UNIVERSITÀ DEGLI STUDI FIRENZE

FLORE
Repository istituzionale dell'Università degli Studi di Firenze

Pigmenti clorofilliani.

Questa è la Versione finale referata (Post print/Accepted manuscript) della seguente pubblicazione:

Original Citation:
Pigmenti clorofilliani / L. LAZZARA; BIANCHI F; FALCUCCI M; HULL V; MODIGH M. E RIBERA D'ALCAL M. - STAMPA. - (1990), pp. 207-223.

Availability:
This version is available at: 2158/258225 since:

Publisher:
Edizioni LINT

Terms of use:
Open Access
La pubblicazione è resa disponibile sotto le norme e i termini della licenza di deposito, secondo quanto stabilito dalla Policy per l'accesso aperto dell'Università degli Studi di Firenze (https://www.sba.unifi.it/upload/policy-oa-2016-1.pdf)

Publisher copyright claim:

(Article begins on next page)

27 April 2024

NOVA THALASSIA	Vol. 11	207-223	1990

PIGMENTI CLOROFILLIANI

a cura di: *Luigi Lazzara, Franco Bianchi, Margherita Falcucci, Vincent Hull, Monica Modigh e Maurizio Ribera d'Alcalà*

INTRODUZIONE

L'obbiettivo di questo capitolo è di descrivere i principali metodi per la stima della biomassa autotrofa planctonica, tramite il rilevamento dei suoi pigmenti clorofilliani. Per disporre di una quantità di pigmenti sufficiente per il loro dosaggio, le cellule in sospensione devono essere concentrate. Esistono tuttavia analisi che rivelano la presenza dei pigmenti clorofilliani *in vivo* e consentono, senza procedure di concentrazione e di estrazione, una stima semi-quantitativa più immediata, anche se molto meno precisa.

1- METODO SPETTROFOTOMETRICO

PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo per la stima quantitativa dei pigmenti clorofilliani esposto di seguito consiste nel concentrare il particellato sospeso contenente pigmenti liposolubili, su di un filtro in fibra di vetro mediante una filtrazione eseguita in presenza di una leggera depressione. I pigmenti clorofilliani vengono estratti a freddo dalle cellule triturando ed omogeneizzando i filtri immersi in una miscela di acetone ed acqua. La concentrazione dei pigmenti nell'estratto viene stimata per via spettrofotometrica.

SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN MARE

Attrezzatura

- Bottiglie@ in plastica scure da almeno 4 dm^3;
- retino@ da plancton avente maglia di 250 μm;
- imbuto in plastica;
- apparato per la filtrazione;
- pompa da vuoto;
- trappola per pompa da vuoto;

- filtri@ in fibra di vetro Whatman GF/F;
- provette da centrifuga tarate da 10 cm^3;
- frigorifero o congelatore;
- spruzzetta per acetone;
- cilindri graduati da 1 dm^3;
- imbuto per filtrazione e carta da filtro.

Prodotti Chimici

- Acetone [$(CH_3)_2CO$];
- carbonato di sodio anidro [Na_2CO_3];
- carbonato di magnesio [$MgCO_3$].

Reagenti

Acetone neutralizzato

Aggiungere all'acetone puro carbonato di sodio anidro in eccesso ed agitare vigorosamente. Filtrare, dopo almeno 24 ore, su carta da filtro e travasare nella spruzzetta.

Soluzione sovrassatura di carbonato di magnesio

Aggiungere 1 g di carbonato di magnesio a 100 cm^3 di acqua grado reagente.

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 zooplancton e le macroalghe eventualmente presenti (Strickland & Parsons, 1968; Lenz & Fritsche, 1980).

Filtrazione

- I campioni vanno filtrati su filtri di fibra di vetro Whatman GF/F; è consigliabile effettuare la filtazione entro breve tempo dal prelievo (massimo 1-2 ore) specialmente quando i campioni sono stati raccolti in ambienti eutrofici.

  Il filtro che viene consigliato è meno soggetto ad intasamento ed è più economico del filtro a membrana sintetica. Si consiglia l'utilizzazione dei filtri GF/F anche per la loro elevata capacità di ritenzione, facilità di omogeneizzazione e versatilità di impiego in una serie di altre analisi che possono essere effettuate in parallelo sullo stesso campione (produzione, CHN del particellato, analisi biochimiche).

  Quando lo scopo è di stimare precise frazioni dimensionali del particellato, in sostituzione dei filtri in fibra di vetro possono essere utilizzati filtri a base di membrane sintetiche.

I filtri di acetato di cellulosa hanno il vantaggio di essere disponibili anche con poro nominale inferiore a quello dei filtri in fibra di vetro e di essere solubili in acetone. Consentono dunque di procedere immediatamente all'estrazione dei pigmenti senza omogeneizzare il filtro. Presentano però lo svantaggio di una minore capacità di ritenzione per cui si intasano più rapidamente, abbassando di fatto la sensibilità del metodo.

I filtri@in policarbonato ad impronta di nucleazione hanno il vantaggio di avere pori calibrati e quindi garantiscono una separazione molto precisa delle particelle secondo la taglia. Presentano però lo svantaggio di possedere una scarsissima capacità di ritenzione, per cui il flusso della filtrazione risulta molto più lento. Occorre pertanto ripartire il campione su più filtri se si vuole accrescere la sensibilità del metodo. Tali filtri sono insolubili in acetone, possono rilasciare in soluzione composti che assorbono nel visibile e non sono facilmente omogenizzabili. L'estrazione dei pigmenti può avvenire, in questo caso, solo mediante shock osmotico.

