reazione.
4. La preparazione dei pacchetti di diffusione va fatta subito prima dell'utilizzo, su una superficie semirigida ricoperta con un foglio di alluminio lavato con etanolo. Anche le pinzette e i cilindri di chiusura delle membrane vanno lavati analogamente.
5. L'aggiunta della lega di Devarda, del pacchetto di diffusione e la successiva chiusura della bottiglia va fatto in rapida sequenza. La reazione di riduzione del NO₃⁻ inizia immediatamente.
6. L'ambiente di lavoro per la preparazione dei campioni deve essere libero da ammoniaca. È bene svolgere le operazioni cruciali sotto cappa aspirante, anche durante la fase di ebollizione.

38.6 MISURA DEI VALORI DI COMPOSIZIONE ISOTOPICA $\delta^{13}\text{C}$ E $\delta^{15}\text{N}$ DELLA COMPONENTE ORGANICA DI ORGANISMI MARINI

Il frazionamento del C e N nei processi di fotosintesi e nel fitoplancton

Negli ultimi venti anni un intenso lavoro di misura dei valori di composizione isotopica di carbonio e azoto di organismi marini, soprattutto legati al comparto pelagico, ha dimostrato la versatilità di questo approccio per una più accurata definizione della catena trofica di sistemi marini complessi. Come accennato nell'introduzione, la variazione dei valori di composizione isotopica di organismi diversi è sostanzialmente legato all'effetto cinetico associato ai diversi isotopi di C e N che, lungo la catena trofica viene amplificato determinando frazionamenti misurabili.

Per quanto riguarda il rapporto isotopico del carbonio nel fitoplancton, risulta ovvio che esso dipenda direttamente dai valori di composizione isotopica della CO_2 organicata durante il processo di fotosintesi. In particolare, due passaggi chiave nel processo di assimilazione dell'anidride carbonica sembrano direttamente influire sui valori di composizione isotopica del fitoplancton stesso: l'assimilazione e la diffusione intracellulare della CO_2 e quindi il processo di biosintesi dei componenti cellulari.

Il valore medio del $\delta^{13}\text{C}$ della CO_2 durante il periodo pre-industriale era di $-7,0\text{‰}$ (Hoefs, 2004). Questo valore è significativamente diminuito negli ultimi 100 anni in risposta all'aumento della CO_2 derivante dai processi di combustione di carboni fossili (-27‰) e dalla decomposizione di biomassa organica frutto di processi antropogenici, raggiungendo un valore medio di circa $-8,0\text{‰}$.

Lo scambio di CO_2 tra atmosfera e superficie dell'oceano genera un frazionamento isotopico dovuto all'equilibrio chimico del sistema carbonatico e alla termodinamica del processo (per esempio Mook, 1994) che determina un incremento di circa 1‰ del valore di composizione isotopica dello ione bicarbonato. Un significativo frazionamento cinetico durante il processo di fotosintesi planctonica che determina l'assunzione del carbonio inorganico disciolto, porta il valore di composizione isotopica delle microalghe ad un valore del $\delta^{13}\text{C}$ di circa $-19/-24\text{‰}$. D'altro canto, lo stesso valore del carbonio organico disciolto in ambiente marino è soggetto ad intensa variabilità legata al contributo degli apporti fluviali il cui DIC è generalmente influenzato dagli input di sostanza organica terrestre fortemente impoverita in ^{13}C .

Per quanto riguarda i valori di composizione isotopica dell'azoto all'interno del comparto biologico marino, è da considerare che l'azoto atmosferico rappresenta la più importante riserva di questo elemento nella biosfera con una composizione isotopica prossima a 0‰ . Per quanto riguarda il gruppo di organismi marini (nella maggior parte cianobatteri) in grado di fissare direttamente azoto atmosferico, il frazionamento isotopico associato è estremamente ridotto (non più di $1-2\text{‰}$) il che comporta che il $\delta^{15}\text{N}$ di tali organismi è sostanzialmente prossimo allo 0‰ (per esempio, Altabet, 1996b).

D'altra parte, il $\delta^{15}\text{N}$ del fitoplancton dipende direttamente dal $\delta^{15}\text{N}$ dei nitrati e/o dell'ammonio da cui le varie specie dipendono. Dove il nitrato disciolto in acqua di mare è abbondante l'assimilazione da parte del fitoplancton procede con un frazionamento associato di circa $4-8\text{‰}$.

Infine c'è da considerare che nel budget relativo ai valori di composizione isotopica dell'azoto in acqua di mare il processo di nitrificazione e denitrificazione procedono con un effetto isotopico associato assai elevato ($10-40\text{‰}$) comportando cospicue variazioni nei valori di composizione isotopica del particolato organico marino. Ai processi di degradazione/mineralizzazione della materia organica durante il "sinking" del particolato organico lungo la colonna d'acqua sono chiaramente associati effetti di frazionamento isotopico (per esempio Altabet, 1996a; Sarmiento e Gruber, 2006) con l'azoto leggero selettivamente rimosso più rapidamente del ^{15}N .

Variazioni nei livelli trofici

Il fenomeno legato al frazionamento isotopico per effetto cinetico al passaggio di livelli trofici lungo la catena trofica marina rappresenta uno strumento ideale, da accoppiare ai convenzionali sistemi di dif-

ferenziazione dei livelli biologici (per esempio lo studio dei contenuti stomacali degli organismi) per definire con esattezza la distribuzione delle catene alimentari in ambienti marini diversi. Viene generalmente considerato un aumento di circa 1‰ per il $\delta^{13}\text{C}$ e di 2,5-3,5‰ per il $\delta^{15}\text{N}$, per ogni passaggio di livello trofico lungo una catena alimentare marina (per esempio Fry e Sherr, 1984; Minagawa e Wada, 1984; Rau *et al.*, 1991; Bodin *et al.*, 2007). In ogni ecosistema i produttori primari rappresentano, in termini di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ i valori di base, seguiti dagli erbivori che frazioneranno isotopicamente in accordo ai valori sopra citati e così via.

Risulta necessario sottolineare che il tessuto degli organismi non riflette la composizione isotopica della loro dieta complessiva, ma il valore isotopico dei nutrienti che compongono la dieta da cui il tessuto è stato sintetizzato. La composizione isotopica delle proteine del corpo negli onnivori, per esempio, spesso riflette la composizione isotopica delle proteine della loro dieta (Gannes *et al.*, 1997). È inoltre da considerare che la composizione biochimica del tessuto influenza direttamente la sua composizione isotopica con, ad esempio, un maggior contenuto in lipidi (generalmente impoveriti in ^{13}C) che spostano i valori di composizione isotopica del $\delta^{13}\text{C}$ dell'organismi verso valori più negativi.

L'azoto escreto contenuto nell'ammoniaca, urea ed acido urico è più leggero di quello del corpo e delle proteine della dieta. Poiché l'azoto di un consumatore è più pesante di quello della sua dieta, l'azoto negli animali più in alto nella catena trofica tende ad essere più pesante (cioè ad avere $\delta^{15}\text{N}$ più positivi). L'arricchimento isotopico dipende dalla velocità di turnover del tessuto e può variare tra i differenti tessuti di un dato organismo. Pertanto tessuti muscolari, che hanno una bassa velocità di turnover, integrano il segnale isotopico della dieta su un periodo più lungo dei quelli con velocità di turnover elevate (gonadi, epatopancreas).

38.6.1 Schema delle operazioni in mare

Per il campionamento di organismi fito- e zooplanctonici vengono utilizzati retini con maglie diverse in relazione alla frazione biologica che si vuole isolare. Una volta recuperato a bordo, il campione viene travasato su un retino di uguale maglia da cui vengono isolate le diverse specie di interesse, lavato con acqua ultrapura e quindi congelato in una fiala di vetro precombusta (a 480 °C per 4 ore) e infine liofilizzato.

38.6.2 Schema delle operazioni in laboratorio

Il primo trattamento necessario per un'accurata analisi isotopica di organismi fito- e zooplanctonici comporta l'eliminazione del possibile contenuto di carbonato di calcio di origine biogenica e/o inorganica, nei campioni da analizzare. In effetti, i campioni di fitoplancton possono contenere resti di carbonato di calcio associato per esempio ai coccolitoforidi e/o a tracce di bicarbonato non opportunamente eliminato dalla fase di lavaggio dei campioni. D'altro canto, nella frazione dello zooplancton possono essere presenti organismi con guscio carbonatico che rendono necessario un pretrattamento utile ad eliminare proprio tale fase (Haines e Montagne, 1979). In entrambi i casi, l'eliminazione di carbonato di calcio e/o ioni carbonato risulta necessaria per un'accurata misura dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ della componente organica degli organismi. In effetti il valore di composizione isotopica del carbonio del carbonato/bicarbonato risulta essere assai più elevato di quello legato alla fase organica, come precedentemente sintetizzato.

Il trattamento consigliato per l'eliminazione della componente carbonatica dai campioni da analizzare prevede generalmente un attacco acido con HCl 1-2 M (Kennedy *et al.*, 2005; Bunn *et al.*, 1995) da eseguire preferenzialmente all'interno delle capsule in argento usate per la determinazione analitica in EA-IRMS.

I campioni di foglie di piante (per esempio, fanerogame) necessitano un lavaggio accurato con acqua ultrapura per eliminare il fango o gli eventuali residui di epifiti con soluzioni di HCl 1M seguite da risciacqui multipli in acqua ultrapura.

Il trattamento per gli invertebrati prevede il lavaggio dai residui di fango con acqua ultrapura e lo spurgo del tratto intestinale tramite lavaggio in acqua distillata degli organismi per almeno 4-8 ore. Per questi organismi è necessaria la separazione fisica del guscio dai tessuti molli.

Tutte le tipologie di campioni sopra citate vanno conservati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al momento dell'analisi essi devono essere essiccati a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ e/o liofilizzati. Il tessuto da analizzare viene quindi omogeneizzato in mortaio o macinato con opportuni mulini per quanto riguarda alghe e/o piante. I campioni vengono quindi pesati (circa $100\text{-}800\text{ }\mu\text{g}$) in capsule prepesate di stagno (o di argento se è richiesto il trattamento di rimozione del carbonati con HCl) e quindi analizzati EA-IRMS secondo le tecniche già descritte. La quantità di materiale utile per le analisi richiede un'opportuna ottimizzazione in funzione del contenuto in carbonio ed azoto presente nei diversi organismi che compongono i campioni di analizzare.

Sebbene non definitivamente dimostrato alcun effetto di frazionamento isotopico sulle molecole contenenti azoto, è comunque consigliato effettuare la determinazione del $\delta^{15}\text{N}$ di materia organica su campioni su cui non sia stato effettuato alcun trattamento acido per la rimozione dei carbonati (Bunn *et al.*, 1995, Kennedy *et al.*, 2005).

Per i dettagli relativi alla determinazione strumentale mediante EA-IRMS di campioni di organismi marini si rimanda al paragrafo relativo al particellato sospeso.

Una considerazione specifica va fatta per la potenziale analisi di campioni conservati in formalina. Vari studi (Mullin *et al.*, 1984; Hobson *et al.*, 1997) hanno dimostrato che tali campioni non sono idonei per la determinazione $\delta^{13}\text{C}$ poiché la formaldeide, molecola impoverita in ^{13}C , viene incorporata nei tessuti degli organismi in essa preservati alterandone sostanzialmente il rapporto isotopico.

Infine, poiché specie diverse di zooplankton sono caratterizzate da una forte variabilità di composizione isotopica del carbonio, sostanzialmente legate a rilevanti variazioni nel contenuto lipidico degli organismi stessi, risulta importante determinare il $\delta^{13}\text{C}$ dei campioni anche dopo estrazione della frazione lipidica oppure applicare modelli opportuni per la correzione dei risultati ottenuti. Tali correzioni sono basate sul contenuto di lipidi e/o sul valore dei rapporti C/N, proporzionali al contenuto lipidico, determinato sugli organismi da indagare (Smyntek *et al.*, 2007, Bodin *et al.*, 2007).

38.7 MISURA DEI VALORI DI COMPOSIZIONE ISOTOPICA $\delta^{18}\text{O}$ E $\delta^{13}\text{C}$ DI CARBONATI BIOGENICI MARINI

Lo studio dei valori di composizione isotopica dell'ossigeno e del carbonio di carbonati biogenici marini, è attualmente considerato strumento di indagine primario per ricerche legate a numerose problematiche di oceanografia dinamica, al ciclo del carbonio, ecc. La precipitazione all'equilibrio tra sistemi carbonatici e acqua di mare permette infatti, tramite lo studio dei rapporti isotopici del carbonio e dell'ossigeno, di risalire, a seguito di una serie di assunzioni relative all'ambiente in studio, ai valori di composizione isotopica dell'acqua marina al tempo della precipitazione del carbonato e alla ricostruzione di alcune variabili termodinamiche (T, S, ecc.) che hanno caratterizzato l'ambiente di precipitazione del carbonato stesso. Nello specifico, l'obiettivo è quello di misurare la composizione isotopica di gusci di organismi planctonici e/o bentonici di cui si conoscono le caratteristiche ecologiche e le cui informazioni isotopiche possano risultare utili per una ricostruzione puntuale di parametri chiave dei diversi livelli della colonna d'acqua all'interno della quale gli organismi hanno precipitato il loro esoscheletero carbonatico. Una serie di complessità teoriche e pratiche, legate ai potenziali effetti di frazionamento isotopico per effetto biologico (comunemente definiti sotto la dizione di "effetto vitale"), così come dovute ad effetti di inomogeneità isotopiche proprie della struttura cristallina del carbonato biogenico, rendono necessario il riferimento a testi specializzati è più adeguati per una comprensione più profonda delle diverse problematiche (per esempio, Hoefs, 2004; Sharp, 2005).

38.7.1 Principio del metodo

Tradizionalmente, le analisi isotopiche dell'ossigeno e del carbonio di carbonati marini sono state effettuate in spettrometria di massa dopo acidificazione (con acido ortofosforico ultrapuro 100%, densità

1,93) a temperatura controllata e successiva estrazione criogenica della CO₂ generata dalla reazione, in linee di vetro, sotto vuoto. Negli ultimi dieci anni è stata sviluppata una nuova tecnologia che permette la preparazione, l'estrazione e la misura degli isotopi di ossigeno e carbonio da carbonati biogenici in sistemi automatizzati sotto flusso continuo di elio utile al trasferimento della CO₂ prodotta dalla reazione (a temperatura controllata) del carbonato con acido ortofosforico, direttamente allo spettrometro di massa dopo opportuna separazione cromatografica della stessa CO₂ da acqua e gas interferenti prodotti dalla reazione acida. Data la diffusione di questa strumentazione, la descrizione del metodo relativo all'analisi isotopica dell'ossigeno e del carbonio dei carbonati biogenici sarà proposta in relazione proprio al sistema di analisi in "continuous flow" riportato nei dettagli nel lavoro di Spötl e Vennemann (2003). Si fa riferimento al testo di Sharp (2005) per metodi di preparazione alternativi.

Il nuovo sistema di acquisizione in "continuous flow" (caratterizzato da un flusso continuo di un gas inerte, nello specifico elio, che trasporta il campione in sorgente) utilizzato da sistemi gas-cromatografici (esempio GasBenchII per quanto riguarda ThermoFisher) interfacciato con spettrometri di massa per isotopi stabili, consiste nella combinazione di un classico sistema d'introduzione di un campione gassoso utilizzato in cromatografia gassosa e da un meccanismo di eliminazione delle molecole d'acqua (membrana Nafion), prodotte a seguito della reazione tra acido ortofosforico e carbonato di calcio. Il Nafion è una membrana capillare costituita da un co-polimero di due unità secondarie monomeriche: tetrafluoroetilene (Teflon®) ed acido solfonico di perfluoro-3,6-dioxa-4-methyl-7-octene, fissate a intervalli normali sulla lunghezza di una catena di Teflon.

L'altro monomero si conclude in un gruppo dell'acido solfonico. Se questo acido solfonico potesse essere liberato e potesse andare in soluzione, produrrebbe un acido forte. Il Nafion è estremamente resistente all'attacco chimico (resistente alla corrosione) e l'acido solfonico non può essere rotto dal resto del polimero del Nafion, anche da reazioni chimiche molto forti.

Quando il gas umido viene a contatto con il Nafion, che contiene pori molto piccoli, il vapore acqueo penetra molto più velocemente nei pori rispetto al gas di trasporto e alle molecole di CO₂. Di conseguenza la maggior parte del vapore acqueo entra nei pori assieme ad una percentuale molto più piccola (ma non trascurabile) del gas di trasporto. Nel GasBenchII, il Nafion è costituito da un tubo del polimero collegato all'estremità ai capillari di trasporto del campione. All'esterno del tubo di Nafion (all'interfaccia dello stesso ed internamente ad un tubo di vetro che lo contiene) scorre in contro corrente un flusso di He che aiuta l'eliminazione dell'acqua presente del campione ed espulsa dal processo sopra descritto.

38.7.2 Schema delle operazioni in laboratorio

La fase di analisi del campione per l'analisi isotopica, può essere schematicamente suddivisa in tre fasi principali: i) flushing, ii) acidificazione, e iii) campionamento.

38.7.2.1 Flushing

Una prima fase di lavoro, consiste nella creazione, all'interno dei vials in cui avverrà la reazione tra il campione da analizzare (precedentemente ivi posto) e l'acido ortofosforico (in un secondo momento inserito dalla pompa automatica di acidificazione all'interno della provetta stessa) un'atmosfera di He (He 4,8 per gas-cromatografia), eliminando così qualsiasi traccia di gas atmosferico all'interno del vial stesso. L'operazione è effettuata con un ago a doppia via che fa fluire all'esterno del vial l'aria in esso presente sotto pressione di elio (il gas "carrier" di tutto il sistema).

38.7.2.2 Acidificazione

La seconda fase di lavoro consiste nell'acidificazione del campione (precedentemente "arrostito" alla temperatura di circa 400 °C sotto vuoto per l'eliminazione di eventuali tracce di materia organica), attraverso una pompa automatica che controlla l'inserimento di un numero di gocce di acido (a sua

volta controllato da software) sufficienti all'acidificazione del carbonato presente all'interno del vial. Un numero di 6/7 gocce è sufficiente per l'acidificazione anche di quantità di campione superiore a 0,200 mg.

Il portacampione e, quindi ogni singolo campione, è mantenuto ad una temperatura costante, opportunamente impostata dall'operatore (generalmente 50 °C). La possibilità di analizzare contemporaneamente standard di riferimento e campioni permette di lavorare a temperature di equilibrio diverse senza necessariamente dover passare dal calcolo dei relativi fattori di frazionamento (come era necessario con le linee di estrazione esterne).

38.7.2.3 Campionamento

La terza fase di lavoro è relativa ai processi di selezione della CO₂ prodotta dall'attacco dell'acido ortofosforico sul carbonato rispetto ad altri gas eventualmente presenti all'interno dei vials di lavoro e del suo inserimento nello spettrometro di massa. Questa operazione a multi step è realizzata in quattro momenti principali.

1) La CO₂ del campione, prodotta dall'attacco acido del carbonato presente nel vial insieme all'He di trasporto, all'acqua prodotta dalla reazione e ad altri eventuali gas in condensabili prodotti dalla fase stessa di acidificazione, viene spinta dall'elio attraverso un ago di campionamento a doppia via, all'interno del capillare che trasporta il campione all'interno del GasBenchII.

2) La miscela di gas attraversa la prima trappola di Nafion dove buona parte delle molecole d'acqua vengono espulse dalla miscela e giunge all'interno di una valvola a 8 porte (Valco);

3) La miscela di gas viene quindi "caricata" all'interno di una colonna cromatografia semi-impaccata Poraplot Q da 7 m, mantenuta a temperatura costante di 71°C. La miscela He-CO₂ fluisce quindi all'interno di una seconda trappola d'acqua e viene trasferita alla sorgente dello spettrometro di massa per la misura isotopica di ossigeno e carbonio. L'inserimento di standard di riferimento di laboratorio (per esempio Marmo di Carrara) ed internazionali (per esempio NIST19) a composizione isotopica nota tra i campioni da analizzare risulta necessario per verificare la stabilità analitica dello spettrometro di massa, per controllare i potenziali "drift" elettronici dello strumento e, infine, le potenziali relazioni tra variazioni di concentrazione della CO₂ generata dall'attacco acido del campione con variazioni di composizione isotopica dello stesso gas.

I risultati vengono riportati in notazione δ contro lo standard internazionale V-PDB.

L'accuratezza della misura stimata sulla base di un set di misure effettuate su standard di matrice certificata è del 95% e la riproducibilità delle misure è rispettivamente di 0,08‰ (2 σ) e 0,1‰ (2 σ) per $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{18}\text{O}$.

38.8 BIBLIOGRAFIA

- ALTABET M.A. (1996a) - Isotopic fractionation during biochemical reactions. In: Ittekkot S. Honjo D. (eds), *Scope: Particle Flux in the Ocean*, Wiley, Chichester: 156-183.
- ALTABET M.A. (1996b) - Nitrogen and carbon isotopic tracers of the source and transformation of particles in the deep-sea. In: Ittekkot, V., Schafer, P., Honjo, S., Depetris, P.J. (eds), *Particle Flux in the Ocean*. Wiley, London: 155-184.
- ALTABET M.A., EUSER W.G. (1985) - Seasonal variations in natural abundance of ¹⁵N in particles sinking to the deep Sargasso Sea. *Nature*, **315**: 218-219.
- ALTABET M.A., FRANCOIS R. (1994) - Sedimentary nitrogen isotopic ratio as a recorder for surface ocean nitrate utilization. *Global Biogeochem. Cycles*, **8(1)**: 103-116.
- ALTABET M.A., MCCARTHY J.J. (1985) - Temporal and spatial variations in the natural abundance of ¹⁵N in PON from a warm-core ring. *Deep-Sea Res.*, **32**: 755-772.
- ALTABET M.A., MCCARTHY J.J. (1986) - Vertical patterns in ¹⁵N natural abundance in PON from the surface waters of warm-core rings. *J. Mar. Res.*, **44**: 185-201.
- ALTABET M.A., PILSKALN C., THUNELL R., PRIDE C., SIGMAN D., CHAVEZ F., FRANCOIS R. (1999) -

-
- The nitrogen isotope biogeochemistry of sinking particles from the margin of the Eastern North Pacific. *Deep-Sea Res.*, **46**: 55-679.
- ARAVENA R., SCHIFF S.L., TRUMBORE S.E., DILLON P.J., ELGOOD R. (1992) - Evaluating dissolved inorganic carbon cycling in a forested lake weathered using carbon isotopes. *Radiocarbon*, **34**: 36-645.
- BLAIR N.E., PLAIS G.R., BOHEME S.E., DEMASTER D.J., LEVIN L.A. (1994) - The remineralization of organic carbon on the North Carolina continental slope. *Deep-Sea Res.*, **41**:755-766.
- BODIN N., LE LOC'H F., HILY C. (2007) - Effect of lipid removal on carbon and nitrogen stable isotope ratios in crustacean tissues. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **341**:168-175.
- BOWEN R. (1988) - *Isotopes in the Earth Sciences*, Barking (Essex): Elsevier Applied Science Publishers.
- BRANDES J.A., DEVOL A.H. (1997) - Isotopic fractionation of oxygen and nitrogen in coastal marine sediments, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **61**: 793– 1801.
- BUNN S.E., LONERGAN N.R., KEMPSTER M.A. (1995) - Effects of acid washing on stable isotope ratios of C and N in penaeid shrimp and seagrass: Implications for food web studies using multiple stable isotopes. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 622-625.
- CARPENTER E., HARVEY H., FRY B., CAPONE D. (1997) - Biogeochemical tracers of the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Deep-Sea Res.*, **44**:27–38.
- CASCIOTTI K.L., SIGMAN D.M., WARD B.B. (2003) - Linking diversity and stable isotope fractionation in ammonia-oxidizing bacteria. *Geomicrobiol. J.*, **20**: (4): 335-353.
- CLARK I.D., FRITZ P. (1997) - *Environmental Isotopes in Hydrogeology*. Lewis Pub. New York. ISBN 1-56670-249-6.
- CLINE J.D., KAPLAN I.R. (1975) - Isotopic fractionation of dissolved nitrate during denitrification in the eastern tropical North Pacific Ocean. *Mar. Chem.*, **3**: 271– 299.
- COPLEN T.B., BRAND W.A., GEHRE M., GRÖNING M., MEIJER H.A.J., TOMAN B., VERKOUTEREN R.M. (2006) - New Guidelines for ¹³C Measurements. *Anal. Chem.*, **78** : 2439-2441.
- CRAIG H., GORDON L.I. (1965) - Deuterium and oxygen 18 variations in the ocean and the marine atmosphere.,In: Tongiorgi E. (ed), *Stable Isotopes in Oceanographic Studies and Paleotemperatures* , Spoleto, Italy: 9-130.
- CRISS R.E., TAYLOR H.P. (1986) - Meteoric-hydrothermal systems. In: Valley J.W., Taylor H.P., O'Neil J.R. (eds), *Stable Isotopes in High Temperature Geological Processes*, Reviews in Mineralogy 16, Mineral. Soc. Am., Washington: 373-424.
- DANSGAARD, W. (1964) - Stable isotopes in precipitation. *Tellus*, **16**: 436-463.
- DE LANGE G. J. (1992) - Distribution of exchangeable, fixed, organic and total nitrogen in interbedded turbiditic/pelagic sediments of the Madeira Abyssal Plain, eastern north Atlantic. *Mar. Geol.*, **109**: 95-114.
- DELWICHE, C.C., ZINKE P.J., JOHNSON C.M., VIRGINIA R.A. (1979) - Nitrogen isotope distribution as a presumptive indicator of nitrogen fixation. *Bot. Gaz.*, **140**: 65–69.
- FAURE G. (1986) - *Principles of Isotope Geology*, 2nd ed., Wiley e Sons: 220 pp.
- FERRONSKY V.I., POLYAKOV V. A. (1982) - *Environmental Isotopes in the Hydrosphere*, Chichester: John Wiley and Sons.
- FONTUGNE M., DUPLESSY J.C. (1981) – Organic carbon isotopic fractionation by marine plankton in the temperature range –1 to 31°C. *Oceanol. Acta* **4**: 85-90.
- FRY B., BRAND W., MERSCH F.J., THOLKE K., GARRIT R. (1992) - Automated analysis system for coupled $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements. *Anal. Chem.*, **64**: 288-291.
- FRY B., SHERR E.B. (1984) - $\delta^{13}\text{C}$ measurements as indicators of carbon flow in marine and freshwater ecosystems. *Contr. Mar. Sci.*, **27**: 13-47.
- GANNES L.Z., O'BRIEN D., DEL RIO C.M. (1997) - Stable isotopes in animal ecology: assumptions, caveats, and a call for more laboratory experiments. *Ecology*, **78**: 1271-1276.
- GIORDANI P., ANGIOLINI L. (1983) - Chemical parameters characterizing the sedimentary environment in a NW Adriatic coastal area (Italy). *Estuar. Coastal Shelf Sci.*, **17**: 159–167.
- GRANGER J., SIGMAN D.M., PROKOPENKO M., LEHMANN M.F., TORTELL P.D. (2006) - A method for nitrite removal in nitrate N and O isotope analysis. *Limnology and Oceanography: Methods*, **4**: 205-212.
- HAINES E.B., MONTAGNE C.L. (1979) - Food sources of estuarine Invertebrates analyzed using ¹³C/¹²C ratios. *Ecology*, **60**: 48-56.
- HARRIS D., HORWATH W.R., VAN KESSEL C. (2001) - Acid fumigation of soils to remove carbonates prior to total organic carbon or carbobn-13 isotopic analysis. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **65**, 1853-1856.
- HOBSON K.A., GIBBS H.L., GLOUTNEY M.L. (1997) - Preservation of blood and tissue samples for stable-

-
- carbon and stable-nitrogen isotope analysis. *Can. J. Zoolog.*, **75**: 1720-1723.
- HOEFS J. (2004) - *Stable Isotope Geochemistry*. Springer-Verlag Berlin: 250 pp.
- HOERING T., FORD H.T. (1960) - The isotope effect in the fixation of nitrogen by *Azotobacter*. *J. Am. Chem. Soc.*, **82**: 376–378.
- HOLMES E., LAVIK G., FISCHER G., SEGL M., RUHLAND G., WEFER G. (2002) - Seasonal variability of $\delta^{15}\text{N}$ in sinking particles in the Benguela upwelling region. *Deep-Sea Res.*, **49**: 377-394.
- HOLMES M.E., SCHNEIDER R.R., MULLER P.J., SEGL M., WEFER G. (1997) - Reconstruction of past nutrient utilization in the eastern Angola basin based on sedimentary $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios. *Paleoceanography*, **12**: 604-614.
- KARL D., MICHAELS A., BERGMAN B., CAPONE D., CARPENTER E., LETELIER R., LIPSCHULTZ F., PAERL H., SIGMAN D., STAL L. (2002) - Dinitrogen fixation in the world's oceans. *Biogeochemistry*, **57/58**: 47-98.
- KARL D.M., TILBROOK B.D., TIEN G. (1991) – Seasonal coupling of organic matter production and particle flux in the western Bransfield Strait, Antarctica. *Deep-Sea Res.*, **38**: 1097-1126.
- KENDALL C. (1998) - Tracing nitrogen sources and cycles in catchments. In: Kendall C. McDonnell J.J. (eds.), *Isotope Tracers in Catchment Hydrology*. Elsevier, Amsterdam: 519-576.
- KENNEDY P., KENNEDY H., PAPADIMITRIOU S. (2005) - The effect of acidification on the determination of organic carbon, total nitrogen and their stable isotopic composition in algae and marine sediment. *Rapid Commun. Mass Sp.*, **19**: 1063-1068.
- KING P., KENNEDY H., NEWTON P.P., JICKELLS T.D., BRAND T., CALVERT S., CAUWET G., ETCHEBER H., HEAD B., KHRIPOUNOFF A., MANIGHETTI B., MIQUEL J.C. (1998) - Analysis of total organic carbon and total nitrogen in settling oceanic particles and a marine sediment: an interlaboratory comparison. *Mar. Chem.*, **60**: 203-216.
- KROOPNICK, P. (1974) - The dissolved $\text{O}_2\text{-CO}_2\text{-}^{13}\text{C}$ system in the eastern equatorial Pacific. *Deep-Sea Res.*, **21**: 211-227.
- LAWS E.A., POPP B.N. BIDIGARE R.R., KENNICUTT M.C., MACKO S.A. (1995) – Dependence of phytoplankton carbon isotopic composition on growth rate and $[\text{CO}_2]_{\text{aq}}$: Theoretical considerations and experimental results. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **59**: 1131-1138.
- LIU K.K., KAPLAN I. R. (1989) - The eastern tropical Pacific as a source of ^{15}N -enriched nitrate in seawater off southern California. *Limnol. Oceanogr.*, **34**: 820–830.
- LOHSE L., KLOOSTERHUIS R.T., DE STIGTER H.C., HELDER W., VAN RAAPHORST W., VAN WEERING T.C.E. (2000) - Carbonate removal by acidification causes loss of nitrogenous compounds in continental margin sediments. *Mar. Chem.*, **69**: 193-201.
- LORRAIN A., SAVOYE N., CHAUVAUD L., PAULET Y.M., NAULET N. (2003) - Decarbonation and preservation method for the analysis of organic C and N contents and stable isotope ratios of low-carbonated suspended particulate material. *Anal. Chim. Acta*, **491**: 125-133.
- LOUREY M.J., TRULL T. W., SIGMAN D.M. (2003) - Sensitivity of $\delta^{15}\text{N}$ of nitrate, surface suspended and deep sinking particulate nitrogen to seasonal nitrate depletion in the Southern Ocean, *Global Biogeochem. Cycles*, **17(3)**: 1081, doi:10.1029/2002GB001973
- MAHAFFEY C., WILLIAMS R.G., WOLFF G.A., MAHOWALD N., ANDERSON W., WOODWARD M. (2003) - Biogeochemical signatures of nitrogen fixation in the eastern North Atlantic. *Geophys. Res. Letters*, **30** (6): 1300, doi: 10.1029/2002GL016542.
- MCCORCKLE D.C., EMERSON S.R., QUAY P.D. (1985) - Stable carbon isotopes in marine porewaters. *Earth Planet. Sci. Lett.*, **74**: 13-26.
- MINAGAWA M., WADA E. (1984) - Stepwise enrichment of ^{15}N along food chains: Further evidence and the relation between $\delta^{15}\text{N}$ and animal age. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **48**:1135-1140.
- MINO Y., SAINO T., SUZUKI K., MARANON E. (2002) - Isotopic composition of suspended particulate nitrogen ($\delta^{15}\text{N}_{\text{org}}$) in surface waters of the Atlantic Ocean from 50°N to 50°S. *Global Biogeochem. Cy.*, **16(4)**: 1059,..
- MIYAJIMA, T., YAMADA, Y., HANBA, Y.T. (1995) - Determining stable isotope ratio of total dissolved inorganic carbon in lake water by GC/C/IRMS. *Limnol. Oceanogr.*, **40**: 994-1000.
- MIYAKE, Y., WADA E. (1971) - The isotope effect on the nitrogen in biochemical, oxidation-reduction reactions. *Records of Oceanographic Works in Japan* **11**: 1-6.
- MOOK, W.G. (1994) – *Principles of Isotope Hydrology*. Free University of Amsterdam: 153 pp.
- MÜLLER P. J. (1977) - C/N ratios in Pacific deep-sea sediments: effect of inorganic ammonium and organic nitrogen compounds sorbed by clays. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **41**: 765-776.
-

-
- MULLIN M.M., RAU G.H., EPPLEY R.W. (1984) – Stable nitrogen isotopes in zooplankton: some geographic and temporal variations in the North Pacific. *Limnol. Oceanogr.* **29**: 1267-1273.
- NIEUWENHUIZE J., MAAS Y.E.M., MIDDELBURG J.J. (1994) - Rapid analysis of organic carbon and nitrogen in particulate materials. *Mar. Chem.*, **45**: 217-224.
- OWENS N.J. P., REES A. P. (1989) - Determination of Nitrogen-15 at sub-microgram levels of nitrogen using automated continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. *Analyst.*, **114**: 1655-1657.
- PAERL H.W., FOGEL M.L. (1994) - Isotopic characterization of atmospheric nitrogen inputs as sources of enhanced primary production in coastal Atlantic Ocean waters. *Mar. Biol.*, **119**: 635-645.
- PANTOJA S., REPETA D.J., SACHS J.P., SIGMAN D.M. (2002) - Stable isotope constraints on the nitrogen cycle of the Mediterranean Sea water column, *Deep-Sea Res.*, **4**: 1609– 1621.
- PARK R., EPSTEIN S. (1960) - Carbon isotope fractionation during photosynthesis. *Geochim. Cosmochim. Acta*, **21**: 110-126.
- RAU G.H., T. L. HOPKINS, J.J. TORRES J. (1991) ¹⁵N/¹⁴N and ¹³C/¹²C in Weddell Sea invertebrates: implications for feeding diversity. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **77**: 1-6.
- RAU G.H., RIEBESELL U., WOLF-GLADROW D. (1997) – CO₂(aq)-dependent photosynthetic ¹³C fractionation in the ocean: a model versus measurements. *Global Biogeochem. Cy.*, **11 (2)**: 267-278.
- RAU G.H., TAKAHASHI, T., DESMARAIS, D., J., RAPETA, D.J., MARTIN, J.H. (1992) - The relationship between δ¹³C of organic matter and (CO₂[aq]) in ocean surface water: data from a JGOFS site in the northeastern Atlantic Ocean and a model. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **56**: 1413-1419.
- RYBA S.A., BURGESS R.M. (2002) - Effects of sample preparation on the measurement of organic carbon, hydrogen, nitrogen, sulfur, and oxygen concentrations in marine sediments. *Chemosphere*, **48**: 139-147.
- SALATA G.G., ROELKE L., CIFUENTES L.A. (2000) - A rapid and precise method for measuring stable carbon isotope ratios of dissolved inorganic carbon. *Mar. Chem.*, **69**: 153-161.
- SARMIENTO J.L., GRUBER N. (2006) - *Ocean Biogeochemical Dynamics*. Princeton University Press, Princeton, NJ: 526 pp.
- SCHUBERT C.J., CALVERT S.E. (2001) - Nitrogen and carbon isotopic composition of marine and terrestrial organic matter in Arctic Ocean Sediments. Implications for nutrient utilization and organic matter composition. *Deep-Sea Res.*, **48**: 789-810.
- SCHUBERT C.J., NIELSEN B. (2000) - Effects of decarbonation treatments on δ¹³C values in marine sediments. *Mar. Chem*, **72**: 55-59.
- SCHUBERT C.J., STEIN R., CALVERT S.E. (2001) - Tracking nutrient and productivity variations over the last deglaciation in the Arctic Ocean. *Paleoceanography*, **16**: 199-211.
- SCHUBERT, C.J., CALVERT, S.E. (2001) - Nitrogen and carbon isotopic composition of marine and terrestrial organic matter in Arctic Ocean Sdiments. Implications for nutrient utilization and organic matter composition. *Deep-Sea Res.*, **48**: 789-810.
- SHARP Z. (2005) - *Principles of Stable Isotope Geochemistry* Upper Saddle River, New Jersey: 256 pp.
- SIGMAN D.M., ALTABET M.A., MCCORKLE D.C., FRANCOIS R., FISCHER G. (2000) - The d15N of nitrate in the Southern Ocean: Nitrogen cycling and circulation in the ocean interior. *J. Geophys. Res.*, **105**: 19599.
- SIGMAN D.M., ALTABET M.A., MICHENER R., MCCORKLE D.C., FRY B., HOLMES R.M. (1997) - Natural abundance-level measurement of the nitrogen isotopic composition of oceanic nitrate: an adaptation of the ammonia dilution method. *Mar. Chem.*, **57**: 227-242.
- SIGMAN D.M., CASCIOTTI K.L., ANDREANI M., BARFORD C., GALANTER M., BOHLKE J.K. (2001) - A bacterial method for the nitrogen isotopic analysis of nitrate in seawater and freshwater. *Anal. Chem.*, **73**: 4145– 4153.
- SIGMAN D.M., GRANGER J., DIFIORE P., LEHMANN M. F., GEEN A. V., HO R., CANE G. (2005) - Coupled nitrogen and oxygen isotope measurements of nitrate along the eastern North Pacific margin. *Global Biogeochem. Cy.*, **19**, GB4022, doi:10.1029/2005GB002458.
- SILVA J.A., REMNER J.M. (1966) - Determination and isotope ratio analysis of different forms of nitrogen in soils. 5. Fixed ammonium. *Soil Sci. Soc. Am. Pro.*, **30**: 587-594.
- SLAWYK G., RAIMBAULT P. (1995) - Simple procedure for simultaneous recovery of dissolved inorganic and organic nitrogen in 15N-tracer experiments and improving the isotopic mass balance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **124**: 289-299.
- SMYNTEK P.M., TEECE M.A., SCHULZ K.L., THACKERAY S.J. (2007) - A standard protocol for stable isotope analyssi of zooplankton in aquatic food web research using mass balance correction models. *Limnol. Oceanogr.*

52: 2135-2146.

- SPÖTL C., VENNEMANN T.W. (2003) - Continuous-flow isotope ratio mass spectrometric analysis of carbonate minerals, *Rapid Commun. Mass Sp.*, **17**: 1004-1006.
- SWINNERTON J.M., IMNENBORN V.J. (1967) - Determination of the C1 into C4 hydrocarbons in seawater by gas chromatography. *Gas Chromatogr.*, **5**: 570-573.
- TAN F.C., PEARSON G.J., WALKER R.W. (1973) - *Sampling extraction and ¹³C/¹²C analysis of total dissolved CO₂ in marine environments*. Report Series BI-R-73-16. Bedford Institute of Oceanography, Nova Scotia.
- UREY H. (1947) - The thermodynamic properties of isotopic substances, *J. Chem. Soc.*, 562-581.
- VILLINSKI, J.C., DUNBAR, R.B., D.A. MUCCIARONE (2000) - ¹³C/¹²C ratios of sedimentary organic matter from the Ross Sea, Antarctica: a record of sea ice and open water phytoplankton bloom dynamics, *J. Geophys. Res.*, **105**: 14,163-14,172.
- VOSS M., ALTABET M.A., BODUNGEN B.V. (1996) - δ¹⁵N of sedimenting particles as indicator of euphotic zone processes. *Deep-Sea Res. I*, **43**: 33-47.
- VOSS M., DIPPNER J.W., MONTOYA J.P. (2001) - Nitrogen isotope patterns in the oxygen-deficient waters of the Eastern Tropical North Pacific Ocean. *Deep-Sea Res. I*, **48**: 1905-1921.
- WADA E., ATTORI A. (1976) - Natural abundance of ¹⁵N in particulate organic matter in the North Pacific Ocean. *Geochimica Cosmochim. Ac.*, **40**: 249-251.
- WASER N.A.D., HARRISON P.J., NIELSON B., CALVERT S.E., TURPIN D.H. (1998) - Nitrogen isotope fractionation during the uptake and assimilation of nitrate, nitrite, ammonium, and urea by a marine diatom. *Limnol. Oceanogr.*, **43**: 215-224.
- WERNER R.W., BRAND W.A. (2001) - Referencing strategies and techniques in stable isotope ratio analysis. *Rapid Commun. Mass Sp.*, **15**: 501-519.
- WONG W., SACKETT, W.M. (1978) - Fractionation of stable carbon isotopes by Antarctic phytoplankton. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **42**: 1809-1815.
- YANG C., TELMER K., VEIZER J. (1996) - Chemical dynamics of the "St. Lawrence" riverine system: δ D_{H₂O}, δ ¹⁸O_{H₂O}, δ ¹³C_{DIC}, δ ³⁴S_{sulfur}, e dissolved ⁸⁷Sr/⁸⁶Sr. *Geochim. Cosmochim. Ac.*, **60**: 851-866.

CAPITOLO 39. BIOTOSSINE MARINE

P. Ciminiello, E. Fattorusso, R. Poletti

fattoru@unina.it

39.1 INTRODUZIONE

Il fitoplancton è costituito da organismi vegetali, unicellulari o coloniali, microscopici (microalghe) che vivono in sospensione nelle acque. Questi organismi svolgono negli ecosistemi acquatici il ruolo di primo anello della catena alimentare acquatica. Nella maggior parte dei casi la proliferazione di alghe planctoniche (il cosiddetto “*algal bloom*”) costituisce pertanto un reale beneficio per l’acquacoltura. Fra le circa 5000 specie di microalghe identificate esistono, tuttavia, alcune specie, principalmente rappresentate da dinoflagellati e diatomee, che producono sostanze tossiche di cui fanno parte le tossine non proteiche più potenti finora conosciute. Presenza di alghe tossiche nell’ambiente marino, in seguito a particolari e favorevoli condizioni ambientali, può causare avvelenamento di prodotti ittici, soprattutto di molluschi eduli bivalvi, organismi filtratori che si nutrono di plancton.

Le biotossine marine sono tra le principali cause di intossicazioni alimentari che si manifestano occasionalmente in consumatori di prodotti ittici. L’ingestione di molluschi eduli tossici può provocare nell’uomo l’insorgenza di sindromatologie molto gravi, talvolta anche con esiti letali. Le principali sindromi da intossicazione umana associate al consumo di molluschi sono state descritte, in base alla tipologia dei sintomi, come paralitiche, diarroiche, neurotossiche ed amnesiche, rispettivamente abbreviate in PSP (Paralytic Shellfish Poisoning) DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning) NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning) ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) (Botana, 2008). Recentemente un gruppo di esperti chiamati dalla FAO/IOC/WHO ha formulato l’indicazione che le tossine siano classificate in riferimento alle loro caratteristiche chimiche: Azaspiracidi (AZAs); Acido Okadaico e Dinophysitossine (DTXs); Pectenotossine (PTXs); Yessotossine (YTXs); Brevetossine (NSP- PbTXs); Imine cicliche; Acido Domoico (DAs); Saxitossine (STXs) (FAO/IOC/WHO, 2005).

Accanto alle tossine che vengono trasmesse all’uomo attraverso la catena alimentare, esistono alcune particolari fioriture algali che possono provocare effetti tossici diretti sull’uomo; sono stati riportati, ad esempio, disturbi respiratori dovuti ad inalazione di aerosol contenente frammenti di cellule di alghe marine, principalmente di tipo bentonico, e/o delle tossine da loro prodotte. In concomitanza di alcune fioriture algali tossiche, si possono verificare anche fenomeni di sofferenza ambientale, che riguardano principalmente l’epibenthos sia sessile (cirripedi, bivalvi, gasteropodi) che mobile (echinodermi, cefalopodi, piccoli pesci).

Negli ultimi decenni, la presenza di alghe tossiche è drammaticamente aumentata sia in frequenza, che in intensità e distribuzione geografica in tutto il mondo. Anche se le cause di questa evidente espansione non sono ancora tutte note, esse possono essere attribuite a due fattori principali: da un lato all’eutrofizzazione delle aree marine costiere e dall’altro alla progressiva diffusione di fitoplancton tossico in nuove aree geografiche. Diverse linee di intervento hanno portato a un miglioramento della situazione in molte zone, tuttavia la lista delle specie tossiche è in continuo aumento ed il fenomeno è, pertanto, in continua evoluzione.

Le tossine che hanno interessato principalmente il Mar Mediterraneo negli ultimi due decenni sono l’acido okadaico ed alcuni suoi derivati, le yessotossine e le saxitossine; presenza di acido domoico è stata rilevata sporadicamente, ma ad una concentrazione inferiore rispetto ai limiti di tollerabilità previsti dalla legge (Ciminiello *et al.*, 2009).

Più recentemente, nel Mediterraneo si è assistito alla proliferazione di un’alga unicellulare bentonica tossica, *Ostreopsis ovata*, produttrice di palitossine, che solitamente vive sulla superficie delle macroalghe

rosse e brune presenti sul fondo del mare (Ciminiello *et al.*, 2009). Le fioriture di tale alga sono state talvolta associate a morie di organismi bentonici e a disturbi respiratori in bagnanti o persone che stazionavano nei pressi dell'area interessata. Non è noto se le tossine prodotte da *O. ovata* o da altri organismi ad essa in qualche modo associati si accumulino lungo la rete trofica e se questo eventuale accumulo possa rappresentare un rischio sanitario significativo.

Qui di seguito vengono riportate le metodiche di estrazione e rivelazione delle principali tossine ritrovate nel mar Mediterraneo, suddividendole, in base alla loro solubilità, in:

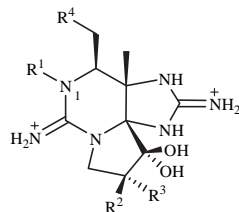
- tossine idrosolubili
- tossine liposolubili

Per quanto riguarda il numero di cellule algali da sottoporre ad estrazione, non è possibile indicare esattamente la quantità da trattare perché la produzione delle tossine può variare in relazione a vari fattori. Si raccomanda, tuttavia, di utilizzare, laddove possibile, una concentrazione algale di almeno qualche centinaio di migliaia di cellule per litro.

39.2 TOSSINE IDROSOLUBILI

39.2.1 Saxitossine (METODO LAWRENCE, Lawrence *et al.*, 2005) – Metodo ufficiale AOAC)

Il metodo è stato validato dall'AOAC (Association of Official Analytical Chemists) ed è applicabile per la determinazione di saxitossina (STX), neosaxitossina (NEO), gonyautossine 2 e 3 (GTX 2,3; insieme), gonyautossine 1 e 4 (GTX 1,4; insieme), decarbamoilSTX (dcSTX), B-1, C-1 e C-2 insieme, e C-3 e C-4 (insieme).

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Carbammato tossine -O-C(=O)-NH ₂	N-Sulfocarbamoil tossine -O-C(=O)-NH-SO ₃ ⁻	Decarbamoil tossine -OH	Deoxydecarbamoil tossine -H
		H	H	H		STX	GTX5, B1	dcSTX
	OH	H	H		NEO	GTX6, B2	dcNEO	
	H	H	OSO ₃ ⁻		GTX2	C1	dcGTX2	doGTX2
	H	OSO ₃ ⁻	H		GTX3	C2	dcGTX3	doGTX3
	OH	H	OSO ₃ ⁻		GTX1	C3	dcGTX1	
	OH	OSO ₃ ⁻	H		GTX4	C4	dcGTX4	
	H	H	OH		11αOH-STX		11αOH-dcSTX	
	H	OH	H		11βOH-STX		11βOH-dcSTX	
	OH	H	OH		11αOH-NEO		11αOH-dcNEO	
	OH	OH	H		11βOH-NEO		11βOH-dcNEO	

STX = saxitossina
NEO = neosaxitossina
GTX = gonyautossina

Strutture delle saxitossine

Estrazione dal fitoplancton (Alexandrium spp.)

- Sospendere le cellule algali in acido acetico 0,1M e conservarle in congelatore a -20 °C per facilitare la successiva rottura della parete cellulare.
- Sonicare il campione per 30', con l'unico accorgimento di mantenere la temperatura più fredda possibile, perché alte temperature riducono la cavitazione. A tal fine occorre immergere il contenitore del campione di fitoplancton in una miscela di ghiaccio-sale-acqua ed alcool.
- Completata la rottura delle cellule algali (di cui ci si deve assicurare mediante osservazione al microscopio), centrifugare il campione.
- Effettuare l'ultrafiltrazione del sovrantante con ULTRAFREE 10.000 NMWL in centrifuga per 30' - 60'.

Cleanup su SPE-COOH

Il *cleanup* su SPE-COOH a scambio ionico viene utilizzato soltanto per gli estratti che dimostrano contenere tossine PSP N-1-idrossilate e solo su un'aliquota dell'estratto totale.

Condizionare una cartuccia SPE-COOH da 3 ml facendovi passare 10 ml di una soluzione 0,01 M di acetato di ammonio. Tenere il flusso tra 2 e 3 ml/min per tutte le eluizioni. Non lasciare che la cartuccia vada a secco. Scartare l'eluato e passare un'aliquota di 2 ml dell'estratto del campione attraverso la cartuccia e raccogliere l'eluato in una provetta a fondo conico, graduata a 15 ml, che sarà identificata come Frazione No. 1. Passare poi 4,0 ml di acqua attraverso la cartuccia e raccogliere nella stessa provetta. Portare il volume finale a 6,0 ml totali. Questa frazione contiene le tossine di tipo C. Passare 4,0 ml di una soluzione di NaCl 0,05 M attraverso la stessa cartuccia, e raccogliere in una seconda provetta conica graduata a 5 ml, identificata come Frazione No. 2. Assicurarsi che il volume finale sia pari a 4,0 ml. Questa frazione contiene le tossine GTX1,4, GTX2,3, B-1, B-2, e dcGTX2,3. Poi, passare 5,0 ml di una soluzione di NaCl 0,3 M attraverso la cartuccia e raccogliere in una terza provetta conica graduata a 5 ml, identificata come Frazione No. 3. Assicurarsi che il volume finale sia di 5,0 ml. Questa frazione contiene la STX, la NEO, e la dcSTX. Procedere con l'ossidazione e le analisi HPLC.

Se si riscontrano problemi di sensibilità del rivelatore, concentrare ciascuna frazione raccolta dalla colonna a scambio ionico in palloncini da 50 ml a fondo arrotondato invece che in provette a fondo conico ed evaporare a circa 1 ml con evaporatore rotante in bagno di acqua a 45 °C. Trasferire la soluzione in una provetta graduata a 5 ml a fondo conico, utilizzando una pipetta Pasteur. Risciacquare il palloncino da 50 ml per 3 volte con circa 0,2-0,3 ml di acqua per volta, e trasferire il risciacquo nella provetta graduata in modo che il volume finale di estratto sia pari a 2,0 ml.

Analizzare le Frazioni No. 1-3 in LC dopo le ossidazioni con periodato e con perossido, come di seguito descritto.

Ossidazione con acido periodico

A 20 µl dell'estratto del campione, a cui sono stati aggiunti 3 µl di NH₄OH 0,5 N, aggiungere 25 µl di reagente ossidante, preparato giornalmente, miscelando :

- 1 ml di acido periodico 0,15 M
- 1 ml di ammonio formato 0,3 M
- 1 ml di potassio fosfato bibasico 0,3 M, portato a pH 8,5 con KOH 5 N.

Miscelare e attendere 1', al buio. Aggiungere 3 µl di acido acetico. Miscelare. Attendere rigorosamente 10'. Prelevare 20 µl per l'iniezione in HPLC.

Ossidazione con perossido di idrogeno

Ad una miscela composta da 50 µl di NaOH 1 N e 5 µl di H₂O₂ al 10% aggiungere 20 µl dell'estratto del campione. Miscelare e attendere 1', al buio, a temperatura ambiente. Aggiungere 4 µl di acido acetico. Miscelare. Prelevare 20 µl per l'iniezione in HPLC.

Soluzioni degli standard di PSP tossine

Preparare soluzioni separate dei vari standard di PSP tossine in acido acetico 0,1 M con concentrazioni che vanno da 100 a 2000 µg ml⁻¹. Diluire con acqua fino ad ottenere soluzioni madri di lavoro, con concentrazioni che vanno da 8 a 100 µg ml⁻¹. Queste sono stabili per almeno un mese.

Nota: Per praticità, gli standard possono essere combinati in 3 miscele con opportune diluizioni delle soluzioni madri in acqua. Tali soluzioni devono essere aggiustate a pH circa 4 con acido acetico 0,1 M. Tutte le ulteriori diluizioni devono essere effettuate utilizzando acido acetico 0,1 mM, in modo che le soluzioni siano mantenute a pH di circa 4.

Le miscele sono le seguenti: *Mix I.*—Per l'ossidazione al periodato.—GTX1,4 e NEO; *Mix II.*—Per l'ossidazione al perossido.—GTX2,3, STX, B-1, e dcSTX; *Mix III.*—Per l'ossidazione al periodato e al perossido—C1,2 e C3,4.

Le soluzioni standard diluite devono essere conservate in provette di plastica o in contenitori di vetro disattivato lasciando in ammollo per un'intera notte in idrossido di sodio, seguito da risciacquo, prima con acqua poi con metanolo, ed asciugatura.

HPLC - Condizioni cromatografiche

Colonna: SUPELCO DB C 18 (250 x 4,6 mm)

Eluente A: Ammonio formiato 0,1 M portato a pH 6 con acido acetico 0,5 M.

Eluente B: Acetonitrile

Temperatura della colonna: Temperatura ambiente

Flusso: 1 ml/min.

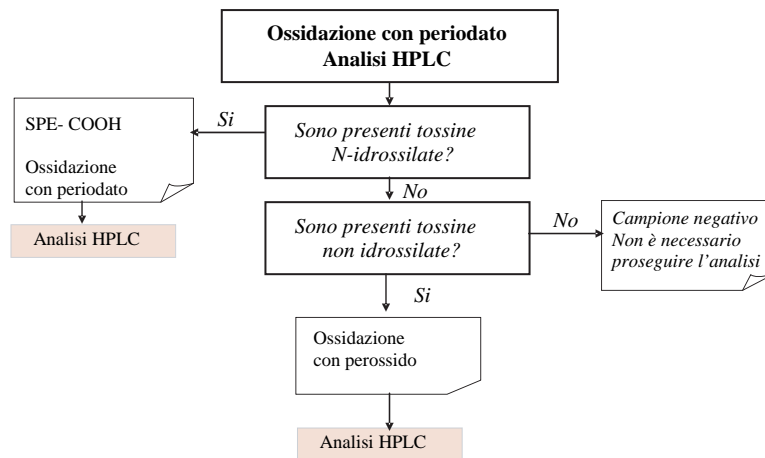
Rivelatore: Fluorescenza Exc. 330 nm - Em. 400 nm

Gradiente:

Tempo (min.)	A (%)	B (%)
0	100	0
16	99	1
22	96	4
29 : 90''	96	4
30	100	0

Applicazione del metodo alle analisi di routine

1. Analizzare gli estratti dopo ossidazione al periodato. Se nessun picco corrisponde a nessuno standard delle tossine PSP, il campione in esame è negativo e non sono necessarie ulteriori analisi.
2. Se è presente una qualsiasi delle tossine non idrossilate, STX, dcSTX, GTX2,3, B-1, o C1,2, ma risultano assenti le tossine N-idrossilate, NEO, GTX1,4, e C3,4, allora le prime possono essere quantificate per confronto diretto con gli standard noti, sottoposti all'ossidazione al periodato. Tuttavia, la reazione di ossidazione al perossido è molto più sensibile per B-1, C 1,2, e dcSTX e sarebbe preferibile, se è richiesta la massima sensibilità. La reazione di ossidazione al perossido può essere utilizzata per confermare i risultati di tutte le tossine ottenute dall'ossidazione con periodato.
3. Se sono presenti, sia le tossine N-idrossilate che quelle non idrossilate, queste ultime vengono quantificate dopo che un'ulteriore aliquota dell'estratto del campione è stato ossidato con il perossido d'idrogeno, ed i picchi sono comparati con gli standard ossidati in modo analogo.
4. Per la quantificazione di qualsiasi tossina N-idrossilata, una porzione dell'estratto del campione algale è sottoposto al *cleanup* su cartuccia SPE-COOH, e la frazione appropriata è quantificata dopo ossidazione al periodato. Questo step separa le C3,4 dalle GTX1,4 e la B-2 dalla NEO, permettendo la quantificazione di tutte le tossine per confronto diretto con gli standard sottoposti alla stessa procedura di ossidazione al periodato.
5. Qui di seguito è riportato un diagramma schematico della procedura da seguire:



Nota: Eseguire prima di ogni serie analitica la determinazione del “bianco-reagente” applicando l’intero metodo di analisi ad un campione di plancton non contenente tossine. Nel cromatogramma del bianco-reagente non dovrebbero essere presenti picchi interferenti con saxitossine, oppure presenti a livelli trascurabili.

Calcoli

Ogni tossina viene determinata quantitativamente per confronto diretto con standard analitici a concentrazioni simili.

STX, GTX2,3, B-1, e C1,2 producono, ognuno, un unico prodotto di ossidazione con entrambe le reazioni di ossidazione, mentre la dcSTX produce 2 prodotti di ossidazione con entrambe le reazioni. NEO, B-2, GTX1,4, e C3,4 producono 3 picchi ciascuna dopo ossidazione con il periodato, ma soltanto i secondi picchi di eluizione vengono utilizzati per la quantificazione. Siccome alcune tossine PSP (NEO e B-2; GTX1,4, e C3,4) danno gli stessi prodotti di ossidazione, la loro determinazione quantitativa può essere effettuata soltanto dopo la separazione per mezzo di cromatografia SPE-COOH a scambio ionico, come descritto precedentemente. Se presente a concentrazione abbastanza elevata, la dcSTX potrebbe interferire con la quantificazione della NEO dopo l’ossidazione al periodato. La NEO può essere quantificata mediante rapporti matematici dei picchi dopo ossidazione con periodato e perossido come descritto di seguito.

(a) Calcolare la concentrazione di PSP (in pg/cellula)

$$\text{Concentrazione di tossine, in pg/cellula} = \frac{Ax * Cs * Vx * D}{As * N} * 10^6$$

dove:

Ax = area del picco della tossina nell’estratto analizzato;

As = area del picco dello standard più vicino;

Cs = concentrazione dello standard ($\mu\text{g ml}^{-1}$);

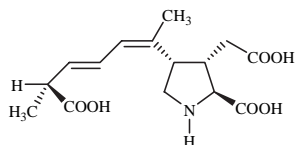
Vx = volume finale dell’estratto analizzato (ml);

D = fattore di diluizione;

N = numero di cellule analizzate;

Nei casi in cui picchi appartenenti a differenti tossine coeluiscono (es. dcSTX e NEO nell’ossidazione al periodato o secondo picco GTX1,4 e primo picco dcGTX2,3) per una corretta quantificazione delle singole tossine si devono considerare i rapporti matematici esistenti tra i picchi nei prodotti di ossidazione al periodato e al perossido.

39.2.2 Acido domoico (Metodo ufficiale AOAC, Quilliam *et al.*, 1995)



Acido domoico

Soluzioni

Soluzione concentrata di acido domoico [$100 \mu\text{g ml}^{-1}$]: pesare 0,5 mg di acido domoico e disciogliere in 5,0 ml di soluzione acetonitrile: acqua, 10:90 (v:v).

Soluzioni di riferimento: diluire la soluzione concentrata di acido domoico con acetonitrile:acqua, 10:90 (v:v) in modo da ottenere soluzioni di concentrazioni di $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$, $2,0 \mu\text{g ml}^{-1}$, $4,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $8,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ di acido domoico.

Estrazione dei campioni di colture/retinate di Pseudo-nitzschia spp.

Raccogliere le cellule (dalla coltura o dalla retinata) mediante filtrazione o centrifugazione, eliminando quanto più liquido (mezzo di coltura o acqua di mare) possibile. Si aggiunge il solvente di estrazione (acqua:metanolo 1:1) con le seguenti modalità:

- qualora non si sia riusciti ad eliminare tutto il mezzo, si aggiunge al campione un ugual volume di metanolo 100%;
- se invece si riesce ad ottenere un campione quanto più asciutto possibile, si dovrà aggiungere un volume di 10 - 15 ml di MeOH 50%.

Si procede alla sonicazione dei campioni, in bagno freddo per evitare l'evaporazione, per mezzo di un sonicatore ad asta, per un tempo minimo di 10 minuti ad impulsi da 20% a 70%. Una volta verificata l'avvenuta rottura delle alghe, i campioni sono trasferiti in provette di polipropilene e portati ad un volume noto con la stessa soluzione estraente.

HPLC - Condizioni cromatografiche:

- Colonna: C18 - $5 \mu\text{m}$ (250 X 4,6 mm)
- Eluente: acetonitrile:acqua 1:9 con 0,2 ml di TFA
- Temperatura colonna: 40°C
- flusso: 1 ml/min
- volume iniettato $20 \mu\text{l}$
- rivelazione spettrofotometrica a 242 nm.

Costruzione della curva di taratura

Iniettare le 4 soluzioni di riferimento di acido domoico descritte precedentemente.

Costruire una curva di taratura di tipo $y = ax + b$, dove: y = area del picco dell'acido domoico; x = concentrazione della soluzione di riferimento in pg ml^{-1} ; a = coefficiente angolare; b = intercetta sull'asse delle y , riportando in ascissa la concentrazione delle soluzioni di riferimento di acido domoico e in ordinata l'area del picco cromatografico.

Analisi dei campioni per la ricerca di acido domoico

Iniettare $20 \mu\text{l}$ di estratto algale filtrato per la determinazione HPLC-UV.

Nota: Eseguire prima di ogni serie analitica la determinazione del "bianco-reagente" applicando l'intero metodo di analisi ad un campione di plancton non contenente tossine. Nel cromatogramma del bianco-

reagente non dovrebbero essere presenti picchi interferenti con l'acido domoico, oppure presenti a livelli trascurabili.

Identificazione

L'identificazione dell'acido domoico si ottiene per confronto del tempo di ritenzione del picco del campione ed il tempo di ritenzione del picco dello standard di acido domoico.

Determinazione

La determinazione quantitativa è realizzata mediante interpolazione dell'area del picco dell'acido domoico nell'estratto campione sulla curva di taratura.

Espressione dei risultati

La concentrazione C di acido domoico, espressa in pg di acido domoico per cellula, è calcolata secondo la seguente equazione:

$$C = \frac{y - b}{a} * \frac{100}{R_m} * \frac{V}{n} * D * 10^6$$

dove:

y = Area del picco di acido domoico dell'estratto campione.

b = Intercetta della curva sull'asse delle y.

a = Coefficiente angolare della curva di taratura.

R in base m = Recupero medio (%), calcolato come descritto di seguito.

V = Volume finale dell'estratto (ml)

n = Numero di cellule analizzate.

D = Fattore di diluizione (se è stata operata una diluizione dell'estratto)

Calcolo del recupero

Valutare il recupero del metodo effettuando prove di recupero su "bianco-campione" di plancton per il quale attraverso precedenti determinazioni cromatografiche sia stata dimostrata l'assenza del picco dell'acido domoico o di picchi interferenti nell'intorno del tempo di ritenzione dell'acido domoico.

Suddividere il bianco-campione in un numero di aliquote corrispondenti ai livelli di fortificazione, più un'aliquota per la prova in bianco.

Fortificare le aliquote, ad eccezione dell'aliquota destinata alla prova in bianco, con ridotti volumi di soluzione concentrata di acido domoico in modo da ottenere in ogni aliquota una diversa concentrazione di acido domoico (livello di fortificazione). I livelli di fortificazione devono essere almeno 2.

Procedere con l'estrazione e l'analisi dei campioni fortificati e della prova in bianco.

Verificare l'assenza di picchi a tempi di ritenzione prossimi a quello dell'acido domoico nella prova in bianco.

Calcolare il recupero in percentuale (R), sui campioni fortificati, come segue:

$$R = \frac{y - b}{a} * \frac{100}{C_f}$$

dove:

y = Area del picco di acido domoico dell'estratto campione fortificato.

b = Intercetta della curva sull'asse delle y.

a = Coefficiente angolare della curva di taratura.

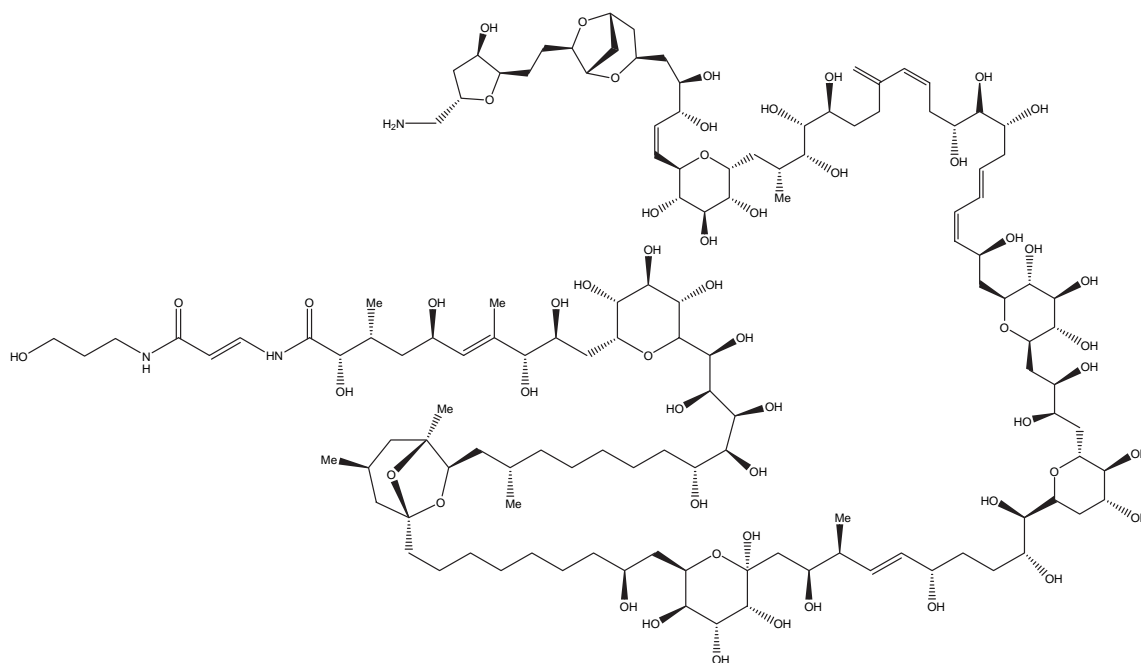
C_f = Concentrazione teorica di acido domoico nell'aliquota di estratto campione fortificato.

Eseguire le prove di recupero, per ciascun livello di fortificazione, in triplicato, per due giorni consecutivi.

Stima dell'accuratezza e precisione

Analizzare statisticamente i valori di recupero ottenuti nelle diverse prove per ottenere il recupero medio (R in base m) e la deviazione standard del metodo.

39.2.3 Palitossina (Ciminiello *et al.*, 2008)



Palitossina

Soluzioni

- Soluzione concentrata di palitossina standard [$100 \mu\text{g ml}^{-1}$]: sciogliere lo standard di palitossina ($100 \mu\text{g}$) in 1 ml di una soluzione metanolo: acqua 1:1.
- Soluzioni di riferimento: diluire la soluzione concentrata di palitossina con metanolo: acqua 1:1 (v:v) in modo da ottenere soluzioni di concentrazioni di $2,0 \mu\text{g ml}^{-1}$, $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$, $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{g ml}^{-1}$ di palitossina.

*Estrazione dei campioni di colture/retinate di *Ostreopsis spp.**

Raccogliere le cellule (dalla coltura o dalla retinata) mediante centrifugazione utilizzando un rotore ad angolo fisso (r_{max} 9,5 cm) a 5000 rpm per 20 min così da separare il pellet dall'acqua di mare o mezzo di coltura.

Estrarre separatamente il pellet algale ed il mezzo di coltura e/o acqua di mare.

a. Pellet.

- Sonicare il pellet con 4 ml di una soluzione metanolo/acqua (1:1 v/v) per 3 min, con l'ausilio di un bagnetto di ghiaccio.
- Centrifugare il miscuglio a 5500 rpm per 30 min, decantare il supernatante e lavare il pellet residuo due volte con 3 ml di metanolo/acqua (1:1 v/v), centrifugando ogni volta.

Riunire gli estratti, portare il volume a 10 ml con la miscela di estrazione.

Analizzare direttamente la miscela all'LC-MS iniettando 5 μ l del campione ottenuto.

b. Acqua di mare o mezzo di coltura.

- Aggiungere all'acqua di mare o al mezzo di coltura un eguale volume di butanolo e procedere alla ripartizione.
- Raccogliere la fase butanolica, portare a secco utilizzando un evaporatore rotante e ridisciogliere il residuo in 4 ml di metanolo/acqua (1:1 v/v).
- Analizzare direttamente la miscela all'LC-MS iniettando 5 μ l del campione ottenuto.

HPLC - Condizioni cromatografiche

- Colonna: Gemini C18-3 μ (2,0 x 150 mm)
- Eluente A: H₂O-30 mM acido acetico
- Eluente B: Acetonitrile 95%-30 mM acido acetico
- Temperatura della colonna: Temperatura ambiente
- Flusso: 200 μ l min⁻¹
- Volume d'iniezione: 5 μ l
- Tempo di equilibratura: 10 min
- Gradiente:

Tempo (min.)	A (%)	B (%)
0	80	20
10	0	100
20	0	100
21	80	20

Parametri di massa ottimizzati per il triplo quadrupolo API-2000 (Applied Biosystems, Part of Life Technologies) equipaggiato con sorgente di ionizzazione elettrospray operante in modalità ioni positivi

- Turbogas temperature (temperatura del gas): 300 °C
- Voltage ionspray (voltage applicato al capillare): 5500 V
- Declustering potential (DP) (potenziale di declusterizzazione): 8 V
- Focusing potential (FP) (potenziale di focalizzazione): 350 V
- Entrance potential (EP) (potenziale di entrata al quadrupolo): 11 V.
- Collision energy (energia di collisione): 50 eV
- Cell exit potential (CXP) (potenziale all'uscita della cella di collisione): 10 V

Nota bene: Se lo strumento di massa è diverso, è necessario ottimizzare le condizioni di ionizzazione e frammentazione della molecola a seconda dello strumento utilizzato.

Costruzione della curva di taratura

- Iniettare le soluzioni di riferimento di palitossina standard.
- Costruire una curva di taratura di tipo $y = ax + b$, dove: y = area del picco della palitossina; x = concentrazione della soluzione di riferimento in μ g ml⁻¹; a = coefficiente angolare; b = intercetta sull'asse delle y , riportando in ascissa la concentrazione delle soluzioni di riferimento di palitossina e in ordinata l'area del picco cromatografico relativo allo ione nel caso del SIM, o l'area del picco cromatografico relativo alla transizione MRM.

Analisi LC/MS dei campioni per la ricerca di palitossine

- Iniettare su uno strumento LC/MS a triplo quadrupolo 5 μ l di estratto (pellet algale e mezzo di coltura/o acqua di mare), utilizzando le condizioni riportate precedentemente per l'HPLC e per la massa.

- Effettuare esperimenti SIM (Selected Ion Monitoring) monitorando:
 - a. per la palitossina: gli ioni a m/z 1340 $[M+2H]^{2+}$, e m/z 1331 $[M+2H-H_2O]^{2+}$ (tempo di ritenzione ~ 6,60 min)
 - b. per l'ovatossina-a: gli ioni a m/z 1324, $[M+2H]^{2+}$, e m/z 1315 $[M+2H-H_2O]^{2+}$ (tempo di ritenzione ~ 6,65 min)
- Selezionare le seguenti transizioni ione precursore > ione frammento per gli esperimenti MRM (Multiple Reaction Monitoring) a ioni positivi:
 - a. per la palitossina: m/z 1340>327; 1331>327
 - b. per l'ovatossina-a: m/z 1324>327; 1315>327

Nota: Eseguire prima di ogni serie analitica la determinazione del “bianco-reagente” applicando l'intero metodo di analisi ad un campione di plankton non contenente tossine. Nel cromatogramma del bianco-reagente non dovrebbero essere presenti picchi per le transizioni MRM della palitossina.

Identificazione

Operando in modalità SIM, l'identificazione della palitossina e del suo analogo ovatossina-a, trovato in *Ostreopsis ovata* raccolta lungo le coste italiane, si ottiene per confronto del tempo di ritenzione e del rapporto ionico dei picchi del campione con quelli dello standard di palitossina o di un campione di riferimento contenente ovatossina-a iniettati nelle stesse condizioni sperimentali in cui viene analizzato il campione incognito.

In modalità MRM l'identificazione delle due tossine si ottiene per confronto, oltre che del tempo di ritenzione e del rapporto ionico, anche della frammentazione.

Determinazione

La determinazione quantitativa è realizzata mediante interpolazione dell'area del picco della palitossina nell'estratto campione sulla curva di taratura.

Per l'ovatossina-a, di cui non è attualmente disponibile uno standard certificato, la quantificazione viene effettuata ipotizzando la stessa risposta molare della palitossina, sulla base delle strette analogie strutturali tra le due tossine.

Espressione dei risultati

La concentrazione C di palitossina o ovatossina-a, espressa in pg di tossina per cellula, è calcolata secondo la seguente equazione:

$$C = \frac{y - b}{a} * \frac{100}{Rm} * \frac{V}{n} * D * 10^6$$

dove:

y = Area del picco di palitossina o ovatossina-a dell'estratto campione.

b = Intercetta della curva sull'asse delle y .

a = Coefficiente angolare della curva di taratura.

R in base m = Recupero medio (%), calcolato come descritto di seguito.

V = Volume finale dell'estratto (ml)

n = Numero di cellule analizzate.

D = Fattore di diluizione (se è stata operata una diluizione dell'estratto)

Calcolo del recupero

- Valutare il recupero del metodo effettuando prove di recupero su “bianco-campione” di pellet algale, acqua di mare o mezzo di coltura, per il quale attraverso precedenti determinazioni LC/MS sia stata dimostrata l'assenza di picchi per le transizioni MRM della palitossina.
- Suddividere il bianco-campione in un numero di aliquote corrispondenti ai livelli di fortificazione, più un'aliquota per la prova in bianco.

- Fortificare le aliquote, ad eccezione dell'aliquota destinata alla prova in bianco, con ridotti volumi di soluzione concentrata di palitossina standard in modo da ottenere in ogni aliquote una diversa concentrazione di palitossina (livello di fortificazione). I livelli di fortificazione devono essere almeno 2.
- Procedere con l'estrazione e l'analisi LC/MS dei campioni fortificati e della prova in bianco.
- Verificare l'assenza di picchi per le transizioni MRM della palitossina nella prova in bianco.
- Calcolare il recupero in percentuale (R), sui campioni fortificati, come segue:

$$R = \frac{y - b}{a} * \frac{100}{Cf}$$

dove:

y = Area del picco di palitossina dell'estratto campione.

b = Intercetta della curva sull'asse delle y.

a = Coefficiente angolare della curva di taratura.

Cf = Concentrazione teorica di palitossina nell'aliquote di campione fortificato ($\mu\text{g ml}^{-1}$)

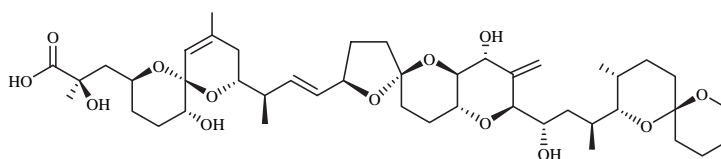
Eeguire le prove di recupero, per ciascun livello di fortificazione, in triplicato, per due giorni consecutivi.

Stima dell'accuratezza e precisione

Analizzare statisticamente i valori di recupero ottenuti nelle diverse prove per ottenere il recupero medio (R in base m) e la deviazione standard del metodo.

39.3 TOSSINE LIPOSOLUBILI

39.3.1 Acido okadaico (Quilliam, 1995)



Acido okadaico

Soluzioni

- Soluzione ADAM: sciogliere 5 mg di 9-antrildiazometano (ADAM) in acetone (100 μl), portare il volume a 2,5 ml con metanolo e filtrare attraverso una membrana di 0,45 μm . Durante la preparazione della soluzione operare sotto luce gialla. La soluzione va preparata al momento e utilizzata il piú presto possibile.
- Soluzioni certificate standard ($24,1 \pm 0,8 \mu\text{g ml}^{-1}$ in metanolo) di acido okadaico
- Soluzioni di riferimento: diluire la soluzione concentrata di acido okadaico con metanolo in modo da ottenere soluzioni di concentrazioni di $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$, $5,0 \mu\text{g ml}^{-1}$, $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ e $1,0 \mu\text{g ml}^{-1}$ di acido okadaico.

Estrazione dei campioni di cellule di Dinophysis spp. e Prorocentrum lima

- Raccogliere le cellule (dalla coltura o dalla retinata) mediante filtrazione o centrifugazione, eli-

-
- minando quanto più liquido (mezzo di coltura o acqua di mare) possibile.
- Sonicare il pellet con 4 ml di una soluzione metanolo/acqua (8:2 v/v) per 3 min, con l'ausilio di un bagnetto di ghiaccio.
 - Centrifugare il miscuglio a 5500 rpm per 30 min, decantare il supernatante e lavare il pellet residuo due volte con 3 ml di metanolo/acqua (8:2 v/v), centrifugando ogni volta.

Derivatizzazione con ADAM

- Trasferire un'aliquota (0,5 ml) sia del campione estratto che dello standard di acido okadaico e delle soluzioni di riferimento diluite separatamente, in vials di vetro ambrato (7 x 30mm) e seccare sotto N₂.
- Trattare i campioni con 200 µl di soluzione ADAM allo 0,2% per 1h, al buio, a 35°C.
- Evaporare il solvente e ridisciogliere il prodotto di reazione in 1 ml di miscela esano-cloroformio (1:1). Dividere la miscela ottenuta in tre porzioni da sottoporre singolarmente a purificazione su SPE.

Clean-up su SPE (Solid Phase Extraction)

- Caricare ciascuna aliquota del campione su una cartuccia di silice per estrazione in fase solida (SPE), preconditionata con 6 ml di cloroformio seguito da 3 ml di miscela esano-cloroformio (1:1).
- Eluire la colonna con 5 ml di miscela esano-cloroformio (1:1), poi con 5 ml di cloroformio e infine con 5 ml di miscela cloroformio-metanolo (96:5).
- Concentrare quest'ultimo eluato, contenente gli esteri ADAM-OA, con un evaporatore rotante, trasferire in un vial ambrato (7 x 30mm) ed evaporare sotto N₂.
- Ridisciogliere il residuo in metanolo (0,2 ml) per l'analisi HPLC.

HPLC - Condizioni cromatografiche

- Colonna: RP C18, Symmetry, Waters CO. (250 mm × 4,6; 5 µm)
- Eluente: Acetonitrile:acqua (80: 20 v/v)
- Temperatura della colonna: 35°C
- Flusso: 1 ml/min
- Volume d'iniezione: 20 µl
- Rivelatore: Fluorescenza, λ_{ex} 365 nm, λ_{em} 415 nm

Costruzione della curva di taratura

- Iniettare le soluzioni di riferimento di acido okadaico standard derivatizzato con ADAM in duplicato.
- Costruire una curva di taratura di tipo $y = ax + b$, dove: y = area del picco dell'acido okadaico (calcolata come media di due repliche dell'analisi); x = concentrazione della soluzione di riferimento in µg ml⁻¹; a = coefficiente angolare; b = intercetta sull'asse delle y , riportando in ascissa la concentrazione delle soluzioni di riferimento di acido okadaico e in ordinata l'area del picco cromatografico.

Applicazione del metodo alle analisi di routine

- Iniettare 20 µl dell'estratto algale derivatizzato con ADAM e purificato su SPE in HPLC utilizzando le condizioni cromatografiche sopra riportate.
- Analizzare ogni campione in duplicato.

Nota: Eseguire prima di ogni serie analitica la determinazione del "bianco-reagente" applicando l'intero metodo di analisi ad un campione di plancton non contenente tossine. Nel cromatogramma del bianco-reagente non dovrebbero essere presenti picchi interferenti con l'acido okadaico, oppure presenti a livelli trascurabili.

Identificazione

L'identificazione dell'acido okadaico si ottiene confrontando i tempi di ritenzione (RT) del picco del campione dopo derivatizzazione con quello di una delle soluzioni di OA standard derivatizzato.

Determinazione

La determinazione quantitativa è realizzata mediante interpolazione dell'area del picco dell'acido okadaico nell'estratto campione sulla curva di taratura.

Espressione dei risultati

La concentrazione C di acido okadaico, espressa in pg di acido okadaico per cellula, è calcolata secondo la seguente equazione:

$$C = \frac{y - b}{a} * \frac{V}{n} * D * 10^6$$

dove:

y = Area del picco di acido okadaico dell'estratto campione (calcolata come media di due repliche dell'analisi).

b = Intercetta della curva sull'asse delle y.

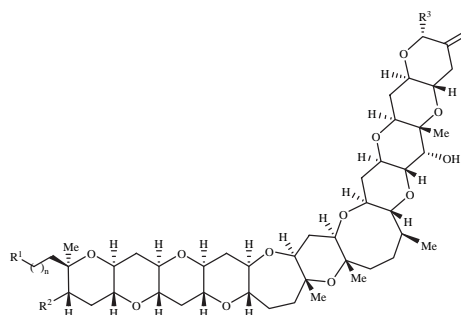
a = Coefficiente angolare della curva di taratura.

V = Volume finale dell'estratto (ml)

n = Numero di cellule analizzate.

D = Fattore di diluizione (se è stata operata una diluizione dell'estratto)

39.3.2 Yessotossine (Ciminiello et al., 2003)



	R ¹	R ²	R ³	n
Yessotoxin (YTX)	OSO ₃ H	OSO ₃ H		1
45-Hydroxyessotoxin (45-hydroxyYTX)	OSO ₃ H	OSO ₃ H		1
Homoyessotoxin (homoYTX)	OSO ₃ H	OSO ₃ H		2
45-Hydroxyhomoyessotoxin (45-OHhomoYTX)	OSO ₃ H	OSO ₃ H		2
Carboxyessotoxin (carboxyYTX)	OSO ₃ H	OSO ₃ H		1
Carboxyhomoyessotoxin(carboxyhomoYTX)	OSO ₃ H	OSO ₃ H		2
Noroxohomoyessotoxin (NoroxohomoYTX)	OSO ₃ H	OSO ₃ H		2
Noroxoyessotoxin (NoroxoYTX)	OSO ₃ H	OSO ₃ H		2
1-Desulfocarboxyhomoyessotoxin	OH	OSO ₃ H		2
4-Desulfocarboxyhomoyessotoxin	OSO ₃ H	OH		2

Struttura delle yessotossine ritrovate nel mar Mediterraneo

Soluzioni

Soluzione concentrata di yessotossina standard [5,5 µg ml⁻¹] in metanolo.

Soluzioni di riferimento: diluire la soluzione concentrata di yessotossina con metanolo in modo da ottenere soluzioni di concentrazioni di 500 ng ml⁻¹, 250 ng ml⁻¹, 125 ng ml⁻¹ e 62,5 ng ml⁻¹ di yessotossina.

Estrazione dei campioni di colture/retinate di Protoceratium reticulatum, Lingulodinium polyedrum e Gonyaulax spinifera

Raccogliere le cellule (dalla coltura o dalla retinata) mediante centrifugazione utilizzando un rotore ad angolo fisso (r_{\max} 9,5 cm) a 3000 rpm per 20 min così da separare il pellet dall'acqua di mare o mezzo di coltura.

Estrarre separatamente il pellet algale ed il mezzo di coltura e/o acqua di mare.

a. Pellet.

- Sonicare il pellet con 3 ml di metanolo x 10 minuti x 3 volte con l'ausilio di un bagno di ghiaccio.
- Centrifugare il miscuglio a 3000 rpm per 15 min, decantare il supernatante e lavare il pellet residuo due volte con 2 ml di metanolo, centrifugando ogni volta.
- Riunire gli estratti, portare il volume a 6 ml con metanolo
- Analizzare direttamente la miscela all'LC-MS iniettando 5 µl del campione ottenuto.

b. Acqua di mare o mezzo di coltura.

- Portare l'acqua di mare o il mezzo di coltura a pH 5,8 con acido formico 0,1-1% e filtrare utilizzando filtri 0,45 µm.
- Concentrare l'acqua di mare o il mezzo di coltura su una cartuccia C18 per estrazione in fase solida (SPE), preconditionata con H₂O a pH 5,8 (con Ac. Formico 0,1-1%).
- Eluire la cartuccia con una soluzione propanolo:acqua 2:8 v:v (10 ml) e successivamente con metanolo.
- Raccogliere la frazione propanolo:acqua 2:8, evaporare e ridisciogliere il residuo in 2 ml di metanolo.
- Analizzare direttamente la miscela all'LC-MS iniettando 5 µl del campione ottenuto.

