



CORSO DI FORMAZIONE SPECIALISTICO
Attuazione della Direttiva 2000/60/CE in Italia:

Metodi Biologici per la valutazione dello stato di qualità dei corsi d'acqua.

CAMPIONAMENTO E ANALISI DELLE DIATOMEE BENTONICHE DEI CORSI D'ACQUA

*Stefania Marcheggiani, Camilla Puccinelli,
Claudia Vendetti e Laura Mancini*

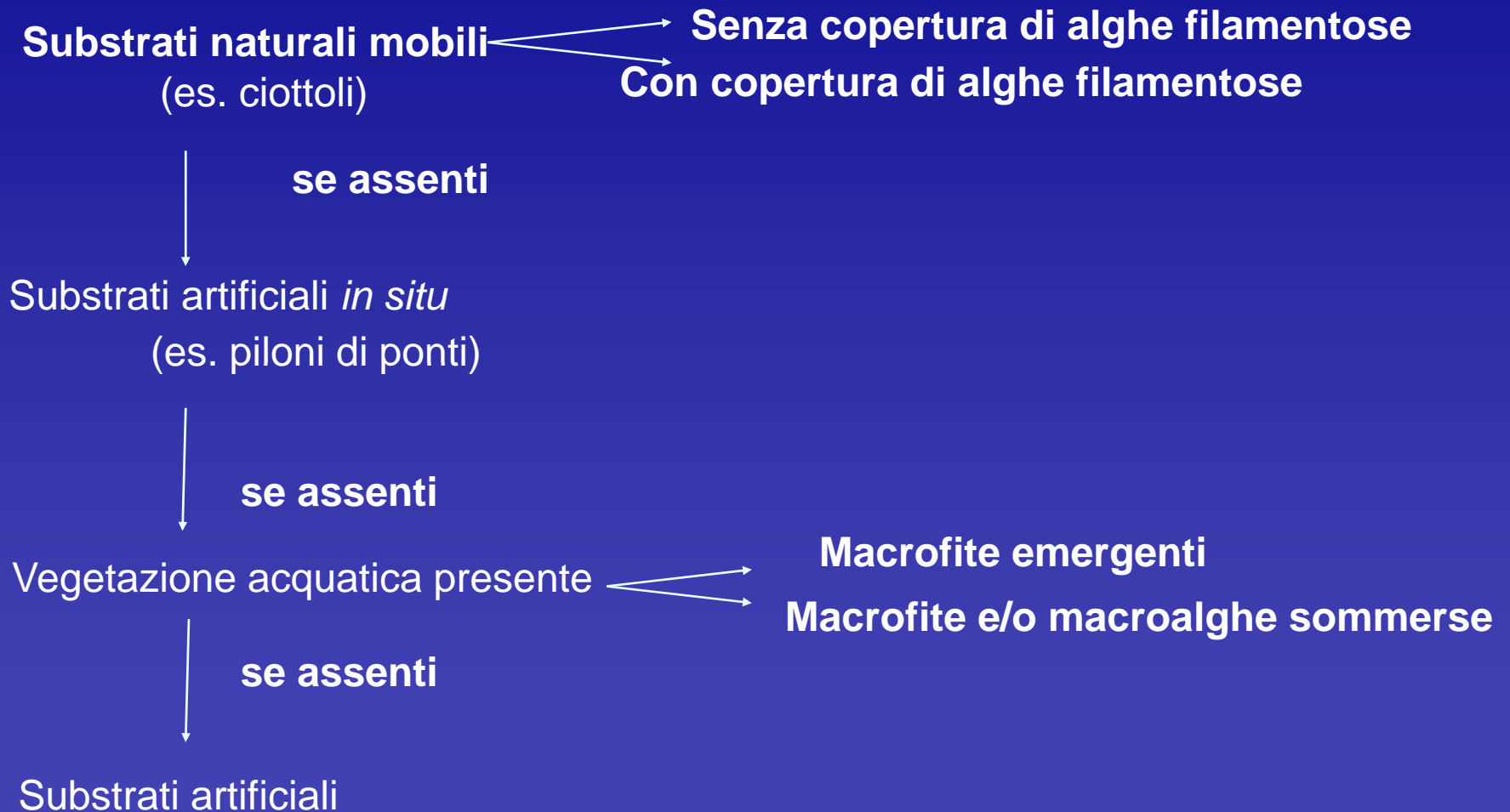
Viterbo 11- 15 ottobre 2010

Scelta della stazione

- Deve essere selezionato un tratto di fiume che presenti habitat e substrati di campionamento idonei, in particolare raschi;
- La lunghezza del tratto di fiume deve essere di almeno 10 m
- L'estensione dovrà comunque superare o essere almeno pari alla larghezza dell'alveo bagnato;

CAMPIONAMENTO

Scelta del substrato da campionare



Procedure Analitiche

in laboratorio

Procedure Analitiche

Operazioni preliminari

- o eliminazione di residui o materiale vegetale grossolano (setaccio);
- o analisi preliminare del campione al microscopio (anomalie es. elevato numero di frustuli vuoti);
- o preparazione del campione / stoccaggio in un luogo freddo e buio (frigorifero) / aggiunta di conservante;
- o conservazione di una parte del campione tal quale.