- Dopo aver collocato il filtro nell'alloggiamento dell'apparato di filtrazione, dispensare con una pipetta Pasteur qualche goccia della sospensione di carbonato di magnesio, dopo averla agitata, fino a ricoprire uniformemente il filtro.

  Si registrano opinioni molto diverse e discordanti riguardo alla opportunità di aggiungere carbonato di magnesio per aumentare la capacità di ritenzione dei filtri in fibra di vetro e per rallentare la degradazione delle clorofille (Rai, 1980; Rai & Marker, 1982). Tuttavia, mancando precise motivazioni contrarie, se ne consiglia ugualmente l'uso.
- 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 il conseguente passaggio di pigmenti attraverso il filtro.
- Versare un volume di campione variabile tra 0,5 e 7 dm^3, misurato col cilindro, nell'imbuto dell'apparato di filtrazione. 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 da filtrare dipende dalla concentrazione presunta dei pigmenti. Per concentrazioni di clorofilla pari a circa 1 $\mu g/dm^3$ vanno filtrati circa 3 dm^3 di acqua.

Un inconveniente che si riscontra frequentemente nel corso della filtrazione è l'intasamento dei filtri.
Presso il Laboratorio Centrale di Idrobiologia (Ministero Agricoltura e Foreste) sono stati condotti esperimenti per confrontare le seguenti procedure atte ad ovviare a questo inconveniente:

- filtrazione fino ad intasamento del filtro,
- filtrazione dello stesso volume di campione su più filtri,
- filtrazione di un volume ridotto dello stesso campione.

Gli esperimenti condotti hanno messo in evidenza che non esistono differenze significative nei risultati per cui le diverse procedure possono essere utilizzate indifferentemente.

Conservazione dei Campioni

E' preferibile eseguire l'estrazione e l'analisi dei pigmenti clorofilliani immediatamente dopo la filtrazione del campione. Tuttavia, se ciò non fosse possibile, 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 cm^3).
- Conservare la provetta al buio a temperature comprese tra -20 e +4 °C.

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 & Koyama, 1971; Blasco, 1973; Neveux, 1979; Lenz & Fritsche, 1980; Wood, 1985). Esistono modalità alternative di conservazione dei filtri che tuttavia vengono sconsigliate, quali la conservazione a -20 °C previo congelamento dei filtri umidi o essiccati (Panella & Magazzù, 1978) o la tecnica di essiccazione e congelamento (freeze-drying) che, secondo Lenz & Fritsche (1980), non dà risultati di conservazione soddisfacenti.
Presso il Laboratorio di Ecologia Vegetale dell'Università di Firenze, per confrontare diverse modalità di conservazione, sono state effettuate varie prove su: i) filtri in acetone puro mantenuti a +4 ed a -20 °C; ii) filtri congelati tal quali e mantenuti a -20 °C. I risultati possono essere così schematizzati:

a) non risultano differenze di conservazione apprezzabili per estratti acetonici mantenuti a -20 ed a +4 °C;
b) la conservazione dei filtri in acetone comporta una minima degradazione della clorofilla *a* (circa il 6% dopo due settimane), significativamente inferiore a quella osservata dopo congelamento e conservazione dei filtri senza solvente (circa il 20%). Ciò è risultato sia da prove condotte su popolamenti fitoplanctonici naturali (basse concentrazioni di pigmenti clorofilliani) che su estratti di colture di *Chaetoceros protuberans* e di *Urtica* sp. (elevate concentrazioni di pigmenti);
c) lo stesso risultato a favore delle conservazione in acetone, anche se meno significativo, si ottiene in prove eseguite su popolamenti fitoplanctonici naturali con elevate concentrazioni di pigmenti clorofilliani.

Gli esperimenti condotti confermano quanto osservato da alcuni autori (Blasco, 1973; Nusch, 1980; Wood, 1985), e cioè che la pratica di conservazione del filtro in acetone ed al freddo sia da preferire. Va infine osservato 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 & Jeffrey, 1971; Jeffrey & Hallegraeff, 1980).

SCHEMA DELLE OPERAZIONI IN LABORATORIO

Attrezzatura

- Spettrofotometro con reticolo interferenziale e larghezza di banda 1-2 nm, con

cellette da almeno 50 mm (preferibilmente 100 mm) di cammino ottico e di volume ridotto (max 7 cm^3). E' 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 a 656,3 nm e quella del mercurio a 546 nm.

- Centrifuga per provette da 12 mm di diametro capace di raggiungere 4000 giri/min.
- Omogeneizzatore® (potter) con pestello in vetro smerigliato o teflon.

Prodotti Chimici

- Acetone [$(CH_3)_2CO$];
- carbonato di sodio [$NaCO_3$];
- acido cloridrico [HCl].

Reagenti

Acetone neutro al 90% v/v

Mescolare 100 cm^3 di acqua grado reagente e 900 cm^3 di acetone. Travasare in un recipiente con carbonato di sodio e agitare vigorosamente. Filtrare su carta da filtro la quantità necessaria. Mantenere sempre la soluzione lontana dalla luce e in presenza di carbonato di sodio.

Acetone neutro all'80% v/v

Mescolare 200 cm^3 di acqua grado reagente e 800 cm^3 di acetone. Eseguire le stesse operazioni e osservare gli stessi accorgimenti che per l'acetone al 90%.

Acido cloridrico 0,66 mol/dm^3

Versare lentamente sotto agitazione 55 cm^3 di acido cloridrico concentrato (HCl 37% w/v) in 950 cm^3 di acqua grado reagente.