HPLC - Condizioni cromatografiche

- Colonna: Hyperclone C8 BDS 3µ (2,0 x 50 mm)
- Eluente A: H₂O-2 mM Formiato di ammonio
- Eluente B: Acetonitrile 95%- 2 mM Formiato di ammonio
- Temperatura della colonna: Temperatura ambiente
- Flusso: 200 µl min⁻¹
- Volume d'iniezione: 5 µl
- Tempo di equilibratura: 10 min
- Gradiente:

Tempo (min.)	A (%)	B (%)
0	90	10
10	0	100
25	0	100
26	90	10

Parametri di massa ottimizzati per il triplo quadrupolo API-2000 (Applied Biosystems, Part of Life Technologies) equipaggiato con sorgente di ionizzazione elettrospray operante in modalità ioni negativi

- Turbogas temperature (temperatura del gas): 100 °C
- Voltage ionspray (voltage applicato al capillare): -4500 V
- Declustering potential (DP) (potenziale di declusterizzazione): -100 V
- Focusing potential (FP) (potenziale di focalizzazione): -350 V
- Entrance potential (EP) (potenziale di entrata al quadrupolo): -9 V.
- Collision energy (energia di collisione): 50 eV
- Cell exit potential (CXP) (potenziale all'uscita della cella di collisione): -35 V

Nota bene: Se lo strumento di massa è diverso, è necessario ottimizzare le condizioni di ionizzazione e frammentazione della molecola a seconda dello strumento utilizzato.

Costruzione della curva di taratura

- Iniettare le soluzioni di riferimento di yessotossina (YTX) standard.
- Costruire una curva di taratura di tipo $y = ax + b$, dove: y = area del picco della palitossina; x = concentrazione della soluzione di riferimento in ng ml^{-1} ; a = coefficiente angolare; b = intercetta sull'asse delle y , riportando in ascissa la concentrazione delle soluzioni di riferimento di yessotossina e in ordinata l'area del picco cromatografico relativo allo ione nel caso del SIM, o l'area del picco cromatografico relativo alla transizione MRM.

Analisi LC/MS dei campioni per la ricerca di yessotossine

- Iniettare su uno strumento LC/MS a triplo quadrupolo 5 μl di estratto (pellet algale e mezzo di coltura/o acqua di mare), utilizzando le condizioni riportate precedentemente per l'HPLC e per la massa.
- Effettuare esperimenti SIM (Selected Ion Monitoring) e MRM (Multiple Reaction Monitoring) monitorando per ciascuna yessotossina gli ioni e le transizioni riportate nella seguente tabella:

Tossina*	SIM		MRM	
	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	[M-SO ₃ -H] ⁻ (<i>m/z</i>)	[M-H] ⁻ /[M-SO ₃ -H] ⁻	[M-H] ⁻ /frammento strutturale diagnostico
YTX	1141	1061	1141/1061	1061/855
homoYTX	1155	1075	1155/1075	1075/869
noroxoYTX	1047	967	1047/967	967/855
CarboxyYTX	1173	1093	1173/1093	1093/855
CarboxyhomoYTX	1187	1107	1187/1107	1107/869
45-OH YTX	1157	1077	1157/1077	1077/855

*I tempi di ritenzione della yessotossina e dei suoi analoghi si aggirano tra i 6-8 minuti.

Nota: Eseguire prima di ogni serie analitica la determinazione del “bianco-reagente” applicando l'intero metodo di analisi ad un campione di plancton non contenente tossine. Nel cromatogramma del bianco-reagente non dovrebbero essere presenti picchi per le transizioni MRM delle yessotossine.

Identificazione

Operando in modalità SIM, l'identificazione delle yessotossine si ottiene per confronto del tempo di ritenzione e del rapporto ionico dei picchi del campione con quelli dello standard di yessotossina o di un campione di riferimento contenente gli altri analoghi iniettati nelle stesse condizioni sperimentali in cui viene analizzato il campione incognito.

In modalità MRM, l'identificazione delle tossine si ottiene per confronto, oltre che del tempo di ritenzione e del rapporto ionico, anche della frammentazione.

Determinazione

La determinazione quantitativa è realizzata mediante interpolazione dell'area del picco della yessotossina o di uno dei suoi analoghi nell'estratto campione sulla curva di taratura.

Per gli analoghi della yessotossina, in mancanza di opportuno standard certificato, la quantificazione può essere effettuata ipotizzando la stessa risposta molare della yessotossina, sulla base delle strette analogie strutturali tra le varie yessotossine.

Espressione dei risultati

La concentrazione C di yessotossina o di uno dei suoi analoghi, espressa in pg di tossina per cellula, è calcolata secondo la seguente equazione:

$$C = \frac{y - b}{a} * \frac{V}{n} * D * 10^3$$

dove:

y = Area del picco di yessotossina o di un suo analogo dell'estratto campione.

b = Intercetta della curva sull'asse delle y.

a = Coefficiente angolare della curva di taratura.

V = Volume finale dell'estratto (ml)

n = Numero di cellule analizzate.

D = Fattore di diluizione (se è stata operata una diluizione dell'estratto)

39.4 BIBLIOGRAFIA

- BOTANA L.M. (2008) - *Seafood and Freshwater Toxins – Pharmacology, Physiology, and Detection*, 2nd Edition Botana L.M. (ed), CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL: 941pp.
- CIMINIELLO P., DELL' AVERSANO C., FATTORUSSO E., FORINO M., MAGNO S., GUERRINI F., PISTOCCHI R., BONI L. (2003) - Complex yessotoxins profile in *Protoceratium reticulatum* from north-western Adriatic sea revealed by LC-MS analysis. *Toxicon*, **42**: 7-14.
- CIMINIELLO P., DELL' AVERSANO C., FATTORUSSO E., FORINO M., TARTAGLIONE L., GRILLO C., MELCHIORRE N. (2008) - Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* collected along the Ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*, **19**: 111-120.
- CIMINIELLO P., DELL' AVERSANO C., FATTORUSSO E., FORINO M. (2009) - Recent developments in mediterranean harmful algal events. In: Fishbein J.C. (ed.), *Advances in Molecular Toxicology*, Volume 3, Elsevier B.V.
- FAO/IOC/WHO (2005) - *Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc Expert Consultation on Biotoxins in Bivalve Molluscs*. Oslo, Norway, Sept. 26-30 2004.
- LAWRENCE J.F., NIEDZWIADK B., MENARD C. (2005) - Quantitative determination of paralytic shellfish poisoning toxins in shellfish using prechromatographic oxidation and liquid chromatography with fluorescence detection: collaborative study. *J. AOAC Int.*, **88**: 1714-1732.
- QUILLIAM M.A. (1995) - Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *J. AOAC Int.*, **78**: 555-570.
- QUILLIAM M.A., XIE M., HARDSTOFF W.R. (1995) - Rapid extraction and cleanup for liquid chromatographic determination of domoic acid in unsalted seafood. *J. AOAC Int.*, **78**: 543-554.

CAPITOLO 40. ANALISI CHIMICHE, BIOCHIMICHE E MICROBIOLOGICHE DI AGGREGATI MUCILLAGINOSI

M. Giani, D. Berto, R. Urbani, M. Pompei, C. Totti, E. Crevatin, P. Del Negro

mgiani@inogs.it

40.1 INTRODUZIONE

Gli aggregati mucillaginosi pelagici sono agglomerati amorfi di materiale organico ed inorganico in cui sono inglobati virus, batteri, microalghe, organismi eterotrofi, materiale detritico, “faecal pellet” e quant’altro si trovi in sospensione nella colonna d’acqua. L’origine di tali aggregati è planctonica (Faganeli *et al.*, 1995; Kovac *et al.*, 2002; Berto *et al.*, 2005), sebbene sia ancora dibattuto il ruolo svolto nella loro formazione dalla sostanza organica disciolta (Fonda Umani *et al.*, 2007), dai batteri (Azam *et al.*, 1999), nonché dalle dinoflagellate (Pompei *et al.*, 2003; Pistocchi *et al.*, 2005a) rispetto alle diatomee (Najdek *et al.*, 2005).

Aggregati mucillaginosi di origine pelagica sono stati osservati in tutti i mari del mondo, quali l’Egeo (Gotsis-Skretas, 1995), il mare del Nord (Riebesell, 1992), aree costiere dell’Oceano Pacifico (Alldredge *et al.*, 2002) e della Nuova Zelanda (MacKenzie *et al.*, 2002), il Tirreno (Innamorati, 1995) e l’Adriatico (Fonda Umani *et al.*, 1989; Giani *et al.*, 2005a). Gli aggregati possono avere dimensioni e morfologia molto diverse e sono pertanto stati classificati in relazione alla loro forma e alla disposizione spaziale nella colonna d’acqua (Stachowitsch *et al.*, 1990; Precali *et al.*, 2005). Le tipologie che si osservano più comunemente sono descritte sinteticamente nella Tabella 1. Per una descrizione più completa si rimanda a Precali *et al.* (2005). Gli aggregati pelagici possono sedimentare ricoprendo gli organismi bentonici sessili e dare origine a processi anossici all’interfaccia aggregato/sedimento.

La formazione di aggregati di grandi dimensioni e l’accumulo massivo di materiale mucillaginoso, come si verifica periodicamente nell’Adriatico settentrionale, sono dovuti all’azione sinergica di una serie di condizioni fisiche, chimiche e biologiche (Degobbis *et al.*, 1999; Giani *et al.*, 2005a), tra cui forti gradienti verticali di densità (Precali *et al.*, 2005), lunghi tempi di residenza delle acque in una stessa area (Cozzi *et al.*, 2004), limitata degradazione batterica della matrice organica (Fonda *et al.*, 2007). Episodi di formazioni massive sono stati segnalati nel bacino Adriatico anche nei secoli passati e alcuni autori hanno evidenziato che vi sono periodi in cui le condizioni climatiche e la circolazione ne favoriscono l’accumulo (Deserti *et al.*, 2005, Supic *et al.*, 2001; 2002).

Le comunità di organismi presenti all’interno degli aggregati possono raggiungere abbondanze di vari ordini di grandezza superiori rispetto a quelle dell’acqua di mare circostante (Herndl, 1988; Del Negro *et al.*, 2005). Tali concentrazioni elevate possono essere, in parte, il risultato di un “effetto spugna” degli aggregati che, durante i movimenti verticali lungo la colonna d’acqua, catturano gli organismi e, in parte di un’attiva di proliferazione di alcune specie al loro interno. Gli aggregati rappresentano, infatti, microambienti particolarmente favorevoli alla crescita di alcuni organismi planctonici (Totti *et al.*, 1993; Azam e Long, 2001; Totti *et al.*, 2005;).

Sui fondali di tipo roccioso si possono, inoltre, formare aggregati di origine bentonica, generati da crisoficee o ectocarpatee filamentose cui sono associate diatomee, cianobatteri e batteri (Innamorati, 1995, Giani *et al.*, 2005b; Sartoni *et al.*, 2008).

40.2 CAMPIONAMENTO

Per il campionamento di aggregati gelatinosi è preferibile utilizzare sistemi di prelievo *in situ*, tramite subacquei, con opportuni sistemi di raccolta atti a mantenerne l’integrità (siringhe, tubi di policarbonato).

In particolare, si consiglia l'uso di siringhe della capacità > 20 ml per fiocchi, macrofiocchi o della capacità > 2 l per filamenti, nastri, ragnatele e nubi. La bocca della siringa deve essere sufficientemente larga per evitare la rottura degli aggregati nella fase di aspirazione. Le bottiglie tipo Niskin possono essere utili per prelevare solo aggregati di piccole dimensioni, distribuiti in modo uniforme, mentre l'impiego di retini da zooplankton comporta l'arricchimento del campione con le frazioni planctoniche e di particolato sospeso presenti nell'acqua che possono essere facilmente inglobate quando il retino viene intasato dalle sostanze mucillaginose.

Per prelevare quantità rilevanti di aggregati di grandi dimensioni (ragnatele, nubi, falsi fondi) nella colonna d'acqua si possono usare pompe peristaltiche (con flusso di 10 l/min) in cui la parte terminale del tubo di aspirazione sia direzionata sull'aggregato da un operatore subacqueo. Per campionare tali aggregati senza l'ausilio di operatori subacquei la bocca del tubo può anche essere calata insieme a una telecamera o una sonda oceanografica (Fig.1) alla profondità in cui è presente, ad esempio, un falso fondo.

Gli aggregati affioranti possono essere raccolti con siringhe, contenitori in polietilene a bocca larga, o tubi. Si consideri che i campioni provenienti da acque basse, in prossimità della costa, sono generalmente contaminati da detrito, particelle di sedimento ecc. e degradati dai processi di fotossidazione e attività batterica e quindi di scarsa utilità per identificare l'origine dell'aggregato. Aggregati di piccole dimensioni, che possono entrare nel flusso passivo di particolato sedimentabile, possono essere raccolti anche mediante trappole di sedimentazione (Faganeli *et al.*, 1995). Per gli aggregati bentonici si possono utilizzare sia siringhe che sacchetti di plastica avendo cura di non risospingere il sedimento nelle operazioni di campionamento. In questo caso è possibile che il campione sia contaminato da frammenti di materiale estraneo (macroalghe, detrito inorganico, ecc.) che dovranno essere rimossi nel pretrattamento del campione. Inoltre, in tutte le fasi di campionamento bisogna evitare di contaminare il campione con residui oleosi che possono essere presenti sulla superficie marina o con gas di scarico dei motori dell'imbarcazione usata per il campionamento.

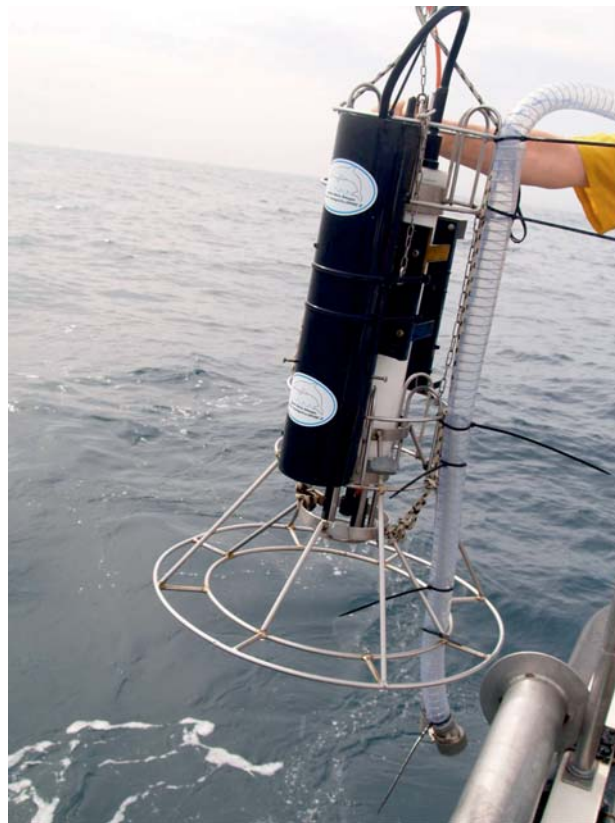


Figura 1. Tubo solidale ad un CTD, collegato ad una pompa peristaltica, usato per campionare aggregati nella colonna d'acqua.

Tabella 1. Tipologia di aggregati mucillaginosi più comunemente osservati nei mari italiani (da Precali et al., 2005).

Tipologia	Descrizione
Fiocchi	Aggregati di piccole dimensioni, lunghi da 0,5 mm a circa 1 cm.
Macrofiocchi	Aggregati con forma subsferica, irregolare, di colore biancastro e delle dimensioni di 1-5cm.
Filamenti	Aggregati di forma allungata, di dimensioni comprese tra 2 e 25 cm circa. Lo spessore • dell'ordine di alcuni millimetri. Si presentano tipicamente nella forma a cometa, con una • Questa forma sferica allungata od ovale e una • Questa allungata.
Nastri	Aggregati di forma allungata con spessore dell'ordine dei centimetri, che possono essere lunghi da alcune decine di centimetri fino ad oltre un metro. Possono presentarsi anche come festoni che si estendono orizzontalmente.
Ragnatele	Aggregati, in genere di colore bianco, formati da filamenti intrecciati che possono arrivare a dimensioni dell'ordine del metro estendendosi orizzontalmente su ampie aree.
Nubi	Aggregati di grandi dimensioni, tipicamente da 0,5 a 3-4 m. Possono affondare o risalire nella colonna d'acqua grazie alle bollicine di gas incorporati negli aggregati. Possono presentarsi in forma compatta allungata con una • Questa od una o pi • Questa (di apparenza spettrale, <i>ghost-like</i>).
Strato cremoso superficiale	Strato superficiale di filamenti o fiocchi liberi disposti all'interfaccia acqua-aria, di consistenza cremosa spesso fino a 15 cm di colore biancastro quando • di recente formazione. Lo strato cremoso non • propriamente galleggiante sulla superficie ma • piuttosto disposto al di sotto dell'interfaccia acqua-aria.
Strato gelatinoso superficiale	Strato molto consistente e di aspetto spugnoso, galleggiante sulla superficie marina. Gli strati tendono ad essere prevalentemente di colore giallastro o marrone piuttosto che biancastri. Tali strati tendono a disporsi in bande larghe fino a 100 m e lunghe anche diverse decine di chilometri.
Falso fondo	Filamenti e macrofiocchi, in genere di colore biancastro, tendono a disporsi talvolta in uno strato ben definito in corrispondenza del picnoclino subsuperficiale formando una specie di orizzonte con spessore che va da alcuni millimetri ad alcune decine di centimetri, in genere molto esteso. I filamenti o i macrofiocchi sono molto densi ma meno compatti rispetto allo strato cremoso superficiale.
Coltre o lenzuolo	Strato di aggregati gelatinosi che copre in modo uniforme rocce ed organismi sessili.

40.3 ANALISI CHIMICHE E BIOCHIMICHE

Per identificare la natura degli aggregati, costituiti da circa il 95% di acqua marina (Penna *et al.*, 2000), e poter confrontare tra loro i campioni raccolti in aree diverse ed in momenti diversi è importante seguire procedure standardizzate che minimizzino gli errori dovuti alla matrice salina o all'inclusione di una elevata componente detritica.

Le componenti organiche degli aggregati sono rappresentate principalmente da polisaccaridi e proteine, ed in misura minore da frazioni lipidiche e umiche (Berto *et al.*, 2005; Giani *et al.*, 2005c; Mecozzi e Pietrantonio, 2006). Per la loro determinazione si rimanda ai metodi per i carboidrati, per le proteine e per i lipidi (Bradford, 1976; Parsons *et al.*, 1984). L'analisi degli acidi grassi e degli steroli può fornire utili indicazioni sul contributo degli organismi planctonici inglobati nella matrice mucillaginosa (Najdek *et al.*, 2002; Pistocchi *et al.*, 2005b).

Pretrattamento

I campioni raccolti, possibilmente separati dall'acqua mediante un retino da 200 µm o per affioramento, vengono immediatamente congelati a -20°C fino al momento dell'analisi. Per alcuni tipi di analisi biochimiche è possibile conservare il campione con NaN₃ (0,02%). Risulta importante eliminare il contributo salino, mediante dialisi, prima di effettuare l'analisi elementare e la determinazione delle principali componenti biochimiche della frazione organica esprimendo così i risultati degli analiti determinati rispetto

al peso secco. I campioni, dializzati, vengono congelati, liofilizzati e conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

Dialisi

- Membrane da dialisi (forbici, chiusure e supporti per becker)
- Molecular Weight Cut Off (consigliato) 1000-3500 Dalton
- Acqua ultrapura MilliQ.
- Sodio Bicarbonato (NaHCO_3) 10 mM
- Sodio EDTA (Na_2EDTA) 30 mM
- Sodio Azide (NaN_3) 0,05%
- Agitatore
- Ancorette Magnetiche
- Becker da 5 litri
- Guanti

Trattamento delle membrane

1. Le membrane da dialisi vengono tagliate con apposite forbici a seconda della lunghezza desiderata e lasciate reidrattare per circa 15 min. in acqua MilliQ.
2. Le membrane vanno immerse in una soluzione di NaHCO_3 10mM a $+80^{\circ}\text{C}$, e mantenute sotto agitazione per 30 min.
3. Le membrane sono trasferite in una soluzione di Na_2EDTA per 30 min.
4. Le membrane sono immerse in acqua MilliQ a $+80^{\circ}\text{C}$ e mantenute sotto agitazione per 30 min.
5. Si lasciano raffreddare le membrane e poi si procede alla dialisi dopo averle ripetutamente lavate con acqua MilliQ.
6. In alternativa le membrane possono essere conservate in frigo in acqua MilliQ dopo aggiunta di NaN_3 0,05%. Prima di effettuare la dialisi le membrane devono essere lavate con acqua MilliQ per eliminare l' NaN_3 presente.
7. In tutte queste operazioni si raccomanda di utilizzare i guanti.

Trattamento dei campioni da dializzare

1. Si introduce nelle membrane da dialisi trattate una quantità di campione di mucillagine (5–10 ml) con un piccolo imbuto, fino ad occupare tutta la lunghezza della membrana.
2. Si immergono quindi i tubi da dialisi in un becker di 5 litri contenente acqua MilliQ (oppure soluzione tampone o acqua MilliQ e Na_2EDTA secondo l'analisi da effettuare) sotto agitazione per circa 4 ore.
3. Si effettua il test della presenza di cloruri sull'acqua MilliQ: si prelevano circa 5 ml di acqua MilliQ e si aggiunge 1 ml di soluzione di AgNO_3 (0,1 M):
 - se si forma un precipitato bianco di AgCl allora si procede al cambio dell'acqua MilliQ di dialisi e alla sua sostituzione con altri 5 l;
 - se non si osserva alcun precipitato bianco allora si può considerare la dialisi completa.In alternativa si effettua una misura di conduttività verificando che sia prossima a $10\ \mu\text{S}/\text{cm}$.
4. In genere per la matrice mucillagini si effettua un cambio di acqua MilliQ dopo le prime 4 ore e successivamente dopo 8-12 ore. Il trattamento è completo dopo tre giorni di dialisi.
5. Il prodotto della dialisi viene estratto dalle membrane e liofilizzato o essiccato a $+60^{\circ}\text{C}$.

40.4 ANALISI MICROBIOLOGICHE

La presenza di virus e batteri nell'aggregato viene quantificata utilizzando il conteggio diretto mediante microscopia in epifluorescenza (Noble e Fuhrman, 1998). L'attività esoenzimatica viene valutata utiliz-

zando il metodo dei substrati fluorigenici proposto da Hoppe (1993) che consente di ottenere informazioni indirette sulla labilità e sulla composizione della matrice organica nonché sulla potenzialità degradativa dei batteri presenti. Il funzionamento della comunità batterica viene valutato attraverso la misura della produzione batterica di carbonio, eseguita utilizzando l'incorporazione di un aminoacido marcato (Smith e Azam, 1992).

I protocolli per l'analisi delle mucillagini differiscono da quelli comunemente impiegati per l'osservazione dei campioni d'acqua di mare soprattutto nella parte relativa al pretrattamento del campione.

Pretrattamento dei campioni

1. I campioni di mucillagine, raccolti in un contenitore sterile (di vetro e/o polycarbonato), vengono lasciati decantare alla stessa temperatura di campionamento al fine di ottenere una separazione tra l'aggregato e l'acqua di mare. Successivamente la frazione aggregata viene raccolta e centrifugata a 3000xg per 15 min, sempre alla temperatura di campionamento.
2. Il surnatante e i *pellets* vengono raccolti separatamente in contenitori sterili. Il pellet viene disgregato utilizzando omogenizzatori meccanici o manuali. Pellet e surnatante vengono successivamente diluiti 1:10 o 1:100 in acqua di mare sterilizzata in autoclave e filtrata su 0,2 μm (Acrodisc® Syringe Filter).
3. Aliquote delle sospensioni diluite vengono trattate con una soluzione di pirofosfato di sodio fino ad ottenere una concentrazione finale di 0,5-10 mmol l⁻¹ in relazione alla salinità del campione (Velji e Albright, 1993) e sonicate 3 volte per 1 min (p.es. con un Branson Sonifer 2200; 60 W) in ghiaccio.

Abbondanza virale e abbondanza batterica

Aliquote di subcampione (sospensioni diluite) vengono fissate con formalina (concentrazione finale 2%) precedentemente filtrata su 0,2 μm (Acrodisc® Syringe Filter) e conservate a +4°C al buio fino al momento della preparazione che segue la stessa procedura descritta in questo volume nei capitoli relativi alle abbondanze virali e batteriche.

Attività esoenzimatica

Seguire i punti 1 e 2 del pretrattamento dei campioni. In questo caso il pellet può venire diluito fino a 400 volte in acqua di mare sterile filtrata su 0,2 μm (Acrodisc® Syringe Filter). Per la stima dell'attività enzimatica esocellulare (Hoppe, 1993) seguire il protocollo descritto nel capitolo relativo di questo volume.

Produzione batterica

La stima della produzione batterica viene effettuata utilizzando il metodo dell'incorporazione di ³H-leucina (Leu) (Smith e Azam, 1992). La concentrazione di marcatore da utilizzare viene stabilita dalla curve di saturazione ottenute per l'acqua circostante gli aggregati mucilluginosi (Del Negro *et al.*, 2005; Bongiorno *et al.*, 2007). Per i passaggi successivi seguire il protocollo descritto in questo volume.

40.5 MICROSCOPIA ELETTRONICA A SCANSIONE DI AGGREGATI MUCILLAGINOSI

Questo metodo viene utilizzato per mettere in evidenza la morfologia microscopica degli aggregati e la loro eterogeneità dovuta all'inclusione, nella matrice gelatinosa, di materiale biotico ed abiotico. Operando ad ingrandimenti sufficientemente alti si possono ottenere, in aggiunta, informazioni relative all'ultrastruttura del reticolo gelatinoso e/o dell'aggregato amorfo (Sartoni *et al.*, 2008).

Pretrattamento e conservazione dei campioni

Al momento della raccolta, i campioni vengono versati delicatamente in provette Eppendorf sterili da 1,5 ml con la loro acqua. Si preparano una decina di repliche per campione. Ad ogni campione viene

aggiunta, come fissativo, una soluzione di glutaraldeide per una concentrazione finale di 2% (peso/volume). I campioni vengono conservati a 4°C fino all'analisi.

Preparazione del campione

Su unità filtrante da vuoto, per filtri da 25 mm, viene posta una membrana Isopore® da 0,2 µm (Millipore). Si applica una depressione blanda (ottenibile anche con pompa ad acqua) e si versa il contenuto di una Eppendorf in una volta sola. Quindi si effettuano lavaggi ripetuti con acqua di mare filtrata (0,22 µm) o sintetica per eliminare l'eccesso di glutaraldeide e di sali. Il campione viene quindi gradualmente disidratato mediante una serie di lavaggi con soluzioni di alcol etilico a concentrazione crescente. Si comincia immergendo il filtro in una soluzione alcolica al 10%, lasciandolo immerso per almeno 15 minuti. Si ripete il trattamento almeno tre volte con soluzione fresca. Si immerge con le stesse modalità il filtro in soluzioni di etanolo a concentrazione crescente: 20%, 30%, 50%, 70%, 90%, 96% e 100%. Parte del filtro così disidratato viene quindi essiccato mediante Critical Point Dryer, montato su *stubs* (supporto per SEM) e metallizzato con Au/Pd. Quindi si procede con l'osservazione al SEM.

40.6 ANALISI DELLE COMUNITÀ MICROALGALI

Le comunità microalgali presenti all'interno degli aggregati possono essere analizzate mediante microscopia ottica, al microscopio rovesciato secondo il tradizionale metodo Utermöhl (vedi Capitolo 21). Tuttavia, la composizione della matrice e le elevate densità cellulari al loro interno impongono talvolta alcune varianti.

Pretrattamento e conservazione dei campioni

I campioni destinati alle analisi microscopiche vanno conservati in bottiglie di vetro scuro con aggiunta di fissativo (formaldeide o soluzione di Lugol). La quantità di fissativo dipende dalla concentrazione di materiale organico presente nel campione e dunque, per tali campioni, si utilizzano concentrazioni di fissativo leggermente superiori a quelle utilizzate per campioni di acqua di mare; in genere la formalina (aldeide formica al 40%) viene aggiunta al campione al 4% (40 ml per litro di campione). Per quanto riguarda il Lugol, questo viene aggiunto in misura di circa 5 ml per litro di campione o comunque fino a che il campione trattato non raggiunge una colorazione simile a quella del cognac.

Ove possibile si consiglia la raccolta e l'osservazione anche di materiale non fissato.

Analisi

Per i campioni in cui c'è solo una limitata presenza di aggregati di piccole dimensioni (fiocchi, microfocci), il metodo da utilizzarsi è lo stesso indicato per le analisi del fitoplancton (Cap. 21).

Per i campioni in cui la concentrazione di aggregati e/o le densità cellulari siano troppo elevate, occorre effettuare l'analisi su subcampioni ridotti, il cui volume da sottoporre ad osservazione potrà variare da 0,5 a 2 ml.

Dopo aver disperso il campione mediante ripetute agitazioni della bottiglia, almeno due subcampioni di volume noto vengono prelevati mediante pipetta graduata e posti in camere di sedimentazione Utermöhl, della capacità di 2 ml, in cui sarà aggiunta acqua di mare filtrata fino al riempimento.

La camera sarà quindi osservata al microscopio rovesciato ad ingrandimenti di 200 o 400x, per l'identificazione e il conteggio degli organismi fitoplanctonici. Si deve tuttavia considerare che, in presenza degli aggregati, le cellule restano imprigionate nella matrice tridimensionale degli stessi e non sedimentano sul fondo della camera; di conseguenza l'osservazione al microscopio va effettuata utilizzando tutti i piani di fuoco.

La presenza di aggregati nel campione rende difficoltosa l'osservazione al microscopio, impedendo in molti casi di effettuare un conteggio rappresentativo di tutto il popolamento fitoplanctonico; pertanto tale analisi non sempre può essere utilizzata a fini quantitativi, ma solo a fini qualitativi.

40.7 BIBLIOGRAFIA

- ALLDREDGE A.L., COWLES T.J., MACINTYRE S., RINES J.E.B., DONAGHAY P.L., GREENLAW C.F., HOLLIDAY D.V., DESHENIEKS M.M., SULLIVAN J.M., ZANEVELD J.R.V. (2002) - Occurrence and mechanisms of formation of a dramatic thin layer of marine snow in a shallow Pacific fjord. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **233**: 1-12.
- AZAM F., LONG R.A. (2001) - Sea snow microcosms. *Nature*, **414**: 495-498.
- AZAM F., FONDA UMANI S., FUNARI E. (1999) - Significance of bacteria in the mucilage phenomenon in the northern Adriatic Sea. *Ann. Ist. Sup. Sanità*, **35**: 411-419.
- BERTO D., GIANI M., TADDEI P., BOTTURA G. (2005) - Spectroscopic evidence of the marine origin of mucilages in the Northern Adriatic Sea. *Sci. Tot. Environ.*, **353**: 247-257.
- BONGIORNI L., ARMENI M., CORINALDESI C., DELL'ANNO A., PUSCEDDU A., DANOVARO R. (2007) - Viruses, prokaryotes and biochemical composition of organic matter in different types of mucilage aggregates. *Aquat. Microb. Ecol.*, **49**: 15-23.
- BRADFORD M.M. (1976) - A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principal of protein- dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 254-284.
- COZZI S., IVANČIĆ I., CATALANO G., DJAKOVAC T., DEGOBBIS D. (2004) - Dynamics of the oceanographic properties during mucilage appearance in the Northern Adriatic Sea: analysis of the 1997 event in comparison to earlier events. *J. Marine Syst.*, **50**: 223-241.
- DEGOBBIS D., MALEJ A., FONDA UMANI S. (1999) - The mucilage phenomenon in the northern Adriatic a critical review of the past scientific hypotheses. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 373-381.
- DEL NEGRO P., CREVATIN E., LARATO C., FERRARI C., TOTTI C., POMPEI M., GIANI M., BERTO D., FONDA UMANI S. (2005) - Mucilage microcosms. *Sci. Tot. Environ.*, **353**: 258-269.
- DESERTI M., CACCIAMANI C., CHIGGIATO J., RINALDI A., FERRARI C.R. (2005) - Relationships between northern Adriatic Sea mucilage events and climate variability. *Sci. Tot. Environ.*, **353**: 82-88.
- FAGANELI J., KOVAC N., LESKOVSEK H., PEZDIC J. (1995) - Sources and fluxes of particulate organic matter in shallow coastal waters characterized by summer macroaggregate formation. *Biogeochem.*, **29**: 71-88.
- FONDA UMANI S., DEL NEGRO P., LARATO C., DE VITTOR C., CABRINI M., CELIO M., FALCONI C., TAMBERLICH F., AZAM F. (2007) - Major inter-annual variations in microbial dynamics in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea) and their ecosystem implications. *Aquat. Microb. Ecol.*, **46**: 163-175.
- GIANI M., RINALDI A., DEGOBBIS D. (2005a) - Mucilages in the Adriatic and Tyrrhenian Sea: An introduction. *Sci. Tot. Environ.*, **353**: 3-9.
- GIANI M., BERTO D., CORNELLO M., SARTONI G., RINALDI, D. (2005b) - *Le mucillagini nell'Adriatico e nel Tirreno*. ICRAM - Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Ed. Millenium, Torino:110 pp.
- GIANI M., BERTO D., ZANGRANDO V., CASTELLI S., SIST P., URBANI R. (2005c) - Chemical characterization of different typologies of mucilaginous aggregates in the Northern Adriatic Sea. *Sci. Tot. Environ.*, **353**: 232-246.
- GOTSIS-SKRETAS O. (1995) - Mucilage appearances in Greek waters during 1982-1994. *Sci. Tot. Environ.*, **165**: 229-230.
- HERNDL G.J. (1988) - Ecology of amorphous aggregations (marine snow) in the northern adriatic sea. II. Microbial density and activity in marine snow and its implication to overall pelagic processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **48**: 265-275.
- HOPPE H.G. (1993) - Use of fluorogenic model substrates for extracellular enzyme activity (EEA) measurement of bacteria. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J.J. (eds) *Current methods in aquatic microbial ecology*. CRC Press Boca Raton: 423-431.
- INNAMORATI M. (1995) - Hyperproduction of mucilages by micro and macro algae in the Tyrrhenian Sea. *Sci. Tot. Environ.*, **165**: 65-81.
- KOVAC N., BAJT O., FAGANELI J., SKET B., OREL B. (2002) - Study of macroaggregate composition using FT-IR and ¹H-NMR spectroscopy. *Mar. Chem.*, **78**: 205-215.
- MACKENZIE L., SIMS I., BEUZENBERG V., GILLESPIE P. (2002) - Mass accumulation of mucilage caused by dinoflagellate polysaccharide exudates in Tasman bay, New Zealand. *Harmful Algae*, **1**: 69-83.
- MECOZZI M., PIETRANTONIO E. (2006) - Carbohydrates proteins and lipids in fulvic and humic acids of sediments and its relationship with mucilaginous aggregates in Italian seas, *Mar. Chem.*, **101**: 27-39.
- NAJDEK M., DEGOBBIS D., MIOKOVIC D., IVANCIC I. (2002) - Fatty acid and phytoplankton composition

-
- of different types of mucilaginous aggregates in the northern Adriatic Sea. *J. Plankton Res.*, **24**: 429-441.
- NAJDEK M., BLAZINA, M., DJAKOVAC T., KRAUS R. (2005) - The role of the diatom *Cylindrotheca closterium* in a mucilage event in the northern Adriatic Sea. Coupling with high salinity water intrusions. *J. Plankton Res.*, **27**: 851-862.
- NOBLE R.T., FUHRMAN J.A. (1998) - Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.*, **14**: 113-118.
- PARSONS T.R., MAITA Y., LALLI C.M. (1984) - *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, 173 pp.
- PENNA N., BERLUTI S., PENNA A., RIDOLFI F. (2000) - Study and monitoring of mucilage in the Adriatic Sea. *Water Sci. Technol.*, **42**: 299-304.
- PISTOCCHI R., CANGINI M., TOTTI C., URBANI R., GUERRINI F., ROMAGNOLI T., SIST P., PALAMIDESI S., BONI L., POMPEI M. (2005) - Relevance of the dinoflagellates *Gonyaulax fragilis* in mucilage formation of the Adriatic Sea. *Sci. Total Environ.*, **353**: 307-316.
- PISTOCCHI R., TRIGARI G., SERRAZANETTI G.P., TADDEI P., MONTI G., PALAMIDESI S., GUERRINI F., BOTTURA G., SERRATORE P., FABBRI M., PIRINI M., VENTRELLA V., PAGLIARANI A., BONI L., BORGATTI A.R. (2005b) - Chemical and biochemical parameters of cultured diatoms and bacteria from the Adriatic Sea as possible biomarkers of mucilage production. *Sci. Total Environ.*, **353**: 287-299.
- POMPEI M., MAZZIOTTI C., GUERRINI F., CANGINI M., PIGOZZI S., BENZI M., PALAMIDESI S., BONI L., PISTOCCHI R. (2003) - Correlation between the presence of *Gonyaulax fragilis* (Dinophyceae) and the mucilage phenomena of the Emilia-Romagna coast (northern Adriatic Sea). *Harmful algae*, **2** (4): 301-316.
- PRECALI R., GIANI M., MARINI M., GRILLI F., FERRARI C.R., PECAR O., PASCHINI E. (2005) - Mucilaginous aggregates in the northern Adriatic in the period 1999-2002: Typology and distribution. *Sci. Tot. Environ.* **353**: 10-23.
- RIEBESELL U. (1992) - The formation of large marine snow and its sustained residence in surface waters. *Limnol. Oceanogr.*, **37**: 63-76.
- SARTONI G., SIST P., BERTO D., URBANI R., GIANI M. (2008) - Benthic mucilaginous aggregates in the Mediterranean Sea: origin, chemical composition and polysaccharides characterization. *Mar. Chem.*, **111**:184-198.
- SMITH D.C., AZAM F. (1992) - A simple, economical method for measuring bacterial protein synthesis rates in sea water using ³Hleucine. *Mar. Microb. Food Webs.*, **6** (2): 107-114.
- STACHOWITSCH M, FANUKO N., RICHTER M. (1990) - Mucous aggregates in the Adriatic Sea: an overview of stages and occurrences. *Mar. Ecol. P S Z N J*, **11**: 327-350.
- SUPIC N., ORLIC M., DEGOBBIS D., DJAKOVAC T., KRAJCR V., PRECALI R. (2001-2002) - Occurrence of the Istrian Coastal Countercurrent in 2000, a year with a mucilage event. *Geofizika*, **18-19**: 45-57.
- TOTTI C, CAVOLO F, MARZOCCHI M, SOLAZZI A. (1993) - Phytoplankton populations during dirty sea phenomenon in the northern Adriatic Sea (summer 1989). *Quad. Ist. Ric. Pesca Maritt.*, **5** (2): 99-118.
- TOTTI C., CANGINI M., FERRARI C., KRAUS R., POMPEI M., PUGNETTI A., ROMAGNOLI T., VANUCCI S., SOCAL G. (2005) - Phytoplankton size-distribution and community structure in relation to mucilage occurrence in the northern Adriatic Sea. *Sci. Tot. Environ.*, **353**: 204-217.
- VELJI M.I., ALBRIGHT L.J. (1993) - Improved sample preparation for enumeration of aggregated aquatic substrate bacteria. In: Kemp P.F., Sherr B.F., Sherr E.B., Cole J. (eds), "*Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology*". Lewis Publishers, Boca Raton: 139-142.

CAPITOLO 41. MICROZOOPLANCTON

S. Fonda Umani, G. Franzè, M. Modigh, M. Monti

s.fonda@units.it

41.1. INTRODUZIONE

Il microzooplancton include gli organismi planctonici eterotrofi di dimensioni comprese tra un limite inferiore di 10 μm (secondo Margalef, 1963) o 20 μm (secondo Fenchel, 1987) e uno superiore di 200 μm (Travers, 1972a, 1972b; Fenchel, 1987; Revelante e Gilmartin, 1987), che non sono pertanto trattenuti dalle reti usualmente impiegate per il campionamento dello zooplancton marino. I taxa più comunemente e abbondantemente rappresentati in questa frazione del plancton appartengono ai Protozoi: Ciliati, sia loricati (Tintinnidi) che non loricati, Dinoflagellati eterotrofi, Radiolari, Foraminiferi. Un'altra componente importante del microzooplancton è costituita dalle forme larvali precoci di Metazoi e da alcuni Rotiferi.

Solo negli ultimi 30 anni, da quando è stato documentato il ruolo decisivo del microzooplancton nelle catene trofiche dei sistemi pelagici (Margalef, 1963; Conover, 1982; Revelante e Gilmartin, 1983; Azam *et al.*, 1983), l'attenzione dei ricercatori si è concentrata su problemi di tassonomia, di biologia delle specie e di ecologia di questa biocenosi. In tale contesto sono stati radicalmente innovati i metodi di campionamento quantitativo: ad esempio, è stata generalmente abbandonata la pratica di raccogliere i campioni con reti a maglie di 65-75 μm , troppo larghe per poter trattenere le componenti dimensionalmente più piccole. Un'altra linea di innovazione si è sviluppata con proposte di standardizzazione dei metodi di conservazione e analisi dei materiali raccolti.

In questo capitolo ci occupiamo anche degli Acantari, un importante gruppo di Protozoi planctonici: questi organismi per le loro dimensioni (stimate tenendo conto della lunghezza delle spicole) sono da considerare una componente del mesozooplancton.

41.2. STIMA DELLE ABBONDANZE

41.2.1 Procedura di campionamento

Sono impiegati essenzialmente due diversi metodi di campionamento: pompa e bottiglia (Travers, 1972a, 1972b; Beers, 1978; Stirn, 1981). In alcuni casi, anche in connessione con i due metodi principali, possono essere impiegate reti da plancton a diversa apertura di maglia in rapporto alle dimensioni degli organismi su cui è focalizzato l'interesse del ricercatore.

Con la pompa possono essere prelevati volumi variabili di acqua, pescando a profondità prefissate oppure in continuo sull'intera colonna d'acqua, in modo da ottenere un campione integrato. L'acqua viene raccolta in un recipiente che, se si vuole affrontare lo studio del microzooplancton su subcampioni di classi dimensionali distinte, può essere equipaggiato con un set di reti di apertura di maglia via via decrescente. In generale, sono usate pompe con portata di 2-5 l min^{-1} . Il vantaggio di questo metodo è quello di consentire il prelievo di notevoli volumi d'acqua (da decine a centinaia di dm^3) che per altro, implica tempi di campionamento piuttosto lunghi. Il rischio più serio legato all'uso della pompa è rappresentato dal danneggiamento meccanico a cui possono andare incontro gli organismi di più fragile struttura. L'uso inoltre di retini per separare le diverse frazioni dimensionali comporta una perdita consistente degli organismi più delicati quali i ciliati non loricati.

Le bottiglie per la raccolta di campioni di microzooplancton sono del tipo usato per la raccolta del

fitoplancton, ad esempio Niskin, Van Dorn o NIO, ma hanno capacità maggiore. Per il microzooplancton, la cui abbondanza è mediamente più bassa di almeno due ordini di grandezza rispetto a quella del fitoplancton, è infatti necessario raccogliere volumi d'acqua proporzionalmente maggiori di quelli usati nella raccolta del fitoplancton. Si usano generalmente bottiglie di capacità tra i 2 e 10 l, a seconda dell'abbondanza del popolamento prevista nell'area di studio. In acque portuali e costiere ad elevato trofismo, sarà sufficiente prelevare campioni di 0,5 l, mentre in aree oligotrofiche o in periodi stagionali prevedibilmente caratterizzati da modeste abbondanze del popolamento, sarà necessario prelevare campioni di 2 - 5 l fino a 20 - 30 l: i campioni possono essere raccolti con l'utilizzo del campionatore multiplo "rosette". Se si vogliono avere informazioni dettagliate sulla distribuzione del microzooplancton lungo la colonna d'acqua, si provvederà, anche con il metodo della bottiglia, a prelevare campioni a diverse profondità: in superficie, in prossimità del fondo e a profondità intermedie, in particolare in corrispondenza degli strati di più marcata discontinuità dei gradienti termoclinici.

Per alcuni taxa i prelievi possono essere eseguiti con rete, seguendo le indicazioni generali illustrate nel capitolo "Campionamento dello zooplancton". La scelta del tipo di rete dipende dalla taglia del gruppo di organismi che si vogliono raccogliere. Per la raccolta di ciliati loricati (Tintinnidi) è necessario una rete con vuoto di maglia piccola, 20 o 40 μm , mentre per gli Acantari, organismi che hanno dimensioni (spicole comprese) tra gli 0,3 e 1,5 mm, si consiglia di usare reti con vuoto di maglia di 165 μm .

41.2.2 Conservazione dei campioni

Per preservare il campione di microzooplancton si può utilizzare formalina concentrata al 38-40% di formaldeide opportunamente diluita nella misura di una parte di formalina aggiunta a nove parti dell'acqua di mare contenente il campione, in modo da avere una concentrazione finale di formaldeide di circa il 4%. Il pH della formalina deve essere preventivamente portato a circa 8,2 con l'aggiunta di tetraborato di sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$). Alcuni autori utilizzano la conservazione in Lugol (in genere al 2%) che può essere però problematica in aree eutrofiche in quando questo conservante tende a colorare oltre al microzooplancton anche il detrito organico. Revelante e Gilmartin (1983) suggeriscono di impiegare come fissativo una variante della soluzione di Lugol (Lovegrove, 1960), ovvero una soluzione all'1% dell'acido di Rodhe, ($\text{I}_2 = 5 \text{ g}$, $\text{KI} = 20 \text{ g}$ in soluzione di acido acetico (10 ml in 1 l) (Rodhe *et al.*, 1958) questo metodo assicura una conservazione decisamente migliore dei Ciliati non loricati. In generale, tuttavia, si osserva che nessuno dei fissativi finora sperimentati è in grado di conservare perfettamente e indefinitamente tutti gli organismi del microzooplancton. Si consiglia pertanto di analizzare i campioni il più presto possibile, generalmente entro due-tre mesi dalla raccolta.

41.2.3 Concentrazione e conteggio

Il microzooplancton convenzionalmente comprende organismi di dimensioni superiori a 10-20 μm . Va ricordato però che in microscopia ottica rovesciata è possibile riconoscere, con un buon grado di approssimazione, organismi non più piccoli di 10 μm . Si suggerisce pertanto di non considerare nei conteggi effettuati al microscopio rovesciato gli organismi di dimensioni inferiori ai 10 μm , che è invece opportuno conteggiare usando un microscopio ad epifluorescenza, metodo che permette di distinguere gli organismi autotrofi dagli eterotrofi ma non di identificare le diverse specie.

Gli organismi presenti in un campione possono essere concentrati mediante filtrazione o sedimentazione. Nel caso di grandi volumi d'acqua si ricorre alla filtrazione su rete con vuoto di maglia di 10 μm , avendo cura di risciacquare accuratamente e ripetutamente la rete con la stessa acqua filtrata e portando il campione ad un volume finale attorno ai 200 ml.

La concentrazione di un campione di grande volume può rendersi necessario qualora l'abbondanza degli organismi sia scarsa oppure qualora vi sia una grande quantità di particolato. La filtrazione del

campione su un retino a maglia fitta presenta il vantaggio di eliminare gran parte del particellato più fine, facilitando la successiva identificazione al microscopio dei campioni. La presenza di abbondante particellato può infatti rendere indistinguibili, nei conteggi al microscopio, molte forme di Ciliati di taglia più piccola e può portare quindi a una significativa sottostima della loro abbondanza. Inoltre, la fissazione di un campione concentrato immediatamente dopo la filtrazione, permette di ridurre la quantità di fissativo utilizzato. Tuttavia, questo metodo inevitabilmente comporta la perdita di tutta la frazione di organismi di dimensioni inferiori o all'incirca uguali a quelle del vuoto di maglia della rete utilizzata per la filtrazione e, ancor più importante, il passaggio attraverso il retino comporta il danneggiamento e la perdita di organismi delicati quali i ciliati non loricati.

Con i metodi di sedimentazione il fissativo si aggiunge all'intero campione prima di procedere alla concentrazione. Secondo Revelante e Gilmartin (1983) si può procedere in tre fasi: un campione di 5 l in un cilindro graduato alto 30 cm si riduce a 1 l dopo 72 ore di sedimentazione; altre 72 ore in cilindro graduato alto 35 cm servono per concentrare ulteriormente il campione da 1 l a 100 ml; segue un terzo periodo di sedimentazione, ancora di 72 ore, in cilindro graduato alto 25 cm, per concentrare il campione da 100 a 10 ml. Per evitare le complicazioni ed i tempi relativamente lunghi richiesti dai diversi passaggi previsti dal metodo di Revelante e Gilmartin, la sedimentazione può essere effettuata direttamente nei contenitori (cilindrici) di raccolta riducendo, ad esempio, un volume iniziale di 2 l a 200 ml, dopo un tempo che va programmato tenendo conto che la velocità di sedimentazione delle particelle sospese di più piccole dimensioni è di circa 1 cm ogni 3 ore. In ogni caso, alla fine del tempo di sedimentazione prefissato, il surnatante viene prelevato dolcemente mediante un capillare ad ansa collegato ad un tubicino in lattice, preferibilmente a caduta libera, senza far ricorso a pompe a vuoto.

I campioni, dopo essere stati concentrati, vanno conservati in bottiglie di vetro scuro con tappo ermetico a vite e riempite completamente in modo da evitare la contaminazione da batteri.

Il conteggio del microzooplancton si esegue generalmente su un subcampione che si estrae dal campione originale concentrato dopo averlo delicatamente agitato per almeno un minuto. Il volume del subcampione varia, in dipendenza dei valori attesi di abbondanza delle forme planctoniche, da 10, 25, 50 e 100 ml: questi sono i volumi standard dei cilindri, che si dispongono sulla camera di sedimentazione utilizzata per i conteggi con il metodo di Utermöhl (1958). Il conteggio si esegue su tutta l'area della camera al microscopio ad ottiche rovesciate a contrasto di fase a 200 ingrandimenti (per una più diffusa trattazione delle operazioni di conteggio con il metodo di Utermöhl si rimanda al capitolo "Fitoplancton").

Un subcampione si può ritenere rappresentativo se il conteggio raggiunge abbondanze di almeno 100 individui per ciascuno dei taxa dominanti. In caso contrario, si dovrà procedere al conteggio di altri subcampioni o dell'intero campione.

Si accenna ad un altro metodo di subcampionamento, che è spesso adottato per il mesozooplancton: previa omogeneizzazione, dal campione originale portato a volume noto viene estratto, con pipetta di Stempel da 1 ml, un subcampione da conteggiare al microscopio rovesciato. L'operazione deve essere ripetuta più volte fino ad ottenere un numero di individui conteggiati che sia statisticamente rappresentativo del campione originale (i.e. almeno 100 individui). In rapporto all'abbondanza della taxocenosi può variare il numero di repliche dei conteggi su pipettate di 1 ml.

41.3 DETERMINAZIONE DELLA BIOMASSA IN TERMINI DI CARBONIO

Per la determinazione della biomassa, generalmente espressa in $\mu\text{gC l}^{-1}$, è necessario determinare il biovolume di un certo numero di individui di ciascun gruppo tassonomico. Il biovolume medio per ciascun gruppo viene moltiplicato per un fattore di conversione, (generalmente espresso in $\text{pgC}\mu\text{m}^{-3}$) moltiplicato per il numero di individui conteggiati per litro. Per calcolare il biovolume si misurano due o più dimensioni lineari, con l'aiuto di un micrometro inserito nell'oculare, di un numero sufficiente di cellule o individui appartenenti a ciascuna delle categorie del microzooplancton. Il biovolume viene quindi

calcolato assumendo forme geometriche semplici (cilindro, cono tronco, etc). Per il calcolo della biomassa in termini di carbonio ci sono fattori di conversione riportati in letteratura. Per i ciliati $0,14 \text{ pg } \mu\text{m}^{-3}$ o $0,19 \text{ pg } \mu\text{m}^{-3}$ per campioni fissati in formalina o in Lugol, rispettivamente (Putt e Stoecker, 1989), $0,14 \text{ pg } \mu\text{m}^{-3}$ per i dinoflagellati (Lessard, 1991). Per quanto riguarda i tintinnidi, la biomassa può essere calcolata o dal volume della lorica, utilizzando l'equazione presentata da Verity e Langdon (1984), oppure misurando la cellula contenuta all'interno della lorica. Quest'ultimo metodo è tuttavia possibile soltanto in caso di loriche ialine trasparenti mentre, per le loriche agglutinate, è sempre necessario utilizzare il metodo di Verity e Langdon. Infine una considerazione sulle loriche vuote: la presenza o meno di una cellula all'interno della lorica è facilmente visibile nel caso di loriche ialine o comunque trasparenti; ma se la lorica è agglutinata e quindi opaca, tale distinzione diventa problematica. In quest'ultimo caso si consiglia di conteggiare come individui tutte le loriche, mettendo in conto la probabilità di ottenere, in tal modo, una sovrastima delle abbondanze. Inoltre, è nota la tendenza dei tintinnidi di abbandonare la lorica se esposti a stress di varia natura. Contando esclusivamente le loriche con una cellula al loro interno si avrà una notevole sottostima del popolamento a tintinnidi. Sarebbe quindi consigliabile contare tutte le loriche, sia piene che vuote; qualora si utilizzino metodi che favoriscono la fuga degli animali dalle loriche quali, ad esempio, la concentrazione su retino del campione o l'aggiunta del fissativo nella bottiglia già contenente il campione. Per il calcolo della biomassa degli altri gruppi del microzooplancton si rimanda a Gifford e Caron (2000).

41.4 ANALISI SISTEMATICA

La classificazione dei Tintinnidi si basa abitualmente sulle caratteristiche morfologiche della lorica; i testi classici per la determinazione dei tintinnidi sono quelli di Kofoid e Campbell (1929, 1939). Gli autori hanno tuttavia descritto un gran numero di specie nuove basandosi in molti casi su piccole variazioni nella forma e nelle dimensioni della lorica. Studi successivi hanno evidenziato un notevole polimorfismo della lorica con un'ampia variabilità nelle dimensioni e in alcune strutture della lorica, quali ad esempio presenza/assenza di anelli orali o di una coda, numero ed estensione di striature superficiali (Boltovskoy *et al.*, 1990; 1995; Davis 1978; 1981; 1985; Dolan *et al.*, 2006; Gold e Morales 1976c; Hedin 1974; Laval-Peuto 1981; Monti e Fonda Umani, 1995; Wasik, 1998; Williams *et al.*, 1994). Un primo tentativo di raggruppare queste varietà all'interno di un numero di specie meno esteso era stato fatto, per il Mediterraneo, da Balech (1959). Secondo Laval-Peuto e Brownlee (1986) è opportuno ricorrere a criteri tassonomici basati, oltre che sulla morfologia della lorica, anche su dati di tipo ecologico, fisiologico, biochimico, ecc. ed è inoltre auspicabile approfondire gli studi citologici anche per chiarire i rapporti filogenetici tra i diversi taxa di Tintinnidi e tra questi e gli altri Ciliati. Si stanno affermando orientamenti più moderni nella tassonomia dei Tintinnidi, che puntano all'analisi di particolari strutture della cellula e che prevedibilmente imporranno una radicale revisione dei criteri tradizionali di classificazione. Sempre secondo Laval-Peuto e Brownlee (1986) alcuni caratteri della lorica sono più conservativi e rappresentano per questo, un migliore criterio per la determinazione tassonomica dei tintinnidi. Tali caratteristiche sono la forma generale della lorica e la struttura della stessa (ialina o agglutinata, presenza di striature e creste, fenestrate, forma e dimensioni delle fenestre) e il diametro orale.

L'identificazione dei Ciliati non Tintinnidi è basata essenzialmente su caratteristiche morfologiche della cellula: forma e dimensioni, struttura e distribuzione delle cilia, peculiarità dell'area citostomale. Tali strutture possono venire seriamente danneggiate dalla fissazione al punto che si consiglia di eseguire la determinazione sistematica su materiale vivo (Corliss, 1979).

Per un'analisi tassonomica più accurata dei Ciliati, così come di altri gruppi del microzooplancton, si fa sempre più diffusamente ricorso alle tecniche della microscopia elettronica.

I dinoflagellati eterotrofi costituiscono un gruppo importante del microzooplancton. I dinoflagellati possono essere autotrofi, mixotrofi o eterotrofi. Per distinguere le diverse forme trofiche si ricorre all'osservazione in epifluorescenza sfruttando la fluorescenza naturale della clorofilla. Ciò permette di di-

stinguere gli autotrofi e i mixotrofi dagli eterotrofi. Per conservare la fluorescenza del campione naturale è necessario l'impiego di fissativi non coloranti, in genere si usa formalina o glutaraldeide. Il campione deve essere conservato al freddo (4°C) e al buio e analizzato in tempi brevi, al massimo entro un mese, per evitare la perdita della fluorescenza della clorofilla. I dinoflagellati tecati possono essere generalmente determinati fino al livello di famiglia o di genere. Per un'identificazione a livello di specie è necessario ricorrere a tecniche specifiche, come il metodo del Calcofluor (Fritz e Triemer, 1985), che evidenzino la disposizione delle diverse placche. Un primo approccio per l'assegnazione dei generi più comuni alle diverse forme trofiche è dato da Lessard e Swift (1986).

Il riconoscimento a livello di specie delle larve di Metazoi è uno degli scogli più ardui e raramente è possibile scendere a livelli tassonomici quali genere o specie.

41.5 BIBLIOGRAFIA

- AZAM F., T. FENCHEL, J.G. FIELD, J.S. GRAY, L.A. MEYER-REIL, THINGSTAD F. (1983) - The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **10**: 257-263.
- BALECH E. (1959) - Tintinnoinea del Mediterraneo. *Trab. Inst. Espan. Ocean.* **28**: 1-88.
- BEERS J.R. (1978) - About microzooplankton. In: Sournia A. (ed), *Phytoplankton Manual, UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology*: 288-296.
- CONOVER R.J. (1982) - Interrelations between microzooplankton and other plankton organisms. *Ann. I. Oceanogr., Paris*, **58** (suppl.): 31-46.
- CORLISS J.O. (1979) - *The Ciliated Protozoa*. Pergamon Press, London, 455 pp..
- FENCHEL T. (1987) - Protozoan communities: marine habitats. In: "Ecology of Protozoa, the Biology of Free-living Phagotrophic Protists", *Science Pech, Madison-Wisconsin*: 102-133.
- FRITZ L., TRIEMER R.E. (1985) - A rapid and simple technique utilizing calcofluor white MR2 for visualization of dinoflagellate technology. *J. Phycol.*, **21**: 662-664.
- GIFFORD D.J., CARON D.A. (2000) - Sampling, preservation, enumeration and biomass of marine protozooplankton In: Harris R.P., J. Lenz, P.H. Wiebe (eds): *ICES Zooplankton Methodology Manual*, Academic Press: 193-221.
- KOFOID C.A., CAMPBELL A.S. (1929) - A conspectus of the marine and freshwater Ciliata belonging to the suborder Tintinnoinea, with descriptions of new species principally from the Agassiz Expedition to the Eastern Tropical Pacific, 1904-1905. *Univ. Calif. Pubis Zool.*, **34**: 1-403.
- LESSARD E.J. (1991) - The trophic role of heterotrophic dinoflagellates in diverse marine environments. *Mar. Microb. Food Webs*, **5**: 49-58.
- LESSARD E.J., SWIFT E. (1986) - Dinoflagellates from the North Atlantic classified as phototrophic or heterotrophic by epifluorescence microscopy. *J. Plankton Res.*, **8**: 1209-1215.
- LOVEGROVE T. (1960) - An improved form of sedimentation apparatus for use with an inverted microscope. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer*, **25**: 279-284.
- MARGALEF R. (1963) - Role des ciliés dans le cycle de la vie pelagique en *Mediterranee*. *Rapp. P.-v. Commn int. Explor. scient. Mer Mediterr.*, **17**: 511-512.
- PUTT M., STOECCKER D.K. (1989) - An experimentally determined carbon: volume ratio for marine "oligotrichous" ciliates from estuarine and coastal waters. *Limnol. Oceanogr.*, **34**: 1097-1103.
- REVELANTE N., GILMARTIN M. (1983) - Microzooplankton distribution in the Northern Adriatic Sea with emphasis on the relative abundance of ciliated protozoans. *Oceanol. Acta*, **6**: 407-415.
- REVELANTE N., GILMARTIN M. (1987) - Seasonal cycle of the ciliated protozoan and micrometazoan biomass in a Gulf of Maine estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, **25**: 581-598.
- RODHE W., VOLLENWEIDER R.A., NAUWERCK A. (1958) - The primary production and standing crop of phytoplankton. In: Buzzati-Traverso A. (ed) *Perspectives in Marine Biology*, Univ. Calif. Press., Berkley, Los Angeles: 299-322.
- STIRN J. (1981) - Manual of methods in aquatic environment research. Part 8 - Ecological assessment of pollution effects. *FAO Fisheries Technical Paper*, **209**: 1-70.

-
- TRAVERS M. (1972a) - Le microplancton du Golfe de Marseille: materiel et methodes generales d'étude. *Tethys*, **4**: 313-338.
- TRAVERS M. (1972b) - Le microplancton du Golfe de Marseille: méthodes d'étude microscopique des organismes. *Tethys*, **4**: 535-558.
- UTERMÖHL H. (1958) - Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton Methodik. *Mitt. int. Verein theor. angew. Limnol.*, **9**: 1-38.
- VERITY P.G., LANGDON C. J. (1984) - Relationship between lorica volume, carbon and nitrogen and ATP content of tintinnids in Narragansett Bay. *J. Plankton Res.* **6**: 859-868.

LETTERATURA SISTEMATICA

Viene presentata una bibliografia essenziale riguardante per lo più testi di base e lavori fondamentali di sistematica generale dei principali gruppi di Protozoi planctonici: Tintinnidi ed altri Ciliati, Acantari, Radiolari e Foraminiferi; per i Dinoflagellati eterotrofi si rimanda alla bibliografia in appendice al capitolo "Fitoplancton".

TINTINNIDI

- BAKKER C., PHAFF W.J. (1976) - Tintinnida from coastal waters of the S.W. Netherlands I. The genus *Tintinnopsis* Stein. *Hydrobiologia*, **50**: 101-111.
- BALECH E. (1944) - Contribucion al conocimiento del Plancton de Lennox y Cabo de Hornos. *Physis, B. Aires*, **12**: 423-446.
- BALECH E. (1959) - Tintinninea del Mediterraneo. *Trab. Inst. esp. Oceanogr.*, **28**: 1-88.
- BALECH E. (1968) - Algunas especies nuevas o interesantes de Tintinnidos del Golfo de Mexico y Caribe. *Revta Mus. argent. Cienc. nat. Bernardino Rivada via, (Hidrobiol.)*, **2**: 163-197.
- BALECH E. (1972) - Los tintinnidos indicadores de afloramientos de aguas (Ciliata). *Physis, B. Aires*, **31**: 519-528.
- BALECH E. (1973) - Segunda contribucion al conocimiento del microplancton del mar de Bellingshausen. *Contrnes Inst. antarct. argent.*, **107**: 4-63.
- BALECH E. (1975) - La familia Undellidae (Protozoa, Ciliophora, Tintinnina). *Physis, B. Aires*, (secc. A), **34**: 377-398.
- BALECH E., SOUTO S. (1980) - Los Tintinnidos de la campana oceanografica "Productividad IV". Parte I. *Physis, B. Aires*, (secc. A), **39**: 1-8.
- BALECH E., SOUTO S. (1981) - Los Tintinnidos de la campana oceanografica "Productividad IV". Parte II. *Physis, B. Aires*, (secc. A), **39**: 41-49.
- BERNATZKY G., FOISSNER W., SCHUBERT G. (1981) - Rasterelektronen - mikroskopische and biometrische Untersuchungen fiber die Variabilitat der Form, Struktur and Grosse des Gehauses einiger limnischer Tintinnina (Protozoa, Ciliophora). *Zoologica Scripta*, **10**: 81-90.
- BOLTOVSKOY D., DINOFRIO O., ADLER V.A. (1990) - Intraspecific variability in Antarctic tintinnids: the *Cy-matocylis affinis/convollaria* species group. *J. Plankton Res.*, **12**: 403-413.
- BOLTOVSKOY D., VIVEQUIN S.M., SWANBERG N.R. (1991) - Vertical distribution on tintinnids and associated microplankton in the upper layer of the Barents Sea. *Sarsia*, **76**: 141-151.
- BOLTOVSKOY D., VIVEQUIN S.M., SWANBERG N.R. (1995) - Tintinnids and Other Microplankton from the Greenland Sea: Abundance and Distribution in the Marginal Ice Zone (May-June 1989). *Marine Ecology P.S.Z.N. I*, **16**(2): 117-131.
- BOLTOVSKOY D. (1999) - *South Atlantic Zooplankton Leiden, Netherlands*: Backhuys Publishers: 1705 pp.
- BRANDT K. (1906) - Die Tintinnodeen der Plankton-Expedition. Tafelerklarungen nebst kurzer Diagnose der neuen Arten. *Ergebn. Adapt Ozean Planktonexped Humboldt-Stift.*, **3**: 1-33.
- BRANDT K. (1907) - Die Tintinnodeen der Plankton-Expedition. Systematischer Teil. *Ergebn. Atlant. Ozean Planktonexped. Humboldt-Stift.*, **3**: 1-488.
- CAPRIULO G.M., GOLD K., OKUBO A. (1982) - Evolution of the lorica in Tintinnids: a possible selective advantage. *Ann. I. océanogr., Paris*, **58** (suppl.): 319-324.
- CORDEIRO T.A., SASSI R. (1997) - Tintinnina (Ciliophora, Protista) of the North Sea during the spring of 1986. *Helgoländer Meeresun.*, **51**: 155-172.
- DAVIS C.C. (1978) - Variations of the lorica in the genus *Parafavella* (Protozoa: Tintinnida) in northern Norway waters. *Can. J. Zool.*, **56**: 1822-1827.

-
- DAVIS C.C. (1981) - Variations of lorica shape in the genus *Ptychocylis* (Protozoa: Tintinnina) in relation to species identification. *J. Plankton Res.*, **3**: 433-443.
- DAVIS C.C. (1985) - *Acanthostomella norvegica* (Daday) in Insular Newfoundland Waters, Canada (Protozoa: Tintinnina). *Int. Revue. ges. Hydrobiol.*, **70**: 21-26.
- DOLAN J.R. (2000) - Tintinnid ciliate diversity in the Mediterranean Sea: longitudinal patterns related to water column structure in late spring-early summer. *Aquat. Microb. Ecol.*, **22**: 69-78.
- DOLAN J.R., CLAUSTRE H., CARLOTTI F., PLOUNEVES S., MOUTIN T. (2002) - Microzooplankton diversity: relationships of tintinnids ciliates with resources, competitors and predators from the Atlantic Coast of Morocco to the Eastern Mediterranean. *Deep-Sea Res.*, **49**: 1217-1232.
- DOLAN J.R., JACQUET S., TORRETON J.P. (2006) - Comparing taxonomic and morphological biodiversity of tintinnids (planktonic ciliates) of New Caledonia. *Limnol. Oceanogr.*, **51**: 950-958.
- GOLD K, MORALES E.A. (1975) - Seasonal changes in lorica sizes and the species of Tintinnida in the New York Bight. *J. Protozool.*, **22**: 520-528.
- GOLD K, MORALES E.A. (1976a) - Observations on the nature and significance of the particles used by Tintinnida during lorica-building. *T. Am. Microsc. Soc.*, **95**: 69-72.
- GOLD K., MORALES E.A. (1976b) - Studies on Tintinnida using scanning electron microscopy. *T. Am. Microsc. Soc.*, **95**: 707-711.
- GOLD K., MORALES E.A. (1976c) - Studies on the sizes, shapes, and the development of the lorica of agglutinated Tintinnida. *Biol. Bull.*, **150**: 377-392.
- GOLD K., MORALES E.A. (1977) - Studies on the Tintinnida of Enewetak Atoll. *J. Protozool.*, **24**: 580-587.
- GRAVILOVA N., DOLAN J. (2007) - A Note on Species Lists and Ecosystem Shifts: Black Sea Tintinnids, Ciliates of Microplankton. *Acta Protozool.*, **46**: 279-288.
- HEDIN H. (1974) - Tintinnids on the Swedish West Coast. *ZOON*, **2**: 123-133.
- HEDIN H. (1975) - On the ultrastructure of *Favella ehrenbergii* (Claparède & Lachmann) and *Parafavella gigantea* (Brandt), Protozoa, Ciliata, Tintinnida. *ZOON*, **3**: 11-18.
- JORGENSEN E. (1924) - Mediterranean Tintinnidae. *Rep. Dan. oceanogr. Exped. Mediterr.*, **2**(J3): 1-110.
- KOFOID C.A., CAMPBELL A.S. (1929) - A conspectus of the marine and freshwater Ciliata belonging to the suborder Tintinninoinea, with descriptions of new species principally from the Agassiz Expedition to the Eastern Tropical Pacific, 1904-1905. *Univ. Calif Pubis Zool.*, **34**: 1-403.
- KOFOID C.A., CAMPBELL A.S. (1939) - Reports on the scientific results of the expedition to the Eastern Tropical Pacific. The Ciliata: The Tintinninoinea. *Bull. Mus. comp. Zool. Harv.*, **84**: 1-473.
- KRSINIC F. (1979) - The Tintinnids (Ciliata) from the coastal waters of the Southern Adriatic in the year 1975/76. *Nova Thalassia*, **3** (suppl.): 199-211.
- KRSINIC F. (1980) - Qualitative and quantitative investigations of the Tintinnids along the Eastern Coast of the Adriatic. *Acta Adriat.*, **21**: 19-104.
- KRSINIC F. (1988) - The family *Xystonellidae* (Ciliophora, Tintinnina) in the Adriatic Sea. *J. Plankton Res.*, **10**: 413-429.
- LAACKMANN H. (1913) - Adriatische Tintinnodeen. *Sber. Akad. Wiss. Wwn, Kl. math. - natunv.*, **122**: 1-45.
- LAVAL-PEUTO M. (1981) - Construction of the lorica in Ciliata Tintinnina. *In vivo* study of *Favella ehrenbergii*: variability of the phenotypes during the cycle, biology, statistics, biometry. *Protistologica*, **17**: 249-272.
- LAVAL-PEUTO M., BROWNLEE D.C. (1986) - Identification and systematics of the Tintinnina (Ciliophora): evaluation and suggestions for improvement. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, **62**: 69-84.
- LEE J.J., LEEDALE G.F., BRADBURY P. (2000) - *The Illustrated Guide to the Protozoa*. Allen Press Inc., Lawrence, 1425 pp.
- LING H-Y. (1965) The tintinnid *Parafavella gigantea* (Brandt), Kofoid and Campbell, 1929, in the North Pacific Ocean. *J. Paleontol.*, **39**: (4) 721-723.
- LOEBLICH A.R.jr., TAPPAN H. (1968) - Annotated index to Genera, Subgenera and Suprageneric Taxa of the Ciliate order Tintinnida. *J. Protozool.*, **15**: 185-192.
- MONTI M., FONDA UMANI S. (1995) - Tintinnids in Terranova Bay - Ross Sea During Two Austral Summers (1987/88 and 1989/90). *Acta Protozool.*, **34**: 193-201.
- ORSI A. (1936) - Tintinnidi del Golfo di Genova. *Boll. Mus. Lab. Zool. Anat. Comp. Univ. Genova*, **16**: 1-18.
- PETZ W. (2005) - Ciliates. In: Scott F.J., Marchant H.J. (eds.), *Antarctic Marine Protists*. ABRS Canberra and AAD Hobart, Goanna Print, Canberra: 347-448.
-

- RAMPI L. (1948) - I Tintinnoidi delle acque di San Remo. II. Osservazioni e conclusioni. *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.*, **3** (n.s.): 50-56.
- RAMPI L. (1950) - I Tintinnoidi delle acque di Monaco raccolti dall' Eider nell'anno 1913. *Bull. Inst. océanogr. Monaco*, **965**: 1-7.
- RAMPI L., ZATTERA A. (1982) - Chiave per la determinazione dei Tintinnidi mediterranei. *ENEA- RT/BIO(82)*, **28**: 1-104.
- SILVA E.S. (1950) - Les Tintinnides de la baie de Cascais (Portugal). *Bull. Inst. océanogr. Monaco*, **979**: 1-28.
- TANIGUCHI A., HADA Y. (1981) - *Eutintinnus haslae* n. sp., a new Ciliated Protozoa from the Tropical Pacific and Indian Oceans. *La Mer*, **19**: 18-22.
- TEODORO G. (1922a) - Tintinnidi del Plancton della Laguna Veneta. *Atti Accad. scient. veneto-trent.-istriana*, **12-13**: 16-21.
- TEODORO G. (1922b) - Ulteriore contributo alla conoscenza dei Tintinnidi planctonici della laguna veneta. *Atti Accad. Sc. ven.-trent.-istr.*, **12-13**: 106-109.
- THOMPSON G.A., ALDER V.A., BOLTOVSKOY D., BRANDINI F. (1999) - Abundance and biogeography of tintinnids (Ciliophora) and associated microzooplankton in the Southwestern Atlantic Ocean. *J Plankton Res.*, **21**: 1265-1298.
- TRAVERS M. (1975) - Inventaire des Protistes du Golfe de Marseille et de ses parages. *Ann. I. océanogr., Paris*, **51**: 51-75.
- TRAVERS A., TRAVERS M. (1970-1971) - Catalogue des Tintinnides (Cilies Oligotriches) récoltés dans le Golfe de Marseille de 1962 a 1964. *Tethys*, **2**: 639-646.
- TRAVERS A., TRAVERS M. (1973) - Présence en Méditerranée du genre *Salpingacantha* Kofoid et Campbell (Cilies Oligotriches, Tintinnides). *Rapp. Comm. int. Explor. scient. Mer Mediterr.*, **21**: 429-432.
- TRAVERS A., TRAVERS M. (1975) - Catalogue du Microplancton du Golfe de Marseille. *Int. Revue ges. Hydrobiol.*, **60**: 251- 276.
- TREGOUBOFF G., ROSE M. (1957) - *Manuel de Planctonologie Méditerranéenne*. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris, Vol. I, pp. 587; Vol. II, tav. I-CCVII.
- VERITY P.G. (1987) - Abundance, community composition, size distribution, and production rates of tintinnids in Narragansett Bay, Rhode Island. *Est. Coast. Shelf Sci.*, **24**: 671-690.
- VITIELLO P. (1964) - Contribution a l'étude des Tintinnides de la baie d'Alger. *Pelagos*, **2**: 5-42.
- WASIK A. (1998) - Antarctic tintinnids: Their ecology, morphology, ultrastructure and polymorphism. *Acta Protozool.*, **37**: 5-15.
- WILLIAMS R., McCALL H., PIERCE R.W., TURNER J.T. (1994) - Speciation of the tintinnid genus *Cymatocylis* by morphometric analysis of the loricae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **107**: 263-272.

CILIATI DIVERSI DAI TINTINNIDI

- CORLISS J.O. (1979) - *The Ciliated Protozoa*. Pergamon Press, London, 455 pp.
- DALE T., DAHL E. (1987) - Rodt vann ved Tvedestrand - masseforekomst av flimmerdyret *Tiarina fusus*. *Fauna*, **40**: 98-103.
- HAMBURGER C., BUDDENBROCK V. (1911) - Nordische Ciliata mit Ausschluss der Tintinnoidea. In: *Nordisches Plankton, Zoologischer Teil, VII Protozoa*, Neudruck A. Asher & Co., Amsterdam 1964: 1-152.
- HAMBURGER C., BUDDENBROCK V. (1913) - Nordische Suctoria. In: *Nordisches Plankton, Zoologischer Teil, VII Protozoa*, Neudruck A. Asher & Co., Amsterdam 1964: 153-193.
- HEMBERGER H. (1985) - Neue Gattungen and Arten hypotricher Ciliaten. *Arch. Protistenk.*, **130**: 397-417.
- HEMBERGER H., WILBERT N. (1982) - Revision der Familie Keronidae Dujardin, 1840 (Ciliophora, Hypotrichida) mit einer Beschreibung der Morphogenese von *Kerona polyporum* Ehrenberg, 1835. *Arch. Protistenk.*, **125**: 261-270.
- KIESSELBACH A. (1936) - Zur Ciliatenfauna der nördlichen Adria. *Thalassia*, **2**: 153.
- KRSINIC F. (1979) - Cruises of the Research Vessel "Vila Velebita" in the Kvarner region of the Adriatic Sea. XI. Microzooplankton. *Thalassia Jugosl.*, **15**: 179-192.
- LAVAL-PEUTO M. (1982) - Methods of taxonomy and selection of criteria for determination of marine planktonic Protozoa. *Ann. I. océanogr., Paris*, **58** (suppl.): 151-168.
- LEE J.J., LEEDALE G.F., P. BRADBURY P. (2000) - *The Illustrated Guide to the Protozoa*. Allen Press Inc., Lawrence, 1425 pp

-
- MEUNIER A. (1910) *Microplancton des Mers de Barents et de Kara*. Bulens C. Ed., Bruxelles, pp. 355, tav.I-XXXVII.
- PETZ W. (2005) - Ciliates. In: Scott F.J., Marchant H.J. (eds.), *Antarctic Marine Protists*. ABRS Canberra and AAD Hobart, Goanna Print, Canberra: 347-448.
- RICCI N., SANTANGELO G., LUPORINI P. (1982) - Researches on the coast of Somalia. Sand-dwelling ciliates. *Monitore Zool. Ital.*, **17** (N.S.suppl.): 115-148.
- SONG W., WILBERT N. (1988) - *Parabakuella typica* nov. gen., nov. spec. (Ciliata, Hypotrichida) aus dem Edaphon eines Standortes in Qingdao, China. *Arch. Protistenk.*, **135**: 319-325.
- WILBERT N. (1986) - Beitrag zur Morphologie and Okologie einiger planktischer Ciliaten aus dem Poppelsdorfer Weiher in Bonn (BDR). *Arch. Protistenk.*, **131**: 59-69.

FORAMINIFERI

- BÈ A.W.H. (1969a) - Microstructural evidence of the close affinity of *Globigerinella cushman* to *Mastigerina thomson*. *Proceedings of Planktonic Microfossils*, Genova 1967, **1**: 89-91.
- BÈ A.W.H. (1969b) - Planktonic Foraminifera. Distribution of marine of selected groups of marine invertebrates in waters south of 35°. *Antarct. Map Folio Ser., American Geographical Society*, **11**: 9-12.
- BOLTOVSKOY D. (1999) - *South Atlantic Zooplankton*. Leiden, Netherlands: Backhuys Publishers: 1705 pp.
- BRADY H.B. (1878) - On the Reticularien and Radiolarien Rhizopoda (Foraminifera and Polycystina) of the North-Polar Expedition of 1875-1876. *Ann. Nat. Hist.*, **1**: 425-440.
- CIFELLI R. (1961) - *Globigerina incomplete*, a new species of pelagic Foraminifera from the North Atlantic. *Contr. Cushman Lab. foramin. Res.*, **12**: 83-86.
- CIFELLI R. (1973) - Observations on *Globigerina pachyderma* (Ehrenberg) and *Globigerina incopta* Cifelli from the North Atlantic. *J. Foraminif. Res.*, **3**: 157-166.
- CORLISS J.O. (1967) - Systematics of the phylum Protozoa. In: Florking H., Scheer B. (eds) *Chemical Zoology, I: Protozoa*, Acad. Press, Ney York: 1-20.
- HAYNES J.R. (1981) - *Foraminifera*. John Wiley & Sons, New York, 433 pp.
- LEE J.J., McENERY M.E., RUBIN H. (1969) - Quantitative studies on the growth of *Allogromia laticollaris* (Foraminifera). *J. Protozool.*, **16**: 377-395.
- LEE J.J., LEEDALE G.F., BRADBURY P. (2000) - *The Illustrated Guide to the Protozoa*. Allen Press Inc., Lawrence: 1425 pp.
- LOBLICH A.J., TAPPAN H. (1988) - *Foraminiferal Genera and their Classification*. Van Nostrand Reinhold, New York, Vol. 1, 970 p., Vol. 2, 212 p. and 847 plates.
- MURRAY J.W. (1971) - *An Atlas of British Recent Foraminiferids*. Heinemann educational books Ed., London, 244 pp..
- RHUMBLER L. (1901) - Nordische Plankton-Foraminiferen. In: *Nordisches Plankton, Zoologischer Ted, VII Protozoa*, Neudruck A. Asher & Co., Amsterdam 1964: 1-32.
- RHUMBLER L. (1911) - Die Foraminiferen (Thalamophoren) der PlanktonExpedition. *Ergebn. Atlant. Ozean Planktonexped. Humboldt-Stift.*, **3**: 1-332.
- WIESNER H. (1911) - Notizen uber die Fauna der Adria bei Rovigno. VIII. Schalentragende Foraminiferen von der Westkuste Istriens. *Zool. Anz.*, **38**: 505-510.

RADIOLARI

- ANDERSON O. R. (1983) - *Radiolaria*. Springer-Verlag, New York, 355. pp.
- BERTOLINI F. (1937) - Sulla classificazione dei Radiolari. *CR. Int. Congr. Zool.*, Lisbonne: 1265-1272.
- BOLTOVSKOY D. (1999) - *South Atlantic Zooplankton*. Leiden, Netherlands: Backhuys Publishers, 1705 pp.
- BORGERT A. (1900) - Untersuchungen uber die Fortpflanzung der Tripyleen Radiolarien speziell von *Aulacantha scolymantha*. H. - *Th. l. Zool. Jb.*, (Abt. Anat. Ontog. Tiere), **29**: 203-276.
- BORGERT A. (1901) - Die nordischen Tripyleen-Arten. In: *Nordisches Plankton, Zoologischer Teil, VII Protozoa*, Neudruck A. Asher & Co., Amsterdam 1964: 1-52.
- BORGERT A. (1905) - Die Tripyleen Radiolarien der Plankton- Expedition. *Ergebn. Atlant. Ozean Planktonexped. Humboldt-Stift.*, **3**: 419-536.
- BOTSCHLI O. (1889) - Protozoa (Infusoria and System der Radiolaria). In: Winter J.F.C. (ed): *Bronn's Klassen and Ordnungen des Thiers- Reichs*, Leipzig, 1098-2035.

- CACHON-ENJUMET M. (1961) - Contribution a l'étude des Radiolaires Phaeodaries. *Arch. Zool. Exp. Gén.*, **100**: 151-238.
- CORLISS J.O. (1967) - Systematics of the phylum Protozoa. In: Florking H., Scheer B (eds) *Chemical Zoology, I: Protozoa*, Acad. Press, New York: 1-20.
- ENRIQUES P. (1919) - Ricerche sui Radiolari. *Memorie R. Com. Talassogr. Ital.*, **71**: 250-282.
- ENRIQUES P. (1931) - Saggio di una classificazione dei Radiolari. *Archo Zool. Ital.*, **16**: 978-994.
- GOWING M. M., COALE S.L. (1989) - Fluxes of living radiolarians and their skeletons along a northeast Pacific transect from coastal upwelling to open ocean waters. *Deep-Sea Res.*, **36**: 561-576.
- HAECKEL E. (1862) - *Die Radiolarien (Rhizopoda Radiaria)*. Monographie, Berlin, 572 pp..
- HAECKEL E. (1887) - *Report on the Radiolaria collected by H.M.S. Challenger during the years 1873-1876* London, 1800pp.
- HAECKEL E. (1888) - *Die Radiolarien. Eine Monographie. Die Acantharien oder Actipyleen-Radiolarien*, Berlin, 248 pp..
- HAECKER V. (1908) - Tiefsee-Radiolarien. *Wiss. Ergebn. dt. Tiefsee-Exped. 'Valdivia'*, **14**: 1-706.
- HOLLANDE A., ENJUMET M. (1960) - Citologie, Evolution et systématique des Sphaeroides (Radiolaires). *Archs Mus. natn. Hist. nat., Paris*, **7**: 1-134.
- HOLSEMANN K. (1963) - Radiolaria in plankton from the arctic drifting station T3 including the description of three new species. *Arctic*, **13**: 1-52.
- IMMERMANN F. (1904) - Die Tripyleen-Familie der Aulacanthiden der Plankton-Expedition. *Ergebn. Atlant. Ozean Planktonexped. Humboldt-Stift.*, **3**: 1-92.
- LEE J.J., LEEDALE G.F., BRADBURY P. (2000) - *The Illustrated Guide to the Protozoa*. Allen Press Inc., Lawrence, 1425 pp.
- SCHMIDT W.J. (1908) - Die Tripyleen-Radiolarien der Plankton- Expedition. *Ergebn. Atlant. Ozean Planktonexped. Humboldt-Stift.*, **3**: 233-280.
- SCHRODER O. (1909) - Die nordischen Spumellarien. In: *Nordisches Plankton, Zoologischer Teil, VII Protozoa*, Neudruck A. Asher & Co., Amsterdam 1964: 1-63.
- SCHRODER O. (1911) - Die nordischen Nassellarien. In: *Nordisches Plankton, Zoologischer Teil, VII Protozoa*, Neudruck A. Asher & Co., Amsterdam 1964: 67-140.
- SCHRODER O. (1929) - Die nordischen Spumellarien. In: *Nordisches Plankton, Zoologischer Teil, VII Protozoa*, Neudruck A. Asher & Co., Amsterdam 1964: 91-120.
- STIASNY G. (1910) - Ober die Beziehung der sog. "gelben Zellen" zu den koloniebildenden Radiolarien. *Arch. Protistenk*: 145-166.
- STIASNY G. (1911) - Radiolarien aus der Adria. *Sber. Akad. Wiss. Wien, K1. math. - naturw.*, **120**: 1-17.
- TAKAHASHI K. (1991) - Radiolaria: flux, ecology, and taxonomy in the Pacific and Atlantic. In: Honjo S. (ed.) *Ocean Biocoenosis*. Series n. 3, Wood Hole Oceanographic Institution Press, 303 pp.

ACANTARI

- BOLTOVSKOY D. (1999) - *South Atlantic Zooplankton*. Leiden, Netherlands: Backhuys Publishers: 1705 pp.
- BOTTAZZI MASSERA E. (1963) - Rivalutazione del genere *Quadrastaurus* Popofsky 1906 (Protozoa-Acantharia). *B. Zool.*, **30**: 1-7.
- BOTTAZZI MASSERA E. (1964) - Gli Acantari dell'Oceano Atlantico. Osservazioni sistematiche ed ecologiche. *B. Zool.*, **31**: 1115-1123.
- BOTTAZZI MASSERA E., NENCINI G., VANNUCCIA. (1965) - Ulteriori ricerche sulla sistematica e sull'ecologia degli Acantari (Protozoa) nel Mar Tirreno. *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.*, **20**: 9-40.
- CORLISS J.O. (1967) - Systematics of the phylum Protozoa. In: Florking H., B. Scheer (eds) *Chemical Zoology, I: Protozoa*, Acad. Press, Ney York: 1-20.
- FEBVRE J. (1990) - Phylum Actinopoda. Class Acantharia. In: Margulis L., Corliss O., Melkonian M., Chapman D.J. (eds) *Handbook of Protoctista*, Jones and Bartlett, Boston: 363-379.
- LEE J.J., LEEDALE G.F., BRADBURY P. (2000) - *The Illustrated Guide to the Protozoa*. Allen Press Inc., Lawrence, 1425 pp
- MASSERA BOTTAZZI E. (1964) - Un nuovo genere *Dendracantha* della famiglia "Stauracanthidae" - Haeckel (Protozoa-Acantharia). *Atti Soc. ital. Sci. nat.*, **103**: 376-379.
- MASSERA BOTTAZZI E. (1965) - *Nivalia schreiberi* n. gen. n. sp., ascrivibile a "Nivaliidae" n. fam. (Protozoa-Acantharia). *Atti Soc. ital. Sci. nat.*, **104**: 318-323.

