



DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA IN: SCIENZE FORESTALI ED AMBIENTALI

INQUINAMENTO AMBIENTALE: NITRATI E DIATOMEI

ENVIRONMENTAL POLLUTION: NITRATE AND DIATOMS.

TIPO TESI: Compilativa

Studente:

ELEONORA FABBRI

Fabbi Eleonora

Relatore:

PROF. CRISTIANO CASUCCI

Cristiano Casucci

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

“Vorrei che tutti vedessero il mondo come l’ho visto io”.
Chris Hadfield (Astronauta).
Dedicata alla mia famiglia e ai miei nonni.

SOMMARIO

ELENCO DELLE FIGURE	4
INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI.....	5
CAPITOLO 1 BIOHIMICA:	6
1.1 Ciclo dell'Azoto.....	7
1.1.1 Ammonificazione.....	9
1.1.2 Nitrificazione.....	10
1.1.3 Denitrificazione.....	11
1.1.4 Anammox.....	12
CAPITOLO 2 INQUINAMENTO DA NITRATI:	13
2.1 Il destino dell'Azoto in Agrosistema	13
2.1.1 Problematiche e soluzioni dovuti all'inquinamento	14
CAPITOLO 3 DIATOMEAE:	17
3.1 Introduzione alle Diatomee	17
3.1.1 Classificazione delle Diatomee	17
3.2 Come le Diatomee aiutano a ridurre l'inquinamento da Nitrati nell'ecosistema.....	27
CONCLUSIONI	35
BIBLIOGRAFIA	366

ELENCO DELLE FIGURE

Figura 1-1: Ciclo dell'Azoto.....	9
Figura 1-2: Inquinamento da Nitrati.....	16
Figura 1-3: Diatomee.....	17
Figura 1-4 Frustuolo.....	19
Figura 1-5: Diatomee Centriche e Diatomee Pennate.....	21
Figura 1-6: Table 1.....	30
Figura 1-7: Nitrati e Diatomee.....	34

INTRODUZIONE E SCOPO DELLA TESI

L'inquinamento da Nitrati e Nitriti ha raggiunto negli ultimi anni un'importanza globale non solo a livello agrario, ma soprattutto a livello di tutela ambientale. Esso viene classificato come la terza minaccia con gravità più elevata dopo la perdita di biodiversità e il cosiddetto "climate change" (J.Giles 2005). Una possibile soluzione per il contenimento di questo fenomeno ci viene offerta dalle Diatomee, alghe unicellulari o coloniali appartenenti alla classe delle Bacillariophyceae (divisione Heterokontophyta), comparse sul pianeta Terra circa 135 milioni di anni fa. Le più antiche diatomee risalgono al Giurassico Inferiore, ma ritrovamenti sono molto rari fino al Cretaceo Superiore. Esistono più di 250 generi differenti, costituiti a loro volta da più di 100.000 specie presenti in tutti i mari, laghi e fiumi del pianeta. Questi organismi costituiscono il più importante gruppo eucariotico del fitoplancton, sono presenti anche a livello bentonico e sono responsabili di circa il 40% della produttività primaria marina (Falwoski et al., 1998). Negli ultimi anni tramite numerosi esperimenti si è evidenziato che queste piccole alghe unicellulari diminuiscono la concentrazione di nitrati presenti nelle acque in seguito all'inquinamento di acque freatiche e mari per l'eccessiva concimazione di campi agricoli oppure per l'utilizzo di reflui zootecnici.

Scopo della presente tesi è quello di fornire una panoramica generale delle problematiche relative all'eccessiva presenza dei nitrati nell'ecosistema e di valutare metodiche innovative per la riduzione di questi inquinanti soprattutto nelle acque attraverso l'analisi di articoli presenti nella letteratura scientifica.

Capitolo 1

BIOCHIMICA:

L'azoto è uno dei macroelementi più importanti per il nutrimento delle piante, ed è l'elemento più abbondante (circa il 78%) quando si parla di materiale organico dopo il Carbonio, Ossigeno e Idrogeno. Esso contribuisce alla formazione di acidi nucleici, proteine ed altri elementi o meglio dire molecole fondamentali per la vita delle piante. Quindi può essere considerato come il costituente di numerosi composti biologici (amminoacidi, proteine, coenzimi, nucleotidi...) e inoltre partecipa a numerosissimi processi metabolici.

Dopo tutto però l'azoto sulla terra è disponibile in una forma non attiva (non reattiva), azoto gassoso (N_2) nell'atmosfera.

Tramite due processi naturali l'azoto atmosferico verrà reso disponibile agli esseri viventi: Fulmini (fenomeno atmosferico legato all'elettricità atmosferica visualizzato come scarica elettrica), grazie a questo apporto enorme di energia si instaurerà una reazione tra azoto e ossigeno formando così degli Ioni Nitrato (NO_3^-), che poi tramite la pioggia e altri fenomeni atmosferici precipiteranno al suolo (Langenbrunner et al., 2009). Il secondo processo naturale viene chiamato fissazione biologica, importante per la grandissima richiesta di energia (16 moli di ATP per convertire 1 mole di N_2 in due moli di ammoniaca, NH_3). Questo tipo di reazione è permessa solo tramite dei piccoli microrganismi, chiamati Diazotrofi e la gran parte di essi richiede un'associazione simbiotica con alcune piante come ad esempio le leguminose.

Nel corso del tempo sono stati sviluppati moltissimi processi per la fissazione dell'azoto. Questo viene utilizzato maggiormente per la produzione di concimi sia per colture di grandi appezzamenti che di piccoli gruppi di piante. Viene utilizzato principalmente sia a livello quantitativo che qualitativo nelle rese, migliorando l'apparato fogliare delle colture e quindi aumentando sia la resa totale che la qualità della produzione.

Quando le dosi di utilizzo sono particolarmente elevate si osservano fenomeni potenzialmente dannosi sia in termini ambientali che per salute umana.

Possono riscontrarsi gravi allergie dovute ad un aumento di produzione di pollini, rischio cancerogeno collegato ai nitriti nelle acque, eutrofizzazione e aumento di alghe e altre vegetazioni, inquinamento delle falde acquifere, danni all'intero ecosistema e diminuzione di biodiversità.

1.1 Il Ciclo dell'AZOTO

Il ciclo dell'azoto è un ciclo biogeochimico, si tratta di reazioni molto comuni in natura che coinvolgono anche microrganismi che popolano, oltre al suolo, anche i corsi d'acqua. Questi microrganismi vengono in gran parte utilizzati dall'uomo anche per combattere l'inquinamento, in particolare per eliminare inquinanti azotati come: ammoniaca, nitrati, nitriti. Questo ciclo viene definito gassoso in quanto il serbatoio di questo elemento chimico è appunto l'atmosfera dove l'azoto occupa circa il 78% di volume totale.

L'importanza di questo ciclo per i microrganismi è dovuta al fatto che per produrre composti organici vitali come proteine e acidi nucleici, essi devono assimilare azoto, che però non può essere assimilato direttamente (ad eccezione dei batteri azoto fissatori) ed infatti è un elemento particolarmente limitante per lo sviluppo forestale.

Le piante però in questo caso svolgono un ruolo molto importante cioè quello di assimilare l'azoto tramite l'assorbimento di alcuni composti azotati (nitriti e nitrati) che, essendo in uno stadio disciolto, riesce a raggiungere le radici. Esso assorbito dalle piante e quindi organicato nella fitomassa, viene preso dagli organismi eterotrofi (animali) e utilizzato come catena alimentare. Una volta degradato e decomposto tramite resti organici viene di nuovo restituito al terreno e attraverso batteri specializzati come i batteri Diazotrofi ritorna in atmosfera.

L'azoto viene identificato in varie forme:

- Azoto organico
- Azoto Molecolare (N_2)
- Ossidi di Azoto (NO e NO_2)
- Azoto Minerale ($N-NH_4$ e $N-NO_3^-$)

Come abbiamo annunciato nei primi capitoli, l'azoto non può essere utilizzato dai microrganismi direttamente ma deve subire un processo di fissazione biologica (trasformazione dell'azoto elementare in azoto ammoniacale tramite processi di riduzione e

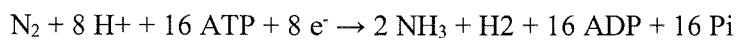
infine poi convertito in azoto organico). Per subire questo processo è richiesto un grande apporto di energia: ENERGIA di ATTIVAZIONE, operata da:

- ✓ Fulmini (alta temperatura), ossidano l'azoto gassoso formando ossidi di azoto (NO_x), i quali raggiungono il suolo attraverso l'acqua delle precipitazioni sotto forma di acido Nitrico (HNO₃)
- ✓ Microrganismi (energia da ossidazione di carbonati).

La fissazione biologica può essere suddivisa in due grandi gruppi:

- ✓ SIMBIONTICA (L'azoto atmosferico viene fissato da organismi che vivono in simbiosi con alcune specie di piante in particolare Leguminose, come esempio possiamo prendere in considerazione il Rhizobium) essa ha una grande importanza per quanto riguarda un punto di vista agronomico perché il solo uso delle concimazioni azotate non soddisfa richieste a scala mondiale, per cui vi sono pratiche agronomiche come il “ Sovescio” che sfrutta questa simbiosi per apportare al terreno la dovuta fertilizzazione.
- ✓ NON SIMBIONTICA (L'azoto atmosferico viene fissato da organismi liberi nel terreno, come esempio possiamo prendere in considerazione gli Azotobacter).

Il processo di fissazione può essere espresso con la seguente formula:



I processi chimici che vengono coinvolti prendono il nome di: Azotofissazione, Ammonificazione, Nitrificazione e Denitrificazione.