Procedura Analitica

- Triturare ed omogeneizzare il filtro, conservato in acetone puro, per un massimo di 2 minuti sciacquando più volte accuratamente il pestello dell'omogeneizzatore. Tale operazione va condotta adoperando un volume di acetone all'80% uguale a quello dell'acetone puro usato per conservare il filtro (generalmente si utilizzano in totale 5 cm^3 di acetone puro e 5 cm^3 di acetone all'80%).

  Se il campione viene analizzato subito dopo la filtrazione, le operazioni di triturazione ed omogenizzazione vanno eseguite direttamente con acetone al 90%.

  Se nel corso dell'omogeneizzazione si aggiunge inavvertitamente una quantità di

acetone che eccede il volume finale di estratto che è stato prescelto (10 cm^3), occorre tenerne conto al momento del calcolo della concentrazione dei pigmenti.

L'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 (5 °C) e contenendo l'operazione in un tempo massimo di 2 minuti.

E' possibile omogeneizzare il campione anche mediante triturazione manuale con mortaio e pestello, ma la procedura risulta scarsamente efficace ai fini della distruzione del filtro. L'uso degli ultrasuoni, infine, sembra non dare buoni risultatati (Nusch, 1980) in quanto produce un eccessivo riscaldamento dell'estratto.

- Ritravasare la sospensione nella provetta utilizzata per la conservazione, portare a volume con acetone all'80% e tappare accuratamente.
- Completare l'estrazione mantenendo l'estratto per 24 ore al freddo (5 °C) e al buio.
- Centrifugare le provette chiuse per 15 minuti a 4000 giri/min.
- Prelevare il sopranatante, mediante una pipetta o una siringa, sciacquare, usandone una piccola quantità, le cellette dello spettrofotometro e quindi riempirle.

Lettura allo Spettrofotometro e Calcoli

Di seguito vengono indicate tre diverse metodiche di stima dei pigmenti fotosintetici: metodo per la stima della clorofilla *a* (con feopigmenti), metodo per la stima 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 (clorofilla *b*) che hanno una coda di assorbimento anche a 664 nm, che di feofitina *a*, principale prodotto di degradazione della clorofilla *a*. Le altre due metodiche consentono di ottenere una stima più precisa della clorofilla *a* in presenza di notevoli quantità di clorofilla *b* e *c*, utilizzando rispettivamente letture a più lunghezze d'onda (Jeffrey & Humphrey, 1975; Lorenzen & Jeffrey, 1980) e trattando l'estratto con acido cloridrico (Lorenzen, 1967).

STIMA DELLA CONCENTRAZIONE DELLA CLOROFILLA *a* .

Il metodo si basa sull'assunto che il picco di massimo assorbimento della clorofilla *a* si trovi a 664 nm con coefficiente di assorbimento di 87,67 $cm^{-1} \cdot g^{-1} \cdot dm^3$ (Jeffrey & Humphrey, 1975).

- Leggere allo spettrofotometro l'assorbanza del campione alle lunghezze d'onda di 664 [A(664)] e 750 nm [A(750)] contro un bianco di acetone (non neutralizzato) al 90%. Occorre tener presente che, se lo spettrofotometro prevede la contemporanea utilizzazione di più cellette, è necessario leggere il valore del bianco per ciascuna delle cellette e tenerne conto nella procedura di calcolo.
- Calcolare la concentrazione della clorofilla *a* (Chl *a*) applicando la seguente formula:

$$\text{Chl } a\ (\mu g/dm^3) = \{[A(s,664,i)-A(b,664,i)]-[A(s,750,i)-A(b,750,i)]\} \cdot v \cdot 10^6/(\epsilon \cdot CO \cdot V)$$

dove:

A(b,664,i) = assorbanza del bianco nella cella i-esima a 664 nm

A(b,750,i) = assorbanza del bianco nella cella i-esima a 750 nm

A(s,664,i) = assorbanza del campione nella cella i-esima a 664 nm

A(s,750,i) = assorbanza del campione nella cella i-esima a 750 nm

ϵ = coefficiente di assorbimento specifico della clorofilla *a* in acetone al 90% (87,67 $cm^{-1} \cdot g^{-1} \cdot dm^3$)

CO = cammino ottico della celletta (cm)

v = volume dell'estratto (cm^3)

V = volume di campione filtrato (cm^3)

STIMA DELLA CONCENTRAZIONE DELLE CLOROFILLE *a*, *b*, *c*

- 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 determinare la loro incidenza sul valore della concentrazione della clorofilla *a* (Lorenzen & Jeffrey, 1980). Applicando questa metodica occorre leggere anche i valori del bianco alle varie lunghezze d'onda.
- Determinare l'assorbanza netta dell'estratto a ciascuna lunghezza d'onda [A(λ)] secondo la formula:

$$A(\lambda) = [A(s,\lambda,i)-A(b,\lambda,i)]-[A(s,750,i)-A(b,750,i)]$$

dove:

A(b, λ,i) = assorbanza del bianco nella cella i-esima a λ nm

A(b,750,i) = assorbanza del bianco nella cella i-esima a 750 nm

A(s, λ ,i) = assorbanza del campione nella cella i-esima a λ nm

A(s,750,i) = assorbanza del campione nella cella i-esima a 750 nm

- Calcolare le concentrazioni delle clorofille (Chl) applicando le seguenti formule:

$$\text{Chl } a\ (\mu g/dm^3) = [11{,}85 \cdot A(664)-1{,}54 \cdot A(647)-0{,}08 \cdot A(630)] \cdot v \cdot 10^3/(CO \cdot V)$$

$$\text{Chl } b\ (\mu g/dm^3) = [-5{,}43 \cdot A(664)+21{,}03 \cdot A(647)-2{,}66 \cdot A(630)] \cdot v \cdot 10^3/(CO \cdot V)$$

$$\text{Chl } c_1+c_2\ (\mu g/dm^3) = [-1{,}67 \cdot A(664)-7{,}60 \cdot A(647)+24{,}52 \cdot A(630)] \cdot v \cdot 10^3/(CO \cdot V)$$

dove:

A(λ) = assorbanza netta del campione come definita al punto precedente

CO = cammino ottico della cellette (cm)

v = volume dell'estratto (cm^3)

V = volume di campione filtrato (cm^3)

I valori delle concentrazioni delle clorofille *b* e *c* risultano negativi quando questi pigmenti sono presenti in concentrazioni molto basse e non possono essere determinati con questo metodo oppure se sono presenti altri pigmenti accessori che disturbano le letture.

Stima della Concentrazione della Clorofilla *a* e dei Feopigmenti

Il metodo permette di determinare le concentrazioni della clorofilla *a* e dei feopigmenti assumendo che il rapporto tra i loro coefficienti di assorbimento specifico sia uguale a quello tra clorofilla *a* e feofitina *a* (Lorenzen, 1967). La procedura analitica prevede l'aggiunta di 50 mm^3 di HCl (0,66 mol/dm^3) per ogni 5 cm^3 di estratto direttamente nella celletta dello spettrofotometro subito dopo le letture a 665 e 750 nm. La celletta va agitata ripetutamente ed occorre attendere 30-60 secondi 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*.
E' importante tener presente che la concentrazione finale dell'acido nell'estratto (Riemann, 1978) non deve superare di molto il valore di $3 \cdot 10^{-3}$ mol/dm^3 (30 mm^3 di HCl mol/dm^3 per ogni cm^3 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.

- Determinare l'assorbanza netta dell'estratto prima dell'acidificazione [$A(665_0)$] e dopo acidificazione [$A(665_a)$] secondo la formula:

  $$A(665_\alpha) = [A(s,665_\alpha,i)-A(b,665,i)]-[A(s,750_\alpha,i)-A(b,750,i)]$$

  dove:

  A(b,665,i) = assorbanza del bianco nella cella i-esima a 665 nm

  A(b,750,i) = assorbanza del bianco nella cella i-esima a 750 nm

  $A(s,665_\alpha,i)$ = assorbanza del campione nella cella i-esima a 665 nm prima (α=0) o dopo acidificazione (α=a)

  $A(s,750_\alpha,i)$ = assorbanza del campione nella cella i-esima a 750 nm prima (α=0) o dopo acidificazione (α=a)

- Calcolare quindi le concentrazioni della clorofilla *a* (Chl *a*) e dei feopigmenti applicando le seguenti formule:

  $$\text{Chl } a\ (\mu g/dm^3) = 26{,}7 \cdot [A(665_0)-A(665_a)] \cdot v \cdot 10^3/(CO \cdot V)$$

  $$\text{Feopigmenti } (\mu g/dm^3) = 26{,}7 \cdot [1{,}7 \cdot A(665_a)-A(665_0)] \cdot v \cdot 10^3/(CO \cdot V)$$

  dove:

  $A(665_0)$ = assorbanza netta del campione nella cella i-esima a 665 nm prima dell'acidificazione

$A(665_a)$ = assorbanza netta del campione nella cella i-esima a 665 nm dopo acidificazione

CO = cammino ottico della celletta (cm)

v = volume dell'estratto (cm^3)

V = volume di campione filtrato (cm^3)

Note

- 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. La concentrazione minima di clorofilla che, utilizzando cellette da 50 mm di cammino ottico, il metodo consentirebbe di dosare nell'estratto è di 456 $\mu g/dm^3$, che equivale ad una concentrazione *in situ* di 0,91 $\mu g/dm^3$ nel caso siano stati filtrati 5 dm^3 di campione. Tuttavia, se le condizioni ottiche della misura e l'accuratezza sono soddisfacenti (± 0,002 A), si hanno letture valide anche con assorbanze di 0,050 a 664 nm (Neveux, 1979).
- Se l'assorbanza dei bianchi supera il valore di 0,008, occorre pulire accuratamente l'esterno delle cellette con un fazzoletto di carta 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.
- 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 Swinnex nel quale è inserito un filtro in teflon di 13 mm di diametro e con porosità di 0,2 μm.

2- METODO FLUORIMETRICO SU ESTRATTI CELLULARI

I metodi fluorimetrici per la stima della concentrazione della clorofilla *a* si basano sulla misura della fluorescenza dell'estratto acetonico dei pigmenti prima e dopo acidificazione con acido cloridrico. Si misura in tal modo la frazione fotosinteticamente attiva (clorofilla *a*) ed inattiva (feopigmenti) dei pigmenti presenti nei campioni. Questi metodi (Yentsch & Menzel, 1963; Holm-Hansen *et al.*, 1965) presentano notevoli vantaggi rispetto a quelli spettrofotometrici in quanto risultano più rapidi, precisi e sensibili.
Si consiglia l'uso di questi metodi solo quando la concentrazione dei pigmenti è inferiore a circa 1 $\mu g/dm^3$ poichè, per valori superiori, la relazione fluorescenza/concentrazione non si mantiene più lineare. Il limite superiore dell'intervallo entro il quale la relazione è lineare è di 750 $\mu g/dm^3$ nell'estratto acetonico (Neveux, 1976) e di 1,5 $\mu g/dm^3$ nell'acqua di mare (Bianchi, 1986).
La validità dei metodi fluorimetrici è fortemente condizionata dalla concentrazione di clorofilla *b* nell'estratto (Yentsch, 1965; Loftus & Carpenter, 1971; Gibbs, 1979), in quanto la feofitina prodotta dalla degradazione di questo pigmento presenta 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 una sovrastima dei feopigmenti.