-
- MASSERA BOTTAZZI E. (1978) - Systematic-ecological aspects of Radiolaria with special reference to Acantharia. *B. Zool.*, **45**: 133-144.
- MASSERA BOTTAZZI E., VANNUCCIA. (1964) - Acantharia in the Atlantic Ocean. A systematic and ecological analysis of planktonic collections made during Cruises Chain 17 and Chain 21 of the Woods Hole Oceanographic Institution. 1st Contribution. *Archo Oceanogr. Limnol.*, **13**: 315-385.
- MASSERA BOTTAZZI E., VANNUCCIA. (1965a) - Acantharia in the Atlantic Ocean. A systematic and ecological analysis of plankton collections made during Cruise 25 of R.V. Chain, of the Woods Hole Oceanographic Institution. 2nd Contribution. *Archo Oceanogr. Limnol.*, **14**: 1-68.
- MASSERA BOTTAZZI E., VANNUCCIA. (1965b) - Acantharia in the Atlantic Ocean. A systematic and ecological analysis of plankton collections made during Cruises 89 of R.V. Crawford of the Woods Hole Oceanographic Institution. 3rd Contribution. *Archo Oceanogr. Limnol.*, **14**: 154-257.
- MASSERA BOTTAZZI E., VIJAYAKRISHNAN NAIR K., BALANI M.C. (1967) - On the occurrence of Acantharia in the Arabian Sea. *Archo Oceanogr. Limnol.*, **15**: 63-67.
- MASSERA BOTTAZZI E., NENCINI G. (1969) - Acantharia. Order Holocantha. Family Acanthochiasmidae. *Conseil International pour l'Exploration de la Mer Zooplankton*, Sheet 114: 14.
- MASSERA BOTTAZZI E., ANDREOLI M.G. (1971) - Ulteriori ricerche sugli Acantari (Protozoa) del Mar Tirreno. *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.*, **26**: 87-107.
- MASSERA BOTTAZZI E., ANDREOLI M.G. (1972) - Ricerche sistematiche sugli Acantari del Golfo di Taranto. *Ist. Lomb. Sc. lett.*, **106**: 3-14.
- NENCINI G., SAGLIA L. (1968) - Ricerche biometriche comparative fra Acantari della stessa specie del Mediterraneo e dell'Atlantico. *Boll. Zool.*, **35**: 9-18.
- POPOFSKY A. (1904) - Die Acantharie der Plankton-Expedition. I Acanthometra. *Ergebn. Atlant. Ozean Planktonexped. Humboldt-Stift.*, **3**: 1-158.
- POPOFSKY A. (1905) - Die Nordischen Acantharien. I: Acanthometriden. II: Acanthophracten. In: *Nordischen Plankton, Zoologischer Teil, VII Protozoa*, Neudruck A. Asher & Co., Amsterdam 1964: 43-89.
- POPOFSKY A. (1906) - Die Acantharie der Plankton-Expedition. II Acanthophracta. *Ergebn. Atlant. Ozean Planktonexped. Humboldt-Stift.*, **3**: 1-160.
- SCHEWIAKOFF W. (1926) - Die Acantharia. *Fauna Flora Golf. Neapel*, **37**: 1-755.

ALTRI

- HAMBURGER C. (1913) - Flagellata and Sarcodina. In: *Nordisches Plankton, Zoologischer Teil, VII Protozoa*, Neudruck A. Asher & Co., Amsterdam 1964: 195-211.
- FEBVRE-CHEVALIER C. (1982) - Revision of the taxonomy of the Heliozoa with attention to electronic microscopical criteria. *Ann. Inst. océanogr., Paris*, **58** (suppl.): 173-178.

CAPITOLO 42. MESOZOOPLANCTON

E. Camatti, I. Ferrari

elisa.camatti@ismar.cnr.it

42.1 INTRODUZIONE

Lo zooplancton rappresenta un anello chiave nel trasferimento di energia dal comparto autotrofo del fitoplancton ai carnivori che occupano i livelli superiori delle catene alimentari. D'altra parte, un'interpretazione aggiornata del funzionamento degli ecosistemi marini evidenzia l'importanza focale delle connessioni che vincolano il comparto zooplanctonico da un lato a quello bentonico - sedimentario, dall'altro alle attività sostenute dalle componenti (alghie microplanctoniche, batteri e protozoi) che alimentano il circolo microbico (*microbial loop*). Lo zooplancton assume un ruolo chiave sia nella produzione di sostanza organica particellata e disciolta trasferita ai decompositori sia nella liberazione di nutrienti assimilabili da microalghe e batteri ed entra pertanto attivamente nei cicli degli elementi biogeni fondamentali, del carbonio del fosforo, e dell'azoto (Banse, 1995; Harris, 1995; Fenchel, 2008). Inoltre ricerche condotte negli ultimi anni hanno evidenziato funzioni determinanti associate allo zooplancton anche nella regolazione e nella valutazione di impatto dei cambiamenti climatici (Portner *et al.* 2004; Hays *et al.*, 2005).

Secondo la classificazione proposta da Sieburth *et al.* (1978), nello zooplancton si possono individuare tre classi dimensionali: microzooplancton (20-200 μm), mesozooplancton (0,2-20 mm) e macrozooplancton (2-20 cm). Il mesozooplancton comprende molteplici forme di organismi appartenenti ad un ampio spettro di taxa di invertebrati (cnidari e ctenofori, numerosi gruppi di crostacei, copepodi in primo luogo, e ancora chetognati, appendicolarie e taliacei, ecc.), ma anche uova e larve di pesci. Si distinguono organismi oloplanctonici, il cui intero ciclo vitale si svolge in ambiente pelagico, ed organismi meroplanctonici caratterizzati da stadi larvali pelagici e da vita adulta bentonica. Sebbene dotati di apparati di locomozione relativamente efficienti, quasi tutti gli organismi del mesozooplancton non sono in grado di contrastare la turbolenza dell'acqua e le correnti lasciandosi trascinare e trasportare da queste pur essendo in grado di compiere migrazioni verticali giornaliere lungo ampi tratti della colonna d'acqua.

Il *pattern* di distribuzione spaziale delle comunità e delle diverse specie che le compongono è modulato dall'interazione di una molteplicità di fattori: la quota batimetrica, l'idrodinamismo associato ai gradienti di temperatura, salinità e densità, lo stato trofico delle acque, i cicli e le strategie di vita delle singole popolazioni, l'incidenza di significative relazioni ecologiche interspecifiche (predazione, competizione, ecc.). Gli studi sul ruolo del mesozooplancton negli ecosistemi marini dovranno pertanto affidarsi anzitutto all'adozione di metodi quanto più accurati e standardizzati per la raccolta e l'analisi dei campioni di questa comunità, ma devono anche prevedere, contestualmente, il rilevamento di dati relativi ai parametri idrologici e biologici più significativi al fine di una caratterizzazione di massima dell'area indagata. Va da sé che, di volta in volta, tecniche e procedure del piano di campionamento dello zooplancton (e di rilevamento simultaneo di parametri ambientali) dovranno essere definite e sequenziate in relazione alle specificità degli obiettivi dei progetti di ricerca e monitoraggio.

Per la stesura di questo capitolo, dedicato all'illustrazione dei metodi di raccolta, conservazione ed analisi di campioni di mesozooplancton, sono stati considerati come riferimento importante i testi curati da Zunini Sertorio (1990a, 1990b, 1990c) e pubblicati nel volume sui "Metodi nell'ecologia del plancton marino", edito da *Nova Thalassia* (Innamorati *et al.*, 1990).

42.2 METODI DI CAMPIONAMENTO

La più diffusa metodologia per la raccolta di campioni di mesozooplancton è basata sull'uso di reti da plancton trainate dall'imbarcazione; di notevole interesse è anche il prelievo di campioni d'acqua

con pompa e filtrazione a bordo. In alcuni casi, quando si desidera disporre di prelievi puntiformi da diverse quote batimetriche, per lo studio della distribuzione e abbondanza di forme zooplanctoniche che normalmente sfuggono alla raccolta con rete trainata da natante, si possono utilizzare bottiglie di adeguata capacità, opportunamente zavorrate e calate sulla verticale fino alla profondità prefissata e quindi recuperate per la filtrazione a bordo.

42.2.1 Prelievo di campioni con bottiglie o pompe e filtrazione a bordo

Bottiglie. Il metodo di raccolta dello zooplancton con bottiglie viene solitamente utilizzato per la raccolta di organismi di piccole dimensioni od in aree dove la ridotta profondità della colonna d'acqua impedirebbe l'uso delle classiche reti da plancton. Tale metodo prevede l'utilizzo di bottiglie con meccanismi di chiusura che permettono il prelievo dei campioni alla quota desiderata (Fig. 1). Il vantaggio del metodo è la relativa semplicità della sua applicazione; lo svantaggio sta nella limitata quantità d'acqua che è possibile raccogliere: le bottiglie infatti raggiungono generalmente una capacità massima di 20 l. Il metodo è dunque consigliato soprattutto per la raccolta di organismi microzooplanctonici o di forme mesozooplanctoniche, in particolare stadi larvali, di piccola taglia mentre, ovviamente, non è consigliabile per la cattura di organismi di specie rare.



Fig. 1: Modello di bottiglia per la raccolta dello zooplancton (Per concessione di HYDRO-BIOS Apparatebau GmbH)

Pompe. L'utilizzo delle pompe, praticato già nelle crociere oceanografiche di fine Ottocento, è consigliato per acque ricche di sostanza organica particellata e con elevate densità planctoniche, condizioni che concorrono all'intasamento delle maglie e alla riduzione della superficie di filtrazione delle reti. L'uso di pompe che, a differenza delle reti calate in acqua, vengono tenute a bordo delle imbarcazioni, permette l'immediato monitoraggio visivo dell'eventuale intasamento della superficie filtrante. Le pompe consentono inoltre una più precisa valutazione dell'effettiva profondità ed estensione degli strati d'acqua campionati. Usualmente con questo metodo non è operativamente possibile campionare a profondità superiori ai 200 m. Eccezionalmente, il sistema MULVPS consente di campionare a profondità fino ai 1000 m (Bishop *et al.*, 1992), ma la sua *performance* si riduce sensibilmente oltre questo limite batimetrico. Si fa seguire un elenco di riferimenti bibliografici essenziali sull'uso di pompe per il prelievo di campioni di zooplancton in relazione a diverse finalità di ricerca: Tranter e Smith (1968), Singarajah (1969), Miller e Judkins (1981), Taggart e Leggett (1984), Harris *et al.* (1986), Durbin *et al.* (1987), Mohlenberg (1987), Omori e Jo (1989).

42.2.2 Reti da plancton trainate da natante

È il metodo più comunemente usato per la raccolta di organismi mesozooplanctonici. Le reti differiscono per forma e dimensione; notevole è inoltre la varietà di campionatori su cui possono essere montate. Rilievo prioritario assume la scelta dell'apertura di maglia in relazione alle peculiarità degli obiettivi di ricerca cui il piano di campionamento deve conformarsi.

Per la raccolta del mesozooplancton si utilizzano comunemente reti ad apertura di maglia di 200 μm . Nelle aree neritiche, dove più frequentemente si verificano fioriture di fitoplancton e possono riscontrarsi contenuti particolarmente alti di materia organica particellata, condizioni che determinano un rapido intasamento delle reti, è sconsigliabile affidarsi a valori di apertura di maglia inferiori a 200 μm . L'adozione di questo standard diventa perentoria per campagne di campionamento in mare di scala spaziale vasta e su lunghi archi temporali. In mare aperto, per ricerche particolari mirate, ad esempio, alla valutazione delle abbondanze delle forme mesozooplanctoniche più minute, possono essere impiegate reti di più piccola apertura di maglia.

I requisiti di base che devono essere soddisfatti per corrette modalità di campionamento, tali cioè da restituirci informazioni accurate e attendibili sulla struttura dei popolamenti, sono descritti di seguito, con ampio riferimento a uno dei testi di Zunini Sertorio (1990a) pubblicati sul già citato volume di *Nova Thalassia* (Innamorati *et al.*, 1990).

Le reti da plancton sono costituite da un cono di garza fissato anteriormente ad un anello metallico collegabile ad una fune da traino e dotato posteriormente di un recipiente collettore nel quale si concentra il materiale convogliato all'interno della rete (Fig. 2). La garza è costituita di materiale sintetico, generalmente nylon, le cui caratteristiche di impermeabilità, robustezza ed indeformabilità garantiscono una buona resistenza delle maglie allo sforzo di traino. Le diverse garze in commercio sono identificate direttamente dall'apertura delle maglie espressa in μm .

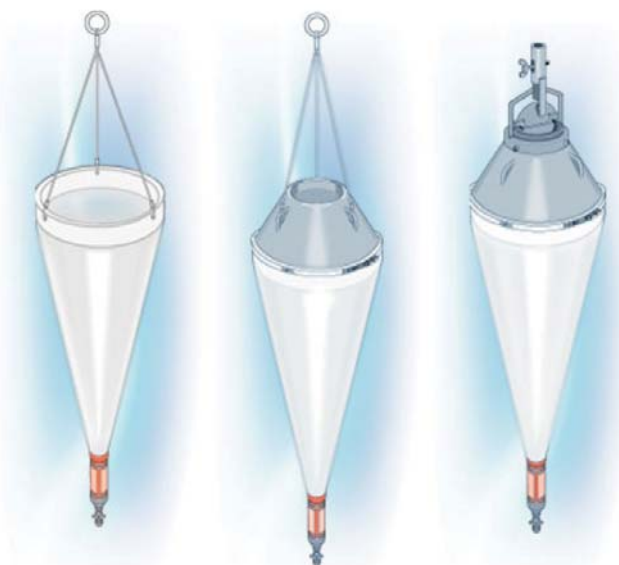


Fig. 2: Modelli di rete da plancton (Per concessione di HYDRO-BIOS Apparatebau GmbH)

Il tasso e l'efficienza di filtrazione delle reti da plancton sono i parametri che ci consentono di valutare il grado di accuratezza delle operazioni di campionamento.

Il tasso di filtrazione è funzione della velocità di traino della rete e della porosità della garza. La porosità è misurata dal rapporto tra la superficie dei vuoti e la superficie totale della garza stessa. Tale rapporto dovrebbe essere quanto più alto: più fine è la garza, minore è infatti la superficie di filtrazione. L'apertura delle maglie

della rete condiziona la scelta della velocità di traino ottimale per la cattura delle diverse componenti dello zooplancton: in particolare, una rete a maglie piccole ha un basso tasso di filtrazione e non può essere trainata ad una velocità sufficientemente alta da catturare gli organismi di maggiore mobilità. La velocità di traino deve essere scelta in funzione dell'apertura delle maglie della rete per evitare fenomeni di rigurgito; infatti, ad una velocità elevata di traino, all'imboccatura della rete si genera una forte resistenza dell'acqua con conseguente allontanamento di una parte degli organismi, un fenomeno noto con il termine *avoidance*. In generale, la velocità di traino deve essere inferiore a 3 nodi (1 nodo = 0,514 m/sec); per reti a maglia di 200 µm la velocità più idonea è compresa tra 0,7 e 1 m/sec.

Il coefficiente di filtrazione di una rete è il rapporto tra il volume dell'acqua realmente filtrato ed il volume teorico calcolato moltiplicando l'area dell'imboccatura per il percorso di traino. Il coefficiente di filtrazione espresso in percentuale è assunto come misura dell'efficienza di filtrazione; questa dipende principalmente dalla porosità delle maglie, dalla superficie del sacco filtrante rispetto alla superficie della bocca della rete, ma anche dalla tipologia del recipiente collettore in cui si concentra il materiale raccolto. Quest'ultimo deve avere da due a quattro finestre filtranti al fine di evitare il danneggiamento del plancton convogliato al suo interno, il rigurgito dell'acqua durante il traino e la perdita di materiale durante il distacco dal retino.

L'efficienza di filtrazione è misurata dal "rapporto di apertura" R, cioè dal rapporto tra superficie dei vuoti della garza e l'area di imboccatura della rete:

$$R = (a \times p) / S$$

dove:

a = area totale della garza

p = porosità delle maglie

S = area dell'imboccatura

Una buona efficienza di filtrazione è raggiunta quando l'area porosa della garza supera di tre volte la superficie della bocca della rete: in realtà, aumentando R, anche significativamente, oltre il valore 3, si riscontra solo un debole aumento di efficienza (Tranter e Smith, 1968).

Operativamente, per mantenere costante un'alta efficienza di filtrazione occorre controllare l'effetto del fattore intasamento: se non si vuole ricorrere all'impiego di reti a maglie più larghe rispetto a quelle programmate all'inizio di un ciclo di campionamenti, si può intervenire riducendo i percorsi di traino. Buone pratiche tese all'aumento del tasso di filtrazione della rete e alla limitazione degli effetti dell'intasamento e dell'*avoidance* consistono nel ridurre l'imboccatura della rete (per esempio, mediante l'aggiunta di una parte tronco-conica di tessuto) o nell'ampliare la superficie di filtrazione (con l'aggiunta di un collare cilindrico di garza posto anteriormente alla parte conica) (Fig. 2).

42.2.3 Diverse tipologie di reti e campionatori

Le metodologie di campionamento con "reti a bassa velocità" trainate su traiettorie orizzontali od oblique sono illustrate in dettaglio da Zunini Sertorio (1990a): speciale attenzione è raccomandata per il mantenimento di una velocità di traino che consenta una filtrazione costante e senza rigurgito. Nel caso di pescate verticali da battello fermo, la rete va calata alla profondità prestabilita e quindi recuperata a una velocità da 0,7 a 1 m/sec. Nello stesso testo Zunini Sertorio ha analizzato anche le principali caratteristiche dei campionatori in corsa e in continuo. I campionatori in corsa possono essere trainati a velocità molto alte, anche oltre i 10 nodi: permettono raccolte di zooplancton su ampie zone in tempi relativamente brevi e catturano con maggiore efficienza forme che tendono a sfuggire alla rete; ma nei casi in cui siano utilizzate reti a piccola apertura di bocca, può verificarsi un serio danneggiamento degli organismi di più grande taglia.

Per particolari esigenze di campionamento, esistono in commercio reti a chiusura o a chiusura/apertura che assicurano la cattura di organismi planctonici insediati in strati d'acqua prestabiliti; modelli di rete di questo tipo sono la rete WP-2 (Fraser, 1968) ed il Bongo (McGowan e Brown, 1966) (Fig 3).

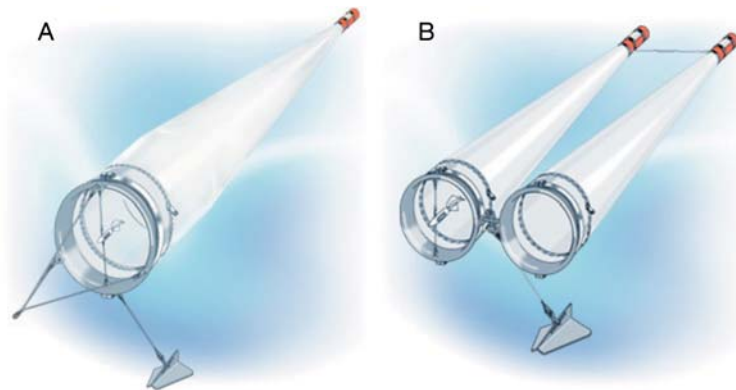


Fig. 3: a) Modello di rete da plancton WP-2; b) Modello di rete da plancton Bongo (Per concessione di HYDRO-BIOS Apparatebau GmbH)

Esistono poi campionatori a reti multiple, costituiti cioè da un certo numero di reti montate su di un unico supporto, che vengono aperte e chiuse in successione una dopo l'altra, permettendo di campionare diversi strati d'acqua durante una sola pescata (Fig. 4); esempi di reti di questo tipo sono il MOCNESS (Wiebe *et al.*, 1976) ed il BIONESS (Sameoto *et al.*, 1977) che vengono azionati elettronicamente.

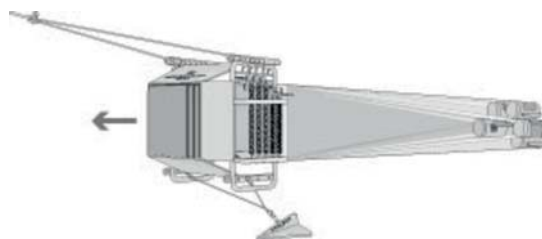


Fig. 4: Modello di campionatore da plancton a reti multiple (Per concessione di HYDRO-BIOS Apparatebau GmbH)

Si è già detto che il parametro fondamentale che governa la *performance* di una rete da plancton è il “rapporto di apertura” R tra superficie filtrante e area della bocca della rete. L'aumento dell'area della bocca di per sé non sembra influire sull'efficienza del campionamento (Pearcy, 1983); può consentire tuttavia una probabilità più alta di catturare forme rare e può contribuire a ridurre l'incidenza dell'effetto *avoidance*. In generale, una rete con diametro della bocca di 0,75 m si ritiene adeguata per le comunità mesozooplantoniche di acque costiere settentrionali e temperate. In acque oligotrofiche è ragionevole usare reti con più grande apertura di bocca in modo da garantirsi la cattura di quantità consistenti di organismi.

Recentemente, all'uso delle reti si stanno affiancando sistemi elettronici ottici ed acustici in grado di fornire informazioni relative alla concentrazione ed alla taglia dello zooplankton: un buon esempio è l'Optical Plankton Counter (OPC), strumento utilizzato per misure *in situ* di distribuzione ed abbondanza di organismi zooplantonici di dimensioni variabili tra 0,2 e 20 mm.

Per approfondimenti più dettagliati sulle strategie di campionamento e sui metodi e le tecniche di raccolta dei campioni di zooplankton, si consiglia di consultare le due sezioni “Sampling and experimental design” e “Collecting zooplankton” dell’“ICES-Zooplankton Methodology Manual” (Harris *et al.*, 2000).

42.2.4 Misura del volume d'acqua filtrato

Per i campionamenti quantitativi di plancton, che consentono di giungere a stime di densità (generalmente espresse in individui per m³) del popolamento totale e delle singole specie, è essenziale conoscere il volume d'acqua filtrato attraverso la rete. Per questo scopo le reti sono dotate di un misuratore di flusso, detto “flussometro”, composto da un'elica che gira con il flusso dell'acqua che la colpisce e da un contatore che registra il numero di giri (Fig. 5). Il flussometro è posizionato al centro dell'imboccatura della rete, fissato con cavetti all'anello metallico della stessa. Ai flussometri è generalmente associata una curva di calibrazione, fornita dalla casa produttrice, che serve a determinare l'avanzamento della rete in corrispondenza di ogni giro di elica.



Fig. 5: Modello di flussometro digitale (Per concessione di HYDRO-BIOS Apparatebau GmbH)

Per determinare il volume di acqua filtrato è necessario conoscere l'area della bocca della rete e la distanza percorsa ad ogni giro di elica, ossia la costante di calibrazione. Il volume d'acqua filtrato è generalmente espresso in m³ ed è calcolato come segue:

$$V = N \cdot c \cdot A$$

dove:

N = numero di giri dell'elica del flussometro

c = costante di calibrazione in m

A = area della bocca in m²

Quando si effettuano retinate verticali, il volume (in m³) potrà essere calcolato moltiplicando l'area della bocca (in m²) per la profondità (in m) della colonna d'acqua campionata.

42.2.5 Recupero, fissazione e conservazione dei campioni

Prima di essere recuperata a bordo, la rete deve essere sciacquata su tutta la superficie per assicurarsi che tutti gli organismi raccolti ed eventualmente rimasti adesi alla garza siano convogliati nel collettore. Lo sciacquo deve essere effettuato esclusivamente con acqua di mare, generalmente prelevata dalla nave con una pompa pescante direttamente l'acqua *in situ*. Tutto il contenuto del collettore verrà poi riversato in un recipiente, la bottiglia campione, sulla quale è stata preliminarmente applicata un'etichetta per la registrazione dei dati più significativi: nome della stazione, modalità di pescata e strato di campionamento, data e ora del prelievo, tipologia di rete e relativa apertura di maglia, numero di giri del flussometro.

Dopo la raccolta, al campione deve essere aggiunto entro pochi minuti un fissativo che ne assicuri una buona conservazione per tempi lunghi (anni, decenni), evitando danni ai tessuti degli animali per effetto di attività batteriche o di fenomeni di autolisi. Il fissativo più comunemente utilizzato è la formalina: una parte di formalina pura (37-40% di formaldeide) viene aggiunta a nove parti di acqua di mare del campione, per ottenere una concentrazione pari al 4%. Per non alterare il pH del campione, la soluzione

di formalina deve essere preventivamente neutralizzata con tetraborato di sodio (2 g di sodio tetraborato $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ in 98 ml di formalina al 40%).

Recentemente, vista l'alta tossicità della formalina, sono state adottate soluzioni alternative, utilizzando etanolo al 70%, isopropanolo al 40%, acido picrico o acido acetico. I fissativi tendono generalmente a rendere più duro e fragile il corpo degli organismi; per far fronte a questo inconveniente e per aumentare la resistenza all'attacco di batteri e muffe, vengono aggiunti al fissativo additivi come propilene fenossetolo e propilene glicerolo (dal 2 al 5 %). È buona norma riportare sull'etichetta applicata alla bottiglia campione anche i dati relativi ai fissativi utilizzati. Per una più sicura conservazione dei campioni, il fissativo deve essere rinnovato entro i primi sei mesi dalla raccolta.

42.3 ANALISI DEI CAMPIONI

Le analisi più comunemente eseguite su campioni di zooplancton riguardano le stime quantitative di abbondanza e di biomassa ("standing stock") e la determinazione tassonomica delle forme (Fig. 6). Di seguito, sono descritte le metodologie più diffusamente praticate. Nuove tecnologie, mirate all'automatizzazione di alcune procedure analitiche, sono andate sviluppandosi con successo negli ultimi anni, ma il persistere di difficoltà di vario ordine (costi, gestione, ecc.) rende ancora incerta la prospettiva ravvicinata di un loro impiego routinario. Anche per questi campi di ricerca e applicazione si rimanda al manuale di Harris *et al.* (2000), in particolare alle sezioni su "Biomass and abundance" e "Acoustical and optical methods".

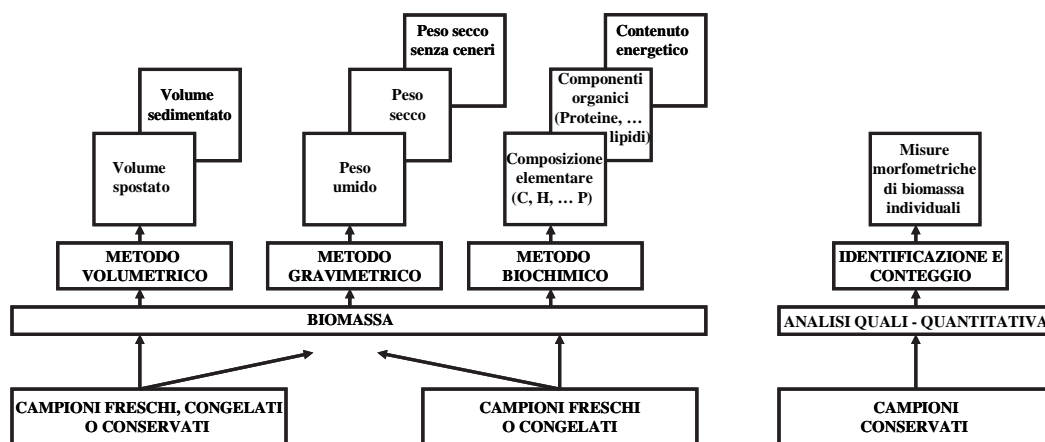


Fig. 6: Schema delle tecniche di analisi dello zooplancton

42.3.1 Stime quantitative di abbondanza

I conteggi e la determinazione tassonomica degli organismi si effettuano allo stereomicroscopio su frazioni estratte con procedura standard dal campione d'origine e versate in vaschette della capienza di uno o più ml (per esempio, camere di Bogorov o Kolkviz). Le vaschette sono generalmente aperte (prive di coperchio) in modo da permettere la manipolazione degli organismi e sono dotate alla base di una griglia utile per l'orientamento al microscopio (in particolare, per evitare di contare più volte uno stesso organismo) (Fig. 7).

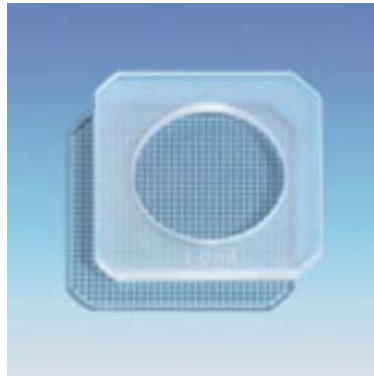


Fig. 7: Modello di camera di Kolkvitz aperta (Per concessione di HYDRO-BIOS Apparatebau GmbH)

La dimensione del subcampione da analizzare dipende dalla consistenza numerica del campione originario, che è generalmente dell'ordine di migliaia di individui, ma presenta un'amplissima variabilità in relazione all'area di studio, al tipo di campionamento e alla stagione in cui il prelievo è stato eseguito. L'usuale raccomandazione di procedere al conteggio di una frazione minima compresa tra un decimo e un quarto del campione è pertanto puramente indicativa. La quota del campione non conteggiata dovrà poi essere interamente analizzata per l'individuazione delle forme rare. Rilievo essenziale assume l'adozione di una corretta tecnica di subcampionamento. Questo può essere effettuato con due distinte modalità: frazionamento del campione originario in due parti uguali e successive bipartizioni con lo stesso metodo fino a ottenere un subcampione corrispondente a una frazione pari a $1/4$, $1/8$, $1/16$ ecc. dell'intero campione; prelievo con pipetta di una o più aliquote del campione originale portato a volume noto. Prima del frazionamento o del prelievo con pipetta è indispensabile provvedere all'omogeneizzazione del campione con delicati interventi di scuotimento e mescolamento che assicurino una distribuzione uniforme degli organismi nel contenitore (Zunini Sertorio, 1990b).

La tecnica della bipartizione sequenziale dei campioni si avvale di semplici apparecchi comunemente detti divisori: i più frequentemente usati sono il Kott *plankton splitter* (Kott, 1953) e il Folsom *plankton splitter* (Sell e Evans, 1982). Quest'ultimo consiste in un contenitore a forma di tamburo (Fig. 8a), diviso per metà da un setto, all'interno del quale è riversato l'intero campione: una volta omogeneizzato con ripetute oscillazioni, tutto il materiale è fatto fuoriuscire dal tamburo attraverso il setto che lo dividerà in due sub-campioni di ugual volume; questi sono convogliati e raccolti nelle due vaschette sottostanti. Tutti gli organismi rimasti aderenti alle pareti dello *splitter* devono essere sciacquati con acqua di mare sintetica o acqua di mare filtrata (su filtri in fibra di vetro GF/C) e riversati nelle rispettive vaschette. Il processo viene ripetuto finché si ottiene la frazione di campione desiderata.

Un metodo alternativo è quello che utilizza pipette di vetro o di plastica, ad esempio la pipetta di Stempel (Hensen, 1887) (Fig. 8b), con la quale è possibile prelevare, previa omogeneizzazione dell'intero campione portato a volume noto, aliquote che possono variare, a seconda dei diversi standard di pipetta in commercio, da decimi di ml a 5 ml. Il campione originario viene filtrato (sotto cappa, per evitare l'inhalazione dei vapori emessi dal liquido di conservazione) su una rete ad apertura di maglia pari o inferiore a quella utilizzata per il campionamento. Tutto il materiale trattenuto dal filtro viene immediatamente risospeso in un contenitore graduato, preferibilmente in vetro, aggiungendo acqua marina sintetica o acqua di mare filtrata fino al volume prefissato, usualmente da 100 a 500 ml. La scelta della diluizione, ossia del volume in cui risospingere il campione dopo la filtrazione, dipende dall'occhio esperto dell'operatore; si basa essenzialmente sul contemperamento di due esigenze contrapposte: da un lato una buona rappresentatività del subcampione, dall'altro tempi di conteggio ragionevolmente speditivi. È buona norma procedere a conteggi separati sulle singole aliquote estratte con la pipetta, per poter stimare l'accuratezza del metodo in base alla comparabilità dei dati numerici di abbondanza ottenuti per le diverse

forme. Se il campione è molto concentrato, si consiglia di ricorrere ad un'ulteriore adeguata diluizione: è bene evitare di ridurre il numero di aliquote da conteggiare; in alternativa, si può passare all'impiego di una pipetta di più ridotto volume standard.



Fig. 8: a) Modello di Folsom plankton splitter b) Modello di pipetta di Stempel (Per concessione di HYDRO-BIOS Apparatebau GmbH)

I subcampioni ottenuti con l'impiego di divisori o estratti con pipetta sono trasferiti nelle camere o vaschette per il conteggio dei diversi taxa allo stereomicroscopio. Per facilitare il conteggio di organismi, quali i cladoceri, che nelle vaschette tendono a galleggiare sul film superficiale, può essere aggiunto al campione qualche goccia di un detergente o di alcool palmitico, come suggerisce Desmarias (1997): queste sostanze, riducono la tensione superficiale e facilitano il depositarsi sul fondo degli organismi, consentendo una loro immediata identificazione.

Il ricorso al subcampionamento ha implicazioni rilevanti di ordine statistico. Sulla quantificazione dell'errore associato alle stime di abbondanza ottenute con i diversi metodi esiste una copiosa bibliografia (Lund *et al.*, 1958; Lenz, 1968; Cassie, 1971; van Guelpen *et al.*, 1982; Zunini Sertorio, 1990b). A parità di condizioni, la precisione del conteggio dipende dalla consistenza numerica del subcampione (Cassie, 1971). In linea di massima si può dire, per altro, che c'è una relazione inversa tra la percentuale di errore e il quadrato del numero degli organismi contati: per dimezzare l'errore deve essere quadruplicato lo sforzo di conteggio. Questa relazione ha conseguenze pratiche rilevanti: la prosecuzione dei conteggi oltre un certo limite (centinaia di individui per ciascuna forma zooplanctonica) comporta una riduzione dell'errore non particolarmente sensibile. L'ottimizzazione e standardizzazione delle tecniche e dei metodi di subcampionamento sono obiettivi non sempre coerentemente perseguiti nelle indagini sullo zooplancton. È auspicabile che su questi temi si sviluppino attività coordinate di intercalibrazione tra esperti di diversi laboratori e centri di ricerca.

Dai dati di conteggio si può risalire ai valori di abbondanza (generalmente espressi in ind. m⁻³) del popolamento totale e dei diversi taxa nell'area campionata, applicando la seguente formula:

$$\text{ind. m}^{-3} = (n \cdot k) / v$$

che prende in considerazione il numero di individui contati (n), la frazione di campione contata (k, ad es.: rapporto tra il volume cui è portato il campione totale prima del subcampionamento ed il volume dei subcampioni conteggiati) ed il volume d'acqua in m³ filtrata dalla rete (v).

42.3.2 Determinazione tassonomica

Si rimanda anzitutto al capitolo sulla letteratura sistematica di alcuni gruppi dello zooplancton pubblicato nel manuale di *Nova Thalassia* (Innamorati *et al.*, 1990) e si fa seguire un elenco delle guide e

delle chiavi di classificazione più frequentemente utilizzate: Sars (1903), Sewell (1932), Rose (1933), Trégouboff e Rose (1957a, 1957b), Fraser (1962), Wickstead (1965), Yamaji (1971), Newell e Newell (1973), Smith (1977), Boltovskoy (1981), Riedl (1983), Schram (1986), Todd e Laverack (1991), Guglielmo e Ianora (1995), Avancini *et al.* (2006).

Nonostante l'amplessima bibliografia disponibile, si devono registrare ancora pesanti lacune negli studi di sistematica e tassonomia dei popolamenti zooplanctonici; per interi phyla e per gran parte degli stadi larvali si dispone di conoscenze largamente inadeguate. Si sottolinea l'importanza strategica di un avanzamento della ricerca in questi campi per poter affrontare su una solida base scientifica lo studio delle relazioni tra biodiversità e funzioni ecosistemiche in mare.

Si dedica un breve cenno ad alcune tecniche che possono facilitare l'osservazione in vivo degli organismi, la loro manipolazione e la loro identificazione. Si possono utilizzare coloranti per migliorare la visibilità o sostanze ad effetto narcotizzante capaci di rallentare i movimenti degli animali: tra queste ultime si possono impiegare cloroformio, alcol metilico o magnesio cloridrico (circa 7 g di magnesio cloridrico in 100 ml di acqua distillata). Le soluzioni di narcotico danneggiano gli animali: devono essere aggiunte gradualmente e i tempi di osservazione e manipolazione degli esemplari allo stereomicroscopio devono essere quanto più brevi. Una volta terminata l'osservazione, gli organismi, nel caso si voglia conservarli, si sciacquano in acqua deionizzata e si trasferiscono in bottiglia con aggiunta di fissativo.

42.3.3 Stima della biomassa

Con il termine biomassa è indicata la quantità di materia organica rappresentata dagli organismi viventi di una popolazione o di una comunità; la misura della biomassa dello zooplancton è essenziale per giungere a stime di produzione di questo comparto biocenotico. Per le stime di biomassa i metodi volumetrici, gravimetrici e biochimici sono quelli attualmente di uso più comune.

Metodi volumetrici. Accanto alle tecniche volumetriche che verranno descritte in seguito dettagliatamente, si accenna qui brevemente che, in genere, per studi mirati su stadi larvali di organismi mesozooplanctonici o comunque ad organismi di dimensioni inferiori ai 200 μm , la biomassa può essere stimata sulla base di dati di abbondanza numerica e sui valori di biovolume di singoli organismi ottenuti seguendo un approccio morfometrico: il biovolume di ogni organismo viene calcolato in base alle sue dimensioni dopo aver assimilato la sua forma a quella di un solido geometrico. Per una trattazione più approfondita si rimanda al volume di Harris *et al.* (2000).

Metodi gravimetrici e biochimici. I metodi gravimetrici implicano misure di peso degli organismi mentre quelli biochimici prevedono la determinazione del contenuto di elementi quali carbonio, azoto e fosforo, oppure del contenuto di componenti chimiche come proteine, lipidi e carboidrati o di specifici costituenti come acidi grassi e aminoacidi. Tra i metodi biochimici sono da annoverare anche le misure calorimetriche con le quali la biomassa viene espressa in termini di contenuto energetico; gli strumenti utilizzati, calorimetri, consentono la determinazione del contenuto calorico di piccole quantità di materiale.

Le stime di biomassa eseguite su campioni di mesozooplancton, se pure prelevati correttamente secondo metodologie standard, forniscono dati che devono essere valutati con estrema prudenza. I campioni su cui si effettuano misure di biomassa, oltre al mesozooplancton, comprendono generalmente altre frazioni dimensionali di organismi vivi (alghe e batteri inclusi) e una quota, che può essere rilevante, di organismi morti e di materiale organico particellato. Sono, in realtà, campioni di seston, costituiti da una componente biologica (bioseston), prevalentemente planctonica, e da una componente abiotica, denominata abioseston o tripton. Le tecniche comunemente utilizzate per le stime di biomassa non sono per lo più in grado di fornire misure distinte per queste due componenti. Fa eccezione il metodo biochimico per la determinazione dell'adenosin trifosfato (ATP), una molecola universalmente coinvolta nelle reazioni energetiche fondamentali per il metabolismo cellulare, che si degrada rapidamente con la morte degli

organismi: il suo contenuto può pertanto essere assunto come misura della materia organica vivente presente nel campione analizzato (Holm-Hansen, 1973; Traganza e Graham, 1977). L'utilizzo dell'acido deossiribonucleico (DNA) per stime di biomassa risulta, invece, di più dubbio valore poiché tale composto, più stabile nell'ambiente dell'ATP, è rinvenibile anche nel detrito e la sua concentrazione non può essere attribuita alla sola componente rappresentata da organismi viventi (Holm-Hansen, 1973; Traganza e Graham, 1977).

I diversi metodi forniscono valori di biomassa che non sono immediatamente confrontabili, essendo correlati con diverse proprietà e funzioni metaboliche degli organismi presenti nei campioni analizzati. È quindi indispensabile che per ogni determinazione siano esplicitamente indicate le tecniche e le procedure analitiche utilizzate. Talvolta, per confrontare i risultati con dati di letteratura è necessario, come unico compromesso possibile, ricorrere all'utilizzo di fattori di conversione o di equazioni che consentano una valutazione comparata dei *proxies* di biomassa stimati con metodi diversi. Per maggiori dettagli inerenti a tali metodi di calcolo si rimanda al capitolo "Biomass and abundance" dell' "ICES-Zooplankton Methodology Manual" (Harris *et al.*, 2000).

Particolare attenzione deve essere riservata alle procedure seguite per la conservazione dei campioni. È noto, in particolare, che la formalina modifica i valori di peso umido riducendo il contenuto idrico e quelli di peso secco aumentando il contenuto in ceneri e che le variazioni di biomassa risultano più marcate nei primi giorni dopo la fissazione. Si consiglia pertanto di effettuare le misure di biomassa su materiale fissato non prima di due mesi dopo il campionamento. Per alcune determinazioni (peso secco e peso secco senza ceneri) è preferibile operare su campioni freschi. Questa raccomandazione vale in modo stringente per le misure di biomassa con metodi biochimici e calorimetrici: se le analisi non possono essere eseguite subito dopo il prelievo, si dovrà procedere al congelamento dei campioni, previo sciacquo ed essiccamento; i campioni si conservano, ad una temperatura compresa tra -20° e -30°C, abbastanza a lungo, ma preferibilmente per non più di un anno (Zunini Sertorio, 1990c).

Nella preparazione preliminare dei campioni, gli organismi dello zooplankton di taglia più grande (ctenofori, meduse, sifonofori, salpe e larve di pesci) devono essere preventivamente estratti; le misure di biomassa di questa componente dimensionale vanno effettuate separatamente.

La biomassa si esprime generalmente per unità di volume d'acqua (mg m^{-3}) o per unità di superficie (mg m^{-2}).

42.3.3.1 Metodi volumetrici

I metodi volumetrici, generalmente poco impiegati e poco raccomandati, rappresentano spesso l'unica scelta da adottare quando l'intero campione deve essere conservato e mantenuto inalterato per utilizzarlo in altri tipi di analisi, ad esempio per la determinazione tassonomica. Essi si basano sulla misura del volume di liquido spostato dalla massa degli organismi planctonici oppure del volume di zooplankton depositato per sedimentazione.

Misura del volume di liquido spostato

Il volume spostato può essere determinato secondo due diverse modalità. La prima consiste nel filtrare il campione di zooplankton attraverso una maglia di uguale o minore porosità rispetto a quella della rete con cui è stato prelevato; il materiale così concentrato viene trasferito, previa rimozione dell'acqua interstiziale, in un contenitore con un volume noto di acqua o formalina al 4%. Il volume di zooplankton sarà equivalente a quello dell'acqua o del fissativo spostati dagli organismi. Alternativa e più conveniente rispetto a questa tecnica, risulta la determinazione del volume mediante differenza tra il volume noto del campione e quello del liquido separato per filtrazione.

Tranter (1959) ha calcolato per diversi taxa zooplanctonici (copepodi, eufausiacei, ecc.) il corrispettivo in peso secco dell'unità di volume spostato.

L'equipaggiamento per le procedure relative all'applicazione di questo metodo è descritto da Frolander (1957) e Beers (1976).

Misura attraverso sedimentazione

La determinazione del volume attraverso sedimentazione si ottiene versando il campione di zooplancton in un cilindro graduato e misurando il volume di zooplancton sedimentato dopo 24 - 48 ore. La precisione della misura dipende dalle dimensioni del cilindro; solitamente vengono utilizzati cilindri con capacità di 50 - 100 ml ($\pm 0,5$ ml) o 500 ml ($\pm 2,5$ ml) (Lillelund e Kinzer, 1966). Questa tecnica risulta meno precisa rispetto alla precedente a causa della differenza nelle forme dei diversi organismi planctonici. La presenza di forme gelatinose o dotate di lunghe appendici o di forme caratterizzate dalla tendenza al galleggiamento può introdurre errori significativi nelle misure di volume.

42.3.3.2 Metodi gravimetrici

In generale, i metodi gravimetrici implicano misure di peso degli organismi, in particolare di peso umido, di peso secco e di peso secco senza ceneri.

Peso umido

Il peso umido si ottiene pesando un'aliquota nota di campione su un filtro o su un foglio di alluminio precedentemente pesato. A tale scopo, per eliminare il liquido di conservazione e quello interstiziale, e per non danneggiare gli organismi, il campione viene filtrato con cautela esercitando una leggera e regolata aspirazione mediante una pompa che produca una differenza di pressione di 33,33 kPa (pari a 250 mm di Hg). Il campione viene in seguito lavato con acqua deionizzata, anch'essa poi rimossa per aspirazione (Zunini Sertorio, 1990c). Si provvede ad una rimozione quanto più spinta dell'acqua residua nel campione mediante l'applicazione di successivi strati di carta bibula e si procede quindi, quanto più rapidamente, alla pesata. La variabilità dei risultati deriva principalmente dalla significativa differenza del contenuto in fluidi nel corpo dei differenti taxa di organismi presenti nei campioni analizzati. I copepodi, per esempio, hanno un contenuto in liquidi pari all'84% del peso corporeo, mentre gli organismi gelatinosi, quali cnidari, ctenofori e tunicati, contengono più del 99% d'acqua (Omori, 1969).

Peso secco

Il peso secco è certamente una misura più precisa rispetto a quella del peso umido e fornisce informazioni di notevole rilievo biologico ed ecologico sul contenuto effettivo di materia organica nei campioni analizzati. Il metodo per la determinazione del peso secco, correntemente applicato da decenni, prevede, in alternativa, l'essiccazione o la liofilizzazione dei campioni.

Nel caso dell'essiccazione, un'aliquota di campione viene filtrata su un filtro in fibra di vetro (GF/C) previamente pesato e scaldato a 500 °C per eliminare ogni traccia di materiale organico. Nel caso di aliquote particolarmente ricche di organismi, è consigliabile effettuare più filtrazioni sommando in seguito i valori di biomassa ottenuti. Terminata la filtrazione, il campione dovrà essere sciacquato con acqua deionizzata o con una soluzione isotonica di formiato d'ammonio ed infine essiccato in termostato a 60 °C per almeno 24 ore. Temperature superiori sono sconsigliate in quanto potrebbero comportare la perdita di composti organici volatili. Dopo l'essiccazione, prima di effettuare le pesate, il campione dovrà essere raffreddato in un essiccatore contenente generalmente gel di silice, per evitare che il materiale secco, altamente igroscopico, assorba umidità dall'ambiente circostante. Il tempo di raffreddamento può influenzare la pesata ed è quindi consigliabile stabilizzare il campione per almeno mezz'ora prima della pesata. La corretta essiccazione viene testata mediante pesate successive. Le pesate sono ripetute fino al raggiungimento di un peso costante. Dopo la prima pesata, quindi, il campione deve essere rimesso in termostato per 3 - 4 ore, poi raffreddato e quindi pesato. Se lo scarto tra i dati ottenuti non è significativo, si assume come peso costante il valore medio tra le due pesate; se la seconda pesata dà un valore apprezzabilmente più basso significa che il campione conteneva ancora acqua ed in questo caso bisogna procedere ad ulteriori passaggi in termostato e a successive pesate, fino al raggiungimento del peso costante.

La liofilizzazione è considerata una tecnica meno aggressiva rispetto all'essiccazione in stufa e fornisce generalmente valori di peso secco relativamente più alti del 2-3% (Fudge, 1968; Omori, 1978). Il campione da liofilizzare richiede un iniziale congelamento ad una temperatura compresa tra -20° e -40 °C. L'acqua contenuta nel campione viene rimossa per sublimazione all'interno del liofilizzatore dove passa direttamente dallo stato solido a quello di vapore senza alterare le strutture degli organismi presenti. In questo modo viene rimosso circa il 99,5% dell'acqua.

In entrambi i metodi di preparazione dei campioni per le misure di peso secco si esprime sensibilmente l'influenza di fattori oggettivi di variabilità inerentemente associati alla composizione specifica dei popolamenti o anche alla quantità di sale residuo nell'acqua interstiziale. Ma le fonti di errore più importanti sono da ricondurre all'inevitabile carico di soggettività connesso alla sequenza di delicate fasi operative che si conclude con le pesate.

Peso secco senza ceneri

Il peso secco senza ceneri è un parametro di essenziale interesse ecologico, essendo una misura della sostanza organica contenuta nella biomassa zooplanctonica, in altri termini del contenuto di materia (e di energia) che lo zooplancton può trasferire agli organismi dei livelli trofici superiori così come al circuito del *microbial loop*. Si calcola per differenza tra il peso secco ed il peso delle ceneri, che costituiscono la frazione di composti inorganici presenti nei campioni. Il contenuto di ceneri viene determinato tramite la combustione a 500 °C in muffola della sostanza organica del campione posto in un crogiolo di silice pre-pesato o, nel caso di piccoli campioni, in un filtro in fibra di vetro. Il tempo di combustione non deve essere inferiore alle 12 ore. Il peso delle ceneri viene misurato dopo aver lasciato raffreddare il campione all'aria e poi in essiccatore. Il contenuto delle ceneri varia in dipendenza della composizione in specie dei popolamenti e delle caratteristiche fisiche e chimiche delle acque da cui i campioni sono stati prelevati. In aree costiere, ad esempio, i campioni di zooplancton possono essere frequentemente contaminati da consistenti quantità di particolato minerale sospeso nella colonna d'acqua.

I metodi fin qui descritti prevedono l'utilizzo di una bilancia analitica o microanalitica, con precisione di $\pm 0,001$ g o mg rispettivamente, che consenta misure ripetibili. Si risottolinea l'importanza di eseguire le pesate rapidamente e in locali con bassi livelli di umidità.

42.3.3.3 Metodi chimici e biochimici

Le stime di biomassa attraverso metodi chimici rappresentano un'alternativa ai classici metodi volumetrici e gravimetrici precedentemente descritti; la loro applicazione può essere di particolare interesse negli studi sui flussi energetici in ambienti litorali o pelagici. I metodi chimici e biochimici consentono di determinare la composizione elementare, le concentrazioni dei composti organici e il contenuto energetico della biomassa zooplanctonica.

Il parametro più comunemente adottato per la misura della biomassa è il contenuto in carbonio, che è il costituente principale della biomassa secca dello zooplancton: questa, infatti, è costituita per circa il 40% da carbonio, mentre l'azoto è intorno al 10% e il fosforo all'1%.

Per la stima della biomassa con metodi chimici, possono essere utilizzati sia campioni freschi che congelati o essiccati. In generale, è preferibile operare su campioni essiccati tramite liofilizzazione; i campioni conservati in formalina sono i meno adatti per questo tipo di analisi.

L'ampia variabilità dei dati di composizione chimica e biochimica di specie diverse, ma anche di popolazioni di una stessa specie, può dipendere in larga misura dalle peculiarità idrodinamiche e idrochimiche dei siti di campionamento.

Ci si limita qui ad una trattazione sommaria dei metodi di più diffuso impiego nell'analisi della composizione elementare della biomassa e nella determinazione del contenuto delle classi fondamentali di composti organici (proteine, lipidi e carboidrati). Per maggiori dettagli tecnici si rimanda al capitolo "Biomass and abundance" dell' "ICES-Zooplankton Methodology Manual" (Harris *et al.*, 2000).

Composizione elementare

La stechiometria di carbonio, azoto e fosforo nello zooplancton è un campo di studi sempre più intensamente praticato nelle ricerche ecologiche sui cicli dei nutrienti in mare.

La determinazione della biomassa dello zooplancton con l'analisi della composizione elementare si basa sulla quantificazione di carbonio, azoto e idrogeno nei prodotti liberati per ossidazione del campione. A seguito dell'ossidazione, gli elementi sono determinati simultaneamente da analizzatori automatici a gascromatografia. In questi apparecchi il campione, preventivamente essiccato, viene combusto a 950 °C in un flusso di elio arricchito di ossigeno puro: i gas liberati dalla combustione, previa riduzione, sono trasferiti ad una colonna cromatografica dove, per eluizione, sono separati, nell'ordine, N₂, CO₂ e H₂O. La registrazione elettronica dei diversi componenti consente la determinazione quantitativa di carbonio, idrogeno e azoto presenti in forma di composti sia organici che inorganici nel campione analizzato (Zunini Sertorio, 1990c).

Sono praticabili procedure che consentono di eliminare dai campioni di zooplancton la frazione inorganica e di ottenere quindi misure del contenuto degli elementi presenti nella sola frazione organica. I campioni, collocati in *vial* o capsule, devono essere preventivamente esposti, per almeno 12 ore, a fumi di acido cloridrico concentrato, all'interno di un essiccatore; dopo questo trattamento, sono posti ad asciugare in stufa a 40°-60 °C e successivamente raffreddati in essiccatore. I campioni vengono poi ridotti a polvere fine tramite omogeneizzazione manuale in mortaio di agata o mediante omogeneizzatore Potter-Elvehjem con pestello di teflon. Alternativamente, è possibile, sempre previa eliminazione della componente inorganica, utilizzare direttamente i filtri su cui si sono precedentemente effettuate le misure di peso secco. In entrambi i casi, il materiale da analizzare, incapsulato in fogli di stagno, viene introdotto nell'analizzatore. In commercio esistono diversi modelli di analizzatori di carbonio, idrogeno e azoto (CHN) che impiegano generalmente meno di 10 minuti per effettuare un'analisi.

Per maggiori dettagli su queste metodologie si rimanda al capitolo "Carbonio organico e azoto totale particellati (POC e PTN)" del presente volume.

Le determinazioni del contenuto di fosforo nello zooplancton, effettuabili tramite combustione umida (*wet combustion*) ed idrolisi (Kleber *et al.*, 1987), sono di uso meno comune.

Analisi dei composti organici

Gli studi sui flussi di materia ed energia attraverso le reti alimentari richiedono informazioni di base anche sul contenuto delle principali classi di composti organici (proteine, lipidi e carboidrati) presenti nella biomassa dello zooplancton; queste informazioni consentono, in sostanza, una stima del "valore nutritivo" espresso complessivamente dalle popolazioni e dalle comunità zooplanctoniche (Mayzaud e Taguchi, 1979).

Esiste un alto grado di variabilità della composizione biochimica nei diversi organismi zooplanctonici. In generale, tuttavia, si può affermare che in tutti i taxa più del 50% della materia organica è costituito da proteine; il contenuto dei lipidi supera generalmente quello dei carboidrati; la chitina, un polisaccaride azotato, nei crostacei planctonici può costituire più del 10% del contenuto totale di materia organica (Raymont *et al.*, 1964; Raymont, 1983; Omori e Ikeda, 1984).

Proteine. La determinazione delle proteine non è comunemente usata come misura di biomassa zooplanctonica; più diffusa è l'esperienza di analisi eseguite su aminoacidi. Esistono diversi metodi per la determinazione quantitativa delle proteine. I metodi colorimetrici, come il metodo Bradford e Lowry, sfruttano la proprietà delle proteine di formare derivati chimici e di legare coloranti, mentre nella procedura spettrofotometrica Warburg-Christian viene sfruttata la proprietà delle proteine di assorbire la luce ultravioletta a 280 nm grazie alla presenza nella loro struttura di aminoacidi con radicali aromatici. Le tecniche fluorometriche, invece, sfruttano la reazione delle ammine primarie con fluoescammina e orto-ftalaldeide (OPA) a formare derivati fluorescenti (Castell *et al.*, 1979).

Lipidi. L'analisi del contenuto in lipidi degli organismi zooplanctonici può fornire informazioni di notevole interesse fisiologico ed ecologico sulle preferenze alimentari di questi animali e sugli effetti

della dieta su tempi e modalità di svolgimento dei loro cicli di vita. Per la determinazione dei diversi composti lipidici si ricorre a moderne tecniche analitiche, quali la cromatografia su strato sottile (TLC) o la cromatografia gas-liquido (GLC) (Christie, 1982, 1987, 1989; Kates, 1986; Kattner e Fricke, 1986).

Carboidrati. I carboidrati costituiscono generalmente solo il 2% della biomassa secca di zooplancton (Baretta-Bekker *et al.*, 1992). Le tecniche di misura del contenuto di carboidrati si basano sul principio dell'idrolizzazione dei polisaccaridi e sulla determinazione dei monosaccaridi solubili sviluppati calorimetricamente mediante calibrazione con il glucosio. Per maggiori dettagli sui metodi più comunemente usati si rimanda a Dubois *et al.* (1956), Raymond *et al.* (1964, 1971), Strickland e Parsons (1968), Golterman e Clymo (1969), Parsons *et al.* (1984).

Determinazione del contenuto energetico

L'evoluzione di tecniche di misura delle attività metaboliche ha consentito di giungere alla formulazione di bilanci energetici di organismi e di popolazioni dello zooplancton, ma anche dei diversi livelli trofici in cui si può strutturare l'intera comunità; in questi bilanci entrano i valori dei flussi di energia associati ai processi metabolici fondamentali (produzione, riproduzione, respirazione, escrezione). A tale riguardo, assume rilievo basilare la determinazione di equivalenti calorici specifici di biomassa.

Il contenuto energetico di un campione di zooplancton, espresso in calorie o joule (J) per unità di peso (grammo di peso secco o peso secco senza ceneri) o per unità di volume d'acqua (per m³) o per individuo, può essere determinato attraverso misure dirette o indirette.

Misure dirette. La tecnica di misura diretta più comune è quella che ricorre all'impiego di uno strumento detto "bomba calorimetrica" (Prus, 1975; Frascchetti *et al.*, 1994). Il campione, precedentemente essiccato, omogeneizzato, pressato in "pellets" e pesato, viene combusto in presenza di ossigeno puro ad alta pressione all'interno dello strumento immerso in una quantità nota di acqua. La quantità di energia liberata dalla completa combustione viene determinata in base all'aumento di temperatura dell'acqua (Zunini Sertorio, 1990c). Il valore calorico è calcolato attraverso apposite formule che tengono conto della temperatura rilevata e del peso secco del campione.

Misure indirette. Il contenuto energetico dello zooplancton può essere stimato anche indirettamente basandosi sui valori dell'equivalente calorico (il calore che si sviluppa per combustione in un calorimetro) relativo alle tre principali classi di composti organici: 39,4 J mg⁻¹ per i lipidi, 23,7 J mg⁻¹ per le proteine, 17,2 J mg⁻¹ per i carboidrati (Brody, 1945). Il valore calorico di un campione di zooplancton può pertanto essere calcolato con la formula seguente:

$$\text{kJ/g} = (39,4 L + 23,7 P + 17,2 C) / 100$$

dove L, P e C sono, rispettivamente, i contenuti espressi in percentuale di lipidi, proteine e carboidrati.

Questo metodo, benchè migliore della stima basata su equazioni che definiscono la relazione tra percentuale di sostanza organica presente nel campione secco ed il corrispondente equivalente calorico (Zunini Sertorio, 1990c), può presentare comunque un notevole margine di approssimazione per l'errore associato alla determinazione delle diverse componenti chimiche e alla variabilità degli equivalenti energetici che si sceglie di applicare per le diverse classi di composti organici (Brody, 1945; Cummins e Wuycheck, 1971; Winberg, 1971; Beukema, 1997; Harris *et al.*, 2000).

42.4 BIBLIOGRAFIA

- AVANCINI M., CICERO A.M., DI GIROLAMO I., INNAMORATI M., MAGALETTI E., SERTORIO ZUNINI T. (2006) - *Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani, Vol. II - Zooplancton neritico*. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare – ICRAM, Roma: 232 pp., 134 tavv.
- BANSE K. (1995) - Zooplankton: Pivotal role in the control of ocean production. *ICES J. Mar. Sci.*, **52**: 265-277.

-
- BARETTA-BEKKER J.G., DUURSMA E.K., KIUPERS B.R. (1992) - *Encyclopedia of marine sciences*. Springer, Berlin: 311 pp.
- BEERS J.R. (1976) - Determination of zooplankton biomass. In: Steedman H.F. (ed), *Zooplankton fixation and preservation*. UNESCO Press, Paris: 35-84.
- BEUKEMA J.J. (1997) - Caloric values of marine invertebrates with an emphasis of the soft parts of marine bivalves. *Oceanogr. Mar. Biol.*, **35**: 387-414.
- BISHOP J.K.H., SMITH R.C., BAKER K.S. (1992) - Springtime distribution and variability of biogenic particulate matter in Gulf Stream warm-core ring 82B and surrounding N.W. Atlantic water. *Deep-Sea Res.*, **39** (1): S295-S325.
- BOLTOVSKOY D. (1981) - *Atlas del zooplancton del Atlantico sudoccidental*. INIDEP, Mar del Plata: 936 pp.
- BRODY (1945) - *Bioenergetics and growth*. Reinhold, New York: 1023 pp.
- CASSIE M. (1971) - Sampling and statistics. In: Edmondson W.T., Winberg G.G. (eds), *A manual of the methods for the assessment of secondary productivity in freshwaters*. Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh: 174-209.
- CASTELL J.V., CERVERA M., MARCO R. (1979) - A convenient micromethod for the assay of primary amines and proteins with fluorescamine. A re-examination of the conditions of reaction. *Anal. Biochem.*, **99**: 379-391.
- CHRISTIE W.W. (1982) - *Lipid analysis*. 2nd edn. Pergamon Press, Oxford: 207 pp.
- CHRISTIE W.W. (1987) - *High-performance and lipids: a practical guide*. Pergamon Press, Oxford: 272 pp.
- CHRISTIE W.W. (1989) - *Gas Chromatography and lipids: a practical guide*. The Oily Press, Ayr: 307 pp.
- CUMMINS K.W., WUYCHECK J.C. (1971) - Caloric equivalents for investigations in ecological energetics. *Mitt. Internat. Verein. Limnol.*, **18**: 1-158.
- DESMARIAS K.H. (1997) - Keeping *Daphnia* out of the surface film with cetyl alcohol. *J. Plankton Res.*, **19**: 149-154.
- DUBOIS M., GILLS K.A., HAMILTON J.K., REBERS P.A., SMITH F. (1956) - Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356.
- DURBIN E.G., RUNGE J.A., CAMPBELL R.G., GARRAHAN P.R., CASAS C., PLOURDE S. (1987) - Late fall-early winter recruitment of *Calanus finmarchicus* on Georges Bank. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **151**: 103-114.
- FENCHEL T. (2008) - The microbial loop - 25 years after. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **366**:99-103.
- FRASCHETTI S., ROBERTSON M., ALBERTELLI G., CAPELLI R., ELEFATHERION A. (1994) - Calorimetry: Use of the Phillipson microbomb. *Oebalia*, **20**: 117-127.
- FRASER J. (1962) - *Nature adrift. The story of marine plankton*. G.T. Foulis, London: 178 pp.
- FRASER J.H. (1968) - Standardization of zooplankton sampling methods at sea. In: Tranter D.J., Fraser I.H. (eds), *Zooplankton Sampling*. UNESCO Monographs on Oceanographic Methodology: 145-169.
- FROLANDER H.S. (1957) - A plankton volume indicator. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, **22**: 278-283.
- FUDGE H. (1968) - Biochemical analysis of preserved zooplankton. *Nature*, **219**: 380-381.
- GOLTERMAN H.L., CLYMO R.S. (1969) - *Methods for chemical analysis of freshwaters*. IBP Handbook n° 8, Blackwell Scientific, Oxford: 157 pp.
- GUGLIELMO L., IANORA A. (1995) - *Atlas of marine zooplankton. Straits of Magellan. Copepods*. Springer Verlag, Berlin: 279 pp.
- HARRIS R.P., FORTIER L., YOUNG R.K. (1986) - A large-volume pump system for studies of the vertical distribution of fish larvae under open sea conditions. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **66**: 845-854.
- HARRIS R. (1995) - ICES Symposium "Zooplankton Production" 1994. *ICES J. Mar. Sci.*, **52**: 261-773.
- HARRIS R. P., WIEBE P. H., LENZ J., SKJOLDAL H.R., HUNTLEY M. (2000) - *ICES Zooplankton Methodology Manual*. Academic Press, USA: 684 pp.
- HAYS G.H., RICHARDSON A.J., ROBINSON C. (2005) - Climate change and marine plankton. *Trends Ecol. Evol.*, **20** (6): 337-344.
- HENSEN V. (1887) - Über die Bestimmung des Planktons oder des im Meere treibenden Materials an Pflanzen und Thieren. *V. Bericht d. Kom. Z. wiss. Unifers. D. deutschen Meere*, **12-16**: 1-108.
- HOLM-HANSEN O. (1973) - The use of ATP determinations in ecological studies. *Bull. Ecol. Res. Comm. (Stockholm)*, **17**: 215-222.
- INNAMORATI M., FERRARI I., MARINO D., RIBERA D'ALCALÀ M. (1990) - *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. *Nova Thalassia* **11**: 372 pp.

-
- KATES M. (1986) - *Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids*. Elsevier Science, Amsterdam: 464 pp.
- KATTNER G., FRICKE H.S.G. (1986) - Simple gas-liquid chromatographic method for the simultaneous determination of fatty acids and alcohols in wax esters of marine organisms. *J. Chromat.*, **361**: 263-268.
- KLEBER H.P., SCHLEE D., SCHÖPP W. (1987) - *Biochemisches Praktikum*. G. Fischer, Jena: 263 pp.
- KOTT P. (1953) - Modified whirling apparatus for the subsampling of plankton. *Austr. J. Mar. Freshw. Res.*, **4**: 387-393.
- LENZ J. (1968) - Plankton. In: Schlieper C. (ed), *Methoden der meeresbiologischen Forschung*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena: 48-62.
- LILLELUND K., KINZER J. (1966) - Absetz- und Verdrängungsvolumen von Planktonproben. Untersuchungen zur Methodik *J. Int. Revue ges. Hydrobiol.*, **51**: 757-774.
- LUND J.W.G., KIPLING C., LECREN E.D. (1958) - The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, **11**: 143-169.
- MAYZAUD P., TAGUCHI S. (1979) - Spectral and biochemical characteristics of the particulate matter in Bedford Basin. *J. Fish. Res. Board Can.*, **36**: 211-218.
- McGOWAN J.A., BROWN D.M. (1966) - A new opening-closing paired zooplankton net. *Scripps Instn Oceanogr.*: 66-23
- MILLER C.B., JUDKINS D.C. (1981) - Design of pumping systems for sampling zooplankton, with descriptions of two high-capacity samplers for coastal studies. *Biol. Oceanogr.*, **1**: 29-56.
- MOHLENBERG F. (1987) - A submersible net pump for quantitative zooplankton sampling: comparison with conventional net sampling. *Ophelia*, **27**: 101-110.
- NEWELL G.E., NEWELL R.C. (1973) - *Marine plankton. A practical guide*. Hutchinson Biological Monographs, London: 244 pp.
- OMORI M. (1969) - Weight and chemical composition of some important oceanic zooplankton in the North Pacific Ocean. *Mar. Biol.*, **3**: 4-10.
- OMORI M. (1978) - Some factors affecting dry weight, organic weight and concentration of carbon and nitrogen in freshly prepared and in preserved zooplankton. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, **63**: 261-269.
- OMORI M., IKEDA T. (1984) - *Methods in Marine Zooplankton. Ecology*. John Wilwy, New York: 332 pp.
- OMORI M., JO S.G. (1989) - Plankton sampling system with a new submersible vortex pump and its use to estimate small-scale vertical distribution of eggs and larvae of *Sergia lucens*. *Plankton Soc. Japan*, **36**: 19-26.
- PARSONS T.R., MAITA Y., LALLI C.M. (1984) - *A manual of chemical and biological methods for sea water analysis*. Pergamon Press, Oxford: 173 pp.
- PEARCY W.G. (1983) - Quantitative assessment of the vertical distributions of micronektonic fishes with opening/closing midwater trawls. *Biol. Oceanogr.*, **2**: 289-310.
- PORTNER H.O., LANGENBUCH M., REIPSCHLOGER A. (2004) - Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *J. Oceanogr.*, **60**: 705-718.
- PRUS T. (1975) - Measurement of calorific value using Phillipson microbomb calorimeter. In: Grodzinski W., Klekowski W. (eds), *Methods for ecological bioenergetics*, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh: 160-199.
- RAYMONT J.E.G. (1983) - *Plankton and productivity in the Oceans. Zooplankton*. Pergamon Press, Oxford: 824 pp.
- RAYMONT J.E.G., AUSTIN J., LINFORD E. (1964) - Biochemical studies on marine zooplankton. I. The biochemical composition of *Neomysis integer*. *J. Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, **28**: 354-363.
- RAYMONT J.E.G., SRINIVASAGAM R.T., RAYMONT J.K.B. (1971) - Biochemical studies on marine zooplankton. IX. The biochemical composition of *Euphausia superba*. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, **51**: 581-588.
- RIEDL R. (1983) - *Fauna und Flora des Mittelmeeres*. Verlag Paul Parey, Hamburg: 836 pp.
- ROSE M. (1933) - *Faune de France. Copépodes pélagiques*. Nedeln, Liechtenstein, Paris: 374 pp.
- SAMEOTO D.D., JAROSZYNSKI L.O., FRANSE W.B. (1977) - A multiple opening and closing plankton sampler based on the MOCNESS and N.I.O. nets. *J. Fish. Res. Board Can.*, **34**: 1230-1235.
- SARS G.O. (1903) - *An account of the Crustacea of Norway. Copepoda: Calanoida*. Bergen Museum, Bergen: 171 pp.
- SCHRAM F. (1986) - *Crustacea*. Oxford University Press, New York: 606 pp.
- SELL D.W., EVANS M.S. (1982) - A statistical analysis of subsampling and an evaluation of the Folsom plankton splitter. *Hydrobiologia.*, **94**: 223-230.

-
- SEWELL R.B.S. (1932) - The Copepoda of the Indian Seas. Calanoida. *Memoirs of the Indian Museum*, **10**: 223-407.
- SIEBURTH J. McN., SMETACEK V., LENZ J. (1978) - Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.*, **23**: 1256-1263.
- SINGARAJAH K.V. (1969) - Escape reactions of zooplankton: the avoidance of a pursuing siphon tube. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **3**: 171-178.
- SMITH D.L. (1977) - *A guide to marine coastal plankton and marine invertebrate larvae*. Kendall-hunt Publ. Comp., Dubuque (Iowa): 161 pp.
- STRICKLAND J.D.H., PARSONS T.R. (1968) - *A practical handbook of seawater analysis*. Fisheries Research Board of Canada, Ottawa: 311 pp.
- TAGGART C.T., LEGGETT W.C. (1984) - Efficiency of large-volume plankton pumps, and evaluation of a design suitable for deployment from small boats. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **41**: 1428-1435.
- TOOD C.D., LAVERACK M.S. (1991) - *Coastal marine zooplankton: a practical manual for students*. Cambridge University Press, Cambridge: 106 pp.
- TRAGANZA E.D., GRAHAM K.J. (1977) - Carbon/adenosine triphosphate ratios in marine zooplankton. *Deep-Sea Res.*, **24**: 1187-1193.
- TRANter D.J. (1959) - A method for determining zooplankton volume. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, **25**: 272-278.
- TRANter D.J., SMITH P.E. (1968) - Filtration performance. In: Tranter D.J. (ed), *Zooplankton sampling. Monographs on oceanographic methodology 2*. UNESCO Press, Paris: 27-56.
- TRÉGOUBOFF G., ROSE M. (1957a) - *Manuel de planctologie Méditerranéenne*. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris Vol. I: 587 pp.
- TRÉGOUBOFF G., ROSE M. (1957b) - *Manuel de planctologie Méditerranéenne*. Centre National de la Recherche Scientifique, Paris Vol. II: 303 pp.
- VAN GUELPEL L., MARKLE D.F., DUGGAN D.J. (1982) - An evaluation of accuracy, precision, and speed of several zooplankton subsampling techniques. *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, **40**: 226-236.
- WICKSTEAD J.H. (1965) - *An introduction to the study of tropical plankton*. Hutchinson Tropical Monogr., London: 160 pp.
- WIEBE P.H., BURT K.H., BOYD A.W., MORTON A.W. (1976) - A multiple opening/closing net and environmental sensing system for sampling zooplankton. *J. Mar. Res.*, **34**: 313-326.
- WINBERG G.G. (1971) - *Methods for the estimation of production of aquatic animals*. Academic Press, London: 175 pp.
- YAMAJI I. (1971) - *The plankton of Japanese coastal waters*. Hoikushu, Osaka: 238 pp.
- ZUNINI SERTORIO T. (1990a) - Campionamento dello zooplankton. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera D'Alcalà M. (eds), *Metodi nell'ecologia del plancton marino. Nova Thalassia*, **11**: 265-275.
- ZUNINI SERTORIO T. (1990b) - Stima della densità zooplanctonica. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera D'Alcalà M. (eds), *Metodi nell'ecologia del plancton marino. Nova Thalassia*, **11**: 285-288.
- ZUNINI SERTORIO T. (1990c) - Stima della biomassa zooplanctonica. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera D'Alcalà M. (eds), *Metodi nell'ecologia del plancton marino. Nova Thalassia* **11**: 277-284.

CAPITOLO 43. FORME DI RESISTENZA DELLO ZOOPLANCTON

G. Belmonte, S. Moscatello, F. Rubino

genuario.belmonte@unisalento.it

43.1 INTRODUZIONE

Molte specie classicamente definite come oloplanctoniche trascorrono periodi, anche molto lunghi, nei sedimenti dei bacini marini costieri sotto forma di stadi dormienti o letargici. Di qui la necessità di integrare le informazioni ricavabili dalla colonna d'acqua con quelle provenienti dai sedimenti, al fine di ottenere un quadro il più completo possibile della dinamica delle comunità planctoniche di un'area marina.

Qui ci occuperemo delle forme di resistenza incapsulate (generalmente denominate "cisti" secondo Belmonte *et al.*, 1995) prodotte dai più comuni gruppi dello zooplancton marino costiero, trascurando le forme dormienti che interessano stadi morfologicamente corrispondenti a quelli attivi (larve o giovanili) e dunque poco distinguibili da questi. Stadi letargici diversi dalle cisti (ad es. Calanoida giovanili) rimangono generalmente nella colonna d'acqua, pur a diversa profondità, e non finiscono nei sedimenti dei fondali marini. D'altra parte i copepoditi dormienti dei Cyclopoida (che possono finire nel benthos) rimangono in qualche modo attivi e in grado di svegliarsi frequentemente per spostarsi all'occorrenza.

Generalizzando, le cisti sembrano tipiche dei *taxa* zooplanctonici marini che in qualche modo abitano con successo anche le acque continentali interne (ad es. ciliati, rotiferi, cladoceri, calanoidi centropagoidei) e generalmente presentano superfici scolpite o spinose che sono, invece, poco diffuse tra le specie, pure affini, d'acqua dolce.

43.2 CRITERI GENERALI PER L'IDENTIFICAZIONE MORFOLOGICA DELLE FORME DI RESISTENZA

Tra gli organismi del micro- e mesozooplancton, solo per i copepodi calanoidi esiste una corposa letteratura scientifica riguardante la produzione di stadi di resistenza nel loro ciclo vitale. Per questo motivo ci sembra opportuno, prima di descrivere le metodiche più comuni utilizzate per lo studio delle forme di resistenza dello zooplancton, effettuare una breve disamina dei loro principali caratteri morfologici, che sia d'aiuto in una prima grossolana identificazione.

43.2.1 Ciliophora

Tra i ciliati (**Ciliophora**) si rinvencono molte specie in grado di produrre cisti. Pochissimi studi, però, sono stati condotti sui ciliati marini. In particolare, il ciclo di incistamento/schiusa è stato studiato solo per 3 specie marine: *Strombidium oculatum* (Fauré-Fremiet, 1948; Jonsson, 1994; Montagnes *et al.*, 2002), *Helicostomella subulata* (Paranjape, 1980) e *Cyrtostrombidium boreale* (Kim *et al.*, 2002). *S. oculatum* vive nelle pozze di scogliera ed è ben conosciuto per il suo ciclo di incistamento/schiusa legato alle maree (Montagnes *et al.*, 2002). Le altre 2 specie, invece, vivono in mare e producono cisti secondo un ciclo stagionale. Altre specie marine per le quali esistono studi sull'incistamento o la schiusa sono *Strombidium conicum* (Kim e Taniguchi, 1995; 1997), *Strombidium crassulum* (Reid, 1987) e alcune specie di *Tintinnopsis* (Kamiyama e Aizawa, 1990). Le cisti dei Ciliophora sono difficilmente rinvenibili nel plancton forse a causa della velocità di affondamento e del fatto che la loro produzione avviene in periodi di tempo molo brevi (Reid, 1987), ma episodicamente hanno rappresentato porzioni caratterizzanti di campioni, come in alcuni che Meunier (1910) raccolse nei mari di Kara e di Barents nel 1907 e che classificò com-

plessivamente con il nome di *Papulifera*. Le “cisti papulose” di Meunier furono suddivise, morfologicamente, in tre categorie: *Fusopsis* (affusolate), *Piropsis* (piriformi) e *Sphaeropsis* (sferoidali o ovoidi) (Reid e John, 1978), con la caratteristica comune di presentare una estremità munita di una minuscola calotta traslucida (la papula), che viene considerata un carattere arcaico e, dunque, comune alla maggior parte dei ciliati planctonici marini che producono cisti. La papula costituisce una sorta di tappo all'estremità apicale delle cisti di eterotrichi e oligotrichi che, con la sua apertura, fornisce la via di uscita alla cellula attiva. Questo “tappo” rende particolarmente riconoscibili le cisti dei ciliati, in mezzo alle altre, facendole somigliare a borracce con l'asse maggiore variabile da 30 a 140 μm (Reid e John, 1983). Tra gli ipotrichi, invece, le cisti sono semplicemente sferiche, mentre quelle dei tintinnidi sono sempre contenute all'interno della lorica e hanno una forma sferica o ellissoidale.

La parete delle cisti di solito è formata da 3 strati, ectocisti, mesocisti ed endocisti, chimicamente composte da diversi tipi di carboidrati, proteine e glicoproteine (Foissner *et al.*, 2005; 2007).

La morfologia dello strato esterno è molto differente a seconda del gruppo cui ci si riferisce. Può essere liscio, tuberculato, con pieghe o spinoso (Foissner *et al.*, 2005). La presenza di strutture superficiali della cisti è meno comune tra i tintinnidi, probabilmente a causa del fatto che spesso la cellula attiva si incista all'interno della lorica che riveste l'organismo attivo. In verità Foissner *et al.* (2007) fanno notare che le propaggini di superficie sono una costante, anche se invisibili al microscopio ottico o molto fragili alla manipolazione per cui, anche quando ci sono, possono essere facilmente asportate dai trattamenti cui la cisti viene sottoposta per l'osservazione. Foissner *et al.* (2007) distinguono spine (formate dall'ectocisti) da piastre (formate dalla mesocisti) o lepidosomi (formati nel citoplasma e riversati all'esterno; il termine raggruppa tutto ciò che altrove viene indicato come “scaglie”). La variabilità compositiva e morfologica delle capsule delle cisti è tale da essere stata considerata in studi di filogenesi dei ciliati (Reid & John, 1983; Foissner *et al.*, 2007). In particolare, sia la presenza di un opercolo (la papula) che quella di uno strato carbonatico nel rivestimento della cisti, sono attualmente una apomorfia degli Oligotrichidae.

43.2.2 Rotifera

Tra i **Rotifera** nella maggior parte dei casi le uova di durata sono ovali (dimensioni medie dell'asse maggiore da 80 a 150 μm) e pertanto facilmente riconoscibili negli accumuli di cisti nei sedimenti (Marcus, 1990; Viitasalo e Katajisto, 1994; Belmonte *et al.*, 1995). La loro superficie, al contrario di quella delle uova subitane che appare liscia, è spesso scolpita e/o rugosa. Ma le sculture non assumono mai l'aspetto di lunghe spine. In trasparenza è quasi sempre possibile osservare uno spazio vuoto (pari a non più del 25% del volume complessivo) disposto secondo l'asse maggiore della cisti, che tiene separato l'embrione dalla superficie interna del rivestimento. Sia in *Synchaeta* che in *Brachionus* la schiusa avviene attraverso una stretta apertura che si apre come uno sportello ad una delle estremità dell'involucro cistico.

Nonostante ciascuna femmina produca solo una o due uova di durata, questo avviene generalmente nelle condizioni di massima densità di popolazione. Per questo motivo le uova diapausali dei Rotifera, nonostante siano prodotte da una o poche specie, sono generalmente comuni da rinvenire nelle banche di cisti costiere, pur mantenendosi numericamente al di sotto delle cisti dei planctonti unicellulari.

43.2.3 Cladocera

Nei **Cladocera** marini (meno di 10 specie appartenenti agli ordini Onychopoda e Ctenopoda) l'uovo diapausale non viene prodotto e mantenuto all'interno di una camera di incubazione materna (efippio) come nei cladoceri d'acqua dolce. Il basso numero di uova diapausali (massimo due) che ciascuna femmina produce è un tasso di produzione relativo praticamente corrispondente a quello dei rotiferi. Il risultato in termini di abbondanza di tali uova nei sedimenti, però, è nettamente inferiore sia a quello dei Rotifera

che a quello dei Calanoida. Infatti nei primi, di dimensioni generalmente micro-zooplanctoniche, le femmine produttrici raggiungono concentrazioni molto più elevate di quelle dei cladoceri (meso-zooplanctonici). Nei secondi, di dimensioni paragonabili ai cladoceri, le femmine producono numerose uova al giorno, per molti giorni della loro esistenza (Ianora, 1998). Le uova diapausali dei Cladocera sono sferiche come in *Evadne* e in *Podon*, oppure ovali come in *Penilia*, e si distinguono nelle banche di cisti per essere molto più grandi delle altre (dimensioni medie da 150 a 250 μm) (Onbé, 1985; 1991). Queste grandi uova possono anche presentare la calcificazione dello strato esterno che conferisce loro un peso maggiore ed una maggiore velocità di affondamento (Braiko, 1966), oltre che una maggiore resistenza alle pressioni e alle scalfitture. La maggior parte di queste cisti è sempre liscia esternamente e mostra, inoltre, una netta stratificazione dell'involucro corionico che appare tipicamente ispessito. Le uova diapausali di *Penilia avirostris* presentano la caratteristica di essere a forma di scodella (concave da un solo lato).

43.2.4 Copepoda

I **Copepoda** rappresentano il gruppo più importante e numeroso nello zooplancton marino. Pur essendo presenti specie planctoniche in diversi ordini, è sicuramente l'ordine Calanoida quello più rappresentato e meglio adattato alla vita oloplanctonica in mare (Huys e Boxshall, 1994). Numerosi sono i casi riportati di specie che entrano in letargo nello stadio di copepodite, ma solo tra i Centropagoidea (*sensu* Huys & Boxshall, 1994) è largamente diffusa la capacità di produrre uova di durata appositamente programmate a superare il periodo avverso. Sazhina (1968) segnalò per prima l'esistenza di un uovo di durata, dalla superficie spinosa, morfologicamente distinguibile da quello subitaneo, a superficie liscia, nel ciclo vitale di *Pontella mediterranea* e *Centropages ponticus* del Mar Nero. Da allora, l'elenco di specie in grado di produrre uova di resistenza è stato ripetutamente aggiornato (Uye, 1985; Williams-Howze, 1997), arrivando a comprendere, oggi, almeno 50 specie (Mauchline, 1998). Le uova diapausali dei Calanoida sono sempre sferiche (diametro da 60 a 150 μm) e presentano nella maggior parte dei casi una superficie spinosa o diversamente scolpita. I Calanoida Centropagoidea marini, con poche eccezioni, depongono uova liberamente nell'acqua (Sazhina, 1987). Ne deriva che le uova diapausali, in aree neritiche, a causa delle loro dimensioni e della loro condizione inattiva, si comportano come particelle inerti di sedimento e finiscono con l'accumularsi in aree a basso idrodinamismo. Numerosi studi condotti a tutte le latitudini della fascia temperata hanno confermato che i sedimenti delle aree costiere contengono più uova di copepodi di quelli delle aree più pelagiche o profonde (Lindley, 1990; Marcus, 1995; Belmonte *et al.*, 1995), e che la quantità delle uova di resistenza nei sedimenti supera spesso quella delle popolazioni attive nella colonna d'acqua (Uye, 1985; Belmonte *et al.*, 1995; Katajisto *et al.*, 1998). Ogni femmina matura può giungere a produrre oltre 100 uova al giorno in alcune specie di Acartiidae e/o Centropagidae (Ianora, 1998; Ara, 2001). Questo è responsabile della predominanza numerica delle uova di Calanoida (mediamente da 10^4 a 10^6 m^{-2} di fondale) rispetto ai Rotifera (circa 10^4 m^{-2}) e ai Cladocera (da 10^3 a 10^5 m^{-2}) nelle banche di cisti (Hairston, 1996). In generale, le uova di resistenza dei Calanoida marini sono morfologicamente distinguibili da quelle subitane (ad es. Sazhina, 1968; Santella e Ianora, 1990; Ianora e Santella, 1991; Belmonte, 1992; 1997; Belmonte e Puce, 1994; Onoué *et al.*, 2004) in quanto presentano spine e processi di vario tipo sul chorion. In non poche specie, però, anche le uova subitane possono presentare processi corionici che vanno da tubercoli impercettibili al microscopio ottico sulle uova di *Pteriacartia josephinae* e *Acartia adriatica*, a spine brevi in *Paracartia latisetosa* e *A. tonsa*, a spine lunghe ma sottili in *A. italica*, a spine grossolane e ramificate in *Centropages typicus*. In tutti questi casi, però, la tendenza generale è, nelle uova diapausali, a irrobustire e/o allungare le spine, contemporaneamente all'ispessimento dello stesso corion. A causa della loro spinosità le uova diapausali dei Copepoda sono state anche confuse con cisti fossili di dinoflagellati, e chiamate *hystricosphaerae*, ma la fuoriuscita di naupli da queste cisti ha indubitatamente consentito di correggere questa errata attribuzione (McMinn *et al.*, 1992). Alla schiusa le uova di calanoidi si aprono secondo una linea di frattura equatoriale che

divide l'involucro esterno in due calotte emisferiche. A causa della variabilità morfologica intraspecifica, è ancora difficile un riconoscimento della specie sulla base della morfologia delle uova. Ciò nonostante sono evidenti spinosità tanto caratteristiche da essere state proposte per la identificazione delle specie (vedi ad es. Belmonte *et al.*, 1997; Belmonte, 1998), come Mura (1986) ha già proposto per i crostacei anostraci, e Foissner (2006) per i ciliati. Il rivestimento delle uova diapausali dei Calanoida, oltre che generalmente spinoso, appare di maggiore spessore ma non è mai calcificato, e le spine si formano all'esterno in breve tempo solo dopo la deposizione dell'uovo (Santella e Ianora, 1992).

