



ISPRA

Istituto Superiore per la Protezione
e la Ricerca Ambientale

SCHEDA METODOLOGICA PER IL CAMPIONAMENTO E L'ANALISI DEL FITOPLANCTON

L'Elemento di Qualità Biologica Fitoplancton

Il fitoplancton rappresenta una componente fondamentale degli ecosistemi acquatici, in quanto alla base delle reti trofiche. La produzione primaria fitoplanctonica garantisce il flusso di materia ed energia necessario per il mantenimento degli organismi eterotrofi; ne consegue che eventuali alterazioni a carico della comunità fitoplanctonica, prodotte da effetti tossici o eutrofizzanti, possono modificare la struttura e il funzionamento di un intero ecosistema. Il fitoplancton è altresì importante come indicatore, dal momento che comprende un elevato numero di specie a differente valenza ecologica, moltissime delle quali sensibili all'inquinamento di tipo organico ed inorganico ed a variazioni di salinità, temperatura e livello di trofia.

Piano di campionamento

Fissare un numero significativo di stazioni per corpo idrico disposte possibilmente su un transetto ortogonale alla costa.

Parametri da analizzare e frequenza delle indagini

La frequenza minima di campionamento è pari a 6 volte l'anno (Tabella 1.)

Nei corpi idrici a rischio eutrofizzazione presenti nelle aree sensibili, in considerazione della elevata variabilità stagionale, sarebbe preferibile campionare il fitoplancton almeno una volta al mese e con una frequenza pari a 15 giorni nel periodo estivo.

Compatibilmente con le esigenze operative, sarebbe opportuno effettuare il campionamento sempre all'incirca alla stessa ora e possibilmente nelle ore centrali della giornata (10-14 ora solare).

Parametri	Frequenza delle indagini
Composizione (genere e specie), abbondanza (cell/L) e biomassa (concentrazione di clorofilla 'a') del fitoplancton superficiale. Segnalazione di fioriture di specie potenzialmente tossiche o nocive.	Bimestrale
Temperatura	Bimestrale e comunque in coincidenza del campionamento del fitoplancton
Salinità	
Ossigeno disciolto	
Nutrienti	
Trasparenza	
pH	

Tabella 1. Frequenze minime di campionamento per il monitoraggio di sorveglianza (ogni 6 anni) e per il monitoraggio operativo (ogni 3 anni) relativo al fitoplancton e agli elementi chimici e fisico-chimici a supporto.

Di seguito vengono riportate le indicazioni per il campionamento e l'analisi del fitoplancton (Magaletti et al., 2001; Magaletti et al., 2005).

Per la determinazione della clorofilla 'a' e degli elementi chimici e fisico-chimici a supporto del fitoplancton riportati in Tabella 1, si rimanda al manuale UNEP/MAP/MED POL (2005) *Sampling*

and Analysis Techniques for the Eutrophication Monitoring Strategy of MED POL. MAP Technical Reports Series n. 163. UNEP/MAP, Athens.

Campionamento

Il campionamento di acque superficiali (a circa 0,5 m di profondità) viene effettuato mediante bottiglia Niskin o, in alternativa, direttamente con un secchio. I campioni (250, 500 o 1000 ml) vanno conservati preferibilmente in bottiglie di vetro scuro con tappo ermetico mantenendoli in luogo fresco e non illuminato. Il travaso dei campioni deve avvenire immediatamente ed evitando di riempire le bottiglie fino all'orlo in modo da consentire, successivamente in laboratorio, l'agitazione del campione per renderlo omogeneo.

Conservazione dei campioni

I fissativi maggiormente utilizzati sono la soluzione di Lugol e la formaldeide (Thronsen, 1978); è buona pratica osservare prima della fissazione una frazione del campione fresco in quanto l'esame del campione non fissato può fornire utili informazioni per la caratterizzazione del colore, della morfologia e della motilità delle cellule fitoplanctoniche.

La soluzione di Lugol acida è il fissativo consigliato, in quanto meno tossico per l'operatore rispetto alla formaldeide. Questo fissativo è adeguato alla preservazione di dinoflagellati, diatomee anche poco silicizzate, e di specie delicate, quali piccoli flagellati; è meno indicato per i cocolitoforidei, in quanto può dissolvere il carbonato di calcio se preservati per tempi lunghi.

L'aggiunta di Lugol non è consigliata per la lettura a epifluorescenza e al microscopio a scansione.

