



Università degli studi di Genova
Scuola di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di laurea magistrale in
SCIENZE CHIMICHE

Tesi di laurea

**STUDIO DELLA SPECIAZIONE DEL FERRO
DISCIOLTO IN ACQUE MARINE ANTARTICHE
TRAMITE CLE-AdSV E HPLC-ESI-MS/MS**

Relatrice

Prof.ssa Paola Francesca Rivaro

Correlatori

Prof.ssa Maria Carmela Ianni

Prof. Alessandro Pellis

Candidato

Matteo Ciarroni

Anno Accademico
2022/2023

INDICE

SCOPO DELLA TESI	5
1. INTRODUZIONE	7
1.1 Antartide e circolazione oceanica	7
1.2 Generalità sul Mare di Ross e sulle sue principali masse d'acqua.....	9
1.3 Generalità sul ciclo biogeochimico del ferro in ambiente marino	13
1.4 Il ferro come micronutriente e ruolo degli organismi nella sua speciazione	17
1.5 Tecniche analitiche per la determinazione del Fe _d e della sua speciazione in acqua di mare... ..	22
2. MATERIALI E METODI	25
2.1 Reattivi e soluzioni standard.....	25
2.1.1 Reattivi e soluzioni standard per la determinazione del Fe _d totale mediante ICP-MS.....	25
2.1.2 Reattivi e soluzioni standard per la determinazione del Fe _d totale e sua speciazione mediante CLE-AdSV	26
2.1.3 Reattivi e soluzioni standard per l'identificazione dei ligandi organici tramite HPLC-ESI-MS/MS.....	28
2.2 Campioni.....	29
2.3 Preparazione dei campioni	32
2.3.1 Determinazione del Fe _d totale tramite coprecipitazione con Mg(OH) ₂	32
2.3.2 Determinazione voltammetrica del Fe _d totale previa digestione UV della sostanza organica.....	33
2.3.3 Determinazione della speciazione del Fe mediante CLE-AdSV	34
2.3.4 Identificazione dei ligandi organici a basso peso molecolare tramite SPE	35
2.4 Strumentazione	37
2.4.1 ICP-MS.....	37
2.4.2 CLE-AdSV.....	39
2.4.3 HPLC-ESI-MS/MS	43

3.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	45
3.1	Determinazione del Fe _d e della sua speciazione chimica nel settore nordoccidentale del Mare di Ross mediante CLE-AdSV.....	45
3.1.1	Determinazione del Fe _d totale mediante CLE-AdSV	46
3.1.2	Determinazione della speciazione chimica del Fe _d nel settore nordoccidentale del Mare di Ross mediante CLE-AdSV	51
3.2	Determinazione del Fe _d totale nel settore orientale del Mare di Ross mediante ICP-MS/MS.....	72
3.3	Identificazione dei ligandi della classe L ₁ (siderofori).....	75
4.	CONCLUSIONI.....	82
5.	BIBLIOGRAFIA.....	84
	RINGRAZIAMENTI	93

SCOPO DELLA TESI

Un'ampia categoria di studi ha dimostrato l'impatto che il continente antartico ha sul bilancio termico globale, influenzando sul clima del nostro pianeta attraverso le circolazioni atmosferiche ed oceaniche.

In particolare, una porzione dell'Oceano Meridionale, quella del Mare di Ross, determina un notevole contributo sulla formazione di masse d'acqua e su ciò che esse arrecano alla circolazione oceanica globale. Inoltre, gli Oceani sequestrano il diossido di carbonio trasferendolo nelle profondità oceaniche ed anche trasformandolo, tramite attività fotosintetica, così da ridistribuire il carbonio lungo la colonna d'acqua.

L'elemento che influenza maggiormente l'attività fotosintetica agendo come micronutriente, operata dal fitoplancton, è il ferro (Fe). Il contenuto di Fe, quindi, influenza la capacità degli oceani di assorbire il CO₂ con conseguenti ripercussioni sul clima globale.

Recentemente lo studio del Fe, e della sua speciazione, ha suscitato parecchio interesse nelle aree *High Nutrient Low Chlorophyll*, di cui l'Oceano Meridionale fa parte, caratterizzate da bassi input di ferro che limitano la produttività primaria, ovvero la produzione di materia organica da parte degli organismi fotosintetici.

Il ciclo biogeochimico del Fe in ambiente marino è il risultato di un complesso bilancio tra processi di input e di output definiti dalla presenza di sorgenti, naturali o antropiche, da meccanismi di rimozione oltre che dalla speciazione chimica dell'elemento.

Si stima che circa il 99% del ferro disciolto (Fe_d) totale in acqua di mare si trovi sotto forma di complessi con ligandi organici, influenzando non soltanto la concentrazione del Fe_d, ma anche la biodisponibilità. I ligandi organici disciolti sono costituiti da un ampio gruppo di molecole organiche molte delle quali non identificate con concentrazioni variabili nell'ordine del nM.

La valutazione del ferro disciolto (Fe_d), della sua speciazione e della caratterizzazione dei suoi ligandi organici, rappresentano una sfida analitica parecchio complessa per via della complessità della matrice ad alto contenuto di sali disciolti, delle strutture chimiche complesse, e delle concentrazioni tipicamente basse e variabili dei ligandi.

Tecniche spettroscopiche e voltammetriche trovano applicazione nella determinazione del ferro disciolto in matrici marine e, nel caso delle tecniche voltammetriche, anche nello studio della sua speciazione.

Il metodo voltammetrico di adsorbimento e ridissoluzione catodica (*Competitive Ligand Equilibration-Adsorptive Stripping Voltammetry*, CLE-AdSV) consente di classificare i ligandi in forti o deboli sulla base dei valori delle costanti di stabilità dei complessi che essi formano con il ferro disciolto. Tuttavia, la composizione dei ligandi non può essere dedotta tramite CLE-AdSV. Tra le varie tecniche, quella che sembra rispondere più adeguatamente a questo scopo è la cromatografia liquida ad alta prestazione-ionizzazione elettrospray-spettrometria di massa tandem (*High Performance Liquid Chromatography-ElectroSpray Ionization-tandem mass spectrometry*, HPLC-ESI-MS/MS). Questa tecnica consente la separazione degli analiti dai composti interferenti, è sensibile e fornisce informazioni strutturali in seguito alla frammentazione dello ione precursore e alla distribuzione isotopica, che possono essere utilizzate per identificare elementi specifici in una molecola.

Nel presente lavoro di tesi si valuteranno diversi aspetti dello studio della distribuzione e della speciazione del ferro disciolto in campioni di acqua di mare prelevati nel corso di diverse campagne oceanografiche coordinate dal Programma Nazionale di Ricerche in Antartide nel Mare di Ross.

In particolare, lo studio si articolerà in due linee principali:

1. l'applicazione della tecnica voltammetrica di adsorbimento e ridissoluzione catodica (CLE-AdSV) per l'analisi del Fe disciolto totale previa digestione UV e dello studio della sua speciazione nelle acque del settore nordoccidentale del Mare di Ross;
2. l'impiego della spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, ICP-MS) e di HPLC-ESI-MS/MS previa procedura di estrazione e preconcentrazione del campione con colonnine SPE (*Solid-Phase Extraction*), per la caratterizzazione di ligandi organici in campioni di acqua di mare prelevata nel settore orientale del Mare di Ross.

1. INTRODUZIONE

1.1 ANTARTIDE E CIRCOLAZIONE OCEANICA

L'Antartide è il continente degli estremi: è il più freddo, il più ventoso, il più arido, il meno popolato e il meno inquinato. È situata quasi interamente entro il 60° di latitudine sud ed è, quindi, il continente più a meridionale della Terra (Figura 1.1).

A causa dell'inclinazione dell'asse di rotazione terrestre (23°27') rispetto al piano dell'orbita, la regione antartica riceve la luce del Sole principalmente in due periodi dell'anno: la primavera e l'estate australe, quindi dal 21 settembre al 23 marzo, mentre nel resto dell'anno la regione polare rimane in ombra (notte polare).

L'Antartide ha un'area totale, comprese le piattaforme di ghiaccio, di 13,8 milioni di km²; il 98% di tale superficie è ricoperto da una calotta di ghiaccio, che racchiude quasi i 7/10 di tutta l'acqua dolce del nostro pianeta.

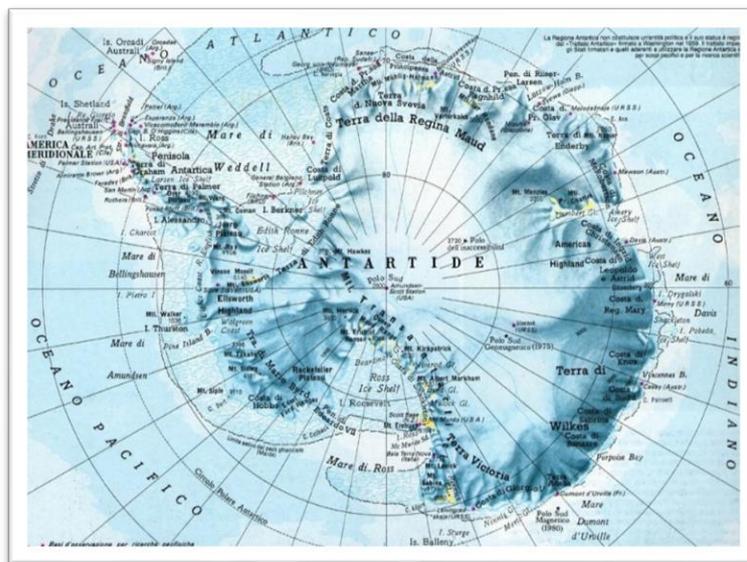


Figura 1.1 – Mappa dell'Antartide [1]

L'Oceano Meridionale detto anche Oceano Antartico comprende le porzioni meridionali degli oceani Atlantico, Pacifico e Indiano; esso si estende senza interruzioni intorno alle coste dell'Antartide costituendo così l'unico tratto di mare circumpolare del globo terrestre.

Questa caratteristica ha una profonda influenza sul clima globale soprattutto per la presenza della Corrente Circumpolare Antartica (*Antarctic Circumpolar Current, ACC*), la corrente più imponente dell'intero Pianeta, che consente lo scambio di masse d'acqua, calore e altre proprietà tra i principali bacini oceanici e i mari antartici attraverso il cosiddetto “Grande

Nastro Trasportatore” (*Ocean Conveyor Belt*) che garantisce il rinnovo e il mescolamento delle acque (Figura 1.2).

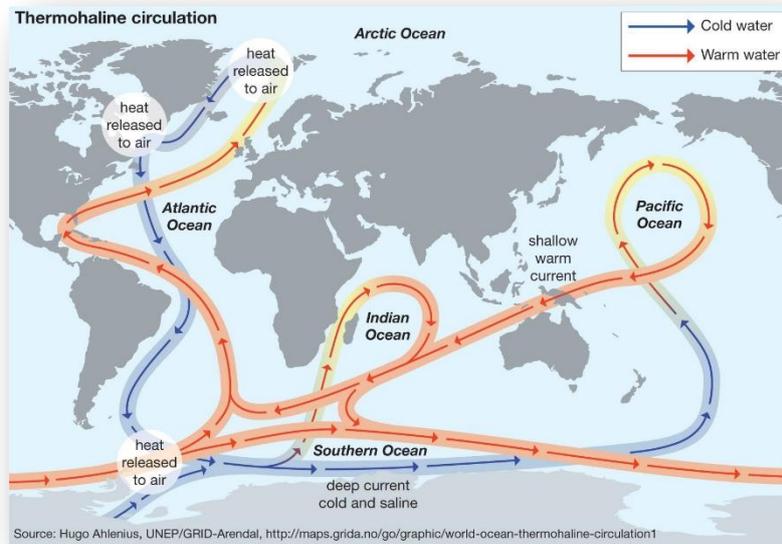


Figura 1.2 – Rappresentazione della circolazione termoalina del “Nastro Trasportatore” (*Conveyor Belt*) [2]

La ACC circola in senso orario intorno al continente antartico, trasportando un volume di acqua stimato pari a $134 \cdot 10^6 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$, guidata da venti occidentali e dalla topografia del fondale marino. La struttura interna della ACC è caratterizzata dalla successione da Nord a Sud di una serie di zone in cui temperatura e salinità delle acque variano bruscamente, dette fronti termoalini, separate tra loro da zone in cui le proprietà delle masse d'acqua rimangono invece pressoché costanti. Questi fronti separano le masse d'acqua di origine antartica da quelle con caratteristiche più equatoriali e costituiscono anche le principali linee di flusso della ACC. Lungo la corrente circumpolare si realizza, infatti, lo scambio di energia e del contenuto di sali che regola e condiziona il trasferimento delle sostanze chimiche e delle specie biologiche, consentendo all'ecosistema antartico di mantenere le sue peculiari caratteristiche. La zona che meglio manifesta questi fenomeni è la Convergenza antartica dove l'acqua superficiale antartica molto fredda, ma di minore salinità, incontra l'acqua superficiale subantartica più calda e più salata. Il quadro sintetico della circolazione termoalina nell'Oceano Meridionale vede acqua profonda, calda e salata, che fluisce verso l'Antartide. Questa massa d'acqua emerge in corrispondenza della Divergenza antartica, si raffredda e si arricchisce di ossigeno per formare sia l'acqua superficiale sia l'acqua di fondo antartica [3].