43.3 METODI DI RACCOLTA

43.3.1 Siti di raccolta

La ricerca delle cisti è molto fruttifera nelle aree costiere dove il debole idrodinamismo consente loro di sedimentare e di accumularsi sul fondo. Di regola, quanto minore è la taglia dei grani del sedimento, tanto maggiore è, fino ad un certo punto, la probabilità di imbattersi in una banca di cisti.

Questo accade proprio in conseguenza del fatto che le cisti, in acqua, si comportano come particelle inerti di sedimento: esse sono incapaci di movimenti propri e tendono a scendere verso il fondo se la turbolenza o le correnti non le mantengono in sospensione e le sospingono altrove. Per le specie di aree confinate, le cisti che raggiungono il fondo assicurano il rifornimento della banca di cisti nel sedimento da cui l'intera popolazione planctonica si rigenera al ritorno delle condizioni favorevoli.

Anche l'ossigenazione del sedimento può essere inversamente corrispondente alla ricchezza delle banche di cisti. Infatti, la penuria di ossigeno sul fondo (anch'essa legata allo scarso idrodinamismo proprio delle aree confinate) impone condizioni proibitive per la schiusa/germinazione favorendo un accumulo di forme di resistenza che provengono dalla colonna d'acqua senza che poi queste restituiscano gli stadi attivi nei momenti favorevoli (Katajisto, 2004). La penuria (o assenza) di ossigeno dei fondali delle aree confinate favorisce l'accumulo di cisti anche per un'altra ragione: impedisce la vita agli animali potenziali consumatori delle cisti (qui considerate come risorsa trofica). Molti motivi (idrodinamismo, impedimento della schiusa, esclusione dei consumatori) rendono dunque possibile l'accumulo di cisti nei fondali anossici o ipossici delle aree confinate, e dovranno essere considerati nella pianificazione delle campagne di prelievo.

43.3.2 Campionamento dei sedimenti

La scelta del mezzo e del metodo è dettata dagli scopi dell'indagine (vedi Tab.1 in Montresor *et al.*, questo volume). Campioni di sedimento non rimescolati e utili per indagini quantitative (che tengano conto dei rapporti numerici delle singole forme nell'intera comunità di cisti) possono essere prelevati con box-corer, multi-corer, carotatori a gravità, o a mano, limitando l'uso di benne a scopi qualitativi e/o ad esperimenti di germinazione legati a singole specie. I campionatori azionati a distanza sono indispensabili per i prelievi in bacini profondi. Essendo i bacini costieri confinati quelli generalmente più ricchi di cisti, la bassa profondità e la necessità di raccogliere sedimenti "indisturbati" può essere soddisfatta con il campionamento "a vista" in immersione con ARA, utilizzando dei carotatori manuali in plexiglas, in modo da poter osservare la condizione del sedimento all'interno delle carote durante l'operazione di raccolta. L'estrazione di carote di sedimento non rimescolato è essenziale per eventuali analisi sia chimiche che biologiche da condurre sui vari livelli della stratificazione.

A causa della minore densità di cisti dello zooplankton, rispetto a quelle del fitoplankton, le quantità di sedimento raccolte devono essere generalmente maggiori, dell'ordine non inferiore a 10 ml di sedimento

umido per campione, in modo da poter ricavare, con le tecniche di estrazione descritte di seguito, sufficienti abbondanze numeriche di uova. Per campione, in una carota stratificata, si intende la singola sezione che da questa si può ricavare; dunque il diametro della carota va calcolato a seconda dello spessore delle sezioni (1/2, 1, 2 o 3 cm).

Una volta stabilito il sito e il diametro del carotatore da adoperare, sarà bene procedere con repliche (almeno triplici) di prelievi per ottenere una base statistica solida su cui fondare le conclusioni relative a ciascuna singola stazione di campionamento.

43.3.3 Trappole per sedimento

Anche per lo zooplancton, per studi che tengano conto della dinamica di produzione delle uova di resistenza è utile l'uso di trappole per sedimento sospese lungo la colonna d'acqua oppure collocate in prossimità del fondo (vedi paragrafo 1.2.2 in Montresor *et al.*, questo volume).

Anche in questo caso, data la minore densità degli organismi zooplanctonici, rispetto a quelli fitoplanctonici, che si traduce in un minore flusso di cisti per unità di superficie, occorre utilizzare trappole con una bocca più ampia, o con un collettore, al fine di aumentare la superficie di raccolta.

Per analizzare la dinamica inversa, cioè l'apporto di stadi attivi alle comunità planctoniche, si possono usare trappole inverse da collocare *in situ* o microcosmi in laboratorio. Per diversi motivi (e.g. la taglia, le densità, una diversa sensibilità agli stimoli luminosi), con gli organismi zooplanctonici è più semplice pianificare esperimenti con trappole inverse *in situ*, rispetto al fitoplancton, tanto che in alcuni casi sono stati utilizzati semplici contenitori in plastica infissi nel sedimento con delle piccole bottiglie inserite sul loro fondo nelle quali si raccolgono le larve o gli adulti schiusi dalle uova nei sedimenti (Caceres, 1998).

43.3.4 Conservazione dei campioni

I sedimenti raccolti possono essere conservati "umidi" ma devono essere mantenuti al buio e a bassa temperatura (generalmente inferiore a quella del sito di prelievo) per evitare schiuse incontrollate di cisti, fino al momento dell'analisi (che può essere prevista anche a distanza di mesi dal prelievo). L'utilizzo di fissativi è da evitare se si prevede di condurre esperimenti di schiusa, altrimenti i campioni di sedimento o delle trappole, vanno fissati in formalina al 5%.

43.4 ANALISI QUALI-QUANTITATIVA

43.4.1 Filtrazione per taglia

Nel caso in cui il sedimento di un'area sia particolarmente ricco di forme di resistenza, avendolo osservato in studi precedenti, oppure, al contrario, nel caso di nuovi studi, per avere una prima grossolana idea di quello che si potrà trovare, può essere utilizzata una semplice metodica di filtrazione per taglia, in modo da ottenere frazioni di sedimento con particelle dalle dimensioni paragonabili e poter cercare le cisti senza cambiare ingrandimento al microscopio. Occorre raccogliere comunque una sufficiente quantità di sedimento (circa 200 ml) poiché, per quanto numerose le cisti possano essere, rappresenteranno sempre la parte minore del campione raccolto e, in più, tra di esse solo alcune saranno abbondanti e molte saranno rare, per cui la quantità di sedimento analizzata consente di avere una risposta sulle abbondanze relative dei diversi tipi, la cui affidabilità è direttamente proporzionale alla quantità di sedimento considerata.

Nel procedimento di filtrazione frazionata (per taglia) si può usare come vuoto di maglia più basso (dei filtri/setacci adoperati) quello di 45-48 μm e più alto quello di 250 μm , con la possibilità di interporre anche un setaccio da 125 μm per frazionare ulteriormente il campione di sedimento.

La filtrazione per taglia è applicabile sia a campioni fissati che non fissati. Nel primo caso occorre effettuare tutte le procedure previste sotto cappa e utilizzare vetreria e setacci diversi da quelli utilizzati per i campioni non fissati, per evitare eventuali condizionamenti dei processi di schiusa/germinazione che si volessero allestire.

Attrezzature e materiale

- Cilindri in vetro graduati (100 ml)
- Setacci con maglia d'acciaio (45/48, 125 e 250 μm)
- Spatolina d'acciaio
- Pipette Pasteur
- Cristallizzatori in vetro (200 ml)
- Spruzzette
- Acqua di mare filtrata (0,45 μm)
- Bagno ad ultrasuoni

Procedura

Il metodo prevede le seguenti operazioni:

- Omogeneizzare il campione con la spatolina, prelevarne un'aliquota (circa 10 ml) e misurarne con precisione il volume nel cilindro graduato ed il peso umido;
- Lavare con acqua di mare filtrata sul setaccio da 45 μm di maglia per eliminare la frazione più sottile del sedimento;
- Sonicare a bassa frequenza per 3 minuti, per separare le cisti dalle particelle di sedimento e disgregare il sedimento conglomerato;
- Lavare con acqua di mare filtrata su batteria di setacci (250, 125, 45 μm) per separare le cisti di diversa taglia.

In questa maniera sul setaccio da 45 μm si raccoglie la frazione più fine che contiene il maggior numero di forme di resistenza (e.g. ciliati, rotiferi, copepodi), mentre le frazioni superiori a 125 e 250 μm conterranno le più grandi come quelle dei cladoceri.

Come accennato prima, questo metodo è preferibile quando si ha a che fare con grandi densità di cisti o quando si affronta per la prima volta lo studio della banca in una determinata area, poiché questo metodo permette l'osservazione di tutti i morfotipi presenti, a patto di utilizzare adeguate quantità di sedimento. L'analisi non è particolarmente laboriosa in quanto può essere condotta a 100 ingrandimenti, quindi abbastanza velocemente.

In seguito, specialmente se si vuole condurre studi su determinate specie o morfotipi, sarà opportuno stabilire una finestra di dimensioni più stretta e centrata sulle dimensioni medie della forma da studiare.

43.4.2 Separazione per centrifugazione

Nel caso in cui il sedimento di un'area non sia particolarmente ricco di forme di resistenza, oppure, nel caso di nuovi studi in cui non si prevede di trovare abbondanze elevate di forme di resistenza, la semplice metodica di filtrazione per taglia può essere integrata con la separazione per centrifugazione.

Nella separazione per centrifugazione si separano diverse particelle presenti nel campione di sedimento basandosi sulle diverse velocità di sedimentazione dovute alle differenze tra le rispettive densità e dimensioni. L'operazione è particolarmente utile per la separazione delle cisti animali dal momento che queste raramente presentano calcificazione (e dunque appesantimento) della parete. Ad ogni centrifugata,

troveremo sul fondo della provetta un pellet (o sedimento) contenente le particelle minerali inorganiche che sedimentano alla velocità utilizzata e il sovranatante, generalmente una soluzione satura, contenente le particelle organiche meno dense.

La centrifugazione richiede una attenta separazione delle particelle e dei grumi che spesso si rinven-
gono. Un uovo, per quanto non calcificato, se “sporco” o aggregato a particelle minerali, verrà trascinato
sul fondo del tubo da centrifuga ugualmente.

Il metodo è consigliato per isolare cisti specifiche. Una volta stabilite quali sono le più abbondanti
o, in alternativa, se si vuole lavorare con cisti di un certo *taxon*, si sceglie una finestra dimensionale re-
lativamente stretta e, isolate le particelle di sedimento di quella taglia con filtrazione frazionata, si procede
con la centrifugazione a isolare le cisti dalle particelle minerali inorganiche.

Attrezzature e materiale

- Cilindri in vetro graduati (100 ml)
- Bilancia digitale
- Setacci con maglia d'acciaio (45/48, 125 e 250 μm)
- Spatolina d'acciaio
- Pipette Pasteur
- Cristallizzatori in vetro (200 ml)
- Spruzzette
- Acqua di mare filtrata (0,45 μm)
- Centrifuga
- Bagno ad ultrasuoni

Procedura

Le forme di resistenza vengono isolate dal sedimento a grana fine utilizzando il metodo di Onbé (1978)-
Marcus (1990), modificato per quanto concerne le dimensioni del vuoto di maglia dei filtri.

Il metodo prevede le seguenti operazioni:

- Filtrare sotto acqua corrente utilizzando 2 filtri in colonna; quello superiore da 250 μm , quello
inferiore da 45 μm (per tutte le cisti animali; un intervallo più stretto si userà per cisti meglio iden-
tificate). Effettuare la fase finale di filtrazione utilizzando acqua di mare filtrata (0,45 μm);
- Sonicare a (4-5 set con un Branson Sonifier 2200), per 3 minuti allo scopo di rompere i grumi e
di isolare le particelle;
- Rifiltrare sotto acqua corrente;
- Preparare una soluzione 1:1 di saccarosio:acqua distillata;
- Versare il campione filtrato nei tubi da centrifuga;
- Centrifugare con la soluzione di saccarosio a 3000 rpm per 2,5 minuti;
- Filtrare il sovrinatante utilizzando il setaccio da 45 μm ;
- Lavare con acqua di mare filtrata

Quando si utilizza la centrifuga, i pesi che vengono caricati sul rotore devono essere bilanciati.

Le provette vanno sempre caricate a coppie e preparate in modo che abbiano lo stesso peso, pesandole
con tutto quanto andrà in centrifuga. Nel rotore vengono caricate una di fronte all'altra, e se non abbiamo
tutte le coppie di provette si allestiscono dei cosiddetti “bilancini” riempiendo provette analoghe con
acqua o con la soluzione che si sta utilizzando.

Le provette vanno riempite di solito al giusto livello, che dipende dal tipo di centrifuga utilizzata e
dalle velocità. Ovviamente non vanno mai riempite fino all'orlo, e neppure devono essere troppo vuote.
Bisogna però stare anche attenti a non utilizzare provette sovradimensionate per il nostro lavoro, perché
non è mai corretto diluire troppo il campione per ottenere il volume giusto.

In questa maniera sul setaccio da 45 μm si raccoglie la frazione più fine (45-250 μm) che contiene
il maggior numero di cisti, mentre sul setaccio da 250 μm , la frazione superiore raccolta (> 250 μm)
sarà quella che contiene le cisti più grandi (vedi Moscatello e Belmonte, 2009).

Consigliamo l'utilizzo di questo metodo nel caso in cui si affronti lo studio degli stadi di resistenza per la prima volta e/o quando ci si appresta a studiare il popolamento di nuove aree. Il metodo di filtrazione per taglia integrato con la centrifugazione differenziale permette infatti l'osservazione al microscopio di tutti i morfotipi presenti nel campione. L'altro grande vantaggio di questo metodo è l'ottenimento di un campione di cisti molto "pulito" e libero delle particelle minerali di sedimento.

Questo metodo, invece, non è consigliabile per studi quantitativi, dal momento che non garantisce la restituzione di tutte le cisti presenti nel campione (molte potrebbero essere trascinate sul fondo dalle particelle minerali del sedimento durante la centrifugazione).

43.4.3 Analisi e riconoscimento del materiale isolato

Comunque sia avvenuta la concentrazione del campione (per filtrazione frazionata o per centrifugazione), la porzione di campione rimanente nel setaccio in cui si effettua l'ultimo lavaggio, va raccolta e predisposta per l'analisi al microscopio, dove sarà effettuato il riconoscimento e la classificazione delle diverse tipologie, la valutazione della loro abbondanza ed, eventualmente, la separazione dei morfotipi principali per successive operazioni di misurazione e/o di schiusa/germinazione.

Attrezzature e materiale

- Micropipetta P1000
- Cristallizzatori in vetro
- Spruzzette
- Acqua di mare filtrata (0,45 µm)
- Piastre per conteggi (piccole piastre di Petri, quadrettate)
- Microscopio ottico invertito.

Procedura

- Decidere preventivamente il volume minimo di campione da analizzare (1/3, 1/5 del volume del campione preparato con le modalità illustrate in precedenza);
- Questa valutazione va fatta sulla base di un'analisi preliminare che permette di individuare tale valore soglia, oltre il quale l'accuratezza dell'analisi non ha un miglioramento significativo. Tutto questo al fine di rendere il più piccolo possibile, e soprattutto sempre uguale, l'errore che si fa nella stima quantitativa. Un semplice test che può essere utilizzato a questo scopo è quello che prevede un'analisi di dati basata sulla relazione tra l'errore standard del numero di elementi da considerare ed il volume del sub-campione (vedi Bros e Cowell, 1987). Questa analisi va ripetuta ogni qualvolta si analizzano campioni di un'area non studiata in precedenza.
- Rapportare i dati di conteggio ad unità di volume (1 ml o 100 ml);
- Suddividere le forme di resistenza sulla base delle loro caratteristiche morfologiche (dimensioni, colore, forma, tipologia di sculture superficiali) e attribuirle grossolanamente alle diverse categorie (Ciliophora, Rotifera, Copepoda, Cladocera) sulla base delle caratteristiche distintive indicate nel secondo paragrafo di questo capitolo.

43.5 SCHIUSA DELLE FORME DI RESISTENZA

In molti casi l'identificazione a livello di specie è possibile solo con l'osservazione dello stadio attivo. Esperimenti di schiusa devono essere condotti per dimostrare il legame biologico esistente tra le forme attive e le cisti e confermare le identificazioni basate sulla morfologia delle cisti.

Nel caso dei protisti la schiusa già produce una cellula mobile identificabile. Nel caso dei metazoi, invece, ad eccezione dei rotiferi, lo stadio che schiude dalla cisti, cioè la larva o il giovane, non è sempre

identificabile a livello di specie, per cui è indispensabile consentire ai primi stadi larvali di raggiungere lo stadio adulto. Questo può richiedere anche un mese di allevamento nei copepodi, con tutti i problemi derivanti dal tasso di sopravvivenza di ciascuno stadio ed età.

In molti lavori sono proposte figure e fotografie di cisti per aiutare l'identificazione dei *taxa* (ad es. Belmonte *et al.*, 1995; Boero *et al.*, 1996; Pati *et al.*, 1999; Rubino *et al.*, 2000; Della Tommasa *et al.*, 2004; Moscatello *et al.*, 2004; Moscatello e Belmonte, 2004; 2009), ma ancora non esiste una proposta editoriale, sotto forma ad esempio di un atlante, che possa soddisfare le esigenze di un eventuale studioso di banche di cisti nei sedimenti marini.

I fattori che inducono la schiusa delle forme di resistenza mature sono noti solo per un numero limitato di specie. In generale, per le specie di zone temperate un primo stimolo alla schiusa è fornito da un aumento della temperatura (Ito, 1960). L'esposizione alla luce (fotoperiodo) può favorire e accelerare la schiusa di alcune specie (Van der Linden *et al.*, 1985; Hagiwara e Hino, 1989); a volte tuttavia la schiusa può avvenire spontaneamente senza alcuno stimolo esterno (Anderson *et al.*, 2003).

Ne consegue che le indicazioni fornite di seguito rappresentano dei suggerimenti generali su come indurre la schiusa di stadi di resistenza. Studi più dettagliati, che tengano in considerazione altri fattori (ad esempio la salinità), potranno essere pianificati in relazione alle diverse specie ed alle specifiche domande della ricerca in corso.

Attrezzature e materiale

- Pipetta Pasteur di vetro con punta assottigliata o micro pipette;
- Acqua di mare filtrata (0,45µm);
- Piastre per colture cellulari (96 o 24 pozzetti);
- Antibiotico (streptomicina-penicillina 1:1);
- Parafilm;
- Camera termostata;
- Microscopio invertito

L'isolamento delle singole cisti dal sedimento può essere effettuato a partire dal sedimento semplicemente setacciato o dalla frazione arricchita in cisti che si ottiene dopo centrifugazione. Entrambi i metodi prevedono la sonicazione del campione; tale trattamento non dovrebbe danneggiare le cisti, ma si raccomanda comunque di non utilizzare intensità elevate e/o di sonicare il campione per un tempo troppo lungo, per evitare che ciò comprometta in qualche modo i dati di schiusa che si dovessero ottenere. La schiusa delle cisti è un processo legato alla strategia di affermazione delle singole specie, sia in connessione del periodo programmato da trascorrere in letargo, sia in dipendenza del rischio giocato sull'anticipo delle altre specie per ottenere un vantaggio dalla acquisizione di risorse in assenza di competitori. A causa di questa strategia (bet hedging di Philippi e Seger, 1989) non tutte le cisti schiudono insieme né esiste un tempo definito di durata del letargo per ciascuna specie.

Può dunque risultare utile ottenere i tassi e i tempi di schiusa di ciascuna specie, registrando le schiuse che avvengono nel tempo, senza stimolarla o forzarla.

Procedura

- Prendere in considerazione le forme di resistenza più abbondanti;
- Passare le cisti in acqua di mare filtrata prima di introdurle nella piastra di coltura, una per ogni pozzetto. Le singole cisti sono poste nei pozzetti di piastre per colture cellulari (preferibilmente da 24 pozzetti da 2 ml) che permettono l'osservazione del materiale con microscopio invertito;
- Aggiungere in ogni pozzetto acqua di mare filtrata;
- Aggiungere antibiotico in rapporto 1:100;
- Chiudere le piastre accuratamente con il parafilm, per limitare l'evaporazione;
- Collocare le piastre nelle camere termostate predisposte a diverse combinazioni di temperatura

e fotoperiodo. La temperatura a cui le forme di resistenza vanno incubate dipende dal tipo di materiale oggetto del nostro studio e dalle caratteristiche della zona in cui sono stati prelevati i sedimenti. Per cisti raccolte in sedimenti marini di acque temperate italiane, possiamo consigliare una temperatura di incubazione compresa fra 14 e 23°C. La temperatura di incubazione deve essere simile o leggermente più elevata di quella del sedimento da cui sono stati prelevati i campioni. Per quanto riguarda la durata del fotoperiodo, si adottano 12:12 h luce:buio e 14:10 h luce:buio che simulano rispettivamente un fotoperiodo “primaverile o autunnale” e un fotoperiodo “estivo”;

- Osservare le piastre con una frequenza quotidiana durante la prima settimana, di 2-3 volte durante la seconda settimana, 1-2 volte nelle settimane successive fino al primo mese di controllo, utilizzando un microscopio invertito, per verificare l'avvenuta schiusa. Se non si riscontra germinazione entro 3-4 settimane, è altamente probabile che le forme di resistenza non siano vitali o che non siano nelle condizioni ideali per la schiusa;
- Gli stadi attivi ottenuti dagli esperimenti di schiusa possono essere prelevati e utilizzati per allestire un allevamento per ulteriori studi.

43.6 BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON D. M., FUKUYO Y., MATSUOKA K. (2003) - Cyst methodologies. In: Hallegraeff, G. M., Anderson, D. M. E Cembella, A. D. (Eds.) *Manual on Harmful Marine Microalgae. Monographs on Oceanographic Methodology*. 11th ed. UNESCO, Paris: 165-190.
- ARA K. (2001) - Daily egg production rate of the calanoid copepod *Acartia lilljeborgi* Giesbrecht in the Cananéia lagoon estuarine system, São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia*, **445**: 205-215.
- BELMONTE G. (1992) - Diapause egg production in *Acartia (Paracartia) latisetosa* (Crustacea, Copepoda, Calanoida). *Bollettino di Zoologia*, **59**: 363-366.
- BELMONTE G. (1997) - Resting eggs in the life cycle of *Acartia italica* and *A. adriatica* (Copepoda, Calanoida, Acartiidae). *Crustaceana*, **70**: 114-117.
- BELMONTE G. (1998) - The egg morphology of 7 Acartiidae species. A preliminary survey for the ootaxonomy of calanoids. *J. Mar. Syst.*, **15**: 35-39.
- BELMONTE G., CASTELLO P., PICCINNI M.R., QUARTA S., RUBINO F., GERACI S., BOERO F. (1995) - Resting stages in marine sediments off the Italian coast. In Elefteriou A. et al. (eds) *Biology and ecology of shallow coastal waters*, Olsen & Olsen Publ., Fredensborg: 53-58.
- BELMONTE G., MIGLIETTA A., RUBINO F., BOERO F. (1997) - Morphological convergence of resting stages produced by planktonic organisms: a review. *Hydrobiologia*, **335**: 159-165.
- BELMONTE G., PATI A.C. (2007) - Hatching rate and diapause duration in eggs of *Paracartia latisetosa* (Copepoda: Calanoida). *J. Plankton Res.*, **29**: 139-147.
- BELMONTE G., PUCE M. (1994) - Morphological aspects of subitaneous and resting eggs from *Acartia josephinae* (Calanoida). *Hydrobiologia*, **292/293**: 131-135.
- BOERO F., BELMONTE G., FANELLI G., PIRAINO S., RUBINO F. (1996) - The continuity of living matter and the discontinuities of its constituents: do plankton and benthos really exist? *Trends Ecol. Evol.*, **11**: 177-180.
- BRAIKO V.D. (1966) - Biology of the winter eggs of *Penilia avirostris*. *Doklady Biological Sciences* (English traduction of *Doklady Academic Nauk SSSR*), **170**: 681-683.
- BROS W.E., COWELL B.C. (1987) - A technique for optimising sample size (replication). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **114**: 63-71.
- CACERES C. (1998) - Interspecific variation in the abundance, production and emergence of *Daphnia* diapausing eggs. *Ecology*, **79**: 1699-1710.
- DELLA TOMMASA L., DANOVARO R., BELMONTE G., BOERO F. (2004) - Resting stage abundance in the biogenic fraction of surface sediments from the deep Mediterranean Sea. *Sci. Mar.*, **68**: 101-113.
- FAURÉ-FREMIET E. (1948) - Le rythme de maree du *Strombidium oculatum* Gruber. *Bulletin Biologique Fr.Bel.*, **82**: 3-23.

-
- FOISSNER W., MÜLLER H., AGATHA S. (2007) - A comparative fine structural and phylogenetic analysis of resting cysts in oligotrich and hypotrich Spirotrichea (Ciliophora). *Eur. J. Protistol.*, **43**: 295-314.
- FOISSNER W., MÜLLER H., WEISSE T. (2005) - The unusual, lepidosome coated resting cyst of *Meseres corlissi* (Ciliophora: Oligotrichea): light and scanning electron microscopy, cytochemistry. *Acta Protozoologica*, **44**: 201-215.
- FOISSNER W. (2006) – Biogeography and dispersal of micro-organisms: A review emphasizing protests. *Acta Protozool.*, **45**: 111-136.
- HAGIWARA A., HINO E. (1989) - Effect of incubation and preservation of resting egg hatching and mixis in the derived clones of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Hydrobiologia*, **186/187**: 415-421.
- HAIRSTON N.G. Jr. (1996) - Zooplankton egg banks as biotic reservoirs in changing environments. *Limnol. Oceanogr.*, **41**: 1087-1092.
- HUYS R., BOXSHALL G. (1994) - *Copepod Evolution*. The Ray Society, London: 468 pp.
- IANORA A. (1998) - Copepod life history traits in subtemperate regions. *J. Mar. Syst.*, **15**: 337-349.
- IANORA A., SANTELLA L. (1991) - Diapause embryos in the neustonic copepod *Anomalocera patersoni*. *Mar. Biol.*, **108**: 387-394.
- ITO T. (1960) - On the culture of the mixohaline rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Müller in the sea water. *Rep. Fac. Fisheries, Prefect. Univ. Mic.*, **3**: 708-740.
- JONSSON P.R. (1994) - Tidal rhythm of cyst formation in the rock pool ciliate *Strombidium oculatum* Gruber (Ciliophora, Oligotrichida): a description of the functional biology and an analysis of the tidal synchronization of encystment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **175**: 77-103.
- KAMIYAMA T., AIZAWA Y. (1990) - Excystment of tintinnids ciliates from marine sediment. *Bul. Plankton Soc. Japan*, **36**: 137-139.
- KATAJISTO T. (2004) - Effects of anoxia and hypoxia on the dormancy and survival of subitaneous eggs of *Acartia bifilosa* (Copepoda: Calanoida). *Mar. Biol.*, **145**: 751-757.
- KATAJISTO T., VIITASALO M., KOSKI M. (1998) - Seasonal occurrence and hatching of calanoid eggs in sediments of the northern Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **163**: 133-143.
- KIM Y.-O., SUZUKI T., TANIGUCHI A. (2002) - A new species in the genus *Cyrtostrombidium* (Ciliophora, Oligotrichia, Oligotrichida): its morphology, seasonal cycle and resting stage. *J. Eukaryot. Microbiology*, **49**: 338-343.
- KIM Y.-O., TANIGUCHI A. (1995) - Excystment of the oligotrich ciliate *Strombidium conicum*. *Aquat. Microb. Ecol.*, **9**: 149-156.
- KIM Y.-O., TANIGUCHI A. (1997) - Seasonal variation of excystment pattern of the planktonic oligotrich ciliate *Strombidium conicum*. *Mar. Biol.*, **128**: 207-212.
- LINDLEY J.A. (1990) - Distribution of over-wintering calanoid copepod eggs in sea bed sediments of the English Channel and southern North Sea. *J. Plankton Res.*, **8**: 399-400.
- MARCUS N.H. (1990) - Calanoid copepod, cladoceran, and rotifer eggs in sea-bottom sediments of northern Californian coastal waters: identification, occurrence and hatching. *Mar. Biol.*, **105**: 413-418.
- MARCUS N.H. (1995) - Seasonal study of planktonic copepods and their benthic resting eggs in northern California coastal waters. *Mar. Biol.*, **123**: 459-465.
- MAUCHLINE J. (1998) - *The Biology of calanoid copepods*. Advances in Marine Biology. Academic Press San Diego. **33**: 1-710.
- MCMINN A., BOLCH C.J.S., HALLEGRAEFF G. (1992) - *Cobricopshaeridium* Harland & Sarjeant: dinoflagellate cyst or copepod egg? *Micropaleontology*, **38**: 315-316.
- MEUNIER A. (1910) - *Microplankton des mers de Barents et de Kara. Campagne Arctique de 1907 du Duc d'Orléans*. Bruxelles, Bulens: 335pp.
- MONTAGNES D.J.S, LOWE C.D., POULTON A., JONSSON P.R. (2002) - Redescription of *Strombidium oculatum* Gruber 1884 (Ciliophora, Oligotrichia), *J. Eukaryot. Microbiology*, **49**: 329-337.
- MOSCATELLO S., BELMONTE G. (2004) - Active and resting stages of zooplankton and its seasonal evolution in a hypersaline temporary pond of the Mediterranean coast (the “Vecchia Salina”, SE Italy). *Sci. Mar.*, **68**: 491-500.
- MOSCATELLO S., BELMONTE G. (2009) - Egg banks in hypersaline lakes of the South-East Europe. *Saline Systems.*, **3**: 5.
- MOSCATELLO S., RUBINO F., SARACINO O.D., FANELLI G., BELMONTE G., BOERO F. (2004) – Plankton biodiversity around the Salento Peninsula (South East Italy): an integrated water/sediment approach. *Sci. Mar.*, **68**: 85-102.

-
- MURA G. (1986) - SEM morphological survey on the egg shelling the Italian anostracans (Crustacea, Branchiopoda). *Hydrobiologia*, **134**: 273-286.
- ONBÉ T. (1978) - Sugar flotation method for sorting the resting eggs of marine cladocerans and copepods from sea-bottom sediments. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **44**: 1411.
- ONBÉ T. (1985) - Seasonal fluctuations in the abundance of populations of marine cladocerans and their resting eggs in the Inland Sea of Japan. *Mar. Biol.*, **87**: 83-88.
- ONBÉ T. (1991) - Some aspects of the biology of resting eggs of marine cladocerans. In Wenner A., Kuris, A. (Eds.) *Crustacean Egg Production*. Crustacean Issues 7, plates I-III. A.A. Balkema, Rotterdam, Netherlands: 41-45
- ONOUÉ Y., TODA T., BAN S. (2004) - Morphological features and hatching patterns of eggs in *Acartia steueri* (Crustacea, Copepoda) from Sagami Bay, Japan. *Hydrobiologia*, **511**: 17-24.
- PARANJAPE M. (1980) - Occurrence and significance of resting cysts in a hyaline tintinnis, *Helicostomella subulata* (Ehre.) Jorgensen. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **48**: 23-34.
- PATI A.C., BELMONTE G., CECCHERELLI V.U., BOERO F. (1999) - The inactive temporary component: an unexplored fraction of the meiobenthos. *Mar. Biol.*, **134**: 419-427.
- PHILIPPI T., J. SEGER, 1989 – Hedging onès evolutionary bets, revisited. *Trends Ecol. Evol.*, **4**(2): 41-44.
- REID P.C. (1987) - Mass encystment of a planktonic oligotrich ciliate. *Mar. Biol.*, **95**: 221-230.
- REID P.C., JOHN A.W.G. (1978) - Tintinnid cysts. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, **58**: 551-557.
- REID P.C., JOHN A.W.G. (1983) - Resting cysts in the ciliate class Polyhymenophorea: phylogenetic implications. *J. Protozool.*, **30**: 710-712.
- RUBINO F., BELMONTE G., MIGLIETTA A.M., GERACI S., BOERO F. (2000) - Resting stages of plankton in Recent North Adriatic sediments. *Mar. Ecol. P.S.Z.N.I*, **21**: 263-284.
- SANTELLA L., IANORA A. (1990) - Subitaneous and diapause eggs in Mediterranean populations of *Pontella mediterranea* (Copepoda: Calanoida): a morphological study. *Mar. Biol.*, **104**: 83-90.
- SANTELLA L., IANORA A. (1992) - Fertilization envelope in diapause eggs of *Pontella mediterranea* (Crustacea, Copepoda). *Molecular Reproduction and Development*, **33**: 463-469.
- SAZHINA L.I. (1968) - O zhimuyushchik yaitsak morskik Calanoida. *Zoological Journal*, **47**: 1554-1556. (in Russian).
- SAZHINA L.I. (1987) - *Rashmioshenie, rost, produkziya morskik veslonogik rakoobrashiyyk*. Naukova Dumka, Kyev: 155 pp. (in Russian).
- UYE S.-I. (1985) - Resting egg production as a life-cycle strategy of marine planktonic copepods. *Bull. Mar. Sci.*, **37**: 440-449.
- VAN DER LINDEN A., BLUST R., DECLEIR W. (1985) - The influence of light on the hatching of *Artemia* cysts. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **92**: 207-214.
- VIIITASALO M., T. KATAJISTO (1994) - Mesozooplankton resting eggs in the Baltic Sea: identification and vertical distribution in laminated and mixed sediments. *Mar. Biol.*, **120**: 455-465.
- WILLIAMS-HOWZE J. (1997) - Dormancy in the free-living copepod orders Cyclopoida, Calanoida, and Harpacticoida. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **35**: 257-321.

CAPITOLO 44. LA RACCOLTA DEL PLANCTON GELATINOSO

F. Boero, P. Licandro

e-mail: boero@unisalento.it

e-mail: prli@sahfos.ac.uk

44.1 INTRODUZIONE

Il plancton gelatinoso è composto da organismi che hanno grande abbondanza di matrice extracellulare nei loro corpi, quella che un tempo veniva chiamata “gelatina” e che è costituita per più del 90% in acqua. I principali rappresentanti del plancton gelatinoso sono gli cnidari (e.g. le meduse), gli ctenofori (e.g. *Pleurobrachia rhodopis* volgarmente detta “ribes di mare”) ed i tunicati pelagici che comprendono appendicolarie e taliacei, ma anche i molluschi eteropodi e pteropodi possono essere ascritti a questa categoria.

Il plancton gelatinoso è rappresentato da organismi dalle forme e dimensioni fra le più svariate. Ad esempio le forme più piccole di meduse appena nate possono essere inferiori al millimetro mentre quelle di maggiori dimensioni, le meduse degli Scyphozoa, possono avere anche due o tre metri di diametro dell’ombrello e tentacoli lunghi anche venti metri. I taliacei, con i pirosoni e le salpe, possono formare delle colonie delicate e trasparenti che assomigliano a “catenelle” lunghe anche qualche decina di metri. È evidente che non è possibile campionare tutti questi organismi impiegando un unico metodo di campionamento. Qui di seguito sono riportate diverse tecniche di osservazione e campionamento del plancton gelatinoso.

44.2 RACCOLTA CON RETINI E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

Il plancton gelatinoso di piccole dimensioni (ovvero di misura compresa tra meno di 1 mm e 2 cm) può essere raccolto facilmente con i retini da plancton che si usano per catturare i crostacei. Se si guarda con occhio attento un campione “a crostacei” è, infatti, possibile individuare numerosissime specie di plancton gelatinoso. La maglia del retino, di 200-250 μm , deve essere preferibilmente di seta in modo da danneggiare il meno possibile le forme più delicate di gelatinosi, la bocca della rete deve essere di diametro compreso tra 30 cm e 1 m, ed il cavo di traino deve essere almeno una cinquantina di metri, per le raccolte in orizzontale, in modo che l’imbarcazione non interferisca con gli organismi da campionare.

All’Observatoire Océanologique di Villefranche sur-mer (Francia) dove il plancton gelatinoso è stato oggetto di studio fin dalla fine dell’ottocento, Braconnot e Carré hanno messo a punto negli anni ’60 una rete, il Filet Régent, con bocca di 1 m di diametro, maglie di seta di 690 μm e collettore a fondo mobile (Braconnot, 1971). La rete Régent permette di raccogliere campioni quantitativamente rappresentativi di meduse, sifonofori, salpe e ctenofori ancora in ottime condizioni.

La parte delicata della raccolta del plancton gelatinoso non è tanto la raccolta stessa quanto il trattamento del campione. La fissazione dei crostacei non richiede accorgimenti particolari per evitare che gli esemplari si deformino, mentre il plancton gelatinoso richiede un trattamento anestetico prima di essere fissato. L’anestetico non è necessariamente identico per ogni gruppo e, a volte, specie dello stesso genere possono rispondere in modo diverso ai vari trattamenti. L’utilizzo di piccole dosi di anestetico (circa 1 mg dm^{-3}) M.S. 222 (Sandoz) si è rivelato molto efficace per immobilizzare i blastozoidi di salpe, senza provocare movimenti scomposti che possono causare la rottura delle catenelle in cui questi planctonti si trovano normalmente aggregati. Il cloruro di magnesio al 6% in acqua dolce, aggiunto goccia a goccia al campione da trattare è di solito l’anestetico più utilizzato. Si possono anche aggiungere cristalli di mentolo, oppure gocce di formalina. Un modo infallibile per “fissare” qualunque animale è di preparare

una soluzione di Bouin (un fissativo istologico a base di acido picrico) in quantità pari all'acqua in cui è immerso il campione. Si deve mettere il contenitore del campione in un recipiente più grande e, poi, gettare il Bouin sul campione, in modo che sostituisca all'improvviso l'acqua in cui si trova. Il liquido in eccesso deborderà nel contenitore più grande che dovrà comunque essere ispezionato poiché potrebbe contenere esemplari. Il Bouin di solito "congela" gli organismi, uccidendoli all'istante e non permettendo loro di contrarsi. Dopo uno o due giorni gli esemplari devono essere trasferiti o in formalina al 10% o in alcool al 75%.

Il modo migliore per studiare il plancton gelatinoso di piccole dimensioni, comunque, consiste nel guardare i campioni ancora vivi, isolare le varie specie e anestetizzarle una ad una.

Le peschate verticali in acque pelagiche richiedono retini di maggiori dimensioni. Questo perché il plancton gelatinoso è spesso rappresentato da animali a distribuzione rada ed è quindi necessario filtrare una maggiore quantità di acqua per concentrarne un numero sufficientemente rappresentativo. Ciò non significa che questi 'grandi gelatinosi' non rivestano un ruolo importante nell'ambiente marino. Spesso, infatti, i rappresentanti del plancton gelatinoso tendono a non intralciarsi nelle loro attività di filtrazione: una medusa con ombrello di 30 cm può avere tentacoli lunghi anche 6 m e tenderà a stare a una distanza doppia dalle sue simili (la lunghezza dei suoi tentacoli e quella dei tentacoli delle altre meduse). Funzionalmente, l'animale è grande sei metri (il raggio d'azione dei suoi tentacoli), ma lo si cattura solo se si prende l'ombrello di 30 cm. Le stesse proporzioni valgono per animali di 3 cm che hanno tentacoli di 60 cm. Una volta catturate, comunque, le meduse contraggono i tentacoli e queste caratteristiche scompaiono.

44.3 CENSIMENTI VISUALI

Quando il plancton gelatinoso (sia di cnidari, di ctenofori o di taliacei) è rappresentato da moltissimi organismi, in numero pari a decine o centinaia di individui per metro cubo, si dice che sta andando incontro ad un "esplosione" o bloom. Un bloom di plancton gelatinoso di solito intasa i retini tradizionali e accade sovente che le raccolte si interrompano per mancato funzionamento degli strumenti.

Per questo il macroplancton gelatinoso non si può raccogliere solo con i retini. Gran parte delle osservazioni che hanno aumentato le nostre conoscenze sul plancton gelatinoso, infatti, derivano da studi effettuati con i sottomarini da ricerca per quanto riguarda le grandi profondità e con il blue diving per quanto riguarda le profondità raggiungibili con l'immersione con scafandro autonomo. È anche possibile effettuare osservazioni da bordo, contando gli esemplari avvistati come si fa con i cetacei. Censimenti visuali possono essere condotti anche a bordo di aerei in grado di coprire le scale spaziali (decine di chilometri) che caratterizzano il plancton gelatinoso in fase di bloom.

44.3.1 Osservazioni da bordo

Occorre prima di tutto calcolare approssimativamente la superficie che s'ispeziona con lo sguardo. Se l'acqua è limpida, occorre stimare la profondità massima cui è possibile distinguere gli esemplari. In questo caso s'ispeziona un volume e non una superficie. La superficie o il volume unitario di osservazione va moltiplicato per la velocità dell'imbarcazione e per il tempo di osservazione. Gli esemplari devono essere contati facendo attenzione al modo in cui sono distribuiti nello spazio. Le correnti di Langmuir (ossia correnti che convergono attorno ad un asse parallelo alla direzione del vento che le ha generate) tendono a concentrare il plancton in strisce parallele. È essenziale che sia individuata la presenza di correnti di Langmuir sia in caso di stime visuali sia in ogni altro caso di raccolta di plancton, in modo che le osservazioni siano effettuate nelle 'strisce di plancton' e non nelle zone adiacenti che appaiono molto più trasparenti e povere di plancton. Raccolte casuali, anche con retino, in condizioni di presenza di correnti di Langmuir possono dare risultati molto vari mentre, se si pesca all'interno delle celle, si

hanno alte probabilità di catturare esemplari in grande quantità. Spesso gli esemplari possono essere catturati da bordo, con un barattolo o con un secchio, a seconda delle dimensioni. Se possibile, è consigliabile raccogliere alcuni esemplari per la corretta identificazione tassonomica e scattare foto digitali della disposizione spaziale degli esemplari.

44.3.2 Blue diving

È necessaria un'imbarcazione ancorata al fondo (o che va alla deriva) dalla quale si cala una cima metrata con un corpo morto all'estremità. Il corpo morto può essere posato sul fondo o restare sospeso a mezz'acqua. I subacquei, che possono essere legati con cime ombelicali alla cima madre, si dispongono in modo da coprire un volume d'acqua più grande possibile. È necessario un correntometro per misurare la direzione e la velocità della corrente. Gli osservatori, in teoria, dovrebbero star fermi ed intercettare visualmente gli individui del plancton gelatinoso che sono trasportati dalla corrente entro il loro raggio d'azione. Gli individui sono identificati e contati (annotando il conteggio su di una tavoletta subacquea) ed, eventualmente, catturati ed inseriti in barattoli con tappo a vite (il tappo deve essere collegato al barattolo con una piccola cima). Anche in questo caso, come per le stime visuali da bordo, occorre moltiplicare il volume ispezionato per la velocità della corrente e per il tempo di permanenza in posizione di osservazione. Una macchina fotografica è utile per fotografare gli esemplari di dubbia identificazione. Alcune specie di ctenofori sono state descritte in base alle fotografie *in situ*, poiché è stato impossibile raccogliere esemplari senza distruggerli.

44.4 SISTEMI OTTICI: VIDEO E SOTTOMARINI DA RICERCA

I sistemi video ed i sottomarini da ricerca rappresentano le tecniche più innovative attualmente in uso per il campionamento del plancton gelatinoso che può essere così fotografato, filmato ed osservato nei suoi colori e forme originali. Tali metodologie sono particolarmente indicate per lo studio *in situ* delle specie gelatinose che vivono in acque sottosuperficiali e diventano addirittura insostituibili per lo studio del plancton gelatinoso che abita le acque profonde. Cnidari e Ctenofori dominano le acque del dominio pelagico ma in passato solo pochissime specie di questi gruppi sono state descritte, ovvero quelle che risultavano ancora riconoscibili nel plancton da rete.

Le videocamere subacquee possono essere di vario tipo, montate direttamente su grandi reti da plancton (e.g. reti Bioness e Ring) oppure su veicoli autonomi che vengono calati in mare separatamente dalle reti. I seguenti sistemi video sono comunemente usati per l'osservazione del meso- e macroplancton gelatinoso *in situ* (Benfield *et al.*, 2007): Laser Optical Plankton Counter (LOPC), Underwater Video Profiler (UVP), Video Plankton Recorder (VPR), Large-Area Plankton Imaging System (LAPIS), Zooplankton Visualization System (ZOOVIS).

Ogni sistema video può produrre centinaia o migliaia di fotogrammi che sono salvati e conservati in forma digitale e che possono essere analizzati in seguito per ottenere informazioni sul plancton filmato. I moderni sistemi video, che arrivano a produrre un elevatissimo numero di immagini digitali (ad esempio 108000 immagini all'ora per una frequenza di 30 Hz), hanno reso necessario lo sviluppo di software per l'analisi d'immagine in grado di fornire rapidamente una statistica sulle classi dimensionali e sulla biomassa in volume degli organismi filmati o fotografati. In tempi più recenti l'analisi d'immagine è stata utilizzata per l'identificazione automatica del plancton a livello di gruppi tassonomici generici (e.g. copepodi, chetognati, appendicolarie).

L'identificazione si ottiene confrontando la morfologia di un singolo oggetto (in questo caso un individuo planctonico) con una banca dati contenente immagini di riferimento di diversi gruppi tassonomici. Su base statistica si stabilisce quindi la 'probabile' appartenenza dell'individuo fotografato a una determinata categoria tassonomica.

Nonostante vi siano esempi di plancton a crostacei in cui è possibile il riconoscimento automatico a livello di genere o specie (Grosjean *et al.*, 2004; Culverhouse *et al.* 2006), non esistono ad oggi specie di plancton gelatinoso che si possano identificare automaticamente senza l'aiuto di un esperto tassonomo.

L'avvento dei sommergibili e dei ROVs (Remotely Operated Vehicles) ha finalmente permesso di intraprendere studi sulla biodiversità del plancton gelatinoso profondo e l'identificazione di specie criptiche (Lindsay *et al.*, 2008).

Esistono diversi tipi di ROV (e.g. ROV HyperDolphin e PICASSO (Plankton Investigatory Collaborating Autonomous Survey System Operon) (Fig. 1), essenzialmente robots muniti di macchine fotografiche e videocamere ad alta definizione e provvisti di impianti di illuminazione. Tali campionatori sono in grado di fornire immagini bidimensionali ad alta risoluzione che, completate da informazioni essenziali quali l'ora dello scatto, la profondità e le coordinate geografiche, sono catalogate ed accumulate all'interno del robot e possono essere scaricate una volta che il ROV è ammainato a bordo.

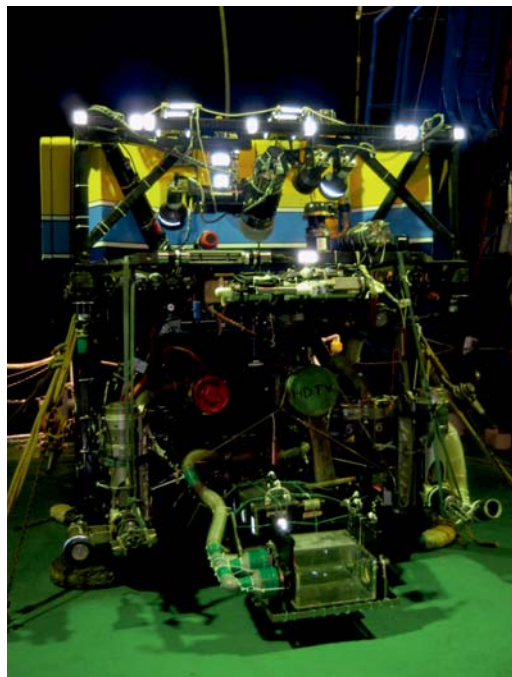


Fig. 1. ROV 'HyperDolphin' equipaggiato con videocamere ad alta definizione (30 scatti al secondo) in grado di fornire una risoluzione sufficiente ad identificare organismi superiori al centimetro di diametro. In primo piano sono visibili due barattoli trasparenti all'interno dei quali l'operatore da bordo può inserire, tramite l'uso di bracci meccanici aspiranti, gli organismi gelatinosi prelevati *in situ* nel corso del video campionamento. Courtesy of Dhugal Lindsay, JAMSTEC, Japan.



Fig.2. Sommergibile *Shinkai 6500* utilizzato per lo studio del plancton gelatinoso al largo dell'Isola di Hokkaido (Giappone). Courtesy of JAMSTEC, Japan.

I sommergibili (ad esempio *Cyana* usato in Mar Ligure e *Shinkai 2000* utilizzato nel Pacifico, Fig. 2) sono considerati mezzi di campionamento più avanzati dei ROV. L'osservazione diretta dell'operatore a bordo del sommergibile permette, infatti, di campionare un volume maggiore di acqua e fornisce informazioni nelle tre dimensioni dello spazio, con una risoluzione che va da molti metri al centimetro. L'osservatore a bordo dei sommergibili è inoltre in grado di fornire preziose informazioni sul comportamento e l'ecologia delle specie, ad esempio osservazioni sulle associazioni di specie esistenti in natura.

Generalmente sia i ROV che i sottomarini sono muniti anteriormente di sonde CTD e di sensori in grado di fornire informazioni sulle caratteristiche fisico-chimiche delle acque abitate dalle diverse specie di plancton. Entrambi questi campionatori, tramite l'uso di bracci meccanici aspiranti, permettono all'operatore di prelevare esemplari di plancton gelatinoso *in situ* che sono collezionati in barattoli sigillabili, da analizzare e conservare una volta a bordo.

Nonostante una singola immersione fornisca già informazioni sulla biogeografia, tassonomia ed ecologia del plancton gelatinoso, per una stima accurata della sua diversità specifica si richiedono un minimo di tre immersioni per ogni campagna di studio e almeno quattro campagne stagionali

44.5 SISTEMI ACUSTICI

I sistemi acustici, pur essendo stati utilizzati per il campionamento del plancton gelatinoso, non si sono rivelati particolarmente adatti allo scopo. Molte specie di gelatinosi sono, infatti, permeabili al suono e non producono un "backscatter" ben definito. Alcuni sifonofori dell'ordine Physonectae possono essere individuati con sistemi acustici grazie alla presenza di una pneumatofora, una vescicola contenente gas che serve loro per galleggiare e orientarsi.

44.6 BIBLIOGRAFIA

- BENFIELD M.C., GROSJEAN P., IRIGOIEN X., SIERACKI M.E., LOPEZ-URRUTIA A., DAM H.G., HU Q., DAVIS C.S., HANSEN A., PILSKALN C.H., RISEMAN E., SCHULTZ H., UTGOFF P.E., GORSKY G. (2007) - RAPID: Research on Automated Plankton Identification. *Oceanography*, **20**(2): 172 – 187.
- BRACONNOT J.C. (1971) - Contribution à l'étude biologique et écologique des Tuniciers pélagiques Salpides et Doliolides I. Hydrologie et écologie des Salpides. *Vie et Milieu*, **22**: 257-286.
- CULVERHOUSE P.F., WILLIAMS R., BENFIELD M.C., FLOOD P.R., SELL A.F., MAZZOCCHI M.G., BUTTINO I., SIERACKI M.E. (2006) - Automatic image analysis of plankton: future perspective. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **312**: 297-309.
- GROSJEAN P., PICHERAL M., WAREMBOURG C., GORSKY G. (2004) - Enumeration, measurement, and identification of net zooplankton samples using the ZOOSCAN digital imaging system. *ICES J. Mar. Sci.*, **61**: 518 – 525.
- LINDSAY D., PAGES F., CORBERA J., MIYAKE H., HUNT J.C., ICHIKAWA T., SEGAWA K., YOSHIDA H. (2008) - The anthomedusan fauna of the Japan Trench: preliminary results from in situ surveys with manned and unmanned vehicles. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **88**: 1519-1539.

CAPITOLO 45. METODO DELLE DILUIZIONI PER LA STIMA DELLA PREDAZIONE DEL MICROZOOPLANCTON (E DEL NANOPLANCTON ETETEROTROFO)

S. Fonda Umani, A. Beran, G. Franzè, M. Modigh

s.fonda@units.it

45.1 INTRODUZIONE

La determinazione diretta dei tassi di predazione del microzooplancton e del nanoplancton eterotrofo e la quantificazione degli specifici tassi di mortalità delle loro possibili prede è di fondamentale importanza per comprendere i flussi di energia e materia attraverso la rete trofica pelagica. Il micro- e il nanoplancton eterotrofo sono capaci di selezionare le loro prede e di reagire con molta rapidità ai cambiamenti di disponibilità alimentare (Pernthaler, 2005). La predazione di protisti flagellati e ciliati gioca un ruolo fondamentale nella strutturazione delle comunità planctoniche (Paranjape, 1990; Fahnenstiel *et al.*, 1995; Froneman & Perissinotto, 1996; Verity *et al.*, 1996; Lessard & Murrell, 1998; James & Hall, 1998; Strom *et al.*, 2007). Essi possono efficacemente controllare la produzione del fitoplancton (Gifford, 1988; Verity *et al.*, 1993; Burkill *et al.*, 1995; Cotano *et al.*, 1998), le sue dinamiche (Landry *et al.*, 1993; Strom & Strom, 1996; Latasa *et al.*, 1997; Ruiz *et al.*, 1998; Stelfox-Widdicombe *et al.*, 2000) e i processi di rigenerazione dei nutrienti (Goldman *et al.*, 1987). Calbet and Landry (2004) hanno stimato che il microzooplancton consuma in media il 67% della produzione fitoplanctonica giornaliera in tutti gli ambienti marini. Analogamente, la predazione di protisti ciliati e flagellati è considerata uno dei più importanti fattori che controllano (assieme alla lisi virale) le biomasse picoplanctoniche sia autotrofe che eterotrofe (Pernthaler, 2005; Montagnes *et al.*, 2008). Anche in questo caso la predazione risulta fortemente selettiva e pertanto sopravvivono e si sviluppano soltanto le specie batteriche che attraverso diversi meccanismi (riduzione o aumento della taglia, formazioni di colonie, produzione di essudati o di tossine, aumento della velocità di fuga) riescono a sfuggire all'impatto della predazione (Jurgens & Gude, 1994; Strom, 2000; Boenigk & Arndt, 2002; Boenigk *et al.*, 2002; Matz & Jurgens, 2005).

45.2 METODI PER LA STIMA DELLA PREDAZIONE

Uno dei maggiori problemi nella stima della predazione del microzooplancton (e del nanoplancton) è che prede e predatori appartengono alle stesse classi di grandezza ed è quindi impossibile separarle (come invece si usa fare per la stima della predazione del mesozooplancton).

Per valutare l'efficienza della predazione si utilizza, ormai, come protocollo standard il metodo delle diluizioni proposto da Landry e Hassett (1982), successivamente modificato da Landry *et al.* (1995) e Gallegos (1989) e ulteriormente adattato per stimare anche la predazione del nanoplancton eterotrofo sul picoplancton. Il metodo classico delle diluizioni consente di stimare esclusivamente l'impatto del microzooplancton sulla frazione autotrofa, valutando le differenze nella concentrazione di clorofilla tra l'inizio e la fine dell'incubazione. Alcuni ricercatori hanno utilizzato analisi con l'HPLC per valutare la predazione sulla base dei pigmenti specifici (Strom & Welschmeyer, 1991; McManus & Ederington-Cantrell, 1992; Verity *et al.*, 1993; Waterhouse & Welschmeyer, 1995; Latasa *et al.*, 1997; Schlüter, 1998) e la citofluorimetria per valutare la pressione predatoria su batteri e flagellati (Reckermann & Veldhuis, 1997; Kuipers & Witte, 1999; Stelfox-Widdicombe *et al.*, 2000; Aberle *et al.*, 2007; Paterson *et al.*, 2008). Per valutare l'efficienza della predazione a livello specifico è però consigliabile analizzare i campioni al microscopio a ottiche rovesciate e, per avere informazioni relativamente alla predazione sulla frazione

eterotrofa (nano e picoplanctonica), i campioni devono essere analizzati quali-quantitativamente al microscopio ad epifluorescenza (Landry *et al.*, 1984; Campbell & Carpenter, 1986; Caron *et al.*, 1991; Landry *et al.*, 1993; Verity *et al.*, 1993; 1996; Aykai, 1996; Nejstgaard *et al.*, 1997; James & Hall, 1998; Lessard & Murrel, 1998; Murrel & Hollibaugh, 1998; Caron *et al.*, 2000; Fonda Umani & Zanon, 2000; Fonda Umani & Beran, 2003, Fonda Umani *et al.*, 2004; 2005; Sakka Hlaili *et al.*, 2007). Nonostante si sia compresa l'importanza dei possibili cambiamenti quali-quantitativi del popolamento dei predatori durante l'incubazione a tutt'oggi sono ancora molto pochi gli studi che prendono in considerazione la composizione degli organismi micro- e nanoplanctonici e la loro possibile crescita durante l'esperimento (Gifford, 1988; Paranjape, 1990; Verity *et al.*, 1993; Froneman & Perissinotto, 1996; Froneman *et al.*, 1996; Strom & Strom, 1996; James & Hall, 1998; Dolan *et al.*, 2000; Fonda Umani & Beran, 2003).

A differenza di altri metodi proposti (quali ad esempio l'uso di prede fluorescenti, particolarmente utilizzato per lo studio dell'impatto dei batterivori (Sherr *et al.*, 1987)), il metodo delle diluizioni, estremamente semplice, prevede soltanto una minima manipolazione degli organismi e consente di ottenere sia il tasso specifico di crescita delle prede (microfitoplancton, nanoplancton, picoplancton) sia quello di mortalità indotta dalla predazione degli organismi eterotrofi (Bamstedt *et al.*, 2000). Successive diluizioni di acqua di mare con la stessa acqua, filtrata su 0,22 µm per eliminare ogni organismo, riducono le probabilità d'incontro tra preda e predatore e consentono di stimare sia il tasso apparente di crescita delle prede che il loro tasso di mortalità. Il tasso specifico di crescita delle prede si ottiene estrapolando la crescita apparente al 100% di diluizione (cioè il tasso di crescita in mancanza di predatori); il tasso di mortalità da predazione degli eterotrofi corrisponde al valore assoluto dell'angolo della retta di regressione (cioè la pendenza della retta) tra la crescita apparente delle prede e le frazioni di acqua non filtrata (Fig. 1)

Il metodo si basa su 3 presupposti:

1 - il tasso di crescita delle prede non varia in seguito alle diluizioni, si suppone che la crescita non sia dipendente dalla densità del popolamento e che segua una legge esponenziale. Deve perciò essere garantita la non limitazione da nutrienti.

2 - il tasso di mortalità da predazione è linearmente correlato con le diverse concentrazioni delle prede, cioè, in condizioni ambientali non dovrebbe esserci un effetto di saturazione da parte dei predatori (ma vedi Mogis, 2006).

3 - il tasso di predazione individuale non varia durante l'incubazione.

In questo caso il tasso di crescita di una preda può essere descritto dalla seguente equazione:

$$C_t = C_0 e^{(k-g)t} \quad (1)$$

che può anche essere scritta:

$$(1/t) \ln (C_t/C_0) = k-g \quad (2)$$

dove:

C_t = numero di individui o biomassa totale al tempo t

C_0 = numero di individui o biomassa totale al t_0

k = coefficiente istantaneo di crescita delle prede

g = coefficiente istantaneo di mortalità delle prede, dovuto alla predazione

t = tempo di incubazione, in genere 24 ore per comprendere un ciclo giornaliero completo.

Il termine k , dato il primo postulato, non viene influenzato dalle diluizioni, ma rimane costante. Il coefficiente g , in accordo con il secondo postulato, varia in modo direttamente proporzionale alla densità dei predatori, e delle prede.

k e g possono variare senza modificare il tasso di crescita delle prede in condizioni naturali nelle differenti diluizioni.

Dal momento che k è costante e g è direttamente proporzionale alla diluizione, le equazioni con le due incognite k e g possono essere risolte graficamente con una retta di regressione.

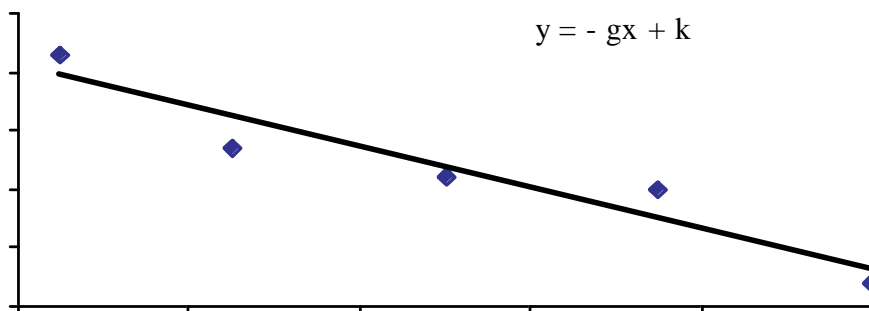


Fig. 1 rappresentazione grafica del modello lineare di regressione.

I coefficienti di crescita apparenti, dati da $(1/t)\ln(C_t/C_0)$, sono riportati in ordinata, mentre in ascissa vengono riportati i fattori di diluizione.

L'intercetta della retta con l'asse y, il punto cioè in cui $g = 0$, rappresenta il coefficiente di crescita istantaneo k in assenza di predatori; la pendenza della retta rappresenta invece il valore negativo del coefficiente istantaneo di mortalità dovuta alla predazione, $-g$.

Conoscendo C_0 , k e g è possibile identificare un altro utile parametro, il tasso di ingestione (I), identificato con la quantità di prede eliminate dai predatori nell'unità di tempo (t) e di volume.

Innanzitutto si calcola la concentrazione media delle prede ($\langle C \rangle$) nel corso dell'esperimento, mediante l'equazione:

$$\langle C \rangle = (C_0 e^{(k-g)t} - C_0)/(k-g) \quad (3)$$

per poi procedere al calcolo del tasso di ingestione (I) ($\mu\text{gC l}^{-1} \text{g}^{-1}$):

$$I = g \langle C \rangle \quad (4)$$

Per allestire la serie delle diluizioni si preleva l'acqua direttamente dalle bottiglie di raccolta (in genere bottiglie Niskin o Go FLo con guarnizioni ed elastici in teflon per evitare di esporre gli organismi a sostanze tossiche). L'acqua viene immediatamente e gentilmente filtrata su retino da $200 \mu\text{m}$, al fine di eliminare tutti i potenziali predatori mesozooplancitonici, avendo cura di mantenere immerso il retino stesso. La serie di diluizione si ottiene miscelando l'acqua filtrata su $200 \mu\text{m}$ con acqua, proveniente dallo stesso sito, filtrata però su $0,22 \mu\text{m}$ al fine di eliminare ogni organismo presente. Per la filtrazione su $0,22 \mu\text{m}$ si utilizzano pompe peristaltiche, con filtri in PTEF idrofilo del diametro di 142 mm , le cui parti in contatto con l'acqua dovrebbero analogamente essere in teflon. Un'opzione alternativa alla rampa filtrante può essere l'uso di una cartuccia filtrante (per esempio: Gelman capsules filter $0,2 \mu\text{m}$). Dal momento che questa è la fase più lunga della preparazione degli esperimenti è possibile effettuare la filtrazione in anticipo, avendo ovviamente a disposizione acqua con le stesse caratteristiche di quella che verrà utilizzata per gli esperimenti. Ciò consente di ridurre il tempo di trattamento a cui si sottopone la comunità planctonica naturale. Tutto il materiale (bottiglie, taniche, tubicini, etc) utilizzato per gli esperimenti deve essere preventivamente lavato accuratamente con acido cloridrico diluito ($\text{HCl } 0,1\text{N}$) e sciacquato più volte con acqua distillata. Si consiglia di lasciare agire l'acido per diverse ore, in genere tutta la notte. Tutte le operazioni di allestimento degli esperimenti devono essere svolte indossando guanti in lattice e a temperature tali da garantire il mantenimento della temperatura dell'acqua al momento del prelievo. Le proporzioni di diluizione sono in genere: 100% (solo acqua filtrata su $200 \mu\text{m}$), 80%, 50%, 30%, 10%. Le aggiunte di acqua filtrata devono essere effettuate facendo attenzione a non creare eccessive turbolenze o bolle d'aria per non danneggiare gli organismi più fragili. Per garantire l'omogeneità del campione distribuito nei contenitori sperimentali è preferibile utilizzare un unico batch di campione madre continuamente, ma delicatamente, mescolato. Con l'acqua così ottenuta, vengono allestite due serie di 15 bottiglie del volume di 2 l, tre per ogni diluizione. Da ciascuna delle bottiglie vengono prelevati sub-

campioni per la determinazione della concentrazione iniziale delle prede (per gli autotrofi si può utilizzare come proxy la clorofilla, con tutti i limiti che questo comporta) e per il conteggio del microzooplancton (o rispettivamente del nanoplancton eterotrofo). Per l'analisi della clorofilla si rimanda al capitolo "Determinazione della biomass fitoplanctonica". Il campione per il conteggio al microscopio del fitoplancton ed eventualmente del microzooplancton viene immediatamente fissato in Lugol o formalina neutralizzata al 2% e conservato al buio e preferibilmente a 4°C. Nanoplancton e batteri vengono fissati in formalina neutralizzata al 2%. Questi dati costituiscono il T_0 . Alla fine dell'esperimento, generalmente dopo 24 h, vengono prelevati subcampioni da tutte le bottiglie per la determinazione delle prede (eventualmente della clorofilla) ed anche per il conteggio del microzooplancton (e rispettivamente del nanoplancton eterotrofo) alla fine dell'incubazione per valutare le eventuali crescite.

L'incubazione si realizza *in situ* (riimmergendo le bottiglie alla stessa profondità di raccolta) oppure simulando le condizioni naturali *in situ*, in genere in vasche in cui si fa circolare acqua alla stessa temperatura di quella alla quale è avvenuto il campionamento poste sul ponte della nave o in luoghi analoghi per simulare il naturale irraggiamento presente alla quota superficiale, se si è campionato in superficie, o opportunamente schermate se il campionamento è avvenuto a quote diverse. Grazie all'azione di una pompa, l'acqua all'interno delle vasche da incubazione viene mantenuta in continuo movimento, garantendo l'omogeneizzazione del contenuto delle bottiglie.

L'esame al microscopio permette di individuare le potenziali prede e di stimare il tasso di predazione su ciascuna di esse (cosa impossibile quando si usa la sola clorofilla). Va ricordato che prima di procedere a qualunque elaborazione va controllata l'efficienza delle diluizioni. Soltanto nel caso in cui ci sia una significativa diminuzione delle prede in funzione alle diluizioni si può procedere con l'elaborazione successiva. Non è materialmente possibile seguire l'evoluzione di una stessa bottiglia, in quanto si tratterebbe di sottrarre più volte subcampioni dalle bottiglie d'incubazione, determinando un'eccessiva quantità d'aria nella bottiglia di incubazione. Pertanto si confronta necessariamente il valore medio delle 3 repliche iniziali con il valore ottenuto per ciascun parametro in ciascuna delle bottiglie d'incubazione. Si raccomanda inoltre di conteggiare 3 repliche per ognuna delle 3 repliche al T_0 e al T_{24} dei campioni di pico- e nanoplancton. Per i conteggi di ciascuna frazione (microzoo- e microfitoplancton, nanoplancton e picoplancton) si seguono i metodi descritti nei rispettivi capitoli.

Per stimare la mortalità indotta sul picoplancton dai soli nanoflagellati eterotrofi è necessario eliminare gli organismi di taglia superiore ai 10 μm . Si procede quindi ad una filtrazione su maglia da 10 μm allestendo una seconda serie di diluizioni in parallelo a quella descritta per il microzooplancton. In genere si usano bottiglie di policarbonato o di vetro di volume pari a 250 ml.

Combinando i risultati ottenuti nei due esperimenti (con e senza microzooplancton) il sistema studiato può essere ricondotto ad uno dei 3 seguenti modelli:

1. la predazione del microzooplancton sul nanoplancton è tanto rilevante da eliminare l'effetto sul picoplancton (Fig. 2 (a));
2. la predazione del microzooplancton è meno intensa e determina soltanto una riduzione della predazione del nanoplancton (Fig. 2 (b,d));
3. il microzooplancton preda sul picoplancton e le due predazioni si sommano (Fig. 2 (c) - Fonda Umani & Beran, 2003).

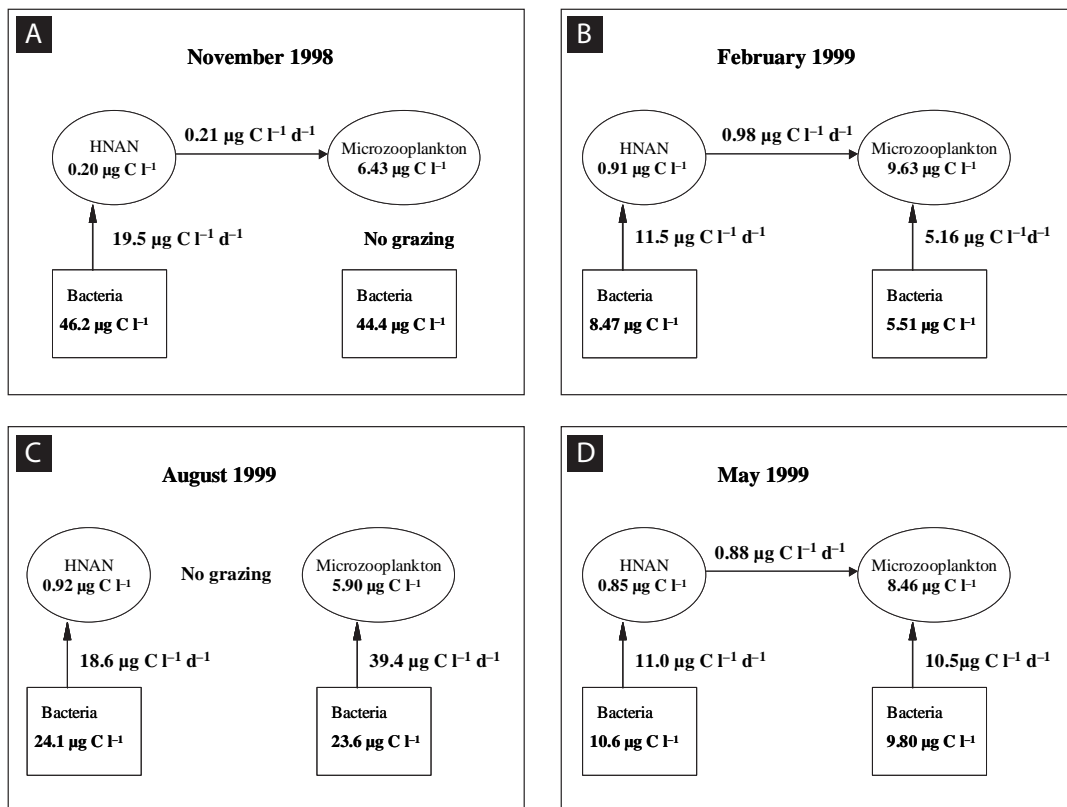


Fig. 2 Possibili interazioni tra la predazione del microzooplancton e quella del nanoplancton eterotrofo sulla biomassa batterica

Analizzando la composizione e le variazioni della biomassa dei predatori durante il periodo di incubazione è possibile stimare anche la loro crescita e quindi la loro produzione (secondaria).

Nell'esempio riportato in Tab. 1 il nanoplancton eterotrofo aumenta durante tutti gli esperimenti considerati, il microzooplancton soltanto in agosto, quando la sua biomassa quasi raddoppia durante le 24 ore.

I valori assoluti di k e g sono indicativi del controllo esercitato dalla predazione sulla crescita delle prede, quando $k < g$ significa che la crescita delle prede è inferiore al tasso di predazione che, quindi, controlla efficacemente lo sviluppo di quella determinata frazione.

Il metodo esposto fa riferimento al semplice modello lineare (modello I) che è stato oggetto di numerose revisioni e critiche. Si rimanda ai lavori di Gallegos (1989) e di Mogis (2006) per ulteriori approfondimenti.

Analizzando i campioni di microzooplancton (o rispettivamente di nanoplancton eterotrofo) all'inizio e alla fine l'incubazione si è visto come i predatori possano crescere o morire in maniera significativa durante l'incubazione. La variazione dell'abbondanza dei predatori durante l'esperimento determina un cambiamento nella pressione da grazing modificando, di fatto, anche il fattore di diluizione che non è più quello nominale. Nel caso in cui i conteggi del microzooplancton (o del nanoplancton eterotrofo) all'inizio e alla fine dell'esperimento dovessero risultare notevolmente diversi tra di loro, si consiglia di procedere all'analisi della regressione plottando le variazioni della concentrazione delle prede con la media geometrica dell'abbondanza dei predatori anziché con il fattore di diluizione. Per calcolare l'abbondanza media dei predatori durante l'incubazione (GMPA Geometric Mean Predator Abundance) si usa l'equazione $(\text{Conc}_{T_0} \times \text{Conc}_{T_{24}})^{0.5}$ convertendola in percentuale della concentrazione al T_0 (Dolan *et al.* 2000) (Fig. 3).

Tab. 1 Esempi di produzione secondaria di microzooplankton e nanoplancton eterotrofo

<i>Novembre 1998</i>	k	SD	C₀	SD	P
Total microzooplankton	ns.	ns.	6,43	1,01	nd.
Total Protozoa	ns.	ns.	5,35	0,49	nd.
Ciliophora non Tintinnida	ns.	ns.	0,13	0,02	nd.
Tintinnida	ns.	ns.	5,01	0,46	nd.
Protozoa non Ciliophora	ns.	ns.	0,21	0,05	nd.
Metazoa	ns.	ns.	1,08	0,51	nd.
HNAN*	0,51	0,18	0,20	0,06	0,13
<i>February 1999</i>					
Total microzooplankton	ns.	ns.	9,63	0,86	nd.
Total Protozoa	ns.	ns.	8,43	0,24	nd.
Ciliophora non Tintinnida	ns.	ns.	1,14	0,07	nd.
Tintinnida	ns.	ns.	0,01	0,02	nd.
Protozoa non Ciliophora	ns.	ns.	7,29	0,17	nd.
Metazoa	ns.	ns.	1,19	0,60	nd.
HNAN*	0,21	0,01	0,91	0,09	0,21
<i>May 1999</i>					
Total microzooplankton	ns.	ns.	8,46	1,66	nd.
Total Protozoa	ns.	ns.	6,89	1,00	nd.
Ciliophora non Tintinnida	ns.	ns.	6,40	0,89	nd.
Tintinnida	ns.	ns.	0,49	0,17	nd.
Protozoa non Ciliophora	ns.	ns.	0,13	0,10	nd.
Metazoa	ns.	ns.	1,44	0,60	nd.
HNAN*	1,02	0,24	0,85	0,08	1,52
<i>August 1999</i>					
Total microzooplankton	0,41	0,15	5,90	0,41	3,02
Total Protozoa	0,44	0,16	5,62	0,46	3,10
Ciliophora non Tintinnida	0,32	0,21	4,84	0,53	1,85
Tintinnida	1,16	0,07	0,59	0,07	1,29
Protozoa non Ciliophora	ns.	ns.	0,19	0,03	nd.
Metazoa	ns.	ns.	0,28	0,07	nd.
HNAN*	0,25	0,08	0,92	0,26	0,27

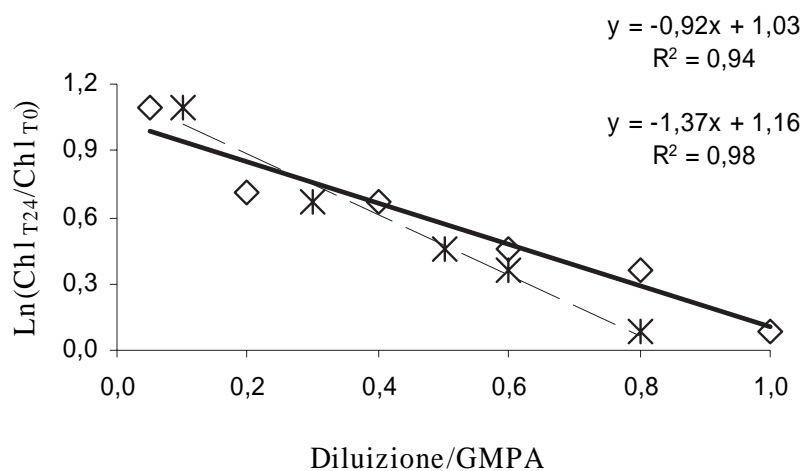


Fig. 3 Esempio di un'analisi di regressione usando il fattore di diluizione (linea intera) e l'abbondanza media dei predatori (linea tratteggiata). Nel primo caso la pendenza (tasso di grazing) è 0,92 d⁻¹ mentre tenendo conto della concentrazione dei predatori $g = 1,37$ d⁻¹.

45.3.BIBLIOGRAFIA

- ABERLE N., LENGFELLNER K., SOMMER U. (2007) - Spring bloom succession, grazing impact and herbivore selectivity of ciliate communities in response to winter warming. *Oecologia*, **150**: 668 – 681.
- AYUKAI T. (1996) - Possible limitation of the dilution technique for estimating growth and grazing mortality rates of picoplanktonic cyanobacteria in oligotrophic tropical waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **198**: 102 – 111.
- BAMSTEDT U., GIFFORD D.J., IRIGOIEN X., ATKINSON A., ROMAN M. (2000) - Feeding (Chapter 8). In: Harris R.P., Wiebe P.H., Lenz J, Skjoldal H.R., Huntley M. (eds). *ICES Zooplankton Methodology Manual*, Academic Press: 296 – 399.
- BOENIGK J., ARNDT H. (2000) - Particle Handling during Interception Feeding by Four Species of Heterotrophic Nanoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**(4): 350 – 358.
- BOENIGK J., MATZ C., JÜRGENS K., ARNDT H. (2001) - Confusing Selective Feeding with Differential Digestion in Bacterivorous Nanoflagellates. *J. Eucaryot. Microbiol.*, **48**(4): 425 – 432.
- BURKILL P.H., EDWARDS E.S., SLEIGH M.A. (1995) - Microzooplankton and their role in controlling phytoplankton growth in the marginal ice zone of the Bellinghausen Sea. *Deep-Sea Res.*, **42**(4/5): 1277 – 1290.
- CALBET A. (2008) - The trophic roles of microzooplankton in marine systems. *ICES J. Mar. Sc.*, **65**: 325-331.
- CALBET A., LANDRY M.R. (2004) - Phytoplankton growth, microzooplankton grazing and carbon cycling in marine systems. *Limnol. Oceanogr.*, **49**: 51 – 57.
- CAMPBELL L., CARPENTER E.J. (1986) - Estimating the grazing pressure of heterotrophic nanoplankton on *Synechococcus* spp. using the sea water dilution and selective inhibitor techniques. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **33**: 121 – 129.
- CARON D.A., DENNETT M.R., LONSDALE D.J., MORAN D.M., SHALAPYONOK L. (2000) - Microzooplankton grazing in the Ross Sea, Antarctica. *Deep-Sea Res.*, **47**: 3249 – 3272.
- CARON D.A., LIM E.L., MICELI G., WATERBURY J.B., VALOIS F.W. (1991) - Grazing and utilization of chroococcoid cyanobacteria and heterotrophic bacteria by protozoa in laboratory cultures and a coastal plankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **76**: 205 – 217.
- COTANO U., URIARTE I., VILLATE F. (1998) - Herbivory of nanozooplankton in polyhaline and euhaline zones of a small temperate estuarine system (Estuary of Mundaka): seasonal variations. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **227**: 265 – 279.
- DOLAN J., GALLEGOS C.L., MOGIS A. (2000) - Dilution effects on microzooplankton in dilution grazing experiments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **200**: 127 – 139.
- FAHNENSTIEL G.L., MCCORMICK M.L., LANG G.A., REDALJE D.G., LOHRENZ S.E., MARKOWITZ M., WAGONER B., CARRICK H.J. (1995) - Taxon-specific growth and loss rates for dominant phytoplankton populations from the northern Gulf of Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **117**: 229 – 239.
- FONDA UMANI S., BERAN A. (2003) - Seasonal variations in the dynamics of microbial plankton communities: first estimates from experiments in the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **247**: 1 – 16.
- FONDA UMANI S., TIRELLI V., BERAN A., GUARDIANI B. (2005) - Relationships between microzooplankton and mesozooplankton: competition vs predation on natural assemblages in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). *J. Plankton Res.*, **27**(10): 973 – 986.
- FONDA UMANI S., ZANON V. (2000) - Prime stime dell'efficienza della predazione del microzooplankton nel Tirreno meridionale (isole Eolie). *Atti 13° Congr. AIOL* : 133 –144.
- FRONEMAN P.W., PERISSINOTTO R. (1996) - Structure and grazing of the microzooplankton communities of the Subtropical Convergence and warm-core eddy in the Atlantic sector of the Southern Ocean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **135**: 237 – 245
- FRONEMAN P.W., PERISSINOTTO R., MCQUAID C.D. (1996) - Seasonal variations in microzooplankton grazing in the region of the Subtropical Convergence. *Mar. Biol.*, **126**: 433 –442.
- GALLEGOS C.L. (1989) - Microzooplankton grazing on phytoplankton in the Rhode River, Maryland: nonlinear feeding kinetics. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, **57**: 23 – 33.
- GIFFORD D.J. (1988) - Impact of grazing by microzooplankton in the Northwest Arm of Halifax Harbour, Nova Scotia. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **47**: 249 – 258.
- GOLDMAN J.C., CARON D.A., DENNETT M.R. (1987) - Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnol. Oceanogr.*, **32**(6): 1239 – 125.
- JAMES M.R., HALL J.A. (1998) - Microzooplankton grazing in different water masses associated with the Sub-

-
- tropical Convergence round the South Island, New Zealand. *Deep-Sea Res.*, **45**: 1689 - 1707.
- JÜRGENS K., GÜDE H. (1994) - The potential importance of grazing-resistant bacteria in planktonic system. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **112**: 169 - 188.
- KUIPERS B.R., WITTE H.J. (1999) - Grazing impact of microzooplankton on different size classes of algae in the North Sea in early spring and mid-summer. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **180**: 93 - 104.
- LANDRY M.R. (1993) - Estimating rates of growth and grazing mortality of Phytoplankton by the dilution method. In: Kemp P.F., Sherr B., Sherr E., Cole J.J., (eds.) *Handbook of methods in aquatic microbial ecology*. Lewis Publishers, Ann Arbor, MI: 715 - 772.
- LANDRY M.R., HASSET R.P. (1982) - Estimating the grazing impact of marine Microzooplankton. *Mar. Biol.*, **67**: 283 - 288.
- LANDRY M.R., MONGER B.C., SELPH K.E. (1993) - Time-dependency of microzooplankton grazing and phytoplankton growth in the subarctic Pacific. *Prog. Oceanogr.*, **33**: 205 - 222.
- LATASA M. (1997) - Pigment-specific growth and grazing rates of phytoplankton in the Central Equatorial Pacific. *Limnol. Oceanogr.*, **42**: 289 - 298.
- LESSARD E., MURRELL M.C. (1998) - Microzooplankton herbivory and phytoplankton growth in the northwestern Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.*, **16**: 173 - 188.
- MATZ C., JURGENS K., (2005) - High motility reduces grazing mortality of plankton bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 1593 - 1599.
- MCMANUS G.B., EDERINGTON-CANTRELL M.C. (1992) - Phytoplankton pigments and growth rates, and microzooplankton grazing in a large temperate estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **87**: 77 - 85.
- MOGIS A.G. (2006) - The clearance rate of microzooplankton as the key element for describing estimated non-linear dilution plots demonstrated by a model. *Mar. Biol.*, **149**: 743 - 762.
- MONTAGNES D. J. S., BARBOSA A. B., BOENIGK J., DAVIDSON K., JÜRGENS K., MACEK M., PARRY J. D., ROBERTS E. C., ŠIMEK K. (2008) - Selective feeding behaviour of key free-living protists: avenues for continued study. *Aquat. Microb. Ecol.* **53**: 83 - 98.
- MURRELL M.C., HOLLIBAUGH J.T. (1998) - Microzooplankton grazing in the northern San Francisco Bay measured by the dilution method. *Aquat. Microb. Ecol.*, **15**: 53 - 63.
- NEJSTGAARD J.C., GISMERVIK I., SOLBERG P.T. (1997) - Feeding and reproduction by *Calanus finmarchicus*, and microzooplankton grazing during mesocosm blooms of diatoms and the coccolithophore *Emiliania huxleyi*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **147**: 197 - 217.
- PARANJAPE M.A. (1990) - Microzooplankton herbivory on the Grand Bank (Newfoundland Canada): a seasonal study. *Mar. Biol.*, **107**: 321 - 328.
- PATERSON H. L., KNOTT B., KOSLOW A. J., WAITE A. M. (2008) - The grazing impact of microzooplankton off south west Western Australia: as measured by the dilution technique. *J. Plankton Res.*, **30**: 379 - 392.
- PERNTHALER J. (2005) - Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nature Rev. Microbiol.*, **3**: 537 - 546.
- RECKERMANN M., VELDHUIS M.J.W. (1997) - Trophic interactions between picoplankton and micro and nanoplankton in the western Arabian Sea during the NE monsoon 1993. *Aquat. Microb. Ecol.*, **12**: 263 - 273.
- SAKKA HLAILI A., GRAMI B., MABROUK H.H, GOSSELIN M., HAMEL D. (2007) - Phytoplankton growth and microzooplankton grazing rates in a restricted Mediterranean lagoon (Bizerte Lagoon, Tunisia). *Mar. Biol.*, **151**: 767 - 783.
- SCHLÜTER L. (1998) - The influence of nutrient addition on growth rates of phytoplankton groups, and microzooplankton grazing rates in a mesocosm experiment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **228**: 53 - 71.
- SHERR B.F., SHERR E.B., FALLON R.D. (1987) - Use of monodispersal, fluorescently labelled bacteria to estimate in situ protozoan bacterivory. *Appl. Env. Microb.*, **53**: 958 - 965.
- STELFOX-WIDDICOMBE C.E., EDWARDS E.S., BURKILL P.H., SLEIGH M.A. (2000) - Microzooplankton grazing activity in the temperate and sub-tropical NE Atlantic: summer 1996. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **208**: 1 - 12.
- STROM S.L., MACRI E. L., OLSON M. B. (2007) - Microzooplankton grazing in the coastal Gulf of Alaska: Variation in top-down control of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, **52**(4):1480 - 1494.
- STROM S.L. (2000) - Bacterivory: interactions between bacteria and their grazers. In: Kirchman D.L. (ed.), *Microbial ecology of the oceans*: 351 - 386.
- STROM S.L., STROM M.W. (1996) - Microplankton growth, grazing, and community structure in the northern gulf of Mexico. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **130**: 229 - 240.

