

Esercitazione n°1. Analisi di un campione di suolo

Il suolo è uno strato di spessore variabile che si forma sulla superficie della crosta terrestre, la Geosfera, e che si trova a contatto con l'Atmosfera e l'Idrosfera; il suolo svolge molti processi necessari ed indispensabili allo sviluppo della vita (Fig. 1.1). Il suolo è il substrato che consente lo sviluppo delle piante, è il fattore principale che controlla il destino dell'acqua negli ambienti terrestri; è una riserva di sostanze nutritive, un sistema di riciclaggio della natura, dove i prodotti di scarto di piante ed animali vengono decomposti e trasformati nei loro elementi costitutivi di base (FAO-ISRIC-IUSS, 2006); infine è un habitat per numerose forme viventi, dai piccoli batteri alle innumerevoli forme di vita macroscopica.

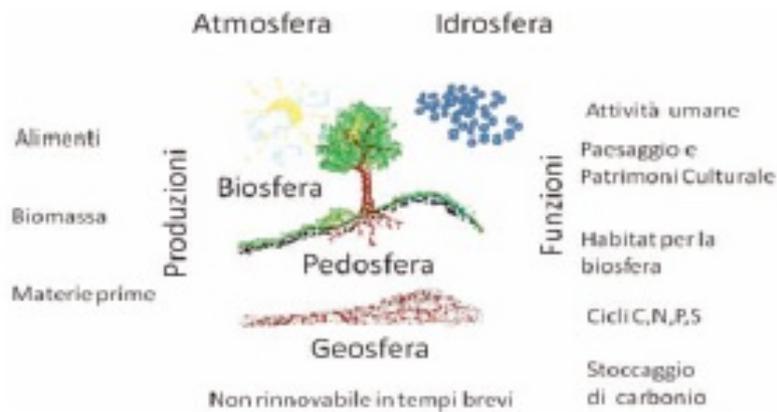


Figura 1.1. Il suolo è un sottile strato che si forma sulla superficie della crosta terrestre (Geosfera) e che si trova a contatto con l'Atmosfera, l'Idrosfera e che svolge molti processi necessari allo sviluppo della vita (Biosfera) (modificato da Colombo et al., 2011).

Il suolo può essere considerato una entità vivente, dotata di struttura propria che respira (fissa ossigeno ed emette anidride carbonica), assimila (sintetizza sostanza organica e fissa azoto), degrada e mineralizza le sostanze organiche, accumula prodotti di riserva nell'humus e ha bisogno di acqua, come tutti i sistemi biologici (Florenzano, 1989).

Tagli, pascolo ed incendi vanno ad inserirsi in questa delicata rete di interrelazioni, inducendo cambiamenti chimico-fisici e biologici ai quali l'ecosistema può o meno adattarsi. Il cambiamento della vegetazione e delle caratteristiche chimico-fisiche e biologiche dei suoli è associato naturalmente alle variazioni della maggior parte dei processi edafici, primo fra tutti quello decompositivo, che ha un ruolo chiave nel riciclo dei nutrienti particolarmente critico negli ecosistemi mediterranei, dove i suoli sono generalmente poveri di nutrienti.



Descrizione di un campione di suolo

L'esercitazione sarà condotta su campioni di suolo precedentemente prelevati dal Docente dai giardini del Complesso di Monte Sant'Angelo e sottoposti ad analisi che hanno escluso la presenza di organismi patogeni.

Lo studio di un suolo può risultare particolarmente complesso, comunque alcune proprietà risultano basilari per la descrizione del campione. Caratteristiche fondamentali risultano essere il **colore**, la **tessitura**, la **pietrosità**, la **struttura**, la **presenza di carbonato di calcio**.

- 1) **COLORE DEL SUOLO**: il colore è determinato con un sistema standard di riferimento basato sul sistema Munsell (tavole della Munsell Soil Color Chart).



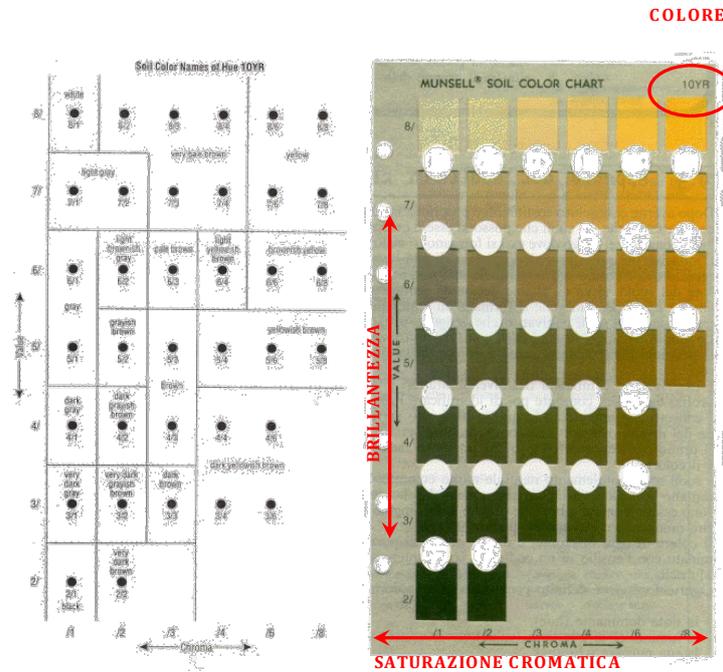
MUNSELL SOIL COLOUR CHARTS

Nel sistema Munsell, il colore è analizzato secondo tre elementi:

HUE (COLORE-spettro base dei colori)- i colori del visibile sono divisi in 10 livelli, ciascuno dei quali viene indicato da una o due lettere maiuscole;

VALUE (BRILLANTEZZA)- scala da 0 a 10 che si ottiene aggiungendo al colore il nero (basso valore) o il bianco (alto valore);

CHROMA (SATURAZIONE CROMATICA)- indica le intensità di colore in una scala da 0 a 10, dove 10 rappresenta la massima brillantezza che si riduce gradualmente come se si aggiungesse acqua al colore.