1.2 GENERALITÀ SUL MARE DI ROSS E SULLE SUE PRINCIPALI MASSE D'ACQUA

Il Mare di Ross è la più vasta area marina protetta al mondo [4]. Situato nel settore Pacifico dell'Oceano Meridionale, tra Capo Colbeck e Capo Adare, copre un'area di circa 5×10^5 km² ed ha una profondità media di circa 500 m con una topografia del fondale piuttosto irregolare caratterizzata da numerosi argini e depressioni, tra cui un canyon orientato verso nord-est e profondo più di 1000 m: il bacino Drygalski, serbatoio di acque salate e dense [5].

Sul lato meridionale è delimitato dal *Ross Ice Shelf* (RIS), una piattaforma di ghiaccio glaciale che si estende su quasi la metà della piattaforma continentale, con uno spessore di circa 250 m sul suo lato più settentrionale (Figura 1.3). Il RIS limita quindi solo le acque più superficiali, mentre le acque profonde possono circolare liberamente al di sotto della piattaforma di ghiaccio [6].



Figura 1.3 – Mare di Ross

All'inizio dell'inverno la superficie del mare viene coperta da uno strato di ghiaccio dello spessore di 2-3 m (la banchisa o *pack ice*) che si forma per il congelamento dell'acqua di mare. Il congelamento avviene a temperatura intorno a $-1,8$ °C ed inizia nel mese di marzo per proseguire con un rapido aumento nel periodo aprile-luglio. Il processo continua sino a settembre/ottobre. All'interno della banchisa restano localmente isolate aree di mare

completamente libere dai ghiacci, note come *polynya*. Esistono sia *polynya* costiere condizionate dai venti catabatici (provenienti dal continente), sia *polynya* oceaniche condizionate dall'azione delle correnti [3].

L'interesse per i processi che si verificano sulla piattaforma continentale occidentale del Mare di Ross è aumentato negli ultimi anni in gran parte a causa della rilevanza climatica delle *polynya*, una delle quali appare regolarmente nella Baia Terra Nova (*Terra Nova Bay*, TNB).

La combinazione di venti catabatici forti e persistenti insieme all'effetto di blocco della lingua di ghiaccio Drygalski sono necessari per formare e mantenere la *polynya* nella TNB. L'area media della *polynya* è di 1300 km², l'interno della TNB è completamente privo di ghiacci e all'esterno della baia è visibile solo una fascia di pack sottile e frammentato. Questa situazione deriva dall'interazione tra la spinta del ghiaccio verso nord e la forzante del vento a largo [7].

Da un punto di vista idrografico, nel Mare di Ross si possono distinguere diverse masse d'acqua in base ai loro valori di temperatura e salinità, che ne determinano densità e profondità, influenzandone la distribuzione e la circolazione.

Le caratteristiche termoaline che definiscono le masse d'acqua principali del Mare di Ross sono visualizzabili tramite grafici chiamati diagrammi TS (temperatura-salinità) (*Figura 1.4*).

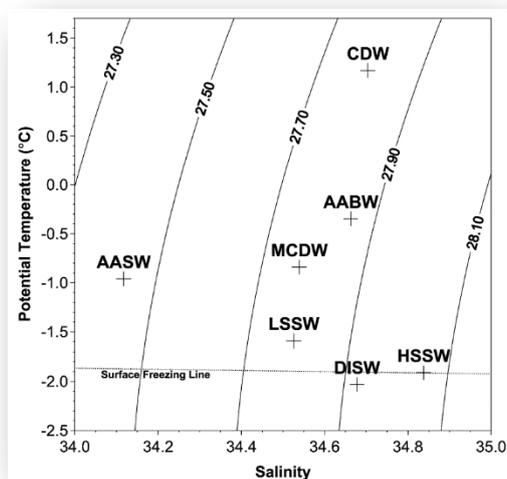


Figura 1.4 – Diagrammi TS delle principali masse d'acqua del Mare di Ross. Per le sigle si rimanda al testo. Le linee rappresentano le anomalie di densità potenziale (densità-1000 kg·m³) [6]

Si distinguono genericamente acque superficiali, acque di piattaforma profonde e acque circumpolari profonde.

L'acqua superficiale (*Antarctic Surface Water*, AASW) occupa i primi 100 m della colonna d'acqua durante il periodo estivo; è la massa d'acqua meno densa (densità minore di $1027,50 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$) e più variabile nel corso dell'anno, essendo influenzata dalle condizioni atmosferiche, dalla fusione e formazione del ghiaccio marino e dalle precipitazioni [5].

La fusione del ghiaccio marino genera uno strato superficiale a bassa densità e rilascia anche nutrienti (nitrati, ione ammonio e fosfati) oltre a elementi in tracce rimasti intrappolati nella banchisa durante l'inverno. Per questi motivi la presenza di AASW favorisce l'inizio di intense fioriture di fitoplancton ed è spesso stata associata ad eventi di aumento della produttività primaria [5].

Le acque superficiali delle polynya costiere sono più fredde rispetto alle zone di mare aperto per l'esposizione ai forti venti che ne facilita il congelamento; gli stessi venti allontanano il ghiaccio marino appena formato in un continuo processo di formazione e rimozione [8].

Quando gli strati superficiali si raffreddano e ghiacciano rilasciano parte del loro contenuto salino, aumentando la salinità delle acque sottostanti, che sprofondano [7].

Tali acque, denominate *High Salinity Shelf Waters* (HSSW) si formano principalmente nella polynya di TNB, che svolge un ruolo chiave nel definire le caratteristiche termoaline delle masse d'acqua del Mare di Ross. L'HSSW ha temperature prossime al punto di congelamento superficiale dell'acqua di mare, comprese tra $1,95$ e $1,75$ °C e salinità da $34,75$ a $35,00$, crescente con la profondità.

Come illustrato in *figura 1.5*, che schematizza la circolazione delle masse d'acqua subsuperficiali, dell'area di polynya di TNB, un ramo di HSSW scorre verso nord lungo il bacino del Drygalski fino al margine della scarpata. Un secondo ramo scorre verso sud, fino al RIS, dove interagisce con la base della piattaforma e contribuisce alla formazione di *Deep Ice Shelf Water* (DISW). La DISW, definita da temperatura inferiore al punto di congelamento superficiale e da salinità media di circa $34,62$, fuoriesce dalla cavità del RIS intorno a 180° di longitudine tra i 300 e i 400 m di profondità [6]. Studi condotti mediante l'impiego di cloro fluoro carburi come traccianti chimici transienti hanno permesso di stimare che il tempo di evoluzione da HSSW a DISW è pari a 3-4 anni [6]. L'HSSW e la DISW sono le masse d'acqua di piattaforma profonde più importanti del Mare di Ross, coinvolte nella ventilazione delle profondità oceaniche [5].

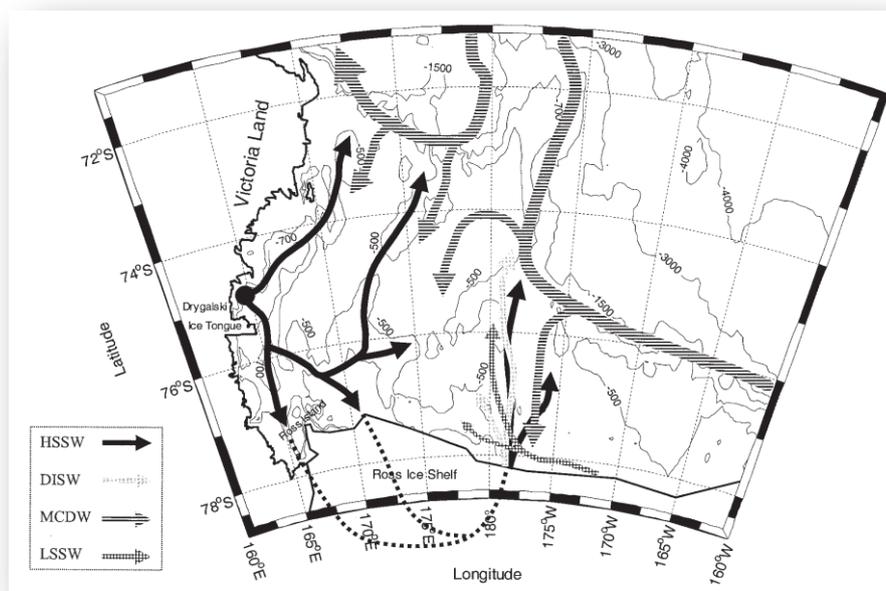


Figura 1.5 – Schema della circolazione subsuperficiale del Mare di Ross [5]

Un'ulteriore massa d'acqua fredda ($T = -1,80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a minore salinità ($S = 34,47$) (cfr. Figura 1.4), trovata a profondità intermedie nella zona centro-orientale del Mare di Ross, è la *Low Salinity Shelf Water* (LSSW). La sua formazione deriva probabilmente dall'interazione tra le AASW con le acque presenti nello strato sub superficiale, caratterizzate da bassa temperatura a causa dei cicli di formazione e scongelamento del ghiaccio superficiale [9].

L'ACC trasferisce al margine della piattaforma continentale del Mare di Ross acque profonde circumpolari (*Circumpolar Deep Water*, CDW) [4].

La CDW è caratterizzata da valori di temperatura positivi e da salinità relativamente elevata ($T = 1,70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $S = 34,73$), oltre che da concentrazione di ossigeno inferiori a $200\text{ }\mu\text{M}$, dovuta al fatto che questa massa d'acqua è rimasta a lungo segregata a profondità intermedie, senza possibilità di scambi con l'atmosfera (cfr. Figura 1.4) [5]. La CDW si mescola con le acque superficiali durante l'intrusione in area di piattaforma, formando la CDW modificata (*Modified Circumpolar Deep Water*, mCDW). L'mCDW è l'unica massa d'acqua che raggiunge la piattaforma del Mare di Ross e svolge un ruolo cruciale nel rinnovamento delle acque della piattaforma, contribuendo alla formazione della DISW e nel bilancio termico totale [7]. Infine, il mescolamento delle HSSW con la mCDW dà origine alle *Antarctic Bottom Waters* (AABW), definite da temperatura negativa e salinità minori di $34,70$ [7]. La produzione di AABW è correlata al volume di acque di *shelf* prodotte e alla loro capacità di raggiungere la zona in cui avvengono i processi di formazione delle acque di fondo, mantenendo le proprie

caratteristiche quasi inalterate. Il Mare di Ross contribuisce al 25% della produzione totale delle AABW, mentre il restante proviene per circa il 50% dal Mare di Weddell e il resto da fonti minori [10]. È la più densa e fredda massa d'acqua di tutti gli oceani del globo terrestre e si posiziona al di sotto dei 4000 m in tutti i bacini oceanici che hanno un collegamento con l'Oceano Antartico a quella profondità con importanti conseguenze sulla circolazione oceanica [3].

1.3 GENERALITÀ SUL CICLO BIOGEOCHIMICO DEL FERRO IN AMBIENTE MARINO

Il ferro (Fe) è l'elemento in tracce più studiato nell'ambiente marino, perché essenziale per molti processi vitali di organismi batterici e algali, quali l'assimilazione di NO_3^- , la fissazione di N_2 , la riduzione di NO_3^- a NO_2^- e a NH_4^+ , la biosintesi della clorofilla e il funzionamento delle catene di trasporto degli elettroni.

Perciò questo elemento è direttamente correlato all'attività fitoplanctonica e ai processi di produzione primaria, ovverosia la quantità totale di materia organica prodotta attraverso la fotosintesi per unità di area o di volume nel tempo, agendo in modo indiretto sulla regolazione delle concentrazioni di diossido di carbonio (CO_2) atmosferico da parte degli organismi fotosintetici, giocando quindi un ruolo fondamentale nella regolazione del sistema climatico globale [11]. A tale proposito, si stima che l'Oceano Meridionale contenga circa il 30% del CO_2 oceanico di origine antropica essendo tra le zone più produttive dell'Oceano Meridionale, nonché un importante sito di sprofondamento di CO_2 su scala annuale [3].