-
- STROM S.L., WELSCHMEYER N.A. (1991) - Pigment specific rates of phytoplankton growth and microzooplankton grazing in the open subarctic Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.*, **36**(1): 50 – 63.
- VERITY P.G., STOECKER D.K., SIERACKI M.E., NELSON J.R. (1993) - Grazing, growth and mortality of microzooplankton during the 1989 North Atlantic spring bloom at 47°N, 18°W. *Deep-Sea Res.*, I **40**(9): 1793 – 1814.
- VERITY P.G., STOECKER D.K., SIERACKI M.E., NELSON J.R. (1996) - Microzooplankton grazing and primary production at 140°W in the equatorial Pacific. *Deep-Sea Res.*, **43**(4-6): 1227 – 1255.
- WATERHOUSE T.Y., WELSCHMEYER N.A. (1995) - Taxon specific analysis of microzooplankton grazing rates and phytoplankton growth rates. *Limnol. Oceanogr.*, **40**(4): 827-834.

CAPITOLO 46. TECNICHE DI MICROSCOPIA A FLUORESCENZA PER LO STUDIO DELLO ZOOPLANCTON

I. Buttino

isabella.buttino@szn.it - isabella.buttino@isprambiente.it

46.1 INTRODUZIONE

La microscopia a fluorescenza è una tecnica largamente impiegata per la visualizzazione di strutture cellulari e per lo studio dei processi fisiologici e biologici dinamici poiché ha il vantaggio, rispetto alla microscopia elettronica, di permettere l'osservazione di campioni biologici *in vivo*. L'immunofluorescenza è la più comune applicazione della microscopia a fluorescenza in biologia cellulare; selezionando anticorpi specifici marcati con fluorocromi che emettono a lunghezze d'onda (λ) differenti, è possibile visualizzare regioni specifiche in tessuti, organelli e strutture cellulari anche di dimensioni inferiori al potere risolutivo della microscopia ottica.

La disponibilità di sonde fluorescenti sempre più selettive e sensibili (vedi sito della Molecular Probes www.probes.it) ha aperto nuovi orizzonti per lo studio dei fenomeni biologici attraverso le tecniche di immunofluorescenza. Inoltre, con lo sviluppo della microscopia laser confocale (MLC) e di sistemi software e hardware sempre più raffinati, si è avuto negli ultimi quindici anni un nuovo impulso allo studio della biologia cellulare; grazie a queste tecniche innovative la microscopia ad epifluorescenza convenzionale è stata quasi del tutto sostituita dalla MLC.

Il principio della confocalità fu ideato da Marvin Minsky nel 1955 per poter analizzare, in 3 dimensioni, le interconnessioni spaziali tra le cellule in tessuti del sistema nervoso centrale (Minsky, 1961, 1988). Tuttavia, il primo microscopio confocale fu commercializzato solo nel 1987, quando se ne intuirono le potenzialità nel campo della microscopia a fluorescenza (Laurent *et al.*, 1992; Boyde, 1995). Il successo scientifico, e quindi commerciale del MLC, è dovuto ad alcune caratteristiche uniche come la possibilità di effettuare sezioni ottiche digitali di campioni integri e di ricostruirne poi l'immagine tridimensionale con software appropriati. La fonte luminosa necessaria per l'eccitazione delle sonde fluorescenti è data dai laser (Fig. 1 A) mentre la fluorescenza viene raccolta da un fotomoltiplicatore che converte l'energia

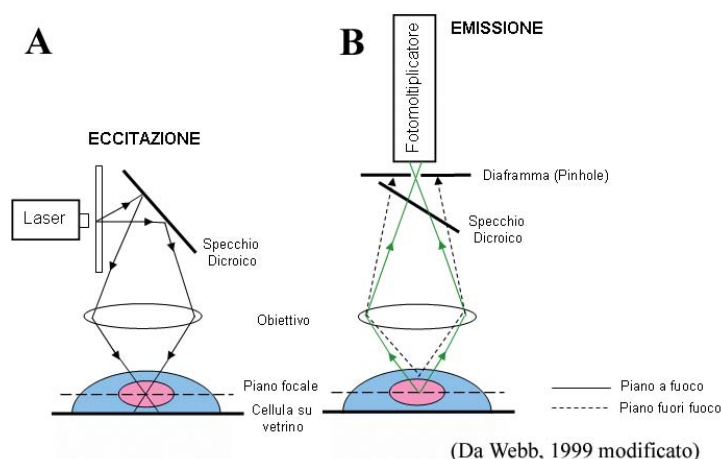


Figura 1. Microscopio laser confocale. Rappresentazione schematica dei percorsi di eccitazione (A) ed emissione (B) di fluorocromi da un piano focale. A) La luce di eccitazione proviene da una fonte di laser, incontra lo specchio dicroico che focalizza la luce sul piano di fuoco del campione ed eccita la molecola fluorescente. B) La fluorescenza in emissione proveniente dal piano focale è la sola che passa attraverso il diaframma (pinhole) e viene captata dal fotomoltiplicatore che converte l'energia luminosa in immagine digitale; le emissioni provenienti dai piani fuori fuoco non contribuiscono all'immagine finale grazie al pinhole. (Da Webb, 1999 modificato).

luminosa in immagine digitale. Il vantaggio, rispetto alla microscopia a fluorescenza convenzionale è che l'immagine finale rappresenta effettivamente il piano focale, i contributi fluorescenti dei piani fuori fuoco vengono esclusi grazie alla presenza di un diaframma (pinhole) (Fig. 1 B).

L'acquisizione delle immagini fluorescenti su differenti piani focali permette la ricostruzione tridimensionale del campione con la possibilità di ottenere una varietà di rappresentazioni come la rotazione in tutte le orientazioni spaziali possibili e proiezioni ortogonali digitali. Con la microscopia laser confocale, inoltre, è possibile combinare le informazioni morfologiche con lo studio dei processi fisiologici delle cellule *in vivo* (variazioni di pH intracellulare, flusso di ioni Calcio etc.). In Figura 2 A, B è riportata schematicamente la differente modalità di acquisizione delle immagini con le due tecniche di microscopia a fluorescenza: nel caso della microscopia classica ad epifluorescenza, l'immagine è simile anche se si mettono a fuoco piani differenti (asse z) poiché vi è il contributo dei piani fuori fuoco (Fig. 2 A), mentre nel caso della MLC ciascun piano focale ha una sua immagine corrispondente (da qui il nome "confocalità") e le due biglie fluorescenti possono essere osservate distintamente (Fig. 2 B).

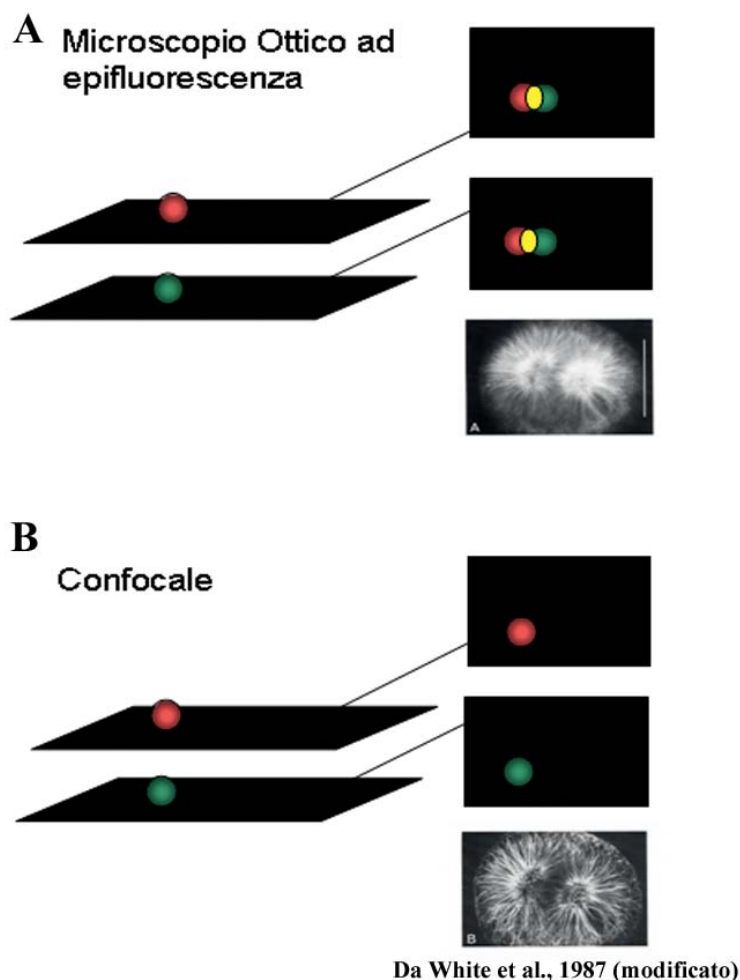


Figura 2. Rappresentazione schematica delle modalità di acquisizione mediante microscopia ad epifluorescenza convenzionale (A) e con la microscopia laser confocale (B), e corrispondenti immagini reali di un embrione di riccio di mare alla prima divisione mitotica; il fuso mitotico è stato colorato con anticorpi anti-tubulina. Con la microscopia convenzionale i due fluorocromi, sebbene siano su piani diversi del campione, appaiono sovrapposti anche se si modifica il piano focale di osservazione; mentre con la microscopia laser confocale ciascun piano focale evidenzia un solo fluorocromo. (da White *et al.*, 1987, modificato).

L'immagine finale è così molto più nitida, come dimostrato da White e collaboratori (1987). Proprio per mostrare i vantaggi di questa tecnica, gli autori hanno utilizzato anticorpi anti-tubulina coniugati con fluoresceina per mettere in evidenza il fuso mitotico di embrioni di riccio di mare in divisione. Questa struttura, orientata su diversi piani focali, è quindi difficilmente osservabile con la fluorescenza convenzionale dove la luce proveniente dai piani sovrastanti e sottostanti il piano focale rende offuscata l'immagine. Inoltre, in cellule di grandi dimensioni come sono appunto gli embrioni, è ancora più difficile evidenziare il particolare fluorescente su di un solo piano focale. La stessa immagine, ottenuta con le tecniche di MLC mostra le fibre del fuso più nitide, sebbene queste strutture abbiano dimensioni inferiori al potere di risoluzione del microscopio ottico.

Il successo della MLC è andato di pari passo con lo sviluppo della chimica dei composti fluorescenti ed oggi è possibile impiegare anticorpi fluorescenti che coprono un ampio spettro di lunghezze d'onda in eccitazione e in emissione.

Nella MLC la presenza di due o più fotomoltiplicatori consente di osservare simultaneamente due o più fluorocromi, che abbiano spettri di eccitazioni ed emissioni separati, nello stesso campione; ad esempio il DNA ed il citoscheletro possono essere evidenziati impiegando sonde nucleari come Hoechst (con eccitazione nell'ultravioletto ed emissione nel blu) ed anticorpi anti-tubulina coniugati con fluoresceina (con eccitazione nel blu ed emissione nel verde). Inoltre, la ricostruzione 3-D dell'embrione permette di seguire le complesse relazioni ed interconnessioni dei filamenti di tubulina in tutto il campione e su piani focali diversi (Matsumoto, 1993). Con il MLC si possono quindi mettere in evidenza organelli cellulari, marcati con sonde fluorescenti, con una definizione migliore rispetto alla classica microscopia ad epifluorescenza. Ciò permette inoltre, di individuare specifiche relazioni spaziali di strutture cellulari poste su piani differenti.

A tutt'oggi, tuttavia, la maggior parte delle tecniche di MLC sono state applicate nel campo delle scienze biomediche, come ad esempio in patologia sperimentale, per lo studio dei processi apoptotici e tossicologici (Smith *et al.*, 1991), per la diagnostica medica (Baak *et al.*, 1987), per lo studio della biologia dello sviluppo (Stricker *et al.*, 1992; Reynaud *et al.*, 2001) e in neurobiologia (Baker e Reese, 1993). Applicazioni delle tecniche di MLC in questi settori hanno, inoltre, incoraggiato lo sviluppo e la ricerca di nuove sonde fluorescenti (Reynaud *et al.*, 2001; Baak, 1987; Smith *et al.*, 1991).

Solo di recente, le nuove tecniche di MLC sono state sperimentate in altri settori di ricerca e con modelli cellulari diversi da quelli classicamente in uso per scopi biomedici. In biologia marina questo strumento ha aperto nuovi orizzonti di indagine, mai esplorati prima con le tecniche d'immunofluorescenza, per lo studio dei fenomeni biologici e fisiologici degli organismi marini. Sebbene in questo campo la MLC sia ancora agli esordi, i primi studi hanno già mostrato le enormi potenzialità di questo strumento non solo per approfondire aspetti morfologico/funzionali di per sé, ma anche per individuare più ampie relazioni tra organismi ed ecosistema marino. Generalmente i protocolli di immunofluorescenza prevedono la fissazione dei campioni, nel caso di coloranti non vitali, oppure l'incubazione diretta in acqua di mare nel caso di colorazioni vitali. Nel caso di campioni fissati questi devono essere resi permeabili agli anticorpi ed ai fluorocromi (generalmente mediante un detergente come il TRITON), devono poi essere incubati con anticorpi primari e successivamente con anticorpi secondari coniugati con le molecole fluorescenti (sono in commercio anche anticorpi primari già legati a sonde fluorescenti), ed infine devono essere risciacquati dall'eccesso di colorante ed osservati a fluorescenza.

In questo capitolo si riporteranno le tecniche ed i protocolli di immunofluorescenza impiegati per l'analisi della morfologia dei crostacei planctonici (copepodi e larve di decapodi), per lo sviluppo embrionale dei copepodi e del riccio di mare, per lo studio della vitalità/mortalità degli embrioni (apoptosi e necrosi). Alcuni di questi protocolli possono essere sperimentati anche su altri modelli animali con le dovute modifiche richieste dal tipo di organismo da utilizzare.

46.2 ANALISI MORFOLOGICA DEI CROSTACEI (LARVE ED EMBRIONI) MEDIANTE CARBOCIANINE

Nell'ambito degli studi sulla morfologia e la fisiologia dello zooplancton marino, in particolare dei copepodi, Bundy e Paffenhöfer (1993) hanno sviluppato, per la prima volta, una tecnica di MLC per

evidenziare le strutture sensoriali nervose presenti alla base delle antennule. Sfruttando la lipofilicità del fluorocromo DiI è stata studiata la morfologia delle sete e di organi mecano-recettori, strutture estremamente fragili e difficilmente conservate con le procedure di fissazione per la microscopia elettronica. Lo studio ha mostrato che con le tecniche di MLC è possibile inoltre analizzare le relazioni tra struttura e funzione e quindi tra fisiologia ed ecologia degli organismi marini.

I copepodi posseggono regioni specializzate della superficie cuticolare che vengono usate come chiavi di riconoscimento tassonomico o filogenetico. Tali strutture sono generalmente osservate mediante microscopia elettronica a scansione (SEM). Grazie alla autofluorescenza della cuticola, l'analisi di queste strutture al MLC risulta più dettagliata, senza dover correre il rischio di danneggiarle con un protocollo invasivo come quello richiesto per la microscopia elettronica. In questo settore, quindi, la MLC offre un nuovo livello di indagine della morfologia dei copepodi (Galassi *et al.*, 1998).

Il DiI è una carbocianina lipofilica ed è stata impiegata anche per il riconoscimento dei diversi stadi larvali dei copepodi poichè rende fluorescente l'intero organismo che può così essere osservato al MLC. La descrizione di ciascuno stadio larvale ed il loro riconoscimento richiedevano l'uso della camera lucida abbinata al microscopio a luce trasmessa. Questa tecnica consentiva di disegnare le parti anatomiche dei singoli stadi larvali e di appendici sezionate, e poi di confrontarle con tavole di riconoscimento. Con la MLC si possono ottenere ingrandimenti e dettagli di aree, anche di piccole dimensioni, senza dover effettuare dissezioni e con un'elevata definizione dell'immagine, indipendentemente dalla manualità dell'operatore (Fig. 3 A, B).

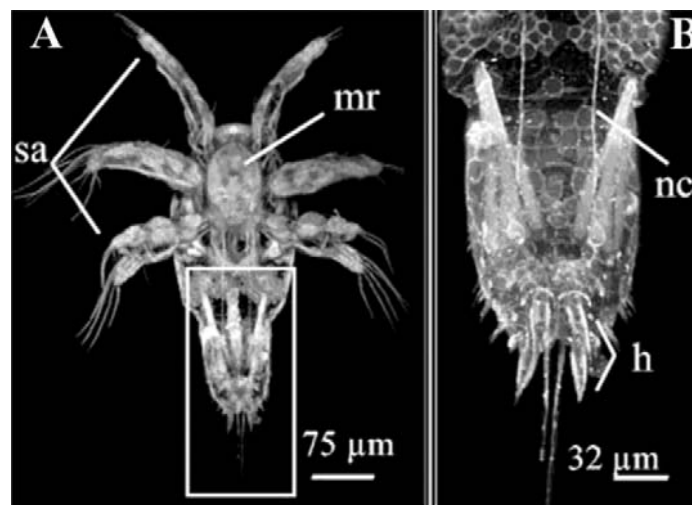


Figura 3. Stadi naupliari del copepode *Calanus helgolandicus* colorati con DiI ed osservati al microscopio laser confocale Zeiss 310, luce di eccitazione Argon laser 488 nm λ . A) Ricostruzione tridimensionale di nauplio NIII ottenuta con 27 sezioni ottiche dello spessore di 3 μ m, visione ventrale. B) Ricostruzione tridimensionale della regione in A ottenuta con zoom digitale di 1,6x da 55 sezioni ottiche di 1,4 μ m; h = uncini e spine sui rami caudali; mr = regione buccale; nc = cordoni nervosi; sa = appendici natatorie. Da Buttino *et al.*, 2003, modificato.

Inoltre, l'archiviazione in formato digitale delle immagini semplifica notevolmente il lavoro di riconoscimento delle specie zooplanctoniche (Carotenuto, 1999; Buttino *et al.*, 2003).

Grazie alla sua lipofilicità, il DiI è stato utilizzato anche per visualizzare gli organi interni dei crostacei decapodi e per seguirne lo sviluppo durante le diverse fasi larvali (Zupo e Buttino, 2001). Questi organismi modificano il loro ciclo vitale passando da una fase larvale zooplanctonica ad adulti bentonici, pertanto lo studio dei cambiamenti morfologici permette di approfondire anche aspetti più propriamente ecologici. Per questi campioni la difficoltà maggiore è sempre quella della permeabilizzazione, inoltre questi organismi sono di notevoli dimensioni, arrivando a misurare fino a qualche mm di lunghezza. L'osservazione al MLC richiede, quindi, obiettivi a basso ingrandimento e ad alta

apertura numerica come quelli ad immersione ad acqua recentemente commercializzati da alcune case produttrici di microscopi laser.

Il DiOC₆ (3,3'-diesiloxacarbocianina ioduro) è un'altra carbocianina ed è stata utilizzata per marcare sia tessuti ed organi di copepodi, che embrioni in vivo ed è da considerarsi un colorante vitale (Fig. 4).

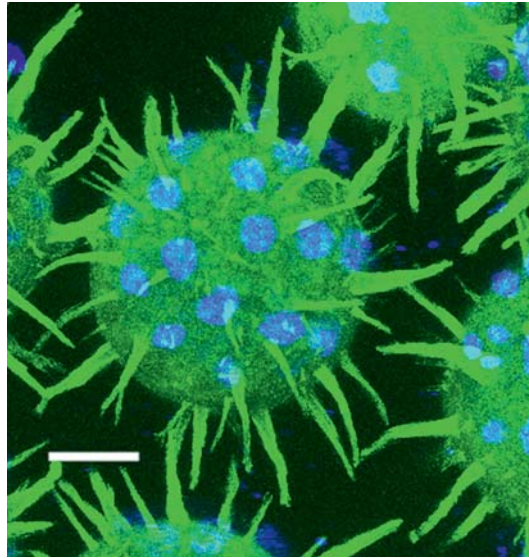


Figura 4. Ricostruzione tridimensionale di embrione di copepode *Centropages typicus* colorato con DiOC₆ (verde) per evidenziare la componente citoplasmatica, e con Hoechst (blue) per evidenziare i nuclei, ed osservato con microscopio Zeiss CSLM 410. Da Buttino *et al.*, 2003, modificato.

46.3 PROTOCOLLI DI COLORAZIONE CON CARBOCIANINE E HOECHST

Diocadecil-tetrametilindocarbocianina (DiI)

- Fissare gli organismi in 4% paraformaldeide in acqua di mare (SW) per almeno due ore a temperatura ambiente.
- Risciacquare i campioni in soluzione composta da acqua bi-distillata BDW:SW 1:1 vol/vol e poi solo in BDW.
- Preparare soluzioni di acqua bidistillata a concentrazione di etanolo al 50%. Incubare in soluzione di etanolo 50% per 2 minuti.
- Preparare soluzione diluita di DiI così composta: DiI 5 mg in 2 ml Etanolo al 95%; diluisci 20 µl di questa soluzione in 4 ml etanolo 95% (Soluzione diluita di DiI).
- Preparare soluzione di 1 ml etanolo al 70% + 80 µl di Soluzione diluita di DiI e lascia per 60 min a temperatura ambiente.
- Sciacquare in etanolo 50% per 60 sec e poi in BDW fino ad eliminare totalmente l'etanolo dalla soluzione.
- Osservare i campioni a fluorescenza con eccitazione nel blu o nel verde (il DiI ha un ampio spettro di eccitazione/emissione) con corrispondenti emissioni nel verde o nel rosso se si utilizza un microscopio ad epifluorescenza convenzionale.
- Per un'osservazione al MLC si dovrà utilizzare un laser Argon a 488 nm λ oppure un laser Elio/Neon a 543 nm λ.
- 3,3'-diesiloxacarbocianina ioduro (DiOC₆)
- Incubare individui vivi in SW contenente una concentrazione finale di DiOC₆ pari a 0,5 µg ml⁻¹ ottenuto da una soluzione madre disciolta in etanolo (per esempio 0,5 mg ml⁻¹ DiOC₆ in etanolo) (Buttino *et al.*, 2003).

-
- Dopo 30 minuti gli individui possono essere sacrificati ed osservati a fluorescenza per l'osservazione degli organi interni utilizzando una luce di eccitazione blu o il laser 488 nm λ .

I copepodi hanno fecondazione interna, pertanto le uova sono fecondate dagli spermatozoi, contenuti nella spermateca, durante il passaggio attraverso l'ovidutto. Subito dopo la deposizione avviene la reazione corticale con formazione della parete di chitina che si ispessisce nel tempo rendendo l'embrione impermeabile.

Per seguire i patterns di divisione mitotica di embrioni di copepodi in vivo gli zigoti sono stati, perciò, incubati subito dopo la deposizione delle uova con il fluorocromo liposolubile DiOC6 per rendere fluorescente il citoplasma lipofilo, e con l'Hoescht per marcare il DNA (Buttino *et al.*, 2003).

Le uova appena deposte si incubano in soluzione 0,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ DiOC6 e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ di Hoechst 33342 (Sigma Aldrich) per 20 minuti al buio. Il DiOC6 rende fluorescente il citoplasma per la sua affinità con le componenti lipidiche, mentre l'Hoechst colora specificamente i nuclei intercalandosi con le basi del DNA.

Il DiOC6 si osserva dopo eccitazione con luce blu o con laser a 488 nm λ , mentre l'Hoechst si osserva con luce di eccitazione UV e con laser 365 nm λ .

Hertzler e Clark (1992) hanno messo a punto un sistema di rimozione meccanica della parete di chitina dagli embrioni di gambero *Sicyonia ingentis*, in modo da renderli permeabili agli anticorpi anti-tubulina usati per marcare il fuso mitotico. Inoltre, iniettando i primi 2-4 blastomeri con rodamina-destrano hanno seguito, in vivo, la progenie cellulare ottenendo così una mappa dettagliata dei foglietti embrionali (cell-lineage) (Hertzler and Clark, 1992; Wang *et al.*, 1997).

46.4 VITALITÀ DEGLI EMBRIONI DI COPEPDI

Gli embrioni di crostacei, in particolare di copepodi, rappresentano un modello cellulare nuovo in biologia marina e di notevole interesse ecologico poiché questi organismi costituiscono oltre il 70% dell'intera biomassa di produttori secondari negli oceani. La vitalità degli embrioni fornisce un indice di valutazione della produzione di biomassa in mare (Miralto *et al.*, 2003) ed è un importante indice per valutare la qualità dell'ecosistema marino nei saggi ecotossicologici.

Per determinare la vitalità degli embrioni di copepodi sono stati testati differenti fluorocromi, la fluoresceina di acetato (FDA oppure la diclorodidrossifluoresceina diacetato H₂DCFDA) (Sigma Aldrich), la 7-aminoactinomycin D (7-AAD) (Molecular Probes) e il SYTOX green (Molecular Probes).

La fluoresceina (FDA o H₂DCFDA) è un colorante vitale permeabile; una volta penetrato nelle cellule diventa fluorescente solo se le esterasi intracellulari, idrolizzando alcuni legami specifici, liberano fluoresceina. Ciò significa che cellule vive, cioè con attività esterasica, appariranno fluorescenti in verde mentre quelle morte, con esterasi inattive, non risulteranno fluorescenti.

La 7-AAD è un intercalante del DNA, permeabile solo nelle cellule morte, pertanto queste appariranno fluorescenti in rosso. Infine, il SYTOX risulta impermeabile alle cellule vive, mentre penetra nelle cellule morte, con membrana plasmatica danneggiata; queste ultime appariranno, quindi, con nuclei fluorescenti in verde.

Il vantaggio che ne deriva dall'uso di questi coloranti vitali è quello di poter fare una valutazione molto rapida della vitalità degli embrioni di copepodi senza dover aspettare i normali tempi di schiusa delle uova (tra le 48 e le 72 ore).

La tossicità di questi coloranti incorporati negli embrioni è stata alta per FDA e 7-AAD, mentre embrioni colorati con SYTOX schiudevano come il controllo non trattato. Pertanto, se gli embrioni devono essere mantenuti vitali fino alla schiusa è consigliabile utilizzare il SYTOX (Buttino *et al.*, 2004a; 2004b). Inoltre, embrioni colorati con il SYTOX mantengono la fluorescenza fino a 10 giorni dopo la colorazione se vengono fissati in formalina. Questo permette di fissare i campioni in un momento (ad esempio durante una crociera) e poi analizzarli successivamente (ad esempio in laboratorio).

I protocolli che vengono di seguito riportati sono stati sperimentati su embrioni di *Calanus helgolandicus* e si consiglia di verificarne l'efficacia se si usano specie di copepodi diversi (Fig. 5 A-F).

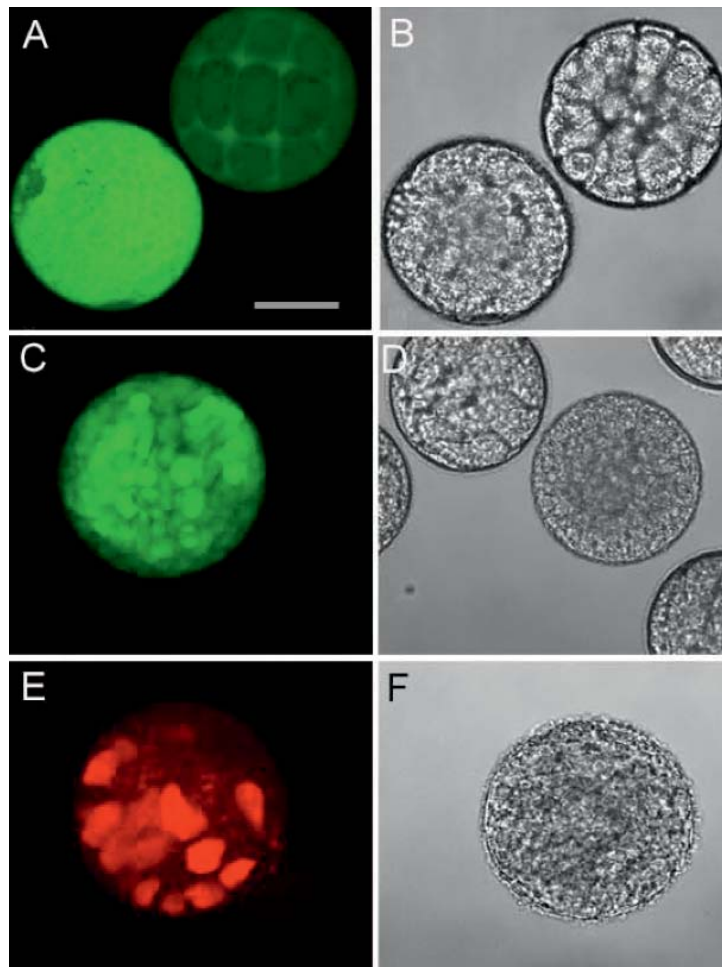


Figura 5. Embrioni di copepode *Calanus helgolandicus* colorati con FDA (A); Sytox green (C) e 7AAD (E) e rispettive immagini a luce trasmessa (B, D, F). (A) L'embrione fluorescente in verde è vitale mentre quello non fluorescente non è vitale; (C) L'embrione fluorescente in verde non è vitale, mentre quelli visibili nel pannello (D) impermeabili al Sytox sono vitali; (E) L'embrione fluorescente in rosso non è vitale. (Da Buttino *et al.*, 2004a, modificato) Barra = 69,5 μm .

46.5 TRATTAMENTO PRELIMINARE PER LA PERMEABILIZZAZIONE DEGLI EMBRIONI DI COPEPODI (COMUNE PER TUTTI I PROTOCOLLI DI COLORAZIONE)

Incubare gli embrioni vivi di copepodi (deposti al massimo da 12 ore) in SW contenenti 1 unità ml^{-1} di enzima chitinase (E.C. 3.2.1.14 da *Serratia marcescens*) per 30 minuti. Risciacquare in SW ed incubare in uno dei coloranti vitali come di seguito indicato.

SYTOX green (Molecular Probes)

- Incubare gli embrioni in 20 μM SYTOX green in SW per 50 minuti al buio a temperatura ambiente.
- Sciacquare tre volte con SW ed osservare a fluorescenza con luce blu o con laser a 488 nm λ .

Diclorodidrofluoresceina diacetato H₂DCFDA

- Incubare gli embrioni in 7,5 μM di H₂DCFDA in SW per 1 ora al buio a temperatura ambiente.
- Risciacquare almeno tre volte per eliminare il colorante ed osservare a fluorescenza con luce di eccitazione blu o con laser 488 nm λ .

Fluoresceina diacetato (FDA)

- Preparare una soluzione di FDA sciogliendo 7,3 mg FDA in 5 ml di dimetilsolfato (DMSO); Incubare gli embrioni in 1 Unità ml⁻¹ di enzima chitinase (E.C. 3.2.1.14 da *Serratia marcescens*) per 30 minuti a 20°C in SW;
- Sciacquare in SW ed incubare in una soluzione di FDA 7,5 µM per 50 minuti al buio a 20°C;
- Sciacquare tre volte in SW ed osservare a fluorescenza con luce blu o con MLC usando un laser di eccitazione a 488 nm λ.

Il DMSO non è risultato tossico alle concentrazioni usate per gli embrioni di *Calanus helgolandicus*, ma va testato per ogni esperimento se si impiegano specie diverse.

7-aminoactinomycin D (7-AAD) (Molecular Probes)

- Dopo l'incubazione in chitinase risciacquare gli embrioni ed incubarli in 20 µg ml⁻¹ 7-AAD in SW per 50 min al buio.
- Risciacquare tre volte ed osservare con luce verde o con laser a 543 nm λ.

46.6 FECONDAZIONE E SVILUPPO EMBRIONALE DEGLI ORGANISMI MARINI

La permeabilizzazione ai coloranti è una delle maggiori difficoltà che si incontrano quando si usano organismi marini. I crostacei, in particolare, posseggono uno spesso strato di chitina che riveste sia gli embrioni che gli organismi adulti e che deve essere rimosso per via enzimatica o meccanica prima della incubazione con anticorpi fluorescenti. Protocolli di immunocitochimica classica ben sperimentati su cellule isolate, quindi, non possono essere applicati tal quale su campioni marini.

D'altro canto, gli zigoti e gli embrioni sono campioni ideali per l'osservazione al MLC poiché per le loro grandi dimensioni e la presenza di materiale lipidico di riserva, le strutture cellulari sono difficilmente osservabili al microscopio ad epifluorescenza convenzionale.

Una delle prime applicazioni della microscopia a fluorescenza prima, e della MLC poi, ha riguardato lo studio delle anomalie morfologiche e funzionali di embrioni e larve dopo esposizione a sostanze tossiche e teratogeniche (Miralto *et al.*, 1999). Per verificare il tipo di anomalie indotte sono state impiegate tecniche di MLC che permettono l'osservazione contemporanea del DNA e dello stato fisiologico (apoptosi) delle cellule mediante l'utilizzo di coloranti specifici (Hoechst e TUNEL), rispettivamente.

Il protocollo di colorazione con Hoescht, un intercalante del DNA che rende fluorescenti quindi i nuclei, è già stato riportato nel paragrafo carbocianime. L'Hoescht è utile per seguire non solo lo sviluppo embrionale ed i piani di divisione dello zigote, ma anche per verificare se è avvenuta la fecondazione (presenza di pronucleo maschile nell'ocita) e se la divisione procede in maniera normale. Questo tipo di colorante vitale può essere usato anche per colorare nuclei di campioni fissati e può essere abbinato ad un protocollo per il rilevamento di cellule in fase apoptotica, come quello che prevede l'utilizzo del TUNEL. L'apoptosi, o morte cellulare programmata, è sia un processo naturale, poiché avviene durante lo sviluppo embrionale per il rimodellamento dei tessuti, che un processo indotto, come avviene in seguito ad esposizione con agenti chimici o a sostanze naturali bioattive. L'apoptosi si differenzia dalla necrosi per una serie di fenomeni fisiologici preliminari che avvengono all'interno dei compartimenti cellulari. La previsione di un evento apoptotico, in una cellula che si presenta ancora vitale, indica che vi è stato un segnale endogeno o esogeno che ha innescato gli eventi apoptotici e che la porterà alla morte. In sostanza è una predizione della vitalità o mortalità cellulare.

Il TUNEL è una tecnica comunemente usata per la determinazione dell'apoptosi in molti modelli cellulari ed è stato utilizzato anche su organismi marini, embrioni e larve di crostacei, embrioni di riccio di mare e ascidie, ecc. Il TUNEL permette di mettere in evidenza eventi precoci di morte cellulare marcando frammenti di DNA parzialmente degradati che si formano nelle prime fasi di apoptosi. Il principio della colorazione si basa sul fatto che durante l'evento apoptotico iniziale vi è una segmentazione del DNA che porta alla esposizione di terminali 3'-OH. Questi frammenti di DNA possono essere identificati

mediante reazione enzimatica: il TdT (terminal deossinucleotidil transferasi) catalizza l'attacco di una base fluorescente (Fluoresceina-dUTP) ai 3'-OH liberi rendendo così fluorescenti in verde i nuclei che presentano queste segmentazioni (Fig. 6).

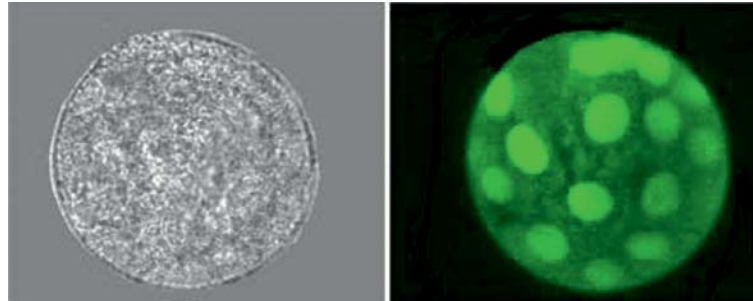


Figura 6. A-B Embrioni di copepode *Calanus helgolandicus* incubati con TUNEL per mettere in evidenza l'apoptosi (morte cellulare programmata). A) Embrione osservato a luce trasmessa; B) lo stesso embrione osservato con microscopio laser confocale Zeiss LSM 310 in fluorescenza e ricostruito in tre dimensioni. I nuclei appaiono fluorescenti in verde indicando positività per l'apoptosi. (Da: Romano *et al.* 2003, modificato).

46.6.1 Protocollo colorazione copepodi con TUNEL

Fissativo

- Soluzione paraformaldeide 4% pH 7,4 in Phosphate Buffered Saline (PBS) e NaCl 0,2M
- Soluzione di chitinase. Sciogliere 1U ml⁻¹ di chitinase (E.C. 3.2.1.14 da *Serratia marcescens*) in soluzione di acido citrico/sodio citrato 50mM pH 6.

Soluzione DNAase I (per controllo positivo)

- TRIS-HCl 50 mM
- MgCl₂ 10 mM
- DTT (ditiotreitolo) 0,1 mM
- Dna-se 1g ml⁻¹ (in BDW)
- Incubare i campioni per 10 minuti a temperatura ambiente per ottenere un controllo positivo.

Soluzione TRITON X-100

- TRITON X-100 0,1 g
- Na Citrato 0,114 g
- Portare la soluzione a 100 ml con BDW
- Soluzione Sodio azide 0,02% in PBS
- Fissare in campioni in fissativo per almeno 12 h a temperatura ambiente.

Sciogliere in PBS ed incubare i campioni (embrioni e copepodi) in soluzione di chitinase per 12 ore a 20°C. Sostituire la soluzione di chitinase ed incubare per altre 12h a 20°C. In alcuni casi, è necessario, prima dell'incubazione in chitinase, congelare e scongelare per almeno tre volte e per 5 minuti ogni volta, i campioni in azoto liquido per favorire la frattura del carapace e permeabilizzare il campione. In altri (adulti di *Calanus helgolandicus*) si è proceduto alla rimozione del telson prima della incubazione in TRITON.

Sciogliere in PBS ed incubare in 0,1% di TRITON X-100 overnight a temperatura ambiente.

Risciacquare due volte in PBS e la terza con PBS con 1% BSA

Incubare in TUNEL seguendo il protocollo del kit della Roche.

In alcuni casi se la colorazione è aspecifica il TUNEL va diluito fino a 5 volte seguendo il protocollo della casa produttrice.

46.7 LA MLC NELLO STUDIO DEGLI AGGREGATI ORGANICI MARINI

Aggregati organici marini fluttuanti vengono definiti con il nome generico di neve marina. Sono composti da materiale di origine organica disciolta e particellata come fitoplancton, batteri, pellet fecali e da sostanza inorganica come composti minerali ecc.. (Silver e Alldredge, 1981). La diversa composizione della neve marina può fornire un'indicazione sullo stato di trofismo dell'ecosistema, infatti, in ambiente oligotrofico, prodotti microbici possono essere importanti concentratori di nutrienti promuovendo così l'attacco da parte di altri microrganismi epifiti (Congestri *et al.*, 2006). La composizione degli aggregati che costituiscono la neve marina è abbastanza nota, tuttavia, per la loro inconsistenza e per la difficoltà a mantenere l'integrità tridimensionale, la struttura fisica della neve marina e la relazione tra composizione minerale ed organica della matrice è ancora poco nota. Per la prima volta Cowen e Holloway (1996) hanno osservato questi aggregati al MLC. Molti microrganismi sono autofluorescenti per la presenza di pigmenti fotosintetici, come la clorofilla *a* del fitoplancton e le ficoeritrine dei cianobatteri. Per i polisaccaridi sono stati impiegati la concanavalina A e per le cellule morte o senescenti lo ioduro di propidio (Holloway e Cowen, 1997). I dettagli della struttura interna rivelano molti aspetti legati alla formazione dell'agglomerato ed ai processi di coagulazione consentendo di predire il suo destino nell'ecosistema marino.

Recentemente, studi sulla composizione e sul ruolo della neve marina negli oceani hanno mostrato che questi aggregati costituiscono un importante veicolo di materia organica attivando il metabolismo del carbonio. Grazie ai batteri ad essa associati, la sostanza organica particellata sarebbe convertita in sostanza organica disciolta, trasformando così una elevata quantità di carbonio in biomassa. Con le tecniche di MLC è quindi possibile osservare la struttura degli aggregati senza danneggiare la composizione spaziale.

La MLC è stata impiegata anche per l'osservazione di campioni di mucillagine raccolti durante l'eccezionale fioritura algale del Nord Adriatico nel 1988. I campioni raccolti sono stati fissati e colorati con coloranti specifici per evidenziare il DNA, i polisaccaridi, ed i lipidi, per identificarne la componente della comunità planctonica ed individuare nuovi possibili meccanismi di formazione della mucillagine a mare (Baldi *et al.*, 1997).

46.8 CONCLUSIONI

L'uso interdisciplinare del MLC ne ha favorito l'ampia diffusione nei più svariati settori della biologia. In particolare in biologia marina il MLC si è rivelato un utile strumento di indagine sia per l'analisi morfologica (descrizione anatomica interna ed esterna di organismi marini), che per gli studi di fisiologia (fecondazione e sviluppo, apoptosi). Più in generale, le tecniche di microscopia a fluorescenza per lo studio dello zooplancton possono essere sviluppate anche senza l'impiego di uno strumento ancora così costoso e complesso come il confocale, utilizzando un comune microscopio ad epifluorescenza. In ogni caso, le maggiori difficoltà che si incontrano quando si lavora con gli organismi marini sono quelle legate alla permeabilizzazione dei tessuti ed alla specificità delle sonde fluorescenti. Molti anticorpi, infatti, sono testati su modelli animali terrestri e la loro specificità su organismi marini deve essere valutata di volta in volta per ciascun campione. Inoltre, in alcuni casi, le grandi dimensioni dei campioni da analizzare rendono difficile la scansione di tutto lo spessore (asse *z*), pertanto la ricostruzione tridimensionale può risultare incompleta o artefatta. Tuttavia, l'indubbio vantaggio che deriva dalla osservazione di campioni integri e la possibilità di ottenere ricostruzioni nello spazio (3 dimensioni) e nel tempo seguendone anche i processi fisiologici (4 dimensioni), è di stimolo per la ricerca di nuovi protocolli sperimentali e per lo sviluppo di settori di ricerca innovativi in ecologia marina. Questo capitolo non è senz'altro esaustivo dei protocolli di microscopia a fluorescenza utilizzati per lo studio dello zooplancton, ma vuole essere di stimolo per gli operatori del settore, a ricercare e sperimentare nuove applicazioni delle tecniche di immunofluorescenza per lo studio della fisiologia e dell'anatomia dello zooplancton marino.

46.9 BIBLIOGRAFIA

- BAAK J.P.A., THUNNISSEN J.M., OUDEJANS C.B.M., SCHIPPER N.W. (1987) - Potential clinical uses of laser scan microscopy. *Appl. optics*, **26**: 3413-3416.
- BAKER G.E., REESE B.E. (1993) - Using confocal laser scanning microscopy to investigate the organization and development of neuronal projections labelled with DiI. In: Matsumoto B. (ed), *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*. Academic Press, Inc., San Diego: 325-366.
- BALDI F., MINACCI A., SALITO A., MEJANELLE L., MOZETIC P., TURK V., MALEJ A. (1997) - Cell lysis and release of particulate polysaccharides in extensive marine mucilage assessed by lipid biomarkers and molecular probes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **153**: 45-57.
- BUNDY M.H., PAFFENHÖFER G.A. (1993) - Innervation of copepod antennules investigated using laser scanning confocal microscopy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **102**: 1-14.
- BUTTINO I., IANORA A., CAROTENUTO Y., ZUPO V., MIRALTO A. (2003) - Use of the Confocal Laser Scanning Microscope in studies on the developmental biology of marine invertebrates. *Microscopy Res. Tech.*, **60**: 458-464.
- BUTTINO I., DO ESPIRITO SANTO M., IANORA A., MIRALTO A. (2004a) - Rapid assessment of copepod (*Calanus helgolandicus*) embryo viability using fluorescent probes. *Mar. Biol.*, **145**: 393-399.
- BUTTINO I., PERALBA A., MAZZOCCHI MG. (2004b) A novel method to detect embryo viability in the egg-carrying copepod *Clausocalanus furcatus*. *Rapp. Comm. int. Mer. Médit.*, **37**: 325.
- CAROTENUTO Y. (1999) - Morphological analysis of larval stages of *Temora stylifera* (Copepoda, Calanoida) from the Mediterranean Sea. *J. Plankton Res.*, **21**: 1613-1632.
- CONGESTRI R., DI PIPPO F., DE PHILIPPIS R., BUTTINO I., PARADOSSI G., ALBERTANO P. (2006) - Seasonal succession of phototrophic biofilms in an Italian wastewater treatment plant: biovolume, spatial structure and exopolysaccharides. *Aquatic Microb. Ecol.*, **45**: 301-312.
- COWEN J.P., HOLLOWAY C.F. (1996) - Structural and chemical analysis of marine aggregates: in situ macrophotography and laser confocal and electron microscopy. *Mar. Biol.*, **126**: 163-174.
- GALASSI D.M.P., DE LAURENTIIS P., GIAMMATTEO M. (1998) - Integumental morphology in copepods: assessment by confocal laser scanning microscopy (CLSM) (Crustacea, Copepoda). *Fragmenta entomologica*, **30**: 79-92.
- HERTZLER P.L., CLARK W.H. Jr. (1992) - Cleavage and gastrulation in the shrimp *Sicyonia ingentis*: invagination is accompanied by oriented cell division. *Development*, **116**: 127-140.
- HOLLOWAY C.F., COWEN J.P. (1997) - Development of scanning confocal laser microscopic technique to examine the structure and composition of marine snow. *Limnol. Oceanogr.*, **42**: 1340-1352.
- LAURENT M., JOHANNIN G., LE GUYADER H., FLEURY A. (1992) - Confocal scanning optical microscopy and three-dimensional imaging. *Biol. Cell.*, **76**: 113-124.
- MATSUMOTO B. (1993) - *Methods in Cell biology. Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*, Academic Press Inc., San Diego: 375 pp.
- MINSKY M. (1961) - US Patent # 3,013,467; priority 07.11.57 US, granted 19.12.61 US. *Microscopy Apparatus*.
- MINSKY M. (1988) - Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, **10**: 128-138.
- MIRALTO A., BARONE G., ROMANO G., POULET S.A., IANORA A., RUSSO G.L., BUTTINO I., MAZZARELLA G., LAABIR M., CABRINI M., GIACOBBE M.G. (1999) - The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, **402**: 173-176.
- MIRALTO A., GUGLIELMO L., ZAGAMI G., BUTTINO I., GRANATA A., IANORA A. (2003) - Inhibition of population growth in the copepods *Acartia clausi* and *Calanus helgolandicus* during diatom blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **254**: 253-268.
- REYNAUD K., NOGUEIRA D., CORTVRINDT R., KURZAWA R., SMITZ J. (2001) - Confocal microscopy: principles and applications to the field of reproductive biology. *Folia Histochem. Cyto.*, **39**: 75-85.
- ROMANO G., RUSSO GL., BUTTINO I., IANORA A., MIRALTO A. (2003) - A marine diatom-derived aldehyde induces apoptosis in copepod and sea urchin embryos. *J. Exp. Biol.*, **206**: 3487-3494.
- SILVER M.W., ALLDREDGE A.L. (1981) - Bathypelagic marine snow: deep-sea algal and detrital community. *J. mar. Res.*, **39**: 501-530.
- SMITH G.J., BAGNELL C.R., BAKEWELL W.E., BLACK K.A., BOULDIN T.W., EARNHARDT T.S., HOOK G.E.R., PRYZWANSKY K.B. (1991) - Application of confocal scanning laser microscopy in experimental pathology. *J. Electron Microsc. Tech.*, **18**: 38-49.

-
- STRICKER S.A., CENTONZE V.E., PADDOCK S.W., SCHATTEN G. (1992) - Confocal microscopy of fertilization-induced calcium dynamics in sea urchin eggs. *Dev. Biol.*, **149**: 370-380.
- WANG S.W., GRIFFIN F.J., CLARK W.H. Jr. (1997) - Cell-cell association directed mitotic spindle orientation in the early development of the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. *Development*, **124**: 773-780.
- WEBB R.H. (1999) – Theoretical basis of confocal microscopy. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press inc. San Diego: 3-20.
- WHITE J.G., AMOS W.B., FORDHAM M. (1987) – An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structure by fluorescence light microscopy. *J. Cell Biol.*, **105**: 41-48.
- ZUPO V., BUTTINO I. (2001) - Larval development of decapod crustaceans investigated by confocal microscopy: an application to *Hyppolite inermis* (Natantia). *Mar. Biol.*, **138**: 965-973.

Lecture consigliate

- DIASPRO A. (2001). *Confocal and Two-Photon Microscopy: foundations, applications and advances*, Wiley.
- HIBBS A.R. (2004) - *Confocal Microscopy for Biologists*, Springer.
- MATSUMOTO B. (2002) - *Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*, Academic Press.
- PADDOCK S.W. (1999) - *Confocal Microscopy: Methods and Protocols*, Springer.
- PAWLEY J.B. (1995) - *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, Plenum Press.

CAPITOLO 47. ALLEVAMENTO DEI COPEPODI PLANCTONICI IN PICCOLI E GRANDI VOLUMI

I. Buttino, A. Ianora

isabella.buttino@szn.it - isabella.buttino@isprambiente.it

47.1 INTRODUZIONE

I primi esperimenti relativi al mantenimento di copepodi marini in laboratorio risalgono agli inizi del secolo ma solo dagli anni 70 in poi si sono messe a punto tecniche adeguate per allevare le più importanti specie oloplanctoniche. La necessità di mantenere ed allevare copepodi calanoidi in laboratorio si è accresciuta negli ultimi anni sia per conoscerne meglio la fisiologia, visto che sono importanti componenti della catena trofica marina, sia per il recente interesse come potenziale alimento per larve di pesci in acquacoltura, in alternativa a rotiferi ed *Artemia* (Battaglia, 1970; Lawson e Grice, 1970; Paffenhöfer 1970; Kitajima, 1973; Gaudy, 1974; Landry 1975; Paffenhöfer e Harris 1979; Støttrup *et al.*, 1986; Huntley *et al.*, 1987; Støttrup e Norsker 1997; Payne e Rippingale, 2001). Alcune tecniche di allevamento delle specie di copepodi calanoidi maggiormente rappresentative degli ecosistemi marini costieri, sono sinteticamente descritte in quattro reviews fondamentali (Marshall e Orr, 1972; Paffenhöfer e Harris, 1979; Omori e Ikeda, 1984; Harris *et al.*, 2000), in monografie di diverse specie di copepodi marini (Mauchline, 1998) ed in numerosi lavori eseguiti al fine di ottenere informazioni sulla morfologia, fisiologia e sul ciclo vitale di varie specie (vedi bibliografia essenziale a fine capitolo).

Le tecniche di allevamento variano in base al tipo di esperimento che si vuole condurre, così come varia l'attrezzatura necessaria.

Negli ultimi anni i copepodi sono stati proposti come alimento alternativo a Rotiferi ed *Artemia* per l'alimentazione di larve di pesce di interesse commerciale, pertanto si sono sviluppate tecniche di allevamento in grandi volumi a circuito chiuso per ottenere una elevata biomassa (Payne e Rippingale, 2001; Olivotto *et al.*, 2008 a,b). In questo capitolo si riportano alcune tecniche di allevamento di copepodi calanoidi, sia in piccoli che in grandi volumi, facendo principalmente riferimento alla personale esperienza del gruppo di Ecofisiologia del Laboratorio di Ecologia Funzionale ed Evolutiva della Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli. Il capitolo aggiorna quello uscito diversi anni fa nel volume edito da NOVA THALASSIA: Metodi nell'allevamento del plancton Marino (Ianora, 1990). All'epoca vi erano pochissimi studi su tali tecniche e perciò si è sentita la necessità di aggiornare i metodi di allevamento e mantenimento dei copepodi, soprattutto per ciò che riguarda la coltivazione in massa di cui il precedente lavoro non fa riferimento.

47.2 ALLESTIMENTO DEGLI ALLEVAMENTI

47.2.1 Campionamento e trasporto in laboratorio

I copepodi possono essere facilmente raccolti usando retini standard da plancton muniti di un collettore di vetro o di plastica. Dovranno essere prese tutte le precauzioni per evitare che gli animali vengano danneggiati durante le operazioni di campionamento (Fig. 1). Il trasporto in laboratorio dovrà essere effettuato in un tempo quanto più breve possibile, entro 1-2 ore dalla raccolta ed in frigoriferi portatili in cui la temperatura dell'acqua sia mantenuta simile a quella del luogo di raccolta, mediante pani di ghiaccio. Appena giunti in laboratorio si procede alla separazione delle specie (sorting): il campione di zooplancton viene travasato in grandi vassoi o cristallizzatori. È necessario che tutta la vetreria sia pulita e non abbia

contenuto formalina in precedenza. Si provvederà ad eliminare subito dal fondo gli organismi morti e/o danneggiati. Si presume che l'operatore abbia una buona conoscenza sistematica dei copepodi marini o sia in grado di riconoscere gli individui adulti della specie su cui si intende lavorare.

Se nel campione portato in laboratorio la specie che si vuole isolare ed allevare è largamente dominante, è abbastanza agevole il loro isolamento e trasferimento nel mezzo di allevamento. Se la specie che si vuole isolare è scarsamente rappresentata, allora conviene eliminare gran parte degli individui delle altre specie filtrando, per esempio, il campione attraverso una serie di reti con maglie a diversa grandezza in modo da eliminare dal campione gli individui di specie che hanno dimensioni nettamente inferiori o superiori a quelle della specie che si desidera allevare. Per il trasferimento nel mezzo di allevamento si utilizza una pipetta avendo cura di controllare, guardando nella pipetta posta contro luce, che non si siano prelevati anche individui di specie non desiderate. Si può sfruttare una caratteristica che è propria di numerose specie di copepodi, come per esempio *Acartia*, cioè la loro tendenza a nuotare verso una fonte luminosa ed a concentrarsi in una piccola zona del recipiente più illuminata.

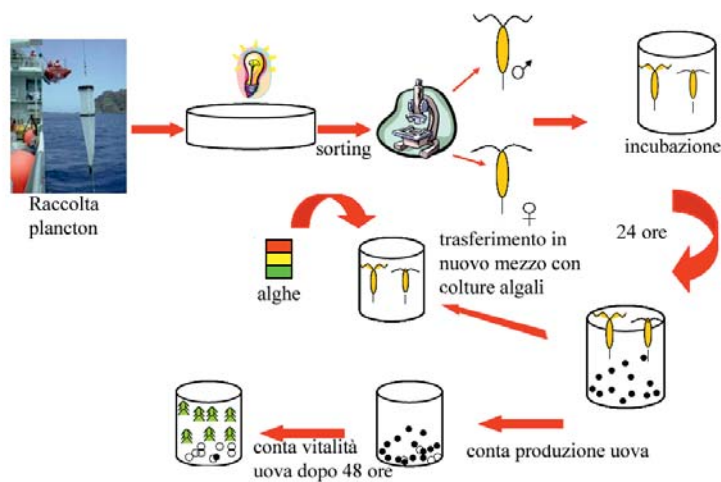


Figura 1. Rappresentazione schematica della raccolta, del sorting dello zooplancton e dell'incubazione dei copepodi per il calcolo della produzione di uova e della loro vitalità.

Infine, se gli organismi sono molto attivi e veloci il loro prelievo può essere problematico, in questo caso è conveniente ridurre il volume di cattura oppure anestetizzare gli animali con ghiaccio tritato. I copepodi si mettono in una capsula Petri che si appoggia su un recipiente più largo che contiene ghiaccio tritato. Dopo alcuni minuti gli animali si muoveranno più lentamente facilitando così le operazioni di prelievo. Questa procedura è anche raccomandata quando è necessario determinare il sesso o lo stadio di sviluppo degli organismi.

47.2.2 Trasferimento in mezzo sperimentale

Se i copepodi si trovano in acqua di mare con le stesse caratteristiche di quella usata per gli esperimenti, allora possono essere pipettati direttamente nel mezzo sperimentale. In caso contrario, il trasferimento avverrà con un semplice cilindro di plastica (ad esempio alto 9 cm e di 6 cm di diametro) munito alla base di una rete a maglie di 200 μm operando nel modo seguente:

a) immergere il cilindro nel recipiente in cui si vuole effettuare l'allevamento e trasferirvi i copepodi con una pipetta, rimuovere il cilindro facendo scorrere sotto alla rete una capsula Petri in modo da evitare

che gli animali restino all'asciutto, e infine sollevare;

- b) sciacquare rete e copepodi con l'acqua del mezzo sperimentale;
- c) pipettare i copepodi dal cilindro nel nuovo contenitore.

47.3 CONDIZIONI SPERIMENTALI

47.3.1 Qualità dell'acqua di mare

Una buona qualità dell'acqua di mare è un prerequisito essenziale per mantenere con successo gli allevamenti in laboratorio. L'acqua di mare dovrebbe essere raccolta possibilmente al largo e filtrata (con filtri a membrana o in fibra di vetro con pori da 0,45 µm) per eliminare il materiale particellato. È raccomandabile far bollire l'acqua di mare dopo la filtrazione. Le infezioni batteriche possono disturbare lo svolgimento di certi esperimenti come gli studi sulla produzione di uova che richiedono un mezzo il più possibile sterile. La contaminazione può essere ridotta con frequenti cambi dell'acqua di mare o con frequenti trasferimenti degli animali in un nuovo mezzo. Se si vuole usare la fonte alimentare sospesa nell'acqua di mare, questa dovrà essere filtrata attraverso una rete a maglie di 50 µm per evitare di agguingere al mezzo di allevamento uova o stadi di sviluppo di altri copepodi.

47.3.2 Temperatura, salinità e luce

La temperatura, la salinità e la luce dovrebbero essere quanto più prossime alle condizioni dell'ambiente naturale e, comunque, rispettare i limiti di tolleranza delle singole specie. Un attento controllo della temperatura è di ovvia importanza negli studi sui tassi di sviluppo, sull'alimentazione, sulla respirazione e sulla produzione di uova; in questi esperimenti è opportuno mantenere gli allevamenti ad una temperatura costante ($\pm 1^\circ\text{C}$). Il controllo della luce può essere fondamentale poiché molti processi metabolici sono sotto il diretto controllo dei cicli circadiani. Landry (1975) ha osservato che le uova di *Acartia* non schiudono in condizioni di luce continua. Da ultimo, si dovrebbe evitare l'eccessiva evaporazione dei contenitori sperimentali, specialmente quando si allevano specie di mare aperto, assai poco tolleranti rispetto alle variazioni della salinità; pertanto, i recipienti dovranno essere coperti.

47.3.3 Ossigeno e pH

La concentrazione di ossigeno dovrebbe essere mantenuta intorno al livello di saturazione. L'aerazione è necessaria quando un numero elevato di individui viene tenuto in contenitori chiusi per un lungo periodo di tempo.

Il pH dell'acqua di mare è uno dei più importanti fattori che limitano il tasso di crescita del plancton in laboratorio. Il pH dovrebbe essere mantenuto sempre tra 7,0 e 8,5. Si raccomanda di mantenere il pH entro questo range, specialmente quando i copepodi sono allevati con alte concentrazioni di fitoplancton.

47.3.4 Volume degli allevamenti

La scelta del volume dei recipienti in cui i copepodi verranno allevati dipende soprattutto dal problema che si intende affrontare. Piccoli volumi sono sufficienti per osservazioni a breve termine, come negli studi sulla produzione di uova. In questo caso le femmine o una coppia composta da maschio e femmina, vengono incubati in piccoli cristallizzatori con volumi da 60 a 200 ml con acqua di mare filtrata (individui

non alimentati) o con acqua di mare contenente alghe planctoniche (individui alimentati) (Ianora *et al.*, 1989) (Fig. 1, 2A). Dopo 24 ore di incubazione le femmine vengono rimosse e le uova vengono contate e lasciate schiudere per determinare la vitalità ed i tempi di sviluppo. La rimozione delle femmine dai cristallizzatori è una buona precauzione per evitare il cannibalismo sulle uova e sui nauplii (Fig. 1).

Volumi più grandi (come bottiglie da 1 o 2 litri) possono essere utilizzati per esperimenti di maggiore durata come quelli per valutare i tassi di ingestione, escrezione e respirazione e nei quali possono essere incubati più individui. Tali contenitori possono essere usati anche per allevare i copepodi per studi di tassi di crescita con varie diete. In questo caso 5-10 copepodi per bottiglia vengono incubati con diete monoalgali o miste a concentrazione di saturazione alimentare equivalente a $1 \mu\text{g}$ Carbonio ml^{-1} di acqua di mare. Le bottiglie vengono fissate su una ruota (plankton wheel) che gira a una velocità di 0,5 rivoluzioni per minuto sistemata in un ambiente a temperatura e luce controllate (Fig. 2B,C; Fig. 3).

Piccoli volumi (multiwells da 2,5 a 5 ml) possono essere impiegati per i test ecotossicologici acuti e cronici, poiché facilitano la manipolazione ed il trasferimento degli animali. Tuttavia alcune specie possono rimanere intrappolate nella pellicola superficiale; questo inconveniente può essere superato usando contenitori con un rapporto superficie/volume più basso, oppure mantenendo gli animali in piccoli contenitori ma avendo cura di riempirli completamente e coprirli con una lastra di vetro o con una pellicola di teflon così da evitare la formazione di bolle di gas all'interfaccia aria-acqua.

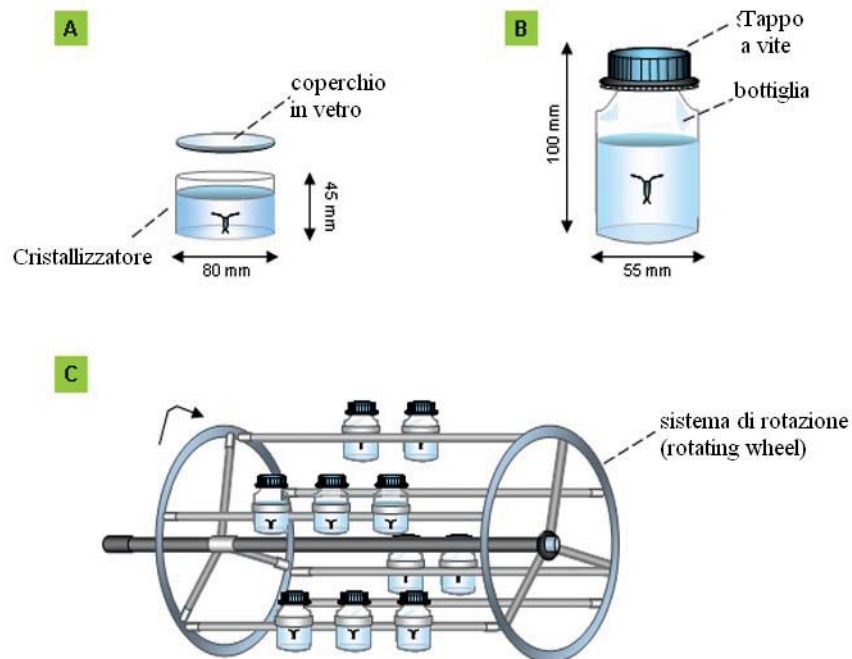


Figura 2. Rappresentazione schematica di incubazione di copepodi in cristallizzatori (A) e in bottiglie (B). C) Sistema di rotazione per le bottiglie di incubazione (Gauslaa Nilsen, 2000 modificato).



Figura 3. Foto del sistema di rotazione presso la Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli.

47.4 ALLEVAMENTI IN PICCOLI VOLUMI

Un sistema per l'incubazione dei copepodi calanoidi in piccoli volumi è ben descritto da Burkart e Kleppel (1998) (Fig. 4 A,B) e consiste di 2 camere o cristallizzatori: una camera di deposizione e una di sviluppo degli embrioni, in modo da evitare il cannibalismo degli adulti sugli embrioni. Le camere in Plexiglas, sono impilate l'una sull'altra. La camera di deposizione consiste di un cilindro di 12,5 cm di diametro x 10 cm di altezza (volume 1,1 litri) con un retino posto sul fondo a maglie variabili da 300 o 200 μm a seconda del diametro degli embrioni. Il retino può essere removibile, fissato con un O-ring, oppure fisso. In questa camera vengono posti gli individui adulti (maschi e femmine) o soltanto le femmine mature; gli embrioni deposti passeranno attraverso la maglia e si depositeranno nella camera sottostante (Fig. 4B). La camera di sviluppo ha un diametro di 12,5 cm x 3,8 di altezza con un volume di circa 0,4 Litri, e può essere posizionata sotto il microscopio per il conteggio degli embrioni. Una griglia disegnata al fondo di ogni camera permette di contare facilmente gli embrioni. Con questo sistema gli embrioni vengono lasciati nel sito di deposizione e non vengono maneggiati, evitando così eventuali danni o perdite dovute al prelievo e trasferimento in altri contenitori.

Un sistema simile a questo, utilizzato in molti lavori sulla produzione di uova dei copepodi, consiste in un cilindro di plexiglass in cui vi è stato incollato un retino da plancton in modo da separare le femmine dalle camera di deposizione in cui cadranno le uova prodotte (Fig. 4C). In questo caso le femmine vengono

incubate nella parte superiore del contenitore che è stato posto in un beaker pieno di sospensione algale. Poiché sia con questo sistema che con quello precedente di Bukkart il volume del contenitore è di circa 1 litro, fino a 10 femmine possono essere incubate insieme. Dopo 24h, il cilindro con le femmine viene rimosso e le uova nel beaker vengono concentrate su un filtro di circa 50 mm, che poi verrà lavato con una spruzzetta in modo da raccogliere in una petri per il conteggio.

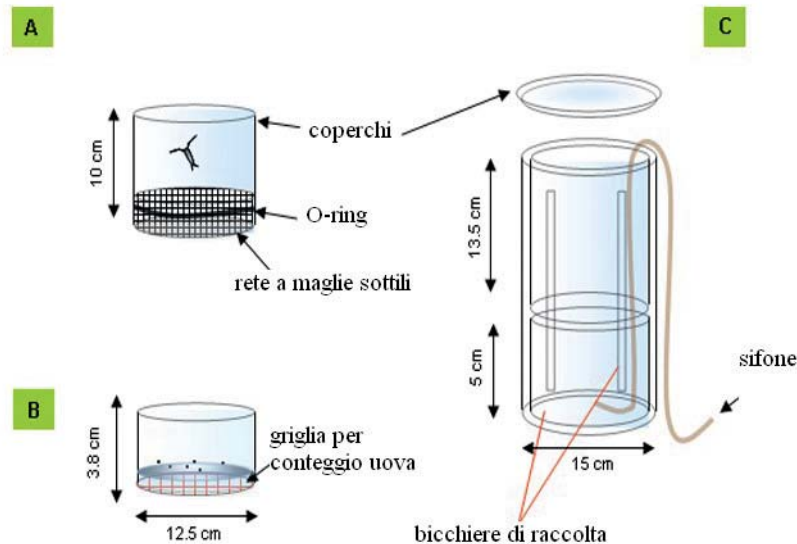


Figura 4. Rappresentazione schematica di diversi sistemi di incubazione di copepodi in piccoli volumi. A) Camera di deposizione nella quale si incubano copepodi adulti, sul fondo si sistema un retino a maglie sottili per far passare solo gli embrioni. B) Camera per il conteggio delle uova, sul fondo viene disegnata una griglia per facilitare il conteggio allo stereomicroscopio (da Burkart e Kleppel, 1998, modificato). C) Sistema accoppiato (A+B): le uova deposte nel bicchiere sottostante vengono sifonate e concentrate su di un filtro a maglie di 50 μm . Le uova così raccolte verranno riversate in una Petri per il conteggio allo stereo microscopio.

Ancora un altro sistema di incubazione simile al precedente ed utilizzato in numerosi laboratori del Nord Europa (Gauslaa Nilsen, 2000) è quello mostrato in figura 5: la camera di incubazione in plexiglass (Fig. 5A) è immersa in un contenitore di vetro di 1-2 litri (Fig. 5B) dalla quale è separata da un retino posto sul fondo (400 mm) per evitare il cannibalismo delle uova. La concentrazione degli individui può arrivare fino a 5 per camera. Il contenitore di vetro viene poi immerso in un bagnetto termostato alla temperatura richiesta (Fig. 5C). Ogni giorno gli individui vengono trasferiti in nuovi contenitori. Le uova ed i pellet fecali vengono raccolti riversando il contenuto del bicchiere di vetro attraverso un filtro con maglie di 90 μm che viene poi risciacquato in un cristallizzatore contenente 50 ml di acqua di mare filtrata. Le uova vengono quindi lasciate schiudere per circa 48-72h a seconda delle specie di copepodi, e dopo fissazione con alcol etilico o formalina alla concentrazione del 2%, si procede al conteggio delle membrane e dei nauplii.

Questi sistemi sono, tuttavia, da evitare poiché maneggiare le uova può danneggiarle e si può avere una sovrastima della vitalità. Inoltre, la presenza di una maglia che separi gli embrioni dagli adulti può, nel caso di alcune specie, danneggiarli causando anomalie e morte. Infatti gli embrioni appena deposti sono fragili e con la parete chitinoso non ancora formata; ci vogliono 10-15 minuti prima che la chitina si inspessisca e indurisca formando una guaina protettiva. Si raccomanda perciò di utilizzare cristallizzatori da 100 ml con una sola femmina in ogni contenitore se lo scopo è quello di calcolare la vitalità delle uova. Per calcolare la vitalità delle uova si raccomanda di lasciare le uova nel contenitore originale in modo da non danneggiarle e, se si mantengono a temperature ambiente di 20°C, dopo 48h dalla deposizione si può aggiungere 10 ml di alcool etilico per fissare i nauplii schiusi. Dopo circa un'ora si procede al conteggio di membrane (uova schiuse e/o mangiate) e di nauplii per il calcolo della vitalità (Ianora

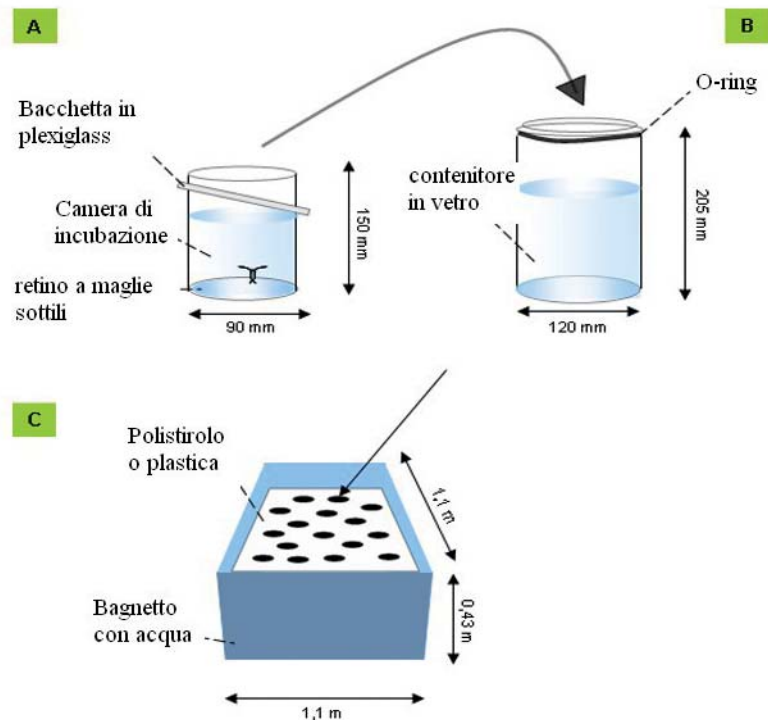


Figura 5. Rappresentazione schematica del sistema di incubazione usato nei paesi Nord Europei per il calcolo della produzione di uova. (A) Camera di incubazione, (B) Contenitore in vetro per la raccolta di uova, e (C) bagnetto termostata ad acqua (Gauslaa Nilsen, 2000 modificato)

et al., 1989) (Fig. 1). Se la temperatura di incubazione è più bassa bisogna aspettare almeno un giorno in più.

Usando questo metodo di incubazione in cristallizzatori, si possono studiare gli effetti a lungo tempo delle diverse diete sulla produzione di uova e la loro vitalità. In questo caso, dopo 24h, gli adulti vengono trasferiti in nuovi cristallizzatori con alimento fresco ogni giorno fino al termine dell'esperimento e le uova e la loro vitalità vengono monitorate per una o due settimane. Per esempio, Ceballos e Ianora (2003) hanno testato l'effetto di 4 specie di diatomee e una specie di dinoflagellato sui tassi di produzione di uova e pellet fecali, vitalità delle uova e sopravvivenza delle femmine per 14 giorni. L'obiettivo era quello di dimostrare che le diatomee producevano delle sostanze nocive (aldeidi polinsaturi) che bloccavano lo sviluppo delle uova dopo 2-6 giorni.

Plourde e Joly (2008) riportano che l'incubazione in volumi di 45 ml riduce apparentemente il cannibalismo rispetto a volumi ancora inferiori (15 ml); questo è particolarmente vero nel caso di specie di grandi dimensioni come *Metridia* spp. In alcune specie di copepodi come quelle appartenenti al genere *Calanus*, il maschio adulto non si nutre e vive poco. Le spermatofores contenenti gli spermatozoi, sono rilasciate in piccole sacche del segmento genitale femminile, le spermateche, e feconderanno tutte le uova prodotte nelle covate successive. In altre specie come quelle appartenente al genere *Temora* o *Centropages*, il maschio si nutre e vive per più tempo. In questo caso le femmine vengono fecondate continuamente durante il loro ciclo riproduttivo, ogni 3-4 giorni e forse anche più spesso in natura. Pertanto, si raccomanda di incubare una femmina e un maschio nello stesso cristallizzatore a cui sarà aggiunta la dieta algale. Gli adulti vengono rimossi dopo 24h e gli embrioni si contano sul fondo del cristallizzatore.

47.5 ALLEVAMENTI IN GRANDI VOLUMI

La necessità di allevare copepodi in grandi volumi per massimizzarne la produzione, è legata al fatto che questi organismi sono stati proposti di recente, come alimento alternativo per larve di specie ittiche

di interesse commerciale, in sostituzione delle diete classiche a base di Rotiferi ed Artemia. Il vantaggio dell'utilizzo di copepodi è quello di poter abbattere notevolmente i costi di produzione delle larve di pesce, anche perché i copepodi sono molto più ricchi in acidi grassi polinsaturi rispetto alle diete classiche e non richiedono così un arricchimento esogeno (Lee *et al.*, 2005). Inoltre, la possibilità di ottenere copepodi di età nota ed in ottimo stato, derivanti da popolazioni controllate, permette di utilizzare questi organismi come modello per lo studio di processi ecologici, biochimici e genetici, o come biomonitori di stress ambientali esogeni ed endogeni. Un sistema utilizzato per l'allevamento del copepode Calanoide tropicale *Gladioferens imparipes* è stato ampiamente descritto da Payne e Rippingale (2001) e da Rippingale e Payne (2005). Tale sistema è stato poi modificato e riproposto per l'allevamento di copepodi calanoidi mediterranei come *Temora stylifera*, *Centropages typicus* e, più recentemente, *Calanus helgolandicus* (Buttino *et al.*, submitted).

Il sistema per l'allevamento di due specie è così composto (Fig. 6):

- 2 vasche di allevamento da 500 litri ciascuna, entrambe dotate di una pre-vasca. In ogni vasca sono presenti due filtri da 55 μm e 150/300 μm , per evitare rispettivamente il passaggio dei copepodi nell'intero sistema e per la separazione dei nauplii/copepoditi durante il processo di separazione/concentrazione;
- 2 vasche di raccolta da 200 litri, avente ciascuna un filtro da 55 μm per la concentrazione dei nauplii/copepoditi;
- 1 modulo di filtrazione e riciclo dell'acqua costituito da una vasca di ripresa-accumulo da 400 litri, da un filtro biologico percolatore, da uno schiumatoio e da una lampada U.V.;
- 3 climatizzatori per la termoregolazione dell'acqua delle due vasche di allevamento e della vasca di accumulo;
- 1 quadro PLC per l'impostazione automatica degli orari di circolazione totale e parziale, nonché per l'avvio dei cicli di separazione/concentrazione, il tutto gestito mediante un programma dedicato ed un PC.

L'impianto ha le seguenti modalità di funzionamento (Fig. 7):

1. Circolazione totale;
2. Circolazione parziale;
3. Circolazione totale + filtrazione/separazione dei nauplii;
4. Circolazione parziale + concentrazione dei nauplii

47.5.1 Circolazione totale

La circolazione totale consente il ricircolo dell'acqua dalla vasca di ripresa-accumulo (A), al modulo di filtrazione (B), alla pre-vasca (C) e alla vasca di allevamento (D). Il percorso dell'acqua nell'intero sistema a circuito chiuso è il seguente: dalla vasca di ripresa-accumulo l'acqua passa dapprima attraverso la lampada U.V (E). Una piccola parte dell'acqua così sterilizzata è convogliata allo schiumatoio (F), per l'eliminazione di particelle quali proteine, amminoacidi, ecc.; la maggior parte dell'acqua, invece, passa attraverso il filtro biologico per una purificazione biologica ad opera di batteri. L'acqua ritorna quindi alla vasca di ripresa-accumulo e da qui è convogliata prima al sistema di termoregolazione (climatizzatori) (G), poi alla pre-vasca ed, infine, alla vasca di allevamento. Il circolo si conclude con il ritorno dell'acqua alla vasca di ripresa-accumulo.

La durata minima prevista è di 4 ore al giorno e consente di rinnovare almeno il 35-40% del volume d'acqua di ciascuna vasca di allevamento. Le 4 ore sono state suddivise in due periodi di due ore ed in momenti diversi della giornata, per consentire anche un corretto funzionamento del filtro biologico. Questo processo comporta l'eliminazione parziale o totale delle alghe e del materiale di rifiuto in sospensione nell'acqua, ma non dei nauplii e delle uova grazie al filtro con maglie da 50 μm (I).

47.5.2 Circolazione parziale

Con “circolazione parziale” s’intende il circolo dell’acqua tra la pre-vasca e la vasca di allevamento. Questo processo garantisce il mantenimento dell’acqua in un range di temperatura ben definito e non comporta l’eliminazione delle alghe in sospensione nell’acqua. Durante la circolazione parziale si ha anche il circolo dell’acqua dalla vasca di ripresa-accumulo, alla lampada U.V. al filtro biologico e poi di nuovo alla vasca di ripresa-accumulo.

47.5.3 Circolazione totale + filtrazione-separazione dei nauplii

Con questo processo si ha il trasferimento simultaneo di acqua purificata dalla vasca di ripresa-accumulo a quella di allevamento e di nauplii dalla vasca di allevamento, presenti nella porzione delimitata da filtri a maglie di 150/300 μm (L), a quella di raccolta da 200 litri (H). La separazione dei nauplii può quindi essere effettuata soltanto in modalità di circolazione totale.

47.5.4 Circolazione parziale + concentrazione dei nauplii

Con questo processo s’intende il trasferimento dell’acqua dalla vasca di raccolta da 200 litri alla vasca di ripresa-accumulo e la conseguente concentrazione dei nauplii in un volume di circa 15 litri. Questa operazione di trasferimento può essere effettuata sia in modalità di circolazione parziale che totale.

Dopo la disinfezione dell’intero impianto con acqua dolce ed ipoclorito (HClO), i moduli vengono riempiti con acqua di mare filtrata (l’ideale sarebbe a 0,22 μm).

Il flusso dell’acqua che dalla pre-vasca s’immette nella vasca di allevamento, è stato regolato ad una portata di 0,8 l/min. Il programma del sistema è stato impostato con 5 ore di circolazione totale giornaliera che, successivamente, sono state ridotte a 4 per garantire una maggiore permanenza delle alghe nella vasca di allevamento per esigenze di alimentazione. Con cadenza giornaliera si devono pulire i filtri delle vasche e vanno rilevati i parametri chimico-fisici (temperatura, ossigeno disciolto e salinità) dell’acqua nella vasca di allevamento. Anche la temperatura ambiente va impostata in modo da garantire il mantenimento della temperatura dell’acqua in vasca. L’ossigeno e la salinità vanno sempre controllati ed eventualmente, va aggiunta acqua di mare alla vasca di accumulo se si osserva una forte riduzione del volume dovuta all’evaporazione.

Il fondo della vasca di allevamento va sifonato frequentemente (2-3 volte a settimana) per l’allontanamento di individui morti e di pellet fecali che possono innalzare i valori di NH_3 in vasca. L’acqua sifonata viene poi filtrata a 30 μm per consentire il recupero delle uova precipitate sul fondo della vasca. Le uova così recuperate, sono portate in boccioni da 10 litri e fatte schiudere. Dopo 48 ore, i nauplii vengono raccolti e nuovamente immessi nella vasca di allevamento.

Periodicamente si può effettuare un censimento degli individui in vasca, con una stima approssimativa del numero di adulti, copepoditi e nauplii, nel seguente modo: in due punti opposti della vasca (denominati “emisfero sud” in prossimità dell’operatore ed “emisfero nord” più lontano dall’operatore) si prelevano 10 litri di acqua, si filtra a 40 μm per recuperare tutte le taglie di copepodi ed il numero di individui raccolti viene contato e moltiplicato per 50, ottenendo così il valore complessivo degli animali nella vasca da 500 litri.

Uno o due giorni prima della raccolta dei nauplii si accende la luce ad immersione all’interno del filtro da 155 μm per attirare gli individui. Con la separazione, i nauplii vengono trasferiti nella vasca di raccolta da 200 litri e con la concentrazione vengono concentrati in un piccolo volume sul fondo del filtro, corrispondente a circa 15 litri. Tale volume viene poi raccolto manualmente in un becker e filtrato a 40 μm . Il filtrato si porta ad un volume di 100 ml e il conteggio viene effettuato su 5 ml distribuiti in gocce osservate allo stereomicroscopio. Il numero di nauplii, moltiplicato per 20, rappresenta il totale dei nauplii raccolti con la concentrazione.



Figura 6. Foto dell'impianto pilota per l'allevamento di copepodi in grandi volumi installato presso la Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli (Innovacqua S.r.l.).

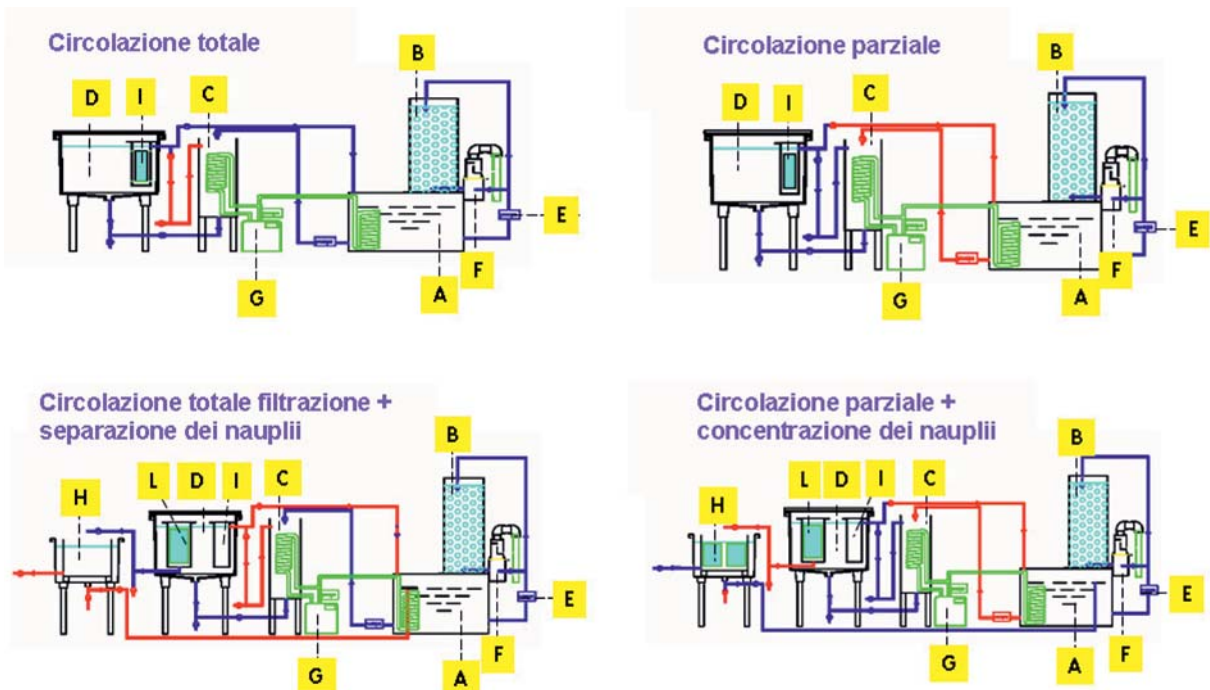


Figura 7. Rappresentazione schematica delle diverse modalità di funzionamento dell'impianto pilota (vedi testo).