L'ordine nella descrizione del colore del suolo nel sistema Munsell è: hue, value e chroma (Es.: 7,5 YR 3/2).

2) **TESSITURA DEL SUOLO:** rappresenta la distribuzione per classi di grandezza delle particelle elementari del suolo. Le particelle con dimensioni superiori ai 2 mm costituiscono “lo scheletro” del suolo (ghiaia e ciottoli), le particelle di dimensioni inferiori ai 2 mm costituiscono “la terra fine” che comprende sabbia, limo ed argilla (in ordine decrescente). Le proporzioni relative delle diverse classi granulometriche possono essere valutate attraverso una procedura chiamata di “valutazione al tatto”. Questa procedura prevede che il campione di suolo venga inumidito e manipolato tra le dita considerando che la sabbia, risulta granulosa al tatto, il limo risulta liscio e setoso come il talco, e l’argilla risulta appiccicosa.

Procedimento:

1 - un cucchiaino di suolo viene inumidito tra le mani eliminando eventuali pietre presenti;

2 - che sensazione dà il suolo?

- | | |
|----------------------------|---------------------|
| Granuloso | passare al punto 3 |
| Setoso | passare al punto 5 |
| Appiccicoso | passare al punto 10 |
| Pastoso | passare al punto 5 |
| Nessuna o non siete sicuri | passare al punto 3; |

3 – cercate di fare una pallina di suolo rotolandola tra i palmi delle mani:
è impossibile

- | | |
|------------------------------------|---|
| si riesce ma con grande difficoltà | Sabbia |
| si riesce facilmente | Sabbioso franco
passare al punto 4; |

4 – cercate di schiacciare la pallina tra pollice ed indice:
si sbriciola **Franco sabbioso**
si appiattisce passare al punto 5;

5 – fate una pallina e cercate di ricavare un cilindretto, prima di circa 1 cm di diametro, e poi più sottile (circa mezzo cm):
non si può formare nessun cilindretto **Sabbioso franco**
si può formare solo un cilindretto grande **Franco sabbioso**
si possono formare i due cilindretti passare al punto 6;

6 - cercate di piegare il cilindretto a forma di ferro di cavallo:
è impossibile passare al punto 7
si riesce passare al punto 8;

7 – manipolate nuovamente il terreno tra le dita e sentite qual è la sensazione:
il suolo è ruvido e granuloso **Limoso sabbioso**
il suolo è setoso **Franco limoso**
il suolo è appiccicoso e ruvido passare al punto 8

8 – rimpastare e cercate nuovamente di piegare il cilindretto a forma di ferro di cavallo:
passare al punto 9

9 – cercate di riunire le due estremità del ferro di cavallo a formare un cerchio di circa 2,5 cm di diametro, senza che si formino fratture:
si può fare passare al punto 10
non si può fare passare al punto 12

10 – modellate il terreno a forma di pallina e appiattite tra indice e pollice fino a produrre una superficie liscia:
la superficie liscia presenta qualche irregolarità passare al punto 12
la superficie è regolare con piccole particelle granulose **Argilloso sabbioso**
la superficie è regolare con pochissime o nessuna irregolarità passare al punto 11

11 – manipolate il suolo tra le dita e sentite qual è la sensazione:
il suolo è liscio come sapone ed ha lucentezza **Argilla**
il suolo è setoso e opaco **Argilloso limoso**

12 – formate di nuovo una pallina e manipolatela tra le dita per giudicare la condizione al tatto:
il suolo risulta molto ruvido **Franco sabbioso argilloso**
il suolo è abbastanza ruvido **Franco argilloso**
il suolo risulta pastoso e liscio **Franco limoso argilloso**

3) CONTENUTO IN PIETRE:

la quantità di pietre si deduce ad occhio nudo come percentuale in volume di pietre:

pietrosità assente	< 1%
pietrosità molto lieve	1-5%
pietrosità lieve	6-15%
pietrosità moderata (pietre frequenti)	16-35%
pietrosità alta (pietre abbondanti)	36-70%
pietrosità molto alta (pietre molto abbondanti)	> 70%

la dimensione delle pietre può essere stimata tenendo conto del diametro o della dimensione più lunga:

pietre molto piccole	2-6 mm
pietre piccole	6 mm – 2 cm
pietre medie	2-6 cm
pietre grandi	6-20 cm
pietre molto grandi	20-60 cm
massi	> 60 cm

Può essere inoltre annotata la forma delle pietre:

arrotondate
angolari
tabulari
piatte

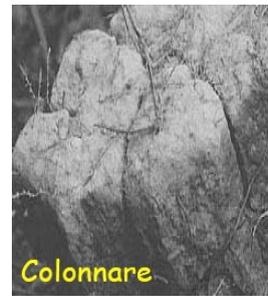
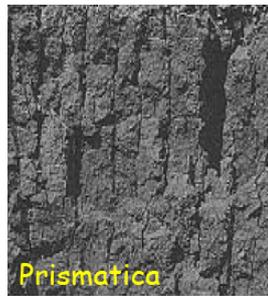
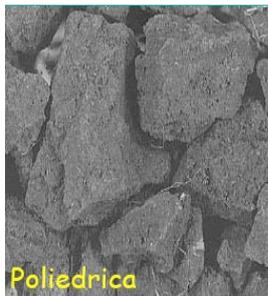
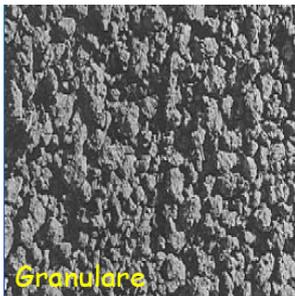
4) **STRUTTURA DEL SUOLO:** la struttura del suolo può essere descritta secondo il suo grado di sviluppo, la dimensione e la forma degli aggregati.

Grado di sviluppo della struttura del suolo:

assente
aggregazione debolmente sviluppata
aggregazione moderatamente sviluppata
aggregazione fortemente sviluppata

La dimensione degli aggregati si effettua secondo la scala molto fine, fine, medio, grossolano o molto grossolano.