In acqua di mare, il Fe viene classificato come elemento in tracce, poiché presenta concentrazioni dell'ordine delle $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. È operativamente suddiviso in particolato (separato dalla fase disciolta mediante filtrazione con membrane di porosità nominale pari a 0,45 e 0,20 μm), disciolto e colloidale (frazione separata dalla fase disciolta attraverso tecniche di ultrafiltrazione) [12].

Nonostante sia uno dei più abbondanti elementi nella crosta terrestre, la concentrazione del Fe disciolto (Fe_d) nelle acque superficiali è generalmente inferiore a 0,2 nM, a causa della bassa solubilità del ferro nell'acqua di mare, dell'elevato pH, del contenuto di ossigeno e delle limitate fonti di ferro nelle zone a largo [13].

Il ferro disciolto esiste sotto forma di diverse specie chimiche. Il bilancio di massa (1) del Fe_d totale ($Fe_{d\ tot}$) è determinato come la somma di Fe libero (Fe_{libero}), Fe complessato con ligandi inorganici (FeL_{inorg}) e Fe complessato con ligandi organici (FeL_{org}):

$$Fe_{d\ tot} = Fe_{libero} + FeL_{inorg} + FeL_{org} \quad (1)$$

Le diverse specie presentano una diversa mobilità ambientale e biologica.

In merito alla mobilità del Fe_d , il seguente bilancio di massa (2) dimostra che:

$$Fe_{tot} = FeL + Fe_{inert} + Fe' \quad (2)$$

Dove FeL rappresenta i complessi con ligandi organici scambiabili in una scala temporale inferiore ad un giorno, Fe_{inert} rappresenta la frazione legata ad una matrice essenzialmente non labile e Fe' la frazione di complessi inorganici labili [14]. Il Fe(II) è molto solubile e lo si trova principalmente come ione libero Fe^{2+} , ma risulta instabile, di conseguenza, viene rapidamente ossidato in presenza di ossigeno nelle acque [15]. Il Fe(III) è la specie termodinamicamente stabile, quindi scarsamente solubile nelle acque naturali; si trova essenzialmente sotto forma di prodotti di idrolisi quali $[Fe(OH)_2]^+$, $Fe(OH)_3$ e $[Fe(OH)_4]^-$, e la frazione di ione libero Fe^{3+} è molto bassa, ma può essere ridotto a Fe(II) per azione della luce e dei microorganismi [16]. Sia il Fe^{2+} sia il Fe^{3+} possono formare diversi complessi inorganici in funzione di pH e Eh. In condizioni ossidanti e per valori di pH intorno a 8 (valore medio dell'acqua di mare), la specie inorganica predominante è $Fe(OH)_3$, come illustrato dal diagramma di Pourbaix (*Figura 1.6*).

Tuttavia, il contributo dato al $Fe_{d\ tot}$ dal Fe_{libero} e dal FeL_{inorg} è poco rilevante. Essendo infatti il Fe un elemento di transizione, possiede un'elevata affinità per i ligandi organici, con i quali forma complessi molto stabili. Si stima che circa il 99% del ferro disciolto totale in acqua di mare si trovi sotto forma di complessi con ligandi organici, influenzando non soltanto la concentrazione del Fe_d , ma anche la biodisponibilità [14]. I ligandi organici sono presenti in eccesso rispetto al ferro e ne mantengono la concentrazione fino a mille volte superiore a quella prevista dalla sua solubilità; ruolo chiave lo giocano le costanti di stabilità (K) che hanno valori elevati compresi tra 10^{19} e 10^{23} , che indicano la tendenza a reagire e a formare complessi molto stabili da parte dei ligandi [17].

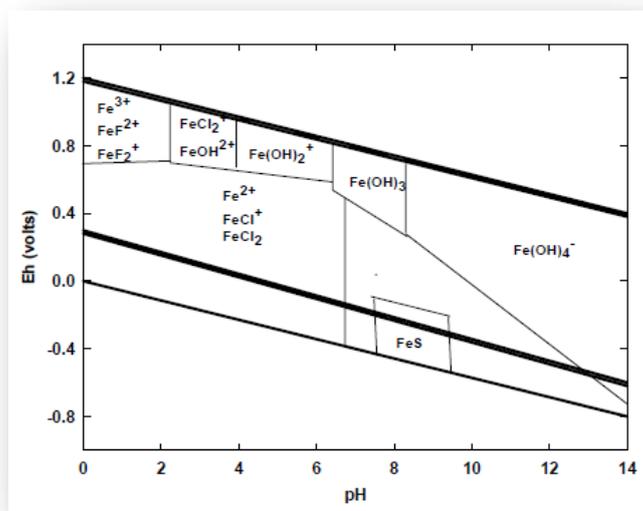


Figura 1.6 – Diagramma di Pourbaix per il ferro

Il Fe_d attraverso processi di adsorbimento, precipitazione e aggregazione può essere trasferito nella frazione particellata (*scavenging*) [18]. Difatti, l'andamento della concentrazione del Fe in funzione della profondità viene definita “*nutrient+scavenging type*” ad indicare da un lato il ruolo biologico del ferro come micronutriente, dall'altro la sua tendenza a precipitare come fase particellata. Tale distribuzione verticale è caratterizzata da basse concentrazioni superficiali e subsuperficiali a causa della rimozione fitoplanctonica e dei processi di adsorbimento sul materiale particellato. La concentrazione aumenta progressivamente lungo la colonna d'acqua, fino a circa 1000 m di profondità a causa dei processi di rimineralizzazione del materiale organico. A profondità maggiori la concentrazione del Fe diminuisce, in quanto prevalgono i processi di rimozione per l'affinità del ferro con la fase solida particellata [12].

Da quanto descritto, si comprende che il ciclo biogeochimico del Fe in ambiente marino è il risultato di un complesso bilancio tra processi di *input* e di *output* definiti dalla presenza di sorgenti, naturali o antropiche, da meccanismi di rimozione oltre che dalla speciazione chimica dell'elemento.

In generale, gli apporti di Fe_d nelle acque superficiali provengono da fusione dei ghiacci nelle aree polari, deposizioni atmosferiche quali polveri (*dust*) provenienti dal continente, sorgenti idrotermali, input costieri e apporti estuarini e risalita di acque profonde (*upwelling*). Le principali vie di rimozione consistono nell'assimilazione biologica (*uptake*), in processi di adsorbimento e precipitazione veicolati da materiale particellato e sedimentazione [19].

Riguardo all'Oceano Meridionale, gli input esterni di Fe sono bassi; i principali apporti riguardano le deposizioni atmosferiche, l'*upwelling*, la risospensione dei sedimenti, la fusione di ghiaccio marino e iceberg e l'intrusione di CDW (Figura 1.7) [20].

In particolare, il ghiaccio marino immagazzina Fe durante i mesi invernali non produttivi, mentre in primavera ed estate, ossia nei mesi ad elevata produttività, lo stesso Fe accumulato viene rilasciato grazie alla fusione del ghiaccio [21]. Si è osservato che la concentrazione di Fe, sia particellato che disciolto, nel ghiaccio è tra uno e due ordini di grandezza superiori rispetto a quella riscontrata nell'acqua di mare [22]. I valori medi di concentrazione di Fe_d riscontrati nel ghiaccio marino antartico sono infatti compresi tra 0,2 e 110 nM, mentre per la colonna d'acqua si hanno valori tra 0,2 e 0,4 nM.

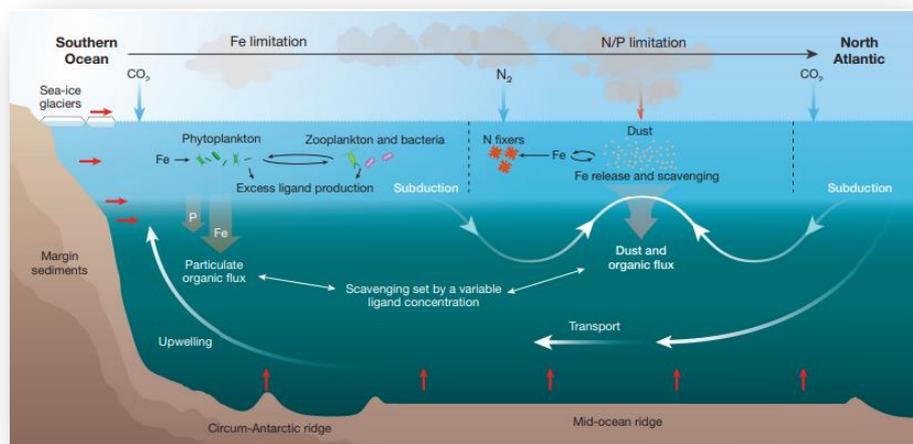


Figura 1.7 – Rappresentazione dei principali processi che influenzano il ciclo biogeochimico del Fe nell'Oceano Antartico [19]

Diversi studi hanno dimostrato che il Fe è distribuito nel ghiaccio con un gradiente verticale e orizzontale di concentrazione, ciò significa che valori di concentrazione di ferro più alti sono stati osservati nella parte inferiore del ghiaccio (*bottom ice*) a seguito dell'assimilazione del Fe presente nell'acqua sottostante da parte delle alghe simpagiche ed è, inoltre, più alta lungo la costa rispetto al mare aperto, per cui il ghiaccio marino più vicino alla costa ha concentrazioni di Fe maggiori rispetto al *pack ice* (ghiaccio presente in mare aperto), a causa dei maggiori apporti costieri da parte della piattaforma continentale [23].

1.4 IL FERRO COME MICRONUTRIENTE E RUOLO DEGLI ORGANISMI NELLA SUA SPECIAZIONE

In diverse aree al largo dell'Oceano Meridionale, dell'Oceano Pacifico sub-artico ed equatoriale sono state identificate regioni definite *High Nutrient Low Chlorophyll* (HNLC) [24]. Queste zone presentano elevate concentrazioni di macronutrienti (nitrati e fosfati) e concentrazioni di biomassa fitoplanctonica (in termini di concentrazioni di clorofilla, Chl-a) inferiori rispetto a quelle stimate sulla base delle concentrazioni dei macronutrienti (Figura 1.8).

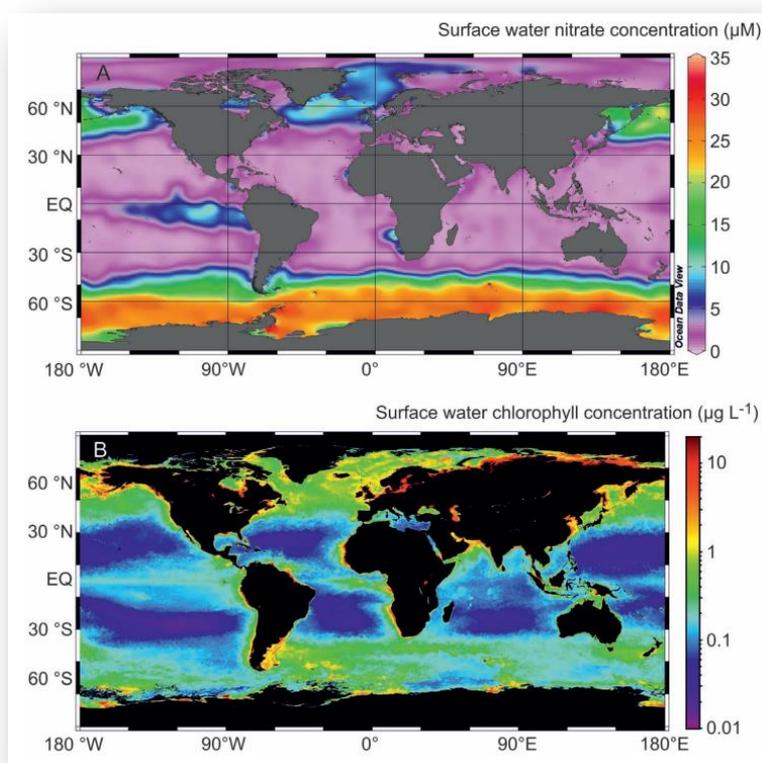


Figura 1.8 – Distribuzioni globali medie annuali di (a) nitrati (μM) e (b) Clorofilla-a ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) [14]

È ormai assodato che la limitazione nella crescita fitoplanctonica sia il risultato della scarsa concentrazione di ferro, in accordo con l'*ipotesi del ferro* formulata da Martin nel 1990 [25], secondo la quale la carenza di questo elemento sarebbe il fattore responsabile dell'esistenza delle zone HNLC [14].