47.6 ALIMENTAZIONE

Molti autori preferiscono somministrare una dieta mista, ma numerose specie di copepodi sono state allevate con successo con una dieta monoalgale. È buona norma rifornire gli animali di una dieta comprendente diversi tipi di cellule algali quando si iniziano allevamenti di nuove specie di copepodi. Riguardo alla concentrazione da somministrare va ricordato che il tasso di ingestione delle alghe da parte dei copepodi è direttamente proporzionale all'abbondanza delle cellule ma solo fino ad un certo valore critico oltre il quale il tasso di ingestione raggiunge un plateau (Kjørboe *et al.*, 1985). In genere sono sufficienti concentrazioni algali di 300-500 µg/C litro. Inoltre, è ormai dimostrato che una alimentazione a base di diatomee può interferire non solo sulla vitalità degli embrioni, ma anche sulla vitalità e lo sviluppo dei nauplii nonché sulla vitalità degli adulti (Miralto *et al.*, 1999; Carotenuto *et al.*, 2002; Ianora *et al.*, 2003; Ianora *et al.*, 2004; Buttino *et al.*, 2008) e ciò dipende dalla presenza di molecole bioattive in alcune specie di diatomee, alle quali ogni specie di copepode risponde in maniera differente. L'uso di colture fitoplanctoniche di differenti dimensioni si rende necessario per le richieste alimentari dei diversi stadi di sviluppo dei copepodi in allevamento.

Le analisi dei contenuti gastrici su popolazioni naturali possono dare utili indicazioni sulle preferenze alimentari.

In numerose ricerche sono state usate, come alimenti naturali, diatomee (*Skeletonema costatum*, *Thalassiosira fluviatilis*, *T. nordenskioldii*, *T. gravida*) o dinoflagellati (*Gonyaulax polyedra*, *Prorocentrum micans*, *Gymnodinium nelsoni*, *Scropsiella trochoidea*) o Crisoficee quali *Isochrysis galbana*. I dinoflagellati di norma sembrano essere un buon alimento per i copepodi. In tabella 1 (modificata da Paffenhöfer e Harris, 1979) sono riportati i vari tipi di alimento e i volumi d'acqua usati per allevare diverse specie di copepodi. Nel caso dell'impianto per l'allevamento intensivo, infatti, sono state usate sia *Isochrysis galbana* che *Prorocentrum minimum* e *Rhodomonas baltica* (Buttino *et al.*, 2009), la prima di piccola taglia viene predata dai nauplii e dai primi stadi copepoditi, mentre le altre due, di taglia maggiore sono predate solo dagli adulti o dagli ultimi stadi copepoditi.

Tab.1 – Sinossi delle tecniche di allevamento di Copepodi (da Paffenhöfer & Harris, 1979, modificata).

Specie	Durata dell'allevamento	Cibo	°C recipiente	Volume
CICLOPOIDI				
<i>Oithona nana</i>	-	<i>Navicula</i> , Protozoi	-	50 cm ³
<i>O.nana</i>	schiusa-adulto	Phaeo	-	150 cm ³
ARPACTICOIDI				
<i>Euterpina acutifrons</i>	schiusa-adulto	Phaeo	16-23	20 cm ³
<i>E. acutifrons</i>	1 anno	Phaeo; Tetra <i>Dicrateria</i> sp.; <i>Gymnodinium</i> sp.; <i>Platymonas</i> sp.	18	30 cm ³ 1-5 dm ³
<i>E.acutifrons</i>	più generazioni	Phaeo; <i>Platymonas suecica</i> ; <i>Dicrateria</i> sp.; <i>Platymonas</i> sp.; <i>Gymnodinium</i> sp.	18	10 dm ³
<i>E.acutifrons</i>	più generazioni	Phaeo	10-30	150 cm ³
CALANOIDI				
<i>Calanus hyperboreus</i>	schiusa-adulto	Thal	3-7	150-200 cm ³
<i>C.helgolandicus</i>	schiusa-adulto	Thal; Cyclo;Dit; <i>Coscinodiscus walesii</i>	12	19 dm ³
<i>C.helgolandicus</i>	2 generazioni	Laud;Skele;Gymno; <i>Chaetoceros curvisetus</i>	1	3-20 dm ³
<i>C.helgolandicus</i>	schiusa-adulto	Laud; Proro; Gymno; <i>Gony</i>	15	7 dm ³

<i>C.helgolandicus</i>	schiusa-adulto	Thal; Dit	10-15	1 dm ³
<i>C.helgolandicus</i>	schiusa-adulto	Pro	20	300 cm ³
<i>C.helgolandicus</i>	schiusa-adulto	Ske	20	300 cm ³
<i>Rhincalanus nasutus</i>	7 generazioni	Thal;Cyclo;Dit; Coscinodiscus wailesii; naupli di Artemia	12	19 dm ³
<i>R.nasutus</i>	schiusa-adulto	Thal;Dit	10-15	1 dm ³
<i>Paracalanus crassirostris</i>	schiusa-adulto	Iso;Mono;Phaeo;Cyclo;	18	75-100 cm ³
<i>Pseudocalanus minutus</i>	schiusa-adulto	Iso	12	20 cm ³
<i>Pseudocalanus elongatus</i>	3 mesi (adulto)	Iso;Laud	10	10-500 cm ³
<i>Phelongatus</i>	4 generazioni	Iso;Skele; Platymonas sp.	15	4dm ³
<i>Phelongatus</i>	30 generazioni	Thalassiosira rotula	12	4 dm ³
<i>Clausocalanus arcuicornis</i>	1 generazione	13 specie fitoplanctoniche	18	-
<i>Ctenocalanus vanus</i>	2 generazioni	13 specie	18	-
<i>Gaetanus pileatus</i>	39 giorni	-	5-20	2-5 dm ³
<i>Euchirella bitumidia</i>	42 giorni	-	5-20	2-5 dm ³
<i>Chirundina streetsi</i>	21 giorni	-	5-20	2-5 dm ³
<i>Euchaeta marina</i>	schiusa-CII	piccoli copepodi e naupli; naupli di Artemia; Gymno	15-20	1 dm ³
<i>Paraeuchaeta gracilis</i>	42 giorni	-	5-20	2-5 dm ³
<i>Temora longicornis</i>	1 generazione	Iso	12	20 cm ³
<i>T.longicorni</i>	più generazioni	Tetraselmis suecica	20	10-40 dm ³
<i>T.longicornis</i>	30 generazioni	Thalassiosira rotula	13	4 dm ³
<i>Temora stylifera</i>	schiusa-adulto	Pro	20	300 cm ³
<i>T. stylifera</i>	schiusa-adulto	Iso	20	300 cm ³
<i>T. stylifera</i>	schiusa-adulto	Oxy	20	300 cm ³
<i>T. stylifera</i>	schiusa-adulto	Tha	20	300 cm ³
<i>Eurytemora americana</i>	schiusa-adulto	Mono;Iso;Dun;Cyclo; Phaeo	4-7	75-100 dm ³
<i>E.herdmani</i>	schiusa-adulto	Mono;Iso;Dun;Cyclo; Phaeo	4-7	75-100 dm ³
<i>E.herdmani</i>	più generazioni	Iso;Cyclo;Skele; Platymonas sp.	2-24	5 dm ³
<i>E.affinis</i>	2 generazioni	Iso	12	20 cm ³
<i>E.affinis</i>	227 giorni	Iso;Chlamy; Chaetoceros sp.	15-20	1-2 dm ³
<i>E.affinis</i>	più generazioni	Iso;Cyclo;Skele; Platymonas sp.	2-24	5dm ³
<i>E.affinis</i>	schiusa-adulto	Iso;Cyclo	15	4 dm ³
<i>Centropages typicus</i>	2 generazioni	13 specie fitoplanctoniche	18	-
<i>C.typicus</i>	schiusa-adulto	Iso;Mono;Phaeo;Cyclo; Dun;naupli di Artemia	18-19	1-20 dm ³
<i>C.typicus</i>	più generazioni	Tetraselmis suecica	20	10-40 dm ³
<i>C.hamatus</i>	più generazioni	Tetraselmis suecica	20	10-40 dm ³
<i>Labidocera aestiva</i>	schiusa-adulto	Gymno. nelsoni; Gony; Iso;naupli di Artemia	15-25	125cm ³
<i>L.Trispinosa</i>	2 generazioni	Laud;Gymno;naupli di Acartia e Calanus	15	1-9 dm ³
<i>Pontella meadi</i>	schiusa-adulto	Proro;Gony,Gymnodinium nelsoni;naupli Artemia	20	125 cm ³
<i>Acartia tonsa</i>	12 generazioni	Iso;Rhodomonas sp.; piccole Diatomee	17	1,5 dm ³
<i>A.tonsa</i>	260 giorni	Iso;Chlamy; Chaetoceros sp.	20	1 dm ³
<i>A.tonsa</i>	10 mesi	Iso;Rhodomonas balthica	15	100 dm ³

<i>A. clausi</i>	14 mesi	Iso;Rhodomonas balthica	15	100 dm ³
<i>A. clausi</i>	3 generazioni	Iso;Rhodomonas sp.; piccole Diatomee	14-16	200 cm ³
<i>A. clausi</i>	più generazioni	Iso;Mono	15-20	-
<i>A. clausi</i>	più generazioni	Tetraselmis suecica	20	10-40 dm ³
<i>A. clausi</i>	schiusa-adulto	Iso;Dun	10-20	0,2-1 dm ³
<i>A. clausi</i>	4 generazioni	13 specie fitoplanctoniche	18	-
<i>A. clausi</i>	6 generazioni	Isochrysis galbana	12-21	1 dm ³

Abbreviazioni per le specie fitoplanctoniche:

Chlamy = *Chlamydomonas reinhardtii*

Cyclo = *Cyclotella nana*

Dit = *Ditylum brightwellii*

Gony = *Gonyaulax polyedra*

Gymno = *Gymnodinium splendens*

Skele = *Skeletonema costatum*

Thal = *Thalassiosira fluviatilis*

Tha = *Thalassiosira rotula*

Ske = *Skeletonema marinoi* (former *S. costatum*)

Iso = *Isochrysis galbana*

Laud = *Lauderia borealis*

Mono = *Monochrysis lutheri*

Phaeo = *Phaeodactylum tricornerutum*

Proro = *Prorocentrum micans*

Tetra = *Tetraselmis microcapillata*

Pro = *Prorocentrum minimum*

Oxy = *Oxyrrhis marina*

Iso = *Isochrysis galbana*

Un esauriente quadro delle tecniche usate per coltivare specie fitoplanctoniche per studi sull'alimentazione dello zooplancton è fornito da Omori e Ikeda (1984). Le cellule di fitoplancton devono essere prelevate da colture in fase di crescita esponenziale poiché gli animali possono essere colpiti da un alto tasso di mortalità quando sono alimentati con colture algali vecchie. Sono da evitare le cellule senescenti che hanno perso mobilità e giacciono sul fondo del recipiente di coltura. È necessario, inoltre, acclimatare gli animali alle condizioni sperimentali per alcune ore (alcuni autori suggeriscono per 24 ore), prima di iniziare gli esperimenti. Le concentrazioni ottimali di cibo algale da somministrare variano da un autore all'altro e secondo il tipo di cellule usate, ma generalmente sono comprese tra 10⁴ e 10⁵ cell. ml⁻¹. Un esempio: Paffenhöfer (1970) è riuscito ad allevare con successo individui di *Calanus helgolandicus* dall'uovo fino allo stadio adulto usando una concentrazione algale che non superava 15-20 µg C l⁻¹.

Per il calcolo del "grazing" in genere si usa effettuare un conteggio del numero di cellule algali prima e dopo somministrazione ai copepodi, ad esempio, nel caso dell'impianto pilota per l'allevamento intensivo dei copepodi mediterranei, si è proceduto giornalmente ad una stima della quantità di alghe presenti in vasca, prima e dopo la circolazione totale, per valutare non solo la quantità di alghe ingerite dai copepodi, ma anche per calcolare la quantità di alghe da reintegrare nelle vasche. Il conteggio delle alghe si può effettuare o al microscopio oppure usando un coulter counter automatico.

Non vi sono molte informazioni sull'uso di materiale particellato naturale come fonte di alimento. Gli studi in cui è stato usato questo tipo di alimento sono stati generalmente condotti a breve termine e parecchi autori hanno integrato la dieta naturale con cellule fitoplanctoniche coltivate in laboratorio.

Gli studi a breve termine si sono particolarmente estesi, in questi ultimi anni, di pari passo con il diffondersi della tendenza ad ottenere misure sull'alimentazione, sulla respirazione e sulla produzione delle uova, evitando il ricorso a tecniche di laboratorio sofisticate e macchinose. Ciò è dovuto soprattutto al fatto che allevare copepodi in laboratorio è piuttosto difficile, specialmente per periodi sufficientemente lunghi da permettere la determinazione dei tempi di generazione. Per questa ragione non si conoscono ancora i tassi di sviluppo di molte specie, anche di quelle più comuni.

Infine, poco si sa sull'allevamento di copepodi carnivori o onnivori. Spesso sono stati usati come alimento i naupli di *Artemia*, ma i risultati ottenuti danno indicazioni di scarso interesse sulla biologia delle popolazioni naturali. In alternativa, come alimento può essere fornito plancton raccolto in mare. Una conveniente fonte di cibo può essere ottenuta sperimentalmente. Ambler e Frost (1974), ad esempio,

nel loro studio sul comportamento alimentare del copepode predatore *Tortanus discaudatus*, utilizzarono come prede naturali i naupli di *Calanus pacificus* fatti schiudere in laboratorio.

Ringraziamenti

Si ringrazia Flora Palumbo, Laboratorio di Ecologia Evolutiva e Funzionale, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Napoli, per l'elaborazione grafica dei disegni.

47.7 BIBLIOGRAFIA

- AMBLER J.W., FROST B.W. (1974) - The feeding behaviour of a predatory planktonic copepod *Tortanus discaudatus*. *Limnol. Oceanogr.*, **19**: 446-451.
- BATTAGLIA B. (1970) - Cultivation of marine copepods for genetic and evolutionary research. *Helgolaend Wiss. Meeresun.*, **20**: 385-392.
- BURKART C.A., KLEPPEL G.S. (1998) - A new incubation system for the measurement of copepod egg production and hatching success in the field. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **221**: 89-97.
- BUTTINO I., DE ROSA G., CAROTENUTO Y., MAZZELLA M., IANORA A., ESPOSITO F., VITIELLO V., QUAGLIA F., LA ROTONDA M.I., MIRALTO A. (2008) - Aldehyde-encapsulating liposomes impair marine grazer survivorship. *J. Exp. Biol.*, **211**: 1425-1433.
- BUTTINO I., IANORA A., BUONO S., VITIELLO V., SANSONE G., MIRALTO A. (2009) - Are monoalgal diets inferior to pluralgal diets to maximize cultivation of the calanoid copepod *Temora stylifera*? *Mar. Biol.*, **156**: 1171-1182.
- CAROTENUTO Y., IANORA A., BUTTINO I., ROMANO G., MIRALTO A. (2002) - Is postembryonic development in the copepod *Temora stylifera* negatively affected by diatom diets? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **276**: 49-66.
- CEBALLOS S., IANORA A. (2003) - Different diatoms induce contrasting effects on the reproductive success of the copepod *Temora stylifera*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **294**: 193-202.
- GAUDY R. (1974) - Feeding four species of pelagic copepods under experimental conditions. *Mar. Biol.*, **25**: 125-141.
- GAUSLAA NILSEN I. (2000) - *MSc thesis Institute of Marine and Freshwater Biology*, Norwegian College of Fishery Science, University of Tromsø.
- HARRIS R., WIEBE P., LENZ J., SKJOLDAL H.R., HUNTLEY M. (2000) - *ICES Zoolplankton Methodology Manual*. Academic Press, London, UK.
- HUNTLEY M.E., CIMINIELLO P., LOPEZ M.D.G. (1987) - Importance of food quality in determining development and survival of *Calanus pacificus* (Copepoda, Calanoida). *Mar. Biol.*, **95**: 103-113.
- IANORA A. (1990) - Allevamento di Copepodi Planctonici. In: Innamorati M., Ferrari I., Marino D., Ribera D'Alcalà M.(eds): *Metodi nell'ecologia del plancton marino*. *Nova Thalassia*, **11**: 315-324.
- IANORA A., SCOTTO DI CARLO B., MASCELLARO P. (1989) - Reproductive biology of the planktonic copepod *Temora stylifera*. *Mar. Biol.*, **101**: 187-194.
- IANORA A., POULET S.A., MIRALTO A. (2003) - The effects of diatoms on copepod reproduction: a review. *Phycologia*, **42**: 351-363.
- IANORA A., MIRALTO A., POULET S.A., CAROTENUTO Y., BUTTINO I., ROMANO G., CASOTTI R., POHNERT G., WICHARD T., COLUCCI D'AMATO L., TERRAZZANO G., SMETACEK V. (2004) - Aldehyde suppression of copepod recruitment in blooms of a ubiquitous planktonic diatom. *Nature*, **429**: 403-407.
- KIØRBOE T., MOHLENBERG F., HAMBURGER K. (1985) - Bioenergetics of a planktonic copepod *Acartia tonsa*: relation between feeding, egg production and respiration, and composition of specific dynamic action. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **26**: 85-97.
- KITAJIMA C. (1973) - Experimental trials on mass culture of copepods. *Bull. Plankton Soc. Jpn.*, **20**: 54-60.
- LANDRY M.R. (1975) - Seasonal temperature effects and predicting developmental rates of marine copepod eggs. *Limnol. Oceanogr.*, **20**: 434-440.
- LAWSON T.J., GRICE G.D. (1970) - The developmental stages of *Centropages typicus* Krøyer (Copepoda, Calanoida). *Crustaceana*, **18**: 187-208.
- LEE C.S., O'BRIEN P.J., MARCUS N.H. (2005) - *Copepods in Aquaculture*. Blackwell Publishing Ames, Iowa USA.

-
- MARSHALL S. M., ORR. A. P. (1972) – The biology of a marine copepod. Springer-Verlag, Berlin.
- MAUCHLINE J. (1998) - The biology of calanoid copepods. *Adv. Mar. Biol.*, **33**: 1-710.
- MIRALTO A., BARONE G., ROMANO G., POULET S.A., IANORA A., RUSSO G.L., BUTTINO I., MAZZARELLA G., LAABIR M., CABRINI M., GIACOBBE M.G. (1999) - The insidious effect of diatoms on copepod reproduction. *Nature*, **402**: 173-176.
- OLIVOTTO I., CAPRIOTTI F., BUTTINO I., AVELLA A.M., VITIELLO V., MARADONNA F., CARNEVALI O. (2008a) - The use of harpacticoid copepods as live prey for *Amphiprion clarkii* larviculture: effects on larval survival and growth. *Aquaculture*, **274**: 347-352.
- OLIVOTTO I., BUTTINO I., BORRONI M., PICCINETTI C.C., MALZONE M.G., CARNEVALI O. (2008b) - The use of the mediterranean calanoid copepod *Centropages typicus* in Yellowtail clownfish (*Amphiprion clarkii*) larviculture. *Aquaculture*, **284** (1-4): 211-216.
- OMORI M.T., IKEDA T. (1984) - *Methods in marine zooplankton ecology*. Wiley & Sons: 332 pp.
- PAFFENHÖFER G.A. (1970) - Cultivation of *Calanus helgolandicus* under controlled conditions. *Helgoländ wiss. Meeresun*, **20**: 346-359.
- PAFFENHÖFER G.A., HARRIS R.P. (1979) - Laboratory culture of marine holozooplankton and its contribution to studies of marine planktonic food webs. *Adv. Mar. Biol.*, **16**: 211-308.
- PAYNE M.F., RIPPINGALE R.J. (2001) - Intensive cultivation of the calanoid copepod *Gladioferens imparipes*. *Aquaculture*, **201**: 329-342.
- PLOURDE S., JOLY P. (2008) - Comparison of in situ egg production rate in *Calanus finmarchicus* and *Metridia longa*: discriminating between morphological and species-specific effects. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **353**: 165-175.
- RIPPINGALE R.J., PAYNE M.F. (2005) – Suitability of the copepod *Gladioferens imparipes* for intensive cultivation for aquaculture. In: Lee C.S., O'Brien P.J., Marcus N.H. (eds), *Copepods in Aquaculture*. Blackwell Publishing Ames, Iowa USA: 107-118.
- STØTTRUP J.G., NORSKER N.H. (1997) - Production and use of copepods in marine fish larviculture. *Aquaculture*, **155**: 231-247.
- STØTTRUP J.G., RICHARDSON K., KIRKEGAARD E., PIHL N.J. (1986) - The cultivation of *Acartia tonsa* Dana for use as a live food source for marine fish larvae. *Aquaculture*, **52**: 87-96.

CAPITOLO 48. PRODUZIONE ED ALLEVAMENTO DI LARVE DI CROSTACEI DECAPODI

V. Zupo, D. Pessani, D. Lumare, L. Lumare, F. Lumare

vzupo@szn.it

48.1 INTRODUZIONE

Le larve planctoniche dei Decapodi (la loro ecologia, distribuzione, presenza stagionale) rappresentano uno strumento efficace per comprendere la distribuzione geografica, l'ecologia, aspetti del ciclo riproduttivo degli adulti nonché per chiarire, tramite studi paralleli sulla morfologia, problemi di tipo filogenetico e sistematico. Tuttavia, considerate le complesse modificazioni morfologiche, fisiologiche ed ecologiche che segnano il passaggio da larva (planctonica) ad adulto (bentonico o, raramente, nectonico) l'abbinamento tra queste due fasi è risultato sempre difficile e, spesso, anche errato. Da quando si è compreso che la stessa specie si presenta prima come larva e poi si trasforma in adulto, sono andati sviluppandosi studi che cercano proprio di stabilire il corretto abbinamento tra le due forme, a volte identificate come appartenenti a specie diverse.

Le larve dei decapodi rappresentano una porzione importante del plancton costiero, specialmente in alcuni periodi dell'anno, come la primavera, coincidenti con la riproduzione di numerose specie mediterranee (Pessani, 1993). Infatti quasi tutte le specie, di decapodi conducono, almeno per un periodo iniziale, vita pelagica e partecipano quindi all'ecologia del plancton costiero (Lebour, 1950). Alcuni decapodi, anzi, hanno larve che si spingono al largo ed in acque profonde. Le larve sono munite di appendici frangiate adatte per il nuoto. In alcune specie dette appendici divengono particolarmente ampie, facilitando così le migrazioni nictemerali, con spostamenti dalla superficie sino agli 800 m di profondità (Schram, 1985). Naturalmente, tranne che in rarissimi casi, i decapodi sono organismi bentonici ed al termine della vita larvale effettuano un'ultima metamorfosi che precede il *settlement*. Il passaggio dalla vita larvale a quella bentonica segna marcate differenze non solo morfologiche ed etologiche, ma anche trofiche, dal momento che specie erbivore, ad esempio, possono attraversare fasi larvali caratterizzate da dieta esclusivamente carnivora. Ciò comporta anche marcate differenze fisiologiche, che sono rivelate dalle modificazioni di organi ed appendici, nel corso dei successivi stadi larvali (Schram, 1986; Zupo e Buttino, 2001).

Le specie di decapodi differiscono però sia per il numero di stadi larvali, sia per la loro durata e per la forma assunta (Wear e Fielder, 1985). In generale, le specie più evolute hanno un numero ridotto di stadi larvali, perchè i primi stadi, comuni anche ad altri crostacei, sono completati nell'uovo (Williamson, 1915). In alcuni decapodi dulcacquicoli, ad esempio, le fasi larvali risultano ridotte: si conservano, in genere, almeno alcuni stadi di Zoëa, che caratterizzano molte specie. Le nostre informazioni a riguardo sono ancora incomplete, dal momento che lo sviluppo larvale non è stato ottenuto in laboratorio per tutte le famiglie (Terada, 1980; Boschi, 1981). Pertanto in molti casi la morfologia dei diversi stadi larvali viene desunta proprio da analisi del meroplancton (Negreiros-Franzoso, 1996; Sankarankutty *et al.*, 1999). Ciò in alcuni casi ha ingenerato confusioni ed errori di identificazione (Clark *et al.*, 1998). In realtà, proprio la variabilità morfologica che caratterizza le diverse specie, ha fatto sì che i decapodi possano essere considerati come la categoria meno conosciuta della frazione meroplanctonica (Franzoso *et al.*, 1998; Franzoso *et al.*, 2002). Ad oggi conosciamo (almeno in parte) gli stadi larvali di quasi il 75% dei decapodi (Williamson, 1967; Sandifer, 1974). Il tipo di sviluppo più frequente osservabile nelle larve dei decapodi va sotto il nome di anamorfosi (Knowlton, 1974) ma al termine di esso si osserva una vera metamorfosi, con il passaggio alla vita postlarvale (Costlow, 1968). Lo sviluppo larvale può essere isocronico, eterocronico o retrogressivo (Kurata, 1969) ed in alcune specie si osserva poecilogonia. In alcune specie (es. *Hippolyte inermis*) si osserva eterocronia e poecilogonia in base alla temperatura ed al tipo di alimenti disponibili: questi processi possono rappresentare adattamenti evolutivi sviluppati in rapporto

a determinate forzanti ambientali e tesi a prolungare lo sviluppo larvale quando le condizioni ecologiche siano ancora poco propizie alla fase di *settlement*.

48.2 UN PO' DI STORIA

Nel 1939 Gurney pubblica un'opera monografica nella quale raccoglie tutti i titoli dei lavori noti fino ad allora sulle larve di Decapodi: secondo l'Autore, già a partire da Linneo (1767-1780) e comunque dalla fine del 1700, vengono pubblicati lavori su larve planctoniche o casualmente ottenute da femmine ovigere; l'interesse per l'argomento continua con sempre maggior vigore fino alla prima metà del 1900. In Mediterraneo, in Italia in particolare, studiosi come Boraschi, Cano, Caroli, Santucci contribuiscono alla descrizione ed identificazione delle larve planctoniche (Gurney, 1939). Nel 1942 Gurney pubblica, oltre ad un aggiornamento del lavoro precedente, una sintesi ragionata delle caratteristiche delle varie famiglie, generi, addirittura specie, fino ad allora note: quest'opera risulta basilare per il riconoscimento delle larve planctoniche, specialmente di Natanti e Reptanti¹.

La svolta fondamentale nello studio delle larve di Decapodi si ha verso gli anni venti del secolo scorso, quando, nel laboratorio di Plymouth, Lebour inizia ad allevare con successo le larve planctoniche, specialmente di Brachiuri, ottenendo via via gli stadi successivi fino ad osservare la muta della megalopa al primo stadio di granchio (Gurney, 1939; 1942). Da questo momento si sviluppano i lavori relativi all'allevamento in laboratorio, soprattutto a partire dalla femmina ovigera.

48.3 LA SITUAZIONE ATTUALE IN MEDITERRANEO

Ad oggi in Mediterraneo viene segnalata la presenza di circa 400 specie di Decapodi (comprese le alloctone): di circa 160 (40 %) non si sa nulla riguardo la morfologia della larva mentre delle restanti specie, in molti casi, si conosce in modo parziale un solo stadio di sviluppo. Tuttavia le ricerche sulla frazione meroplantonica rappresentata dalle larve di Crostacei Decapodi continuano, a dispetto delle difficoltà che si incontrano.

La Tab. 1 riportata i lavori dedicati all'analisi delle larve presenti in raccolte planctoniche; si può evidenziare come questi siano concentrati in alcune zone (il Mar Ligure, ad esempio) o su alcuni gruppi od addirittura solo su una specie. (Per i riferimenti indicati con asterisco, cfr. Pessani e Robotti, 1992; González-Gordillo *et al.*, 2001).

48.4 LA BIBLIOGRAFIA SPECIFICA E LE CHIAVI DI IDENTIFICAZIONE

Prima di accingersi all'identificazione degli esemplari planctonici è necessario conoscere (ed avere a disposizione) i lavori inerenti l'argomento: questi spesso sono "antichi" (e non è immediato comprendere quali specie in essi vengono descritte) o sono relativi ad uno o più stadi di una sola specie (quindi numerosi e pubblicati su diverse e, a volte, disperse riviste). Indispensabili sono quindi gli elenchi bibliografici ragionati che permettono di avere il quadro delle specie per le quali è nota la morfologia degli stadi larvali ed anche di come essi sono stati ottenuti (raccolte planctoniche od allevamento in laboratorio). Oltre il già citato lavoro di Gurney (1942) risultano molto utili gli elenchi di Pessani e Robotti (1992) (per le specie mediterranee) e González-Gordillo *et al.* (2001) (per le specie dell'Europa sud-occidentale).

¹ Per adeguarsi a quanto riportato dai diversi Autori, viene qui ancora utilizzata la terminologia di Natanti, Macruri Reptanti, Anomuri e Brachiuri, invece di Dendrobranchiata e Pleocyemata, come proposto da Martin e Davis (2001).

Tab 1. Aree geografiche e gruppi di interesse nello studio delle larve planctoniche di Decapodi.

Zona mediterranea	Autore	Gruppi di interesse
Area Nord-occidentale Isole Baleari (Maiorca)	Abell—e Guerao, 1999 Heldt, 1955a*	Decapodi (megalope) <i>Aristeus antennatus</i> , <i>Aristeomorpha foliacea</i>
Delta dell'Èbro Catalogna	Fuste, 1989 Fuste, 1982, 1987	Decapodi Decapodi
Golfo di Marsiglia	Bourdillon-Casanova, 1960*	Decapodi
Villefranche / Banyuls	Barnich, 1996	Decapodi (excl. Brachiuri)
Mar Ligure Mar Ligure (Capo Noli) Golfo di Genova Golfo del Tigullio	Carli <i>et al.</i> , 1987 Battuello, 2008 Boraschi, 1921* Destefanis e Pessani, 1984 Pessani, 1975 Pessani, 1993* Pessani e Salton, 1998	Decapodi Decapodi Anomuri e Brachiuri Macruri Reptanti ed Anomuri Decapodi Natanti Brachiuri
Golfo di Napoli Isole Egadi Rada di Augusta	Cano 1891-93* Pike e Wiliamson, 1960* Pike e Wiliamson, 1960a* Carli e Pessani 1973 Pessani <i>et al.</i> , 1980	specialmente Brachiuri Diogenidae e Paguridae Dromiidae e Homolidae Decapodi (excl. Brachiuri) Decapodi
Medio Adriatico Basso Adriatico	Kurian, 1956* Flagella, 2000	Decapodi Brachiuri (zoea e megalopa)
Golfo di Pagassitikos (Grecia)	Thessalou, 1979	Decapodi (excl. Brachiuri)
Golfo di Izmir (Turchia)	Ozel, 1979	Anomuri
Libano Israele	Lakkis e Zeidane, 1988 Williamson, 1967* Galil, 1993 Fiedler e Spanier, 1999	Decapodi Decapodi Decapodi <i>Scyllarus arctus</i>
Tunisia	Heldt, 1955*	<i>Solenocera membranacea</i>
Algeria	Seridji 1971*, 1988*, 1990*, 1993*	Decapodi; <i>Albunea carabus</i> ; <i>Stenopus spinosus</i> ; Calappidae

Tab. 2. Elenco dei gruppi di interesse delle chiavi di identificazione realizzati per le specie mediterranee.

Gruppo di Decapodi	Autori	Area geografica
Dendrobranchiati	dos Santos e Lindley, 2001	Atlantico orientale
Pleocyemati	dos Santos e Gonzales-Gordillo, 2004	Spagna meridionale
Decapodi (excl. Brachiuri)	Barnich, 1996	Villefranche/ Banyuls
Anomuri (primo stadio)	Basile <i>et al.</i> , 2006	Mediterraneo
Brachiuri	Bourdillon-Casanova, 1960	Golfo di Marsiglia
Brachiuri	Pessani <i>et al.</i> , 1998	Mediterraneo
Brachiuri (megalopa)	Pessani <i>et al.</i> , 2004	Mediterraneo

Il tentativo di identificare un esemplare (magari unico nel campione esaminato) appartenente ad un certo stadio di una certa specie viene spesso supportato (a volte risolto) dalle chiavi di identificazione; va sottolineato che, presenti già nelle opere di Gurney e Lebour, le chiavi di riconoscimento delle larve sono abbastanza numerose, aggiornate in base alle nuove conoscenze, di relativamente facile utilizzo, spesso relative solo alle specie di una certa area ma, purtroppo, anche per la loro stessa natura, mai definitive. Indispensabili, almeno nella prima fase di *sorting* risultano le chiavi proposte da Williamson e collaboratori che, a partire dal 1957, trattano le larve delle famiglie di Natanti e Reptanti presenti nel Nord Atlantico (cfr. Pessani e

Robotti, 1991; González-Gordillo *et al.*, 2001). Recentemente sono state proposte da dos Santos e Lindley (2001) e dos Santos e González-Gordillo (2004) chiavi di identificazione per specie dell'Atlantico orientale e del sud della Spagna: queste sono utili anche per l'identificazione di specie mediterranee e vanno ad aggiungersi a quelle dedicate proprio all'area mediterranea (Tab. 2).

48.5 RIPRODUZIONE E STADI LARVALI PRINCIPALI

I decapodi presentano generalmente sessi separati, ma molte specie sono considerate ermafrodite proterandriche. Su questo argomento sono ancora in corso accese discussioni, poiché in passato sono state effettuate larghe generalizzazioni per similitudine (Zupo *et al.*, 2008), ritenendo ermafrodite alcune specie che non lo erano (solo perché congeneriche di ermafrodite) e viceversa. Solitamente, nelle specie ermafrodite proterandriche si osserva inizialmente la comparsa di maschi di dimensioni ridotte, i quali si trasformano in femmine attraverso una serie ben nota di processi fisiologici (Payen, 1973), che iniziano con la degenerazione della ghiandola androgenica (King, 1964; Sagi, 1988), cui fa seguito la trasformazione dei tessuti gonadici, la produzione di un *ovotestis* intermedio, sino alla produzione di un ovario funzionante. Anche questa serie fisiologica ha alcune importanti eccezioni, come nel caso di *Hippolyte inermis*, che produce un ovario solo dopo la completa distruzione della ghiandola androgenica e della gonade maschile, senza passare attraverso uno stadio di *ovotestis* (Reverberi, 1950; Zupo, 2000). È stato dimostrato che questo processo può essere modificato dall'ingestione di alcune diatomee (Zupo, 1994; Zupo, 2001), le quali provocano apoptosi precoce della ghiandola androgenica (Zupo e Messina, 2007; Zupo *et al.*, 2007). Non è ancora chiaro se simili processi possano avere luogo anche in altre specie di crostacei decapodi. In alcuni rari casi (es. *Calocaris* spp.) la proterandria conduce, in determinati periodi della vita, ad una forma di ermafroditismo contemporaneo: non si assiste ad autofecondazione ma sarebbe possibile la fecondazione incrociata di intersessi (Runnström, 1925).

Le gonadi dei decapodi sono localizzate nel torace, generalmente posizionate sotto il cuore, dorsalmente rispetto all'epatopancreas (Cfr. Fig. 8). In genere i testicoli sono disposti in una posizione posteriore rispetto agli ovari, che in alcune specie ed in determinate stagioni giungono sino alla parte frontale del carapace (e possono prolungarsi posteriormente nell'addome). I prodotti gonadici sono trasportati all'esterno da gonodotti che sfociano, nei maschi, in un poro genitale situato alla base della coxa del quinto paio di pereopodi, nelle femmine alla base del terzo paio. I maschi di molte famiglie di gamberi si distinguono per la presenza di una cosiddetta "appendice mascolina", presente sull'endopodite del secondo pleopode ed avente forma variabile, ma sempre disposta esternamente all'appendice interna, presente in entrambi i sessi ed osservabile nella maggior parte delle specie. In queste stesse specie, le uova prodotte e fecondate sono trattenute per un periodo variabile e restano attaccate all'esterno del corpo, sostenute dai pleopodi. Nei brachiuri la distinzione tra i sessi viene fatta macroscopicamente, dal momento che l'addome è più allargato nelle femmine, stretto nei maschi, con la notevole eccezione di *Calappa granulata*, nella quale entrambi i sessi presentano un addome da maschio. È generalmente presente un *receptaculum seminis* che permette alla femmine di trattenere a lungo le spermatofore. In molte specie di Reptanti, comunque, il dimorfismo sessuale è molto evidente e può essere basato su una forma diversa delle chele, la colorazione più accesa degli individui di un sesso rispetto all'altro, o dimensioni notevolmente diverse.

Tra i Natanti, il maschio dei Peneidi si distingue perché fornito di un petasma sul primo paio di pleopodi, mediante il quale le spermatofore contenenti il seme sono trasferite alla femmina. Sull'ultimo paio di zampe toraciche della femmina è invece presente un thelycum (ricettacolo seminale), al quale le spermatofore rimangono attaccate sino alla fecondazione delle uova, che sono poi liberate direttamente nell'acqua e si schiudono molto rapidamente (come vedremo nelle prossime sezioni) allo stadio di nauplius.

Il numero di uova prodotte da una femmina è estremamente variabile secondo la specie, l'età e le dimensioni degli individui considerati. Nella maggior parte dei Caridei si producono circa 200 uova da

ogni femmina matura, ma questo numero aumenta notevolmente nelle specie che producono larve meno sviluppate (es. Peneidi). Il numero di uova prodotte raggiunge livelli molto elevati in *Homarus* (70.000) ed aumenta ancora (Bouvier, 1940) in *Palinurus* (100.000) ed in *Callinectes sapidus* (2.000.000). Allo sviluppo embrionale, che si completa nelle uova, talvolta trattenute dalla femmina all'esterno del corpo (in genere mediante i pleopodi), seguono i primi stadi larvali, che si concludono nella larga generalità dei casi con il passaggio alla vita bentonica.

Le fasi larvali fondamentali sono 5: nauplius, metanauplius, protozoëa, zoëa, mysis, ma si considerano spesso varie sub-fasi (generalmente non presenti nei Brachiuri), corrispondenti a singole mute, talvolta osservabili con cadenza giornaliera. A questa sequenza segue la prima fase postlarvale, caratterizzata da riduzione degli exopoditi toracici, funzioni natatorie trasferite ai soli pleopodi (nei natanti), completamento morfologico dei pereopodi, riduzioni di spine ed allungamento dei peduncoli oculari. Nella maggior parte dei decapodi, però, le prime fasi larvali hanno luogo nell'uovo, mentre la prima larva, alla schiusa, è rappresentata da una zoëa. Di pari, l'ultima fase (mysis) è spesso assente, sostituita da altre forme larvali o da brevi passaggi postlarvali. Nei Brachiuri, ad esempio, la fase di mysis è sostituita da quella di megalopa, una sorta di ultima larva molto simile all'adulto, ma ancora munita di alcuni caratteri tipici. La vita larvale è più breve nei decapodi che vivono in acque fredde o molto profonde. Solo nei Peneidi sono presenti tutte le fasi larvali, mentre in molti decapodi d'acqua dolce (soprattutto nei Reptanti) le fasi larvali sono notevolmente ridotte ed i nuovi nati, al momento della schiusa, si presentano identici agli adulti. In alcuni casi il numero di stadi larvali e la loro durata è variabile in base all'alimentazione ed alla temperatura (Le Roux, 1963; Regnault, 1969). Di ciò bisognerà tener conto anche in caso di coltura in sistemi a ciclo chiuso.

Concludiamo questa sezione ricordando che una descrizione esemplificativa della struttura dei diversi stadi larvali è riportata in seguito, a proposito dello sviluppo larvale dei Peneidi, che mostrano tutte le fasi larvali principali. Ovviamente la forma delle larve varia da specie a specie e, come suddetto, nella maggior parte dei decapodi Natanti e Reptanti si osserva solo un numero variabile di zoëe, poiché le prime fasi larvali sono completate nell'uovo.

48.6 MODALITÀ DI CAMPIONAMENTO ED ECOLOGIA DELLE LARVE

L'esame di campioni planctonici dimostra che la percentuale delle larve di Decapodi è, a volte, quasi irrilevante (0,08 % - coste catalane, Fuste 1982; 0,12 % - Puglia meridionale; Flagella, 2000; 0,15% - Golfo di Rapallo, Pessani e Salton, 1998) ma che può arrivare all'eccezionalità del 10 % (Gargano e Golfo di Manfredonia; Flagella, 2000). Se però si prende in considerazione la sola frazione meroplanctonica, si può rilevare come le larve di Decapodi arrivino a costituirne il 25, il 58 fino al 74% (Gargano e Golfo di Manfredonia; Flagella, 2000). Ne consegue che particolari accorgimenti, legati all'ecologia ed etologia larvale, dovranno essere presi per ottenere un campione di larve consistente e rappresentativo.

Il retino da plancton tradizionale, meglio se composto da 2-3 settori di ampiezza di maglia crescente dal collettore all'anello di raccordo (Pessani, 1975), dà buoni risultati quali-quantitativi, evitando di raccogliere quantità di organismi planctonici che spesso restano non identificate. Le modalità di cattura (pescate orizzontali, verticali a chiusura o no, oblique) e la maglia utilizzata per il retino di raccolta (che, quando indicate dagli Autori elencati in Tab. 1, appaiono molto discordanti) provocano la prima selezione rispetto alle specie pescate: larve al primo stadio, maggiormente fototropiche rispetto agli stadi successivi (Carli e Pessani, 1973; Thiriot, 1974) difficilmente compariranno in pescate effettuate al di sotto di 5 m di profondità, mentre la maglia del retino di 200 µm (od inferiore) selezionerà larve di piccola taglia che non riescono a sfuggire con l'effetto riflusso che si verifica nel retino quando le maglie iniziano ad otturarsi. Pescate effettuate fino a - 50 m è probabile siano ricche di stadi avanzati o di megalope, poiché il fototropismo tende ad invertirsi (Kurian, 1956; Thiriot, 1974), mentre più in profondità le larve si raffermano.

Importante è la profondità e la tipologia del fondale: il fondo che non supera 50 (al massimo 90) m di profondità (Thiriot, 1974) ed ospita praterie di *Posidonia oceanica* (Carli e Pessani, 1973; Pessani, 1975) assicura l'habitat ottimale per gli adulti e di conseguenza la presenza quali-quantitativa delle loro larve.

Ovviamente la presenza delle larve è strettamente collegata a quella degli adulti; tuttavia Destefanis e Pessani (1984) trovano un gran numero di larve di *Upogebia* spp. (i cui adulti sono considerati rari) e pochissime zoeae di *Clibanarius erythropus* (il paguro più abbondante del meso-infralitorale mediterraneo). Questo risultato conferma quanto osservato da Thiriot (1974), ovvero che la supposizione di abbondanza delle larve collegata all'abbondanza dell'adulto, presenta delle eccezioni.

La presenza delle larve è anche in stretto rapporto col periodo riproduttivo dell'adulto (presenza di femmine ovigere): si può prevedere che le larve compariranno nel plancton a partire da 40-60 giorni dopo questo periodo. Ne consegue che i mesi ottimali per pescare larve di decapodi sono aprile, maggio, soprattutto giugno: a seconda delle aree geografiche esaminate è però possibile riconoscere specie con larve perenni (presenti durante tutto l'anno o quasi), temporanee (presenti solo in alcuni mesi), sporadiche (trovate fino ad oggi occasionalmente e senza apparente periodicità; Bourdillon-Casanova, 1960; Fuste, 1982; Barnich, 1966). È interessante evidenziare che, in generale, le larve di una data specie sono presenti in una pescata con più stadi successivi, ovvero anche se c'è dilazione di uno o più giorni nella comparsa dei diversi stadi, questi tendono a stare aggregati (Carli e Pessani, 1973) separandosi però quando mutano agli stadi avanzati (Kurian, 1956).

Riguardo ai parametri ambientali, è stato osservato che le larve, benché fototropiche positive, sfuggono la luce solare troppo forte o la luce artificiale eventualmente utilizzata in pescate notturne (Carli e Pessani, 1973). Inoltre non si hanno dati definitivi e concordanti sulle migrazioni nictemerali, ovvero sulla distribuzione verticale delle larve durante il giorno o la notte. Kurian (1956) è in grado di riconoscere solo per le larve dei "paguri" la presenza superficiale esclusivamente notturna. Thiriot (1974) ipotizza un certo grado di omogeneità nella distribuzione verticale in inverno ed una forte eterogeneità tra le specie in estate. In sintesi i momenti e le condizioni migliori per le raccolte planctoniche dedicate alle larve di Decapodi sembrano essere il primo mattino, l'imbrunire, il cielo parzialmente o del tutto coperto (Bourdillon-Casanova, 1960; Carli e Pessani, 1973; Pessani, 1975).

La temperatura gioca un ruolo fondamentale nella presenza e distribuzione delle larve quando si considerano i suoi valori estremi; ad esempio se d'inverno, superata l'omeotermia tipica del periodo, si toccano 9-10 °C (Golfo di Marsiglia; Bourdillon-Casanova, 1960) od in luglio (Golfo del Tigullio, Pessani, 1975) si superano 24 °C, si assiste alla netta diminuzione quali-quantitativa delle larve. In generale la naturale capacità termica dell'acqua di mare provvede a mantenere condizioni costanti e confacenti alla biologia larvale. In relazione alla salinità, Fuste (1989) riscontra come le condizioni di bassa salinità che si vengono ad instaurare nel delta del fiume Ebro provocano immediata rarefazione delle larve: solo le larve dei Brachiuri sembrano mostrare maggior tolleranza allo stress osmotico. L'effetto di dispersione delle correnti gioca un ruolo marginale nella distribuzione delle larve, che infatti non sembrano essere dislocate in maniera costante dal luogo in cui schiudono dall'uovo: questo è particolarmente vero per specie con adulti che vivono sottocosta (Kurian, 1956). Battuello (2008) che ha effettuato pescate superficiali su fondi di -1000, -1500, -2000, -2500 m, trova consistente e progressiva rarefazione, fino alla scomparsa, delle poche forme larvali in connessione all'aumento della profondità del fondo. Infine nei pochi casi nei quali è stata analizzata la relazione tra oloplancton e presenza delle larve di Decapodi (Pessani, 1975; Fuste, 1987), si è evidenziata la normale successione temporale di massimo di fitoplancton – massimo di oloplancton, accompagnato dal massimo di presenza di larve di Decapodi. Le fluttuazioni stagionali delle larve vanno in parallelo con quelle dell'oloplancton quando questo è composto prevalentemente da copepodi e cladoceri (Pessani, 1975); se è presente plancton gelatinoso si assiste a diminuzione di fitoplancton e conseguentemente di larve (Fuste, 1987). Infine, riguardo ai possibili predatori delle larve di Decapodi, sembrano giocare un ruolo fondamentale, tra gli organismi planctonici, i Chetoganti: Mussat Sartor e Pessani (2008) trovano numerose larve di Natanti col corpo spezzato in due in pescate dove abbondante è la presenza di grossi Chetognati.

48.7 PRESENZA DELLE LARVE DI SPECIE ALLOCTONE

A causa della scarsità di studi sulle larve planctoniche di Decapodi e della difficoltà di determinazione, le segnalazioni relative alla presenza in Mediterraneo delle larve di specie non indigene sono esigue. Le specie riscontrate fino ad oggi sono: *Marsupenaeus japonicus* e *Penaeus semisulcatus* (Israele - Galil, 1993; Libano - Lakkis e Zeidane, 1988), *Lucifer hansenii* ed *Anapagurus hyndmanni* (Libano - Lakkis e Zeidane, 1988), *Charybdis longicollis* (Israele - Williamson, 1967; Galil, 1993), *Callinectes sapidus* (Israele - Williamson, 1965; Galil, 1993; Golfo del Tigullio - Pessani e Salton, 1998), *Portunus pelagicus* (Golfo del Tigullio - Pessani e Salton, 1998), *Eriocheir sinensis* (Marsiglia - Bourdillon-Casanova, 1960)

48.8 DUE ESEMPI CONCRETI DI ALLEVAMENTO, IN IMPIANTO ED IN LABORATORIO

Non potendo considerare qui tutte le specie di decapodi, né offrire una generica panoramica dello sviluppo larvale di tutti i decapodi mediterranei, descriveremo due esempi ben noti, che potranno eventualmente servire per definire ulteriori schemi produttivi. Prenderemo in considerazione, infatti, due specie molto diverse tra loro, per ottenere un quadro necessariamente incompleto, ma sufficientemente vario, dei sistemi di coltura applicabili a questo gruppo animale estremamente diversificato ed eterogeneo dal punto di vista fisiologico e morfologico. Per la prima specie, *Marsupenaeus japonicus*, descriveremo la struttura ed il funzionamento di un impianto di dimensioni industriali. Per la seconda, *Hippolyte inermis*, descriveremo invece la struttura di un sistema minimo da laboratorio, in modo da illustrare due possibili percorsi produttivi, adeguati ad esigenze diverse.

I Crostacei rivestono un ruolo molto importante nell'economia mondiale e sono oggetto di intensa pesca, oltre che di allevamento. Alla produzione mondiale di Crostacei, nel 2005, la prima ha contribuito per circa 6 milioni di tonnellate, mentre la seconda per 3,9 milioni di tonnellate (Fig. 1; FAO, 2007a). La maggior parte dei Crostacei prodotti è rappresentata da gamberi. L'Europa è nel mondo, insieme a Giappone ed USA, uno dei maggiori consumatori di gamberi. Il Giappone presenta una lieve prevalenza dei consumi rispetto alle altre due aree, mentre USA ed Europa hanno volumi simili tra loro, con oscillazioni che dipendono dalle variazioni del costo del denaro ed, in genere, dall'andamento dell'economia nei rispettivi Paesi. La pesca dei gamberi peneidi, i più richiesti tra i Crostacei, appare in affanno con arresti e flessioni che sono indice di una risorsa eccessivamente sfruttata e non certo illimitata. Al contrario, la produzione dei gamberi peneidi da allevamento è in continua ascesa ed oggi contribuisce in modo rilevante alla produzione mondiale. La produzione dei gamberi risulta sempre in crescita e negli ultimi anni ha subito un notevole incremento, con lo sviluppo di tecnologie innovative e il consolidamento delle vecchie. La produzione mondiale (pesca e allevamento) di gamberi peneidi, nel 2005, è ammontata a 6.091.869 t (FAO, 2007b; c), di cui la quota da allevamento ha costituito il 43,9% (2.675.336 t).

48.8.1 Strutture essenziali per la produzione larvale

Come si vedrà negli esempi che seguono, varie specie di decapodi possono necessitare di strutture diverse per la produzione e l'allevamento delle larve, secondo il tipo di larve prodotte, le loro abitudini alimentari, la robustezza che le caratterizza. Si possono però effettuare delle generalizzazioni, che saranno di ausilio nella pianificazione di sistemi da realizzare *ad hoc*. In generale è necessaria una struttura per il mantenimento dei riproduttori, anche nel caso in cui questi siano raccolti in natura nel periodo del rilascio delle larve. Ovviamente questo sistema permette di evitare complesse strutture per l'ingrasso e la riproduzione e dovrebbe essere applicato tutte le volte in cui sia possibile reperire facilmente femmine ovigere.

Le larve possono essere raccolte utilizzando vari sistemi, sfruttando il loro fototropismo positivo, filtrandole attraverso retini a maglia stretta (in genere 50-60 µm sono sufficienti anche per le specie che

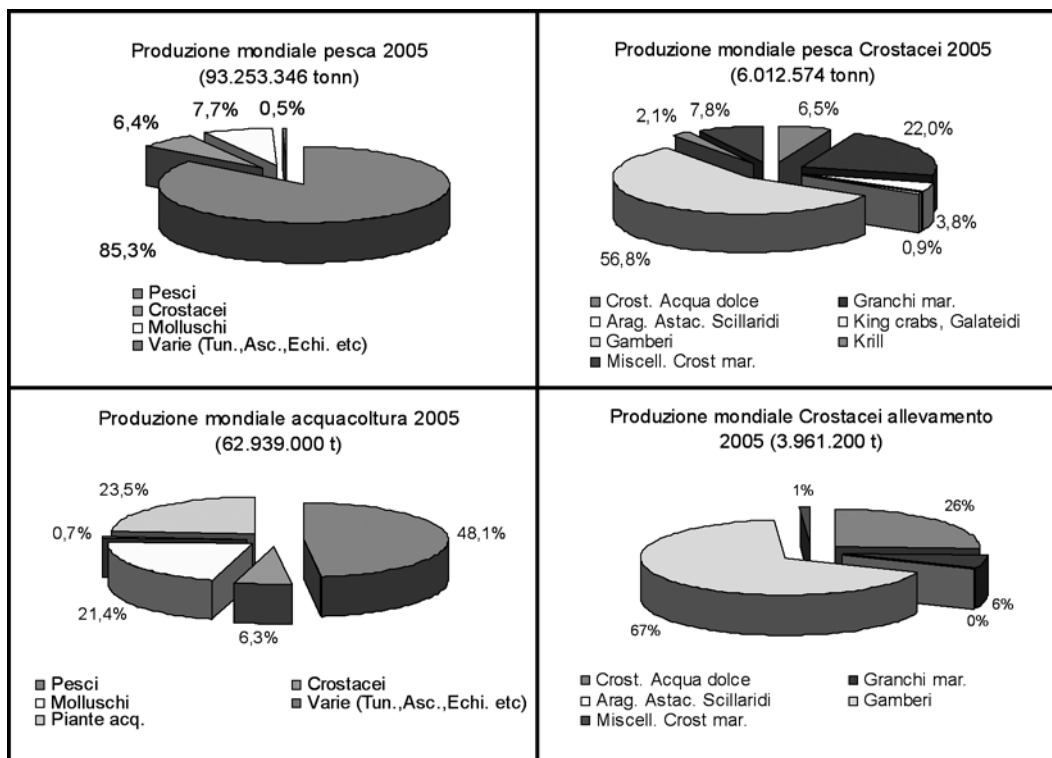


Fig 1. Confronto tra le produzioni mondiali di pesca ed acquacoltura, riferite al 2005. Vengono riportati i quantitativi relativi ai Crostacei, indicati per singoli gruppi. La voce "gamberi" rappresenta una frazione sempre preponderante ed è rappresentata soprattutto da Peneidi.

producono nauplii), ecc. Le larve raccolte sono quindi trasferite in beute od altri contenitori aerati, contenenti un mezzo di coltura idoneo. In generale è impossibile prevedere un sistema di filtraggio dell'acqua, a causa dell'estrema delicatezza delle larve. Per questo motivo si dovranno prevedere cambi frequenti del mezzo di coltura (da 1 cambio totale ogni 12 ore, ad 1 cambio ogni 48 ore, secondo le specie considerate e le modalità colturali), utilizzando filtri a maglia stretta per raccogliere le larve. Nel corso dello sviluppo larvale è opportuno raccogliere periodicamente degli individui da sottoporre ad analisi biometrica e morfologica, per accertarsi del progresso nella successione delle fasi larvali e del rapido accrescimento.

Il tipo di alimenti somministrati impone la presenza di alcune strutture essenziali nell'impianto di allevamento. Nel caso di specie molto robuste, che possono essere alimentate con soli nauplii di *Artemia*, eventualmente integrati da alimenti microincapsulati o secchi (vedi sezione successiva), l'impianto può essere notevolmente semplificato. La presenza di ceppi vivi di rotiferi e/o di fitoplancton impone invece l'utilizzo di autoclave, camera termostatica per la produzione di fitoplancton, cappa sterile per la produzione dei mezzi di coltura algale, ecc.

La sterilità del mezzo di coltura rappresenta comunque un elemento fondamentale per il successo dell'allevamento di qualsiasi specie di crostacei decapodi. Le larve sono estremamente sensibili alla qualità del mezzo di coltura, alla presenza di inquinanti e, specialmente, alla presenza di batteri opportunisti. In molti casi, minime quantità di batteri chitinolitici presenti nel mezzo di coltura inducono rallentamenti dello sviluppo, elevata mortalità larvale e postlarvale, allungamento dei tempi di passaggio tra le varie fasi larvali, blocco dello sviluppo a livello delle ultime zoëe, prima del passaggio alla post-larva. I danni prodotti dai batteri chitinolitici possono facilmente essere valutati nelle postlarve residue, poiché si notano corrosioni e danneggiamenti permanenti dei pleopodi o di altre delicate strutture esoscheletriche. Per questo motivo è fondamentale utilizzare un impianto di sterilizzazione (fisica mediante UV, chimica mediante forti ossidanti, ecc.) dell'acqua utilizzata per le colture larvali e ridurre la quantità di nutrienti presenti in origine (particellato organico, azoto totale, albumine, ecc) mediante sistemi diversi di filtraggio

(filtri meccanici, adsorbenti, schiumatoi). Filtri Millipore (45 µm e 25 µm), attraverso i quali l'acqua viene aspirata da un'apposita pompa a vuoto, possono essere utili sia per produrre acqua da autoclavare, destinata alle colture algali, sia per produrre una riduzione della flora batterica ed un abbattimento consistente del particolato organico nell'acqua da destinare alle colture larvali. In quest'ultimo caso però, dati i volumi rilevanti del mezzo di coltura generalmente necessari ad ogni ricambio, si ricorre più spesso a filtri meccanici di tipo diverso (filtri a bicchiere, a spago, ecc), meno efficienti, ma in grado di produrre quantità maggiori di liquido nell'unità di tempo.

Si tenga presente, infine, che le larve necessitano generalmente di contenitori alti e ben aerati (beute, vasche tronco-coniche, ecc) di dimensioni medio-piccole, in modo da rendere agevoli i cambi d'acqua e ridurre il rischio di epidemie che possano colpire l'intera produzione. Le postlarve necessitano invece di vasche basse e di ampia superficie, per ridurre il rischio di predazione dovuta a comportamenti territoriali. Con il passaggio alla vita postlarvale, ovviamente, bisognerà prevedere un cambiamento della dieta mediante svezzamento. In questa fase, in definitiva, man mano che le prime postlarve sono osservate nel mezzo di coltura, si dovrà prevedere una progressiva riduzione degli alimenti larvali (es. nauplii di *Artemia*) in contemporanea con somministrazioni sempre più abbondanti di alimenti postlarvali (es. pellets, alimenti freschi, ecc). Il periodo di svezzamento può durare dai 4 ai 10 giorni e ad esso segue il pre-ingrasso, l'ingrasso, l'introduzione in natura (ripopolamento) o comunque l'utilizzo delle postlarve per scopi diversi. Gli esempi riportati nelle pagine seguenti permettono di identificare le applicazioni pratiche di questi concetti generali.

48.8.2 Alimentazione larvale

In generale, per le prime fasi larvali si potrà fare uso di alimenti vivi molto comuni in acquacoltura, come rotiferi (*Brachionus* spp.) e nauplii appena schiusi di *Artemia salina*. Per molte specie potrà essere opportuno arricchire i nauplii di *Artemia* utilizzando appositi integratori di origine vegetale (es. Algamac). Benché l'arricchimento non sia sempre indispensabile, esso è consigliabile per molte specie, perchè rende lo sviluppo costante ed indipendente dal ceppo di *Artemia salina* utilizzato. Alcuni ceppi di *Artemia* producono nauplii di grandi dimensioni, dalla struttura spinosa e dal contenuto proteico insufficiente. Questi possono costituire un problema e spesso rappresentano il motivo principale di elevate mortalità larvali. L'arricchimento permette di superare, almeno parzialmente, questi problemi, anche se inducono un certo aumento dimensionale degli alimenti, che possono quindi divenire meno appetibili per larve piccole. Solitamente, comunque, le larve di decapodi riescono ad aggrapparsi anche a particelle piuttosto grosse, ed a nutrirsi attivamente. I rotiferi, in realtà, hanno un valore nutritivo scarso rispetto a quello dei nauplii di *Artemia*. Le loro dimensioni ridotte però permettono di garantire un minimo apporto nutritivo anche nelle primissime fasi larvali e nelle specie che necessitano di prede più piccole. Per questo motivo si utilizzano talvolta somministrazioni contemporanee di *Brachionus* (3-6 ind ml⁻¹) e nauplii di *Artemia* (3-5 ind ml⁻¹) nel primo periodo di sviluppo, seguite da somministrazioni di soli nauplii.

L'aggiunta di fitoplancton al mezzo di coltura può avere una doppia valenza: trofica, nel caso di specie che producono larve poco sviluppate (protozoëa) ed aventi esigenze da filtratori, e batteriostatica, poichè piccole aggiunte di fitoplancton al mezzo di coltura permettono di abbattere i livelli di inquinamento organico e controllare in parte lo sviluppo di batteri in sospensione.

Sono disponibili in commercio anche sostituti di rotiferi ed *Artemia* in forma secca o come microincapsulati (es. Argent Cyclo-Peeze). Per alcune specie di decapodi molto robusti (es. *Lysmata seticaudata*, osservazione personale) questi alimenti, specialmente se somministrati alle ultime fasi larvali, possono risultare utili, essendo ben accettati e costituendo una buona fonte di acidi grassi essenziali. Per altre specie di decapodi, più sensibili (es. *Hippolyte inermis*) appaiono invece male accettati ed insufficienti a garantire un corretto sviluppo.

48.9 MORFOGENESI NEI PENEIDI

Nello sviluppo larvale dei Peneidi, come in ogni decapode, ad ogni muta corrispondono modificazioni morfologiche alle quali la terminologia comune attribuisce il termine di stadio o sub-stadio. I vari autori che hanno studiato lo sviluppo larvale dei Peneidi sotto il profilo morfo-funzionale (Gurney, 1942; Williamson, 1969; 1982; 1988) hanno distinto vari stadi sulla base della funzionalità delle appendici responsabili della locomozione: nauplio-protozoëa, nel caso in cui il nuoto sia reso possibile dal movimento delle antenne; zoëa-mysis i cui spostamenti sono dovuti al movimento delle appendici toraciche; post-larva quando gli spostamenti sono determinati dalle appendici addominali. Nello sviluppo larvale di *Marsupenaëus japonicus*, il Peneide più allevato nel Mediterraneo, vengono distinti quattro stadi: nauplio, protozoëa, mysis e post-larva.

48.9.1 NAUPLIO

Il nauplio (Fig. 2) è piriforme, allargato anteriormente, con un occhio mediano naupliare e tre paia di appendici cefaliche impiegate per il nuoto. Di queste, il primo paio o antennula non è ramificato, il secondo ed il terzo, rispettivamente rappresentati da antenne e mandibole, sono biramificati. Il nuoto avviene ad intermittenza, con spostamenti a scatti, ai quali seguono brevi fasi di riposo durante le quali la larva affonda lentamente. Il nauplio passa attraverso 6 successive mute durante le quali il corpo si allunga, le appendici divengono segmentate ed appaiono gli abbozzi sia delle due paia di maxille che delle prime due di massillipedi. Alla base delle appendici mandibolari si sviluppano, come rigonfiamenti, le superfici masticatorie, anche se la larva non si nutre ancora e si accresce a spese delle riserve del sacco del tuorlo. L'estremità posteriore del corpo diviene bilobata ed il numero delle spine caudali aumenta progressivamente. La lunghezza del corpo aumenta da circa 0,30 a 0,50 mm.

La durata dello stadio di nauplio, è in allevamento, di circa 36-37 ore, a temperatura compresa tra 27 e 29 °C. I differenti momenti dello sviluppo morfogenetico del nauplio vengono indicati, generalmente, con un acronimo costituito dalla lettera N e dal numero del substadio di riferimento. I principali elementi di caratterizzazione dei differenti substadi naupliari sono i seguenti:

N 1 (Fig. 2 A). La lunghezza del corpo varia all'incirca da 0,30 a 0,34 mm, mentre la larghezza (la maggiore distanza rilevabile generalmente all'altezza delle seconde appendici) da 0,16 a 0,18 mm. Sulle appendici le setole sono tutte lisce e sull'esopodite del 2° paio esse sono in numero di 5 (Fig. 2A.1). Le spine furcali, la cui formula è 1+1, appaiono arcuate verso l'interno (Fig. 2A.2).

N 2 (Fig. 2 B). La lunghezza totale varia da 0,33 a 0,35 mm e la larghezza da 0,16 a 0,18 mm. Setole piumose su tutte le tre paia di appendici e sull'esopodite del 2° paio; appaiono ancora in numero di 5 (Fig. 2B.1). Spine furcali con formula 1+1, ma leggermente divaricate (Fig. 2B.2).

N 3 (Fig. 2 C). Lunghezza corporea da 0,35 a 0,38 mm e larghezza da 0,17 a 0,19 mm. Sull'esopodite del 2° paio di appendici le setole piumose aumentano a 6. Comparsa dei rudimenti di 3 paia di appendici ventrali (Fig. 2C.1) che daranno origine nello stadio di protozoëa a maxillula, maxilla e 1° massillipede. Spine furcali con formula 3+3 (Fig. 2C.2).

N 4 (Fig. 2 D). Lunghezza corporea da 0,38 a 0,42 mm e larghezza da 0,17 a 0,19 mm. Sul 2° paio di appendici il protopodite appare suddiviso in 3 articoli e l'esopodite in 6 (Fig. 2D.1). Sull'esopodite del 2° paio di appendici le setole piumose appaiono ancora in numero di 6. Le 4 paia di appendici ventrali divengono distinte e biramificate. Spine furcali con formula 4+4 (Fig. 2D.2).

N5 (Fig. 2 E). Lunghezza del corpo da 0,42 a 0,45 mm e larghezza da 0,175 a 0,195 mm. Sull'esopodite del 2° paio di appendici le setole piumose appaiono in numero di 7. Alla base del 3° paio di appendici si sviluppa una protrusione sferica (corrispondente alla mandibola del successivo stadio di protozoëa) e si evidenzia l'articolazione tra protopodite e le due branche (Fig. 2E.1). Le 4 paia di appendici ventrali appaiono più distinte. Spine furcali con formula 6+6 (Fig. 2E.2).

N 6 (Fig. 2 F). Lunghezza corporea da 0,48 a 0,51 mm e larghezza da 0,18 a 0,20 mm. Carapace rudimentale

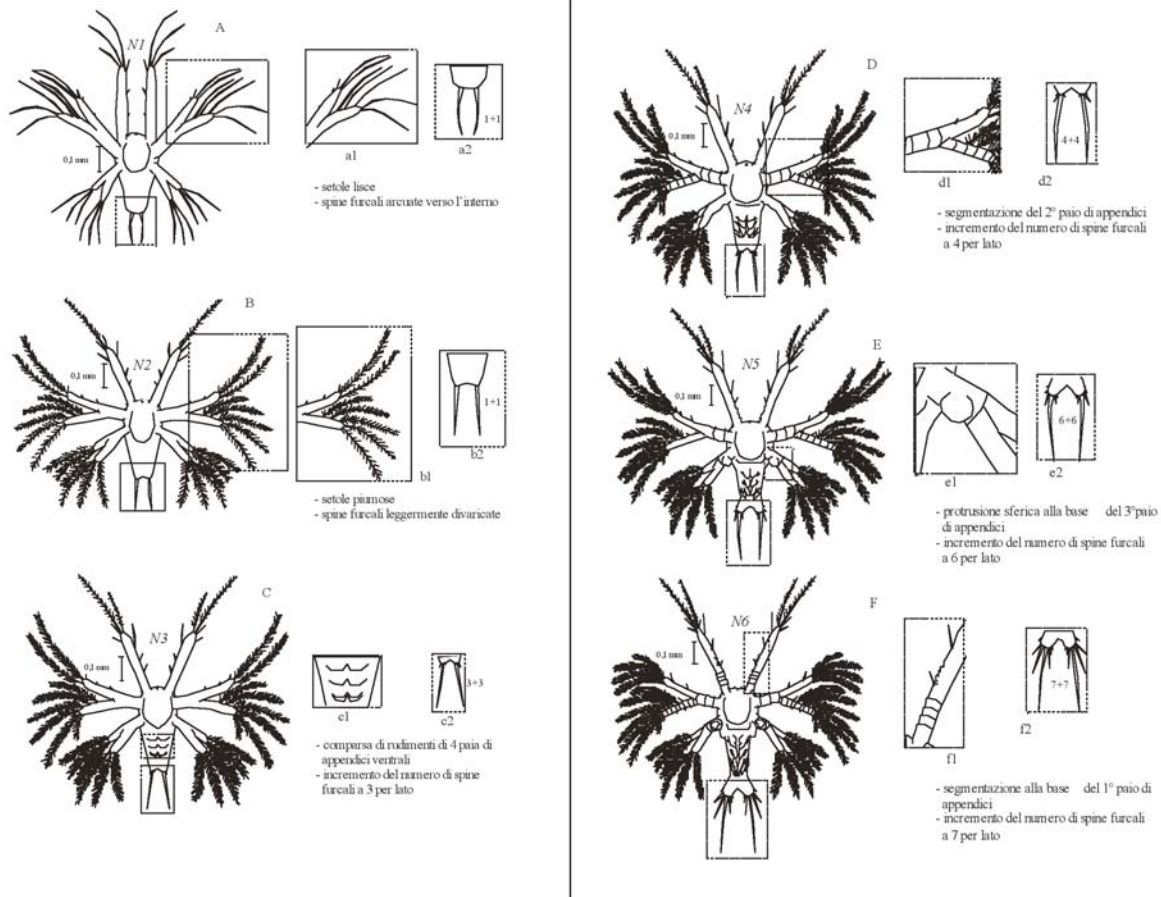


Fig. 2. Morfogenesi del nauplio di *Marsupenaeus japonicus*.

sulla superficie del corpo. Primo paio di appendici con 5 distinte articolazioni (Fig. 2F.1). Sull'esopodite del 2° paio di appendici le setole piumose appaiono in numero di 8. Protrusioni sferiche più evidenti sul protopodite del 3° paio di appendici. Spine furcali con formula 7+7 (Fig. 2F.2).

48.9.2 Protozoëa

Il nauplio, completando l'esuviazione dell'ultimo substadio, passa a protozoëa (Fig. 3). La lunghezza corporea varia da 0,92 a 2,59 mm. In questo stadio compaiono gli occhi composti e pedunculati, inizialmente come due abbozzi protrusi in posizione frontale e, successivamente, ben sviluppati. Appare ben conformato il carapace, di forma ottagonale e largo, ben distinto dalla rimanente parte del corpo; esso ricopre la regione cefalica ed i primi segmenti toracici. Man mano che la larva si sviluppa, si differenziano i somiti, prima quelli della regione toracica e poi quelli della parte addominale, fino ad assumere il pieno sviluppo. All'estremità distale del 6° segmento addominale compaiono, alla fine, gli uropodi.

La protozoëa, planctonica, è caratterizzata da un movimento natatorio più armonioso di quello a scatti dello stadio precedente per il coinvolgimento di più appendici deputate a tale funzione. Queste sono antennula e antenna, già impiegate nello stadio precedente, cui si aggiungono 1° e 2° massillipede. La larva, a seguito del conformarsi dell'apertura boccale, comincia ad alimentarsi attivamente di fitoplancton (diatomee) che filtra con l'aiuto delle appendici boccali (1ª e 2ª maxilla). In favorevoli condizioni trofiche ed ambientali di allevamento la protozoëa impiega 3 giorni per completare questo stadio (un giorno per ciascuno dei tre substadi). L'acronimo che indica i differenti momenti di sviluppo morfogenetico è rap-

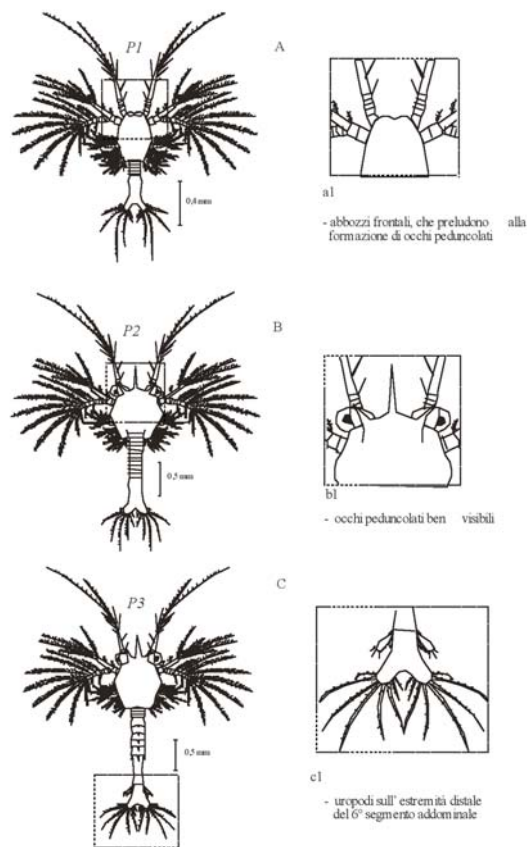


Fig. 3. Morfogenesi della protozoa di *Marsupenaes japonicus*.

presentato dalla lettera P seguito dal numero di riferimento del substadio. Gli elementi morfologici caratteristici dei tre substadi sono riportati di seguito:

P 1 (Fig. 3 A). La lunghezza corporea varia da 0,92 a 1,30 mm. Gli occhi composti non sono ancora visibili, anche se dall'inizio alla fine dello stesso substadio si rileva una progressiva estroflessione di due sporgenze sul bordo anteriore del carapace (Fig. 3A.1), che preludono alla formazione degli occhi pedunculati, presenti poi dal substadio successivo. Sono ben visibili 6 somiti afferenti al segmento toracico.

P 2 (Fig. 3 B). La lunghezza corporea varia da 1,45 a 2,0 mm. La caratteristica più evidente di questo substadio è la presenza degli occhi composti, pedunculati, e di un rostro nella parte frontale del carapace (Fig. 3B.1). Sul carapace è presente, anche, un paio di spine sopraorbitali, bifide. Sul corpo dell'animale sono ben distinguibili 10 somiti, dei quali gli ultimi 5 sono addominali.

P 3 (Fig. 3 C). La lunghezza corporea oscilla tra 2,14 e 2,59 mm. Tutti i somiti sono pienamente sviluppati. I 6 somiti toracici sono dotati di appendici; i primi 5 somiti addominali presentano una spina postero laterale, mentre il 6° addominale, più esteso di oltre il doppio rispetto al precedente, porta 2 paia di spine delle quali uno in posizione antero-laterale e l'altro postero-laterale. L'elemento più appariscente di questo substadio è la presenza degli uropodi all'estremità distale del 6° segmento addominale (Fig. 3C.1).

48.9.3 Mysis

Lo stadio di mysis (Fig. 4), costituito da 3 substadi, è raggiunto dopo circa 108 ore dalla schiusa, alla temperatura di 27- 29 °C, ed ha una durata complessiva di 3 giorni (un giorno per ciascun substadio).

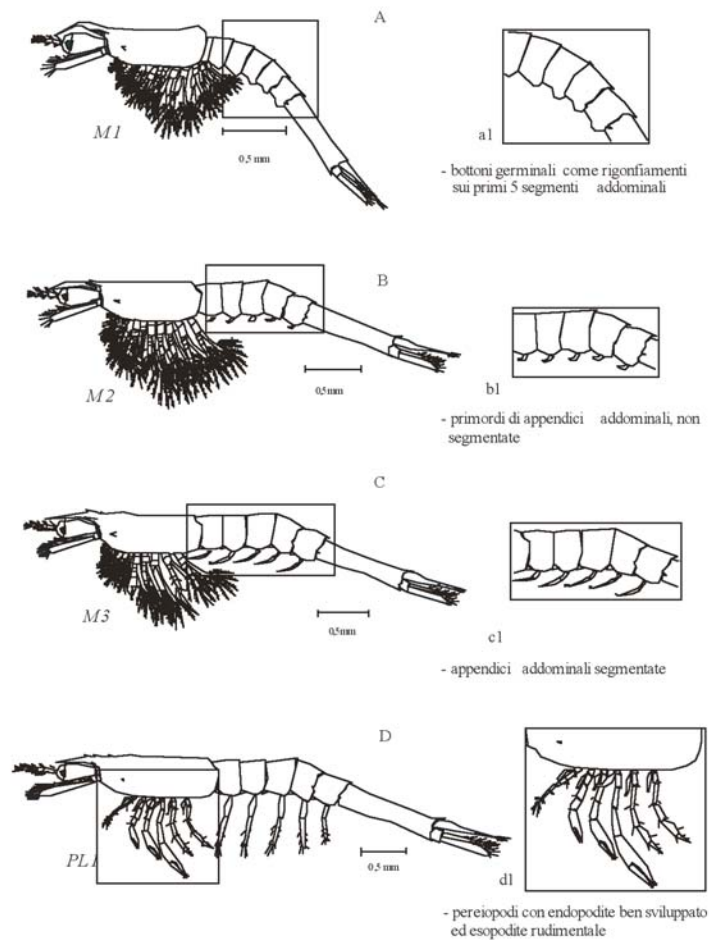


Fig. 4. Morfogenesi di Mysis e post-larva di *Marsupenaeus japonicus*.

La lunghezza corporea varia mediamente da 2,67 a 4,52 mm. L'aspetto generale della mysis è simile a quello del gambero. I segmenti cefalici e toracici formano un unico corpo: il cefalotorace, ricoperto dal carapace, e l'addome, ben distinto ed ormai sviluppato nei definitivi 6 segmenti. Questi sono muniti di appendici nei substadi finali, e da un telson che concorre, unitamente agli uropodi, a formare la pinna codale. Il nuoto risulta molto più armonioso che nei precedenti stadi e viene svolto principalmente dalle 5 paia di pereiopodi (negli stadi successivi con il ruolo di arti ambulacrali) con l'ausilio delle 3 paia di massillipedi. Caratteristica inconfondibile della larva, ancora planctonica in questo stadio, è la posizione di nuoto a testa in giù.

Particolare importanza assumono i pereiopodi bifidi. Di questi l'esopodite è inizialmente molto sviluppato e delegato al nuoto, mentre l'endopodite rimane inattivo, sebbene evidenzi già la presenza di chela rudimentale all'estremità delle prime 3 paia. Con le successive mute, l'endopodite si sviluppa e tende ad assumere una lunghezza pari a circa quella degli esopoditi. Il termine di mysis, attribuito a questo stadio, deriva dai pereiopodi bifidi, tipicamente propri degli adulti dei Misidiacei. L'acronimo che indica i differenti momenti di sviluppo morfogenetico è rappresentato dalla lettera M seguito dal numero di riferimento del substadio. Gli elementi morfologici caratteristici dei tre substadi vengono riportati di seguito:

M1 (Fig. 4 A). Lunghezza corporea da 2,67 a 3,10 mm. Su tutte e cinque paia di pereiopodi gli esopoditi, delegati principalmente al nuoto, sono oltre due volte più lunghi degli endopoditi. Presenza di bottoni germinali, appena visibili sui primi cinque segmenti addominali, che daranno origine agli arti addominali o pleopodi (Fig. 4A.1).

M 2 (Fig. 4 B). La lunghezza del corpo varia da 2,99 a 3,64 mm. Sui pereiopodi gli esopoditi risultano più lunghi degli endopoditi; le prime tre paia sono composte da 4 articoli, le rimanenti due paia da 5 articoli. Sui cinque segmenti addominali risultano ben sviluppati i processi primordiali, insegmentati, degli arti addominali (Fig. 4B .1).

M 3 (Fig. 4 C). La lunghezza del corpo varia mediamente da 3,79 a 4,52 mm. L'endopodite del 1° pereiopode è leggermente più corto dell'esopodite, mentre l'endopodite del 2° pereiopode è circa uguale in lunghezza all'esopodite. L'endopodite del 3° è più lungo di circa una volta e mezzo rispetto all'esopodite. Gli endopoditi delle rimanenti due paia di pereiopodi sono leggermente più lunghi degli esopoditi. Tutti gli endopoditi sono costituiti da 5 segmenti. I pleopodi appaiono ulteriormente sviluppati e formati da due segmenti, con due-tre corte setole all'estremità (Fig. 4C.1).

49.9.4 Post-larva

La durata di ciascun substadio varia secondo la specie e le condizioni ambientali, con particolare riferimento alla temperatura. Uno studio comparativo (Lumare e Gozzo, 1972) ha posto in evidenza le variazioni dei tempi di permanenza nei differenti sub-stadi naupliari, in condizioni termiche diverse, in *Melicertus kerathurus* e *Marsupenaeus japonicus*. Con la muta, che segna il passaggio da mysis al 1° substadio di post-larva, l'esopodite dei pereiopodi tende a ridursi ad un esile rudimento (Fig. 4D.1), viene perduta quindi la funzione di nuoto di quest'organo e l'animale scende sul fondo, anche se frequentemente se ne distacca per nuotare con l'aiuto dei pleopodi. Con una-due mute successive l'animale diviene completamente bentonico e gli endopoditi assumono il pieno sviluppo alla funzione di arti ambulacrali. Le prime tre paia svolgono anche attività di cattura e di presa del cibo.

La forma della post-larva è ora molto più simile a quella dell'adulto e man mano che si susseguono le successive 20-22 mute tale somiglianza diventa sempre maggiore. Data la difficoltà di individuare le piccole variazioni morfologiche, che si limitano ormai ad un incremento numerico dei segmenti in alcune appendici e allo sviluppo dimensionale di altri, risulta utile agli operatori, per motivi pratici di gestione, attribuire alle post-larve un numero di ordine successivo dei substadi preceduto dalle lettere PL, in relazione all'anzianità in giorni. Pertanto l'acronimo PL1 farà riferimento ad 1 giorno di permanenza del giovane peneide nello stadio di post-larva, piuttosto che a specifiche variazioni morfologiche. Le modificazioni morfologiche e funzionali delle appendici in *Marsupenaeus japonicus* attraverso i differenti stadi e substadi di sviluppo larvale fino a post-larva 1 sono rappresentate in Fig. 5. Vengono indicate con il medesimo colore le appendici che si sviluppano nello stesso intervallo di tempo, quindi in corri-

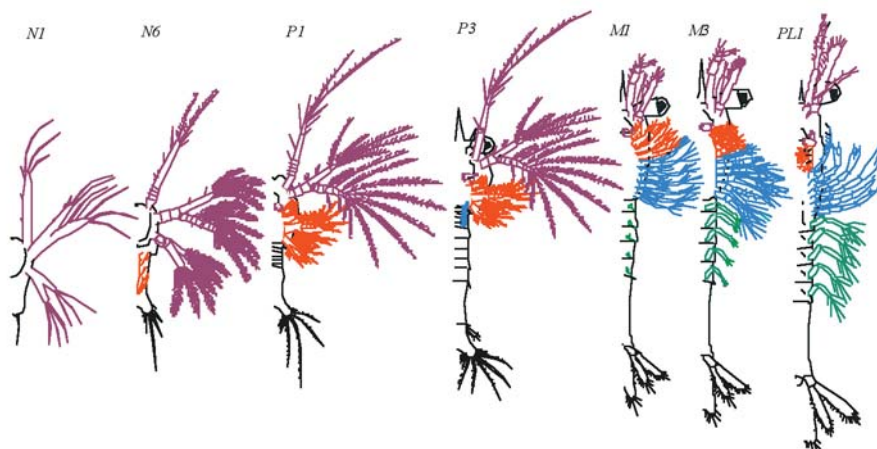


Fig. 5 Evoluzione morfologica delle appendici in *Marsupenaeus japonicus* attraverso i diversi stadi di sviluppo, fino a post-larva 1 (non in scala). Ciascun colore indica lo stesso inizio di sviluppo in termini cronologici, ma non sempre corrisponde a identica attività funzionale.

spondenza di un medesimo substadio larvale, anche se poi esse possono assumere funzioni diverse tra loro. Ciò rende meglio l'idea di come attraverso i differenti stadi la funzione del nuoto venga delegata ad appendici diverse, e giustifica sia le diverse modalità del movimento delle larve che l'attribuzione dei distinti quattro stadi di sviluppo in relazione all'uso delle appendici.

48.10 RIPRODUZIONE IN CATTIVITÀ

Alcune specie di Peneidi sono in grado di riprodursi spontaneamente nei bacini da allevamento (*Fenneropenaeus indicus*), la maggior parte delle specie allevate, invece, deve essere sottoposta a trattamenti di condizionamento. Il controllo sulla maturazione sessuale e riproduzione dei gamberi peneidi in cattività, viene messo in atto quando la specie da allevare non è presente in natura, o anche, pur essendo presente, la reperibilità delle post-larve da semina è scarsa e discontinua.

I metodi di induzione alla riproduzione si basano essenzialmente sulla eliminazione della funzionalità del peduncolo oculare e/o su controlli dei parametri ambientali quali fotoperiodismo, intensità luminosa, temperatura, alimentazione etc.

La tecnica dell'ablazione unilaterale del peduncolo oculare, tra le più utilizzate, sfrutta l'equilibrio esistente nell'endolinfa tra Ormone Stimolatore delle Gonadi (GSH), prodotto dall'Organo Y (nel *cerebellum* dei peneidi), e Ormone Inibitore delle Gonadi (GIH), prodotto dall'Organo X, nel peduncolo oculare. Eliminando uno dei due peduncoli oculari si riduce nell'endolinfa dei peneidi anche il livello dell'Ormone Inibitore delle Gonadi a favore del GSH. In tal modo si determina una rapida maturazione degli ovari e, quindi, la riproduzione. Nell'area del Mediterraneo il peneide maggiormente impiegato in allevamento è *Marsupenaeus japonicus*, la cui riproduzione in cattività si effettua ricorrendo ad ablazione unilaterale del peduncolo oculare. Una femmina di questa specie in natura può produrre oltre un milione di uova (si riproduce circa una sola volta), mentre in cattività emette da 100.000 a 200.000 uova, ma in compenso lo stesso esemplare può riprodursi varie volte. Il Peneide autoctono del Mediterraneo, *Melicertus kerathurus*, comunemente noto con il nome di "mazzancolla", gambero imperiale o gamberone, non si presta invece ad allevamento ed in natura può emettere poco meno di 200.000 uova. Nella riproduzione in cattività di *Marsupenaeus japonicus*, su scala commerciale si opera con alcune centinaia di riproduttrici per poter produrre decine di milioni di uova. La percentuale di schiusa di queste oscilla intorno al 30%; in cattività, con esemplari pescati in natura già maturi, si arriva ad oltre l'80% (Lumare *et al.*, 1997). L'impianto di produzione di novellame di gambero, pronto per la semina, consta di alcune strutture rappresentate principalmente dai settori operativi descritti in seguito.

48.11 SETTORE DI MANTENIMENTO, CONDIZIONAMENTO E MATURAZIONE DEI RIPRODUTTORI

Quest'area dello schiuditoio utilizza vasche da 6 m di diametro strutturate in modo da creare un movimento forzato dell'acqua attraverso il letto sabbioso, che deve sempre rimanere in ottime condizioni date le abitudini fossorie della specie. Un secondo ricircolo prevede il prelievo dell'acqua dalla vasca e l'invio a pressione attraverso ugelli orientati opportunamente sul pelo dell'acqua, per creare un movimento centripeto della massa d'acqua con cui concentrare il detrito (escrementi, residui alimentari etc.) al centro della vasca, in corrispondenza dello scarico.