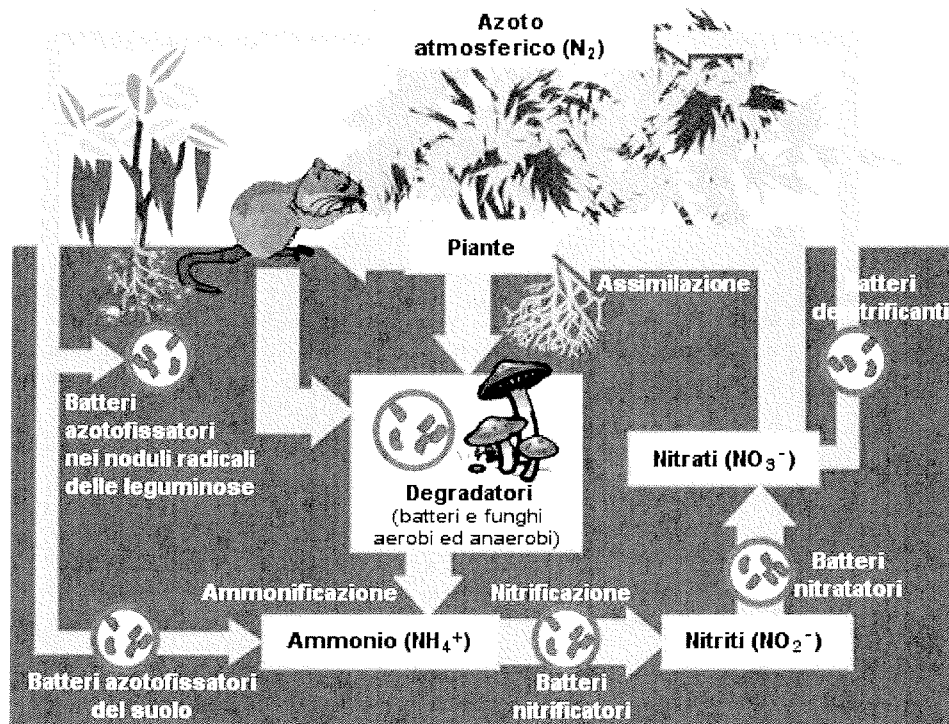


Figura 1: Ciclo dell'azoto

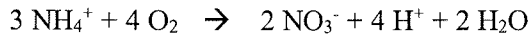
1.1.1 Ammonificazione

Con Ammonificazione si intende quel processo con il quale abbiamo produzione di ammoniaca attraverso composti organici azotati (composti proteici derivanti da materia vivente), tutto ciò attuato da microrganismi semplici. Dalla degradazione delle proteine si forma ammoniaca e tutto ciò ha inizio con la scissione delle proteine in amminoacidi da parte di enzimi proteolitici (proteasi e peptidasi) creati o emessi da microrganismi decompositori. Raggiunto questo stadio gli amminoacidi prodotti subiscono a loro volta un'altra degradazione microbica chiamata "Deamminazione Ossidativa", che consiste nella rimozione di un gruppo amminico ($-NH_2$). Il prodotto finale sarà ammoniaca (Fiorin, 1999)

E' un processo molto importante in quanto viene prodotto un composto stabile attraverso la rapida degradazione di sostanze organiche azotate. Attraverso altre reazioni poi si potranno formare dei Sali d'ammonio.

1.1.2 Nitrificazione

Trasformazione per ossidazione biologica delle forme ammoniacali dell'azoto presenti nei liquami a nitrati.



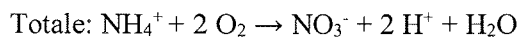
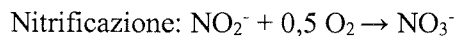
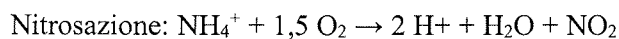
Ossidazione biologica di ioni ammonio a ioni nitrato.

Può avvenire esclusivamente in ambienti ricchi di ossigeno e in funzione di altri fattori come:

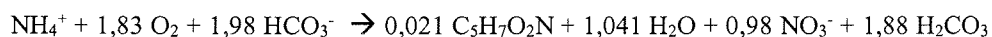
- Rapporto C/N della sostanza organica
- Temperatura
- pH
- Contenuto idrico

La nitrificazione porta ad importanti conseguenze ambientali.

Il processo di nitrificazione (trasformazione di ammoniaca in nitrato) può avvenire secondo due stadi distinti di ossidazione biologica operata da batteri autotrofi aerobi (microrganismi capaci di sintetizzare le proprie molecole organiche a partire da molecole inorganiche utilizzando energia e ossigeno). Il primo stadio viene chiamato Nitrosazione: l'ammoniaca viene convertita in Nitrito e vengono utilizzati batteri Nitrosomonas. Il secondo stadio viene chiamato Nitrificazione, in cui i nitriti vengono ulteriormente ossidati a Nitrati per opera dei Nitrobacter (Vismara, 1998).



Tuttavia però in queste equazioni non viene considerato l'azoto richiesto per la sintesi batterica dei Nitrosomonas e dei Nitrobacter. Viene utilizzata pertanto una nuova espressione stechiometrica che tiene conto sia della sintesi batterica che dell'ossidazione dell'ammoniaca (Vismara, 1999).



Da questa reazione possiamo percepire che l'ossidazione di ammoniaca da parte dei Nitrosomonas libera molta più energia dei Nitrobacter:

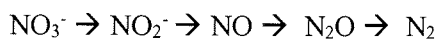
- Nitrosomonas (nitrosazione : 58 / 84 kcal)

- Nitrobacter (nitrificazione: 15 / 21 kcal)

In queste reazioni il Ph ha un enorme importanza per quanto riguarda la velocità di reazione che per sua natura tende sempre verso il campo acido. La velocità massima di nitrificazione avviene con valori di Ph intorno a 8-9 (Vismara,1999).

1.1.3 Denitrificazione

Questo processo mira alla rimozione dell'azoto disciolto in fase acquosa come nitrato.



Riduzione biologica degli ioni nitrato ad azoto molecolare.

La denitrificazione è un processo a differenza della nitrificazione che avviene ad opera dei batteri eterotrofi facoltativi, quindi è una reazione di tipo anaerobico (senza ossigeno) e questi batteri recuperano l'ossigeno necessario alla respirazione (catabolismo) dai nitrati invece che dall'ossigeno atmosferico disciolto.

- Batteri → Micrococcus denitrificans o Pseudomonas.

Può avvenire solamente in condizioni anaerobiche in presenza di sostanza organica (come fonte di carbonio) e altri fattori come:

- Temperatura (25°C / - 32°C)
- Ph intorno a 8

Anche la denitrificazione porta a importanti conseguenze ambientali.

Questi batteri in condizioni di anaerobiosi utilizzano i Nitrati come accettore finale di elettroni e produrre infine N₂ come catabolita gassoso di rifiuto. Parlando di organismi eterotrofi, una fonte organica è comunque necessaria per la sintesi cellulare. Infatti a differenza dei microrganismi autotrofi, gli eterotrofi necessitano di una fonte di carbonio organico, se esso viene a mancare deve essere opportunamente integrato.

I liquami industriali sono poveri di carbonio organico e per questo vengono dosati metanolo o scarti di lavorazione di zuccheri (melassa) sostanze facilmente biodegradabili.

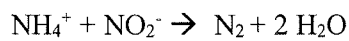
I reflui domestici o industriali a elevato BOD₅ sono ricchi invece di sostanze organiche abbattute tramite ossidazione biologica.

Di solito lo stadio di denitrificazione viene posto prima dello stadio di ossidazione biologica perché il refluo risulta generalmente deficitario del carbonio organico necessario ai batteri Denitrificatori.

Il refluo ossidato-nitrificato viene riciclato per essere poi misciato con il liquame grezzo ricco di BOD₅ così non è necessario apportare una fonte esterna di carbonio organico.

La velocità di denitrificazione è molto più lenta della nitrificazione perché la sostanza organica contenuta nei liquami grezzi è molto più complessa e difficile da degradare.

1.1.4 Anammox



(Qui riportata l'equazione associata alla reazione Anammox)

Quando si parla di reazione Anammox si fa riferimento a quelle reazioni provocate da microrganismi in grado di ossidare ammoniaca in condizioni di anossia e si tratta di microrganismi procarioti denitrificanti autotrofi. Anammox (Anaerobic Ammonium Oxidation) in cui i nitriti ossidano direttamente l'ammoniaca. Queste reazioni avvengono principalmente in ambienti acquatici.

INQUINAMENTO DA NITRATI:

2.1 Il destino dell'Azoto in Agrosistema

Parlando di suolo una delle sue funzioni più importanti è quella di sostenere la crescita vegetale e allo stesso tempo di fornire tutti gli elementi indispensabili alle colture per garantirgli il massimo sviluppo (sia macro elementi che microelementi come: Ossigeno, potassio, azoto, fosforo etc..)

L'azoto viene considerato uno dei Macroelementi più importanti per la crescita vegetale, ma soprattutto per incrementare le rese vegetative delle colture. Entra a far parte degli acidi nucleici, delle proteine e altre macromolecole necessarie per la vita. E' presente nel terreno sia in forma organica (parte integrante della sostanza organica del suolo), sia in forma minerale rappresentate da nitriti (NO_2^-), nitrati (NO_3^-) e ioni ammonio (NH_4^+). L'azoto nitrico è libero nella soluzione circolante e la sua assimilabilità è più elevata di quello dell'azoto ammoniacale, per questo motivo le piante assorbono maggiormente da suolo azoto sotto forma nitrica mentre lo assorbono in forma ammoniacale alternativamente. Allo stesso tempo però lo ione nitrato è quello più mobile e suscettibile alla lisciviazione e dilavamento. Le perdite da dilavamento di nitrati raggiungono anche il 99%, mentre nella forma ammoniacale i dilavamenti risultano molto ridotti e le perdite sono inferiori all'1%.

In agricoltura l'uomo interviene direttamente sul ciclo dell'azoto attraverso concimazioni minerali la cui sintesi industriale sfrutta l'azoto atmosferico (processo Haber- Bos), oppure attraverso l'apporto al suolo di concimi organici da allevamento (liquame, letame e pollina).

Ne consegue un'alterazione del ciclo dell'azoto.

2.1.1 Problematiche e soluzioni dovute all'inquinamento

Negli ultimi anni si è osservato un progressivo aumento nelle acque di falda e nelle acque superficiali della concentrazione dei nitrati provocato sia dall'attività intensiva di allevamenti o coltivazioni per quanto riguarda l'ambito agricolo che dai reflui provenienti da zone urbanizzate o altamente industrializzate.

I nitrati risultano essere non pericolosi per la salute umana ma, in particolari condizioni come lunghi periodi di conservazione, calore, pH acido e presenza di batteri, il 20-30% di essi può trasformarsi in nitriti che mostrano la capacità di legarsi all'emoglobina, la proteina del sangue che trasporta l'ossigeno in tutto il nostro organismo, trasformandola in metaemoglobina, una proteina incapace di trasportare ossigeno che di conseguenza si riduce nei tessuti. Inoltre i nitriti possono trasformarsi anche in Nitrosammine, sostanze ritenute pericolose a livello cancerogeno.

Per questo motivo, la legislazione europea ed italiana ha posto in 50 mg/l la concentrazione massima ammissibile dei nitrati nelle acque potabili. (ISPRA, 2012) e, in generale, quale standard di qualità per tutte le acque sotterranee, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) indica in 10 mg/l la concentrazione ideale per le acque potabili.

L'unione Europea ha stipulato nel 1991 una direttiva 91/676/CEE, meglio nota come direttiva nitrati, in cui viene spiegato e descritto come sia possibile identificare una zona agricola vulnerabile ai nitrati. Gli stati membri devono cercare di emanare delle direttive che affrontino l'inquinamento incontrollato di nitrati e allo stesso tempo di attuare una serie di misure a ridurre l'inquinamento provocato in modo diretto o indiretto nelle acque.