Nel Mare di Ross, la maggior parte dei processi fotosintetici sono localizzati nelle polynya. Due gruppi di organismi algali si accrescono alternativamente durante la fioritura fitoplanctonica della regione: le diatomee e le aptofite (Figura 1.9). Le prime si sviluppano nella

porzione occidentale e orientale del Mare di Ross [26], mentre le seconde si trovano generalmente nelle polynya aperte della regione centrale sud ed ovest [27]. I *bloom* fitoplanctonici nella polynya TNB, sono quindi dominati da diatomee, mentre le acque della polynya del Mare di Ross (*Ross Sea Polynya*, RSP) sono caratterizzate dallo sviluppo di aptofite coloniali [28].

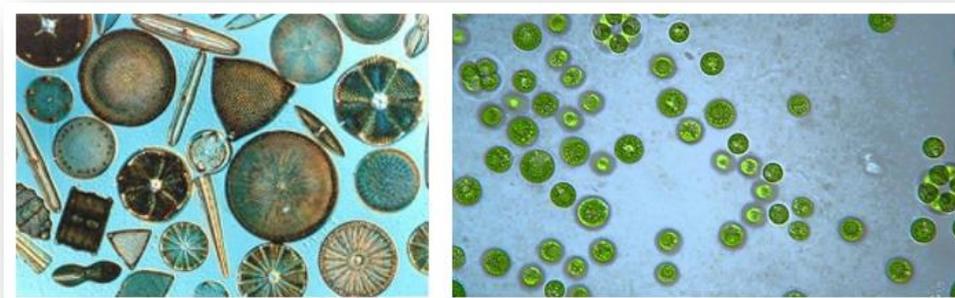


Figura 1.9 – Diatomee (sinistra) e aptofite (destra)

Le diverse fioriture fitoplanctoniche nel Mare di Ross avvengono non solo in zone, ma anche in tempi differenti. Infatti, la crescita fitoplanctonica durante la primavera australe, ossia nei mesi di novembre e dicembre quando il ghiaccio inizia a fondere, è spesso caratterizzata da *bloom* di aptofite, per poi scemare rapidamente a causa della diminuzione di micronutrienti [29]. Mentre le diatomee si sviluppano in un secondo *bloom* che avviene durante il periodo estivo, tra la fine di dicembre e gennaio grazie alla fusione del ghiaccio che è stato accumulato nel periodo invernale [30].

La segregazione spaziale e temporale di questi gruppi è associata alla differente risposta in relazione alla concentrazione di ferro e alla disponibilità di luce, legata a sua volta alla presenza della copertura di ghiaccio e al mescolamento verticale [31].

La disponibilità di Fe_d può quindi limitare la produzione primaria e influenzare la struttura della comunità di fitoplancton. Infatti, il Fe_d può essere molto basso nello strato superiore (0,02-0,08 nM a 100 m), anche all'inizio della stagione, quando la polynya è ancora in formazione (dicembre) a causa dell'esaurimento della riserva invernale all'inizio della stagione. Nonostante ciò, nella RSP si ha la più alta concentrazione di fitoplancton tra i mari costieri dell'Antartide.

È stato osservato che le concentrazioni di Fe_d aumentano con la profondità vicino al fondale marino del RIS [4]. Nella CDW il Fe_d viene ridotto durante il mescolamento sulla piattaforma

con l'acqua superficiale antartica (AASW) e, inoltre, la presenza di mCDW provoca, in prossimità del fondo, un forte gradiente di densità che ostacola l'apporto di Fe dal sedimento. A parte le fonti locali come la fusione del ghiaccio marino sui margini della polynya e il trasporto laterale dalla terra, i flussi ascendenti dal sedimento sono le fonti più importanti di Fe_d nelle acque superficiali del Mare di Ross [20].

La componente biologica svolge un ruolo determinante nella sintesi e nel rilascio in acqua dei ligandi organici, che, come accennato nel paragrafo precedente, aumentano la solubilità del Fe_d e ne influenzano in maniera significativa la speciazione e la biodisponibilità [4]. I ligandi organici disciolti sono costituiti da un ampio gruppo di molecole organiche molte delle quali non identificate con concentrazioni variabili nell'ordine del nM.

Una loro generica classificazione li suddivide in base alla massa molecolare in ligandi a bassa e ad alta massa molecolare. Appartengono alla prima classe i ligandi *siderophore-type* e *porphyrin-type* [14].

I ligandi della classe "*siderophore-type*" (Figura 1.10) sono ligandi a bassa massa molecolare (300-1000 Da) presenti principalmente nelle acque più superficiali, con elevata affinità per il Fe, con il quale formano dei complessi con elevate costanti di formazione ($K \sim 10^{22-23}$). Vengono sintetizzati ed escreti da batteri autotrofi (cianobatteri) ed eterotrofi in condizioni aerobiche e di Fe limitazione, per complessare il Fe_d grazie a gruppi chelanti presenti nelle molecole. Il complesso Fe-sideroforo è poco biodisponibile per gli altri organismi [14].

Parallelamente alla sintesi dei siderofori, i batteri sintetizzano delle proteine di membrana recettoriali esterne in grado di riconoscere selettivamente specifici complessi Fe(III)-siderofori, permettendo l'assimilazione del Fe. Una volta che la richiesta di Fe intracellulare è soddisfatta, la biosintesi dei siderofori e delle loro proteine recettoriali di membrana viene inibita.

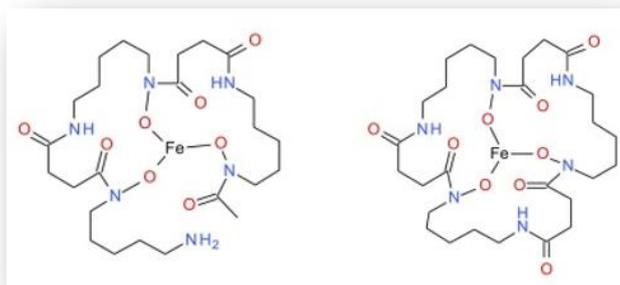


Figura 1.10 – Strutture di alcuni siderofori (Ferriossamina B e Ferriossamina E) [14]

I ligandi *porphyrin type* hanno massa molecolare 600-1000 Da e sono distribuiti lungo tutta la colonna d'acqua. Questi composti presentano una minore affinità per il Fe rispetto ai siderofori ma, in ogni caso, formano complessi con elevate costanti di formazione ($K \sim 10^{20-21}$). Questi ligandi hanno la funzione di gruppo prostetico nelle proteine e sono utili per la loro capacità di assorbire la luce, trasferire elettroni e legare l'ossigeno [14]. Le porfirine, che includono clorofilla e loro prodotti di degradazione, complessi eme e la vitamina B₁₂, sono prodotti da quasi tutti gli organismi che impiegano la via metabolica del tetrapirrolo (Figura 1.11) [32].

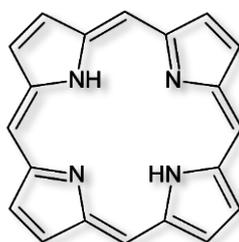


Figura 1.11 – Struttura dell'anello porfirinico

Per quanto concerne i ligandi organici ad alto peso molecolare sono più diffusi ma più complessi da identificare rispetto a quelli a basso peso molecolare. Questa classe di ligandi comprende diverse classi di sostanze tra cui sostanze umiche (HS) e sostanze polimeriche extracellulari (EPS) [14].

Le HS (Figura 1.12) sono una classe di composti organici di varia struttura, forma e massa. Sono suddivisi in base alla loro solubilità a diversi valori di pH e vengono catalogati in acidi umici, quando sono solubili in soluzione alcalina, acidi fulvici, se solubili in soluzione acida e umina, la restante parte insolubile. Strutturalmente sono ricche di sostanze alifatiche, mentre i composti aromatici sono presenti, ma non costituiscono una parte predominante. I gruppi

funzionali costituiscono circa il 20-30% delle sostanze umiche e i più abbondanti sono i gruppi carbossilici e alcolici [33].

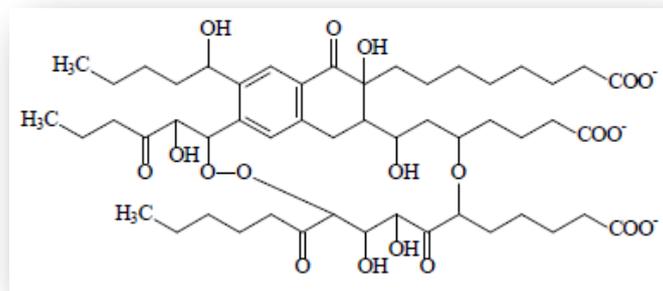


Figura 1.12 – Esempio di sostanza umica di origine marina

Gli EPS, invece, sono sostanze che, dal punto di vista chimico, sono ricche in polisaccaridi ad alto peso molecolare (dimensioni da 10 a 30 kDa) e che presentano una composizione esopolimerica [34], sono presenti, inoltre, acidi nucleici e fosfolipidi ma in quantità inferiori [35].

In aggiunta, la maggior parte delle sostanze umiche fanno parte anche della materia organica disciolta colorata (CDOM). Si presume che la forza legante delle sostanze umiche sia relativamente bassa, ma potrebbe non essere sempre così. I polisaccaridi e le sostanze polimeriche extracellulari (EPS), secondo alcuni ricercatori, potrebbero dare il contributo più importante al pool di ligandi nelle acque superficiali a largo dell'oceano. Le sostanze umiche sono molto resistenti alla degradazione e si ritiene siano sostanze organiche refrattarie con tempi di residenza > 1000 anni, mentre il tempo di emivita (permanenza) dell'EPS e dei polisaccaridi è breve (ore - 3 anni). Pertanto, la concentrazione di Fe_d è determinata dalla competizione tra i ligandi organici che legano il Fe_d , coprecipitazione con altre particelle e la precipitazione sotto forma di ossidi. Di conseguenza, il trasporto del Fe_d dalla sua fonte all'acqua di mare è facilitato dai ligandi organici che legano il Fe_d [4].

L'aumento della temperatura nella Penisola Antartica, da attribuire ai cambiamenti climatici, sta mettendo sempre più a rischio l'equilibrio delle piattaforme galleggianti di ghiaccio (*ice shelves*) oltre che del ghiaccio marino che si forma e si fonde annualmente [3]. Di conseguenza, si hanno ripercussioni sull'accumulo e il rilascio di micronutrienti, tra cui il ferro. È quindi fondamentale la determinazione del Fe e della sua speciazione per poter comprendere quali

effetti potrebbe avere il cambiamento climatico sull'intera catena trofica dell'Oceano Meridionale.

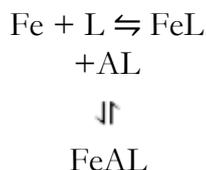
1.5 TECNICHE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DEL Fe_d E DELLA SUA SPECIAZIONE IN ACQUA DI MARE

La quantificazione accurata e precisa di Fe e, più in generale, di metalli traccia in acqua di mare è molto impegnativa, a causa delle basse concentrazioni (10^{-9} - 10^{-12} mol·L⁻¹) e delle forti interferenze derivanti dalla matrice (tipicamente 3,5% di solidi disciolti totali) [36]. Di conseguenza, una fase di separazione/preconcentrazione, basata sull'estrazione con solvente [35][36], estrazione in fase solida [37][38] o coprecipitazione, sono generalmente necessarie [15][36][41].

La tecnica più promettente per la determinazione simultanea a più elementi è la spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS), che offre prestazioni eccellenti in termini di limiti di rilevamento (LOD), versatilità, ampia gamma di linearità dinamica e vanta un basso consumo di campione. Tuttavia, quando si analizza l'acqua di mare, è necessaria un'adeguata preparazione del campione poiché l'ICP-MS è altamente soggetto agli effetti matrice, che rendono impossibile condurre la determinazione direttamente sul campione così com'è. Il gruppo di ricerca "Chimica analitica degli elementi in tracce" del DCCI ha sviluppato un metodo per la determinazione dei livelli in ultratracce di Fe nell'acqua di mare, basato sulla procedura di coprecipitazione con idrossido di magnesio (Mg(OH)₂) in combinazione con la cella di reazione dinamica ICP-MS (ICP-DRC-MS). Questo metodo ha mostrato una buona accuratezza, un basso LOD (nell'ordine di ng·L⁻¹) e un'elevata precisione, rivelandosi un'alternativa allettante ai metodi che richiedono procedure prolungate o strumentazione costosa [36].

I metodi voltammetrici di adsorbimento catodico e ridissoluzione sono ampiamente utilizzati per la determinazione del Fe_d e sua speciazione nell'acqua di mare. In particolare, il metodo di eccellenza oggi è la voltammetria di ridissoluzione per adsorbimento con scambio di ligandi competitivi (CLE-AdSV) [42][43][44].

Il metodo CLE-AdSV consiste nell'aggiunta al campione di un ligando elettroattivo (AL) che compete con i ligandi naturali (L) nel campione e nella successiva misurazione voltammetrica del complesso formato tra Fe e il ligando aggiunto (FeAL).