48.12 SETTORE DI RIPRODUZIONE E RACCOLTA DELLE UOVA

È la zona dello schiuditoio in cui sono allocate vasche cilindro-coniche di medio volume (2-4 m³), attrezzate con riciclo di acqua termocondizionata (26-28 °C) e trattamento mediante filtro biologico, destinate a ricevere le riproduttrici per soli 2-3 giorni per ciclo. Le femmine con ovari maturi emettono ivi le uova

durante la notte (ore 22:00-01:00) e quelle che si sono riprodotte vengono trasferite al mattino nelle vasche di condizionamento dalle quali provenivano, per le successive riproduzioni. Le uova emesse vengono concentrate con flusso idrico automaticamente, in un apposito cestello, da dove sono trasferite in contenitori nei quali sono sottoposte a disinfezione ed analizzate per una valutazione qualitativa e numerica. In base ai risultati delle osservazioni, le uova vengono trasferite, entro 1-2 ore, nelle apposite vasche da allevamento larvale, in numeri adeguati, tenendo conto della percentuale di fertilità, curando che le larve che schiuderanno non abbiano una densità di stoccaggio superiore a 30-40 naupli per litro d'acqua.

48.13 SETTORE DI ALLEVAMENTO LARVALE E POSTLARVALE

Questa è l'area in cui si trovano le numerose vasche cilindriche, di volume variabile (9-20 m³) nelle quali viene condotto l'allevamento dei giovani animali. Le vasche dispongono di acqua marina riscaldata, a salinità controllata, filtrata a circa 5 micron e trattata con batteriostatici. Qui le uova schiudono dopo circa 3 ore dal trasferimento e ne viene fuori il nauplio (planctonico) che metamorfosa dopo circa un giorno e mezzo a protozoëa (planctonica). Questa permane attraverso tre substadi per una durata complessiva di tre giorni per metamorfosare a mysis, planctonica. Dopo tre giorni (e tre substadi) essa diventa post-larva (bentonica) di un giorno di vita (PL 1). Le post-larve continuano ad essere allevate finché non diventano sufficientemente robuste (PL22, ovvero post-larva di 22 giorni) per essere trasferite nei bacini da allevamento. Il ciclo di coltura larvale post-larvale dura, in genere, 30 giorni.

48.14 SETTORE FITOPLANCTON

È il settore nel quale viene prodotto il fitoplancton ed in genere si utilizzano diatomee del genere *Chaetoceros* per alimentare le larve dei Peneidi allo stadio di protozoëa. La diatomea, nelle colture larvali di Peneidi, svolge due importanti ruoli: costituisce alimento delle larve nella fase di protozoëa (3 giorni) e sottrae, assimilandoli, i nutrienti dall'acqua, con particolare riguardo a quelli tossici come nitriti ed ammoniaca. Proprio per quest'ultimo motivo la diatomea *Chaetoceros* sp. viene somministrata non solo per i 3 giorni nei quali la larva protozoëa si nutre di essa, ma anche in quelli immediatamente successivi, allo scopo di mantenere le condizioni dell'acqua favorevoli all'allevamento fino al momento in cui le larve diventano abbastanza resistenti.

48.15 SETTORE DI SCHIUSA DELLE UOVA DI *ARTEMIA SALINA*

I nauplii di *Artemia salina*, appena schiusi, rappresentano l'alimento di base delle larve di gamberi Peneidi, dallo stadio di mysis 1 fino ai primi di post-larva (ovvero per circa 6 giorni). Le vasche per la produzione di naupli di *Artemia* sono di forma conica o cilindro-conica e del volume di 2-3 m³ ciascuna. Esse devono essere organizzate numericamente in modo da far fronte alle richieste nutrizionali dell'impianto, tenendo conto che 1 m³ di vasche di naupli di *Artemia* sostiene troficamente circa 15 m³ di coltura a mysis. Pertanto uno schiuditoio commerciale di media grandezza consuma giornalmente, per alimentare lo stadio di mysis, circa 4,5 kg di cisti di *Artemia* (1 g di cisti di *Artemia* produce mediamente 250.000 naupli).

48.16 GESTIONE DELL'ALLEVAMENTO LARVALE

La gestione consiste in una serie di azioni orientate ad esercitare il massimo controllo a livello: 1) biologico, ovvero sulla frazione vivente dell'ecosistema da allevamento e rappresentata da fitoplancton,

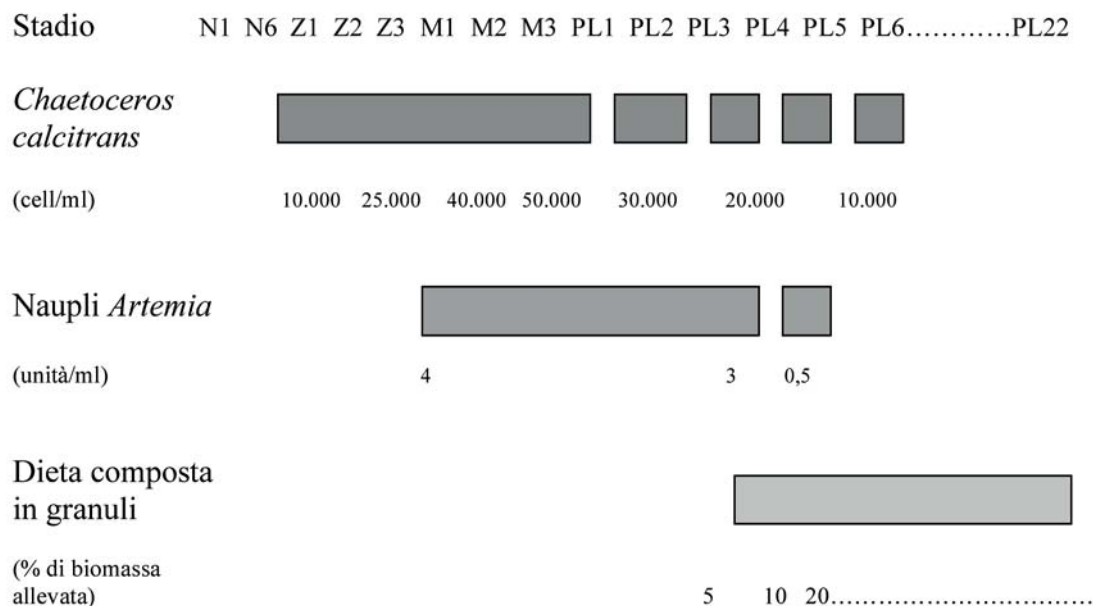


Fig. 6. Sequenza delle componenti alimentari nell'allevamento di larve e post-larve del Peneide *Marsupenaeus japonicus*. La dieta composta in granuli ha dimensioni da 250 ad oltre 700 micron.

zooplancton e popolazione allevata. Tali componenti interagiscono principalmente per esigenze trofiche, ma anche in ordine al controllo sulla qualità dell'acqua (fitodepurazione endogena). I controlli esercitati nell'ambito di tale scomparto riguardano la consistenza numerica dei componenti perché via sia il giusto rapporto tra predatori e prede, la qualità delle prede, lo stato di salute degli animali allevati. 2) ambientale dell'ecosistema di allevamento, attraverso le analisi chimiche e fisiche delle acque e gli interventi correlati orientati a mantenere, per quanto possibile, i parametri anzidetti entro un campo di variabilità congeniale alle esigenze degli animali; 3) tecnologico, attraverso operazioni mirate a mantenere nello stato ottimale il funzionamento delle strutture da allevamento, delle quali si è detto.

Un aspetto importante della gestione è rappresentato dall'alimentazione. Allo stadio di nauplio la larva non si alimenta, non essendosi ancora sviluppata l'apertura boccale. Tuttavia, fin dai primi sub-stadi naupliari si travasano nelle vasche da allevamento larvale colture di *Cheatoceros* sp., (10.000 cell. ml⁻¹). Il fitoplancton, nella vasca da allevamento, dovrà raggiungere successivamente una densità di 25.000-50.000 cell. ml⁻¹. L'intensità luminosa e la densità delle larve in coltura potranno determinare oscillazioni significative dei valori idonei. Al di sopra di 100000 cell. ml⁻¹ occorre intervenire per bloccare una ulteriore crescita algale che risulterebbe pericolosa. Non è consigliabile effettuare ricambi per non danneggiare le larve che andrebbero a schiacciarsi contro i filtri. È più opportuno aumentare il livello dell'acqua, determinando una diluizione del fitoplancton.

Dallo stadio di mysis l'alga, come fonte alimentare perde di importanza, ma è necessario che essa sia presente in quanto fornisce alimento ai naupli di *Artemia* sp. che, da questo momento, vengono somministrati come cibo e stabilizza le condizioni chimiche dell'acqua (Fig. 6). Dallo stadio di mysis la densità delle diatomee può essere ridotta, gradatamente, da 30.000 a 10.000 cell. ml⁻¹, ma i naupli di *Artemia* dovranno essere somministrati ad una concentrazione di 4 unità ml⁻¹. L'alimentazione a base di nauplii di *Artemia* prosegue anche nei primi stadi post-larvali (da PL1 a PL3); soltanto a PL 3, quando cioè le postlarve saranno già diventate bentoniche, si riduce la quantità di *Artemia* (3 e poi 0,5 unità ml⁻¹), ma si inizia a somministrare cibo composto in granuli (Fig. 6). Questo inizialmente ha una dimensione di 250 micron e successivamente sarà di dimensioni crescenti (400, 700 micron ed oltre).

Altri fattori importanti nella gestione sono quelli ambientali, ed in particolare: temperatura (da mantenere in un range tra 25 e 29 °C), salinità (35-37 ‰), pH (7,8-8,9), ossigeno (prossimo alla saturazione),

nutrienti (valori tipici di acque salubri), movimentazione dell'acqua (crescente da nauplio a post-larva) etc. Un parametro decisivo è l'intensità luminosa che deve essere sempre superiore a 10.000-20.000 lux nell'allevamento larvale di *Marsupenaeus japonicus*, ma può essere meno incisiva nel caso di *Penaeus semisulcatus* (Lumare *et al.*, 1997).

48.17 PRODUZIONE DI POSTLARVE DI *HIPPOLYTE INERMIS* IN LABORATORIO

Hippolyte inermis è un gamberetto vivente in praterie di *Posidonia oceanica* ed in altre fanerogame. Come altri Hippolytidi è caratterizzato da inversione sessuale proterandrica (Fig. 7). Si tratta però di una specie molto peculiare, perchè l'inversione è preceduta da completa distruzione del testicolo (Zupo e Messina, 2007): l'ovario è costruito a partire da cellule embrionali totalmente indifferenziate ancora presenti nel corpo dell'adulto (Reverberi, 1950). Inoltre questa specie presenta 2 periodi di riproduzione (in primavera ed in autunno) ed un ciclo vitale perfettamente sincronizzato con la disponibilità in campo di alcune specie di macroalghe (Zupo, 1994). Per tutti questi motivi viene allevato sperimentalmente come specie modello per lo studio dell'apoptosi indotta da estratti vegetali e può rappresentare un esempio anche per altre specie di decapodi natanti che producono larve già sviluppate: schiude infatti in forma di zoëa ed ha un numero variabile di stadi larvali, da 7 a 12, dipendenti dalla temperatura e dalle disponibilità trofiche (Zupo e Buttino, 2001).



Fig. 7. *Hippolyte inermis*: maschio maturo della lunghezza di 9 mm. In basso a sinistra il suo secondo pleopode ingrandito (200 X) al microscopio ottico. A.M. appendice mascolina; A.I. appendice interna; E endopodite; S esopodite.

48.18 PRODUZIONE E ALLEVAMENTO LARVALE

Le femmine ovigere di *Hippolyte inermis* possono essere raccolte facilmente su praterie di *Posidonia oceanica* nel periodo primaverile ed in quello autunnale. È possibile raccogliere in immersione, strisciando un retino sulle foglie della fanerogama, oppure dalla barca, trascinando sulle foglie un retino da plancton. Generalmente aprile e settembre sono i mesi ideali per raccogliere femmine ovigere, poichè questa specie presenta due picchi riproduttivi in corrispondenza di questi mesi, almeno nelle acque costiere italiane (Zupo, 1994).

Le femmine campionate in primavera sono generalmente di dimensioni maggiori (18-25 mm di lunghezza totale), derivando da inversione sessuale. Possono produrre sino a 3-400 larve ciascuna. Le fem-

mine raccolte in autunno sono in gran parte derivate da sviluppo diretto e sono quindi mediamente più piccole (9-11 mm di lunghezza totale). Le riproduttrici, immediatamente dopo la raccolta, possono essere ospitate in beute da 2 l contenenti acqua di mare filtrata (attraverso un filtro Millipore da 0,45 μm), alla quale possono essere aggiunti nauplii di *Artemia salina* (1-2 ind. ml^{-1}) utili per sostenere le prime fasi vitali di larve eventualmente rilasciate. In ogni beuta viene disposta una pietra porosa collegata ad una pompa d'aria. Sul fondo è possibile disporre dei frammenti di foglia di *Posidonia oceanica*, che aiutano le femmine ovigere ad occultarsi e le rendono più tranquille. Il rilascio delle larve è immediatamente seguito da una muta delle femmine, per cui è possibile identificare rapidamente le beute contenenti le larve anche osservando la presenza di esoscheletri sul fondo. Tutto il processo può essere effettuato in camera termostatica ad una temperatura di 18-20 °C. Non è necessaria una elevata irradianza, dal momento che non si prevede di somministrare direttamente fitoplancton col mezzo di coltura. Nei nostri esperimenti abbiamo sempre sperimentato con successo una irradianza attorno ai 100 μE , ma riteniamo che le larve possano essere tolleranti a questo proposito.

Le larve prodotte dagli individui in allevamento sono raccolte su un retino da plancton (maglia 60 μm), prelevate poi al microscopio binoculare mediante una pipetta Pasteur e contate (secondo il metodo descritto da Zupo, 2000). In seguito sono trasferite in beute da 1 l contenenti 800 ml d'acqua di mare, o in beute da 2 l contenenti 1500 ml d'acqua di mare, secondo il numero delle larve nate da una singola femmina. La densità massima di coltura è rappresentata da 1 larva per ogni 10 ml d'acqua. L'allevamento a densità inferiori non pone problemi di sorta, mentre densità più elevate conducono spesso a problemi di inquinamento, che produce poi elevata mortalità e scarsa crescita.

L'acqua di mare utilizzata per l'allevamento viene decantata per eliminare le particelle grossolane in sospensione e filtrata su filtro meccanico (lana di perlon) e carbone attivo. Successivamente, per evitare problemi dovuti alla presenza di batteri chitinolitici, si utilizza un sistema di filtraggio e sterilizzazione, costituito da una vasca da 60-100 litri, nella quale è disposto uno schiumatoio. L'acqua viene aspirata da una pompa centrifuga e passa attraverso un filtro esterno (da ripulire giornalmente per evitare accumulo di detrito organico) contenente lana di perlon e carbone attivo. Viene quindi spinta in un sistema di sterilizzazione UV prima di tornare in vasca. In questo modo l'acqua viene privata degli inquinanti organici ed inorganici, oltre che di proteine ed altre sostanze schiumabili, prima di essere sterilizzata mediante il mezzo fisico.

Per produrre il mezzo di coltura sono aggiunti all'acqua di mare nauplii di *Artemia salina* appena schiusi (4 ind. ml^{-1}) e rotiferi (*Brachionus plicatilis*; 4 ind. ml^{-1}). La somministrazione di *Brachionus* può essere limitata alla prima settimana di allevamento larvale e serve principalmente per fornire una fonte alimentare facile da catturare per gli individui più piccoli. In realtà i nauplii di *Artemia* costituiscono l'alimento principale. Per migliorare le rese e rendere più costanti i risultati i nauplii possono essere arricchiti concentrandoli per 24 ore in una beuta aerata contenente acqua di mare ed Algamac (un integratore di origine algale facilmente reperibile in commercio). Al termine del processo di arricchimento i nauplii sono raccolti su un retino da 50-60 μm e sciacquati con acqua di mare filtrata prima della somministrazione.

Le beute contenenti le larve sono mantenute in camera termostatica a 18-20 °C (temperatura ottimale per lo sviluppo larvale di *Hippolyte inermis*; Regnault, 1969) e sottoposte ad un fotoperiodo di 12 ore. Anche in questo caso gli scambi gassosi sono garantiti da una moderata aerazione, tale da non disturbare i normali movimenti delle larve nelle beute. Ogni due giorni le larve sono filtrate su retino da plancton (60 μm), isolate al microscopio mediante pipetta Pasteur, contate e trasferite in nuovo mezzo di coltura. Il processo viene continuato fino alla trasformazione in postlarve (settlement). L'allevamento larvale dura in media 25-30 giorni (Zupo, 2000), ma tale periodo è ampiamente variabile in relazione alla temperatura, alla qualità e quantità dell'alimento, alle condizioni di salute delle larve ed alla taglia delle genitrici. In alcuni casi, larve in ottime condizioni e bene alimentate possono raggiungere il settlement in soli 15 giorni. In altri casi, larve stressate dalla presenza di una eccessiva flora batterica possono bloccarsi nell'ultima fase, prima di quella postlarvale, anche per varie settimane. Adottando questo sistema speri-

mentale, *H. inermis* segue una serie variabile di fasi larvali, tutte costituite da zoe (Regnault, 1969; Zupo e Buttino, 2001), sino alla prima post-larva.

48.19 ALLEVAMENTO POSTLARVALE

Dopo almeno 20-30 giorni di allevamento larvale (secondo l'alimentazione, la temperatura, lo stato delle femmine ovigere e vari altri fattori ambientali), *Hippolyte inermis* passa allo stadio giovanile, detto "postlarvale". A differenza dell'allevamento larvale, che è condotto in condizioni sperimentali identiche per tutti gli individui raccolti, l'allevamento postlarvale può essere condotto diversificando le diete delle repliche, allo scopo di valutare l'influenza di alimenti diversi sul processo di inversione sessuale. Le postlarve sono trasferite in cristallizzatori da 12 cm di diametro, ciascuno contenente 400 ml acqua di mare filtrata come descritto per la fase precedente dell'allevamento. Ogni recipiente può contenere sino a 25 individui, derivanti dall'unione delle postlarve prodotte, in modo da randomizzare i diversi pool genetici. Le beute sono areate mediante tubicini cui sono collegate pipette di plastica piegate ad "L" in modo da risultare adattate alla forma dei cristallizzatori.

Si può verificare, al microscopio ottico, che le postlarve si nutrano effettivamente degli alimenti somministrati. Allo scopo, vengono osservate le fecal pellets prodotte. Un alimento postlarvale per questa specie deve necessariamente contenere sia prede vegetali sia prede animali. È stato infatti dimostrato (Zupo, 2000) che per ottenere una crescita sufficiente ed una normale maturazione del sesso *H. inermis* necessita sia di proteine animali sia di principi alimentari di origine vegetale. A questo scopo, un cibo sperimentale dai requisiti minimi può essere preparato miscelando in parti uguali a) *Artemia salina* liofilizzata arricchita con PUFA; b) *Spirulina* pura in polvere e c) Tetra AZ shrimp food. Nei nostri esperimenti abbiamo sostituito in alcuni casi *Spirulina* con macroalghe (*Enteromorpha* sp) liofilizzate ed il cibo Tetra per gamberi (Tetra AZ) con vari pellets per pesci d'acquario, ottenendo risultati comparabili. Dopo aver miscelato i 3 alimenti secchi, si preparano dei pellets da 5 mg ciascuno, che possono essere conservati a lungo in frigorifero.

Ogni giorno si somministra un pellet da 5 mg in ogni cristallizzatore: questa quantità di alimento è infatti sufficiente per alimentare *ad libitum* i 25 individui presenti sino alla maturazione. È importante però effettuare somministrazioni giornaliere perché gli alimenti perdono le loro proprietà organolettiche e nutritive dopo alcune ore di permanenza in acqua. L'aggiunta di materiali vegetali freschi (macro- e microalghe) migliora in genere la crescita e può essere considerata laddove non interferisca con eventuali *constraints* sperimentali. Il passaggio dall'alimentazione larvale (*Artemia* in sospensione) a quella postlarvale (pellets da distribuire sul fondo dei cristallizzatori) dovrebbe avvenire in maniera progressiva, per facilitare lo svezzamento degli individui allevati. Allo scopo, il numero di nauplii presenti nel mezzo di coltura sarà ridotto gradualmente durante i primi 5 giorni di coltura postlarvale (da 4 a 0 ind. ml⁻¹), mentre si somministreranno normalmente i pellets di cibo secco. In questo modo le postlarve potranno adattarsi alla nuova modalità di alimentazione e si miglioreranno notevolmente le rese in termini di sopravvivenza.

Una singola replica può essere seguita per monitorare le curve di crescita e la maturazione. Allo scopo, i singoli individui sono osservati al microscopio da dissezione (40 X), per misurarli (su carta millimetrata) e valutare la forma dell'endopodite del secondo paio di pleopodi e registrare la presenza di appendici maschili e femminili. Tale metodo richiede la narcosi dei gamberi, ottenuta mediante immersione per 30 secondi dei singoli individui in una soluzione di cloroformio (16 µl di cloroformio in 200 ml d'acqua di mare). Dopo l'analisi, ogni singolo individuo viene trasferito in una capsula Petri con acqua di mare pura, per seguirne il completo ripristino delle funzioni motorie. I giovani *Hippolyte* narcotizzati, infatti, diventano aggressivi al risveglio: per questo è fondamentale far risvegliare i gamberi in contenitori separati. In alternativa è possibile raccogliere e misurare le esuvie prodotte in ogni cristallizzatore. Allo scopo le esuvie prodotte dai gamberi in allevamento possono essere immerse per una notte in una soluzione concentrata di rosa Bengala in alcool etilico (70%) e poi riportate in alcool prima delle misurazioni (Zupo

et al., 2008). In questo modo è possibile misurare la lunghezza totale delle esuvie e campionare il secondo pleopode, da analizzare al microscopio ottico per la presenza di eventuali appendici maschili e per determinare lo stato di maturazione sessuale sulla base della forma del primo pleopode (Fig. 7). Utilizzando questi sistemi il processo di crescita può essere facilmente monitorato e si può valutare l'influenza di alimenti diversi sull'allungamento e la maturazione del sesso (Fig. 8).

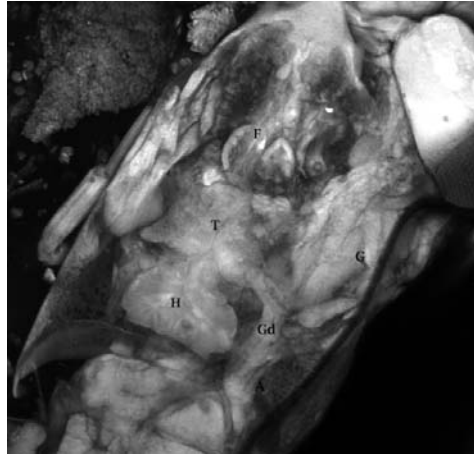


Fig. 8. Carapace di post-larva (30 gg) di *Hippolyte inermis* osservato al microscopio ottico laser confocale per mostrare la disposizione degli organi interni. F stomaco; T testicolo; Gd gonodotti; G branchie; H cuore. Immagine ottenuta in cooperazione con la Dr. Isabella Buttino, Functional and Evolutionary Ecology Laboratory (SZN).

48.20 CONCLUSIONI

Per il carcinologo impegnato nell'identificazione delle larve planctoniche l'ausilio fornito dalle ricerche sull'allevamento delle larve in laboratorio è indispensabile. Va però sottolineato che la conoscenza del numero, della durata, della morfologia delle fasi di sviluppo in natura serve a chiarire eventuali alterazioni, modificazioni, anomalie indotte proprio dall'ambiente di laboratorio: i due diversi approcci allo studio delle larve si integrano quindi a pieno titolo l'uno nell'altro.

Le ricerche sulle larve planctoniche continuano, ma sono ancora oggi frenate dalla difficoltà di abbinare correttamente larva ed adulto, processo indispensabile per poter poi operare confronti, fare considerazioni, proporre ipotesi. Nella programmazione di una ricerca finalizzata alla raccolta delle larve di Decapodi vanno tenute presenti le esigenze ecologiche di questo gruppo, per ottimizzare il successo del campionamento ed ottenere risultati che rispecchino la realtà in natura. Per l'ambiente mediterraneo è anche fondamentale poter valutare la presenza delle larve planctoniche di specie alloctone e la loro distribuzione: va ricordato che una specie immigrata in un nuovo ambiente può essere definita come stabilizzata in quell'ambiente quando in esso inizia a riprodursi attivamente. Da ciò nasce la necessità di strumenti per riconoscere correttamente le larve delle specie autoctone da quelle delle alloctone.

I due esempi pratici forniti potranno servire per sviluppare sistemi *ad hoc* da utilizzare per altre specie di crostacei decapodi. Le modalità di riproduzione ed il susseguirsi delle fasi larvali, infatti, possono essere comparabile con quanto sin qui descritto, pur con le differenze del caso. Utilizzeremo ovviamente i sistemi produttivi meglio adattabili alle nostre necessità, siano queste di tipo industriale (come spiegato nel caso di *Marsupenaeus*) o di tipo sperimentale (come nel caso di *Hippolyte*). I concetti sin qui riportati saranno comunque serviti a spiegare quanto complessa e varia possa essere la morfogenesi dei crostacei decapodi: sono necessari senza dubbio ulteriori ricerche per chiarire i numerosi dubbi ancora esistenti in merito e per definire il ruolo evolutivo delle varie strategie di sviluppo e dei numerosi adattamenti morfo-funzionali osservabili in ogni singola specie.

48.21 BIBLIOGRAFIA

- ABELLÓ P., GUERAO G. (1999) - Temporal variability in the vertical and mesoscale spatial distribution of crab megalopae (Crustacea: Decapoda) in the Northwestern Mediterranean. *Estuar. Coast. Shelf Sc.*, **49**: 129-139.
- BARNICH R. (1996) - *The larvae of the Crustacea Decapoda (excl. Brachyura) in the plankton of the French Mediterranean Coast*. Cuvillier Verlag, Gottinga: 189 pp.
- BASILE R., FRANCOBANDIERA P., PESSANI D. (2006) - Chiave di identificazione del primo stadio larvale degli Anomuri (Crostei Decapodi) del Mar Mediterraneo. *Biol. Mar. Mediterr.*, **13**(1): 937-939.
- BATTUELLO M. (2008) - *Caratterizzazione delle comunità zooplanctoniche superficiali del Santuario Internazionale dei Cetacei*. Tesi di laurea in Conservazione e Biodiversità animale, Università di Torino: 270 pp.
- BOSCHI E.E. (1981) - Larvas de Crustacea Decapoda. In Boltovskoy, D. (ed.), *Atlas del Zooplancton del Atlántico Sudoccidental y Métodos de Trabajo con el Zooplancton Marino*. Public. Esp. Inst. Nac. Inv. Desarrollo Pesq., Mar del Plata: 699-757.
- BOURDILLON-CASANOVA L. (1960) - Le méroplancton du golfe de Marseille. Les larves des Crustacés Décapodes - Rec. Trav. Stat. Mar. End., **30** (18): 1-286
- BOUVIER E.L. (1940) - Faune de France. 37. *Decapodes marcheurs*. Lechevalier et fils. Paris : 404 pp.
- CARLI A., PESSANI, D. (1973) - Studio delle larve di Crostei Decapodi (Natantia e Reptantia) raccolte durante la campagna di pesca del giugno 1968 alle isole Egadi (Sicilia). Primo contributo. *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.*, **28**(2): 317-337.
- CARLI A., ASTE, A., PANE, L., BALESTRA, V. (1987) - Crustacea Decapoda larvae from the Ligurian Sea. *Inv. Pesq.*, **51** (suppl. 1): 453-454.
- CLARK P. F., CALAZANS, D. K., POHLE, G. W. (1998) - Accuracy and standardization of brachyuran larval descriptions. *Inverteb. Reprod. Dev.*, **33**: 127-144.
- COSTLOW J.D. Jr (1968) - Metamorphosis in crustaceans In: Etkin W. e Gilbert L.I.(eds), *Methamorphosis. A problem in developmental biology*. New York. Appleton-Century Crofts: 3-41.
- DESTEFANIS L., PESSANI D. (1984) - Larve planctoniche di Macruri Reptanti ed Anomuri (Crostei Decapodi) nel golfo del Tigullio. *Nova Thalassia*, **6** (suppl.): 77-83.
- FAO (2007a) - *FAO yearbook . Fishery statistics. Commodities 2005*. Vol. 101, Rome: 237 pp.
- FAO (2007b) - *FAO yearbook. Fishery statistics. Aquaculture Production 2005*. Vol 100/2, Rome; 202 pp.
- FAO (2007c) - *FAO yearbook. Fishery statistics. Capture Production 2005*. Vol 100/1, Rome; 539 pp.
- FIEDLER U., SPANIER E. (1999) - Occurrence of larvae of *Scyllarus arctus* (Crustacea, Decapoda, Scyllaridae) in the Eastern Mediterranean - preliminary results. *Ann. Ser. Hist. Natur.*, **9**: 153-158.
- FLAGELLA S. (2000) - *Il plancton del litorale pugliese con particolare attenzione alle megalope (Decapodi, Brachiuri) identificate mediante una chiave valida per tutti gli esemplari mediterranei*. Tesi di laurea in Scienze Naturali, Università di Torino, 389 pp.
- FRANSOZO A., CUESTA J.A., NEGREIROS-FRANSOZO M.L. (1998) - The first zoeal stages of two species of Grapsidae (Decapoda, Brachyura) and a key to such larvae from the Brazilian coast. *Crustaceana*, **71** : 331-343.
- FRANSOZO A, MANTELATTO F.L., BERTINI NEBECC G. (2002) - The first zoeal stage of the genus *Cronius* (Brachyura, Portunidae) from the Brazilian coast, hatched in a laboratory. *J. Plankton Res.*, **24**(11): 1237-1244.
- FUSTE X. (1982) - Ciclo anual de las larvas de Crustáceos Decápodos de la costa de Barcelona. *Inv. Pesq.*, **46** (2): 287-303.
- FUSTE X. (1987) - Distribución de larvas de Crustáceos Decápodos de la costa de Cataluña. *Inv. Pesq.*, **51** (Suppl. 1): 277-284.
- FUSTE X. (1989) - Distribution of decapod Crustacean larvae in the bays of the Ebro Delta. *Sci. Mar.*, **53** (4): 763-770.
- GALIL B. (1993) - The composition and diversity of planktonic larval Decapoda off the Mediterranean coast of Israel. *Final Reports on Research Projects dealing with the Effects of Pollutants on Marine Communities and Organisms*, Athens, UNEP: 131-151.
- GONZÁLES-GORDILLO J.I., DOS SANTOS A., RODRÍGUEZ A. (2001) - Checklist and annotated bibliography of decapod crustacean larvae from the Southwestern European coast (Gibraltar Strait area). *Sci. Mar.*, **65**(4): 275-305.
- GURNEY R. (1939) - Bibliography of the larvae of Decapod Crustacea. *The Ray Society London*, **125**: 1-123
- GURNEY R. (1942) - Larvae of Decapod Crustacea. *The Ray Society London*, **126**:1-306.

-
- KING D.S. (1964) - Fine structure of the androgenic gland of the crab *Pachygrapsus crassipes*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **4**: 533-544.
- KNOWLTON R.E. (1974) - Larval development processes and controlling factors in decapod crustaceans with emphasis on Caridea. *Thalassia Jugosl.*, **10**: 138-158.
- KURATA H. (1969) - Larvae of Decapoda Brachyura of Arasaki, Sagami Bay. IV Majidae. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **57**: 81-127.
- KURIAN C.V. (1956) - Larvae of Decapod Crustacea from the Adriatic sea. *Acta adriatica*, **6**: 1-108.
- LAKKIS S., ZEIDANE R. (1988) - Le meroplankton des eaux Libanaises: larves de Crustacés Décapodes. *Rapp. P.-V. Réun. CIESM*, **31**(2): 238.
- LE ROUX A. (1963) - Contribution à l'étude du développement larvaire d'*Hippolyte inermis* Leach (Crustacée Décapode Macroure). *Comptes Rendus Séanc. Acad. Sci. Paris*, **256**: 3499-3501.
- LEBOUR M.V. (1950) - Notes on some larval decapods (Crustacea) from Bermuda. *Proc. Zool. Soc. London*, **120**: 369-379.
- LUMARE F., GOZZO S. (1972) - Osservazioni sulla morfogenesi del nauplio di *Penaeus kerathurus* nelle sue relazioni con *Penaeus japonicus*. *Atti Soc. Pelorit. Scienze Fis. Mat. Nat., Messina*, **18** (2-4): 165-175.
- LUMARE F., UZUNOGLU S., BASPEHLIVAN H. (1997) - Hatchery mass production of the penaeid fry *Penaeus japonicus* and *P. semisulcatus* (Penaeidae, Decapoda) on the Mediterranean coast of Turkey (Gulf of Antalya). *Riv. It. Acquacoltura*, **32**: 127-146.
- MARTIN J.W., DAVIS G.E. (2001) - An updated classification of the recent Crustacea. *Nat. Hist. Mus. Los Angeles County, Sc. Ser.*, **39**: 1-124
- MUSSAT SARTOR R., PESSANI D. (2008) - Primi dati sul mero plancton dell'area di Khao Lak (Mare delle Andamane) dopo l'evento catastrofico del dicembre 2004. *Biol. Mar. Mediterr.*, **15**(1): 394-395.
- NEGREIROS-FRANSOZO M.L. (1996) - The zoea I of *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) (Decapoda, Portunidae) obtained in laboratory. *Nauplius*, **4**: 165-168.
- OZEL I. (1979) - Anomuran larvae (Decapoda, Crustacea) in plankton collection from cruises in the gulf of Izmir, Aegean coast of Turkey. *Rapp. Comm. Int. Mer Méditerr.*, **25/26**(8): 147-148.
- PAYEN G.G. (1973) - Etude descriptive des principales étapes de la morphogenèse sexuelle chez un crustacé décapode à développement condensé, l'Ecrevisse *Pontastacus leptodactylus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). *Ann. Embryol. Morphol.*, **6**: 179-206.
- PESSANI D., ROBOTTI C.A. (1992) - Larvae of the Mediterranean Decapod Crustaceans: summary of the literature until 1988. *Oebalia*, suppl. **17**: 387-397.
- PESSANI D. (1975) - Ricerche sulle larve di Crostacei Decapodi nel golfo Tigullio (mar Ligure). *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova*, **43**: 41-62.
- PESSANI D. (1993) - Planktonic larvae of Natantia (Decapoda) in Tigullio Gulf (Ligurian Sea), with remarks on larvae of Pandalidae. *Crustaceana*, **65**(3): 309-317.
- PESSANI D., BURRI R., SALTON L. (1998) - A key for the identification of the known larval stages of the Mediterranean Brachyura. *Invert. Reprod. Develop.*, **33**: 191-199.
- PESSANI D., GIOVANARDI F., PERICOLI P. (1980) - Analysis of the phyto and zooplankton populations in waters polluted by the Augusta-Priolo industrial discharges, around the Magnisi Peninsula (East Sicily). *Ves Journées Etud. Pollutions*, C.I.E.S.M. Cagliari 1980: 831-840.
- PESSANI D., SALTON L. (1998) - Planktonic larval stages of Brachyura in the Gulf of Tigullio (Ligurian Sea, Italy). *Invert. Reprod. Develop.*, **33**: 201-208.
- PESSANI D., TIRELLI T., FLAGELLA S. (2004) - Key for the identification of the Mediterranean brachyuran megalopae. *Medit. Mar. Sci.*, **5** (2): 53-64.
- REGNAULT M. (1969) - Etude expérimentale de la nutrition d'*Hippolyte inermis* Leach (Decapoda Natantia) au cours de son développement larvaire, au laboratoire. *Internat. Rev. Ges. Hydrobiol.*, **54**: 749-764
- REVERBERI G. (1950) - La situazione sessuale di *Hippolyte viridis* e le condizioni che la reggono. *Boll. Zool. It.*, **4-6**: 91-94.
- RUNNSTRÖM S. (1925) - Beitrag zur Kenntnis einiger hermaphroditischen Dekapoden Crustaceen. *Bergens Mus. Skrift., Ny Raekke*, **3**(2): 1-115.
- SAGI A. (1988) - The androgenic gland in crustacea - with emphasis on the cultured freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* - A review. *Israeli J. Aquacult. - Bamidgeh*, **40**(1): 9-16.
- SANDIFER P.A. (1974) - Larval stages of the shrimp *Ogyrides limicola* Williams 1955 (Decapoda, Caridea) obtained in the laboratory. *Crustaceana*, **26**: 37-60.
-

-
- SANKARANKUTTY C., HONG S.Y., KIM K.B. (1999) - Description of laboratory reared first zoea of *Callinectes danae* (Crustacea, Decapoda, Portunidae). *Revista. Bras. Zool.*, **16**(suppl. 2): 45–49.
- SANTOS DOS A., GONZÁLES-GORDILLO J.I. (2004) - Illustrated keys for the identification of the Pleocyemata (Crustacea: Decapoda) zoeal stages, from the coastal region of south-western Europe. *J. Mar. Biol. Ass. UK*, **84**: 205-227.
- SANTOS DOS A., LINDLEY J.A. (2001) - Fiches d'identification du Plancton. Crustacea, Decapoda: larvae. II Dendrobranchiata (Aristeidae, Benthescymidae, Penaeidae, Solenoceridae, Sicyonidae, Sergestidae, and Luciferidae). *ICES, Identification Leaflets for Plankton*, **186**: 1-9.
- SCHRAM F.R. (1985) - Crustacean Issues. *Larval growth*. A.M. Wenner (ed.), University of California, Santa Barbara. A.A. Balkema/Rotterdam/boston. 236 pp.
- SCHRAM F.R. (1986) - *Crustacea*. Oxford University Press. 606 pp.
- TERADA M. (1980) - The zoeal development of *Ovalipes punctatus* (De Haan) (Brachyura, Portunidae) in the laboratory. *Proc. Japan. Soc. Syst. Zool.*, **9**: 24–33.
- THESSALOU M. (1979) - Preliminary report on the larvae of Decapod Crustacea from Pagassitikos Gulf, Greece. *Rapp. Comm. Int. Mer Médit.*, **25/26**(8): 145-146.
- THIRIOT A. (1974) - Larves de Décapodes Macrura et Anomura, espèces européennes; Caractères morphologiques et observations écologiques. *Thalassia Jugosl.*, **10**: 341-378.
- WEAR RG., FIELDER, D.R. (1985) - The marine fauna of New Zealand: larvae of the Brachyura (Crustacea, Decapoda). *N. Z. Ocean. Inst. Mem.*, **92**: 1–89.
- WILLIAMSON D.I. (1967) - On a collection of planktonic decapoda and stomatopoda (Crustacea) from the Mediterranean coast of Israel. *Bull. Sea Fish. Res. Stn. Israel* **45**:1-64.
- WILLIAMSON D.I. (1969) - Names of larvae in the Decapoda and Euphausiacea. *Crustaceana*, **16**: 210-213.
- WILLIAMSON D.I. (1982) - Larval morphology and diversity. In: Abele L.G. (ed). *The biology of Crustacea. Vol 2, Embriology, Morphology and Genetics*, Academic Press, New York and London: 43-110.
- WILLIAMSON D.I. (1988) - Evolutionary trends in larval forms. In: Fincham A.A., Rainbow P.S. (eds) *Aspects of Decapod Crustacean Biology*. Symposia of the Zoological Society of London 59. Oxford University Press, Oxford: 11-25.
- WILLIAMSON H.C. (1915) - Crustacea Decapoda Larven. In: Brandt K., Apstein C. (eds), *Nordisches plankton*. Vol VI. Kiel und Leipzig Verlag von Lipsius e Tischer: 588 pp.
- ZUPO V., MESSINA, P., BUTTINO, I., SAGI, A., AVILA, C., NAPPO, M., BASTIDA, J., CODINA, C., ZUPO, S. (2007) - Do benthic and planktonic diatoms produce equivalent effects in crustaceans? *Mar. Freshw. Behav. Physiol.*, **40**(3): 1-13.
- ZUPO V. (1994) - Strategies of sexual inversion in *Hippolyte inermis* Leach (Crustacea Decapoda) from a Mediterranean seagrass meadow. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **178**: 131-145.
- ZUPO V. (2000) - Effect of microalgal food on sex reversal of *Hippolyte inermis* (Crustacea Decapoda). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **201**: 251-259.
- ZUPO V. (2001) - Influence of diet on sex differentiation of *Hippolyte inermis* Leach (Decapoda: Natantia) in the field. *Hydrobiologia*, **449**: 131-140.
- ZUPO V., BUTTINO I. (2001) - Larval development of decapod crustaceans investigated by confocal microscopy. *Mar. Biol.*, **138**: 965-973.
- ZUPO V., MESSINA P. (2007) - How do dietary diatoms cause the sex reversal of the shrimp *Hippolyte inermis* Leach (Crustacea, Decapoda). *Mar. Biol.*, **151**: 907-917.
- ZUPO V., MESSINA P., CARCATERRA A., AFLALO E.D., SAGI A. (2008) - Experimental evidence of a sex reversal process in the shrimp *Hippolyte inermis*. *Invert. Reprod Develop.*, **52**(1–2): 93–100.

CAPITOLO 49. PRODUZIONE ED ALLEVAMENTO DI LARVE DI CIRRIPEDI: *BALANUS AMPHITRITE* COME SPECIE MODELLO

M. Faimali, F. Garaventa

marco.faimali@ismar.cnr.it

49.1 INTRODUZIONE

La possibilità di ottenere diverse generazioni di Cirripedi (prevalentemente balani) in condizioni controllate di laboratorio ha stimolato, fino dalla metà dello scorso secolo, il loro utilizzo come organismi modello in studi attinenti a discipline estremamente eterogenee (protezione dei materiali, ecologia, neurofisiologia, ecotossicologia, etologia, ecc. ecc).

Attualmente, effettuando una semplice ricerca nella banca dati online “Web of Science”, di lavori pubblicati che riguardino le cinque principali specie di Balani presenti anche nel Mediterraneo (*Balanus amphitrite*, *B. perforatus*, *B. trigonus*, *B. eburneus* e *B. improvisus*), emerge come la specie maggiormente studiata ed utilizzata sia *B. amphitrite* (77% dei lavori pubblicati) che, a seguito di una revisione filogenetica (Pitombo, 2004), ha recentemente cambiato nome in *Amphibalanus amphitrite*.

Questo crostaceo sessile è una specie dominante tra gli organismi del fouling ed ha una distribuzione cosmopolita (Desai *et al.*, 2006); esso viene prevalentemente allevato ed utilizzato come organismo modello per l'esecuzione, in laboratorio, di test di efficacia (*settlement test*) nel settore delle tecnologie antifouling (vedere le più recenti review sull'argomento Terlizzi *et al.*, 2002; Yebra *et al.*, 2004; Railkin, 2004; Chambers *et al.*, 2006). La facilità di ottenimento ed allevamento delle fasi larvali ha ultimamente ampliato il suo utilizzo anche come modello per studi dedicati alla standardizzazione di nuovi test ecotossicologici per il comparto marino (Wu *et al.*, 1997 a,b; Lam *et al.*, 2000; Magillo *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2005; Faimali *et al.*, 2006 a,b; Greco *et al.*, 2006; Choong *et al.*, 2006; Faimali *et al.*, 2007).

Per questi motivi, considerando che le metodologie di allevamento delle diverse specie di balani sono abbastanza simili (Geraci e Romairone, 1990), il presente capitolo analizzerà nel dettaglio tutte le fasi metodologiche per l'allevamento in condizioni controllate di *B. amphitrite* (= *Amphibalanus amphitrite*) come modello operativo per la produzione e allevamento di larve di Cirripedi.

49.2 DESCRIZIONE DELL'ORGANISMO

Come già detto in precedenza, *Balanus amphitrite*, insieme a *B. perforatus*, *B. trigonus*, *B. eburneus* e *B. improvisus*, costituisce una delle principali specie di Cirripedi presenti nel Mar Mediterraneo. L'ambiente in cui vive è costituito principalmente da zone antropizzate, in quanto tale specie è in grado di tollerare elevati valori di nitrati, nitriti, ammoniaca, fosfati ed un basso contenuto di ossigeno disciolto dovuto agli scarichi urbani ed industriali.

Presenta un'ampia distribuzione geografica; infatti si ritrova lungo tutta la costa mediterranea europea, nei porti della costa atlantica, con limite situato presso il parallelo 47° N, e nel Mar Nero.

Nelle acque italiane è possibile rinvenirlo dal limite superiore della fascia infralitorale fino a circa 65 - 70 metri di profondità.

B. amphitrite appartiene ai Cirripedi detti opercolati cioè individui sessili sprovvisti di peduncolo e dal corpo protetto da un guscio costituito generalmente da tre parti: la base, la muraglia e l'apparato opercolare. Per una descrizione dettagliata della Classe e della Specie in oggetto si rimanda a Relini, 1980. Molto interessante può essere anche consultare la Monografia di Charles Darwin del 1854 disponibile sul sito web <http://darwin-online.org.uk/contents.html>.

Le placche opercolari sono le uniche mobili, le altre costituiscono un complesso piuttosto rigido. Le piastre principali sono: scuta, tergo, rostro e carena. Il guscio ha forma conica o tubuloso-conica ed è caratterizzato da striature longitudinali di colore bianco, rosa o porpora (Fig. 1).

La base può raggiungere, nei mari italiani, un diametro massimo di 18 - 20 mm. L'opercolo ha scuta munite di una banda trasversale colorata e percorse da coste, anch'esse trasversali, e terga che presentano uno sperone di dimensioni variabili. L'apertura opercolare, più grande rispetto alle altre specie, ha forma approssimativamente romboidale.

All'interno di questa struttura il corpo del balano adulto è ripiegato all'indietro con un angolo di 90° rispetto al punto di unione tra capo e corpo; in tal modo, le appendici toraciche, denominate cirri, si trovano rivolte verso l'alto permettendo una più efficace cattura del cibo.



Fig. 1 - Esemplari adulti di *Balanus amphitrite* - allevamento in condizioni controllate di laboratorio.

L'alimentazione è di tipo microfago: avviene per filtrazione di particelle alimentari in sospensione e di piccoli organismi. Le sei paia di cirri sono munite di lunghe setole utilizzate per creare una corrente alimentare che convoglia gli alimenti verso la bocca, situata sul cono orale davanti al primo paio di cirri. I cirri vengono utilizzati anche per la respirazione, in quanto questi animali non presentano vere e proprie branchie. Il movimento delle parti mobili è assicurato da muscoli, tra i quali assumono grande importanza quelli opercolari.

Il corpo può essere suddiviso in due regioni: una cefalica e una toracica. Di questa ultima la parte anteriore è predominante, in quanto il pleon è molto ridotto.

La segmentazione è appena accennata e negli adulti mancano le antenne, le antennule ed il cuore.

La riproduzione di *B. amphitrite* è di tipo ermafrodita; anche se si osservano casi di autofecondazione in individui isolati, la fecondazione generalmente è incrociata. Affinché questo avvenga la temperatura deve essere preferibilmente compresa tra i 22 e i 32 °C, e soprattutto non essere inferiore ai 17 - 18 °C (Geraci e Romairone, 1990).

Gli embrioni vengono incubati nella cavità del mantello all'interno di sacche ovigere. Lo stadio di schiusa è una larva nauplius, facilmente riconoscibile per la forma a scudo del carapace triangolare. Il primo stadio di crescita è molto breve e si sviluppa ancora all'interno dell'organismo adulto (Fig. 2a); normalmente infatti le larve, quando vengono emesse, si trovano al secondo stadio (Fig. 2b). A questo livello di sviluppo il *B. amphitrite* ha dimensioni di 270 × 140 µm.

Una volta emesse nell'ambiente, le larve proseguono lo sviluppo, mediante mute, attraverso altri quattro stadi naupliari (Fig. 2c-f) riconoscibili principalmente in base alle dimensioni dell'individuo ed alle caratteristiche delle antennule e delle spine addominali (Fig. 3; modificata da Geraci e Romairone, 1986).

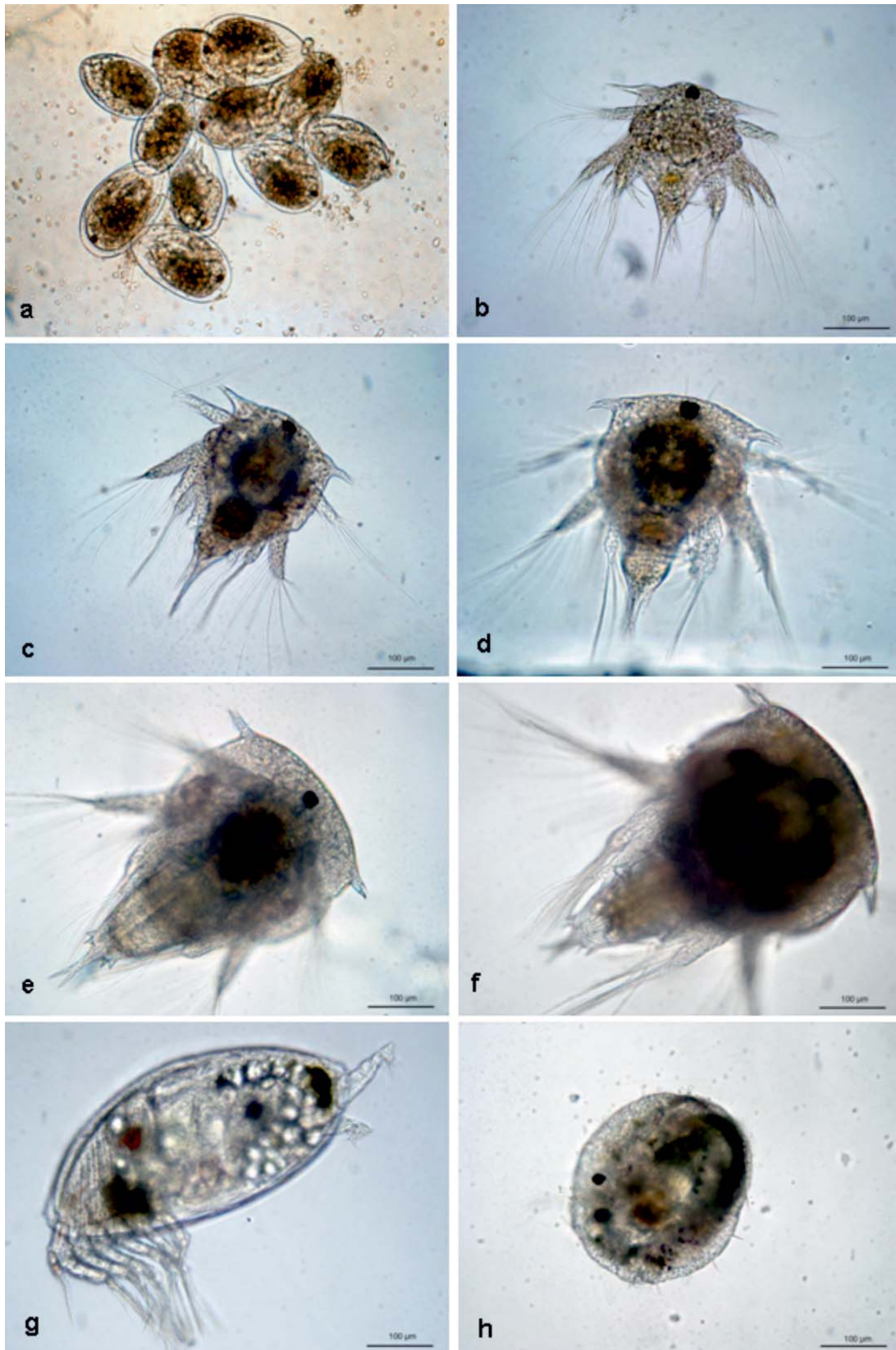


Fig. 2 - Fasi larvali di *Balanus amphitrite*: a) nauplii stadio I; b) nauplio stadio II; c) nauplio stadio III; d) nauplio stadio IV; e) nauplio stadio V; f) nauplio stadio VI; g) Cypris; h) larva cypris immediatamente dopo la metamorfosi ed insediamento.

Mediante verifiche di laboratorio si è osservato che, nel passaggio tra uno stadio naupliare ed il successivo, avviene una drastica riduzione degli individui, che può assumere valori anche dell'80%; le massime perdite si riscontrano durante la muta dal secondo al terzo stadio.

All'ultimo dei sei stadi naupliari segue una larva cypris, il cui corpo è completamente racchiuso in un carapace bivalve e possiede sei paia di appendici toraciche (Fig. 2g).

Durante questo stadio l'individuo non si alimenta (Barnes, 1985) e, dopo un periodo di tempo che può variare da poche ore a più settimane, si fissa al substrato (Fig. 2h) con il secreto delle ghiandole del cemento poste sulle prime antenne. Tale secreto, oltre a questa funzione, sembra avere anche carattere di feromone, in quanto la sua presenza induce l'insediamento di altri cypris conspecifici (Clare *et al.*, 1994). La scelta del substrato può essere influenzata da vari fattori tra i quali l'illuminazione, la profondità, la posizione, la scabrosità e la presenza del biofilm (Henschel e Cook, 1990; Wiczorek *et al.*, 1995; Faimali *et al.*, 2004). Durante la metamorfosi i cirri si allungano, il corpo si flette e compaiono i primordi delle piastre dell'esoscheletro, che giace sotto le vecchie valve del cypris.

Gli individui che sopravvivono all'elevato tasso di mortalità del periodo immediatamente successivo all'insediamento vivono dai due ai sei anni.

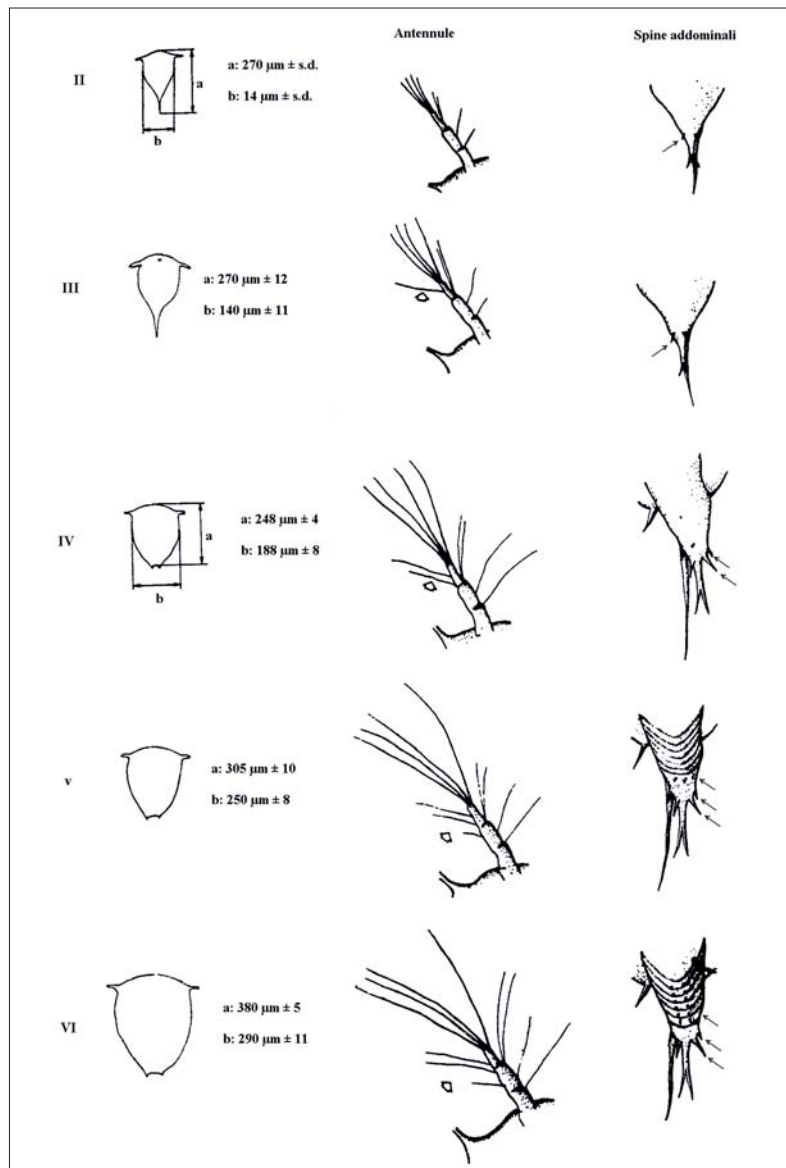


Fig. 3 - Tavola di riferimento per il riconoscimento delle fasi naupliari di *Balanus amphitrite* mediante osservazione al microscopio. Per ogni stadio naupliare sono riportate le principali caratteristiche morfologiche (dimensioni, antenne e spine addominali) necessarie per la loro classificazione (modificato da Geraci e Romairone, 1986).

49.3 ALLEVAMENTO DEGLI ORGANISMI ADULTI

49.3.1 Campionamento degli organismi

Gli individui adulti di questa specie sono facilmente reperibili su gran parte dei substrati artificiali utilizzati in ambito portuale. Quando si effettua un campionamento, i balani devono essere rimossi dal substrato mantenendo la base intatta. Infatti, la presenza in coltura di organismi con la base non integra determina una elevata percentuale di mortalità nei primi giorni di acclimatazione e allevamento. Generalmente è molto difficile recuperare individui intatti da substrati naturali sui quali l'adesione del cemento della porzione basale risulta essere molto forte. Per evitare questo inconveniente bisogna selezionare substrati a bassa rugosità in grado di consentire un distacco non traumatico degli organismi. La nostra esperienza insegna che i substrati artificiali più idonei sono le cime, il materiale plastico, le carene delle imbarcazioni, i galleggianti dei pontili, tutti facilmente reperibili in ambito portuale. Chiaramente, sarebbe possibile ovviare a questi problemi immergendo in mare pannelli o strutture di materiale idoneo disponendo così di una stazione di reperibilità continua avendo cura però di rimuovere costantemente, dai substrati utilizzati come collettori, le altre specie che inevitabilmente si insedieranno. Un'ulteriore possibilità di raccolta deriva dall'opportunità di sfruttare l'elevato insediamento sulle strutture portuali di mitili (*Mytilus galloprovincialis*) sulle cui valve è frequente la presenza di balani. In questo caso, dal momento che risulta estremamente difficoltoso rimuoverli dalle valve dei molluschi mantenendo intatta la base, è conveniente tagliare, con l'ausilio di un tronchese, i tratti di valva sui quali essi sono insediati. Per disporre di individui prossimi all'emissione di naupli, si consiglia di raccogliere balani di almeno 5 mm di diametro basale.

Gli individui campionati possono essere trasportati a secco in laboratorio, se questo può essere raggiunto in giornata, altrimenti per trasporti di maggior durata gli organismi possono essere avvolti in cotone o stracci imbevuti d'acqua di mare.

49.3.2 Allestimento e mantenimento degli allevamenti

Una volta giunti in laboratorio, dal materiale campionato, è necessario selezionare e separare (*sorting*) gli organismi appartenenti alla specie *Balanus amphitrite*. In questa fase è essenziale eliminare tutti gli organismi danneggiati (avendo cura soprattutto di togliere i residui delle loro parti molli) e quindi pulire accuratamente le piastre calcaree in modo da rimuovere gli eventuali epibionti. A tale scopo si possono usare comuni spazzolini da denti. Gli individui così trattati vengono successivamente posti in grossi cristallizzatori o vasche di plastica contenenti acqua di mare filtrata su carta bibula alla temperatura ed alla salinità dell'ambiente di raccolta mantenuta vigorosamente aerata. In questa fase, è opportuno che il volume d'acqua non sia inferiore a 50 ml per individuo. Il giorno successivo si effettua il cambio dell'acqua dei recipienti e si controllano tutti gli individui, eliminando quelli morti nelle 24 ore precedenti.

In seguito, le condizioni di mantenimento vengono gradualmente portate a quelle standard di allevamento. Questa operazione, che risulta essere particolarmente importante nei mesi invernali ed estivi, viene effettuata ad intervalli di tempo regolari, variando la temperatura ed eventualmente la salinità, in modo da permettere agli organismi una graduale acclimatazione. I cambi d'acqua vanno eseguiti ogni giorno fino a quando, nelle popolazioni in acclimatazione, la mortalità non si sia ridotta a zero.

Terminato il periodo di acclimatazione, gli organismi vengono suddivisi in lotti da 40/50 individui e posti in beaker da 1000 ml, contenenti 800 ml di acqua di mare naturale filtrata a 0,45 µm; i beaker vengono quindi posti in un ambiente termostato dotato di lampade a luce bianca attorno ai 1400 lux con un fotoperiodo 16h:L - 8h:B (L = luce; B = buio) e mantenuti vigorosamente aerati con aria prefiltrata a 0,22 µm.

Sebbene *B. amphitrite* sia una specie eurialina ed euriterma (Qiu e Qian, 1999), i risultati da noi ottenuti dopo molti anni di allevamento in continuo suggeriscono di mantenere l'acqua ad una salinità corretta a 37‰ e ad una temperatura di $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ quando si voglia allevare gli organismi per lunghi periodi. Nel caso di allevamenti intensivi di breve periodo, la temperatura può essere portata a 25 - 30 °C in modo da aumentare la frequenza di emissione delle larve e diminuire la durata del tempo di sviluppo embrionale.

Il mantenimento della coltura necessita di assidui interventi da parte degli operatori; ogni 48 ore, dopo aver rimosso l'acqua di allevamento dai beaker, i balani vengono risciacquati con cura, controllati e ripuliti da eventuali epibionti eliminando gli organismi morti e, quindi, mantenuti a secco per 30 - 40 minuti. Dopo questo periodo di tempo viene nuovamente aggiunta acqua di mare con le stesse caratteristiche; i beaker vengono quindi lasciati per qualche ora a temperatura ambiente (del laboratorio) in modo tale da stimolare, grazie agli "shock" dovuti alle operazioni di pulitura (esposizione all'aria e rinnovo dell'acqua) l'emissione delle larve.

Prima di essere nuovamente riposti nella camera termostatica, gli organismi adulti vengono alimentati fornendo una dieta mista costituita da organismi vivi (fitoplancton e zooplancton).

49.3.3 Alimentazione degli adulti

Dalla letteratura emerge che gli organismi adulti di questa specie vengono alimentati somministrando ogni due giorni, in concomitanza del rinnovo del mezzo di coltura, nauplii appena schiusi di *Artemia salina* e una dose mono o plurispecifica di microalghe. Per quanto riguarda il quantitativo di nauplii somministrati, pochi sono gli autori che forniscono informazioni precise anche se, recentemente, alcuni dati sperimentali (Desai *et al.*, 2006) dimostrano come, in una serie di allevamenti a 20 - 25 - 30 °C, il numero di larve prodotte dagli adulti di *Balanus amphitrite* sia, indipendentemente dalla temperatura, accettabile (tra le 500 e 1500 larve per ogni singola emissione larvale) somministrando almeno 50 nauplii di *A. salina* appena schiusi per individuo al giorno, anche se il maggior numero di larve di *B. amphitrite* sono state ottenute a 30 °C con un regime di 200 nauplii di *A. salina* per individuo al giorno. Anche le informazioni sulla concentrazione delle differenti specie algali utilizzate nella dieta degli organismi adulti viene spesso omessa (Tab. 1).

Nei nostri allevamenti gli adulti vengono alimentati ogni 48 ore mediante somministrazione di opportune aliquote di *Tetraselmis suecica* e nauplii di *A. salina* in modo da raggiungere rispettivamente, nei beaker di allevamento degli adulti, le concentrazioni di 5×10^5 cellule \times ml⁻¹ e 20 - 25 larve \times ml⁻¹.

Tab. 1 - Specie algali utilizzate nella dieta per l'allevamento in laboratorio degli adulti di *Balanus amphitrite*.

Specie	Concentrazione	Riferimento
<i>Skeletonema costatum</i>	-	Qiu e Qian, 1999
<i>Tetraselmis suecica</i>	5×10^5 cell. ml ⁻¹	Faimali <i>et al.</i> , 2004, 2005, 2006a,b;
	Greco <i>et al.</i> , 2006	
<i>Isochrysis galbana</i>	-	Burgess <i>et al.</i> , 2003
<i>Chaetoceros gracilis</i>	-	Satuito <i>et al.</i> , 1997
<i>Chaetoceros gracilis</i> e <i>Isochrysis galbana</i>	-	O'Connor e Richardson, 1998

49.4 ALLEVAMENTO DELLE FASI LARVALI

49.4.1 Ottenimento delle larve

Nel giro di poche ore, a partire dal momento in cui gli adulti vengono posti a temperatura ambiente durante le operazioni di mantenimento dell'allevamento (vedi paragrafo precedente), si ottiene l'emissione delle larve al secondo stadio naupliare (Fig. 2b). La raccolta delle larve avviene posizionando il beaker

contenente gli adulti in corrispondenza di un fascio luminoso sfruttando così il fototattismo positivo larvale, in modo da poter raccogliere i nauplii più facilmente con l'utilizzo di una pipetta Pasteur.

Le larve così prelevate vengono poste in un beaker da 500 ml su cui viene annotata la data dell'emissione. Le operazioni di raccolta devono essere eseguite velocemente per evitare che le larve vengano catturate dagli adulti. Larve emesse nella stessa fascia oraria ma provenienti da adulti diversi, vengono poste nello stesso beaker; il materiale raccolto contiene quindi individui omogenei per età ma con una buona variabilità genetica.

49.4.2 Allevamento delle larve

Da esperienze di laboratorio si è osservato che la densità ideale, per avere un buon sviluppo di tutti gli stadi naupliari e ottenere lo stadio finale cypris, è di circa 20 larve per ml d'acqua. Per questo motivo, al termine della raccolta dei naupli, occorre effettuare una stima della densità degli individui all'interno dei beaker di raccolta. Si preleva un campione di 300 μ l, dopo aver resa omogenea la distribuzione delle larve nel recipiente, e si compie un conteggio degli individui presenti, quindi, con una semplice proporzione si calcola la densità dell'intero contenitore. Successivamente, conoscendo questo valore, si possono diluire le larve fino alla densità desiderata. Qualora siano state raccolte molte larve, utilizzando più beaker, l'operazione precedente deve essere ripetuta per ogni singolo contenitore.

I nauplii vengono quindi filtrati, attraverso un filtro con maglie da 80 μ m, in modo da poter essere trasferiti in beaker alla giusta densità, con acqua filtrata 0,22 μ m addizionata di Cloramfenicolo (10 mg l⁻¹); l'utilizzo dell'antibiotico limita un eventuale accrescimento di batteri e protozoi, che sarebbe dannoso per le giovani larve. Inoltre, è necessario fornire alle larve una leggera aerazione utilizzando tubetti in silicone con terminale in vetro del diametro di 1,2 mm collegata ad un aeratore fornito di filtro per l'aria da 0,22 μ m. Le condizioni di allevamento vengono mantenute costanti all'interno di un armadio termostato ad una temperatura variabile da 20 a 28 °C \pm 0,5 a seconda di quanto si desideri rapido lo sviluppo e delle prove che si intendono eseguire. Il fotoperiodo, a parte qualche caso particolare, viene mantenuto generalmente a 12h:L - 12h:B. In queste condizioni solitamente, se allevate a 20 °C, le larve impiegano circa 10 - 12 giorni per completare lo sviluppo naupliare ed arrivare all'ultima fase insediante (stadio cypris); il periodo di tempo si dimezza se allevate a 28 °C.

Il controllo della coltura, il cambio dell'acqua e l'alimentazione vengono effettuati ogni 48 ore in concomitanza del rinnovo delle colture di adulti. Per effettuare il rinnovo dell'acqua è necessario raccogliere le larve, concentrandole nei beaker di allevamento sfruttando un fascio luminoso e trasferirle, momentaneamente, utilizzando una pipetta Pasteur, in un nuovo recipiente. Questa operazione consente l'eliminazione dei pellet fecali, dell'eventuale cibo residuo e delle mute naupliari, dette più propriamente exuvie. Le larve così trasferite vengono filtrate su filtro da 80 μ m e quindi riportate nel beaker di coltura mediante risospensione con acqua di mare filtrata a 0,22 μ m più cloramfenicolo (10 mg l⁻¹).

Durante le operazioni di mantenimento dell'allevamento, è necessario verificare l'eventuale presenza di larve allo stadio cypris (Fig. 2g). Infatti, trascorsi circa 6 - 12 giorni (in base alla temperatura) dalla raccolta delle larve emesse dagli adulti, generalmente si osserva la presenza di nauplii al VI stadio pronti a metamorfosare nella fase insediante (cypris). La presenza di larve cypris può essere rilevata puntando un fascio di luce sul beaker da monitorare e osservando lo spostamento verso la fonte luminosa (fototattismo positivo) delle larve; i cypris infatti mostrano traiettorie di nuoto diverse da quelle dei nauplii; queste ultime sono curvilinee mentre quelle dei cypris sono riconducibili ad una linea spezzata. La separazione nauplii/cypris avviene con l'ausilio di tre filtri montati in sequenza decrescente, con maglie da 300, 200 e 150 μ m. I cypris vengono trattenuti dal filtro con maglia più fine, mentre i naupli rimangono intrappolati nei primi due filtri.

Le larve vengono risciacquate dai rispettivi filtri e trasferite nuovamente in beaker separati, utilizzando acqua filtrata 0,22 μ m con aggiunta di cloramfenicolo (10 mg l⁻¹). I beaker contenenti i naupli vengono, dopo aver aggiunto l'alimento, ricollocati all'interno dell'armadio termostato, per essere

poi ricontrrollati, a cadenza giornaliera, per separare gli eventuali nuovi cypris presenti. Le larve cypris, pronte per l'insediamento, vengono invece raccolte in beaker da 250 ml e poste, senza alimento, in frigo ad una temperatura di 5 - 6 °C per 4 - 5 giorni in attesa del loro eventuale utilizzo (Rittschoff *et al.*, 1992) per i test di insediamento (*settlement test*) o per ottenere una seconda generazione di organismi adulti in laboratorio. La procedura di invecchiamento delle larve cypris (*5 days-old cyprids*) mediante condizionamento termico (Rittschhof *et al.*;1984) consente l'ottenimento di popolazioni larvali con una spiccata ed omogenea predisposizione all'insediamento rispetto alle larve appena metamorfosate.

49.4.3 Alimentazione delle fasi larvali

Nella tabella 2 vengono sintetizzate le diverse tipologie di dieta algale riportate dalla letteratura riguardante lo sviluppo larvale di *Balanus amphitrite* in laboratorio.

Presso il nostro laboratorio viene solitamente somministrata, ogni 48 ore, una dieta algale monospecifica a base di *Tetraselmis suecica*. Opportune aliquote di coltura algale in crescita vengono somministrate in modo da ottenere, nei beaker di allevamento, la concentrazione finale di 5×10^5 cell. ml⁻¹

Tab. 2 - Specie algali utilizzate nella dieta per l'allevamento in laboratorio delle fasi larvali di *Balanus amphitrite*.

Specie	Concentrazione	Riferimento
<i>Skeletonema costatum</i>	-	Qiu e Qian, 1999
	2×10^5 cell. ml ⁻¹	Hellio <i>et al.</i> , 2004; Desai <i>et al.</i> , 2006
	1×10^5 cell. ml ⁻¹	Anil <i>et al.</i> , 1995; Thiyagarajan <i>et al.</i> , 2002a
	2×10^6 cell. ml ⁻¹	Wu <i>et al.</i> , 1997a
<i>Skeletonema costatum</i> / <i>Chaetoceros gracilis</i>	$2,5 \times 10^5$ cell. ml ⁻¹	Thiyagarajan <i>et al.</i> , 2002b
<i>Chaetoceros calcitrans</i>	2×10^5 cell. ml ⁻¹	Desai <i>et al.</i> , 2006
	-	Kawahara <i>et al.</i> , 1999
<i>Chaetoceros gracilis</i>	$1-2 \times 10^5$ cell. ml ⁻¹	Anil <i>et al.</i> , 2001
	2×10^5 cell. ml ⁻¹	Satuito <i>et al.</i> , 1997; Matsumura <i>et al.</i> , 1998
	5×10^5 cell. ml ⁻¹	Thiyagarajan <i>et al.</i> , 2002b
<i>Chaetoceros gracilis</i> / <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Isochrysis galbana</i> / <i>Thalassiosira weissflogi</i>	1×10^5 cell. ml ⁻¹	Qiu <i>et al.</i> , 2005
	-	O'Connor e Richardson, 1998
	-	Burgess <i>et al.</i> , 2003
<i>Tetraselmis suecica</i>	5×10^5 cell. ml ⁻¹	Faimali <i>et al.</i> , 2004, 2005, 2006a,b; Greco <i>et al.</i> , 2006
<i>Monochrysis lutheri</i> / <i>Tetraselmis suecica</i>	1-2 / $4-5 \times 10^6$ cell. ml ⁻¹	Geraci e Romairone, 1990

49.5 OTTENIMENTO DELLA SECONDA GENERAZIONE DI ADULTI

49.5.1 Insediamento in laboratorio

Utilizzando la larva lecitotrofica cypris, ultimo stadio della fase planctonica del ciclo vitale di *Balanus amphitrite*, è possibile ottenere in laboratorio in poco più di due mesi, una seconda generazione di adulti in grado di riprodursi.

Generalmente, questa larva compie una prima fase di esplorazione, che può anche durare molto tempo, finalizzata alla selezione dell'appropriato substrato sul quale iniziare il processo di insediamento (Crisp, 1984; Walker *et al.*, 1987). Durante questo processo la larva non si nutre ma utilizza una riserva di energia (*cyprids' major protein: CMP*) tipica di questo stadio (Satuito *et al.*, 1996; Shimizu *et al.*, 1996). Dopo una sequenza di contatti reversibili con il substrato (*settlement phase*) la larva, a causa di una complessa interazione di stimoli (fisici, chimici e biologici), si insedia definitivamente (*attachment phase*) creando un legame irreversibile con il substrato e, successivamente, mediante il processo di metamorfosi, si trasforma nel giovane organismo sessile (Fig. 2h) che aderisce al substrato mediante la produzione del cemento da parte di due ghiandole specializzate (Walker, 1971; Okano *et al.*, 1996).

Per ottenere la seconda generazione di adulti, dopo aver raccolto e condizionato le larve cypris, come precedentemente descritto, esse vengono suddivise in lotti di alcune centinaia di individui, in scatole petri da 90 mm di diametro riempite con acqua filtrata a 0,22 μm . Le scatole petri così preparate vengono mantenute ad una temperatura di 28 °C che consente di ottenere delle elevate percentuali di insediamento entro le 72 ore di incubazione. Generalmente dopo questo periodo di tempo si ottiene un insediamento di giovani organismi attorno al 70%.

49.5.2 Allevamento dei giovani insediati

Successivamente, le petri sulle quali si sono insediati i giovani balani, vengono collocate singolarmente all'interno di beaker di vetro da 1000 ml contenenti 800 ml di acqua di mare (filtrata a 0,45 μm con salinità controllata al 37‰) e quindi posti alle stesse condizioni di allevamento degli organismi adulti. Durante il primo mese, i giovani organismi metamorfosati vengono alimentati solo con le alghe unicellulari planctoniche (*Tetraselmis suecica* alla concentrazione di $3 - 5 \times 10^5$ cell. ml^{-1}) mentre, a partire da una dimensione del disco basale di circa 5 mm, si passa alla stessa dieta mista degli adulti (*T. suecica* e nauplii di *Artemia salina*). Man mano che gli organismi si accrescono, è necessario ridurne il numero cercando di ottenere una densità finale attorno ai 50 individui per petri avendo cura di selezionare gli individui insediati il più vicino tra di loro. Questo accorgimento aumenterà le possibilità di fecondazione incrociata e di conseguenza la frequenza e la produzione larvale. Solitamente in queste condizioni è possibile ottenere le prime emissioni di larve dopo solo 70 giorni (Fig. 4).

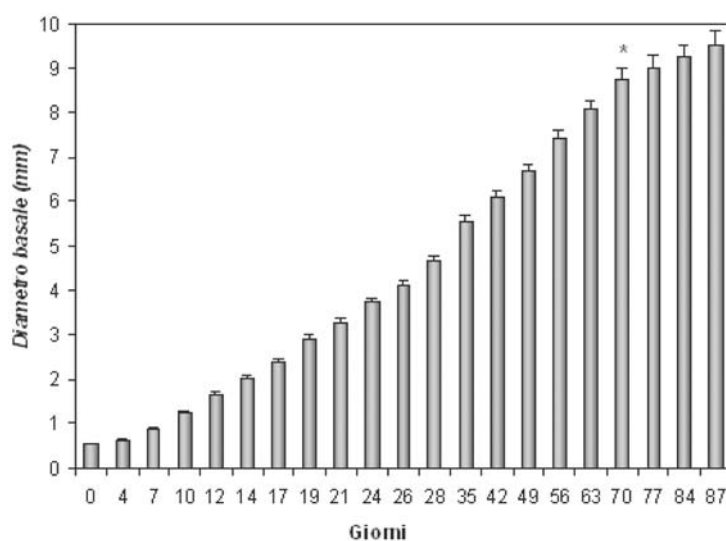


Fig. 4 - Esempio di crescita di esemplari di *Balanus amphitrite* in condizioni controllate di laboratorio ($m \pm es$; $n = 15$). L'asterisco indica il raggiungimento della maturità sessuale (prima emissione di larve).

49.6 ALLEVAMENTO DELLE SPECIE UTILIZZATE PER L'ALIMENTAZIONE

49.6.1 Coltura di *Tetraselmis suecica* per alimentazione

Queste prasinoficee, sono alghe unicellulari mobili di dimensioni comprese tra 10 e 20 μm , hanno forma rettangolare con lati tondeggianti (Csernok, 1981). La cellula è caratterizzata dalla presenza di quattro flagelli e di una teca, costituita da scaglie, che ricopre la superficie esterna priva di parete cellulare; è dotata di un unico cloroplasto. La riproduzione avviene per divisione cellulare con la formazione di due cellule figlie, originariamente sprovviste di flagelli, prima contenute all'interno della teca e successivamente liberate. *Tetraselmis suecica* è un'alga cosmopolita, è poco sensibile alle variazioni di salinità e pH, e vive anche in acque inquinate. In coltura può raggiungere concentrazioni di $3 - 6 \times 10^6$ cell. ml^{-1} a temperature di 20 °C; a temperature superiori ai 22 °C l'alga tende ad incistarsi e precipitare.

Per dare inizio ad una coltura di queste microalghe si prelevano dai ceppi, base per gli inoculi, circa 10 ml di coltura monospecifica e si portano a volume in beute da 750 ml utilizzando acqua di mare con salinità corretta al 37‰, filtrata su membrana Millipore da 0,22 μm ed arricchita con terreno di coltura Walne (Walne, 1970).

Le beute, contenenti le popolazioni algali, vengono conservate in camera termostata ad una temperatura di 20 °C \pm 0,5; l'illuminazione è fornita da tubi fluorescenti al neon da 30 Watt e lampade Osram-fluora da 18 Watt con un fotoperiodo 16h:L-8h:B. Nelle colture algali è importante che venga fatta gorgogliare aria affinché sia garantita l'ossigenazione e, attraverso il movimento del mezzo di coltura, sia impedita la sedimentazione delle cellule.

Le colture algali, prima di essere utilizzate come alimento per gli adulti e le larve, vengono meticolosamente analizzate per avere una stima quantitativa e qualitativa della popolazione ed individuare l'eventuale presenza di protozoi all'interno della stessa.

Il conteggio delle alghe viene eseguito al microscopio binoculare rovesciato mediante l'uso di un'apposita camera di conta (camera di Burkner); il metodo permette di riportare il numero di cellule contate a quelle presenti in 1 ml di coltura. Dopo l'utilizzo, le colture algali contenute nelle beute vengono riportate al volume iniziale per riportare la coltura nella fase di crescita.

Particolare attenzione deve essere messa nel compiere le operazioni fin qui descritte: è necessario che tutto il materiale utilizzato, puntali, vetreria, tubetti per l'aerazione, sia precedentemente autoclavato (sterilizzazione a 120 °C per 20 minuti), e passato in stufa (170 °C per circa mezz'ora, naturalmente solo nel caso della vetreria) e che questo venga maneggiato con cura, senza quindi toccare o inquinare in altro modo le parti che verranno a contatto con i ceppi, le colture o il terreno di coltura. Se si è riscontrata la presenza di protozoi, durante i controlli al microscopio, è necessario far ripartire la coltura prelevando un'aliquota di alghe da una coltura incontaminata oppure ripartire direttamente da un nuovo ceppo.

49.6.2 Ottenimento di *Artemia salina* per alimentazione

Artemia salina è un crostaceo usato come cibo vivo o congelato per i pesci d'acquario. L'organismo è reperibile in commercio sotto forma di cisti cioè di gastrula metabolicamente inattiva chiusa da un involucri. La qualità delle cisti, in termini di efficienza della schiusa, è legata alla loro provenienza. Le più conosciute ed usate sono quelle provenienti dal Gran Lago Salato nello stato dello Utah negli USA, altre sono quelle provenienti dalla Baia di San Francisco USA, oppure, meno usate, quelle provenienti dalla Cina o dalla Russia. L'efficienza di schiusa varia dal 95% per quelle della Baia di San Francisco, al 35- 40% per quelle provenienti dalla Russia che, per questo motivo hanno un costo nettamente inferiore. Altra caratteristica è la quantità di cisti contenute in un grammo di prodotto. Utilizzando artemie provenienti da San Francisco si arriva ad avere 350.000 cisti per grammo di prodotto, con quelle del Lago Salato 250.000 ed infine, facendo uso di quelle di qualità più scadente, si hanno circa 150 - 100.000

cisti g⁻¹. Le cisti vengono conservate in un contenitore ermetico ed asciutto in camera termostatica alla temperatura di 20 °C o, meglio ancora, in frigorifero.

Per ottenere il quantitativo di nauplii di *A. salina* necessario per l'alimentazione degli adulti di *Balanus amphitrite* è necessario porre ad incubare 1 grammo di cisti in beaker da 1000 ml, contenenti 800 ml di acqua di mare naturale (filtrata a 0,22 µm e a salinità corretta a 37‰) e mantenerli, vigorosamente aerati, alla temperatura di 28 °C con luce bianca attorno ai 1400 lux e fotoperiodo 16h:L - 8h:B.

Dopo poche ore, il processo di schiusa delle cisti ha inizio con la trasformazione della gastrula in un primo stadio di sviluppo denominato E1 durante il quale il pre-nauplio inizia il processo di estrusione dall'involucro della cisti, segue quindi lo stadio E2 in cui il pre-nauplio fuoriuscito dalla cisti rimane ancora attaccato alla membrana interna di questa e lo stadio E3 nel quale il pre-nauplio è avvolto da una membrana. Generalmente, trascorse 24 - 30 ore, termina il processo di schiusa delle cisti e i nauplii sono in grado di nuotare. Sfruttando il fototattismo larvale positivo, i nauplii possono essere facilmente raccolti e separati dalle cisti schiuse con una pipetta Pasteur dopo aver posizionato il beaker in prossimità di un fascio luminoso.

I nauplii così prelevati vengono trasferiti in un beaker da 500 ml, regolando la densità larvale a circa 200 ind. ml⁻¹ mediante opportuna diluizione con acqua di mare filtrata a 0,45 µm. Questo accorgimento consente di prelevare aliquote da 100 ml da fornire ai beaker degli organismi adulti di *B. amphitrite* ad una concentrazione di larve tale da fornire ad ogni balano adulto un numero di nauplii di artemia pari a 500 (considerando una media di 40 organismi adulti per ogni beaker).