Il problema dei nitrati deriva appunto da un apporto eccessivo di fertilizzanti organici e chimici sul terreno coltivato. Quando elevate quantità di nutrienti, in particolare di azoto e fosforo, presenti sul terreno iniziano ad inquinare e contaminare i corpi idrici possono causare il fenomeno dell'Eutrofizzazione (eu = "buono", trophè = "nutrimento").

Il termine Eutrofizzazione indica una sovrabbondanza di ricchezza di sostanze nutritive in particolare di nitrati e fosfati in un ambiente acquatico. Esso porta alla proliferazione delle alghe microscopiche che non essendo smaltite dai consumatori determinano maggiore attività batterica con consumo di ossigeno che provoca la morte di pesci e animali acquatici.

Questo termine viene anche utilizzato per indicare l'eccessivo accrescimento degli organismi vegetali, che ha sempre come problematica dosi troppo elevate di sostanze nutritive prima elencate con il conseguente degrado dell'ambiente divenuto asfittico.

Quando si parla di agricoltura e concimazioni troppo elevate, in molti casi, tutto questo processo viene associato con l'aumento di popolazione globale, in cui abbiamo una maggiore richiesta di cibo e la necessità di coltivare nuove aree con il minor tempo possibile. Negli ultimi due secoli la superficie di terre coltivate è aumentata del 466% (Matson, 1997).

L'azoto che viene introdotto nell'agrosistema è distribuito in: 50% nella biomassa vegetale raccolta, il 23 % come lisciviazione, il 12 % come emissioni di NH_3 , N_2O , e NO_x , il 10 % è convertito come N_2 da denitrificazione. (Smil, 1998).

Oltre a presentare un problema per l'ambiente, i nitrati possono essere considerati pericolosi anche per la salute umana, all'interno del nostro organismo in particolari condizioni i nitrati vengono trasformati in "nitriti", "uno dei più potenti gruppi di sostanze cancerogene mai scoperto" (Food and Drug administration) i quali comportano una serie di complicanze come ad esempio la sindrome dal sangue blu nei neonati.

Le principali perdite da azoto dal sistema agricolo possono essere:

- Lisciviazione di nitrati, problema riscontrato nelle acque. E' un fenomeno legato alle caratteristiche pedo-climatiche e alla disponibilità dell'azoto nel suolo. La lisciviazione nei nostri ambienti si verifica maggiormente nel periodo autunnale con elevata piovosità, oppure con elevato azoto residuale nel suolo a seguito della raccolta delle colture primaverili estive (mais). In ambienti con terreni sabbiosi, in cui la ripartizione delle particelle è grossolana, abbiamo maggiore probabilità di lisciviazione dell'azoto.

- Volatilizzazione dell'ammoniaca, problema riscontrato in atmosfera. Fenomeno legato alle condizioni meteo (temperatura e intensità e direzione del vento) e al contenuto in ammonio.

Si può verificare mediante:

- Emissioni dalla stalla
- Emissione dallo stoccaggio di reflui liquidi e solidi
- Emissione durante le operazioni di spandimento dei reflui e la distribuzione dei fertilizzanti

Minerali o emissione di ossidi di azoto, problema riscontrato in atmosfera.

Questi problemi vengono gestiti tutti in modi diversi, tramite direttive, tramite gestioni del territorio e gestioni delle concimazioni. Però in alcuni casi, non sono gli interventi antropici ad occuparsi del ripristino dell'ecosistema, ciò che interviene sono proprio coloro che vivono all'interno dell'ambiente stesso: piccoli microrganismi, alghe, organismi unicellulari o pluricellulari, fauna, insetti etc.. Ciò che andremo a prendere in considerazione, sono dei

piccoli esseri viventi che contribuiscono al ripristino (anche se in minima parte) dell'ambiente immagazzinando e allo stesso tempo eliminando i nitrati presenti nelle acque: le DIATOMEE.

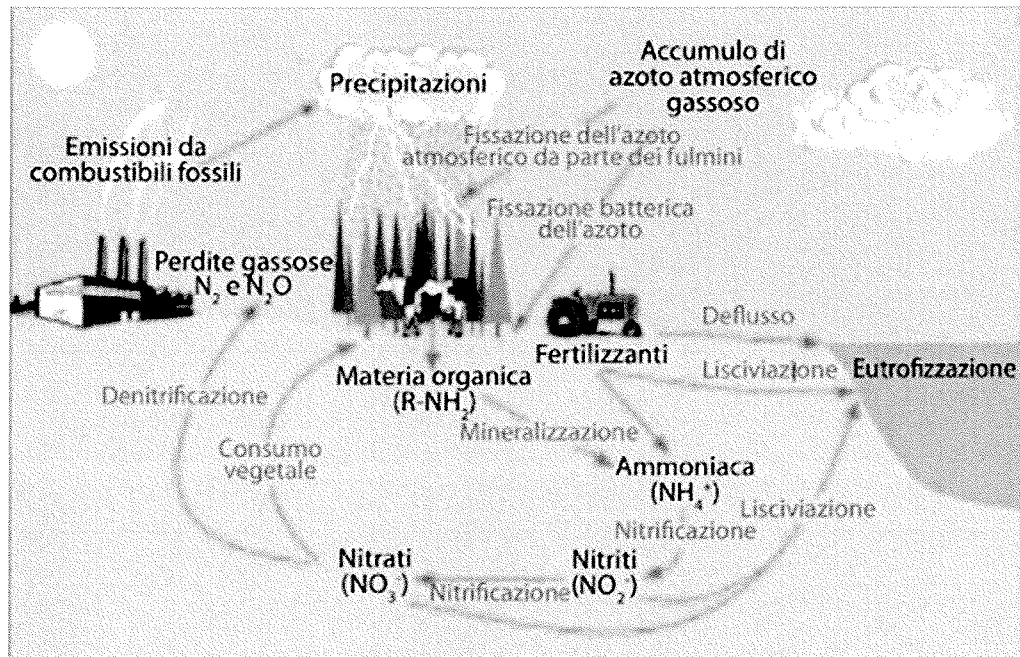


Figura 2: Inquinamento da Nitrati

Capitolo 3

LE DIATOMEE:

3.1 Classificazione delle Diatomee

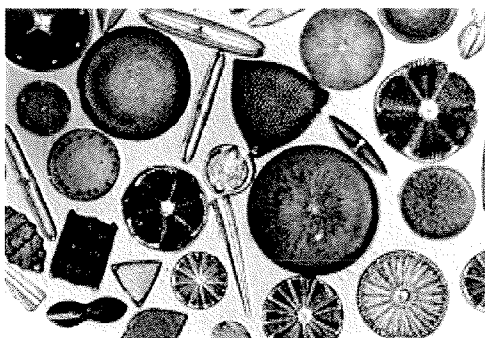


Figura 3: Diatomee

La Diatomea è una microalga che vive negli oceani e nei corsi d'acqua. Queste alghe microscopiche, non visibili ad occhio nudo, sono importanti perchè generano circa il 20% dell'ossigeno prodotto sul pianeta ogni anno, assorbendo miliardi di tonnellate di silicio e Nitrati dalle acque in cui vivono.

Sono anche dei fertilizzanti naturali: i gusci delle diatomee morte possono depositarsi fino a 800 metri di profondità sul fondo dell'oceano, e l'intero bacino dell'Amazzonia viene fertilizzato ogni anno da 27 milioni di tonnellate di polvere di diatomee trasportate dai venti transatlantici est-ovest .

Il gruppo, nel complesso, occupa un'enorme portata ecologica. Come detto le diatomee si possono trovare in tutto il mondo, dai tropici ai poli, attraverso una vasta gamma di habitat, inclusi molti ambienti lenticolari come laghi grandi o piccoli, torbiere, sorgenti e paludi, e in ambienti lotici, ad esempio nelle bocche di grandi fiumi.

Diatomea → Divisione Bacillariophyta, classe Bacillariophyceae

Sono alghe unicellulari, prive di flagelli, comparse sul pianeta circa 135 milioni di anni fa, le più antiche diatomee risalgono al giurassico Inferiore. Esistono più di 250 generi differenti e 100 000 specie presenti in tutti i mari, laghi del pianeta, popolano sia acque dolci, sia acque salate sono riunite in colonie batteriche. Sono organismi eucarioti, autotrofi per la presenza di clorofilla, hanno dimensioni da pochi micron fino oltre mezzo mm.

Esse si riproducono asessualmente per via binaria da 1 a 8 volte al giorno a seconda della specie. (Falciatore,2000).

• DESCRIZIONE PARTE ESTERNA DIATOMEAE

Una forte caratteristica delle Diatomee è la parete cellulare fortemente silicizzata amorfa chiamata "Frustuolo", suddivisa in una parte inorganica e una parte organica. La parte inorganica costituisce circa il 50% di peso secco della cellula, formata da Silice e rafforzata poi con metalli come Alluminio, Ferro, Magnesio ecc.. La parte organica è data da parti di sostanze peptiche (polimerizzazione dell'acido Galatturonico) e polisaccaridi come Mannosio, Arabinosio ecc.. (De Agostini,1999).

La parte esterna delle Diatomee può considerarsi una specie di scatola chiusa da un coperchio. Il Frustuolo si divide in due parti uguali dette valve, la parte superiore (coperchio) è chiusa dall'Epivalva, la parte inferiore (il fondo) invece è chiuso dall'ipovalva. Le superfici di fondo del coperchio vengono chiamate placche valvari (sono ricche di pori e alveoli) ed esse si prolungano in una o più bande connettivali (lisce) (sovrapposte alla mediana del Frustuolo).

• RIPRODUZIONE DELLE DIATOMEAE

Ricapitolando in modo più dettagliato le diatomee (in questo caso nelle diatomee pennate) hanno due riproduzioni: una per via agamica e una per via sessuale. La riproduzione per via agamica è una semplice divisione cellulare, in cui viene diviso tutto: parete cellulare, teche, tramite divisione mitotica anche il nucleo e il citoplasma (il piano di divisione è quello parallelo alle due valve). Con la divisione le cellule figlie otterranno ognuna una "eredità" o meglio dire una TECA (epiteca o ipoteca). Dopo aver ricevuto la teca dalla cellula madre ognuna formerà la parte di teca mancante (se una delle cellule figlie ha ottenuto l'epiteca allora

formerà l'ipoteca, viceversa se una delle due cellule figlie ha ricevuto l'ipoteca andrà a formare l'epiteca). Di conseguenza, essendo che una popolazione di diatomee si formano tutte da una cellula madre, attraverso numerose divisioni alcuni individui mantengono le proprie dimensioni, altri invece si rimpiccioliranno sempre di più.