La concentrazione del complesso FeAL dipenderà dalla concentrazione di L e dalla stabilità del complesso FeL rispetto a quella del complesso FeAL. Il complesso FeAL viene adsorbito su un elettrodo di lavoro, comunemente una goccia pendente di mercurio (Hg), in seguito all'applicazione di un potenziale specifico. Questa fase di preconcentrazione è particolarmente vantaggiosa in quanto migliora il LOD, isola il metallo dalla matrice e di conseguenza aumenta la selettività. Nella fase di ridissoluzione il complesso viene poi riportato in soluzione mediante scansione catodica, durante la quale viene registrata la corrente di riduzione.

Il metodo prevede la misurazione voltammetrica dopo un opportuno tempo di equilibrio in una serie di campioni contenenti la stessa concentrazione di ligando AL e aggiunte crescenti di Fe inorganico. Viene quindi costruita una curva di titolazione che mette in relazione la corrente in funzione della concentrazione totale di Fe [45][46][47][48]. I dati sperimentali vengono poi elaborati secondo opportuni modelli, derivati dai bilanci di massa delle specie coinvolte e dalle definizioni delle costanti di formazione dei complessi. Questa elaborazione consente di ottenere la concentrazione di Fe_d complessato e libero insieme alla concentrazione e alla forza legante di L [47][48].

La tecnica CLE-AdSV ha una buona sensibilità, superiore ad altre tecniche di ridissoluzione, perché il composto adsorbito rimane sulla superficie dell'elettrodo, mentre in altri casi può diffondere parzialmente all'interno della gocciolina di Hg. Di conseguenza, è possibile ottenere un LOD dell'ordine del ng·L⁻¹, tipicamente tra 80 e 100 pM [43][44].

Il metodo CLE-AdSV viene utilizzato anche per la determinazione del Fe_d totale applicando un metodo appropriato a campioni di acqua di mare fornendo così acidificazione e/o trattamento con radiazioni UV per distruggere la materia organica e portare tutto il Fe in forma ionica [11][14].

Tuttavia, la composizione molecolare dei ligandi non può essere dedotta tramite CLE-AdSV. La caratterizzazione di questi composti è difficile perché i ligandi sono di composizione eterogenea, hanno strutture chimiche complesse e sono presenti in basse concentrazioni in una matrice con elevata forza ionica [14].

Questi fattori rendono difficile la preparazione del campione e la successiva analisi e sono generalmente necessari grandi volumi di campione e tecniche specifiche per l'estrazione e la preconcentrazione di questi composti [51][52]. I metodi tradizionali prevedono l'uso di estrazioni liquido-liquido e colonne cromatografiche, sebbene ciò comporti procedure complesse e scarsa riproducibilità [55]. Recentemente, la tecnica più utilizzata per l'estrazione e la preconcentrazione di questi composti è l'estrazione in fase solida (SPE), che presenta i vantaggi di una buona riproducibilità, di un'elevata efficienza e dell'uso di piccoli volumi di solventi [49][50][52][53][54].

I saggi spettrofotometrici possono essere utilizzati per la determinazione di ligandi organici e in particolare di siderofori ed EPS [54][55][56][57][58]. Tuttavia, questi non sono applicabili a matrici complesse, non sono sufficientemente sensibili e sono soggetti alle interferenze della matrice. Pertanto, è necessario un metodo sensibile in grado di separare e rilevare questi composti. Tra le varie tecniche, quella che sembra rispondere più adeguatamente a questi requisiti è la cromatografia liquida ad alta prestazione-ionizzazione elettrospray-spettrometria di massa tandem (HPLC-ESI-MS/MS). Questa tecnica consente la separazione degli analiti dai composti interferenti, è sensibile e fornisce informazioni strutturali in seguito alla frammentazione dello ione precursore e alla distribuzione isotopica, che possono essere utilizzate per identificare elementi specifici in una molecola [56].

Tuttavia, nonostante i recenti sviluppi tecnologici nel campo della spettrometria di massa, lo studio dei ligandi organici nell'acqua di mare è ancora difficile, a causa della complessità e della varietà di queste sostanze.

2. MATERIALI E METODI

2.1 REATTIVI E SOLUZIONI STANDARD

Tutti i campioni sono caratterizzati da concentrazioni di analita estremamente basse (nell'ordine delle nanomoli su litro), pertanto, al fine di evitare la loro eventuale contaminazione, sono stati impiegati reattivi ultrapuri (u.p.). In aggiunta, ad ogni step del procedimento analitico, è stata impiegata acqua ultrapura ottenuta mediante il sistema a scambio ionico MilliQ (Millipore®), alimentato dal sistema di osmosi inversa Elix 3 (Millipore®). Allo scopo di ridurre il rischio di contaminazione, dunque, gran parte delle operazioni riguardanti la preparazione delle soluzioni standard e dei campioni sono state condotte sotto cappa a flusso laminare, ad eccezione delle procedure di preparazione dei campioni destinati all'identificazione dei ligandi organici che sono state condotte sotto cappa di aspirazione.

In riferimento alla preparazione delle diverse soluzioni, tutte le micropipette utilizzate sono state preventivamente tarate su bilancia analitica.

2.1.1 Reattivi e soluzioni standard per la determinazione del Fe_d totale mediante ICP-MS

- Acido nitrico (HNO₃) 67-69% NORMATOM® ultrapuro (VWR chemicals);
- Soluzione di ammoniaca (NH₄OH) 25% LiChropur® (Sigma-Aldrich);
- Soluzione standard monoelementare di ferro a 1000 mg·L⁻¹ (Fluka Analytical)
- Soluzioni standard per il *daily performance* dell'ICP-MS;
- Ammoniaca (NH₃) 99,9995% ultrapura (SIAD), usata come gas di reazione
- *Soluzioni standard di Fe(III) per calibrazione strumentale*

Le soluzioni standard di Fe per la calibrazione sono state preparate trasferendo volumi opportuni delle soluzioni standard intermedie in una provetta da 50 mL e portando a volume con acqua MilliQ. Le soluzioni sono state poi acidificate all'1% (v/v) aggiungendo 500 µL di HNO₃. Le soluzioni intermedie sono state a loro volta preparate attraverso diluizioni in serie a partire dalla soluzione standard commerciale monoelementare a 1000 mg·L⁻¹.

2.1.2 Reattivi e soluzioni standard per la determinazione del Fe_d totale e sua speciazione mediante CLE-AdSV

- Soluzione di cloruro di potassio (KCl) 3 mol·L⁻¹ Supelco® (Sigma-Aldrich) per elettrodo Ag/AgCl;
- Mercurio (Hg) 99,999% (Thermo Scientific) per elettrodo di lavoro;
- Bromato di potassio (KBrO₃) ≥ 99,8% NORMAPUR® (VWR chemicals);
- 2,3-diidrossinaftalene (DHN) ≥ 98,0% (Sigma-Aldrich) (Figura 2.1):

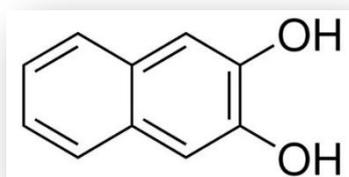


Figura 2.1 – Formula di struttura del DHN

- acido 3-(4-(2-idrossietil) piperazin-1-)-propan-1-solfonico (HEPPS) ≥ 99,5% (Sigma-Aldrich) (Figura 2.2):

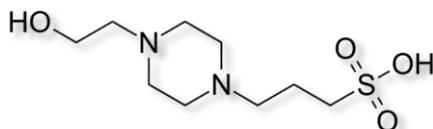


Figura 2.2 – Formula di struttura dell'HEPPS

- Soluzione di ammoniaca (NH₄OH) 25% LiChropur® (Sigma-Aldrich);
- Metanolo (CH₃OH) ≥ 99,8% CHROMANORM® (VWR chemicals);
- Soluzione standard monoelementare di ferro a 1000 mg·L⁻¹ (Fluka Analytical) per la preparazione delle soluzioni standard diluite;
- Diossido di manganese (MnO₂) 0,05 M per la purificazione dell'HEPPS;
- Azoto (N₂) ≥ 99,999% ALPHAGAZ™ (Air Liquide), usata per “degasare” la cella voltammetrica.

▪ Soluzione madre di DHN (0,01 M)

Si pesano 81,7 mg di DHN su bilancia analitica in una provetta da 50 mL e si porta a volume con metanolo. La soluzione è conservata a +4 °C.

- *Soluzione di DHN (0,1 mM)*

Si trasferiscono 0,5 mL di soluzione DHN 0,01 M in una provetta da 50 mL, portare a volume con metanolo. La soluzione è conservata a +4 °C.

- *Soluzione tampone/ossidante (HEPPS 0,1 M / bromato 0,4 M / ammoniaca ~ 0,05 M)*

Si pesano 3,3553 g di KBrO_3 e 1,2648 g di HEPPS in una provetta da 50 mL e si porta a volume con acqua MilliQ. Si aggiungono 187 μL di soluzione di ammoniaca e si agita per 2 ore. Successivamente si purifica la soluzione con 100 μL di MnO_2 0,05 M e si lascia equilibrare una notte. Si trasferisce il surnatante in un'altra provetta da 50 mL. La procedura di purificazione si ripete altre due volte.

La soluzione si conserva a temperatura ambiente e al buio (la si avvolge nell'alluminio perché sensibile alla luce).

- *Soluzione standard di Fe(III) (40 μM)*

Si prelevano 112 μL della soluzione standard commerciale di Fe(III) a $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e si trasferiscono in una provetta da 50 mL contenente una soluzione di HCl 0,1%.

- *Soluzione standard di Fe(III) (60 nM)*

Si prelevano 75 μL della soluzione di Fe(III) a 40 μM , si trasferiscono in una provetta da 50 mL e si porta a volume con acqua MilliQ.

- *Soluzione standard di Fe(III) diluite (da 14 a 224 nM)*

Si preparano soluzioni di Fe(III) per ciascun campione in modo che la concentrazione del campione dopo un'aggiunta di 50 μL di tale soluzione sia doppia rispetto alla concentrazione di Fe_d totale presente originariamente nel campione (determinata con ICP-MS).

Si preleva un volume opportuno di soluzione di Fe(III) a 40 μM , lo si trasferisce in una provetta da 50 mL e si porta a volume con acqua MilliQ.

- *Soluzione standard di Fe(III) (240 nM)*

Si prelevano 300 μL della soluzione di Fe(III) a 40 μM , si trasferiscono in una provetta da 50 mL e si porta a volume con acqua MilliQ.

Le soluzioni standard di Fe(III) sopra descritte vengono conservate a +4 °C e, in queste condizioni, sono stabili per circa una settimana.

2.1.3 Reattivi e soluzioni standard per l'identificazione dei ligandi organici tramite HPLC-ESI-MS/MS

- Acido cloridrico (HCl) 34-37% NORMATOM® suprapuro (VWR chemicals);
- Metanolo (CH₃OH) ≥ 99,8% CHROMANORM® (VWR chemicals);
- Soluzione standard di ferriossamina E (Sigma-Aldrich) (vedi *Figura 1.10*);
- Soluzione standard di un sideroforo con struttura simile alla stafiloferrina A, sintetizzata presso i laboratori del CEBR (*Figura 2.3*). Il nostro derivato ha la stessa porzione dell'α-idrossicarbossilato (due unità di acido citrico), ma differisce per il legante tra le due unità citriche, rispettivamente acido 2,5-diamminopentaenoico per la stafiloferrina A e acido 2,6-diamminoesanoico per la nostra molecola.

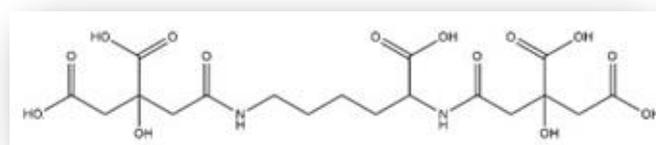


Figura 2.3 – Formula di struttura del composto simile alla stafiloferrina A sintetizzato presso i laboratori del CEBR

- *Acqua di mare artificiale (ASW) (salinità pari a 35 g·L⁻¹ e pH pari a 8,2)*

Per preparare l'acqua di mare artificiale (ASW), impiegata sia come bianco procedurale che come campione, contenente una quantità nota di analita; sono stati sciolti in 4 L di acqua MilliQ i costituenti riportati in *tabella 2.1*.