La forma degli aggregati



5) **PRESENZA DI CARBONATO DI CALCIO:** per determinare la presenza di carbonato di calcio nel suolo si può utilizzare acido cloridrico (2 N o 10 %), *usando gli opportuni dispositivi di sicurezza*, ed osservare la reazione.

Suolo non calcareo con un contenuto di carbonati <1%

Suolo scarsamente calcareo con un contenuto di carbonati 1-5%

Suolo calcareo con un contenuto di carbonati 5-10%

nessun effetto all'udito e alla vista

effervescenza moderatamente udibile e scarsamente visibile

effervescenza udibile e piccole bolle visibili (fino a 3 mm di diametro)

BIOMASSA FUNGINA

È possibile realizzare determinazioni di biomassa fungina totale nel suolo che comprende le ife morte, attive ed inattive al momento del campionamento, utilizzando un microscopio ottico.

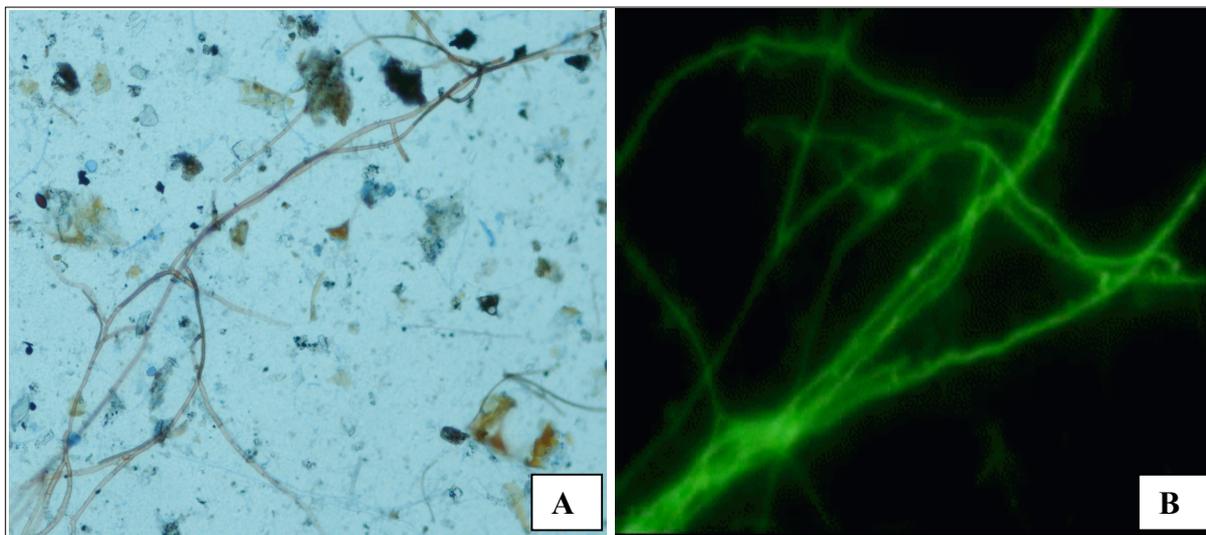
La metodica prevede la sospensione di 1 g di suolo fresco in 100 ml di una soluzione di tampone fosfato (60 mM, pH 7.5), il tutto viene omogeneizzato a 6000 giri per 2 minuti. Con una pipetta sono prelevati 0,5 ml di sospensione e filtrati sotto vuoto su filtri di nitrocellulosa con diametro dei pori di 0,45 µm.

Per la determinazione del micelio totale si procede alla colorazione del filtro con blu di anilina, (0,05 grammi di blu di anilina in acido lattico 80%), che lega la chitina della parete cellulare delle ife fungine, non discriminando tra quelle metabolicamente attive e quelle inattive o morte da poco e non ancora degradate.

I filtri sono fatti asciugare all'aria e quindi montati sui vetrini chiarificandoli con una goccia di olio di legno di cedro. I vetrini sono osservati ad ingrandimento 40X e la conta delle ife è determinata dalle intersezioni di esse con un retino montato nell'oculare, considerando 20 campi di osservazione.

Calcolando il totale delle intersezioni e conoscendo la dimensione della maglia del retino, è possibile convertire il numero totale di intersezioni osservate per ogni vetrino in lunghezza delle ife presenti su tutto il filtro (Olson, 1950).

La biomassa fungina viene espressa come mg di biomassa fungina per g di peso secco di suolo.



(A) Ife fungine colorate con blu di anilina per la determinazione della biomassa fungina totale (immagine al microscopio ottico); (B) ife fungine dopo colorazione con diacetato di fluoresceina (FDA) per evidenziare il micelio metabolicamente attivo (immagine al microscopio a fluorescenza).

Gliese Mauro

Esercitazione n°2. Analisi della clorofilla in foglie di piante acclimatate a diversi regimi luminosi

La clorofilla è una sostanza, di formula complessa contenente un atomo di Mg. Essa è presente nelle parti verdi delle piante. Essa presenta analogie con il gruppo eme, contenuto nella molecola di emoglobina, che ha al centro della struttura un atomo di Fe (Fig. 1)