Preparazione della soluzione di Lugol con acido acetico:

- 100 g potassio ioduro (KI)
- 1000 mL H₂O distillata
- 50 g iodio (I₂)
- 100 mL acido acetico (CH₃COOH)

Aggiungere 0,5 - 1 ml di soluzione di Lugol a 250 ml di campione. Se le cellule tendono a diventare troppo scure è possibile ottenere una colorazione meno intensa aggiungendo sodio tiosolfato.

I campioni fissati devono essere conservati al buio ed al fresco (1-5°C). I campioni possono essere conservati per più di dodici mesi, ma si raccomanda di controllare sempre la colorazione della soluzione: la colorazione con il tempo potrebbe divenire meno intensa a causa dell'ossidazione dello iodio, con conseguente riduzione delle proprietà fissative.

In alternativa alla soluzione di Lugol, in particolare per i laboratori che intendono effettuare degli approfondimenti tramite lettura ad epifluorescenza ed al microscopio elettronico a scansione (SEM), può essere usata la formaldeide.

Preparazione della formaldeide

- Formaldeide al 40% diluita al 20% con acqua distillata e tamponata preferibilmente con 100 g/L di esametilentetramina filtrata prima dell'uso. Il pH finale deve essere neutro o leggermente basico (7,0-7,2).
- La formaldeide (conservata a 5-6°C) va versata nel campione, in ragione di 20-40 mL/L a seconda della densità fitoplanctonica.

Analisi dei campioni (UNI EN 15204:2006)

L'analisi qualitativa e quantitativa del subcampione sedimentato segue il metodo della sedimentazione ovvero metodo di Utermöhl (1958).

Nella scelta del volume da mettere a sedimentare si può far riferimento ai valori di clorofilla *a* relativi al campione da analizzare. Dopo aver randomizzato il campione, capovolgendo

delicatamente la bottiglia almeno 100 volte, si sedimentano 10, 25, 50 o 100 ml di subcampione a seconda della densità fitoplanctonica.

Il conteggio verrà effettuato quando sarà completata la sedimentazione di tutti gli organismi. Si ritiene comunemente sufficiente un tempo pari a tre ore per ogni centimetro d'altezza del cilindro; si consiglia però, se possibile, di prolungare i tempi soprattutto per campioni ricchi di specie di dimensioni molto piccole.

Il conteggio delle cellule algali presenti va effettuato per campi casuali o transetti per le specie abbondanti, e sull'intera camera di sedimentazione per quelle poco abbondanti.

- conteggio per campi casuali: il numero dei campi casuali deve corrispondere ad almeno un centesimo dell'area totale della camera di sedimentazione per l'obiettivo utilizzato. Se il totale delle cellule fitoplanctoniche contato è inferiore a 200 aumentare il numero dei campi.
- conteggio per transetti: considerare due transetti diametrali, ortogonali fra di loro, e in caso di densità planctonica ridotta aumentarne il numero, in modo da contare almeno 200 cellule totali.

Per l'osservazione dovrà essere utilizzato un microscopio rovesciato con ingrandimento di circa 400X.

Il calcolo della densità fitoplanctonica va effettuato applicando le seguenti formule:

a) per conteggi su transetti passanti per il centro della camera di sedimentazione

$$C = (N \cdot \pi \cdot r \cdot 1000) / (2 \cdot h \cdot v \cdot n)$$

dove:

C = densità fitoplanctonica del campione, espressa come cellule/L

N = totale cellule contate su tutti i transetti

r = raggio (in mm) della camera di sedimentazione

h = altezza (in mm) del transetto

v = volume (in mL) del campione messo a sedimentare

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

b) per conteggi su campi di dimensioni pari al campo visivo

$$C = (N \cdot 1000 \cdot A) / (n \cdot v \cdot a)$$

dove:

C = densità fitoplanctonica del campione, espressa come cellule/L

N = totale cellule contate su tutti i campi

A = area totale della superficie di fondo della camera (in mm²)

n = numero dei campi sui quali si è effettuato il conteggio

v = volume (in mL) del campione messo a sedimentare

a = area del campo visivo considerato (in mm²)

Limite di detenzione (n_{det})

Il limite di detenzione è la concentrazione minimale di un taxon o gruppo specifico che permette la sua individuazione con una probabilità specifica. Per un singolo taxon, il limite di detenzione può essere determinato attraverso il modello di Poisson secondo la formula:

$$n_{det} = -\ln(a) \cdot f_{totale} / V \cdot f_{contato}$$

dove:

- n_{det} = limite di detenzione
 α = livello di significatività (di solito 0,05 che corrisponde ad una probabilità del 95%)
 f_{totale} = numero totale dei campi sull'intero fondo della camera di sedimentazione
 $f_{contato}$ = numero di campi esaminati
 V = volume del subcampione esaminato (in litri)

Si rende necessario specificare tale limite in quanto definisce il numero minimo di uno specifico taxon o gruppo di organismi in un campione che può essere contato con una certa probabilità.