Tabella 2.1 – Composizione dell'acqua di mare artificiale avente salinità 35 g·L⁻¹. I valori delle masse sono calcolati per 4 L di soluzione

Costituente	Concentrazione (mol·L ⁻¹)	Massa (g)
NaCl	0,47	109,87
NaSO ₄ ·10H ₂ O	1,87·10 ⁻²	24,10
KCl	6,25·10 ⁻³	1,864
CaCl ₂ ·2H ₂ O	6,25·10 ⁻⁵	2,934
NaHCO ₃	1,58·10 ⁻³	0,531
KBr	5,63·10 ⁻⁴	0,268
H ₃ BO ₃	3,83·10 ⁻⁴	0,080

SrCl ₂	8,20·10 ⁻⁵	0,052
-------------------	-----------------------	-------

2.2 CAMPIONI

I metodi analitici sono stati applicati allo studio della distribuzione del Fe_d, della sua speciazione chimica e dell'identificazione dei ligandi organici a campioni di acqua di mare raccolti nel corso di diversi progetti finanziati dal Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA) nel Mare di Ross.

In particolare sono stati impiegati campioni prelevati nel corso delle attività dei progetti CELEBeR (*CDW Effects on gLacial mElting and on Bulk of Fe in the mEastern Ross sea*), P-ROSE (*Plankton biodiversity and functioning of the Ross Sea ecosystems in a changing Southern Ocean*), ed ESTRO (*Effect of the eaSTern inflow of water on the ROss Sea salinity field variability*).

Il campionamento dei progetti CELEBeR e P-ROSE è stato effettuato a bordo della R.V. Italica durante la campagna oceanografica della XXXII spedizione del Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA), svoltasi tra gennaio e febbraio 2017.

L'obiettivo generale del progetto è l'incremento delle conoscenze riguardo al ciclo del ferro nel Mare di Ross e su come il cambiamento climatico potrebbe influenzare le sue sorgenti e la sua speciazione con conseguenze sul ciclo del carbonio.

Il campionamento di CELEBeR ha interessato tre zone dell'area occidentale: l'area antistante il ghiacciaio Drygalski e la vicina polynya di Baia Terra Nova, l'area prossima ai ghiacciai Marine e Aviator e l'area in prossimità di Cape Adare (*Figura 2.4*).

Il campionamento del progetto P-ROSE ha interessato una zona comune al progetto CELEBeR (polynya di Baia Terra Nova) e un'area nel settore centrale del Mare di Ross, campionata in 12 punti in direzione sud-nord lungo la longitudine 175° W (*Figura 2.4*).

L'attività di ricerca in questione mirava a identificare segnali e/o pattern di risposta del comparto planctonico rispetto ai cambiamenti climatici in atto.

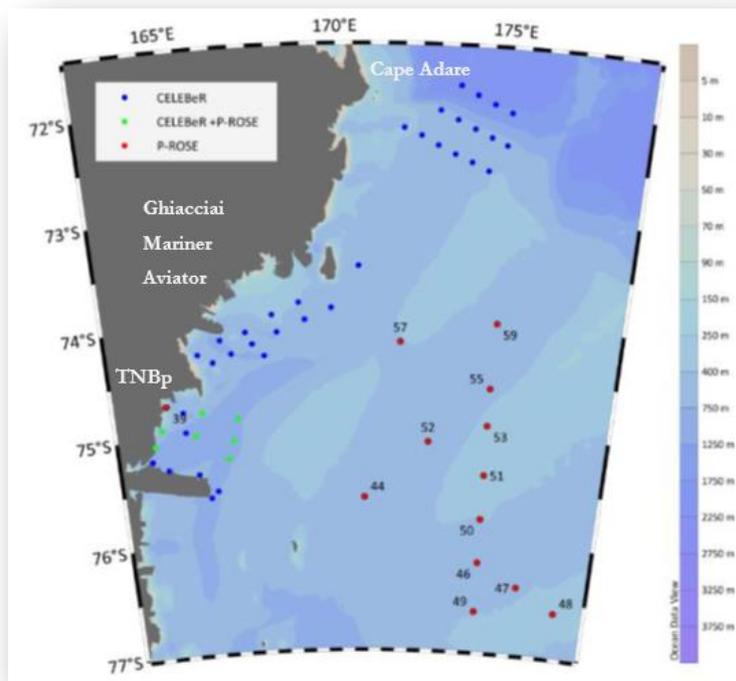


Figura 2.4 – Mappa delle stazioni campionate nell’ambito dei progetti CELEBeR e P-ROSE

Infine, per quanto riguarda il progetto ESTRO, i campioni di acqua di mare sono stati raccolti a bordo del R.V. Laura Bassi nel Mare di Ross durante la campagna oceanografica della XXXV spedizione PNRA nell’estate australe 2020. L’obiettivo principale del progetto ESTRO era la caratterizzazione delle masse d’acqua e della dinamica del settore orientale del Mare di Ross, fino ad allora poco conosciuto, attraverso l’acquisizione di un dataset completo e sinottico di misure fisiche e chimiche.

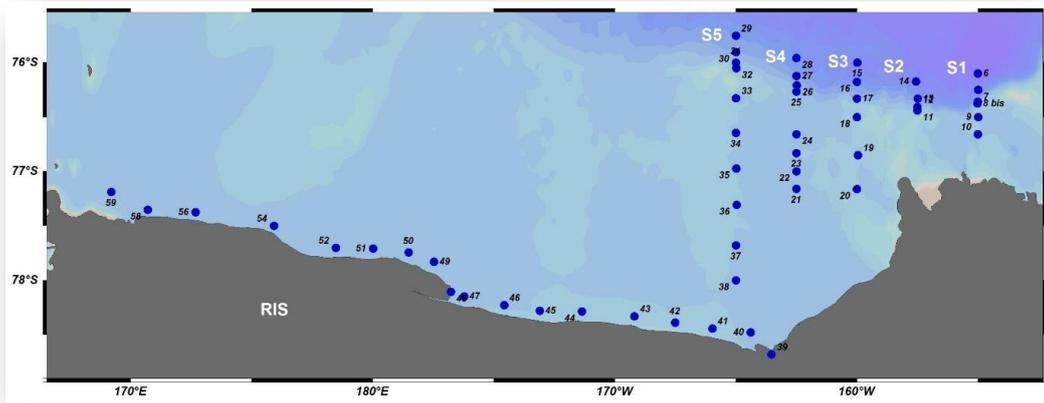


Figura 2.5 – Stazioni di campionamento del progetto ESTRO. S1: stazioni 6-10; Stazioni S2 11-14; S3: stazioni 15-20; S4: stazioni 21-28; S5: stazioni 29-38; RIS: stazioni 39-59

La crociera ESTRO ha coperto la regione della piattaforma e l'area del versante orientale del Mare di Ross. Le 50 stazioni campionate sono state mappate in 5 transetti nel settore orientale e un transetto lungo il RIS (Figura 2.5).

I campioni di acqua di mare per l'analisi del ferro sono stati raccolti a profondità specifiche da una bottiglia GO-FLO da 5 L rivestita in teflon e sigillata utilizzando cloruro di polivinile. La bottiglia GO-FLO è stata ricoperta con sacchetti di plastica dopo ogni stazione per ridurre al minimo la contaminazione. L'acqua di mare è stata trasferita in bottiglie di polietilene a bassa densità da 2 L pulite con acido e filtrata attraverso membrane in policarbonato (PC) con pori da 0,40 e 0,20 μm . Successivamente un'aliquota di 200 mL è stata raccolta e congelata a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per la determinazione del Fe_d e l'analisi di speciazione del Fe.

Inoltre sono stati acquisiti dati di temperatura, ossigeno disciolto, salinità e fluorescenza attraverso la sonda CTD (*Conductivity Temperature Depth*) e tramite bottiglie Niskin sono stati effettuati prelievi di campioni di acqua a diverse quote tra la superficie e il fondo per la determinazione di diversi parametri chimici (ossigeno disciolto, pH e alcalinità totale, nutrienti) e biologici (composizione in specie del fitoplancton, pigmenti algali, abbondanza virale, principali gruppi procariotici, batteri eterotrofi aerobi coltivabili). Tutti questi dati son utili per comprendere l'effetto delle variabili ambientali e biologiche sulla distribuzione del Fe_d e sulla sua speciazione.

2.3 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

2.3.1 Determinazione del Fe_d totale tramite coprecipitazione con $Mg(OH)_2$

Il metodo [36] è stato applicato ad alcuni campioni prelevati nell'ambito del progetto ESTRO suddivisi in base al tipo di massa d'acqua. Questo metodo prevede una fase di preconcentrazione e rimozione della matrice, seguita da analisi ICP-MS con cella di reazione dinamica.

Nello specifico, il trattamento del campione si basa sulla coprecipitazione degli analiti con $Mg(OH)_2$, conseguente all'aggiunta di una piccola quantità di soluzione di ammoniaca, seguita da centrifugazione, rimozione del surnatante e ridissoluzione del precipitato con HNO_3 diluito. La soluzione così ottenuta viene analizzata tramite ICP-MS, impiegando NH_3 come gas di reazione per la riduzione delle interferenze poliatomiche dovute alla matrice residua, al solvente e al gas del plasma.

Nello specifico, in una provetta da 85 mL, la cui pulizia è stata preventivamente testata con analisi ICP-MS utilizzando una soluzione di HNO_3 u.p. all'1%, si pesano su bilancia tecnica $50,0 \pm 0,5$ g di campione. In seguito, si aggiungono 500 μ L di soluzione di ammoniaca e si attende per 1,5 minuti senza agitare. Si osserva la comparsa di uno strato biancastro dovuta alla coprecipitazione degli analiti (*Figura 2.6*).



Figura 2.6 – Campione immediatamente dopo l'aggiunta della soluzione di ammoniaca

Successivamente, si agita la soluzione per tre volte e la si lascia riposare per 3 minuti quindi, il campione viene centrifugato a 3000 rpm per 3 minuti. Al termine della centrifugazione si ha la deposizione del precipitato sul fondo della provetta (*Figura 2.7*) e si procede con la rimozione

del surnatante con l'ausilio di una micropipetta fino a raggiungere un piccolo volume (~ 5 mL).

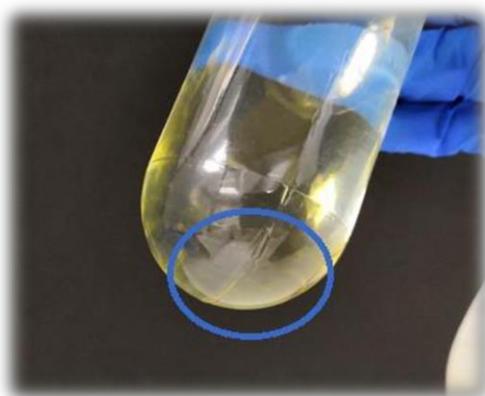


Figura 2.7 – Deposizione precipitato dopo la centrifugazione

A questo punto si ripete la centrifugazione e si procede con la rimozione della soluzione surnatante rimanente, facendo attenzione a non aspirare il precipitato.

Infine, il precipitato è ridisciolto in 5 mL di HNO₃ u.p. all'1%.

2.3.2 Determinazione voltammetrica del Fe_d totale previa digestione UV della sostanza organica

Su alcuni campioni prelevati nell'ambito del progetto CELEBeR sono state eseguite misure di Fe_d totale impiegando come tecnica analitica la voltammetria.

Il metodo, elaborato sulla base delle condizioni impiegate sia da [16] sia [13], consiste nel trattamento del campione con radiazioni UV per degradare la sostanza organica, seguito da analisi voltammetrica impiegando il 2,3-diidrossinaftalene (DHN) come ligando artificiale.

In dettaglio, si trasferiscono 25 mL di campione all'interno di una provetta in quarzo da 30 mL, che viene chiusa ermeticamente e sottoposta a digestione per un'ora (*Figura 2.8*).

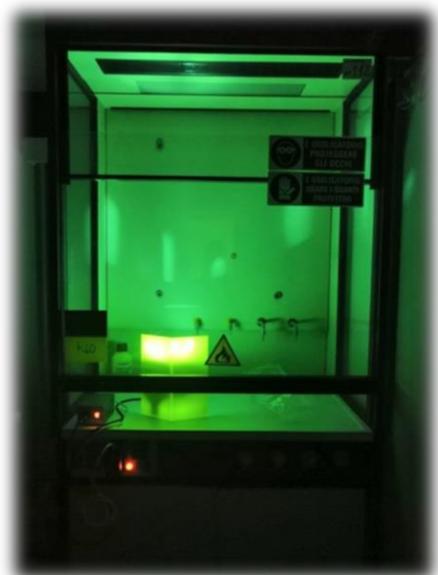


Figura 2.8 – Digestore UV in funzione

Al termine, si estrae la provetta dal digestore UV [61] e si lascia raffreddare fino a temperatura ambiente. In seguito, si trasferiscono in una cella in teflon, precedentemente lavata tre volte con acqua MilliQ, 10 mL di campione digerito e si aggiungono 100 μ L di DHN.