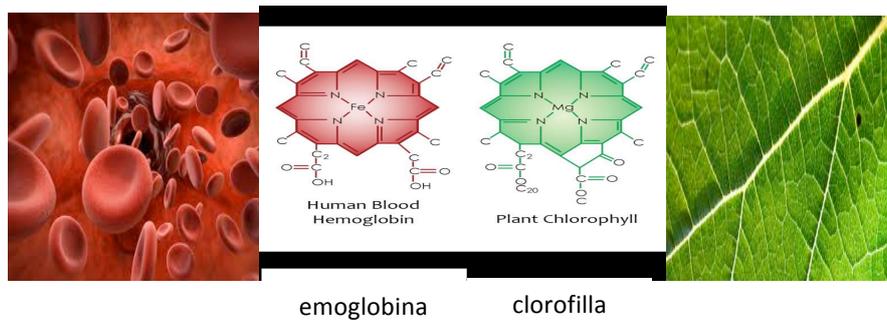


Fig. 1: confronto tra il gruppo eme della molecola di emoglobina e la clorofilla

È appunto la clorofilla che conferisce alle foglie il caratteristico colore verde. Nelle piante superiori ci sono due differenti tipi di clorofilla: la clorofilla a e la clorofilla b, entrambe le molecole captano l'energia luminosa necessaria affinché le piante possano svolgere la fotosintesi clorofilliana. Per catturare l'energia luminosa, indispensabile al processo fotosintetico, le piante utilizzano non soltanto la clorofilla ma anche altri pigmenti accessori tra cui i carotenoidi. Tutti i pigmenti fotosintetici assorbono la luce nell'intervallo compreso tra 400-700 nm (regione PAR = Photosynthetic Active Radiation) (Fig. 2).

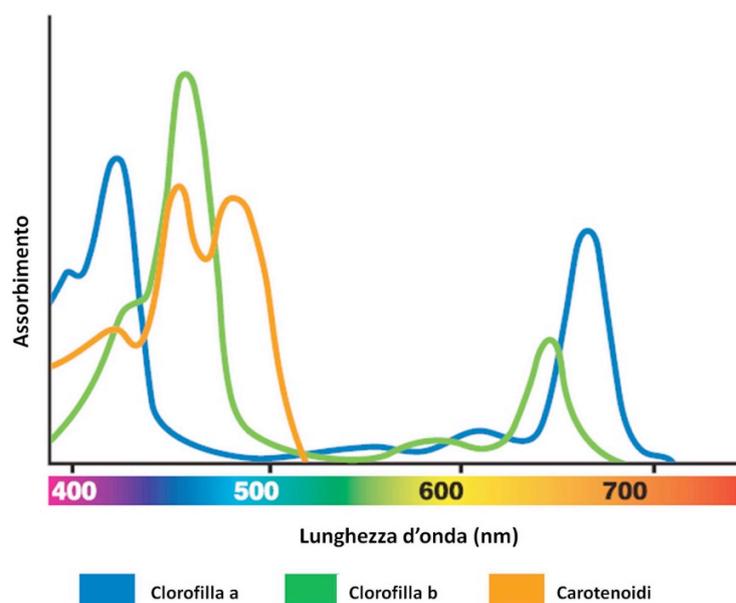


Fig. 2: Picchi di assorbimento dei pigmenti fotosintetici nell'intervallo 400-700 nm (PAR)

Generalmente il contenuto di clorofilla non è costante ma varia in funzione della specie, dell'età della foglia, degli stress ambientali ai quali gli organismi vegetali sono esposti. In particolare, in risposta alla diversa quantità di luce che riceve durante la crescita, una pianta o una foglia possono modulare il corredo pigmentario per aumentare o ridurre l'assorbimento di luce. Poiché la clorofilla e gli altri pigmenti accessori espletano la loro importante funzione solo se la foglia è viva, l'analisi della quantità di clorofilla presente nel parenchima fotosintetico può fornire utili informazioni non solo sull'efficienza di cattura della luce nel processo fotosintetico, ma anche sulla capacità della pianta e/o delle foglie di una stessa pianta di adattarsi a differenti regimi luminosi.

Parte 1: procedimento di estrazione

Le clorofille ed i carotenoidi possono essere facilmente estratti dalle foglie di qualunque pianta, nel caso specifico si procederà all'estrazione di pigmenti fotosintetici da foglie (prelevate nei giardini del Complesso di Monte Sant'Angelo dal Docente) della stessa specie acclimatate a diversi regimi luminosi. Per la determinazione dei pigmenti fotosintetici (clorofilla a, b e carotenoidi) si procede in primo luogo all'estrazione: si pesa un minuscolo pezzo di foglia o ne si prende un disco a diametro noto e lo si colloca in un mortaio insieme ad acetone 100%, *usando gli opportuni dispositivi di sicurezza*. L'acetone estrarrà completamente i pigmenti conferendo alla soluzione un colore verde. La procedura corretta prevede di operare in un ambiente dove c'è luce soffusa per evitare che i pigmenti possano foto ossidarsi.

Successivamente di volta in volta, si trasferisce il contenuto del mortaio in una provetta graduata. Una volta estratta la clorofilla da tutti i campioni, si procede al bilanciamento delle provette e si annota il volume finale di ciascuna provetta (ml estratto). L'estratto viene poi centrifugato a 3000 rpm per circa 5-10 minuti (dipende dalla specie e dalla consistenza della foglia), quindi si prosegue al trasferimento del surnatante in cuvette di vetro e si esegue, per ciascun campione estratto, una lettura allo spettrofotometro alle lunghezze d'onda di 662 nm, 645 nm e 470 nm, rispettivamente per la determinazione delle assorbanze di clorofilla a, clorofilla b e carotenoidi totali, poiché a queste specifiche lunghezze d'onda i pigmenti di nostro interesse presentano il picco di assorbimento nella luce visibile (radiazione PAR, 400-700 nm). Secondo la legge di *Lambert-Beer*, l'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione di clorofilla e carotenoidi (Fig. 3).



Fig. 3: Passaggi della procedura di estrazione e lettura allo spettrofotometro

Parte 2: calcolo delle concentrazioni

La concentrazione di clorofilla e carotenoidi può essere espressa per peso fogliare (mg g^{-1}) nel caso si estragga da un pezzetto di foglia di peso noto o per superficie fogliare ($\mu\text{g cm}^{-2}$), nel caso si

estragga da una superficie fogliare nota. Nel presente esperimento la clorofilla verrà espressa in $\mu\text{g cm}^{-2}$, quindi si farà riferimento ad un dischetto fogliare di area nota.