Procedure Analitiche

Conservazione del campione

- o Etanolo al 70% (consigliato)
- o Soluzione di formaldeide tamponata al 4% v/v (note sulla sicurezza)
- o Lugol (non è adatta per la conservazione a lungo termine)

La conservazione NON è necessaria se si prepara il campione entro alcune ore  frigorifero

PREPARAZIONE

- Per osservare i frustuli al microscopio, è necessario ossidare il campione per eliminare la materia organica presente
- Preparare i vetrini permanenti usando una resina ad alto indice di rifrazione (Naphrax)

Metodi per la pulizia dei frustuli

1) perossido di idrogeno a caldo

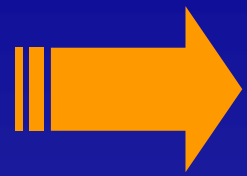
2) perossido di idrogeno a freddo

Più usati

*Non richiedono
l'uso di sostanze
pericolose*

3) perossido di idrogeno a caldo con potassio dicromato

4) acido a freddo e permanganato



Accorgimenti per evitare la contaminazione del campione !!

Per ogni campione dovrà essere utilizzato e opportunamente siglato :

- un beaker*
- una provetta di centrifugazione*
- una pipetta pasteur*
- una bacchetta di vetro*

PRIMA DI PROCEDERE

- omogenizzare il campione;

- prelevare piccola quantità (5-10 ml);

*Se il campione
è conservato*

- mettere in provetta per centrifuga;

- centrifugare a 1500 giri/min. per 10 minuti
ed eliminare il surnatante;

-mettere in un beaker

Procedere con uno dei metodi DI OSSIDAZIONE

Ossidazione del campione

Metodo 1: perossido di idrogeno a caldo

- o Omogeneizzare il campione e trasferire da 5 a 10 ml di sospensione in un beaker
- o Aggiungere circa 20 ml di perossido di idrogeno e riporre su piastra riscaldante fino a che tutta la sostanza organica non si sia ossidata e finchè nel beaker non siano rimasti pochi ml di sospensione.
- o Togliere il beaker o il provettone dalla piastra. Aggiungere alcune gocce di acido cloridrico al fine di rimuovere il perossido di idrogeno in eccesso ed i carbonati e lavare le pareti del beaker con acqua distillata o demineralizzata. Lasciare raffreddare sotto cappa.

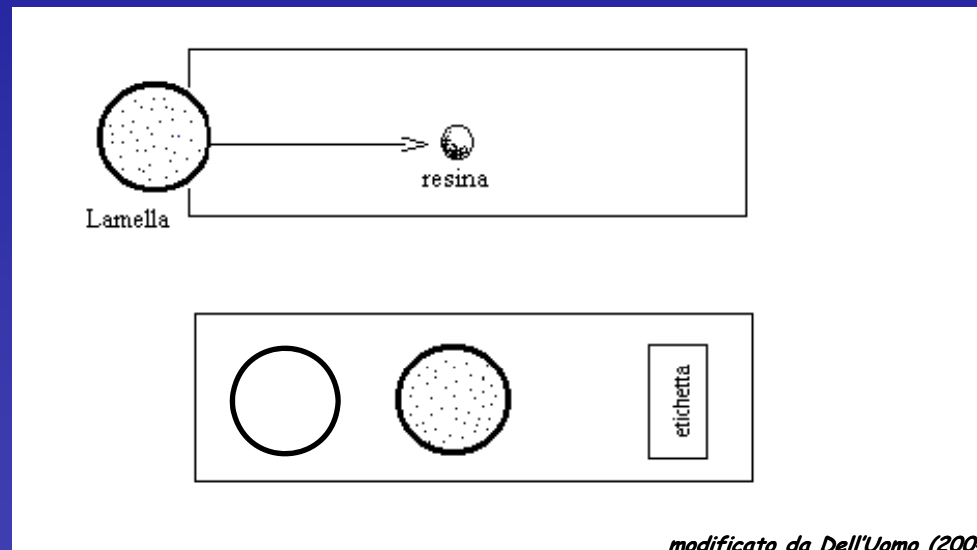
Reagenti

- soluzione di perossido di idrogeno al 30%;
- acido cloridrico diluito (HCl) 1M.