Nell'eventualità in cui fosse necessario ripetere l'analisi, si trasferiscono altri 10 mL in una provetta da 15 mL, precedentemente lavata con 6 mL di HNO_3 allo 0,05%, e si aggiungono 100 μ L di DHN. I restanti 5 mL hanno il semplice scopo di rendere più agevole il trasferimento di campione con la micropipetta dalla provetta alla cella.

I campioni vengono dunque lasciati equilibrare in cella in frigorifero a +4 °C fino al giorno successivo.

2.3.3 Determinazione della speciazione del Fe mediante CLE-AdSV

I metodi CLE-AdSV per gli studi di speciazione del Fe si basano sull'aggiunta al campione di un legante elettroattivo (AL) che compete con i leganti naturalmente presenti (L) in esso e nella successiva misura voltammetrica del complesso formato tra il ferro e il legante aggiunto. La sua concentrazione dipenderà dalla concentrazione dei leganti naturali L e dalla stabilità del complesso FeL rispetto a quella del complesso FeAL.

Si trasferiscono 50 mL di campione in una provetta da 50 mL, si aggiungono 250 μ L di DHN 0,1 mM e si lascia equilibrare per 15 minuti.

In 7 provette da 15 mL risciacquate con HNO_3 0,05% si aggiungono in sequenza 0-60-120-180 μ L della soluzione standard di Fe(III) 60 nM e 120-180-240 μ L della soluzione standard di Fe(III) 240 nM.

Successivamente, si aggiungono in ogni provetta 7 mL della miscela campione/legante, si agita con movimento rotatorio facendo attenzione a non porre la soluzione in contatto con il tappo della provetta e si lascia equilibrare una notte a temperatura ambiente (*Figura 2.9*).

Al momento dell'analisi, le soluzioni equilibrate vengono trasferite dalla concentrazione più bassa alla più elevata nella cella di lavoro e, ad ogni aliquota, si aggiungono 300 μL di tampone HEPPS. La cella non viene risciacquata nel corso della titolazione al fine di mantenerne il condizionamento.

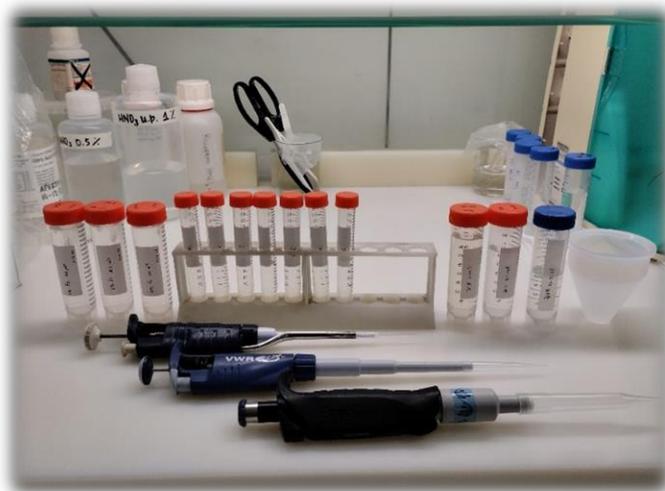


Figura 2.9 – Preparazione del campione per determinare la speciazione del Fe

2.3.4 Identificazione dei ligandi organici a basso peso molecolare tramite SPE

Lo sviluppo del metodo HPLC-ESI-MS/MS prevede l'uso di acqua di mare artificiale (ASW) addizionata con standard di siderofori, nello specifico un derivato della stafiloferrina A e feriossamina E, a concentrazioni simili a quelle presenti nei campioni reali (~ 20 ppb), a partire da $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ di soluzioni madre.

La procedura di preparazione del campione consiste nell'acidificare 200 mL di acqua di mare con HCl s.p. fino a $\text{pH}\sim 2$, si aggiungono 4 mL degli standard di siderofori, si agita e si procede con l'estrazione in fase solida (SPE) con cartucce C18 da 500 mg.

Il procedimento di estrazione si articola in cinque fasi (*Figura 2.10*):

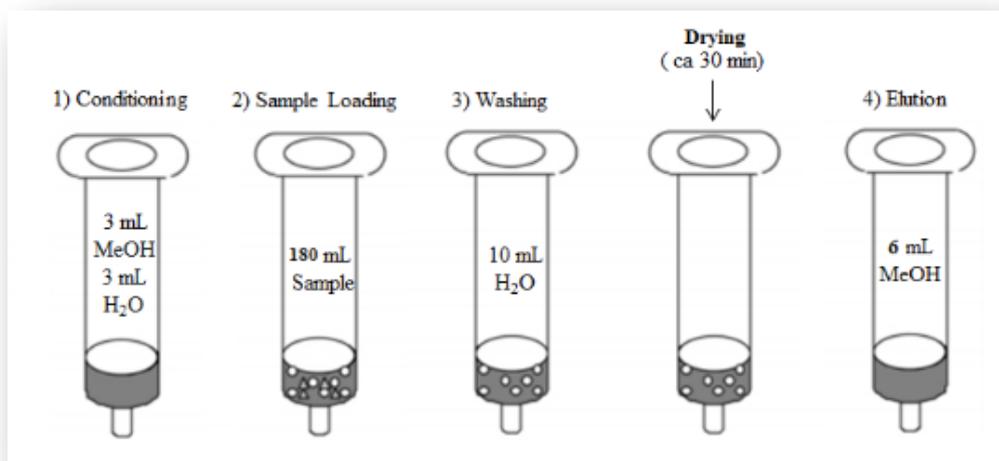


Figura 2.10 – Sequenza di estrazione dei ligandi organici a basso peso molecolare del Fe con colonnina SPE

1. *Condizionamento*

Si caricano, in successione, nella cartuccia 3 mL di metanolo e 3 mL di acqua MilliQ acidificata (pH~2).

2. *Caricamento del campione*

Si caricano 180 mL di campione. È necessario mantenere un flusso del campione molto lento per permettere agli analiti di legarsi con maggior efficacia alla fase stazionaria.

3. *Lavaggio*

Si caricano 10 mL di acqua MilliQ acidificata (pH~2). Questo passaggio è necessario per eliminare le specie interferenti e i sali che andrebbero ad interferire nella misura allo spettrometro di massa. Successivamente la cartuccia viene portata a secco per 30 minuti.

4. *Eluizione*

Si utilizzano 6 mL di metanolo, prestando attenzione a mantenere un flusso lento, in modo da garantire un maggior recupero.

Si riduce il volume dell'eluato ottenuto mediante un flusso di N₂, trasferendolo in vials in vetro di volume via via decrescente, fino a portare quasi a secco. Si aggiungono 100 µL di metanolo per recuperare l'aliquota di campione, si agita e si trasferisce all'interno di un microvial da 250 µL la quale, a sua volta, viene posta all'interno di un ulteriore vial in vetro ambrato da 1,5 mL (Figura 2.11). Il campione viene conservato in freezer a -20 °C fino al momento dell'analisi.



Figura 2.11 – Preparazione del campione per l'identificazione dei ligandi organici

Prima dell'analisi, il campione viene portato a secco mediante flusso di N_2 e successivamente ripreso in 60 μL di una soluzione di acido formico allo 0,1% (v/v) in acqua, per la determinazione dei siderofori.

2.4 STRUMENTAZIONE

2.4.1 ICP-MS

Per determinare il contenuto di Fe_d totale nei campioni di acqua di mare è stata utilizzata come tecnica analitica strumentale la spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS). L'ICP-MS è la tecnica d'eccellenza per analisi elementari, consente determinazioni multielementari e isotopiche con elevata precisione, accuratezza e bassi limiti di rilevabilità (inferiori al $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$). Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato lo strumento ELAN DRC II PerkinElmer-Sciex (Concord, Ontario, Canada) (Figura 2.12), le cui caratteristiche principali e i parametri operativi sono riassunti in *tabella 2.2*.



Figura 2.12 – ICP-MS ELAN DRC II PerkinElmer-Sciex utilizzato per la determinazione del Fe_d totale

Lo strumento è costituito da sei principali unità: il sistema d'introduzione del campione, la sorgente, l'interfaccia, l'ottica ionica, l'analizzatore di massa e il rivelatore (Figura 2.13).

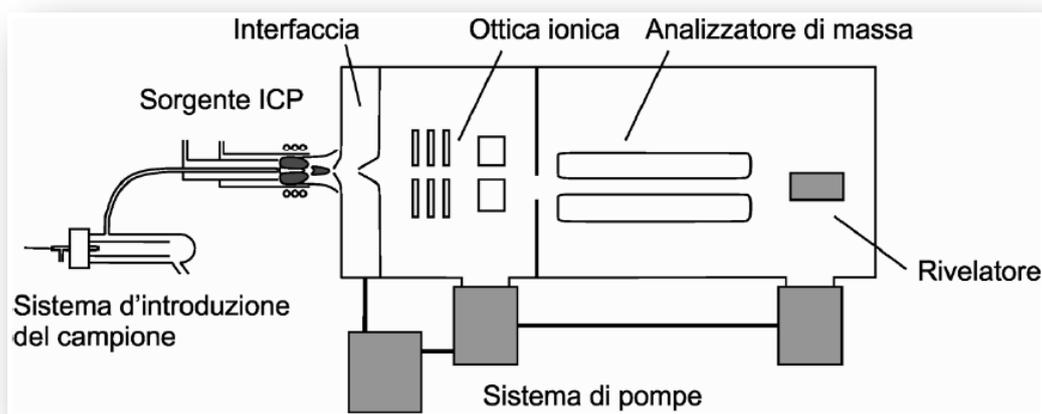


Figura 2.13 – Schema di uno spettrometro di massa con sorgente ICP

La sorgente a plasma accoppiato induttivamente (ICP) genera gli ioni atomici del campione, i quali, attraversando l'interfaccia, vengono condotti all'interno dello spettrometro di massa (MS). In questo sito gli ioni vengono, in primo luogo, collimati da opportune lenti che costituiscono l'ottica ionica, e successivamente selezionati da un analizzatore di massa in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z) per poi essere rivelati da un apposito rivelatore, dispositivo che, all'arrivo di un fascio di ioni, fornisce un segnale elettrico proporzionale alla loro quantità che viene in seguito amplificato e registrato.

Tabella 2.2 – Condizioni operative ICP-MS

Sistema di introduzione del campione	
Nebulizzatore	Micronebulizzatore PFA-ST
Camera di nebulizzazione	Camera ciclonica a piccolo volume (20 mL)
Flusso di gas nebulizzatore	1,00 L·min ⁻¹
Flusso di aspirazione del campione	100 µL·min ⁻¹
Sorgente a plasma	
Potenza RF	1500 W
Flusso di gas principale	14,5 L·min ⁻¹
Flusso di gas ausiliario	1,65 L·min ⁻¹
Interfaccia	
Cono <i>sampler</i>	Platino; 1,1 mm
Cono <i>skimmer</i>	Platino; 0,9 mm
Cella di reazione	
Tipo di cella	Cella di reazione dinamica (DRC)
Flusso gas di reazione (NH ₃)	0,6 mL·min ⁻¹
Analizzatore di massa	
Tipo di analizzatore	Quadrupolo
Rivelatore	
Tipo di rivelatore	“Dual-stage” a dinodo discreto
<i>Analog stage voltage</i>	-2300 V
<i>Pulse stage voltage</i>	1400 V
Acquisizione del segnale	
Modalità di acquisizione	“Peak-hopping”
<i>Sweeps</i>	50
<i>Dwell time</i>	100 ms
Repliche	10
Ioni misurati	⁵² Cr ⁺ , ⁵⁴ Fe ⁺

2.4.2 CLE-AdSV

Le misure voltammetriche per determinare il Fe disciolto e la sua speciazione sono state effettuate con lo strumento “884 Professional VA” (Metrohm AG, Svizzera) (Figura 2.14).



Figura 2.14 – Sistema voltammetrico per la determinazione della speciazione del Fe

Esso è dotato di una cella elettrochimica in cui sono alloggiati tre elettrodi:

- 1) elettrodo di lavoro a goccia pendente di mercurio (HMDE) sulla cui superficie avviene la semi-reazione che coinvolge l'analita;
- 2) elettrodo di riferimento ad argento/cloruro di argento per la regolazione del potenziale applicato, utilizzando come elettrolita una soluzione di cloruro di potassio (KCl) 3 M (Supelco[®], Germania);
- 3) elettrodo ausiliario (controelettrodo) in platino.

Gli elettrodi sono posizionati in una cella contenente il campione, nella quale sono presenti anche un sistema di degasaggio mediante gorgogliamento di azoto, al fine di rimuovere l'ossigeno disciolto in quanto potenziale causa di interferenza strumentale ed un sistema di agitazione meccanica.

