Capitolo III

MATERIALI E METODI

3.1 PIANO DI CAMPIONAMENTO

Durante l'intervallo temporale che va da maggio 2006 a settembre 2007 sono stati effettuati campionamenti volti a mettere in evidenza la dinamica delle frazioni fitoplanctoniche rispetto a diverse scale spaziali e temporali:

1- Campionamento stagionale in dieci stazioni distribuite nell'intera laguna (**Fig. 3.1** e **Tab. 3.I**.), nei seguenti mesi:

primavera	3-4 maggio 2006
estate	5-6 settembre 2006
autunno	30-31 ottobre 2006
inverno	20-21 febbraio 2007
estate 2007	23-24 luglio e 17-18 settembre

2- Campionamenti mensili e per tutto l'intervallo temporale considerato, effettuati in sole cinque stazioni poste nella parte meridionale della laguna (Stazioni: M, A, C, D, E), al fine di meglio individuare le scale temporali della componente biologica.

Per ogni stazione, sono stati misurati, in continuo e lungo la colonna d'acqua, i valori di temperatura, salinità e ossigeno. Alla quota superficiale, sono stati raccolti campioni d'acqua destinati all'analisi di nutrienti (NH_4, NO_2, NO_3, PO_4, SiO_2), biomassa fitoplanctonica (totale e frazionata) e valutazione dello spettro pigmentario per ciascuna frazione.

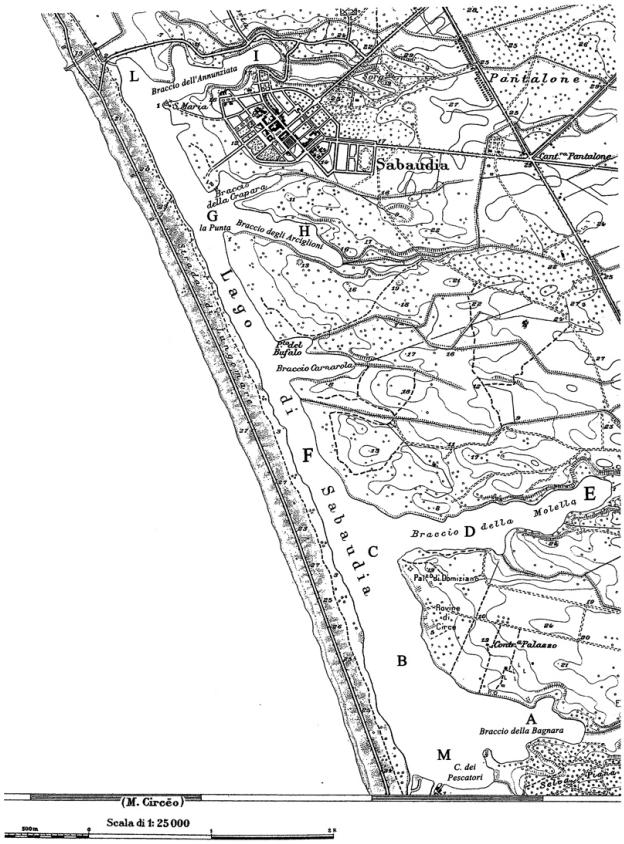

Fig. 3.1 – Sabaudia: siti di campionamento

Tabella 3.I - Coordinate geografiche e profondità delle stazioni di campionamento.

STAZIONE	LATITUDINE	LONGITUDINE	PROFONDITÀ
M	41°15'06.6"N	13°02'37.6"E	1.30 m
A	41°15'19.5"N	13°03'02.1"E	5.00 m
C	41°16'10.9"N	13°02'12.1"E	11.50 m
D	41°16'12.7"N	13°02'28.0"E	9.50 m
E	41°16'24.0"N	13°03'19.8"E	5.50 m
F	41°16'37.1"N	13°01'42.4"E	4.50 m
G	41°17'39.0"N	13°01'13.1"E	7.00 m
H	41°17'32.2"N	13°01'41.4"E	5.80 m
I	41°18'17.0"N	13°01'13.0"E	4.50 m
L	41°18'14.6"N	13°00'40.2"E	3.00 m

3.2 METODICHE DI CAMPIONAMENTO

I profili verticali di salinità, temperatura e ossigeno sono stati ottenuti mediante un CTD SBE 911 Plus (*Conducibility-Temperature-Depth*).

Per la determinazione della biomassa fitoplanctonica totale e del relativo spettro pigmentario, sono stati raccolti alla quota superficiale campioni d'acqua con l'ausilio di una bottiglia Niskin da 12 litri. I campioni sono stati filtrati, immediatamente sul sito di raccolta, su filtri di fibra di vetro *GFF Whatman* da 25 mm di diametro (foro passante 0,8 μm, potere di ritenzione 0,45 μm).