PREPARAZIONE dei vetrini permanenti 3

Si consiglia l'utilizzo di vetrini copri-oggetto di forma rotonda (diametro 11-13 mm) e di prepararne almeno due per ogni campione



Concentrazione ideale :
10 a 15 valve per campo ad un ingrandimento 1000X)

Metodo 1: perossido di idrogeno a caldo

- o Trasferire il contenuto del beaker in un tubo da centrifuga, portare a volume con acqua distillata e centrifugare a **1500 giri/min. per 10 minuti.**

- o Decantare la sospensione, eliminare il surnatante in eccesso, risospendere il contenuto con acqua distillata o demineralizzata e ripetere la centrifugazione.

Il processo di lavaggio dovrebbe essere ripetuto almeno 3 volte

- o mescolare il contenuto di diatomee in una piccola quantità di acqua distillata e trasferire in una fialetta pulita.

- o Aggiungere alcune gocce di etanolo, perossido di idrogeno o formalina tamponata per prevenire la crescita fungina. Il campione così preparato può essere conservato per un tempo illimitato.



PREPARAZIONE dei vetrini permanenti 1

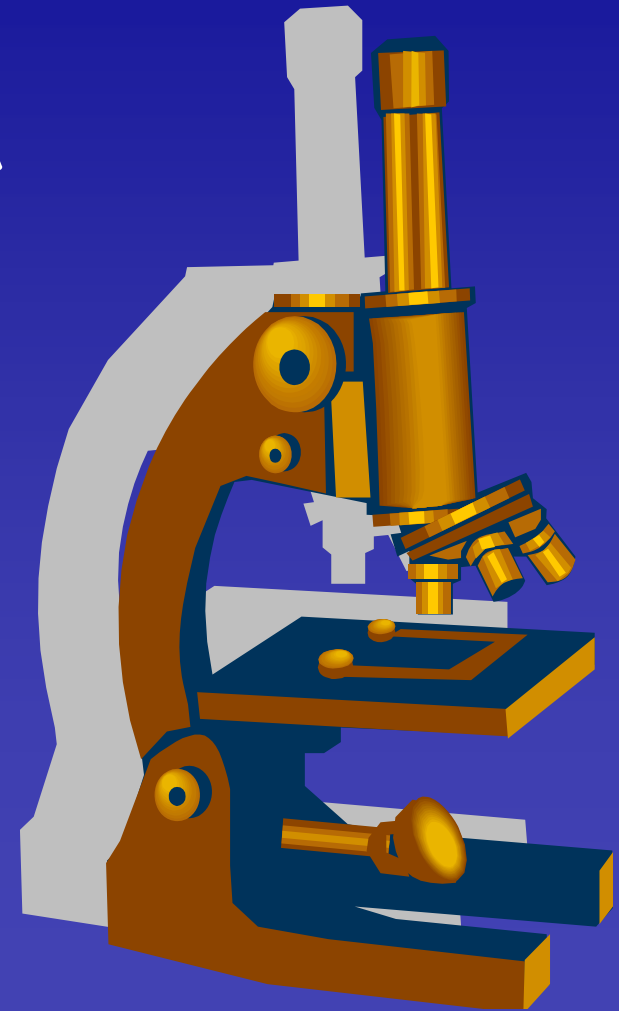
- o pulire i vetrini coprioggetto e portaoggetto ed etichettare il vetrino;
- o agitare la provetta contenente il preparato ossidato;
- o diluire il campione;
- o porre i vetrini coprioggetto direttamente sullo stesso vetrino portaoggetti;
- o prelevare con una pipetta pasteur una piccola quantità della diluizione omogenizzata e porla su un vetrino coprioggetto
- o lasciare asciugare la goccia senza polvere
oppure
sulla piastra riscaldante a bassa temperatura;

PREPARAZIONE dei vetrini permanenti 2

- o posizionare sul vetrino portaoggetti una goccia di resina al alto potere di rifrazione (es: Naphrax);
- o con una pinzetta prendere il coprioggetto e capovolgerlo sulla goccia, in modo che la superficie ricoperta dalle diatomee sia a contatto con la resina;
- o porre il vetrino così preparato su una piastra riscaldante a temperatura non troppo elevata (circa 90-100°C);
- o lasciare scaldare fino a che il solvente della resina non evapori completamente: nell'evaporazione produrrà delle bolle, esercitare una leggera pressione con la pinzetta per migliorare l'adesione;
- o lasciare raffreddare completamente il vetrino;
- o pulire il contorno del coprioggetto dalla resina in eccesso.

PREPARAZIONE dei vetrini permanenti 3

- o Le diatomee sono identificate a livello di specie - microscopio ottico (1000x)
- o 400 valve per campione



Tassonomia - analisi morfologica del frustulo

IMAGE ANALYS SYSTEM



Identificazione= larghezza, lunghezza e numero di strie in 10 μ m

Grazie per l'Attenzione