Ad esempio, per un livello di significatività pari a 0,05 ed un volume di campione di 25 mL, il limite di detenzione, in caso di conteggio su tutto il fondo della camera, sarà uguale a 120. In questo caso se al termine della lettura si ottengono le seguenti concentrazioni:

taxon A = 4000 cell/L

taxon B = 400 cell/L

taxon C = 80 cell/L

l'operatore dovrà indicare l'abbondanza del taxon C non 80 cell/L ma < 120 cell/L.

Conta diretta del nanoplancton mediante microscopio ad epifluorescenza (facoltativa)

Conservazione dei campioni

I campioni di acqua (250 mL) sono conservati in bottiglie di plastica scura, fissati con gluteraldeide prefiltrata a 0,22 μm (concentrazione finale 1%) e mantenuti al buio, a +4 °C, fino alla preparazione dei vetrini che deve avvenire entro pochi giorni dal campionamento.

Analisi dei campioni

Le analisi vengono eseguite utilizzando il metodo indicato in Sherr e Caron (1983), che prevede l'osservazione mediante microscopio ad epifluorescenza. Un'aliquota pari a 20 ml di campione viene filtrata (48 kPa) su filtri neri di policarbonato (2 μm il diametro dei pori; 25 mm il diametro dei filtri) sotto ai quali viene posto un filtro Millipore (0,45 μm) per favorire la dispersione omogenea del campione.

Durante la filtrazione, agli ultimi 2 ml di campione vengono aggiunti 2 μL di una soluzione DAPI (1 mg/mL di acqua distillata prefiltrata a 0,2 μm) e, in assenza di vuoto, lasciati al buio per 15 minuti per consentire la formazione di un complesso DNA-DAPI. Il filtro deve essere conservato al buio, a -20°C, fino all'osservazione al microscopio ad epifluorescenza. Il filtro viene trasferito su un vetrino portaoggetto su cui era stata posta una goccia di olio ad immersione. Un'altra goccia di olio viene messa sul filtro che viene poi coperto con un vetrino coprioggetto. L'osservazione viene effettuata al microscopio utilizzando un ingrandimento finale di 1000x.

La frazione eterotrofa viene contata utilizzando set di filtri ad eccitazione UV (BP 340-380, una lamina dicromatica RKP 400 e un filtro di sbarramento LP 430) mentre per la frazione autotrofa si opera in luce blu con un filtro di eccitazione BP 450-490, una lamina dicromatica RKP 510 e un filtro di sbarramento LP 510. Il numero dei campi osservati (in genere 20-30) dipende dalla concentrazione del campione (conteggio di un numero minimo di cellule pari a 200).

Calcolo della densità del nanoplancton:

$$\text{cell/mL} = N (A_f / A_c) \cdot 1 / V$$

dove:

N = numero medio di cellule contenuto in un campo

A_f = area di filtrazione
 A_c = area del campo
 V = volume del campione filtrato (in mL)

Conta diretta del picoplancton mediante microscopio ad epifluorescenza (facoltativa)

Conservazione dei campioni

I campioni di acqua (250 mL) sono conservati in bottiglie di plastica scura, fissati con gluteraldeide prefiltrata a 0,22 μm (concentrazione finale 1%) e mantenuti al buio, a +4 °C, fino alla preparazione dei vetrini che deve avvenire entro pochi giorni dal campionamento.

Analisi dei campioni

Le analisi vengono eseguite utilizzando il metodo di Porter e Feig (1980) modificato che prevede l'osservazione mediante microscopio ad epifluorescenza.