Attrezzature Specifiche

- Fluorimetro@ a filtri o spettrofluorimetro.

Nel caso si adoperi il fluorimetro, si raccomanda di usare come fonte luminosa una lampada F 474-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).
Nel caso si effettuino le misure con uno spettrofluorimetro, occorre selezionare le lunghezze d'onda ai valori massimi di eccitazione e di emissione riscontrati dalla lettura degli standards. Anche in questo caso è necessario un fotomoltiplicatore con sensibilità estesa nella regione del rosso.

Procedura Analitica e Calcoli

- Preparare una soluzione standard di clorofilla *a* in acetone al 90%. A tale scopo si può adoperare sia una soluzione a concentrazione nota (clorofilla *a*@pura) che clorofilla purificata con tecnica cromatografica, oppure estratti da campioni naturali di fitoplancton la cui concentrazione è stata previamente misurata con metodo spettrofotometrico.
- Preparare, diluendo lo standard, alcuni substandards a diluizioni decrescenti.
- Misurare la fluorescenza dei substandards prima e dopo acidificazione con acido cloridrico, effettuata con la stessa procedura illustrata per il metodo spettrofotometrico.
- Calcolare il fattore medio di concentrazione o costante di calibrazione (c) e il fattore di acidificazione (x) nel modo seguente:

$$c = C(Chl)/F_0$$

$$x = F_0/F_a$$

dove:

C(Chl) = valore medio della concentrazione della clorofilla negli standards

F_0 = valore medio della fluorescenza degli standards prima dell'acidificazione

F_a = valore medio della fluorescenza degli standards dopo l'acidificazione

Nel caso che per l'allestimento degli standards si adoperino popolazioni naturali di fitoplancton, il fattore di acidificazione (x) può presentare variazioni molto ampie, con valori compresi tra 0,9 e 3,1 (Yentsch & Menzel, 1963; Holm-Hansen *et al.*, 1965).
Valori elevati derivano dalla presenza di clorofilla *c*, il cui fattore di acidificazione è circa 6. Valori bassi possono derivare o da un elevato rapporto feofitina *a*/clorofilla

a oppure dalla presenza di clorofilla *b*, che ha un fattore di acidificazione inferiore a 1 (Loftus & Carpenter, 1971).

- Filtrare i campioni ed estrarre i pigmenti come indicato per i metodi spettrofotometrici.
- Misurare la fluorescenza dell'estratto prima (F_0) e dopo (F_a) acidificazione con acido cloridrico, diluendo i campioni che presentano valori di fluorescenza più elevati del substandard a concentrazione maggiore.
- Calcolare le concentrazioni della clorofilla *a* (Chl *a*) e della feofitina *a* presenti nel campione applicando le seguenti equazioni (Lorenzen, 1966):

$$\text{Chl } a \ (\mu g/dm^3) = x \cdot (x-1)^{-1} \cdot (F_0 - F_a) \cdot c \cdot v \cdot V^{-1}$$

$$\text{Feofitina } a \ (\mu g/dm^3) = (F_a \cdot x - F_0) \cdot (x-1)^{-1} \cdot c \cdot x \cdot v \cdot V^{-1}$$

dove:

$x = F_0/F_a$

$c = C(Chl)/F_0$

v = volume dell'estratto (cm^3)

V = volume di campione filtrato (cm^3)

3- METODO FLUORIMETRICO SULLE SOSPENSIONI *IN VIVO*

La stima della concentrazione dei pigmenti fotosintetici con metodi che non prevedono la loro estrazione è basata principalmente sulla misura di fluorescenza rossa emessa dalla clorofilla *a* e dai pigmenti accessori, in seguito ad eccitazione con luce blu (Lorenzen, 1966).

I massimi spettrali di eccitazione e di emissione della fluorescenza sono indicati generalmente come 432 ± 4 nm e 680 ± 2 nm, rispettivamente. Nonostante la scarsa efficienza dell'emissione di fluorescenza da parte delle strutture pigmentarie *in vivo* (variabile indicativamente fra l'1 e il 10% di quella degli stessi pigmenti in soluzione), la maggiore sensibilità e stabilità del segnale ottenute nei fluorimetri@realizzati con questo scopo, ed ora disponibili sul mercato, consente una stima della clorofilla *a* in un ampio intervallo di concentrazioni, indicativamente comprese tra 0,01 e 10 mg/m^3. L'uso di fluorimetri *in situ* rende inoltre possibile un rilevamento in tempo reale della biomassa autotrofa e permette di evidenziarne con buona definizione le caratteristiche di distribuzione, sia verticale che orizzontale.