I dati relativi alle concentrazioni dei singoli pigmenti vengono calcolati partendo dalle assorbanze a 662, 645 e 470 nm; per ottenere dalle relative assorbanze le concentrazioni sono state applicate le seguenti formule:

Clorofilla a: $[(11.24 \cdot A_{662}) + (-2.04 \cdot A_{645})]$

Clorofilla b: $[(20.13 \cdot A_{645}) + (-4.19 \cdot A_{662})]$

Una volta calcolati i valori di clorofilla a e b, si prosegue al calcolo della clorofilla in $\mu\text{g cm}^{-2}$.

(1) $\mu\text{g cm}^{-2}$ chl a = (Clorofilla a * volume totale della provetta) / area del campione

(2) $\mu\text{g cm}^{-2}$ chl b = (Clorofilla b * volume totale della provetta) / area del campione

(3) $\mu\text{g cm}^{-2}$ chl (a+b) = (1) + (2)

NB: tali formule tengono conto dei coefficienti di assorbimento specifici dell'acetone al 100% (H. K. Lichtenthaler, Methods in Enzymology, 1987, 148, 350-382).

Parte 3: elaborazione grafica dei dati e discussione dei risultati

Mettere in grafico i valori ottenuti e commentare il significato ecologico delle variazioni di concentrazione ottenute per le differenti tipologie di foglie.

Giulia Mauro

Esercitazione n°3. Analisi di ipotesi, raccolta dati e loro elaborazione

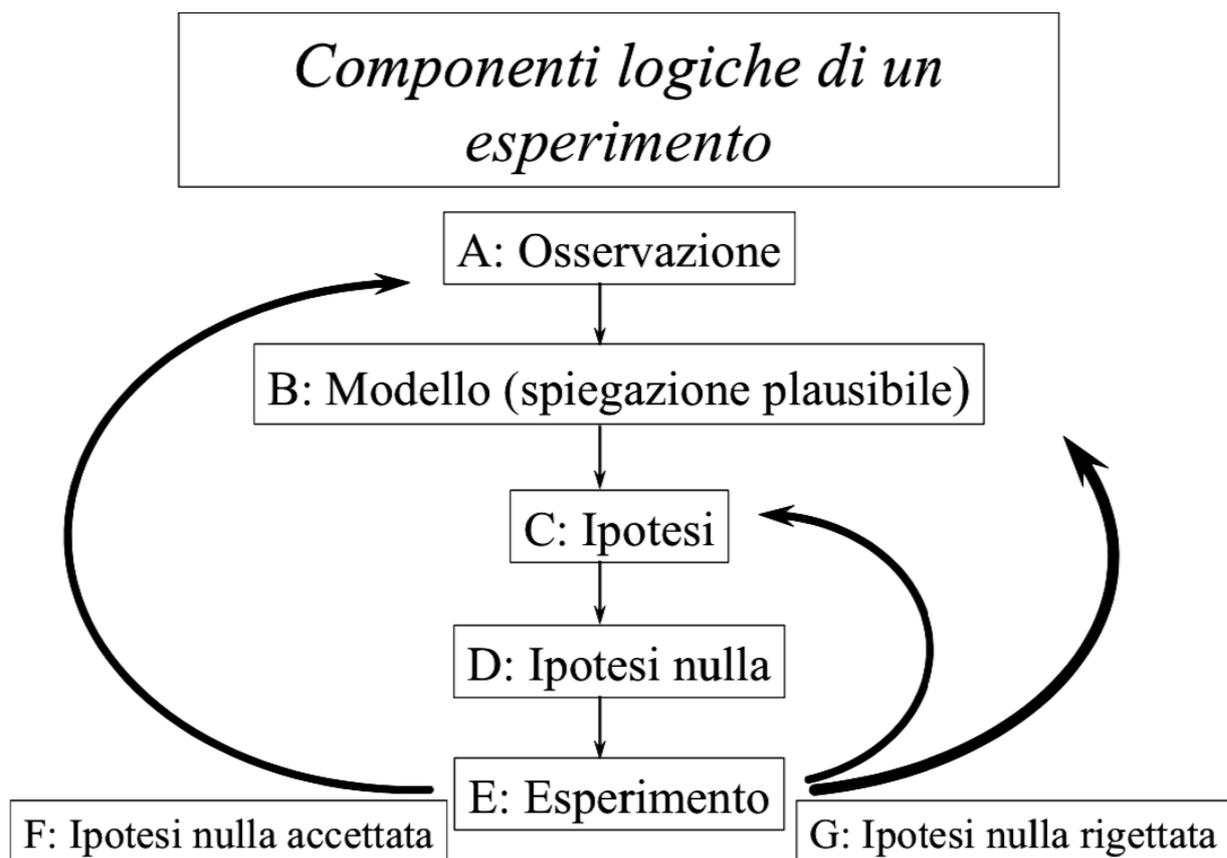
Introduzione

Misurare e spiegare la variabilità dei sistemi ecologici è un compito complesso. Il laboratorio identificherà gli strumenti logici e metodologici necessari per comprendere i processi ecologici fondamentali che determinano tale variabilità, requisito essenziale per prevedere gli effetti del disturbo antropico, per guidare le politiche di conservazione e di ripristino di habitat, per preservare la biodiversità e per garantire uno sviluppo sostenibile. Lo scopo è quello di enfatizzare la natura quantitativa della disciplina, il ruolo della logica nella progettazione degli studi ecologici, i principi di base del disegno sperimentale, l'uso corretto delle più comuni procedure di analisi dei dati e la necessaria cautela nella fase interpretativa dei risultati.

Il testo di riferimento Benedetti-Cecchi L 2003 DISEGNO SPERIMENTALE ED ANALISI DI IPOTESI IN ECOLOGIA Biol. Mar. Medit., 10 (Suppl.): 433-484

1 Un contesto logico per l'analisi di ipotesi in ecologia

La lezione verterà sulla descrizione del metodo ipotetico-deduttivo basato sul concetto di falsificazione. Alcuni esempi tratti dalla letteratura verranno discussi con gli studenti.