Un'aliquota di 2-3 ml di campione a cui si aggiungono 2-3 μL di soluzione DAPI (1 mg/mL di acqua distillata prefiltrata a 0,2 μm) viene posta al buio per 15 minuti e successivamente filtrata (48 kPa) su un filtro nero di policarbonato (2 μm il diametro dei pori; 25 mm il diametro del filtro), sotto al quale viene posto un filtro Millipore (0,45 μm) per favorire la dispersione omogenea del campione. Il filtro nero viene conservato al buio, a -20 °C, fino all'osservazione al microscopio ad epifluorescenza. Il filtro viene trasferito su un vetrino portaoggetto su cui era stata posta una goccia di olio ad immersione. Un'altra goccia di olio viene messa sul filtro che viene poi coperto con un vetrino coprioggetto. Il vetrino, così preparato, può essere conservato al buio, a +4 °C, anche fino a 24 settimane. L'osservazione viene fatta al microscopio utilizzando un ingrandimento finale di 1000x.

La frazione eterotrofa viene contata utilizzando set di filtri ad eccitazione UV (BP 340-380, una lamina dicromatica RKP 400 e un filtro di sbarramento LP 430) mentre per la frazione autotrofa si opera in luce blu utilizzando un filtro di eccitazione BP 450-490, una lamina dicromatica RKP 510 e un filtro di sbarramento LP 510.

Il numero dei campi osservati (20-30) dipende dalla concentrazione del campione (numero minimo di cellule: 200).

Calcolo della densità del picoplancton:

$$\text{cell/mL} = N (A_f / A_c) \cdot 1 / V$$

dove:

N = numero medio di cellule contenuto in un campo
 A_f = area di filtrazione
 A_c = area del campo
 V = volume del campione filtrato (in mL)

Bibliografia

- Magaletti, E., Ghetti, A., Cabrini, M. e M. Pompei. 2001. Fitoplancton. In: Metodologie analitiche di riferimento. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001-2003). Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, Servizio Difesa Mare – ICRAM. ICRAM 2001.
- Magaletti, E., Pompei, M., Giovanardi, F. 2005. Phytoplankton Determinations. In: UNEP/MAP/MED POL: Sampling and Analysis Techniques for the Eutrophication Monitoring Strategy of MED POL. *MAP Technical Reports Series n. 163*. UNEP/MAP, Athens.

- Porter, K.G., e Feig, Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25: 943-948.
- Sherr, E.B., e Caron, D.A. 1983. Technique for enumeration of heterotrophic and phototrophic nanoplankton using epifluorescence microscopy and comparison with other procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 491-498.
- Thronsen, J. 1978. Preservation and storage. In: Sournia A. (ed) Phytoplankton manual. *Monographs on oceanographic Methodology* 6: 69-74. UNESCO, Paris.
- UNI EN 15204 : 2006. Water quality- Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique).
- Utermöhl, H. 1958. Zur vervollkommung der qualitativen Phytoplankton metodik. *Mitt. Int. Verein. Limnol.* 9: 1-38.

Alcuni manuali consigliati per l'identificazione del fitoplancton marino:

- Avancini, M., Cicero, A.M., Di Girolamo I., Innamorati M., Magaletti, E., Sertorio Zunini, T. (eds.). 2006. Guida al riconoscimento del plancton nei mari italiani. Vol. I – Fitoplancton, 503 pp. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare – ICRAM, 2006. Roma.
- Chrétiennot-Dinet, M. J. 1990. Atlas du Phytoplankton Marin. Volume III: *Chlorarachniophycées, Chlorophycées, Chrysophycées, Cryptophycées, Euglenophycées, Eustigmatophycées, Prasinophycées, Prymnésiophycées, Rhodophycées et Tribophycées*. Edition du CNRS, pp. 261.
- Horner R.A. 2002. A taxonomic guide to some common marine phytoplankton. Edition Biopress Ltd., pp. 195.
- Ricard, M. 1987. *Atlas du Phytoplankton Marin. Volume II: Diatomophycées*. Edition du CNRS, pp. 297.
- Sournia, A. 1986. Atlas du Phytoplankton Marin. Volume I: *Introduction, Cyanophycées, Dictyochophycées, Dinophycées et Raphidophycées*. Edition du CNRS, pp. 219.
- Tomas, R.C. 1997. Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press, pp. 858.

A CURA DI:

ERIKA MAGALETTI (ISPRA, ROMA)

CRISTINA MAZZIOTTI (STRUTTURA OCEANOGRAFICA DAPHNE, ARPA EMILIA ROMAGNA)

MARINELLA POMPEI (CENTRO RICERCHE MARINE, CESENATICO)