Tuttavia, la corrispondenza di questo tipo di misura con l'effettiva concentrazione di clorofilla *a* deve essere frequentemente verificata mediante dosaggi su estratti acetonici (vedi paragrafo precedente), poichè la variabilità del rapporto fluorescenza/clorofilla *a* è notevole, in particolare nei popolamenti naturali. Le cause di variazione di tale rapporto, sono descritte, con i limiti di questo metodo, da vari autori (Harris, 1980; Sakshaug, 1980; Prézelin & Boczar, 1986) e consistono principalmente in:

a) presenza in mare di sostanze fluorescenti con caratteristiche spettrali che possono

interferire con quelle della clorofilla (sostanza gialla, acidi umici, cellulosa);

b) interferenza di fenemeni ottici quali diffusione, autoassorbimento, "quenching", che tuttavia possono divenire importanti solo per concentrazioni di pigmento molto elevate;

c) variabilità dell'efficienza di fluorescenza a parità di contenuto in clorofilla *a*, conseguente al diverso stato fisiologico degli organismi.

Quest'ultimo fattore è la fonte più significativa di variabilità e dipende, a sua volta, da cause quali: le variazioni, tanto più se improvvise, di temperatura (Lorenzen, 1966), luce (Kiefer, 1973) e nutrienti (Slovacek & Hannan, 1977); la diversa composizione pigmentaria e tassonomica dei popolamenti; le eventuali condizioni di stress degli organismi ed i loro ritmi biologici (Prézelin & Ley, 1980). Infine, anche le modalità di svolgimento della cinetica di induzione della fluorescenza (Harris, 1980) possono alterare le risposte misurabili.

Una stima più stabile e corrispondente al contenuto in clorofilla *a* può essere ottenuta, secondo Slovacek & Hannan (1977), in seguito a trattamento con DCMU (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea) in basse concentrazioni (10^{-5} mol/dm^3 finale). La sua presenza blocca, nella catena ossido-riduttiva delle reazioni luminose, il trasporto degli elettroni, innalzando la quantità di fluorescenza emessa e diminuendo la sua variabiltà. I risultati ottenuti da questi autori su colture monospecifiche non sono stati tuttavia completamente confermati in studi su popolamenti naturali (Lorenzen & Jeffrey, 1980; Neveux, 1982).

Va inoltre considerata la possibilità di misurare l'emissione di fluorescenza eccitando alle lunghezze d'onda specifiche dei pigmenti accessori (clorofilla *b* e *c*, carotenoidi e ficobiline) ottenendo così degli spettri di eccitazione e di emissione della fluorescenza. L'analisi di tali spettri (Yentsch & Yentsch, 1979, Yentsch & Phynney, 1985, Lazzara & Innamorati, 1985) può consentire di individuare la presenza di gruppi tassonomici di fitoplancton basati sul tipo di pigmenti che li caratterizzano (Cianoficee, Cripto-Rodoficee, Cloroficee, Diato-Dino-Primnesioficee) o di conoscere le condizioni di fotoadattamento dei popolamenti fitoplanctonici (Neori *et al.*, 1984; Mitchell & Kiefer, 1984).

Esistono infine anche metodi per la misura dell'assorbimento luminoso da parte di sospensioni (Shibata *et al.*, 1954; Faust & Norris, 1982; Maske & Haardt, 1987; Sathyendranath *et al.*, 1987), oggi più facilmente utilizzabili data la disponibilità, per vari spettrofotometri, di accessori per la trasmissione diffusa o sfere integratrici. Il notevole limite di questi metodi sta nella loro scarsa sensibilità, così da poter essere utilizzati solo in caso di popolamenti naturali di fitoplancton eccezionalmente abbondanti (almeno 30-40 mg clorofilla *a*/m^3). D'altra parte, l'espediente di concentrare il materiale sospeso su dei filtri (Yentsch, 1960; Kiefer & Sooho, 1982) porta ad un'alterazione dell'identità fisica della grandezza misurata (Bricaud *et al.*, 1983) cosicchè il valore della misura è relativo alle particolari condizioni ottiche in cui questa è stata realizzata.

4- CROMATOGRAFIA LIQUIDA AD ALTA RISOLUZIONE (HPLC)

Le attuali tecniche di separazione cromatografica liquido-liquido condotte su colonna usano alte pressioni di flusso del solvente e materiale di impaccamento di piccolo