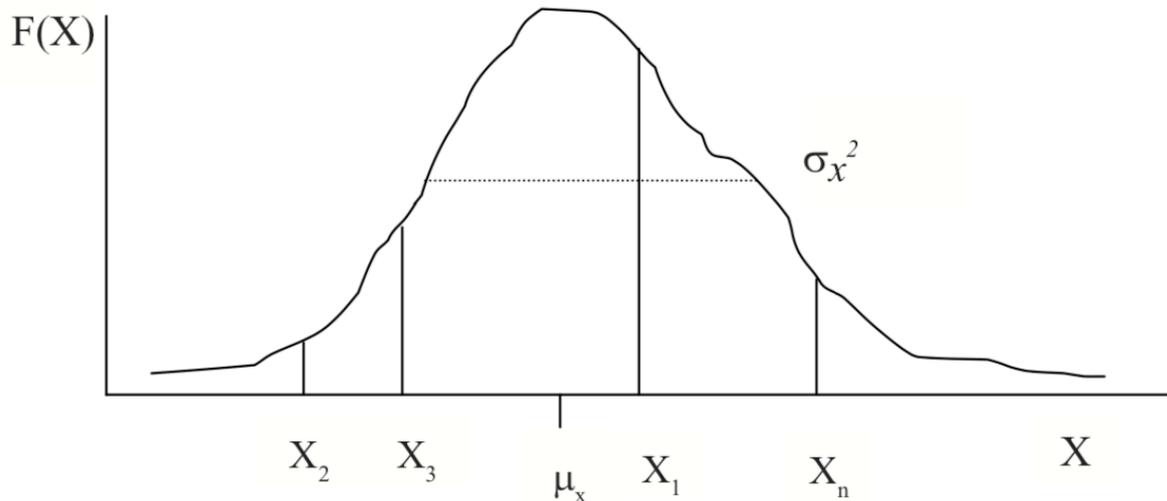
2 Introduzione al disegno sperimentale

La lezione verte sulla definizione di esperimento e sui criteri principali del disegno sperimentale applicabili sia nel caso che l'analisi di ipotesi richieda la manipolazione di variabili, sia che richieda contrasti definiti dal campionamento. Durante la lezione verranno discussi con gli studenti il concetto di fattore, la scelta dei livelli di ciascun fattore, le modalità

di assegnazione delle unità sperimentali ai fattori, la dislocazione delle unità sperimentali nello spazio e nel tempo, il numero di repliche in ciascuna combinazione di fattori.

3 Variabili, parametri e distribuzioni di frequenza

Un esperimento esamina l'influenza di uno o più fattori, o variabili predittive, su una o più variabili dipendenti, o variabili di risposta. La lezione verterà sulle definizioni di variabili e di parametri che a loro volta descrivono la forma della distribuzione di frequenza di una variabile.



4 Campionamento rappresentativo

Un campionamento si dice rappresentativo quando l'intero "range" di possibili valori della variabile è riprodotto dal campione di osservazioni sperimentali. Tale condizione è perseguita se, all'inizio dell'esperimento, le potenziali osservazioni hanno tutte la stessa probabilità di entrare a far parte del campione. Per comprendere come raggiungere questa condizione, verrà condotta una esercitazione in campo, durante la quale gli studenti raccoglieranno i dati da analizzare in laboratorio.

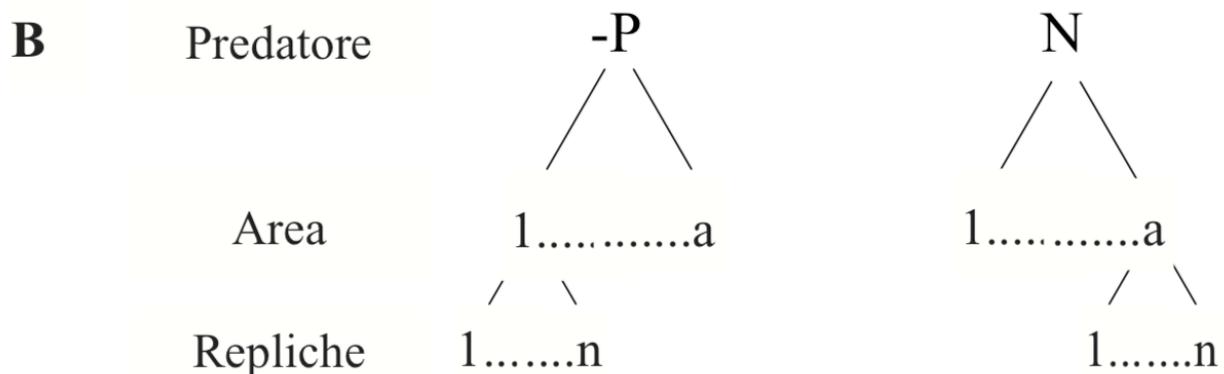
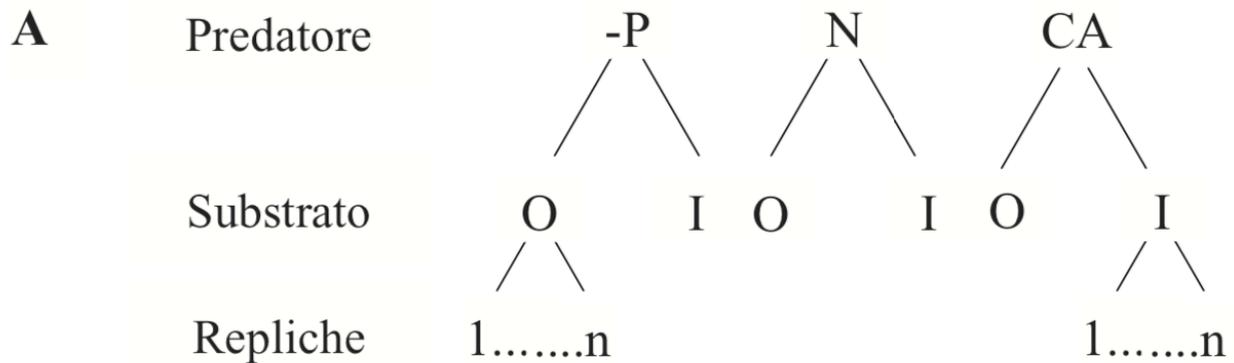


5 Fattori fissi e fattori random

La natura non fornisce fattori etichettati come fissi e come random. Ogni fattore può assumere l'una o l'altra caratteristica in funzione della ipotesi da analizzare. La distinzione è basata sul modo in cui i livelli del fattore sono scelti. Gli studenti familiarizzeranno con questi concetti attraverso la simulazione di disegni sperimentali per testare ipotesi diverse unitamente alla discussione di alcuni lavori presi dalla letteratura.