Quando i frustuoli raggiungono le dimensioni minime compatibili con la vita delle cellule, si avvia la riproduzione sessuata. La parte fondamentale di questa riproduzione è ripristinare le dimensioni massime della specie.

La riproduzione sessuata ha inizio con la copertura di due cellule vicine da uno strato mucillaginoso e iniziano la loro meiosi. Di quattro nuclei aploidi due degenerano e solo due si dividono (citodieresi) con formazione di due gameti uguali ma con dimensioni diverse. Dai due nuclei aploidi attivi si formeranno quindi quattro gameti che vanno in contro a movimenti di tipo ameboide due a due.

Il movimento ameboide può essere spiegato attraverso un piccolo schema, in cui il gamete più piccolo prodotto da una cellula si condensa con quello più grande formato da un'altra cellula. In questo modo abbiamo la formazione di due zigoti che si accresceranno attraverso un processo chiamato: Auxosporulazione. L'Auxopora (zigote) a questo punto si dividerà a sua volta in due cellule che avranno le dimensioni massime della specie e ognuna poi si circonda del proprio Frustuolo.

Nelle Diatomee Centriche la riproduzione avviene in modo un po' diverso. Le cellule della linea femminile dopo la meiosi, formano due gameti di grandi dimensioni e soprattutto immobili. Le cellule della linea maschile invece dopo la meiosi subisce altre divisioni per via mitotica, in cui si origineranno 64 piccoli gameti dotati di un solo flagello: Anterozoidi (gameti maschili). Da qui lo zigote che si formerà andrà anch'esso incontro al processo di Auxosporulazione.

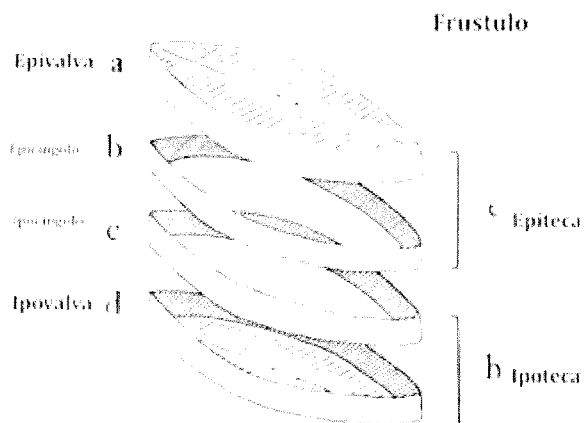


Figura 4: Frustuolo

• DIATOMEE CENTRICHE E DIATOMEE PENNATE

Prendendo in considerazione le ornamentazioni (pori e alveoli) riusciamo a distinguere due grandi gruppi di diatomee:

✚ Diatomee centriche (ordine centrales) simmetria raggiata, assenza di rafe, forma circolare, ovale, triangolare o quadrata, tipicamente planctoniche, principalmente marine. (ISPRA,2000). Le ornamentazioni si dispongono come dei raggi di una ruota oppure circolarmente e si trovano principalmente nel plancton.

✚ Diatomee Pennate (ordine Pennales) valve a simmetria bilaterale rispetto all'asse longitudinale, frustulo di forma ellittica, bastoncellare o a navetta. Sono bentoniche e colonizzano tutti gli ambienti acquatici. (ISPRA 2000).

Quando si parla di diatomee pennate essa ha una struttura più complicata evidenziata dalla presenza longitudinale di un "Rafe", una fenditura a forma di S (sezione trasversale). Prende avvio dai poli della valva in cui troviamo due ispessimenti chiamati NODULI POLARI. All'interno poi ritroveremo il NODULO CENTRALE caratterizzato da un ispessimento. Il rafe non è mai presente nelle diatomee centriche.

Le ornamentazioni sono poste ai lati del rafe e possono evidenziarsi per diverse tipologie:

- | | |
|-----------------------------------------------|----------------------------------|
| ✚ Punteggiate (formate da una serie di punti) | In serie lineare |
| ✚ Lineolate (formate da una serie di linee) | Perpendicolari alla stria stessa |

Nel caso in cui ci siano condizioni avverse per la formazione di nuovi zigoti (parlando di riproduzione) per particolari fattori come: carenza di nutrienti, temperatura, intensità luminosa, pH, le diatomee possono produrre delle spore di resistenza, che differiscono notevolmente dalle forme vegetative. Esse hanno valve molto ispessite e citoplasma molto denso ricco di sostanze di riserva. Nel caso in cui le condizioni avverse migliorino o ritornino alla normalità, queste riprendono l'aspetto di normali cellule vegetative.

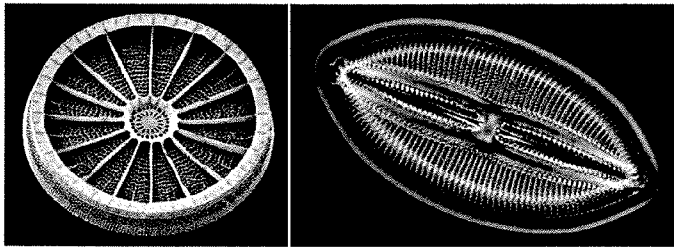


Figura 5: Diatomee Centriche e Diatomee Pennate

•CITOPLASMA E NUCLEO DELLE DIATOMEE

All'interno del frustulo si trovano citoplasma e nucleo, disposti diversamente a seconda della diatomea presa in considerazione. Le diatomee concentriche differiscono da quelle pennate per la presenza di un grande vacuolo centrale e il citoplasma ridotto ad un piccolo strato, in cui al suo interno è presente sia il nucleo che i plasmidi. Nelle diatomee pennate invece il nucleo è posto centralmente, vi è la presenza di due vacuoli e due plastidi grandi e lobati.

Le diatomee contengono clorofilla a e clorofilla c, considerando i pigmenti accessori contengono

Beta carotene e Xantofille (Diatoxatina, Diadinoxantina, Fucoxantina), la Fucoxantina è molto abbondante e per questo le cellule si colorano di un blu-dorato.

In autunno e in primavera abbiamo un aumento progressivo di diatomee per la presenza di nutrienti e la luce permette di avviare la fotosintesi. Alla morte della cellula i frustuli si accumulano dando vita a depositi silicei conosciuti come farina fossile o diatomite. Possono accumularsi talmente tanto che questi depositi possono ispessirsi anche per centinaia di metri e ricoprire aree di molti chilometri quadrati.

La composizione chimica (non considerando il Frustuolo siliceo) delle diatomee è composta dal 30-60% da proteine, 10-50% da lipidi, 5-20% da carboidrati.

•HABITAT E DIATOMEE

Quando si parla di diatomee, si parla di un mondo molto vasto, esse vivono in tantissimi habitat e a seconda di questi habitat possiamo suddividerle in due principali categorie: BENTONICHE E PLANCTONICHE.

Le bentoniche sono essenzialmente le pennate, provviste di rafe, che si trovano presso fiumi, rive marine ecc.. fin dove c'è penetrazione di luce.

Le planctoniche invece sono caratterizzate da diatomee centriche, si suddividono in pochi generi e a loro volta limitate specie. (Dell'uomo A.2004).

In un metro cubo di acqua si possono contare fino a milioni di diatomee ed insieme a tutta la frazione del plancton, danno vita al grande gruppo dei fitoplancton (alimento indispensabile per lo zooplancton).

Attraverso la salinità e la temperatura (fattori che rendono le diatomee molto sensibili) riesco a stabilire il percorso delle correnti marine.

Le diatomee sono influenzate da molteplici fattori (temperatura, sostanza organica, pH etc.), ed essi mi permettono di classificarle in diverso modo a seconda del loro adattamento.

❖ TEMPERATURA

La temperatura è sempre stata fonte di classificazione, sia per piante, sia per animali che per microorganismi e anche le diatomee rientrano in questa classificazione.

E' uno dei parametri più problematici da mettere in correlazione con le diatomee, perché la temperatura variando cambia anche tutta una serie di fattori chimici e biologici: come la solubilità, ossigenazione, viscosità etc..

Queste alghe però mostrano una correlazione buona con le acque fresche primaverili e autunnali e sembrano non tollerare, se non per breve tempo, temperature superiori a 40°C.

Prendendo in considerazione la loro tolleranza alla temperatura, le diatomee possono essere classificate in:

- ✦ Stenoterme, se tollerano piccole oscillazioni di temperatura, < 10°C
- ✦ Euriterme, se sopportano grandi oscillazioni di temperatura o almeno con temperatura maggiore ai 10 ° C e minori di 40 ° C

Oppure secondo una ulteriore classificazione che prende in considerazione i valori assoluti, possiamo avere diatomee:

- ✦ Oligoterme: quando si incontrano solo a basse temperature, inferiori a 15 ° C
- ✦ Mesoterme: se vivono tra temperature di 15 ° C e 30°C
- ✦ Euterme: quando esigono acque calde con temperature superiori a 30 ° C.

❖ pH

Il pH è un altro fattore di classificazione importante, per identificare la distribuzione delle diatomee. Le acque possono dividersi in acque con reazione acida, alcalina o neutra e in base ad essere si insediano differenti comunità di diatomee. La suddivisione si basa sulla sensibilità delle diatomee al pH, le distingue nelle seguenti classi:

- ✦ Diatomee alcalibionti: esigono ambienti a reazione alcalina (*Gyrosigma acuminatum*, *Navicula pygmaea*, *Navicula tuscula*)
- ✦ Diatomee Alcalofile: prediligono un pH superiore a 7 (*Caloneis amphisbaena*, *Cyclotella meneghiniana*, *Cymatopleura elliptica*, *Meridion circolare*) insieme alle diatomee alcalibionti, popolano corsi d'acqua che solcano terreni di natura calcarea.
- ✦ Diatomee Neutrofile: hanno uno sviluppo ottimale a valori di pH intorno a 7 (*Aulacoseira granulata*, *Cymbella amphicephala*, *Diatoma moniliformis*, *Fragilaria arcus*, *Gomphonema productum*, *Navicula mutica*)
- ✦ Diatomee acidofile: prediligono un pH inferiore a 7 (*Anomoeoneis exilis*, *Eunotia praeurupta*, *Eunotia glacialis*) si trovano in corsi d'acqua che scorrono su substrati silicei.
- ✦ Diatomee acidobionti: si sviluppano sempre a pH inferiore a 7, con pH ottimale intorno a 5, prediligono le acque acide delle torbiere a sfagni, non sono molto conosciute questa specie di diatomee pero possiamo ricordare (*Eunotia exigua*, *Frustulia rhomboides* var. *saxonica*, *Pinnularia brauniana*).