Per la valutazione del contributo delle diverse frazioni dimensionali, i campioni di acqua sono stati filtrati in modo sequenziale su un retino da fitoplancton con foro passante da 20 μm e successivamente su filtro di fibra di vetro *GFF Whatman* da 25 mm di diametro (GFF < 20μm). Questa operazione consente di valutare il contributo della classe dimensionale compresa tra 20 e 0,45 μm. Per la valutazione della classe dimensionale pico-fitoplanctonica, i campioni di acqua di mare sono stati filtrati su membrane di policarbonato *Nuclepore* (∅ 47 mm), con foro passante da 2 μm e, successivamente, su filtri di fibra di vetro *GFF Whatman* da 25 mm di diametro (GFF < 2 μm).

Il contributo delle differenti frazione dimensionali alla biomassa totale è stato calcolato secondo il seguente schema:

biomassa totale = (GFF Tot.)

micro-fitoplancton (> 20 μm) = (GFF Tot.) - (GFF < 20 μm);

nano-fitoplancton (20-2 μm) = (GFF < 20 μm) - (GFF <2 μm);

pico-fitoplancton (< 2 μm) = (GFF < 2 μm).

Le aliquote di campione sono state decise di volta in volta in base alla colorazione del filtro. I campioni sono stati filtrati a bassa intensità di luce e con depressione non superiore a 0.5 atmosfere.

3.3 PROCEDURE ANALITICHE

3.3.1. Nutrienti

I nutrienti saranno analizzati secondo le metodiche in Innamorati *et al.* (1990).

3.3.2. Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

I pigmenti sono stati estratti in 5 ml metanolo al 100%, poi filtrati su filtri *GF/F WHATMAN* (Ø 25 mm) e il volume recuperato misurato con siringhe di precisione Hamilton. A 0.5 ml di estratto sono aggiunti, prima d'iniettare il campione, 250 µl di soluzione di acetato d'ammonio 1 N. Il campione è poi iniettato nello strumento in maniera che prima di raggiungere la colonna attraversi un loop di 200 µl. Va ricordato che durante tutte queste operazioni si lavora a bassi livelli di luce per evitare che i pigmenti vengano alterati. La tecnica di analisi utilizzata è quella di Vidussi *et al.*, (1996).

Lo strumento utilizzato è un Hewlett Packard mod.1100, costituito da:

- una pompa quaternaria con programmatori di gradienti Hewlett Packard,
- un sistema di degasaggio dei solventi,
- una colonna per cromatografia in fase inversa (MOS C8, 3 µm, 100x4,6 mm, Sigma-Aldrich),
- uno spettrofotometro a diodi Hewlett Packard (DAD) settato a 440 nm per la determinazione delle clorofille e dei carotenoidi. Esso, infatti permette di determinare lo spettro di assorbimento che è specifico di ciascun pigmento nell'intervallo tra 350 e 750 nm.
- uno spettrofluorimetro Hewlett Packard con lunghezze d'onda d'eccitazione a 410 nm e d'emissione tra 420 e 4700 nm, che permette la determinazione delle clorofille e dei loro prodotti di degradazione.

Uno dei vantaggi più importanti di questa metodologia è la sua capacità di fornire, oltre ad un'analisi di tipo qualitativo, anche informazioni quantitative. Esiste, infatti, una correlazione tra le aree al di sotto dei picchi ottenuti e la quantità di pigmento presente nel campione.

La calibrazione dello strumento è stata eseguita secondo la procedura di Mantoura e Repeta (1997).

In Tab. 3.II si riportano i pigmenti diagnostici dei gruppi tassonomici (da Jeffrey e Mantoura, 1997, modificata):

Tab. 3.II -

Pigmento	**Divisioni algali/Classi**
Peridinina	Dinophyta
Fucoxantina	Bacillariophyta
19'esanoiloxifucoxantina	Prymnesiophyta
Alloxantina	Cryptophyta
Zeaxantina	Cyanophyta
Clorofilla *b*	Chorophyta

3.4 TRATTAMENTO DEI DATI

I dati sono stati preventivamente trasformati secondo le relazioni $x'=\log_{10}(x)$ e $x'=\sqrt{\text{arcsen}(x)}$ (per i valori percentuali) per rendere i dati il più possibile conformi alle assunzioni di normalità e di omogeneità della varianza.

Al fine di individuare patterns spaziali e temporali è stata effettuata l'Analisi delle Componeni Principali (PCA) con l'ausilio del programma "Statistica". Per ciò che riguarda i pigmenti, sono stati anche utilizzati i coefficienti di correlazione di rango di Spearman e Kendall i cui valori sono stati calcolati utilizzando il programma "Past".

Per verificare se fra le matrici di distanza fra le stazioni relative a periodi differenti ci fosse o meno dipendenza, si è proceduto ad applicare il Test di Mantel basato sulla distanza della corda.

Infine, per visualizzare le relazioni esistenti fra i campioni prelevati nelle diverse stazioni e nei diversi periodi in tutta la laguna è stato condotto un nMDS (non-metric **M**ulti **D**imensional **S**caling) su una matrice di distanze euclidee fra i dati trasformati in logaritmo. L'ordinamento ottimale è stato ottenuto effettuando 100 ripetizioni, un'analisi possibile con l'utilizzo del programma "Primer".