6 Disegni gerarchizzati e disegni ortogonali

Raramente i problemi ecologici sono risolvibili con esperimenti basati su un unico fattore. Più spesso, infatti, l'analisi di modelli ecologici richiede esperimenti multifattoriali, basati cioè sulla manipolazione simultanea di più variabili predittive. L'estensione dal contesto unifattoriale a quello multifattoriale richiede l'introduzione dei concetti che definiscono le modalità di relazione tra fattori. In questo contesto verrà anche introdotto il concetto di "esperimento confuso", dove la confusione tra variabili nella analisi di ipotesi origina quando le differenze tra i livelli di un fattore non isolano l'effetto del fattore di interesse, ma includono anche l'influenza di altre variabili.



7 Analisi formale di ipotesi: la trattazione statistica dei dati

Questa sezione comprenderà i seguenti argomenti: 1- la relazioni tra variabili, 2- analisi di esperimenti complessi: l'analisi della varianza, 3- assunzioni della analisi della varianza in un

contesto ecologico , 4- trasformazione dei dati, 5- esempi di analisi multivariate, 6- applicazioni ed esempi.

Gli studenti utilizzeranno dati forniti dai docenti per analizzare diverse ipotesi in campo ecologico. Il fine ultimo è quello di consentire agli studenti di familiarizzare con alcune procedure di analisi univariata e multivariata di dati ecologici, in modo da renderli consapevoli degli step principali da seguire in una analisi di ipotesi in ecologia.

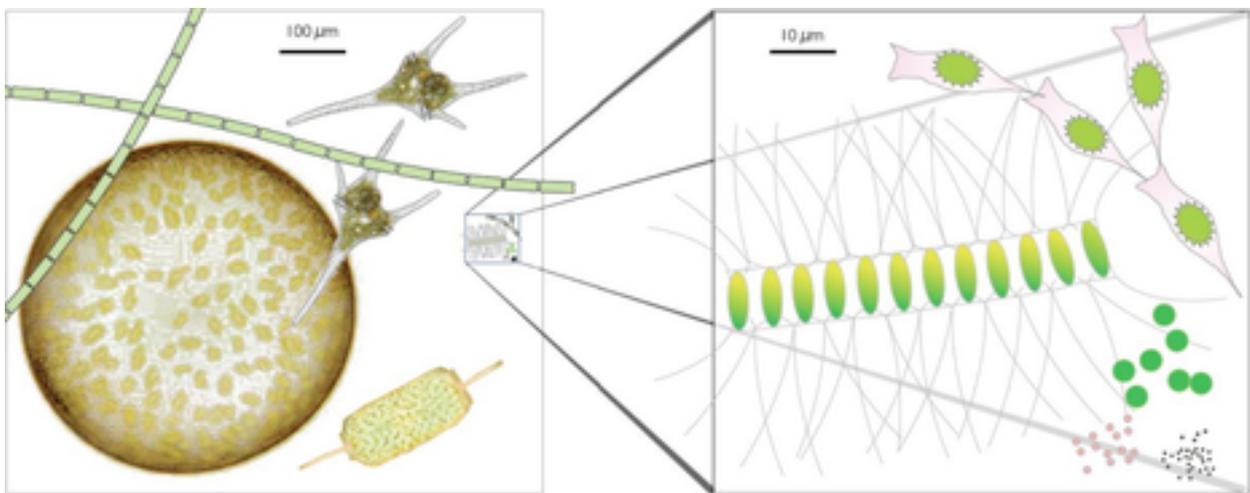
Giulia Mauro

Esercitazione n° 4. Il fitoplancton: metodiche di analisi quali-quantitativa

INTRODUZIONE

Il fitoplancton è costituito da migliaia di organismi vegetali, invisibili ad occhio nudo perché microscopici, e rappresenta il comparto biologico più importante in mare in quanto da esso dipende la vita negli oceani. Gli organismi fitoplanctonici sono l'equivalente delle piante sulla terra e proprio come queste riescono ad utilizzare la luce del sole per crescere e moltiplicarsi.

Quindi, anche se non li vediamo, gli organismi fitoplanctonici sono importantissimi anche nella nostra vita quotidiana su scala globale, sono centrali nella gestione del mare, delle risorse marine (pesca, catene alimentari) e della salute del mare.



TIPOLOGIA DEL CAMPIONE

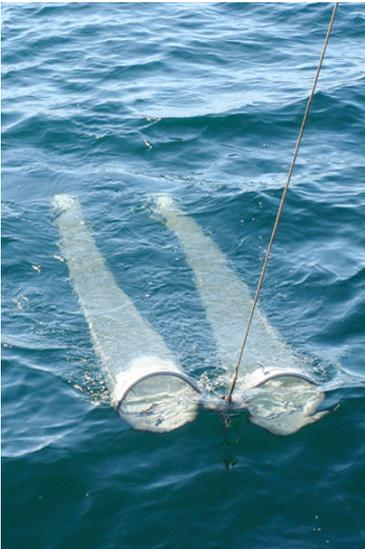
Comprendere e valutare la diversità fitoplanctonica è essenziale per capire il funzionamento dell'intero ecosistema marino. Le ricerche di tipo ecologico si basano in genere su conteggi ed identificazioni effettuati su campioni naturali e/o fissati.

Durante l'esercitazione verranno utilizzati campioni di acqua di mare contenenti organismi fitoplanctonici vivi. I campioni di acqua di mare saranno precedentemente trattati in laboratorio per eliminare eventuali patogeni e saranno mantenuti in condizioni sterili fino al momento dell'esercitazione.