❖ LA VELOCITA' DI CORRENTE

E' un fattore che determina aspetti del metabolismo delle diatomee, come la respirazione o l'assorbimento delle sostanze disciolte.

Di norma le acque rapide sono anche ben ossigenate e in proposito si possono distinguere:

- ✦ Diatomee reoflie: predilizione per le acque correnti, ma si trovano bene anche in acque stagnanti
- ✦ Diatomee Limnofile: prediligono acque stagnanti dei laghi, oppure acque leggermente correnti come ad esempio quelle del tratto terminale dei fiumi.
- ✦ Diatomee Reobionti: colonizzano esclusivamente le acque correnti, torrenti di alta e media montagna e possiedono adattamenti per l'adesione al substrato.
- ✦ Diatomee limnobionti: vivono esclusivamente in acque tranquille

Allo stesso tempo oltre a questo tipo di diatomee ne esistono altre che si ritrovano indifferenti alla corrente: sono rappresentate sia in acque correnti (ambienti lotici), che in acque stagnanti (ambienti lenticici).

❖ LA SOSTANZA ORGANICA

All'inizio del secolo (1902), dopo tutta una serie di osservazioni sui corsi d'acqua della Germania, ci si rese conto che esiste una chiara relazione tra organismi acquatici e corpi idrici sottoposti ad inquinamento organico. Così nacque il "sistema degli organismi saprobi" o "sistema saprobico" che, tramite successive elaborazioni (1964, 1965; e soprattutto Sládeček, 1973, 1986), ha portato alla suddivisione degli organismi acquatici in vari livelli, o gradi, che manifestano un'affinità o una tolleranza crescente per la sostanza organica. Le diatomee, che sono alghe ben integrate nel sistema saprobico, possono essere suddivise nei seguenti cinque livelli:

- ✦ Diatomee Xenosaprobie: non tollerano per niente bene la sostanza organica: *Achnanthes flexella*, *Pinnularia divergens*.
- ✦ Diatomee Oligosaprobie: tollerano solo piccole quantità di sostanza organica: *Cymbella affinis*, *Navicula radiosa*;
- ✦ Diatomee β -mesosaprobie: si sviluppano se è presente una mediocre presenza di sostanza organica che viene completamente degradata. *Diatoma vulgare*.
- ✦ Diatomee α -mesosaprobie: si trovano in ambienti con elevate quantità di sostanza organica, la cui demolizione è solo parziale, si arresta quando l'ossigeno disponibile risulta tutto consumato. *Navicula cuspidata*, *Nitzschia hungarica*;
- ✦ Diatomee Polisaprobie: sopportano la presenza di un elevata quantità di sostanza organica, in ambienti dove i processi riduttivi dominano su quelli ossidativi, dove vengono formati anche tramite processi, sostanze tossiche. *Navicula goeppertiana*, *Navicula saprophila*.

❖ SOSTANZA ORGANICA

La stretta gamma di relazioni che intercorre tra la sostanza organica e gli organismi acquatici è molto complessa. La sostanza organica disciolta contiene:

- ✦ alcuni principi nutritivi
- ✦ importanti mediatori chimici che svolgono azione per lo più oligodinamica nei confronti degli organismi viventi. Come la vitamina B1 (o tiamina), la vitamina B12.
- ✦ fattori ad azione antibiotica prodotti soprattutto da batteri, cianoprocaroti (alghe azzurre), Dinoficee e funghi.
- ✦ L'affinità/tolleranza delle diatomee per la sostanza organica è parte integrante. Gli altri parametri che influenzano questo indice sintetico sono la polluzione minerale ed il grado trofico.

❖ LA SILICE

Le diatomee hanno bisogno di silice per la costruzione della loro parete cellulare (frustulo). Ogni specie possiede un proprio optimum per quanto riguarda la concentrazione della silice, che viene assunta in forma solubile, come $\text{Si}(\text{OH})_4$. Le necessità variano inoltre nel corso del ciclo vitale dell'alga e con le condizioni chimico-fisiche del mezzo ambiente. Il frustulo risulta silice amorfa idrata, cui possono essere associate piccole quantità di alluminio, magnesio, ferro e titanio; questa componente inorganica è avvolta da una componente organica costituita da aminoacidi e zuccheri.

❖ LA SALINITÀ

Le diatomee riescono ad adattarsi alle variazioni della concentrazione salina, in particolare ai cloruri (NaCl , MgCl_2), a volte la loro capacità di osmoregolazione è molto elevata (forme eurialine). Le prime si trovano tipicamente in acqua dolce (fiumi, laghi) o, con specie ben differenziate, in acqua salata (mari e oceani), le seconde in acqua salmastra, dove le condizioni di salinità sono molto variabili (acque costiere, foci di fiumi). Alcuni scienziati hanno tentato di elaborare un “sistema di salinità” riferito alle diatomee; tra questi: Kolbe (1927) Van Dam (1994). Si riporta in seguito una classificazione delle diatomee che popolano i corsi d’acqua:

- ✦ Diatomee β -mesoalobie: forme d’acqua oligosalmastra, con salinità che oscilla tra 0,5 e 5 g/l. *Bacillaria paradoxa*, *Nitzschia lorenziana*; queste specie segnalano un forte inquinamento minerale.
- ✦ Diatomee alofile: forme che sopportano un moderato contenuto in sali (cloruri): salinità compresa tra 200 e 500 mg/l. *Entomoneis paludosa*, *Cyclotella meneghiniana*; la loro presenza è il segnale di un moderato inquinamento minerale di origine antropica.
- ✦ Diatomee oligoalobie tolleranti: hanno uno sviluppo ottimale a valori di salinità compresi tra 50 e 200 mg/l. *Gomphonema parvulum*;
- ✦ Diatomee oligoalobie esigenti: tollerano solo una piccola quantità di cloruri (20-50 mg/l)
- ✦ Diatomee alofobe: forme di acqua dolce che non tollerano i cloruri, se non in concentrazione inferiore a 20 mg/l.
- ✦ Diatomee α -mesoalobie: forme di acqua salmastra con salinità compresa tra 5 e 20 (-30) g/l;
- ✦ Diatomee Eualobie; forme tipicamente marine, salinità compresa tra 30 e 40 g/l;
- ✦ Diatomee polialobie (o iperalobie): tollerano valori di salinità superiori a 40 g/l.

❖ I SALI NUTRITIVI

Il sistema trofico, mette in relazione organismi viventi e contenuto in nutrienti (soprattutto nitrati e fosfati). Tra gli ultimi che si sono occupati espressamente dei rapporti tra diatomee e sali nutritivi figurano Hofmann (1994) e Van Dam (1994). Le diatomee che popolano i corsi d'acqua sono:

- ↓ specie caratteristiche di ambienti ipotrofici.
- ↓ specie caratteristiche di ambienti oligotrofi.
- ↓ specie caratteristiche di ambienti mesotrofici.
- ↓ specie caratteristiche di ambienti eutrofi.
- ↓ specie caratteristiche di ambienti ipertrofici.

Eutrofico: ambiente ricco di sostanze nutritive.

Oligotrofico: ambiente povero di sostanze nutritive.

3.2 Le Diatomee possono contribuire a ridurre l'inquinamento da Nitrati nell'Ecosistema

Anja Kamp , Dirk de Beer , Jana L. Nitsch , Gaute Lavik e Peter Stief , 2011, Diatoms respire nitrate to survive dark and anoxic conditions. Proceedings of the National Academy of Sciences 108(14):5649-54

Le diatomee sopravvivono in strati di sedimenti scuri e anossici per mesi o decenni. La nostra indagine rivela una correlazione tra il potenziale di sopravvivenza oscura delle diatomee marine e la loro capacità di accumulare NO_3^- intracellulare. I ceppi axenici di diatomee bentoniche e pelagiche che immagazzinavano 11-274 mM NO_3^- nelle loro cellule sono sopravvissuti per 6-28 settimane. Dopo improvvisi cambiamenti in condizioni oscure e anossiche, la diatomea bentonica *Amphora coffeaeformis* ha consumato l'84-87% del suo pool intracellulare di NO_3^- entro 1 giorno. Un esperimento di marcatura con isotopi stabili ha dimostrato che il consumo di $^{15}\text{NO}_3^-$ era accompagnato dalla produzione e dal rilascio di $^{15}\text{NH}_3$

4^+ , che indica la riduzione dissimilatoria dei nitrati ad ammonio (DNRA). La DNRA è un processo di respirazione anaerobica che è noto principalmente per gli organismi procarioti mentre questo lavoro evidenzia come questo processo possa essere utilizzato anche da fototrofi eucarioti, infatti le diatomee possono respirare NO_3^- intracellulare in strati di sedimenti senza O_2 e NO_3^- . Il rapido esaurimento della concentrazione intracellulare NO_3^- , implica che le diatomee usano la DNRA per entrare in una fase di riposo per la sopravvivenza a lungo termine.

Le diatomee sono fototrofi eucarioti sia nelle zone pelagiche che bentoniche degli ecosistemi acquatici. Molte diatomee assorbono e immagazzinano NO_3^- intracellulare in concentrazioni fino a circa 100 mM, che superano le concentrazioni ambientali di NO_3^- di diversi ordini di grandezza. È ben documentato che le diatomee utilizzano l' NO_3^- intracellulare per la riduzione assimilativa dell' NO_3^- .

L'affondamento di massa delle fioriture di diatomee pelagiche (la morte) è innescato dall'esaurimento dei nutrienti nello strato superficiale della colonna d'acqua. L'esaurimento dei silicati è l'indizio ambientale prevalente per l'aumento dei tassi di affondamento e pertanto il pool intracellulare di NO_3^- potrebbe non essere esaurito nelle diatomee che affondano dallo strato superficiale povero di nutrienti a strati più profondi ricchi di nutrienti o alla superficie del sedimento. In effetti, Lomstein et al. (1990) hanno trovato un elevato quantitativo di NO_3^- intracellulare in pozze di fitoplancton appena depositato sul fondo marino. Una frazione considerevole delle diatomee si sono insediate per sopravvivere per mesi come cellule vegetative in ambienti oscuri in cui né fotosintesi né respirazione aerobica possono verificarsi. Le diatomee bentoniche subiscono cambiamenti in condizioni oscure e anossiche dovuti al comportamento di migrazione verticale nel sedimento e alla sepoltura da parte di animali bioturbanti. La presenza di diatomee che immagazzinano NO_3^- negli strati profondi del sedimento aumenta la concentrazione di NO_3^- legato alle cellule, che ha potenziali implicazioni per il ciclo dell'azoto. Tuttavia, il metabolismo energetico che consente alle diatomee di sopravvivere in sedimenti oscuri e anossici non è noto e il destino dell' NO_3^- intracellulare non è chiaro.