diametro. Elevata risoluzione, basso tempo di analisi, basso consumo di solvente e riproducibilità sono le caratteristiche salienti di queste tecniche (Robinson, 1979). La prima applicazione della cromatografia liquida ad alta risoluzione ai pigmenti fotosintetici è dovuta a Evans *et al.* (1975) che applicarono questa tecnica per la separazione di numerose porfirine.
Abaychi & Riley (1979) propongono un metodo isocratico quantitativo, veloce e sensibile, che separa le clorofille, i pigmenti accessori ed i prodotti di degradazione. Esso si basa sull'uso di una strumentazione analitica estremamente semplificata e prevede passi successivi di eluizione con due miscele di solventi. L'estrazione dei pigmenti viene effettuata con acetone e metanolo; gli estratti vengono concentrati e separati in colonna da 30 cm (Partisil-10 con 4600 piatti teorici) utilizzando una fase mobile contenente etere di petrolio, acetone, dimetil sulfossido e dietilamina, dosata con un flusso di 2 cm^3/min ad una pressione di 14 atmosfere. Quando nei campioni da analizzare è presente clorofilla *c*, si prevede l'uso di una miscela di solventi più polare. I valori di estinzione vanno determinati allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 440 nm. Questo metodo risulta estremamente sensibile e riproducibile, permettendo il rilevamento di concentrazioni di clorofilla di circa 80 ng e di carotene di circa 5 ng, con un coefficiente di variazione compreso tra 0,6 e 1,8%.
Gieskes & Kraay (1983a, b) hanno applicato questa tecnica a campioni naturali di fitoplancton, confrontando le concentrazioni di clorofilla *a* misurate con l'H.P.L.C. con i valori ottenuti con l'applicazione delle metodiche spettrofotometriche e fluorimetriche. L'utilizzazione delle metodiche convenzionali pare comporti una sovrastima della clorofilla *a* di circa il 40%.
Mantoura & Llwellyn (1983) hanno messo a punto un metodo di analisi in fase inversa molto sensibile (limite minimo di rilevabilità della clorofilla *a* di 0,1 ng/dm^3), compatibile con l'estrazione del filtro secondo i metodi classici (acetone al 90%). Questa metodologia utilizza un reagente "ion-pair" per incrementare e stabilizzare la separazione dei pigmenti acidificati, una colonna ODS da 25 cm con particolato da 5 μm, un sistema a gradiente lineare con rilevatore spettrofotometrico e fluorimetrico. In un tempo totale di analisi di circa 20 minuti si riescono a quantificare circa trenta composti, tra clorofille e carotenoidi.
Allo stato attuale, tuttavia, nessuna metodica H.P.L.C. viene suggerita dallo SCOR-UNESCO, che si propone di valutare e diffondere quanto prima un metodo relativamente semplice che sia in grado di determinare quantitativamente le clorofille *a*, *b*, *c* e relativi prodotti di degradazione.

BIBLIOGRAFIA

ABAYCHI J.K., J.P. RILEY - 1979 - The determination of phytoplankton pigments by high performance liquid chromatography. *Analyt. Chem. Acta*, *107*, 1-11.

BARRETT J., S.A. JEFFREY - 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. *Archo. 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.

BRICAUD A., A. MOREL, L. PRIEUR - 1983 - Optical efficiency factors of some phytoplankters. *Limnol. Ocenogr.*, *28*, 816-832.

EVANS N., D.E. GAMES, H.A. JACKSON, S.A. MATLIN - 1975 - Application of high-pressure liquid chromatography and field desorption mass spectrometry in studies of natural porphyrins and chlorophyll derivatives. *J. Chromatogr.*, *115*, 325-333.

FAUST M.A., K.H. NORRIS - 1982 - Rapid *in vivo* spectrophotometric anâlysis of chlorophyll pigment in intact phytoplankton cultures. *Br. phycol. J.*, *17*, 351-361.

GIBBS C.F. - 1979 - Chlorophyll *b* interference in the fluorometric determination of chlorophyll *a* and phaeopigments. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, *30*, 597-606.

GIESKES W.W.C., G.W. KRAAY - 1983a - Dominance of cryptophyceae during the phytoplankton spring bloom in the central North Sea detected by HPLC analysis of pigments. *Mar. Biol.*, *75*, 179-185.

GIESKES W.W.C., G.W. KRAAY - 1983b - Unknown chlorophyll *a* derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis. *Limnol. Oceanogr.*, *28*, 757-766.

HARRIS G.P. - 1980 - The relationship between chlorophyll *a* fluorescence diffuse attenuation changes and photosynthesis in natural phytoplankton populations. *J. Plankton Res.*, *2*, 109-127.

HOLM-HANSEN O., C.J. LORENZEN, R.W. HOLMES, J.D.H. STRICKLAND - 1965 - Fluorimetric determination of chlorophyll. *J. Cons. perm. int. Explor. Mer*, *30*, 3-15.

JEFFREY S.W., G.M. HALLEGRAEFF - 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., G.F. HUMPHREY - 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.

KIEFER D.A. - 1973 - Chlorophyll *a* fluorescence in marine centric diatoms: responses of chloroplasts to light and nutrient stress. *Mar. Biol.*, *23*, 39-46.

KIEFER D.A., J.B. SOOHO - 1982 - Spectral absorption by marine particles from the coastal waters of Baja California. *Limnol. Oceanogr.*, *27*, 492-499.

LAZZARA L., M. INNAMORATI - 1985 - Spectres de fluorescence *in vivo* et composition des peuplementes phytoplanctonìques dans l'Adriatique Septentrionel. *Rapp. Comm. int. Mer Mèdit.*, *29*, 111-114.

LENZ J., P. FRITSCHE - 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., J.H. CARPENTER - 1971 - A fluorimetric method for determining chlorophyll *a*, *b* and *c*. *J. Mar. Res.*, *29*, 319-338.

LORENZEN C.J. - 1966 - A method for the continuous measurements of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.*, *13*, 223-227.

LORENZEN C.J. - 1967 - Determination of chlorophyll and phaeopigments spectrophotometric equations. *Limnol. Oceanogr.*, *12*, 343-346.

LORENZEN C.J., S.W. JEFFREY - 1980 - Determination of chlorophyll in sea water. *UNESCO Tech. Pap. Mar. Sci.*, *35*, 1-20.

MANTOURA R.F.C., C.A. LLWELLYN - 1983 - The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reversed-phase-high-performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, *151*, 297-314.

MASKE H., H. HAARDT - 1987 - Quantitative *in vivo* absorption spectra of phytoplankton: detrital absorption and comparison with fluorescence excitation spectra. *Limnol. Oceanogr.*, *32*, 620-633.

MITCHELL B.G., D.A. KIEFER - 1984 - Determination of absorption and fluorescence excitation spectra for phytoplankton. In: "Marine Phytoplankton and Productivity", Holm-Hansen O., L. Bolis, R. Gilles Eds, *Lecture Notes on Coastal and Estuarine Studies*, *8*, 157-169.