ARTICOLAZIONE DELL'ESERITAZIONE

1. Schema del campionamento

Verrà descritta la metodica di campionamento a mare: i campioni vengono prelevati, a bordo di una nave oceanografica, in genere con bottiglie Niskin (bottiglie di plastica scure (1L, 5L oppure 10 L). Possono essere utilizzati anche dei retini con maglia da 200 μm . I campioni prelevati sono pretrattati a bordo e conservati in relazione alle successive analisi da effettuare in laboratorio.

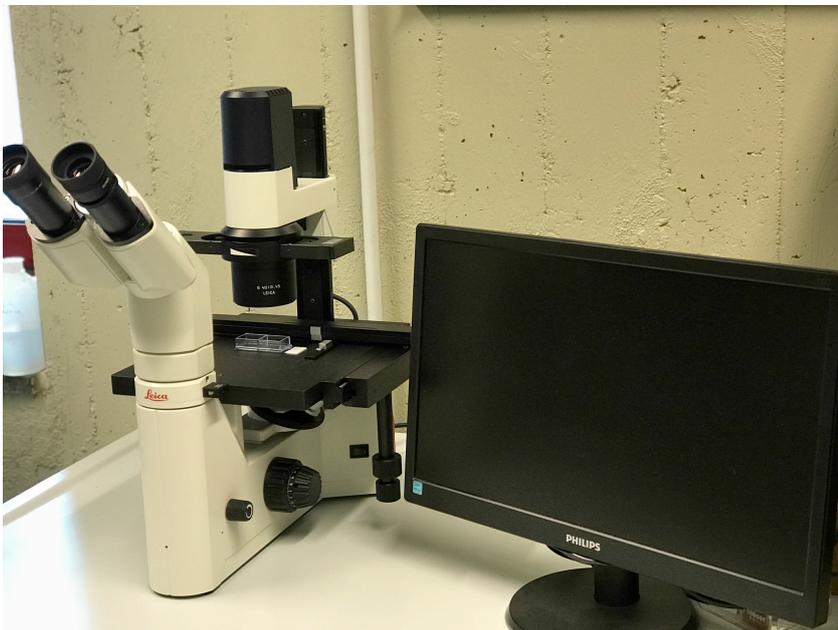


Gli aspetti sopra descritti saranno esposti agli studenti attraverso la visione del funzionamento delle attrezzature di campionamento.

2. Analisi al microscopio

Il metodo prevede l'osservazione delle cellule fitoplanctoniche al microscopio invertito in apposite camerette con fondo dello spessore di un coprioggetto e prende il nome dal ricercatore tedesco che lo propose (Utermohl, 1931). Il campione va versato lentamente evitando la formazione di bolle e la camera deve essere chiusa con un coprioggetto. L'osservazione in campo chiaro permette di ottenere informazioni sul colore, mentre il contrasto di fase e il contrasto d'interferenza differenziale facilitano l'osservazione di strutture poco contrastate. Il microscopio prevede obiettivi 10x e 20x, usati per le specie di maggiori dimensioni, e 40x per gli organismi più piccoli.

Sarà utilizzato un microscopio Leica con telecamera associata.

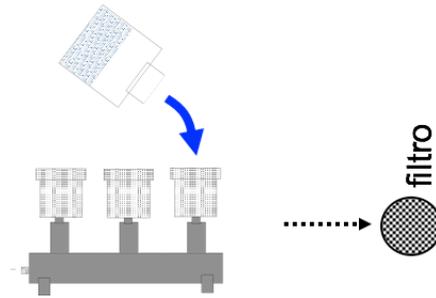


3. Stima della biomassa fitoplanctonica

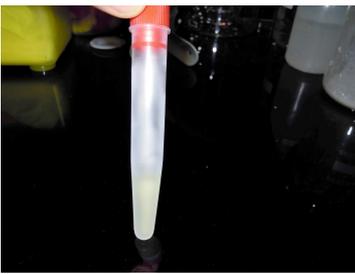
Un comune descrittore della biomassa fitoplanctonica totale è la concentrazione della clorofilla *a* (Chl-a), utilizzato sin dagli anni '30 (Harvey et al., 1934). Durante l'esercitazione, una parte dei campioni sarà processata per l'estrazione della Chl-a.

Il metodo per la stima quantitativa della Chl-a è descritto di seguito:

- Il particolato sospeso in acqua di mare contenente i pigmenti liposolubili viene concentrato su di un filtro in fibra di vetro (GFF) mediante filtrazione eseguita in presenza di una leggera depressione. Più in particolare, dopo aver collocato il filtro nell'apposito alloggiamento dell'apparato, si attiva la pompa a vuoto con lieve depressione e con un cilindro graduato un volume di campione viene versato nell'imbuto dell'apparato di filtrazione.



- Alla fine della filtrazione, il filtro viene conservato a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e trasportato in laboratorio.
- In laboratorio i filtri vengono immersi in una miscela di acetone ed acqua per consentire l'estrazione dei pigmenti dalle cellule fitoplanctoniche che possono essere analizzati con diverse metodiche.



Il metodo analitico più utilizzato (su estratti acetonic) per determinare la concentrazione della Chl-a è quello spettrofluorimetrico che permette di ottenere dati attendibili filtrando piccoli volumi di acqua e utilizzando filtri di diametro piccolo.

Il metodo utilizza la proprietà della Chl-a di essere fluorescente cioè di riemettere parte della luce assorbita sempre come radiazione luminosa. Quando una molecola assorbe un fotone con energia compresa nel visibile passa dal suo livello di minima energia (stato fondamentale) ad uno stato eccitato. La molecola eccitata può ritornare allo stato fondamentale emettendo l'energia assorbita sotto forma di radiazione, fluorescenza. La fluorescenza della Chl-a in vitro e in vivo è sempre rossa con lunghezza d'onda compresa tra 620 e 780 nm.

Giulia Mauro