49.7 BIBLIOGRAFIA

- ANIL A.C., CHIBA K., OKAMOTO K., KUROKURA H. (1995) - Influence of temperature and salinity on larval development of *Balanus amphitrite*: implications in fouling ecology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **118**: 159-166.
- ANIL A.C., DESAI D.V., KHANDEPARKER L. (2001) - Larval development and metamorphosis in *Balanus amphitrite* Darwin Cirripedia, Thoracica: significance of food concentration, temperature and nucleic acids. *J.E.M.B.E.*, **263**: 125-141.
- BARNES R.D. (1985) - I Crostacei. In: Milani R. (it. ed.), *Zoologia: gli invertebrati*. Piccin Nuova Libreria, Padova: 753-945.
- BURGESS J.G., BOYD K.G., ARMSTRONG E., JIANG Z., YAN L.M., BERGGREN M., MAY U., PISACANE T., GRANMO A., ADAMS D.R. (2003) - The development of a marine natural product-based antifouling paint. *Biofouling*, **19** (Supplement): 197-205.
- CHAMBERS L.D., STOKES K.R., WALSH F.C., WOOD R.J.K. (2006) - Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surf. Coat. Technol.*, **201**: 3642-3652.
- CHOONG A.M.F., TEO S.L.M., LEOW J.L., KOH H.L., HO P.C.L. (2006) - A preliminary ecotoxicity study of pharmaceuticals in the marine environment. *J. Toxicol. Environ. Health A*, **69** (21): 1959-1970.
- CRISP D.J. (1984) - Overview of research on marine invertebrate larvae, 1940-1980. In: Costlow J.D., Tipper R.C. (eds), *Marine Biodeterioration: an Interdisciplinary Study*. US Naval Institute Press, Maryland: 103-126.
- CLARE A.S., FREET R.K., McCLARY M. (1994) - On the antennular secretion of the cyprid of *Balanus amphitrite amphitrite*, and its role as a settlement pheromone. *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, **74**: 243-250.
- CSERNOK E. (1981) - Utilisation des engrais chimiques dans la culture de l'algue unicellulaire *Tetraselmis suecica* Kylin (Butch). *Cercet. Mar.*, **14**: 187-191.
- DESAI D.V., ANIL A.C., VENKAT K. (2006) - Reproduction in *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia: Thoracica): influence of temperature and food concentration. *Mar. Biol.*, **149**: 1431-1441.
- FAIMALI M., GARAVENTA F., TERLIZZI A., CHIANTORE M., CATTANEO-VIETTI R. (2004) - The interplay of substrate nature and biofilm formation in regulating *Balanus amphitrite* Darwin, 1854 larval settlement. *J.E.M.B.E.*, **306** (1): 37-50.
- FAIMALI M., GARAVENTA F., MANCINI I., SICURELLI A., GUELLA G., PIAZZA V., GRECO G. (2005) - Antisettlement activity of synthetic analogues of polymeric 3-Alkylpyridinium salts isolated from the sponge *Reniera sarai*. *Biofouling*, **21** (1): 49-57.
- FAIMALI M., GARAVENTA F., CHELOSSI E., PIAZZA V., SARACINO O.D., RUBINO F., MARIOTTINI G.L.,

-
- PANE L. (2006a) - A new photodegradable molecule as a low impact ballast water biocide: efficacy screening on marine organisms from different trophic levels. *Mar. Biol.*, **149**: 7-16.
- FAIMALI M., GARAVENTA F., PIAZZA V., MAGILLO F., GRECO G., CORRÀ C., GIACCO E., GALLUS L., FALUGI C. (2006b) - Swimming speed alteration of larvae of *Balanus amphitrite* as behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. *Mar. Biol.*, **149**: 87-96.
- FAIMALI M., GARAVENTA F., PIAZZA V., GRECO G., CORRÀ C., D'AMICO G. (2007) - Mortality, settlement inhibition and swimming speed alteration of larvae of *Balanus amphitrite* as acute, chronic and behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. *Biol. Mar. Mediterr.* **14** (1): 114-116.
- GERACI S., ROMAIRONO V. (1986) - Larval stages and *Balanus* (Cirripedia) settlement in a port environment with a key to naupliar stages of Tyrrhenian species. *Mar. Ecol. P.S.Z.N.I.*, **7** (2): 151-164.
- GERACI S., ROMAIRONO V. (1990) - Allevamento di larve di Cirripedi. *Nova Thalassia*, **11**: 213-217.
- GRECO G., CORRÀ C., GARAVENTA F., CHELOSSI E., FAIMALI M. (2006b) - Standardization of laboratory bioassays with *Balanus amphitrite* larvae for preliminary oil dispersants toxicological characterization. *Chem. Ecol.*, **22** (1): 163-172.
- HELLIO C., MARECHAL J.-P., VERON B., BREMER G., CLARE A.S., LE GAL Y. (2004) - Seasonal Variation of Antifouling Activities of Marine Algae from the Brittany Coast (France). *Mar. Biotechnol.*, **6**: 67-82.
- HENSCHEL J.R., COOK P.A. (1990) - The development of a marine fouling community in relation to the primary film of microorganisms. *Biofouling*, **2**: 1-11.
- KAWAHARA H., TAMURA R., AJIOKA S., SHIZURI Y. (1999) - Convenient assay for settlement inducing substances of Barnacles. *Mar. Biotechnol.*, **1**: 98-101.
- LAM P.K.S., WO K.T., WU R.S.S. (2000) - Effects of cadmium on the development and swimming behavior of barnacle larvae *Balanus amphitrite* Darwin. *Environ. Toxicol.*, **15** (1): 8-13.
- MAGILLO V., FAIMALI M., GERACI S. (2003) - Effect of cadmium chloride on the swimming behaviour of *Balanus amphitrite* (Crustacea: cirripedia) larvae. *Biol. Mar. Mediterr.*, **10** (2): 1014-1017.
- MATSUMURA K., MORI S., NAGANO M., FUSETANI N. (1998) - Lentil lectin inhibits adult extract-induced settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*. *J. Exp. Zool.*, **280**: 213-219.
- OKANO K., SHIMIZU K., SATUITO G.C., FUSETANI N. (1996) - Visualisation on cement exocytosis in the cypris cement gland of the Barnacle *Megabalanus rosa*. *J. Exp. Biol.*, **199**: 2131-2137.
- O'CONNOR N.J., RICHARDSON D.L. (1998) - Attachment of barnacle (*Balanus amphitrite* Darwin) responses to bacterial films and extracellular materials *J.E.M.B.E.*, **226**: 115-129.
- PITOMBO FB. (2004) - Phylogenetic analysis of the Balanidae (Cirripedia, Balanomorpha). *Zool Scr.*, **33**: 261-276.
- QIU J.-W., QIAN P.-Y. (1999) - Tolerance of the barnacle *Balanus amphitrite* to salinity and temperature stress: effect of previous experience. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **188**: 123-132.
- QIU J.-W., THIYAGARAJAN V., CHEUNG S., QIAN P.-Y. (2005) - Toxic effects of copper on larval development of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Mar. Poll. Bull.*, **51**: 688-693.
- RAILKIN A.I. (2004) - *Marine Biofouling: Colonization Processes and Defenses*. CRC Press LLC: 320 pp.
- RELINI G. (1980) - *Cirripedi toracici. Guide per il riconoscimento degli animali delle acque costiere a lagunari italiane*, 2 C.N.R., AQ/1/91: 116 pp.
- SATUITO C.G., SHIMIZU K., NATOYAMA K., YAMAZAKI M., FUSETANI N. (1996) - Age related settlement success by cyprids of the Barnacle *Balanus amphitrite*, with special reference to consumption of cyprid storage protein. *Mar. Biol.*, **127**: 125-130.
- SATUITO C.G., SHIMIZU K., FUSETANI N. (1997) - Studies on the factors influencing larval settlement in *Balanus amphitrite* and *Mytilus galloprovincialis*. *Hydrobiologia*, **358**: 275-280.
- SHIMIZU K., SATUITO C.G., SAIKAWA W., FUSETANI N. (1996) - Identification and partial characterization of vitellin from the barnacle *Balanus amphitrite*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, **115**: 111-119.
- TERLIZZI A., FRASCHETTI S., GIANGUZZA P., FAIMALI M., BOERO F. (2001) - Environmental impact of antifouling technologies: state of art and perspectives. *Aquat. Conserv.*, **11**: 311-317.
- THIYAGARAJAN V., HARDER T., QIAN P.-Y. (2002a) - Effect of the physiological condition of cyprids and laboratory-mimicked seasonal conditions on the metamorphic successes of *Balanus amphitrite* Darwin (Cirripedia; Thoracica) *J.E.M.B.E.*, **274**: 65-74.
- THIYAGARAJAN V., HARDER T., QIAN P.-Y. (2002b) - Relationship between cyprid energy reserves and metamorphosis in the barnacle *Balanus Amphitrite* Darwin (Cirripedia; Thoracica). *J.E.M.B.E.*, **280**: 79-93.

-
- WALKER G., YULE A.B., NOTT J.A. (1987) - Structure and function in balanomorph larva. In: Southward A.J. (ed.), *Barnacle biology*. A.A. Balkema Rotterdam: 307-328.
- WALKER G. (1971) - A study of the cement apparatus of the cypris larva of the barnacle, *Balanus balanoides*. *Mar. Biol.*, **9**: 205-212.
- WALNE P.R. (1970) - Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Crassostrea*, *Mercenaria*, and *Mytilus*. *Fish. Invest.*, **26**: 1-62.
- WIECZOREK S.K., CLARE A.S., TODD C.D. (1995) - Inhibitory and facilitatory effects of microbial films on settlement of *Balanus amphitrite* amphitrite larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **119**: 221-228.
- WU R.S.S., LAM P.K.S., ZHOU B.S. (1997b) - Effects of two oil dispersants on phototaxis and swimming behaviour of barnacle larvae. *Hydrobiologia*, **352**: 9-16.
- WU R.S.S., LAM P.K.S., ZHOU B. (1997a) - A settlement inhibition assay with cyprid larvae of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Chemosphere*, **35** (9): 1867-1874.
- YEBRA D.M., KIIL S., DAM-JOHANSEN K. (2004) - Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog. Org. Coat.*, **50**: 75-104.

CAPITOLO 50. ALLEVAMENTO DI STADI LARVALI DI RICCIO DI MARE

A. Toscano, P. Cirino

alfonso.toscano@szn.it

50.1 INTRODUZIONE

Paracentrotus lividus (riccio di mare comune) è uno degli echinoidi regolari più conosciuti dei nostri mari. È presente in tutto il Mediterraneo e nell'Atlantico nord-orientale, dove tipicamente vive su fondali rocciosi costieri e nelle praterie di Posidonia, da 0 fino a 10-20 m di profondità. Il diametro degli individui più grandi (senza spine) può raggiungere i 7,5 cm. La sua colorazione è altamente variabile e spazia dai toni del marrone al nero, dal violaceo al bruno olivastro, passando anche per toni bruno rossastri.

Gli embrioni di riccio di mare hanno giocato un ruolo chiave negli studi embriologici per almeno un secolo e probabilmente gli stadi iniziali del loro sviluppo sono i più conosciuti tra quelli degli organismi marini attualmente studiati (Hinegardner, 1969). Studi ecologici hanno dimostrato l'importanza degli echinoplutei, almeno stagionalmente, nella composizione e biomassa delle comunità zooplanctoniche (Turon *et al.*, 1995; López *et al.*, 1998). Il riccio di mare rappresenta, inoltre, un'importante risorsa commerciale per il consumo delle sue gonadi, molto apprezzate come specialità di mare e consumate crude o cotte. Attualmente i paesi maggiori consumatori di riccio di mare sono Francia e Spagna, seguiti da Italia e Grecia, sebbene in molti altri paesi (Irlanda, Portogallo, Croazia) sono, o sono stati, raccolti estensivamente per l'esportazione (Boudouresque e Verlaque, 2007). Ciò ha causato in alcune zone l'eccessivo sfruttamento delle popolazioni naturali, che ha reso necessaria l'adozione di specifiche politiche gestionali (restrizione dei periodi di raccolta, quote di cattura, acquacoltura) per salvaguardare la risorsa naturale (Guidetti *et al.*, 2004). L'importanza di questa specie, sia a livello ecologico che commerciale, ha portato ad intensificare gli studi sulle tecniche di coltura delle larve, finalizzate alla produzione di ricci di mare in acquacoltura (Liu *et al.*, 2007).

Questo capitolo fornisce un protocollo semplificato per l'ottenimento di stadi larvali (echinoplutei) in laboratorio per scopi di studio. Vengono descritti i metodi per ottenere i gameti, realizzare la fecondazione in vitro, allevare le larve e indurre la metamorfosi; vengono fornite, inoltre, le indicazioni di base per la preparazione in laboratorio dell'alimento per le larve (colture di microalghe). Le metodiche descritte si riferiscono ad esperienze lavorative nel Servizio "Allevamento Organismi Marini per la Ricerca" della Stazione Zoologica Anton Dohrn di Napoli.

Sorgenti aggiuntive di informazioni sull'allevamento di larve di echinodermi in laboratorio sono Hinegardner (1969), Lowe e Wray (2000), Wray *et al.* (2004).

50.2 MANTENIMENTO DEI RICCI ADULTI E OTTENIMENTO DEI GAMETI

50.2.1 Trasporto e mantenimento degli adulti

I ricci adulti vengono raccolti da pescatori subacquei e trasportati in laboratorio nel più breve tempo possibile. Gli animali vengono riposti a strati, frapposti con stracci o carta imbevuti di acqua di mare, in contenitori frigo portatili senza ulteriore acqua per il trasporto; durante i mesi estivi, è opportuno porre sul fondo dei contenitori dei siberini (distanziati dagli animali) per evitare un eccessivo innalzamento della temperatura durante il trasporto. Tali condizioni, nella generalità dei casi, consentono di limitare lo stress per gli animali e la conseguente emissione dei gameti. In laboratorio, gli animali vanno mantenuti in acquari a circuito aperto o chiuso (con acqua a ricircolo). È opportuno provvedere ad una adeguata

aerazione e al controllo della temperatura dell'acqua, che dovrà essere mantenuta a valori prossimi a quella dei siti di raccolta. Durante il mantenimento a lungo termine, si provvederà ad alimentare gli animali con macroalghe di diverse specie (es. *Ulva* spp.).

Durante queste fasi è possibile che, in risposta allo stress di cattura e trasporto, gli animali maturi possano emettere uova o sperma; l'accurata osservazione degli animali nel trasferimento dai contenitori di trasporto alla vasca permette di separare subito quelli in fase di emissione, che andranno tenuti in una vasca separata fino alla fine del fenomeno. Dal momento che non è possibile distinguere nei ricci il sesso dalle caratteristiche morfologiche esterne, si può utilizzare questa evenienza per formare stock separati di maschi e femmine.

50.2.2 Ottenimento dei gameti

In mancanza di stock separati, nella procedura standard la determinazione dei sessi in *P. lividus* avviene al momento dell'emissione dei gameti. Generalmente, quest'ultima viene indotta e l'osservazione dei gameti consente di distinguere facilmente i maschi dalle femmine; le uova sono colorate (da giallo ad arancio) e lo sperma è bianco (Fig. 1a,b).

L'emissione dei gameti può essere indotta con vari metodi, progressivamente più invasivi:

- a. scuotimento più o meno vigoroso dell'animale;
- b. applicazione di una scossa elettrica a basso voltaggio (12 volts) con l'ausilio di elettrodi posti sui lati dell'animale che viene poggiato con il lato orale verso il basso su una piastra Petri con un fondo di acqua di mare filtrata a 0,22 μm . Le scosse, della durata di pochi secondi, vengono ripetute alcune volte, approssimativamente all'altezza dei gonopori;
- c. iniezione intracelomica di acetilcolina 10mM o di cloruro di potassio (KCl) 0,5M. Utilizzando una siringa da 5 ml, si iniettano da 1 a 2 ml di soluzione attraverso la membrana peristomale.

La pronta emissione dei gameti in seguito agli stimoli sopraindicati dipende dallo stato di riempimento delle gonadi e quindi dal momento riproduttivo dell'animale. Con animali maturi il semplice scuotimento (a) consente la raccolta di gameti maturi ed il recupero dell'animale stesso, che può essere reintrodotta in vasca una volta terminata la fase di emissione. Gli animali che non rispondono al primo stimolo (a) possono essere sottoposti alla stimolazione elettrica (b) e in caso di ulteriore mancata emissione, possono essere iniettati (c). Generalmente animali iniettati con KCl hanno minori probabilità di sopravvivenza e quindi di recupero e riutilizzo (Luis *et al.*, 2005).

Ottenuta l'emissione dei gameti, si procede alla raccolta delle uova e degli spermatozoi separatamente. I ricci femmine vengono posti capovolti sopra piccoli beaker o cristallizzatori delle opportune dimensioni, contenenti acqua di mare filtrata a 0,22 μm , con la parte aborale, nella quale si aprono i gonopori, che lambisce l'acqua. Le uova si depositeranno sul fondo del contenitore (Fig. 1c). Il prelievo degli spermatozoi dai ricci maschi viene effettuato "a secco", procedendo alla raccolta con pipetta Pasteur o pipetta automatica (Fig. 1d); lo sperma deve essere diluito solo al momento dell'uso per la fecondazione, poiché viene attivato dal contatto con l'acqua, con conseguente riduzione della motilità e dell'efficienza di fecondazione. Prelevati "a secco", gli spermatozoi possono essere conservati in eppendorf a freddo (4 °C) fino al loro uso, anche dopo 24h dal prelievo.

50.3 ALLESTIMENTO DEGLI ALLEVAMENTI

50.3.1 Fecondazione in vitro

Le uova vengono raccolte dai contenitori dove sono state emesse, utilizzando pipette monouso in polietilene da 3 ml, e trasferite in monostrato in piastre Petri (15 cm) con acqua di mare filtrata a 0,22 μm .

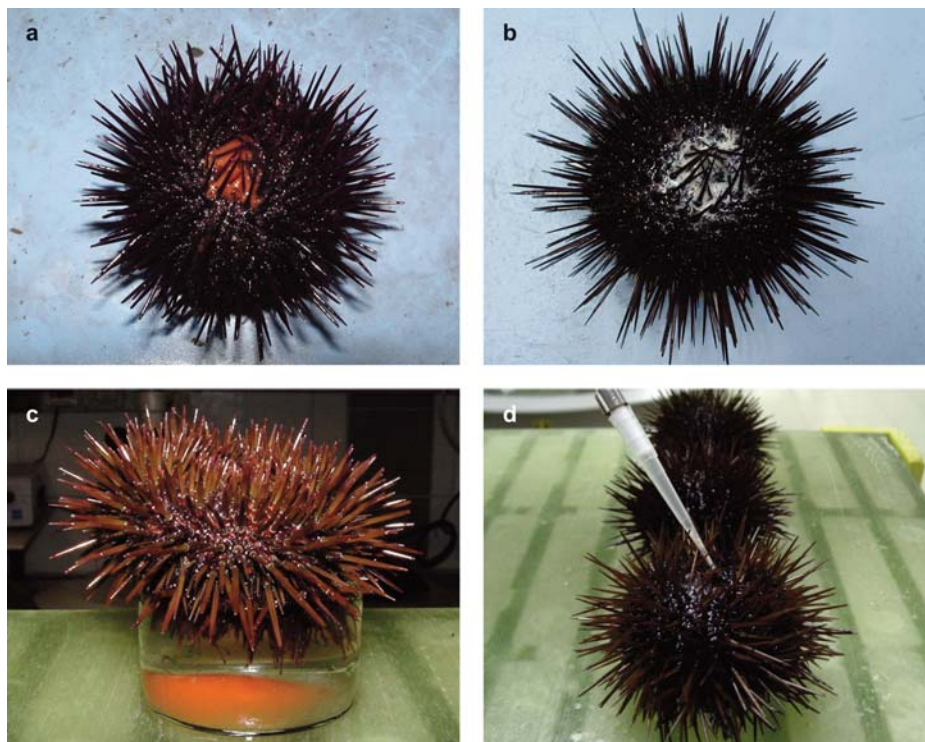


Fig. 1 – Emissione e raccolta dei gameti di *P. lividus* da femmina (a, c) e maschio (b, d)

E' bene effettuare questa operazione in breve tempo (entro 1 ora dal prelievo dei gameti) per non lasciare le uova in condizioni non ottimali di ossigenazione.

Si procede, quindi, alla preparazione della soluzione diluita di sperma da aggiungere per fecondare. Si preleva una goccia di sperma “secco” e si diluisce in una provetta con 10 ml di acqua filtrata, agitando dolcemente la stessa per ottenere una soluzione omogenea di sperma. Una goccia di questa soluzione è sufficiente per fecondare la sospensione di uova in una piastra (volume approssimativo di 100 ml).

L'avvenuta fecondazione potrà essere controllata al binoculare subito: entro 30 sec dall'inseminazione si osserva il sollevamento della membrana di fecondazione, che comincia dal punto di penetrazione dello spermatozoo e rapidamente si espande a tutta la superficie dell'uovo (Fig. 2).

Durante le prime ore dopo la fecondazione è opportuno effettuare un cambio di acqua per allontanare l'eventuale eccesso di spermi.

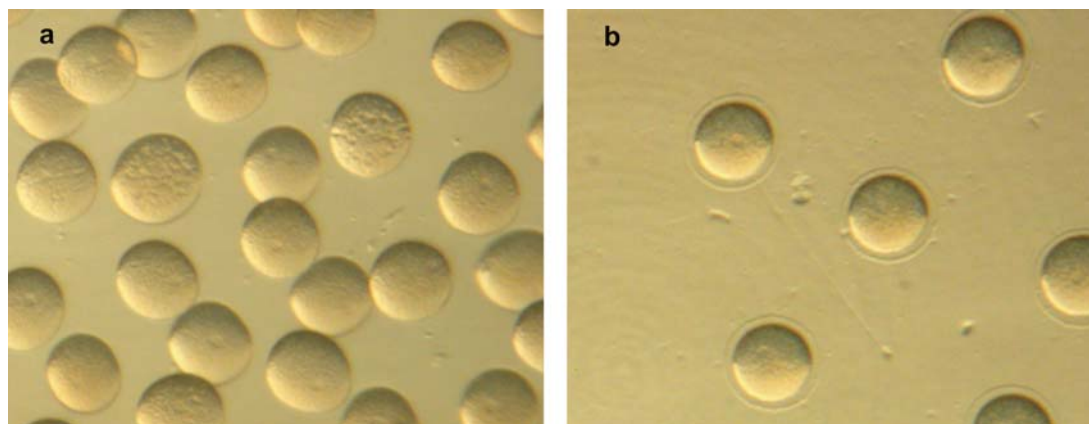


Fig. 2 – Uova di *P. lividus* prima (a) e subito dopo (b) la fecondazione

50.3.2 Sviluppo embrionale

In condizioni ottimali lo sviluppo embrionale è sincrono e attraversa le fasi di sviluppo di blastula, blastula natante, gastrula, prisma e termina dopo 2 giorni (a 20°C) con il differenziamento della caratteristica larva pluteo (echinopluteo) a 4 braccia, sostenute da raggi scheletrici calcarei (Fig. 3a).

Dopo un giorno il pluteo inizia ad alimentarsi e ciò segna la fine del periodo embrionale e l'inizio della vita larvale (vedi Tab. 1).

Durante questa fase, gli echinoplutei si accrescono e sviluppano in successione 6 e 8 braccia (Fig. 3b;c).

Dopo un paio di settimane sviluppano un rudimento all'interno della parete di una invaginazione epidermica (il vestibolo) situata sul lato destro del corpo (Fig. 3d). Il rudimento cresce progressivamente ed include le piastre terminali, le prime spine ed i primi pedicelli.

Quando la larva diventa competente, i primi pedicelli vengono estroflessi e verranno utilizzati per la ricerca di un substrato solido dove stabilirsi e metamorfosare (Fig. 3e). È stato dimostrato che la fase di competenza viene abbreviata e la metamorfosi indotta da adeguati stimoli (Gosselin e Jangoux, 1996; Blin, 1997). Nella nostra esperienza, questi vengono efficacemente procurati dall'esposizione delle larve a pezzetti di macroalghe (*Ulva spp.*).

La metamorfosi dura meno di un'ora: il rudimento dell'echinopluteo viene evaginato, compaiono i primi pedicelli e le prime spine, mentre i tessuti larvali vengono progressivamente riassorbiti (Fig. 3f).

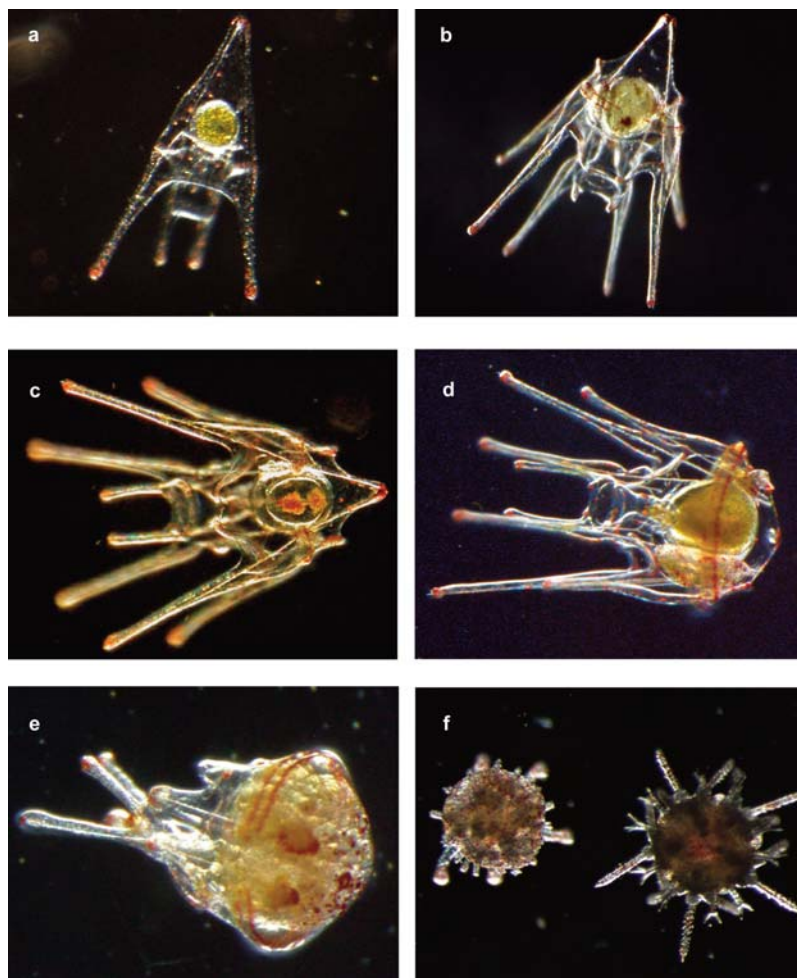


Fig. 3 – Alcuni stadi dello sviluppo di *P. lividus* (dettaglio nel testo)

La postlarva somiglia ad un adulto miniaturizzato (Fig. 4a) ma non possiede nè bocca nè ano ed è perciò endotrofica (Gosselin e Jangoux, 1998). Durante la settimana successiva la postlarva subisce importanti cambiamenti, diventa un juvenile esotrofico con un tratto digestivo pienamente sviluppato e funzionale e comincia ad andare attivamente in cerca di alimento (4b).

Nella Tabella 1 si fornisce un quadro schematico della successione delle fasi di sviluppo di *P. lividus* in coltura.

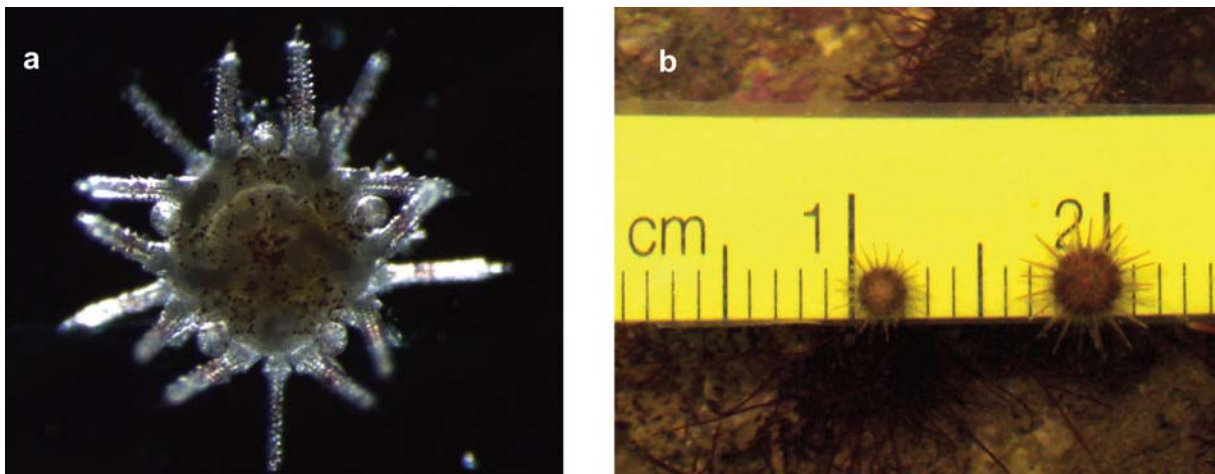


Fig. 4 – Postlarva endotrofica (a) e juvenili esotrofici (b) di *P. lividus*.

50.3.3 Trattamento degli embrioni

Per la coltura gli embrioni vanno trasferiti in contenitori più grandi (cristallizzatori in vetro da 1 l a 3 l) con acqua di mare filtrata a $0,22 \mu\text{m}$. Il trasferimento può essere effettuato subito dopo le prime divisioni.

Nella necessità di effettuare delle conte accurate, risulta ottimale effettuare il trasferimento prima che gli embrioni raggiungano uno stadio natante (blastula natante a 12 h a 20°C), risultando più agevole la conta di embrioni statici.

Il volume della coltura da approntare, e conseguentemente il contenitore da utilizzare, è dipendente dalla finalità di studio, tenendo presente la stretta relazione tra volume e numero di larve in coltura.

Nella nostra esperienza sono risultate ottimali densità da $0,5$ a 1 larva ml^{-1} , sebbene siano riportati in letteratura valori da $0,25$ larve ml^{-1} (Grosjean *et al.*, 1998) a 5 larve ml^{-1} (George, 1996).

Culture piccole e medie (fino a 2 l) sono state mantenute efficacemente in condizioni statiche, senza aerazione e con cambi di acqua dell'ordine del 10 – 20%, effettuati con frequenza trisettimanale.

I cambi d'acqua richiedono estrema attenzione dal momento che le larve si danneggiano facilmente. Il metodo da noi utilizzato prevede l'aspirazione dell'acqua da cambiare, con l'ausilio di un pipettatore o di una pompa a vuoto, attraverso un setaccio con la rete di fondo di 100-150 micron, che non permette il passaggio delle larve. Questo può anche essere realizzato in laboratorio utilizzando pezzi di tubazioni in PVC delle opportune dimensioni o asportando il fondo di un contenitore in plastica (es: beaker) e creando un fondo con una rete da plancton con la maglia sopra indicata. L'acqua asportata per il cambio viene sostituita con una pari quantità di acqua filtrata a $0,22 \mu\text{m}$ ed alla stessa temperatura.

Il cambio d'acqua effettuato secondo questa procedura risulta abbastanza veloce e poco dannoso per le larve in coltura, sia perché non comporta alcun trasferimento dei plutei durante i cambi d'acqua, sia perché non richiede il cambiamento della maglia del setaccio utilizzato, che può rimanere la stessa durante tutte le fasi di crescita delle larve.

Per limitare l'evaporazione ed eventuale inquinamento da polveri, è opportuno mantenere coperte le colture. La mortalità osservata durante l'intero periodo di sviluppo non ha superato la percentuale di 1% al giorno (pari a un tasso di sopravvivenza del 70% alla metamorfosi).

50.3.4 Alimentazione delle larve

Le larve di *P. lividus* sono planctotrofiche e consumano una varietà di specie di alghe unicellulari, di cui devono nutrirsi durante l'esteso periodo di vita planctonica (da 3 a 4 settimane) per poter giungere alla metamorfosi.

L'allevamento dei vari stadi di echinopluteo in laboratorio richiede, dunque, l'approvvigionamento di colture algali per l'alimentazione delle larve durante l'intero periodo di crescita, fino alla metamorfosi. Laddove non sia possibile il reperimento di colture microalgali già avviate, se ne deve prevedere la produzione in laboratorio (vedi paragrafo successivo).

Nell'alimentazione delle larve è importante considerare la densità della coltura, ovvero il numero di larve per volume d'acqua. Infatti, soprattutto all'inizio, condizioni di sovralimentazione risultano tra i fattori pregiudizievoli per il successo dell'allevamento. Le microalghe vengono somministrate a giorni alterni, secondo le dosi calcolate.

Poco dopo l'introduzione dell'alimento, i plutei osservati al binoculare presentano gli stomaci pieni di alghe ancora vitali (mobili). Questa regola empirica, così come quelle dell'osservazione della distribuzione regolare delle larve in tutto lo "spazio coltura" e della loro modalità di nuoto continuo, servono per la valutazione dello stato di salute dei plutei in crescita.

Nella Tabella 1 sono riportate le densità di *Dunaliella tertiolecta* (numero di cellule algali per ml) utilizzate per alimentare la coltura di echinoplutei a vario stadio di crescita, considerando la densità iniziale delle larve di 1 pluteo ml⁻¹.

50.3.5 Colture algali per l'alimentazione delle larve

Le colture devono essere avviate almeno una settimana prima che le larve siano pronte per mangiare, cioè quando raggiungono lo stadio di pluteo a 4 braccia ed iniziano il periodo larvale, a 3 giorni dalla fecondazione delle uova.

Per l'alimentazione di larve di *P. lividus* (così come di altre specie di echinoidi) vengono di routine utilizzate diverse specie di microalghe, sia diatomee (*Phaeodactylum tricorutum*) che fitoflagellati (*Pleurocystis carterae*; *Pleurocystis elongata*; *Isochrysis galbana*; *Dunaliella tertiolecta*) (Fenaux *et al.*, 1985; Grosjean *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2007). È possibile allevare plutei fino alla metamorfosi usando una singola specie di alga, sebbene sia riportato l'utilizzo di mix di più specie.

Nella nostra esperienza sono state effettuate crescite di larve utilizzando le specie *I. galbana* e *D. tertiolecta*, sia singolarmente che come mix delle due. La procedura riportata è riferita alla coltura ottenuta alimentando i plutei con sola *D. tertiolecta* che è risultata quella che in termini di grandezza delle larve, velocità di crescita e sopravvivenza ha dato i migliori risultati.

I ceppi di partenza sono stati reperiti in sede (SZN). Il terreno di coltura da noi utilizzato è un Guillard F/2 modificato (Micro Algae Grow Mass Pack™), adoperato in impianti di acquacoltura; esso viene addizionato all'acqua di mare filtrata a 0,22 µm (4 ml di terreno/10 l FSW) alla quale vengono aggiunte le microalghe (inoculo) per dare avvio alla coltura massiva. Partendo da piccoli contenitori in plastica o vetro (es. beute o flasks ventilate da 0,5 – 1 litro), attraverso passaggi in volumi crescenti (2, 3 e 5 litri), si può arrivare a carboy in polycarbonato da 10 e 20 litri.

Questa tecnica permette la riduzione dei tempi di sviluppo (le colture vengono mantenute sempre nella fase di sviluppo esponenziale), un controllo più accurato ed una crescita più pianificabile delle colture. Le microalghe vengono poi mantenute in coltura batch semi-continua, in condizioni di illuminazione fluorescente di tipo daylight per la durata minima di 12 ore/day.

La densità delle cellule algali viene calcolata mediante conte in "camere di conteggio", tipo emocitometro. Naturalmente il dimensionamento della coltura di microalghe segue in maniera diretta i volumi di utilizzo delle alghe e quindi quello della coltura di larve da mantenere.

Riferimenti ed ulteriori informazioni sulle principali tecniche di coltura di microalghe possono trovarsi in Hoff e Snell (1987) e Lavens e Sorgeloos (1996).

Tabella 1 – Successione delle fasi di sviluppo di *P.lividus* e del trattamento alimentare degli echinoplutei in coltura. Da Gosselin e Jangoux (1998), modificata e adattata alle condizioni di allevamento applicate nel presente lavoro.

<i>Fase di sviluppo</i>	<i>Durata</i>	<i>Caratteristiche</i>	<i>Trattamento alimentare</i>
periodo embrionale (vita planctonica)	3 gg.	dalla fecondazione a pluteo a 4 braccia	(alimentazione endotrofica)
periodo embrionale (vita planctonica)	15 gg.	differenziamento di braccia addizionali: da 4 a 6 braccia addizionali: da 6 a 8	(alimentazione esotrofica) 1000 cellule <i>D.tertiolecta</i> ml ⁻¹ di coltura larvale 3000 cellule <i>D.tertiolecta</i> ml ⁻¹ di coltura larvale
		differenziamento del rudimento	5000 cellule <i>D.tertiolecta</i> ml ⁻¹ di coltura larvale
periodo post-larvale (perimetamorfosi) (vita planctonica/bentonica)	1 ÷ 4 gg	(fase competente) acquisizione della capacità a metamorfosare	(alimentazione esotrofica) 7000 cellule <i>D.tertiolecta</i> ml ⁻¹ di coltura larvale
(vita bentonica)	circa 1 h	(metamorfosi) cambiamento di forma riassorbimento delle braccia	(alimentazione endotrofica)
	circa 8 gg	ontogenesi prejuvenile	(alimentazione endotrofica)
	circa 6 mesi	juvenile accrescimento e differenziamento delle gonadi	(alimentazione esotrofica) macroalghe

50.3.6 Attrezzatura per l'allevamento

L'attrezzatura necessaria per l'allevamento di larve di echinodermi è relativamente poco costosa o comunque è quasi tutta reperibile tra quella standard di un laboratorio di biologia marina. Naturalmente, le tecniche di allevamento variano considerevolmente e dipendono in larga misura dal tipo di studio che si vuole condurre; così l'attrezzatura necessaria può variare da piccoli contenitori (cristallizzatori o beaker) statici a sistemi più grandi e sofisticati fino alle tecnologie più evolute per le applicazioni in acquacoltura.

La metodica qui riportata si riferisce ad una scala dimensionale di laboratorio, per l'ottenimento di una coltura di alcune migliaia di echinoplutei a vari stadi di crescita.

50.3.6.1 Contenitori

Per l'allevamento delle larve cristallizzatori in Pyrex da 1 a 5 l sono eccellenti contenitori per tutte le fasi di crescita: sono facilmente gestibili e nella necessità di produrre quantità maggiori di larve possono essere mantenuti in "batteria".

Per la crescita delle colture di microalghe, sono adatti contenitori in plastica e vetro: flask ventilate di diversi volumi, bottiglie da 2 l, carboy in polycarbonato da 10 e 20 l, beute in vetro da 2 a 5 l, ecc..

Per questi contenitori (e per qualunque altra cosa che debba andare in contatto con le colture di alghe e di larve) bisogna evitare scrupolosamente qualsiasi contaminazione con sostanze potenzialmente tossiche, quali detergenti, fissativi o reagenti chimici.

Sarebbe opportuno dedicare uno spazio del laboratorio per l'allevamento larvale e contrassegnare tutto il materiale e la vetreria in uso per le colture in modo da evitare inquinamenti. I contenitori vanno lavati con acqua corrente, sciacquati con acqua distillata e sterilizzati in autoclave.

50.3.6.2 Attrezzatura complementare

Aeratori forniti di tubi flessibili in silicone, filtri aria, connettori e rubinetti sono necessari per l'aerazione delle colture algali (che risulta indispensabile per colture di volume superiore ai 2 l).

È importante avere accesso ad uno stereomicroscopio per poter monitorare lo stato di salute e lo sviluppo delle larve. Con l'ausilio di un microscopio ottico e di un emocitometro (tipo camera di Neubauer)

si possono operare le conte algali per valutare la densità e l'andamento della crescita delle colture. Tale valutazione è indispensabile per poter dosare l'alimentazione da somministrare ai plutei.

Altra attrezzatura necessaria per la gestione corrente delle colture è reperibile in laboratorio: filtri da 0,22 µm per la filtrazione dell'acqua di mare; piastre Petri; pipette Pasteur e pipette graduate monouso in plastica; pipette e pipettatori automatici; pompa a vuoto.

L'accesso ad un'autoclave permette di ottenere la sterilizzazione di tutti i contenitori in uso, procedura ottimale per limitare i rischi di inquinamento.

50.3.6.3 Acqua di mare

Alghe e larve possono essere prodotte in acqua di mare sia naturale che artificiale, sebbene la prima rimanga da preferirsi.

L'esperienza riportata ha utilizzato esclusivamente acqua di mare naturale, filtrata utilizzando unità filtranti (tipo stericup) a 0,22 µm.

50.4 BIBLIOGRAFIA

- BLIN J. (1997) - Culturing the purple sea urchin, *Paracentrotus lividus*, in a recirculation system. *Bull. Aquacul. Assoc. Canada*, **97**: 8-13.
- BOUDOURESQUE C. F., VERLAQUE M. (2007) - Ecology of *Paracentrotus lividus*. In: Lawrence J.M. (ed), *Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, Elsevier Science, Amsterdam: 243-285.
- FENAUX L., CELLARIO C., ETIENNE M. (1985) - Variations in the ingestion rate of algal cells with morphological development of larvae of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoidea). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **24**: 161-165.
- GEORGE S.B. (1996) - Echinoderm egg and larval quality as a function of adult nutritional state. *Oceanol. Acta*, **19** (3-4): 297-308.
- GOSSELIN P., JANGOUX M. (1996) - Induction of metamorphosis in *Paracentrotus lividus* larvae (Echinodermata, Echinoidea). *Oceanol. Acta*, **19** (3-4): 293-296.
- GOSSELIN P., JANGOUX M. (1998) - From competent larva to exotrophic juvenile: a morphofunctional study of the perimetamorphic period of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata, Echinoida). *Zoomorphology*, **118**: 31-43.
- GROSJEAN P., SPIRLET C., GOSSELIN P., VAITILINGON D., JANGOUX M. (1998) - Land-based closed-cycle echinoculture of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinoidea: Echinodermata): a long-term experiment at a pilot scale. *J. Shellfish Res.*, **17** (5): 1523-1531.
- GUIDETTI P., TERLIZZI A., BOERO F. (2004) - Effects of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*, fishery along the Apulian rocky coast (SE Italy, Mediterranean Sea). *Fish. Res.*, **66**: 287-297.
- HINEGARDNER R. T. (1969) - Growth and development of the laboratory cultured sea urchin. *Biol. Bull.*, **137** (3): 465-475.
- HOFF F. H., SNELL T. W. (1987) - *Plankton Culture Manual*. J. Nelsen Ed., Florida Aqua Farms Inc., Dade City, Florida: 162 pp.
- LAVENS P., SORGELOOS P. (1996) - *Manual on the production and use of live food for aquaculture*. FAO Fisheries Technical Paper. 361, FAO, Roma: 295 pp.
- LIU H., KELLY M. S., COOK E. J., BLACK K., ORR H., ZHU J.X., DONG S.L. (2007) - The effect of diet type on growth and fatty-acid composition of sea urchin larvae, I. *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata). *Aquaculture*, **264**: 247-262.
- LÓPEZ S., TURON X., MONTERO E., PALACÍN C., DUARTE C.M., TARJUELO I. (1998) - Larval abundance, recruitment and early mortality in *Paracentrotus lividus* (Echinoidea). Interannual variability and plankton-benthos coupling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **172**: 239-251.
- LOWE C. J., WRAY G. A. (2000) - Rearing larvae of sea urchin and sea stars for developmental studies. In: Tuan R. S., Lo C. W. (eds), *Developmental Biology Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ: 9-15.
- LUIS O., DELGADO F., GAGO J. (2005) - Year-round captive spawning performance of the sea urchin *Paracentrotus lividus*: Relevance for the use of its larvae as live feed. *Aquat. Living Resour.*, **18**: 45-54.
- TURON X., GIRIBET G., PALACIN C., LÓPEZ S. (1995) - Growth and population structure of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) (Echinodermata: Echinoidea) in two contrasting habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **122**: 193-204.
- WRAY G. A., KITAZAWA C., MINER B. (2004) - Culture of Echinoderm Larvae through Metamorphosis. In: Etensohn C.A., Wessel G.M., Wray G.A. (eds), *Methods in Cell Biology*. Elsevier Inc. Vol. 74: 75-86.

CAPITOLO 51. RIPRODUZIONE E ALLEVAMENTO LARVALE IN SCALA DI LABORATORIO DI MOLLUSCHI BIVALVI: *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* E *OSTREA EDULIS*

E. Prato, G. Sansone

linda.prato@iamc.cnr.it

51.1 *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS*

51.1.1 Cenni su biologia ed ecologia

Mytilus galloprovincialis è un mollusco lamellibranco che appartiene alla famiglia dei Mytilidae. La conchiglia di colore nero-violaceo è equivalve, di forma allungata e bombata, con il margine anteriore appuntito e il margine posteriore arrotondato (Fig.1). La parte interna si presenta di colore madreperlaceo e mostra le impronte delle inserzioni dei muscoli adduttori.

Nei mitili la cerniera o articolazione delle valve è poco sviluppata. I muscoli adduttori inseriti perpendicolarmente rispetto alle valve, permettono di serrare le valve nel caso di bassa marea, siccità e difesa dai predatori.



Fig.1- *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

Il mantello è formato da due lobi di tessuto che racchiudono completamente l'animale all'interno della conchiglia che cambia colore e spessore a seconda dello stadio di maturità sessuale bianco-crema nei maschi, giallo arancio nelle femmine.

Nei mitili il mantello contiene la maggior parte delle gonadi. I gameti si formano all'interno del mantello e sono trasportati lungo canali ciliati ai gonodotti che terminano nella cavità del mantello. Dopo il rilascio dei gameti, il mantello diventa sottile e trasparente.

M. galloprovincialis, è un organismo a sessi separati, privo di dimorfismo sessuale, raggiunge la maturità sessuale nel primo anno di vita, alla taglia di circa 3 cm; poiché il tasso di crescita è strettamente correlato alla temperatura, la maturità viene raggiunta in periodi di tempo che sono in funzione della latitudine.

Nell'area Mediterranea, la maturazione delle gonadi avviene verso la fine dell'estate, l'emissione dei gameti inizia nel mese di ottobre fino alla tarda primavera quando la temperatura è al di sotto dei 20°C.

(Renzoni, 1973; Pastore *et al.*, 1976; Pastore, 1980; Ceccherelli e Rossi, 1984; Matarrese *et al.*, 1993).

Per valutare la maturità delle gonadi o conoscere il sesso è necessario sacrificare alcuni organismi. Aprendo le valve, un'organismo maturo presenta gonadi molto voluminose, l'incisione leggera determina la fuoriuscita di un liquido denso. Tale liquido al microscopio ottico (10x) permetterà l'osservazione delle uova o degli spermatozoi.

Invece, per conoscere il sesso di un individuo senza doverlo sacrificare è necessario assistere all'emissione dei gameti. Dal momento che la gonade femminile è nel 95% dei casi di colore arancio, l'espulsione dei gameti femminili si manifesta con emissioni granulari dalle tonalità del giallo arancio, mentre i prodotti sessuali di individui di sesso maschile sono di aspetto lattiginoso di colore biancastro (Figs. 2-3).

51.1.2 Riproduzione controllata

Mytilus galloprovincialis è il mitilide più diffuso nell'intero bacino del Mediterraneo e rappresenta una realtà commerciale e occupazionale di notevole interesse nel panorama nazionale dell'acquacoltura. Il suo allevamento si basa principalmente sulla raccolta di seme selvatico in natura. In alcuni casi il reclutamento naturale può essere minacciato da numerosi fattori endogeni (fisiologici, genetici) o fattori esogeni (condizioni ambientali sfavorevoli durante il periodo di emissione dei gameti, disponibilità di fitoplancton, ecc...) determinando incertezze sulle produzioni e non soddisfacendo le necessità e le aspettative degli allevatori (Camacho *et al.*, 1995).

La riproduzione controllata è una pratica abbastanza diffusa in acquacoltura che si rende necessaria quando si vuole disporre di novellame di buona qualità della specie che si intende allevare. Nel caso della molluschicoltura, la riproduzione controllata interessa tutte le fasi fondamentali del ciclo vitale del mollusco da allevare, allo scopo di garantire una produzione costante di uova, larve e giovanili:

- Raccolta dei riproduttori
- Condizionamento
- Selezione dei gameti
- Allevamento larvale
- Ingrassio

51.1.3 Raccolta dei riproduttori

Il prelievo degli organismi deve essere effettuato in aree non contaminate e in condizioni ambientali ottimali, evitando possibili fattori di disturbo che potrebbero stressare gli organismi e minacciarne la vitalità. Le mareggiate, le variazioni di temperatura, il trasporto possono indurre all'emissione dei gameti. Durante il trasporto in laboratorio, è preferibile avvolgere i mitili in un canovaccio umido o carta bagnata all'interno di una borsa termica. In laboratorio si effettua una prima scelta degli organismi, allontanando gli individui morti o che presentano valve danneggiate, malformate, comunque non in buono stato di salute.

Il pool di individui scelto (almeno 50-60 individui) deve essere sottoposto a pulizia delle valve per liberarli da epibionti e incrostazioni. La stabulazione avviene per 3-4 giorni, in vasche contenenti acqua di mare naturale provviste di sistema di aerazione, alla temperatura di 15-18°C (US EPA, 1995; ASTM, 2004), la salinità deve essere simile alla salinità del sito di raccolta, correggendola gradualmente (1-4‰ al giorno). Se l'acqua di mare naturale utilizzata non contiene sufficienti quantità di fitoplancton sarà necessario integrare con una miscela di colture algali fitoplanctoniche (mix di microalghe costituito da *Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta* e *Tetraselmis suecica*).

Durante questo periodo deve essere garantita la pulizia giornaliera delle vasche dai pellets fecali, la rimozione degli eventuali organismi morti, il controllo periodico della temperatura, salinità, pH (7,8-8,2), ossigeno disciolto (70-100%), ammoniaca e nitrati (assenti).

51.1.4 Condizionamento

Questa fase si rende necessaria quando si vogliono avere organismi sessualmente maturi al di fuori del naturale periodo riproduttivo della specie e consiste nel ricreare artificialmente tutte le condizioni chimico-fisiche caratteristiche del loro periodo riproduttivo naturale.

I principali fattori esterni che influenzano la maturazione delle gonadi sono la temperatura e la disponibilità di cibo, infatti la quantità e la qualità dei gameti prodotti dipende dalla disponibilità di cibo nel periodo precedente a quello riproduttivo (Breber, 1996).

Agendo su questi fattori è possibile portare a maturazione individui con gonadi quiescenti in circa 2 mesi. Il processo richiede il mantenimento, in vasche predisposte per un riciclo d'acqua, di esemplari di *Mytilus galloprovincialis* a una temperatura di circa 20-22 °C, e una salinità di 36±1‰. Durante la fase di condizionamento è necessario somministrare colture microalgali almeno due volte al giorno, per circa due mesi. Questa fase rappresenta il processo più oneroso a carico degli schiuditori che devono necessariamente effettuare colture parallele di fitoplancton necessarie per il mantenimento degli individui. I costi gestionali di questa fase rappresentano circa il 40% dei costi complessivi (Turolla, 1999) ma possono essere notevolmente ridotti semplicemente utilizzando individui maturi provenienti dall'ambiente naturale.

La verifica della maturità sessuale si ottiene con un'analisi istologica di frammenti di gonadi e, se lo sperma appare attivo e le uova grandi e tondeggianti, significa che il lotto dei riproduttori ha raggiunto la maturità e può essere stimolato per l'emissione dei gameti.

51.1.5 Emissione dei gameti

Prima dell'emissione dei gameti i riproduttori vengono puliti, privati del bisso e non alimentati nelle 24h ore precedenti la stimolazione per ridurre l'espulsione di feci e pseudofeci che potrebbero causare infezioni batteriche e quindi minacciare la sopravvivenza larvale. In questa fase i riproduttori vengono stimolati collettivamente in un'unica vasca.

La stimolazione degli individui maturi può avvenire in vario modo. Il metodo più praticato è lo shock termico, che consiste nel sottoporre i mitili a una serie ripetuta di bagni termici in acqua di mare con salinità di 36±1. Cicli alternati di 18°C e 28°C vengono effettuati ogni 30 minuti e contemporaneamente i riproduttori possono essere stimolati con l'aggiunta di gameti precedentemente uccisi (tramite congelamento). Nel caso in cui dopo 4 bagni ripetuti l'emissione non si avvia, è possibile, per *M. galloprovincialis*, provvedere all'iniezione di KCl 0,5 M nel muscolo adduttore posteriore (US EPA, 1995; ASTM, 2004). È possibile inoltre utilizzare stimoli chimici per indurre l'emissione dei gameti aggiungendo all'acqua di mare perossido di idrogeno 5mM in ambiente basico (pH 9,1) per 15 minuti. Dopo 15 minuti di esposizione i mitili vengono lavati e reintrodotti in acqua di mare non trattata (Turolla *et al.*, 2002).

In genere i gameti vengono liberati nell'arco di circa trenta minuti, l'emissione è visibile ad occhio nudo, ma per facilitare l'individuazione dei gameti è consigliabile l'uso di vasche con il fondo scuro per consentire il contrasto cromatico con i gameti e la localizzazione degli individui che stanno emettendo. L'emissione dello sperma appare lattiginoso e nuvoloso, mentre le uova appaiono sottoforma di liquido granuloso color giallo-arancio (Fig.2).

Una volta iniziata l'emissione, i riproduttori vengono velocemente allontanati e posti singolarmente in beakers puliti con acqua di mare filtrata (0,45µm), per completare l'emissione. In questa fase è consigliabile l'impiego di due operatori per la raccolta indipendente dei gameti maschili e femminili, per evitare l'accidentale fecondazione delle uova. I maschi, in genere, emettono prima delle femmine, e data la breve durata di vita degli spermatozoi, è opportuno bloccare l'emissione dei maschi, fino all'ottenimento delle uova da parte delle femmine. Pertanto sarà opportuno togliere i maschi dall'acqua serrando le valve con grossi elastici.

Non appena incomincia l'emissione da parte delle femmine riproduttrici, queste vengono allontanate



Fig.2- Emissione dei gameti maschili

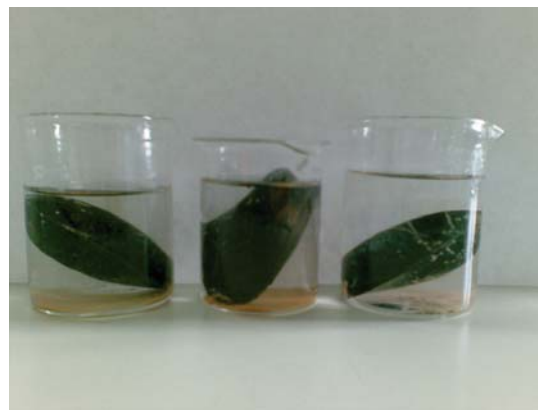


Fig.3- Emissione gameti femminili

e poste singolarmente in beakers riempiti con circa 200 ml di acqua filtrata, dove prosegue il rilascio dei gameti (Fig. 3).

Terminata la deposizione delle uova, si liberano i maschi dagli elastici e in un volume minimo di acqua di mare filtrata (l'acqua deve ricoprire appena le valve) si raccolgono gli spermatozoi di ogni singolo individuo, in una soluzione concentrata. Per assicurare una migliore qualità dei gameti, gli animali devono essere lasciati emettere per un periodo non superiore ai 30 minuti alla temperatura di 18°C.

La selezione dei maschi e delle femmine richiede la valutazione quali-quantitativa dello sperma e delle uova. Verranno scelti i maschi che producono quantitativamente più sperma, mentre per la qualità verranno scelti i maschi che presenteranno una buona motilità spermatica che sarà determinata al microscopio ottico (10x). La selezione delle femmine prevede la scelta delle emissioni più consistenti con uova omogenee per forma e dimensioni (controllate al microscopio 10x). Inoltre viene effettuata preventivamente una breve prova di fecondazione prelevando 1ml di uova e aggiungendo una piccolissima quantità di sperma: se in breve tempo le uova non vengono fecondate la sospensione di uova di quella femmina viene scartata. Lo sperma va utilizzato entro 2h dalla raccolta e mantenuto alla temperatura di emissione. Le uova invece possono essere conservate per diverse ore. Per mantenere un'elevata variabilità genetica sarà necessario utilizzare uova provenienti da femmine diverse che verranno fecondate con sperma proveniente da più maschi.

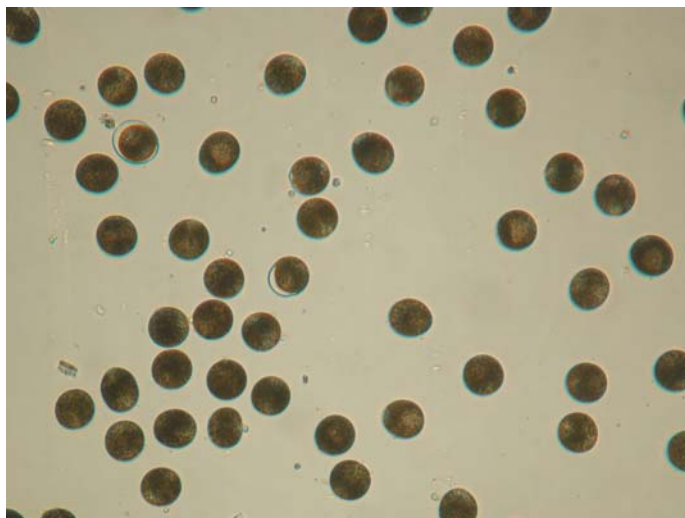


Fig.4-Uova di *Mytilus galloprovincialis*

51.1.6 Fecondazione

Tutte le uova ritenute idonee (provenienti dalle femmine selezionate) verranno riunite in un unico pool mediante filtrazione con un setaccio a maglia di 100 µm e raccolte in un cilindro graduato da 2000 ml (Fig. 4). Con uno stantuffo forato verrà agitata la sospensione di uova per evitarne la deposizione sul fondo. Risulta abbastanza difficoltoso determinare la quantità di sperma necessario a fecondare le uova, dal momento che il conteggio spermatico può risultare impreciso e abbastanza dispendioso. Nelle nostre condizioni sperimentali, per fecondare 3-4 milioni di uova sono risultati sufficienti 5ml di sperma (Fig. 5).



Fig. 5- Uova e spermatozoi

Quindi è necessario conoscere la densità di uova raccolte nel cilindro graduato da 2000 ml, mediante diluizione successive. Continuando a mescolare con lo stantuffo forato, per assicurare una uniforme distribuzione delle larve in tutto il volume, si procede al prelievo di 10 ml di sospensione di uova, portati a volume (250 ml) con acqua di mare (filtrata 0,45µm) in un cilindro graduato. Da quest'ultima sospensione si prelevano 6 sub-campioni da 0,1 ml, che posti su 6 vetrini concavi, potranno essere esaminati al microscopio ottico. Verrà stimata la media delle uova contate (in 0,1ml) su ogni vetrino. Per conoscere il numero di uova presenti nel volume originario dovrà essere applicata la seguente formula:

$$N^{\circ} \text{ uova} = N^{\circ} \text{ medio} * 10 * 250 / 10$$

Il tempo di fecondazione è di circa 15 min. È possibile accertarsi dell'avvenuta fecondazione esaminando al microscopio ottico (10x) un campione di uova, se la fecondazione ha avuto successo circa il 90% delle uova presenterà il globulo polare (Fig.6).

Dopo la fecondazione si procederà al lavaggio delle uova facendo passare la sospensione di uova attraverso due setacci (100 µm e 36 µm). Le uova passeranno attraverso il setaccio di 100 µm e si raccoglieranno sul setaccio a maglia più piccola (36µm) lasciando passare gli spermatozoi in eccesso.

Dopo il lavaggio le uova fecondate verranno poste in vasche circolari, con acqua di mare filtrata (0,45µm), alla salinità di 36±1‰, temperatura di 22±1°C e costantemente areate. Durante questa fase la densità delle uova può essere mantenuta intorno a valori alti (80-100 uova ml⁻¹).

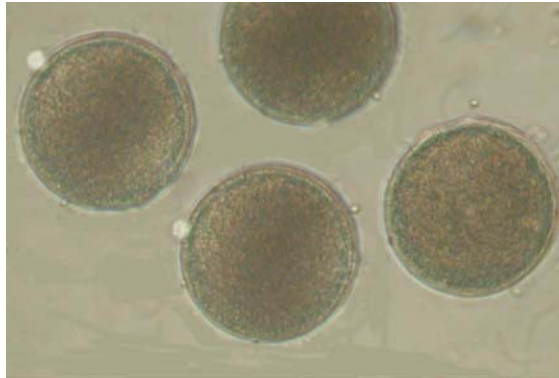


Fig.6- Espulsione del globulo polare

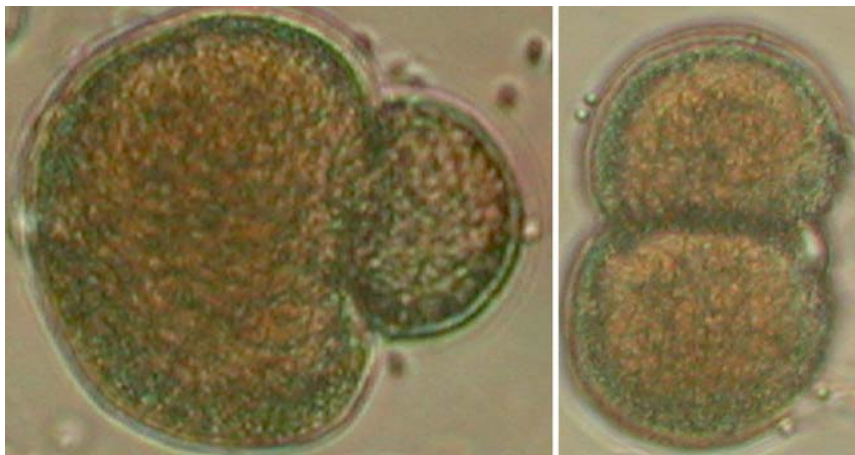


Fig. 7- Prime divisioni cellulari

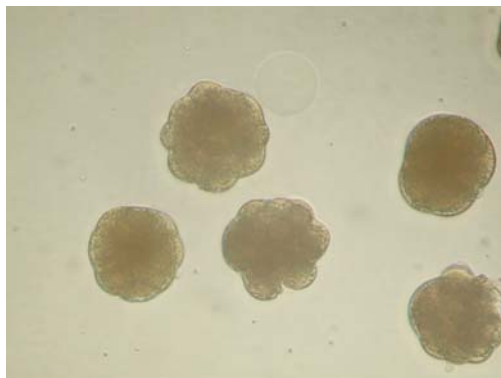


Fig.8- Embrioni dopo 2 ore dalla fecondazione

51.1.7 Allevamento larvale

Dopo la fecondazione le uova incominciano a dividersi (Figs. 7-8). Il primo stadio larvale è determinato dalla comparsa della trocofora, questo stadio ha una durata variabile e dipende strettamente dalla temperatura (Fig.9). Durante questo stadio non viene fornito alcun tipo di alimento.

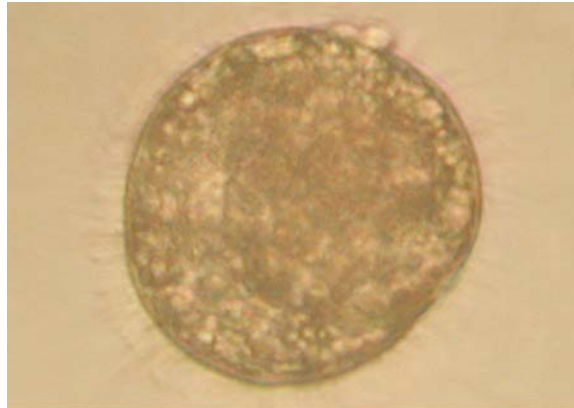


Fig. 9 - Trocofora di *Mytilus galloprovincialis*

La trocofora è provvista di una corona di ciglia in posizione mediana e un lungo flagello apicale che consente il nuoto. L'applicazione del nostro protocollo consente di ottenere il secondo stadio larvale, larva D, dopo 24-30 ore circa dalla fecondazione, di dimensioni di circa $106 \pm 1 \mu\text{m}$ (Fig. 10).

Studi precedenti riportano per *Mytilus galloprovincialis* il passaggio da trocofora a larva D dopo 30-36 ore a 20°C (Le Pennec e Masson, 1976), in *Mytilus edulis* la comparsa della larva D avviene dopo 32 ore a 18°C (Sprung, 1984). La larva D è provvista di due valve trasparenti e di un organo denominato *velum* che, estroflettendosi tra le due valve, consente il nuoto e la raccolta delle particelle di cibo. Da questo momento si cominciano ad alimentare le larve.



Fig. 10 - Larve D

Le larve continuano a nuotare, alimentarsi e crescere sviluppando nell'arco di una settimana l'umbone. Con l'accrescimento l'umbone diventa più prominente e larva entra nello stadio di veliger.

L'allevamento prevede una densità abbastanza alta nei primi giorni ($15-20 \text{ larveD ml}^{-1}$) questa densità verrà ridotta all'avvicinarsi della metamorfosi sino ad un valore di $5 \text{ pediveliger ml}^{-1}$. Il pediveliger è riconoscibile per la presenza di una "macchia oculare" e di un piede con cui si sposta e, a tratti, si solleva usando ancora il "velum" come mezzo di locomozione (Fig. 11).

Ogni due giorni occorre fare delle selezioni, per lavare le larve, allontanare pseudofeci e individui morti. L'acqua viene filtrata attraverso setacci di dimensioni di maglia ogni volta più grandi: 36mm (larva D), 53, 60, 73, 85, 100 mm (Veliger), 125 mm (pediveliger). Dopo circa 13 giorni al veliger segue lo stadio di pediveliger e quando questo ha raggiunto le dimensioni di $0,3 \pm 0,1$ mm è pronto all'insediamento.

Durante la fase larvale i mitili vengono osservati quotidianamente al microscopio ottico per valutare i cambiamenti morfologici che indicano l'approssimarsi della metamorfosi, durante la quale si osserva una regressione del *velum*, si sviluppa il piede e la colorazione delle valve diventa più marrone.

Prima dell'insediamento (*setting*), nel periodo finale dell'allevamento larvale, allo stadio di pediveliger le larve hanno ancora la capacità di nuotare nella colonna d'acqua, ma cominciano sempre di più a stanziare sul fondo e deambulare utilizzando il piede alla ricerca di un substrato adatto per metamorfosare e passare alla fase esclusivamente bentonica (Figg. 12-13).

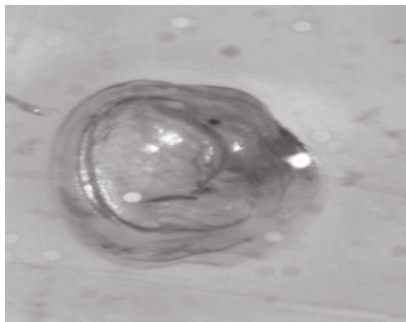


Fig.11 - Pediveliger in fase terminale e macchia oculare (LT= 0,5mm)

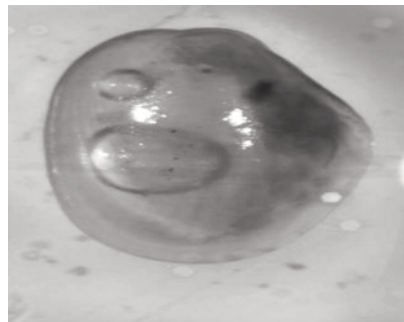


Fig.12 - Giovanile con macchia oculare e valve ialine (LT= 1,5 mm)



Fig. 13 - Inizio della pigmentazione delle valve (LT= 2 mm)

Per valutare la crescita larvale è necessario effettuare, giornalmente, misure al microscopio ottico, con un ingrandimento 10x, fornito di apposito oculare micrometrico.

Le larve vengono misurate dall'estremità anteriore a quella posteriore delle valve. Ciascuna larva viene orientata ed allineata con il reticolo calibrato dell'oculare (Fig. 14).

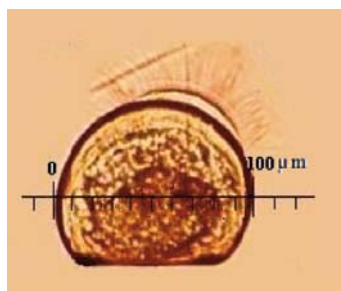


Fig.14 - Misura della lunghezza totale di una larva D

51.1.8 Alimentazione

Durante l'allevamento le larve vengono alimentate con *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis suecica* e *Dunaliella tertiolecta*, dimensionate al consumo giornaliero. L'alimento viene somministrato due volte al giorno secondo lo schema indicato in Tab. 1: per i primi quattro giorni esclusivamente *Isochrysis galbana*, di dimensioni più piccola, dal quinto giorno fino al termine della fase larvale con relativa immissione in setting si somministra una miscela algale di *Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta* e *Tetraselmis suecica*. Tuttavia sono si stanno sperimentando altre diete con altre specie algali e integratori per migliorare le performance di accrescimento e di sopravvivenza.

Per la produzione di alghe si utilizzano beute da 2 lt mantenute nella camera temostata alle condizioni di crescita migliori per la popolazione cellulare, ovvero temperature comprese tra 20-25°C, salinità 36 ‰, pH 8,0-8,6, ed intensità di luce di almeno 2000lux per 24h/giorno.

L'acqua di mare, prelevata direttamente dalla costa limitrofa, viene filtrata su membrane Millipore (0,2 µm), autoclavata e arricchita con un terreno di coltura secondo Guillard (1983).

Prelevando le cellule con una pipetta dalle beute, quotidianamente viene seguita la crescita della coltura algale, contando il n° di cellule per ml con una camera di Burkner.

Tab. 1- Schema di alimentazione larvale del *Mytilus galloprovincialis*.

Giorno dalla raccolta delle larve D	Lunghezza delle valve (µm)	Densità (n. larve/ml)	Numero di alghe da somministrare per larva/µl/die (da dividere in due somministrazioni al giorno)		
			<i>I. galbana</i>	<i>D. tertiolecta</i>	<i>T. suecica</i>
0	106±2	15-20	15.000-20.000		
2	110±3	15-20	15.000-20.000		
4	135±2	15-20	20.000-30.000		
6	175±4	10-8	30.000-35.000	25.000-30.000	5.000-10.000
8	196±2	10-8	45.000-50.000	35.000-40.000	10.000-12.000
10	223±3	8-6	45.000-50.000	50.000-55.000	12.000-13.000
12	263±4	6-5	35.000-45.000	60.000	14.000-15.000
13	300±2	5	35.000-45.000	70.000	14.000-15.000

51.1.9 Mortalità

Durante l'allevamento possono insorgere infezioni di natura batterica, fungina o infestazioni da parte dei protisti che possono minacciare la sopravvivenza larvale.

Sembra che negli schiuditori le patologie più frequenti siano a carico dei batteri, i quali possono essere rinvenuti sia nelle colture algali sia nel mezzo d'allevamento larvale, nonostante l'attenzione costantemente esercitata per mantenere l'ambiente asettico. Per contrastare l'insorgenza di questi problemi, si utilizzano sostanze antibiotiche come streptomina, penicillina e cloramfenicolo.

51.2 OSTREA EDULIS

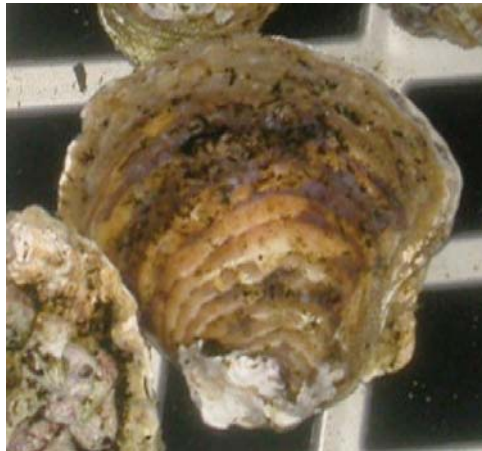


Fig. 15- Esempio di *Ostrea edulis*

51.2.1 Cenni su biologia ed ecologia

Ostrea edulis comunemente definita Ostrica Piatta Europea è un mollusco bivalve sessile appartenente alla famiglia Ostreidae. Nativo delle coste Europee, lo si ritrova naturalmente dalla Norvegia al Marocco nel Nord-Est dell'Atlantico e nell'intero Mar Mediterraneo (Fig. 15).

O. edulis ha conchiglia ovale dall'aspetto piriforme, la valva sinistra (inferiore) convessa è solitamente adesa al substrato mentre la valva destra (superiore) piatta funge da coperchio.

Generalmente colonizza la zona intertidale fino ai 20 metri di profondità, ma durante la fase larvale libera può raggiungere altre aree.

La lunghezza media degli adulti è di 10-12 cm, può tollerare ampi range di salinità anche fino al 23‰ e si ritrova in banchi su substrati fangoso-sabbiosi, fangoso-ghiaiosi e rocciosi.

Per alimentarsi filtra dall'acqua fitoplancton e particolato organico in sospensione. Coe (1943) nella classificazione delle varie forme di ermafroditismo definisce quello dell'*O. edulis* un ermafroditismo ritmico consecutivo. Generalmente si sviluppa come maschio nella fase iniziale della stagione riproduttiva per poi rilasciare gli spermatozoi ed entrare in fase funzionalmente femminile.

Una *O. edulis* in fase femminile del peso di 70-90 g produce da 1 a 2,5 milioni di uova che sono liberate nella cavità palleale dove vengono fecondate da spermatozoi prelevati dall'ambiente esterno per filtrazione. È una specie larvipara quindi dopo un periodo di incubazione delle larve di circa 8-10 giorni, dipendente dalla temperatura, quando queste misurano circa 160 μm, vengono rilasciate nell'ambiente dove trascorrono vita planctonica per altri 8-10 giorni prima di fissarsi al substrato.

51.2.2 Condizionamento dei riproduttori

Il condizionamento riproduttivo in cattività è basato sulla simulazione delle condizioni ambientali che determinano il ciclo riproduttivo naturale anche se in un intervallo di tempo di solito più breve. Nel caso di *O. edulis* la maturazione sessuale si realizza aumentando progressivamente la temperatura dell'acqua e fornendo all'animale adeguate dosi di fitoplancton.

Queste ostriche sono ermafrodite sincrone quasi sempre proterandriche e la fecondazione delle uova avviene nella camera di incubazione della femmina; la fecondazione in vitro risulta molto difficile da ottenere (Bierne *et al.*, 1998), i risultati hanno mostrato un tasso di sopravvivenza delle larve molto basso in seguito a questa pratica. La maturazione e l'induzione all'emissione sincronizzata delle larve restano

dal punto di vista tecnico ancora difficoltose rispetto ad altre specie di molluschi bivalvi. La pratica è quella di condizionare interi batches di riproduttori che spontaneamente si feconderanno emettendo in seguito le larve (Figs.16-17).

Il condizionamento dei riproduttori in impianti a circuito chiuso oltre che ottimizzare il consumo di alghe riduce notevolmente il rischio di apportare microorganismi patogeni nel sistema.

L'acqua di mare usata nella fase di condizionamento non dovrà essere sottoposta all'azione dei raggi UV e microfiltrazione (max 50-60 µm) per evitare di danneggiare gli spermatozoi emessi dai maschi maturi oltre che le alghe utilizzate per l'alimentazione.

Nel caso di allevamento in impianti a ricircolo l'accorgimento principale è quello di ridurre la biomassa per litro di acqua.

Anche il flusso di acqua in ingresso deve essere modulato secondo la biomassa stoccata; un esempio pratico è quello di stoccare, in un sistema a circuito aperto, circa 50 adulti del peso 80-100 g in vasche da 150 litri. Il minimo flusso d'acqua in queste condizioni di stoccaggio dovrebbe essere di 1-1,2 litri min⁻¹. In un sistema a ricircolo la biomassa va ridotta di almeno 2/3 o in ogni caso stabilita in base all'efficienza di depurazione del sistema in uso.

È buona norma tenere le vasche con i riproduttori in un locale separato dove gli animali ricevano meno disturbi possibile, questi infatti meno vengono disturbati e più tempo spendono a mangiare.

Durante il condizionamento riproduttivo le ostriche sono alimentate con alghe dei generi *Tetraselmis chuii*, *T. tetrahele*, *T. suecica*, *Isochrysis galbana* (e T-Iso clone), *Pavlova lutherii*, *Chaetoceros muelleri*, *Thalassiosira pseudonana*, *T. weisfloggii* e *Skeletonema costatum* allevate in loco o fornite sottoforma di pasta di alghe. La pratica comune è quella di utilizzare una miscela di 2 o 3 alghe al massimo. Vasche outdoor, in cui si effettua il bloom delle alghe di interesse, rappresentano una buona soluzione al problema.

Mix appropriati delle alghe sopra citate sono molto più efficienti di diete basate su singola specie. Specie relativamente indigeribili (e.g. *Chlorella* sp.) o conosciute per essere deficitarie in acidi grassi polinsaturi a lunga catena (e.g. *Dunaliella tertiolecta*) sono sconsigliate.

La quantità di alghe da somministrare dovrà corrispondere al 2-4% del peso secco della polpa degli animali stoccati. Speciali tabelle riportano i pesi delle varie alghe sui quali si possono costruire le diete più disparate per il condizionamento.

Nella Tab. 2 viene riportato un protocollo tipo, utilizzato con successo per il condizionamento dei riproduttori in acquari sperimentali a circuito chiuso.

Tab. 2 - Protocollo riassuntivo per il condizionamento di *Ostrea edulis*

Ostriche	<i>O. edulis</i> , peso medio 85 g, provenienti dalla pesca in fase di riposo gonadale
Salinità	37
Temperatura	da 15 a 23 °C, aumento di 1°C alla settimana
Volume del sistema	200-250 l volume vasche e circa 50 l volume filtro
Flussi	Flusso filtro acquario: 9-10 l/min; fermo durante alimentazione
pH	8,0 ± 0,2
Densità	1 mollusco / 5 l
Specie algali	<i>T. suecica</i> ed <i>I. galbana</i> in rapporto di 1:4 (V/V); nelle ultime settimane si consiglia anche ¼ del volume di <i>C. calcitrans</i>
Concentrazione algale nelle vasche	Dosare le alghe fino ad ottenere un valore medio in vasca di circa 50000 - 70000 alghe ml ⁻¹
Tempo di alimentazione	8-12 h d ⁻¹ nelle quali l'acqua delle vasche • statica mentre il filtro • in ricircolazione interna.

Nelle condizioni sopra indicate si ottiene la completa maturazione in 8-12 settimane di stabulazione. È buona norma sacrificare alcune ostriche durante le ultime settimane per valutare lo stato di maturazione e prepararsi alla raccolta delle larve.



Fig. 16 - Vasche di condizionamento a circuito chiuso

Fig.17- Esemplari adulti durante il condizionamento

51.2.3 Allevamento larvale

Le larve rilasciate dagli adulti vengono raccolte per sifonamento e concentrate su un filtro da 90 μm (Fig. 18). Un accorgimento può essere anche quello di riporre in cestelli rivestiti di rete da filtro gli adulti nelle fasi finali di maturazione sessuale e per tutta la durata di emissione delle larve. La rimozione di queste nel più breve tempo possibile dalle vasche di condizionamento previene la contaminazione delle larve ad opera del materiale fecale degli adulti, oltre che la loro stessa rimozione dall'acqua dovuta all'attività filtrante degli stessi. L'emissione delle larve non è in genere sincrona in ostriche dello stesso batch ma può durare per 1 o 2 settimane. Dopo la raccolta le larve vengono contate e distribuite in vasche oscurate all'appropriata densità di allevamento (generalmente 5-10 larve ml^{-1} riducendola progressivamente durante l'accrescimento, Fig.19).

Una tecnica alternativa è quella di rimuovere le larve dal genitore sacrificandolo quando sono sviluppate allo stadio di trocofora o di larva D, questo riduce i tempi di contatto con le acque di stabulazione dei riproduttori prevenendo eventuali infezioni.

L'allevamento di stadi giovanili di *O.edulis* richiede la continua produzione di microalghe. Di solito l'alimentazione prevede l'uso di flagellati combinati con diatomee fino all'ottenimento di una dieta bilanciata. Ottimi risultati sono stati ottenuti allevando le larve con una dieta composta da *I. galbana* e *C. calcitrans* nei primi giorni di allevamento aggiungendo in seguito anche *T. suecica* (Tab.3).

Per valutare in corso d'opera l'andamento dell'allevamento larvale è buona norma procedere alla misura della conchiglia in lunghezza (L) di un campione di larve rappresentativo e trasformarlo in peso secco DW con la seguente formula: $DW = 1,22 \times 10^{-6} L^{2,64}$.

Da questo dato è possibile calcolare il tasso di crescita specifico giornaliero (μ) come incremento percentuale giornaliero in peso secco con la formula:

$$\mu = \ln \left(\frac{DW_2}{DW_1} \right) \frac{100}{(t_2 - t_1)}$$

DW_1 e DW_2 sono i pesi secchi rispettivamente al tempo t_1 e t_2 (Beiras e Camacho, 1994).

Le larve evolvono allo stadio di pediveliger durante il quale tendono a stazionare sul fondo alla ricerca di un substrato idoneo alla fissazione e dopo circa 12-16 giorni dal rilascio si fissano completando la metamorfosi (Figs. 20-21). Per le larve fissate la densità di allevamento dovrà essere compresa tra 0,1 e 0,5 larve ml^{-1} .

Fino al compimento della metamorfosi un metodo molto usato di allevamento larvale è quello in discontinuo dove le larve sono accresciute in vasche. Ogni due giorni le larve sono filtrate su filtri dalle maglie di dimensione via via crescente, contate, misurate le lunghezze di un campione rappresentativo



Fig. 18 - Cilindro in rete di nylon di 90 μm per catturare le larve emesse dagli adulti

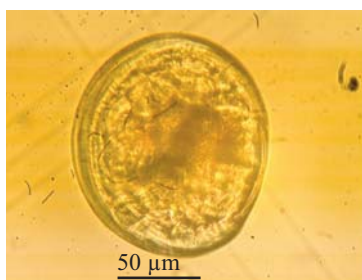


Fig. 19 - Larva veliger appena rilasciata dall'adulto



Fig. 20 -Larva pediveliger



Fig.21- Larva pediveliger in fissazione su substrato inerte

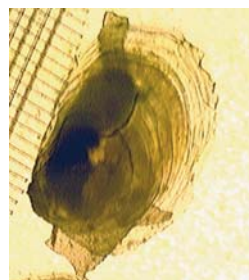


Fig.22 - Spat metamorfosata

di almeno 50-100 larve (per la metodica seguire quanto riportato nel paragrafo di *M. galloprovincialis*) e ridistribuite in volumi via via crescenti d'acqua di mare filtrata a 1 μm e sterilizzata con lampade UV. Un altro sistema di allevamento che permette densità di allevamento maggiori è quello in ricircolo d'acqua.

Il substrato utilizzato per la fissazione è rappresentato dai guschi di ostriche adulte resi inerti e triturati. La polvere di ostrica da utilizzare dovrà essere setacciata con rete da 500 μm ed essere trattenuta da una rete da 250 μm .

Una volta fissate le larve si accrescono in sistemi ad upwelling nei quali il flusso di acqua e alimento dal basso verso l'alto tiene delicatamente in sospensione le spat (Fig. 22).

Le larve fissate e cresciute sono cernite con un filtro da 4 mm; quelle trattenute dal filtro sono di dimensioni tali da poter essere trasferite direttamente a mare per l'accrescimento.



Fig.23 - Cestelli con maglie da 150 µm contenenti guschi di ostriche tritati (diametro da 250 a 500 µm) per la fissazione delle larve.

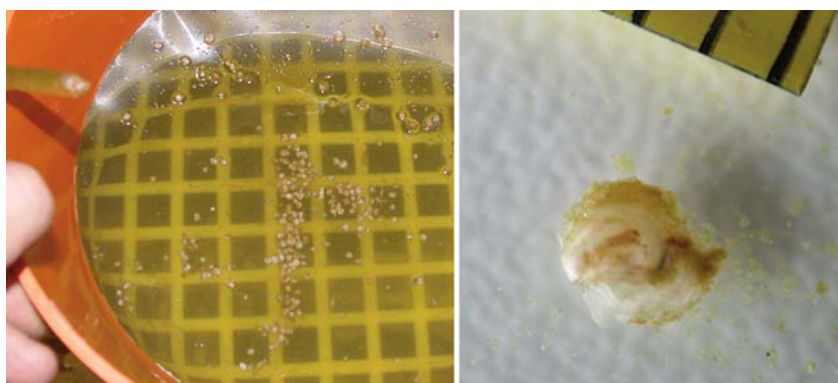


Fig.24 - Spat pronte per il trasferimento in mare

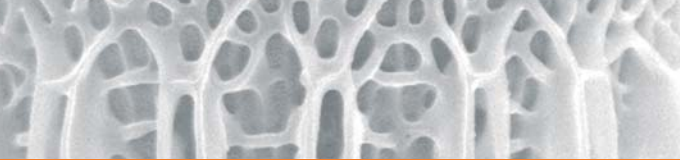
Tab.3 - Schema di alimentazione larvale di *Ostrea edulis*.

Giorno dalla raccolta delle larve	Lunghezza delle valve (µm)	Densità (n. larve ml ⁻¹)	Numero di alghe da somministrare per larva/die (da dividere in due somministrazioni al giorno)		
			<i>I. galbana</i>	<i>C. calcitrans</i>	<i>T.suecica</i>
0	170-190	5-10	10,000	10,000	
2	180-200	5-10	14.000	14.000	
4	200-230	3-5	27.000	27.000	6000
6	240-260	3-5	45.000	45.000	10000
8	250-280	1-3	54.000	54.000	12000
10	260-290	1-3	54.000	54.000	12.000
12	270-310	1	63.000	63.000	14.000

51.3 BIBLIOGRAFIA

- ASTM (2004) - Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. *American Society for Testing and Materials*. E724-89, PA: 334-351.
- BEIRAS R., PÉREZ CAMACHO A. (1994) - Influence of food concentration on the physiological energetics and growth of *Ostrea edulis* larvae. *Mar. Biol.*, **120**: 427-435.
- BIERNE N., LAUNEY S., NACIRI-GRAVEN Y., BONHOMME F. (1998) - Early Effect of Inbreeding as Revealed by Microsatellite Analyses on *Ostrea edulis* Larvae. *Genetics*, **148**: 1893-1906.
- BREBER P. (1996) - *L'allevamento della vongola verace in Italia*. Cleup, Padova, 157 pp.
- CAMACHO A.P., LABARTA U., BEIRAS R. (1995) - Growth of mussels (*Mytilus edulis galloprovincialis*) on cultivation rafts: influence of seed source, cultivation site and phytoplankton availability. *Aquaculture* **138**: 349-362.
- CECCHERELLI V.U., ROSSI R. (1984) - Settlement, growth and production of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **16**: 173-184.
- COE W.R. (1943) - Sexual differentiation in mollusks. I. Pelecypods. *Quad. Rev. Biol.*, **18**: 154 - 164.
- GUILLARD R.R.L. (1983)- Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Berg, C.J. (ed.) *Culture of marine invertebrates. Select readings...*, Hutchinson Ross Publishing Co., Stroudsburg, P.A. 108-132 pp.
- LE PENNEC M., MASSON M. (1976)- Morphogenèse de la conquille de *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) élevé au laboratoire. *Cah. Biol. Mar.*, **XVII**: 113-118.
- MATARRESE A., TURSIA A., COSTANTINO G., POLLICORO R. (1993)- The reproductive cycle of *Mytilus galloprovincialis* Lamarck in the Mar Piccolo and in the Mar Grande of Taranto (Ionian sea). *Oebalia*, **19**: 1-11.
- PASTORE M., PANETTA P., ANDREOLI C., DELL'ANGELO B. (1976) - Accrescimento di *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, nei mari di Taranto. *Oebalia*, **2**(1): 20-61.
- PASTORE M. (1980) - Riproduzione di *Mytilus galloprovincialis* Lmk ed *Ostrea edulis* L., nei mari di Taranto: collettori usuali e collettori sperimentali per l'attecchimento delle larve. I nota preliminare. *Memorie di Biologia Marina ed Oceanografia*, **10**: 247-254.
- RENZONI A. (1973) - Dati su accrescimento e ciclo riproduttivo di *Mytilus galloprovincialis* Lamk nella Sacca di Scardovari. *Boll. Pesca Piscic. Idrobiol.*, **28**: 205-216.
- SPRUNG M. (1984) - Physiological energetics of mussel larvae (*Mytilus edulis*). I. Shell growth and biomass. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **17**: 283-293.
- TUROLLA E. (1999) - Riproduzione controllata di bivalvi. *Laguna*, **5**:16-19.
- TUROLLA E., CASTALDELLI G., BARBIN L., ROSSI R. (2002) - Induzione all'emissione dei gameti in *Mytilus galloprovincialis* mediante l'impiego di due stimolanti chimici (KCl e H₂O₂). *Biol. Mar. Mediterr.* , **10**(2) :490-491.
- US EPA (1995)- *Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to West Coast Marine and Estuarine Organisms*. EPA/600/R-95/136, Cincinnati, Ohio, U.S.: 661 pp.

Finito di stampare nel mese di giugno 2010
dalla Tipolitografia CSR - Via di Pietralata, 157 - 00158 Roma
Tel. 064182113 (r.a.) - Fax 064506671



ISBN 978-88-448-0427-5



9 788844 804275