La riduzione dissimilatoria di NO_3^- è comune in molti procarioti anaerobici ed è stata recentemente trovata anche in diversi taxa eucarioti. Il protozoo anaerobico *Loxodes* spp. passa da una respirazione di NO_3^- a NO_2^- , e i due funghi *Fusarium oxysporum* e *Cylindrocarpum tonkinense* passano da una respirazione NO_3^- a N_2O . La riduzione dissimilatoria di NO_3^- può anche portare alla formazione di NH_4^+ in un percorso noto come riduzione dissimilatoria del nitrato ad ammonio (DNRA), un processo ben documentato nei

procarioti, come i grandi batteri solforosi. Gli unici eucarioti noti per essere capaci di DNRA sono i funghi. La DNRA è coinvolta nella generazione di energia anaerobica attraverso una sequenza di reazione in due fasi: riduzione di NO_3^- a NO_2^- con la più elevata resa in ATP, mentre la riduzione di NO_2^- a NH_4^+ ha solo una piccola resa di ATP.

In questo lavoro viene ipotizzato che la riduzione dissimilatoria di NO_3^- sia un metabolismo utilizzato dalle diatomee per sopravvivere all'oscurità e all'anossia e per dimostrarlo vengono utilizzati tre ceppi di diatomee bentoniche e tre ceppi di diatomee pelagiche per valutare la massima capacità di accumulo di NO_3^- intracellulare e la correlazione tra questo contenuto e la sopravvivenza in condizioni di anossia e buio.

Risultati

Accumulo di NO_3^- Intracellulare.

Le massime concentrazioni intracellulari di NO_3^- raggiunte durante la coltivazione di ceppi di diatomee in condizioni ottimali (cioè disponibilità di luce, O_2 e sostanze nutritive) variavano da 0,4 mM (per *Cylindrotheca closterium*) a 274 mM (per *A. coffeaeformis*). La mancanza di un sostanziale accumulo intracellulare di NO_3^- nel *C. closterium* potrebbe essere dovuta alla competizione con i batteri che contaminano la coltura. La concentrazione intracellulare massima di NO_3^- non era correlata al tipo di habitat delle diverse specie di diatomee (pelagiche o bentoniche). Le concentrazioni residue di NO_3^- nel mezzo di crescita al momento della raccolta delle cellule erano sempre inferiori alle concentrazioni intracellulari di NO_3^- . I fattori di arricchimento risultanti (cioè, concentrazione di NO_3^- intracellulare su extracellulare) variavano da 5 (per *Ditylum brightwellii*) a 391 (per *A. coffeaeformis*). Il massimo contenuto intracellulare di NO_3^- non era correlato con il volume cellulare cioè, le cellule di diatomee più generalmente non hanno immagazzinato più NO_3^- delle piccole (Tab.1)

Table 1.

Intracellular NO₃⁻ accumulation in cultures of six diatom species from benthic and pelagic habitats

Species name	Habitat type	Maximum intracellular NO ₃ ⁻ content, fmol [‡]	Cell volume, pL	Maximum intracellular NO ₃ ⁻ concentration, mM [‡]	NO ₃ ⁻ concentration in growth medium, mM [‡]	Enrichment factor
<i>D. brightwellii</i>	Pelagic	111.6 (32.2)	24.80	4.5 (1.3)	0.9 (0.2)	5 (0.3)
<i>S. costatum</i>	Pelagic	3.7	0.33	11.1	0.1	111
<i>T. weissflogii</i>	Pelagic	113.1 (6.7)	1.22	92.9 (5.5)	0.9 (0.1)	103 (5.4)
<i>C. closterium</i>	Benthic	0.1	0.15	0.4	< 0.1	NA
<i>N. punctata</i>	Benthic	4.5 (0.3)	0.11	40.6 (2.5)	0.9 (0.1)	45 (2.2)
<i>A. coffeaeformis</i>	Benthic	128.8 (41.1)	0.47	273.7 (87.4)	0.7 (0.1)	391 (69.0)

- NA, not applicable.
- [‡]*Maximum intracellular NO₃⁻ content reached during cultivation under light/oxic conditions. Values are mean (SD) of three replicate culture tubes; *S. costatum* and *C. closterium* were analyzed only once.
- [‡]Calculated from maximum intracellular NO₃⁻ content and cell volume.
- [‡]Measured at the time of cell harvesting for analysis of intracellular NO₃⁻ content.

Il tempo massimo di sopravvivenza in condizioni di buio/anossia era significativamente correlato positivamente con la concentrazione massima intracellulare di NO₃⁻ nelle varie specie di diatomee. Al contrario, il tempo di sopravvivenza non era correlato con l'habitat delle specie di diatomee. In provette di coltura singola di *Nitzschia punctata* e *A. coffeaeformis* è stato registrato un tempo di sopravvivenza massimo di 28 settimane. La conta cellulare non ha rivelato crescita in nessuna delle sei specie di diatomee testate incubate in condizioni scure/anossiche. Al contrario, tutte e sei le specie stavano crescendo attivamente prima dell'inizio dell'esperimento di sopravvivenza.

L'NO₃⁻ intracellulare è stato rapidamente consumato in risposta a condizioni scure/anossiche, con gran parte del consumo che si è verificato durante le prime 8 ore dell'esperimento. Entro 21 ore dall'esperimento, è stato consumato l'87% dell'NO₃⁻ intracellulare. La concentrazione stabile di NO₃⁻ nel mezzo di crescita ha indicato che l'NO₃

intracellulare è stato effettivamente consumato da *A. coffeaeformis* piuttosto che perso. La coltura axenica di *A. coffeaeformis* non è cresciuta in condizioni scure/anossiche, mentre la coltura stava crescendo attivamente prima dell'esperimento.

Le colture di Axenic *A. coffeaeformis* cresciute in condizioni di luce con 1 mM $^{15}\text{NO}_3^-$ o $^{14}\text{NO}_3^-$ sono state raccolte, lavate e trasferite in acqua di mare artificiale priva di NO_3^- arricchita con 200 μM di Na-acetato come donatore di elettroni. Pertanto, per gli esperimenti successivi, l'unica fonte di NO_3^- che è stata immagazzinata intracellularmente è risultata essere $^{15}\text{NO}_3^-$ o $^{14}\text{NO}_3^-$. Quando esposte a condizioni scure/anossiche, le colture axeniche di *A. coffeaeformis* hanno consumato simultaneamente NO_3^- intracellulare e prodotto NH_4^+ che è stato rilasciato nel mezzo di crescita. Al contrario, quando esposte a condizioni di luce, le colture axeniche di *A. coffeaeformis* consumavano anche NO_3^- intracellulari, ma non rilasciavano NH_4^+ . Le colture di *A. coffeaeformis* esposte a condizioni di luce stavano crescendo, mentre quelli esposti a condizioni scure/anossiche non lo erano. Pertanto, il pool di NO_3^- intracellulare viene utilizzato per l'assimilazione durante le condizioni di crescita e la generazione di energia in condizioni scure/anossiche.

I tassi di consumo simultaneo di NO_3^- e produzione di NH_4^+ in condizioni di buio/anossico erano più alti nella fase iniziale dell'esperimento (0-2,5 h) rispetto alla fase tardiva (8-192 h). Entro 24 ore dall'incubazione scura/anossica, è stato consumato l'84% dell' NO_3^- intracellulare. Colture di Axenic *A. coffeaeformis* pre incubate con $^{15}\text{NO}_3^-$ hanno rilasciato $^{15}\text{NH}_4^+$ nel mezzo di crescita a circa il doppio della velocità di rilascio di NH_4^+ . Alla fine dell'esperimento, le quantità totali di NH_4^+ e $^{15}\text{NH}_4^+$ rilasciate corrispondevano rispettivamente al $56\% \pm 5\%$ e $110\% \pm 10\%$ della quantità totale di NO_3^- intracellulare consumata.

Le diatomee vitali sono sepolte in sedimenti a profondità in cui la luce e l' O_2 sono assenti. Queste cellule mostrano solo segni trascurabili di degradazione del pigmento e iniziano la fotosintesi immediatamente dopo essere state riesposte alla luce. Il metabolismo che consente alle diatomee di sopravvivere in questo ambiente a bassa energia non era precedentemente noto. I risultati del nostro studio rivelano una correlazione tra la capacità delle diatomee di sopravvivere a condizioni scure/anossiche e la capacità di immagazzinare NO_3^- intracellulare. Questa scoperta suggerisce che le specie di diatomee che immagazzinano NO_3^- possiedono un metabolismo anaerobico non fotosintetico che coinvolge NO_3^- come accettore di elettroni. Infatti, una riduzione dissimilatoria di NO_3^- a NH_4^+ (cioè DNRA) è stata trovata in *A. coffeaeformis*, la specie di diatomee con la più alta concentrazione intracellulare di NO_3^- .

La maggior parte del pool intracellulare di NO_3^- in *A. coffeaeformis* (84-87%) è stata consumata entro 1 giorno dopo il passaggio sperimentale a condizioni scure/anossiche. Ciò

potrebbe indicare che la riduzione dissimilatoria di NO_3^- è ampiamente utilizzata per la transizione che richiede energia delle diatomee dalla fase di crescita a quella di riposo, mentre la capacità di immagazzinare NO_3^- a livello intracellulare è legata alla sopravvivenza a lungo termine. La sintesi di enzimi e proteine strutturali che sono essenziali per la transizione allo stadio di riposo richiede energia ed equivalenti di azoto che potrebbero essere forniti entrambi da NO_3^- . Una volta raggiunta la fase di riposo, la richiesta di energia delle cellule dovrebbe essere molto più bassa.

Il rilascio cellulare di NH_4^+ in condizioni scure/anossiche merita particolare attenzione perché il terreno di crescita inizialmente non conteneva NH_4^+ . In tali condizioni, NH_4^+ normalmente rimane all'interno della cellula per l'assimilazione di N. Questo era infatti il caso in condizioni di luce/ossico quando le colture di *A. coffeaeformis* stavano crescendo, ma non in condizioni di buio/anossico quando le colture non stavano crescendo. Inoltre, la quantità totale di 15NH_4^+ rilasciata bilanciava la quantità totale di intracellulare 15NO_3^- consumato. Concludiamo che la riduzione di NO_3^- in *A. coffeaeformis* in condizioni scure/anossiche è dissimile.

Alla fine dell'incubazione, tuttavia, la quantità totale di $^{15}\text{NO}_3^-$ intracellulare consumata bilanciava la quantità totale di $^{15}\text{NH}_4^+$ prodotto. Questa osservazione suggerisce l'accumulo transitorio di un prodotto intermedio non identificato che è stato ulteriormente ridotto a NH_4^+ , che è stato poi rilasciato nel terreno.