NEORI A., O. HOLM-HANSEN, B.G. MITCHELL, D.A. KIEFER - 1984 - Photoadaptation in marine phytoplankton. *Plant Physiol.*. *76*,518-524.

NEVEUX J. - 1976 - Dosage de la chlorophylle *a* et de la phaeophytine *a* par fluorimetrie. *Ann. Inst. Oceanogr.*, *52*,165-164.

NEVEUX J. - 1979 - Pigments chlorophylliens. In: "Phytoplancton, Biomasse, Production, Numeration et Culture", Jaques G. Ed., Edition du Castellet, Perpignan, 1-107.

NEVEUX J. - 1982 - Pigments du Phytoplancton: Composition et Activité Photochimique des Chlorophylles. Signification Ecologique de la Fluorescence *in vivo* de la Chlorophylle *a*. Thèse d'état, Univ. Paris 6 (Doct. Es-Science), pp. 162.

NUSCH E. - 1980 - Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, *14*,14-35.

PANELLA S., G. MAGAZZU' - 1978 - Analisi dei pigmenti fitoplanctonici. In: "Metodi per lo Studio del Plancton e della Produzione Primaria", Magazzù G. Ed., Edizioni GM, 19-33.

PRÉZELIN B.B., B.A. BOCZAR - 1986 - Molecular bases of cell applications to studies in optical oceanography. In: "Progress in Phycological Research", Round F.E., D. Chapman Eds, Biopress Ltd., Bristol, 359-464.

PRÉZELIN B., A.C. LEY - 1980 - Photosynthesis and chlorophyll *a* fluorescence rhythms of marine phytoplankton. *Mar. Biol.*, *55*,295-308.

RAI H. - 1980 - Some problems in determination of photosynthetic planktonic pigments and their decomposition products. *Arch. Hydrobiol. Beih.*, *14*, 3-16.

RAI H., A.F.M. MARKER (Eds) - 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.

SAKSHAUG E. - 1980 - Problems in the methodology of studying phytoplankton. In: "The Physiological Ecology of Phytoplankton", Morris I. Ed., Blackwell Sci. Pubbl., Oxford, 57-91.

SATHYENDRANATAH S., L. LAZZARA, L. PRIEUR - 1987 - Variations in spectral values of specific absorption of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, *32*, 403-415.

SHIBATA K., A.A. BENSON, M. KALVIN - 1954 - The absorption spectra of suspension of living micro-organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, *15*, 461-470.

SLOVACEK R.E., P.J. HANNAN - 1977 - *In vivo* fluorescence determination of phytoplankton chlorophyll *a*. *Limnol. Oceanogr.*, *22*, 919-924.

STRICKLAND J.D.H., T.R. PARSONS - 1968 - A Practical Handbook of Seawater Analysis. *Bull. Fish. Res. Bd. Can.*, *167*, 1-312.

WOOD L.W. - 1985 - Chloroform-methanol extraction of chlorophyll *a*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, *42*, 38-43.

YANAGI K., T. KOYAMA - 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. - 1960 - The influence of phytoplankton pigments on the color of the sea water. *Deep-Sea Res.*, *7*, 1-9.

YENTSCH C.S. - 1965 - Distribution of chlorophyll and phaeophytine in the open ocean. *Deep-Sea Res.*, *12*, 653-666.

YENTSCH C.S., D.W. MENZEL - 1963 - A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytine by fluorescence. *Deep Sea Res.*, *10*, 221-231.

YENTSCH C.S., D.A. PHINNEY - 1985 - Spectral fluorescence: an ataxonomic tool for studying the structure of phytoplankton populations. *J. Plankton Res.*, *7*, 617-632.

YENTSCH C.S., C.M. YENTSCH - 1979 - Fluorescence spectral signatures: characterization of phytoplankton populations by the use of excitation and emission spectra. *J. Mar. Res*, *37*, 471-483.

NOTA

La bibliografia indicata di seguito e non citata nel testo consente di avere un quadro più chiaro dell'argomento anche se una revisione completa dei lavori pubblicati esula dagli scopi di questo manuale.

BOTO K.G., J.S. BUNT - 1978 - Selective excitation fluorometry for the determination of chlorophylls and phaeophytines. *Anal. Chem.*, *50*, 392-396.

NEVEUX J. - 1975 - Analyse chromatographyque des pigments du phytoplancton en Mediterranée Nord-Occidentale et près des côtes atlantiques marocaines. *Int. Rev. ges. Hydrobiol.*, *60*, 675-690.

NEVEUX J., M. PANOUSE - 1987 - Spectrofluorimetric determination of chlorophylls and phaeophytins. *Arch. Hydrobiol.*, *109*, 567-581.

SAMUELSSON G., G. OQUIST - 1977 - A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Physiol. Plant*, *40*, 315-319.

SHOAF W.T. - 1978 - Rapid method for the separation of chlorophylls *a* and *b* by high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, *152*, 247-249.

TREES C.C., C.M. KENNIKUTT II, J.M. BROOKS - 1985 - Errors associated with the standard fluorimetric determination of chlorophylls and phaeopigments. *Mar. Chem.*, *17*, 1-12.

WHITE R.C., I.D. JONES, E. GIBBS, L.S. BUTLER - 1972 - Fluorimetric estimation of chlorophylls, chlorophyllides, phaeophytines and phaeophorbides in mixtures. *Agric. Food Chem.*, *20*, 773-778.