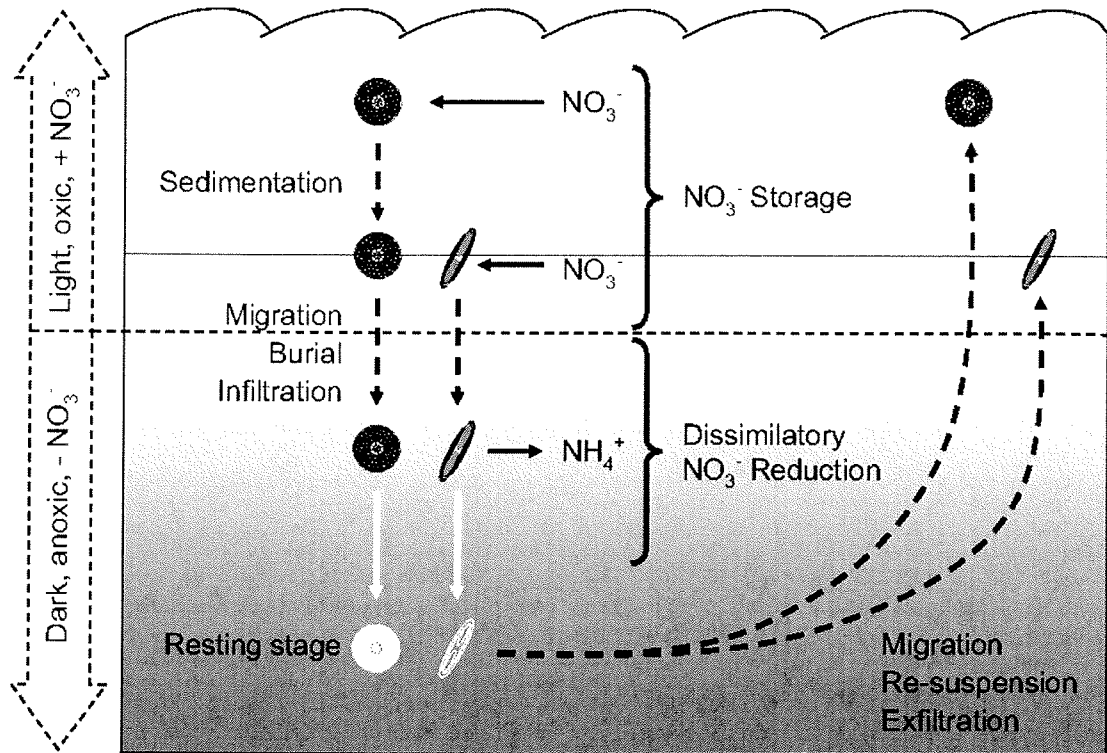
A. coffeaeformis, un fototrofo eucariotico, è in grado di ridurre in modo dissimilatorio l' NO_3^- attraverso la via del DNRA. Finora, l'attività del DNRA è stata identificata solo nei procarioti e nei funghi. Curiosamente, alcuni funghi usano le loro riduttasi assimilatrici di NO_3^- e NO_2^- per generare ATP mediante riduzione dissimilatoria di NO_3^- e NO_2^- . Tale duplice uso di enzimi potrebbe essere realizzato anche nelle diatomee. Inoltre, l'analisi dei primi due genomi di diatomee hanno rivelato che questi organismi eucarioti hanno incorporato geni procarioti mediante trasferimento genico orizzontale da vari batteri marini. Pertanto, le specie di diatomee possono possedere combinazioni di metabolismo che in precedenza non erano mai state trovate insieme in un organismo. Nel caso di *A. coffeaeformis* si tratta ovviamente di fotosintesi e riduzione dissimilatoria di NO_3^- .

La riduzione dissimilatoria di NO_3^- può avere importanti funzioni nel ciclo di vita delle diatomee fornendo un mezzo fisiologico per preparare la fase di riposo di una cellula o colmare l'assenza temporanea di luce. In condizioni di abbondanza di nutrienti, le diatomee assorbono NO_3^- per l'assimilazione di N, ma possono anche immagazzinare NO_3^- e usarlo come accettore di elettroni in condizioni scure/anossiche. Nei sedimenti, le diatomee possono essere esposte

all'oscurità e all'anossia per brevi o lunghi periodi a causa della loro stessa migrazione verticale. L'attività del DNRA può spiegare perché il metabolismo cellulare di molte diatomee rimane relativamente alto in assenza di luce e sostanze nutritive, e anche perché il recupero delle diatomee da condizioni avverse è immediato. Pertanto, l'attività del DNRA delle diatomee sepolte può svolgere un ruolo finora trascurato nel funzionamento dei sedimenti come banche di semi per future fioriture di diatomee.

L'effetto diretto del DNRA delle diatomee sull'inventario dell'azoto sedimentario può sembrare piccolo, perché NH_4^+ è raramente limitante nei sedimenti acquatici. Tuttavia, il DNRA delle diatomee manterrà l'azoto fisso nel sedimento e quindi stimolerà la nitrificazione e indirettamente la denitrificazione e l'anammox come vie di rimozione dell'azoto. Se alcune delle diatomee muoiono (ad esempio, a causa di un'interruzione meccanica) prima di aver esaurito il loro NO_3^- intracellulare, allora altri microrganismi del sedimento possono utilizzare direttamente NO_3^- per la denitrificazione e l'anammox.

La capacità di immagazzinamento di NO_3^- e il potenziale di sopravvivenza al buio delle diatomee pelagiche suggerisce che sono anche capaci di DNRA. Supponendo questo, le zone minime di ossigeno oceanico (OMZ) sono siti potenzialmente importanti di attività DNRA da parte delle diatomee. Le fioriture senescenti di diatomee affondano fuori dallo strato superficiale e passano strati più profondi che sono poveri di O_2 , ma ricchi di NO_3^- . Pertanto, le diatomee che affondano potrebbero esibire attività DNRA nella parte scura/anossica della colonna d'acqua a spese di NO_3^- intracellulare o extracellulare. La via prevalente di perdita di azoto nella maggior parte delle OMZ è l'anammox, che richiede NH_4^+ , che recentemente è stato dimostrato essere fornito dall'attività di DNRA. Data la loro elevata abbondanza negli oceani, le diatomee pelagiche potrebbero quindi essere i principali trasportatori di NO_3^- e produttori di NH_4^+ nelle OMZ che sono responsabili del 30-50% della perdita di azoto dall'oceano.



Modello concettuale di accumulo intracellulare e riduzione dissimilatoria di NO₃⁻ da parte di diatomee bentoniche e pelagiche. Le frecce nere indicano l'assorbimento cellulare o il rilascio di composti N, le frecce nere tratteggiate indicano il trasporto delle cellule e le frecce bianche indicano la transizione fisiologica allo stadio di riposo. Le frecce di blocco sul lato sinistro e la linea tratteggiata orizzontale attraverso il sedimento delineano le zone in cui sono presenti o assenti luce, O₂ e NO₃⁻ extracellulare. Le cellule di diatomee sono stilizzate, con cellule centriche e pennate che rappresentano rispettivamente diatomee pelagiche e bentoniche.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha come aspetti più importanti:

- ✓ Il ciclo dell'azoto. Per evidenziare come esso tramite reazioni di tipo chimico, attraverso le molecole di ammoniaca e il processo di nitrificazione riesce a produrre sostanze come i nitriti o nitrati, elementi molto importanti per il suolo ma allo stesso tempo pericolosi.
- ✓ Come questi "inquinanti" possono creare problemi all'ambiente e come determinate gestioni potrebbero garantire un risanamento dell'ecosistema.
- ✓ La gestione dell'Ambiente non è solo di tipo antropico ma microrganismi, alghe e animali ci aiutano a salvaguardare il mondo in cui viviamo.

Con questa tesi volevo evidenziare come le Diatomee, dei piccolissimi esseri viventi, potrebbero contribuire anche se in minima parte al risanamento ambientale come risposta all'inquinamento da nitrati dovuto a diversi fattori come antropizzazione, elevate concimazioni, inquinamento atmosferico, industrializzazione che aumenta con l'aumentare della popolazione. Nel nostro pianeta tutto è strettamente correlato, ogni essere vivente dal più piccolo al più grande contribuisce a mantenere quell'equilibrio, quella sottile linea che ci permette di restare in vita e le Diatomee contribuiscono in grande parte a mantenere questo equilibrio.

BIBLIOGRAFIA

- ✓ *Lodovico Alfieri*, 2013. Inquinamento da Nitrati, ReadKong, pp. 11-35.
- ✓ *Anja Kamp , Dirk de Beer , Jana L. Nitsch , Gaute Lavik e Peter Stief* , 2011, Diatoms respire nitrate to survive dark and anoxic conditions. PNAS. pp. 1-7
- ✓ *Dell'Uomo*, 1999, Indice Diatomico di Eutrofizzazione/Polluzione (EPI-D) nel monitoraggio delle acque torrenti. LINEE GUIDA. APAT, Roma.
- ✓ *Fiorin, M.G.* 1999. Microbiologia: principi e tecniche, Zanichelli, Bologna (Italia). pp 23-38
- ✓ *Hertach, M.* (2008). Anaerobic Ammonium Oxidation (Anammox) – A new sink in the marine nitrogen cycle. Term Paper, ETH, Politecnico federale di Zurigo (Svizzera).
- ✓ *Langenbrunner, B.; Hastings, M.G.; Spak, S.; Petersen, W.A.* (2009). Is there a quantifiable relationship between lightning and nitrate deposition in the subtropics? American Geophysical Union, Fall Meeting 2009, pp 1-8
- ✓ *Maffei, M.* (1998). Biochimica vegetale, Piccin - Nuova Libreria, Padova (Italia).pp 15-20
- ✓ *Van Loosdrecht, M.* (2012). Innovative N-removal processes. Learning course, TUDelft, Delft University of Technology (Paesi Bassi).
- ✓ *Verstraete, W.; Philips, S.; and Mq* (1998). Nitrification-denitrification processes and technologies in new contexts. Environmental Pollution 102: 717-726.
- ✓ *Vismara, R.* (1998). Depurazione biologica - Teoria e processi (3rd ed.), HOEPLI, Milano (Italia). pp 3-32
- ✓ *Haugl, A., Myklestad, S.* (1976). Polysaccharides of Marine Diatoms with Special Reference to Chaetoceros Species. Marine Biology, 222: 217–222.
- ✓ *Casciaro Valentina*, 2015, Effetto della carenza di azoto sulla crescita e composizione di *Phaeodactylum tricornutum*, Università di Bologna, facoltà di biologia marina, pp 6-13

- ✓ *De Filippis Andrea*, 2006, Valutazione della qualità del fiume creati sulla base delle comunità di diatomee, Università della Calabria, facoltà di scienze matematiche, fisiche e naturali, pp 6-15
- ✓ *Rigoni Gianluca Antonio*, 2013, TRATTAMENTO ANAMMOX PER LA RIMOZIONE DELL'AZOTO AMMONIACALE DAL CENTRIFUGATO DI DIGESTIONE ANAEROBICA, Università degli studi di Padova, Facoltà di ingegneria chimica e dei processi industriali, pp 1-8
- ✓ *Nelson DM, Treguer P, Brzezinski MA, Leynaert A, Queguiner B* (1995) Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: Revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem Cycles* pp :359–372.
- ✓ *Lomas MW, Glibert PM* (2000) Comparisons of nitrate uptake, storage, and reduction in marine diatoms and flagellates. *J Phycol* pp :903–913.
- ✓ *Needoba JA, Harrison PJ* (2004) Influence of low light and a light:dark cycle on NO₃- uptake, intracellular NO₃-, and nitrogen isotope fractionation by marine phytoplankton. *J Phycol*, pp:505–516.
- ✓ *Høgslund S* (2008) Nitrate storage as an adaptation to benthic life. PhD thesis (Aarhus University, Aarhus, Denmark). pp: 300-302
- ✓ *Smetacek VS* (1985) Role of sinking in diatom life-history cycles: Ecological, evolutionary and geological significance. *Mar Biol*, pp:239–251.
- ✓ *Bienfang PK, Harrison PJ, Quarmby LM* (1982) Sinking rate response to depletion of nitrate, phosphate and silicate in four marine diatoms. *Mar Biol* pp:295–302.
- ✓ *Lomstein E, Jensen MH, Sørensen J* (1990) Intracellular NH₄⁺ and NO₃⁻ pools associated with deposited phytoplankton in a marine sediment (Aarhus Bight, Denmark) *Mar Ecol Prog Ser*, pp:97–105.
- ✓ *Lewis J, Harris ASD, Jones KJ, Edmonds RL* (1999) Long-term survival of marine planktonic diatoms and dinoflagellates in stored sediment samples. *J Plankton Res*, pp:343–354.
- ✓ *McQuoid MR, Godhe A, Nordberg K* (2002) Viability of phytoplankton resting stages in the sediments of a coastal Swedish fjord. *Eur J Phycol*, pp:191–201.
- ✓ *Jewson DH, Lowry SF, Bowen R* (2006) Co-existence and survival of diatoms on sand grains. *Eur J Phycol*, pp:131–146.
- ✓ *Consalvey M, Paterson DM, Underwood GJC* (2004) The ups and downs of life in a benthic biofilm: Migration of benthic diatoms. *Diatom Res*, pp:181–202.

- ✓ *Kamp A, Witte U* (2005) Processing of ¹³C-labelled phytoplankton in a fine-grained sandy-shelf sediment (North Sea): Relative importance of different macrofauna species. *Mar Ecol Prog Ser*, pp:61–70.
- ✓ *Sayama M* (2001) Presence of nitrate-accumulating sulfur bacteria and their influence on nitrogen cycling in a shallow coastal marine sediment. *Appl Environ Microbiol*, pp:3481–3487
- ✓ *Høgslund S, Nielsen JL, Nielsen LP* (2010) Distribution, ecology and molecular identification of *Thioploca* from Danish brackish water sediments. *FEMS Microbiol Ecol*, pp:110–120.
- ✓ *Garcia-Robledo E, Corzo A, Papaspyrou S, Jimenez-Arias JL, Villahermosa D* (2010) Freeze-lysable inorganic nutrients in intertidal sediments: Dependence on microphytobenthos abundance. *Mar Ecol Prog Ser*, pp:155–163.
- ✓ *Finlay BJ, Span ASW, Harman JMP* (1983) Nitrate respiration in primitive eukaryotes. *Nature*, pp :333–336.
- ✓ *Shoun H, Tanimoto T* (1991) Denitrification by the fungus *Fusarium oxysporum* and involvement of cytochrome P-450 in the respiratory nitrite reduction. *J Biol Chem*, pp :11078–11082.
- ✓ *Usuda K, Toritsuka N, Matsuo Y, Kim DH, Shoun H* (1995) Denitrification by the fungus *Cylindrocarpum tonkinense*: Anaerobic cell growth and two isozyme forms of cytochrome P-450_{nor}. *Appl Environ Microbiol*, pp :883–889.
- ✓ *Risgaard-Petersen N, et al.* (2006) Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature*, pp :93–96.
- ✓ *Piña-Ochoa E, et al.* (2010) Widespread occurrence of nitrate storage and denitrification among Foraminifera and Gromiida. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp :1148–1153.
- ✓ *Otte S, et al.* (1999) Nitrogen, carbon, and sulfur metabolism in natural thioploca samples. *Appl Environ Microbiol*, pp:3148–3157.
- ✓ *Preisler A, et al.* (2007) Biological and chemical sulfide oxidation in a *Beggiatoa* inhabited marine sediment. *ISME J*, pp:341–353.
- ✓ *Zhou ZM, et al.* (2002) Ammonia fermentation, a novel anoxic metabolism of nitrate by fungi. *J Biol Chem*, pp:1892–1896.
- ✓ *Takasaki K, et al.* (2004) Fungal ammonia fermentation, a novel metabolic mechanism that couples the dissimilatory and assimilatory pathways of both nitrate and ethanol:

Role of acetyl CoA synthetase in anaerobic ATP synthesis. *J Biol Chem*, pp:12414–12420.

- ✓ *Schlesinger WH, Megonigal JP, Hines ME, Visscher PT* (2004) in *Biogeochemistry, Anaerobic metabolism: Linkages to trace gases and aerobic processes*, ed Schlesinger WH (Elsevier-Pergamon, Oxford, UK), pp 317–424.
- ✓ *Bonin P* (1996) Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: A dissimilatory pathway. *FEMS Microbiol Ecol*, pp:27–38.
- ✓ *Peters E, Thomas DN* (1996) Prolonged nitrate exhaustion and diatom mortality: A comparison of polar and temperate *Thalassiosira* species. *J Plankton Res*, pp:953–968.
- ✓ *Murphy AM, Cowles TJ* (1997) Effects of darkness on multi-excitation in vivo fluorescence and survival in a marine diatom. *Limnol Oceanogr*, pp :1444–1453.
- ✓ *Cole JA, Brown CM* (1980) Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: Short-circuit in the biological nitrogen cycle. *FEMS Microbiol Lett*, pp:65–72.
- ✓ *Vargas A, Strohl WR* (1985) Utilization of nitrate by *Beggiatoa alba*. *Arch Microbiol*, pp :279–284.
- ✓ *Risgaard-Petersen N, Rysgaard S, Revsbech NP* (1995) Combined microdiffusion–hypobromite oxidation method for determining ¹⁵N isotope in ammonium. *Soil Sci Soc Am J*, pp :1077–1080.
- ✓ *De la Pena MR* (2007) Cell growth and nutritive value of the tropical benthic diatom, *Amphora* sp., at varying levels of nutrients and light intensity, and different culture locations. *J Appl Phycol*, pp :647–655.
- ✓ *Bothe H, Ferguson S, Newton WE, Mohan SB, Cole JA* (2007) in *Biology of the Nitrogen Cycle, The dissimilatory reduction of nitrate to ammonia by anaerobic bacteria*, eds Bothe H, Ferguson S, Newton WE (Elsevier Science, Burlington, MA), pp 93–106.
- ✓ *Watsuji TO, Takaya N, Nakamura A, Shoun H* (2003) Denitrification of nitrate by the fungus *Cylindrocarpum tonkinense*. *Biosci Biotechnol Biochem*, pp:1115–1120.
- ✓ *Armbrust EV, et al.* (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, evolution, and metabolism. *Science*, pp :79–86.
- ✓ *Bowler C, et al.* (2008) The *Phaeodactylum* genome reveals the evolutionary history of diatom genomes. *Nature*, pp:239–244.
- ✓ *Bowler C, Vardi A, Allen AE* (2010) Oceanographic and biogeochemical insights from diatom genomes. *Ann Rev Mar Sci*, pp:333–365.

- ✓ *Allen AE, Vardi A, Bowler C* (2006) An ecological and evolutionary context for integrated nitrogen metabolism and related signaling pathways in marine diatoms. *Curr Opin Plant Biol*, pp :264–273.
- ✓ *Ehrenhauss S, Witte U, Buhring SL, Huettel M* (2004) Effect of advective pore water transport on distribution and degradation of diatoms in permeable North Sea sediments. *Mar Ecol Prog Ser*, pp :99–111.
- ✓ *Kuypers MMM, et al.* (2005) Massive nitrogen loss from the Benguela upwelling system through anaerobic ammonium oxidation. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp :6478–6483.
- ✓ *Lam P, et al.* (2009) Revising the nitrogen cycle in the Peruvian oxygen minimum zone. *Proc Natl Acad Sci USA*, pp :4752–4757.
- ✓ *Gruber N, Sarmiento JL* (1997) Global patterns of marine nitrogen fixation and denitrification. *Global Biogeochem Cycles*, pp :235–266.
- ✓ *Codispoti LA, et al.* (2001) The oceanic fixed nitrogen and nitrous oxide budgets: Moving targets as we enter the anthropocene? *Sci Mar*, pp:85–105.
- ✓ *Guillard RR, Ryther JH* (1962) Studies of marine planktonic diatoms, I: *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. *Can J Microbiol*, pp :229–239.
- ✓ *Akkermans AD, et al. Muyzer G, Hottenträger S, Teske A, Waver C* (1995) in *Molecular Microbial Ecology Manual, Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA: A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities*, ed Akkermans AD, et al. (Kluwer, Dordrecht), pp 1–22.
- ✓ *Braman RS, Hendrix SA* (1989) Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological materials by vanadium (III) reduction with chemiluminescence detection. *Anal Chem*, pp:2715–2718.
- ✓ *Revsbech NP* (1989) An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol Oceanogr*, pp:474–478.
- ✓ *Kester DR, Duedall IW, Connors DN, Pytkowicz RM* (1967) Preparation of artificial seawater. *Limnol Oceanogr*, pp:176–178.
- ✓ *Liu X, et al.* (2009) Effects of organic carbon sources on growth, photosynthesis, and respiration of *Phaeodactylum tricorutum*. *J Appl Phycol*, pp:239–246.
- ✓ *Kempers AJ, Kok CJ* (1989) Re-examination of the determination of ammonium as the indophenol blue complex using salicylate. *Anal Chim Acta*, pp:147–155.

- ✓ *Knowles R, Blackburn TH Warembourg FR (1993) in Nitrogen Isotope Techniques, Nitrogen fixation in soil and plant systems, eds Knowles R, Blackburn TH (Academic, New York), pp 157–180.*