Per verificare la risposta strumentale prima di effettuare l'analisi dei campioni e, al termine di esse o della trincea di campioni, viene effettuato il lavaggio degli elettrodi. Questo metodo elimina eventuali residui e impurezze presenti sugli elettrodi. A livello operativo viene impiegata una cella in quarzo riempita con alcuni mL di acqua MilliQ e 25 μ L di HNO₃ ultrapuro concentrato.

Per quanto concerne le analisi dei campioni sono state utilizzate, invece, delle celle in Teflon®. Una volta terminate le analisi ogni cella è riposta all'interno di un contenitore in polipropilene contenente acqua MilliQ e HNO₃ 0,5% e prima del successivo utilizzo viene lavata con acqua MilliQ.

L'uso del teflon come materiale delle celle per l'analisi dei campioni è dovuto alla capacità del quarzo di adsorbire sulla superficie il ferro e altri metalli con conseguente possibile sottostima dei risultati (fenomeno da evitare data l'esigua concentrazione degli analiti studiati). Tale sottostima non è rilevante per i lavaggi dato che lo scopo è la pulizia degli elettrodi e non una determinazione.

Di seguito, nella *tabella 2.3* e *tabella 2.4*, sono mostrate le condizioni operative adattate in base al metodo impiegato.

Tabella 2.3 – Parametri operativi per determinare il Fe_a totale con DHN

Parametro	Valore
Tempo di degasaggio con N ₂	300 s
Potenziale di adsorbimento	-0,1 V
Tempo di adsorbimento	30 s
Velocità di rotazione dell'agitatore	2400 rpm
Tempo di equilibrio	8 s
Potenziale applicato	da -0,35 V a -0,75 V
Tipo di scansione	Corrente diretta ("sampled-DC")
Dimensioni della goccia	8
Ampiezza dell'impulso	0,05 V
Tempo dell'impulso	0,03 s
<i>Potential step</i>	0,004 V
<i>Potential step time</i>	0,1 s
Velocità di scansione	0,04 V/s
Repliche	5

Tabella 2.4 – Parametri operativi per determinare la speciazione del Fe con DHN

Parametro	Valore
Tempo di degasaggio con N ₂	300 s

Potenziale di adsorbimento	-0,1 V
Tempo di adsorbimento	60 s
Velocità di rotazione dell'agitatore	2000 rpm
Tempo di equilibrio	8 s
Potenziale applicato	da -0,35 V a -0,75 V
Tipo di scansione	Corrente diretta ("sampled-DC")
Dimensioni della goccia	4
Ampiezza dell'impulso	0,05 V
Tempo dell'impulso	0,03 s
<i>Potential step</i>	0,004 V
<i>Potential step time</i>	0,1 s
Velocità di scansione	0,04 V/s
Repliche	5

Come interfaccia tra lo strumento e l'operatore viene utilizzato il software VIVA, messo a disposizione dalla stessa ditta di produzione dello strumento. Il software è studiato appositamente per analisi voltammetriche, permette di caricare e modificare i metodi voltammetrici secondo l'esigenza dell'operatore seguendo dei diagrammi di cui in *figura 2.15* è riportato un esempio.

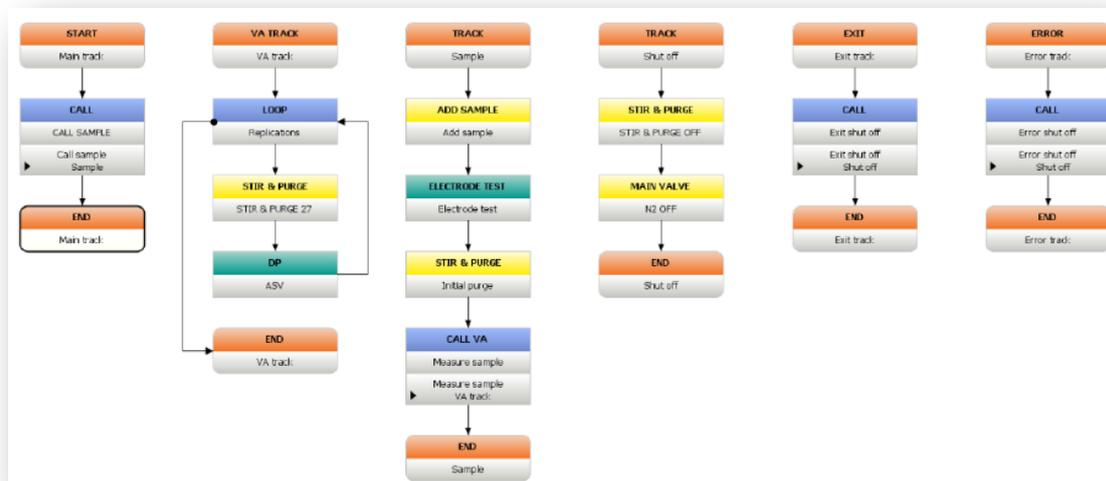


Figura 2.15 – Diagramma del metodo del software VIVA

2.4.3 HPLC-ESI-MS/MS

Per l'identificazione dei ligandi organici nei campioni è stata impiegata la tecnica micro HPLC-ESI-MS/MS, utilizzando un HPLC serie 1100 Agilent Technologies (Santa Clara, California, USA), dotato di autocampionatore e uno spettrometro di massa LC/MSD trap XCT della medesima società che sfrutta come analizzatore di massa una trappola ionica ad alta capacità (Figura 2.16). Le misure sono state effettuate presso i laboratori del CEBR dell'Università di Genova in collaborazione con il gruppo di ricerca di biochimica strutturale e cellulare.

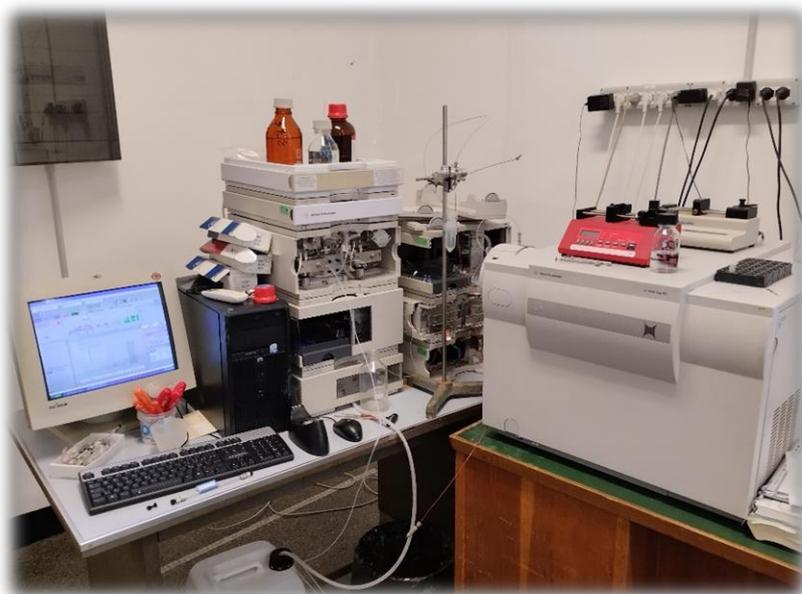


Figura 2.16 – Micro HPLC-ESI-MS/MS utilizzato per l'identificazione dei ligandi organici

Il sistema cromatografico per la separazione degli analiti impiegato è una colonna Phenomenex Jupiter 5 μm C18 300 \AA 150x1 mm (Torrance, California USA). La fase mobile è composta dalla soluzione A di acido formico allo 0,1% (v/v) in acqua e dalla soluzione B di acido formico allo 0,05% (v/v) in acetonitrile. Le condizioni operative utilizzate sono riportate nella *tabella 2.5*.

Tabella 2.5 – Condizioni operative del sistema cromatografico

Parametro	Valore
Volume iniettato	8 μL
Flusso	50 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
Temperatura della colonna	30 $^{\circ}\text{C}$

L'eluizione a gradiente è stata effettuata secondo il programma descritto nella *tabella 2.6*.

Tabella 2.6 – Condizioni operative della sorgente ionica

Tempo (min)	Soluzione A (%)	Soluzione B (%)
0	97	3
5	97	3
30	0	100
33	0	100
33,01	97	3

Il sistema cromatografico è dotato di un rivelatore UV a diode array (DAD). Le lunghezze d'onda utilizzate durante l'analisi sono le seguenti: 220-280-320-450-650 nm.

L'HPLC è interfacciato direttamente con lo spettrometro di massa mediante sorgente ESI. I parametri di tale sorgente ionica sono descritti nella *tabella 2.7*.

Tabella 2.7 – Condizioni operative della sorgente ionica

Parametro	Valore
Temperatura	360 °C
Flusso del gas di nebulizzazione	8,0 L·min ⁻¹
Pressione del gas di nebulizzazione	20 psi
Voltaggio capillare	-3800 V
Voltaggio end plate	-500 V

La scansione delle masse è stata effettuata in un intervallo da 100 a 1500 m/z operando in modalità a ionizzazione positiva.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 DETERMINAZIONE DEL Fe_d E DELLA SUA SPECIAZIONE CHIMICA NEL SETTORE NORDOCCIDENTALE DEL MARE DI ROSS MEDIANTE CLE-AdSV

In precedenti lavori di tesi erano stati condotti studi sulla distribuzione del Fe_d totale in tutte le zone campionate dai progetti CELEBeR e P-ROSE (polynya di Baia Terra Nova, area dei ghiacciai Mariner e Aviator, Cape Adare e area centrale della piattaforma; *cf. paragrafo 2.2*) [41][42][43].

In particolare, i dati di Fe_d riportati negli elaborati di [62] e [64] (polynya di Baia Terra Nova, area dei ghiacciai Mariner e Aviator, Cape Adare) erano stati ottenuti mediante il metodo di coprecipitazione con $Mg(OH)_2$ e determinazione mediante ICP-MS, mentre [63] riportava dati di Fe_d nella zona centrale del Mare di Ross mediante tecnica voltammetrica, previa degradazione della sostanza organica con UV.

Per quanto riguarda invece la speciazione chimica del Fe_d mediante CLE-AdSV, non erano stati esaminati i campioni prelevati nella zona più nordoccidentale del Mare di Ross, ovvero l'area antistante Cape Adare. Questa parte del lavoro di tesi permette quindi di colmare questa lacuna e di poter effettuare dei confronti delle altre zone più costiere e maggiormente produttive per quanto riguarda l'attività biologica.

Inoltre, avendo a disposizione per alcuni campioni volumi maggiori di quelli richiesti dall'analisi di speciazione si è deciso di analizzare il Fe_d mediante il metodo voltammetrico previa degradazione della sostanza organica mediante UV per un confronto con i valori precedentemente acquisiti mediante il metodo di coprecipitazione con $Mg(OH)_2$ e ICP-MS e per valutare la possibile determinazione del Fe_d totale e della sua speciazione con la sola tecnica voltammetrica.

3.1.1 Determinazione del Fe_d totale mediante CLE-AdSV

I campioni disponibili in laboratorio per l'analisi tramite CLE-AdSV del Fe_d totale erano 5, prelevati nell'area di Cape Adare e conservati a +4 °C dal momento delle precedenti analisi effettuate nel 2018.

L'impiego di CLE-AdSV potrebbe rappresentare un grosso vantaggio dal punto di vista analitico, tenendo presente che è possibile utilizzare la strumentazione a bordo di una nave, se dotata di laboratori "puliti", perché consentirebbe di analizzare i campioni nel corso di una campagna oceanografica senza doverli necessariamente conservare anche per lunghi periodi. Date le basse concentrazioni di ferro attese nei campioni occorre prestare nella misura voltammetrica particolare attenzione alla presenza di residui sull'elettrodo di lavoro che potrebbero compromettere la determinazione dell'analita.

A inizio della sequenza di analisi, sia nel caso del Fe_d, sia nel caso della speciazione, occorre eseguire diverse scansioni per valutare che la risposta strumentale sia ottimale. Qualora venisse rilevata la presenza di residui sugli elettrodi è necessario lavarli con abbondante acqua MilliQ prima di ripetere l'analisi. Il metodo ottimizzato prevede un tempo di deposizione di 30 s, una velocità di agitazione pari a 2000 rpm e 4 repliche per ogni valutazione.

A titolo di esempio in *figura 3.1* sono riportati i voltammogrammi ottenuti nel caso di presenza e di assenza di residui. Si può osservare nel tracciato (a) la presenza di un picco intenso e slargato dovuto alle impurezze di Fe-DHN presenti, che scompare nel tracciato (b) grazie a ripetuti lavaggi dell'elettrodo, rendendo così possibile la misura nei campioni.

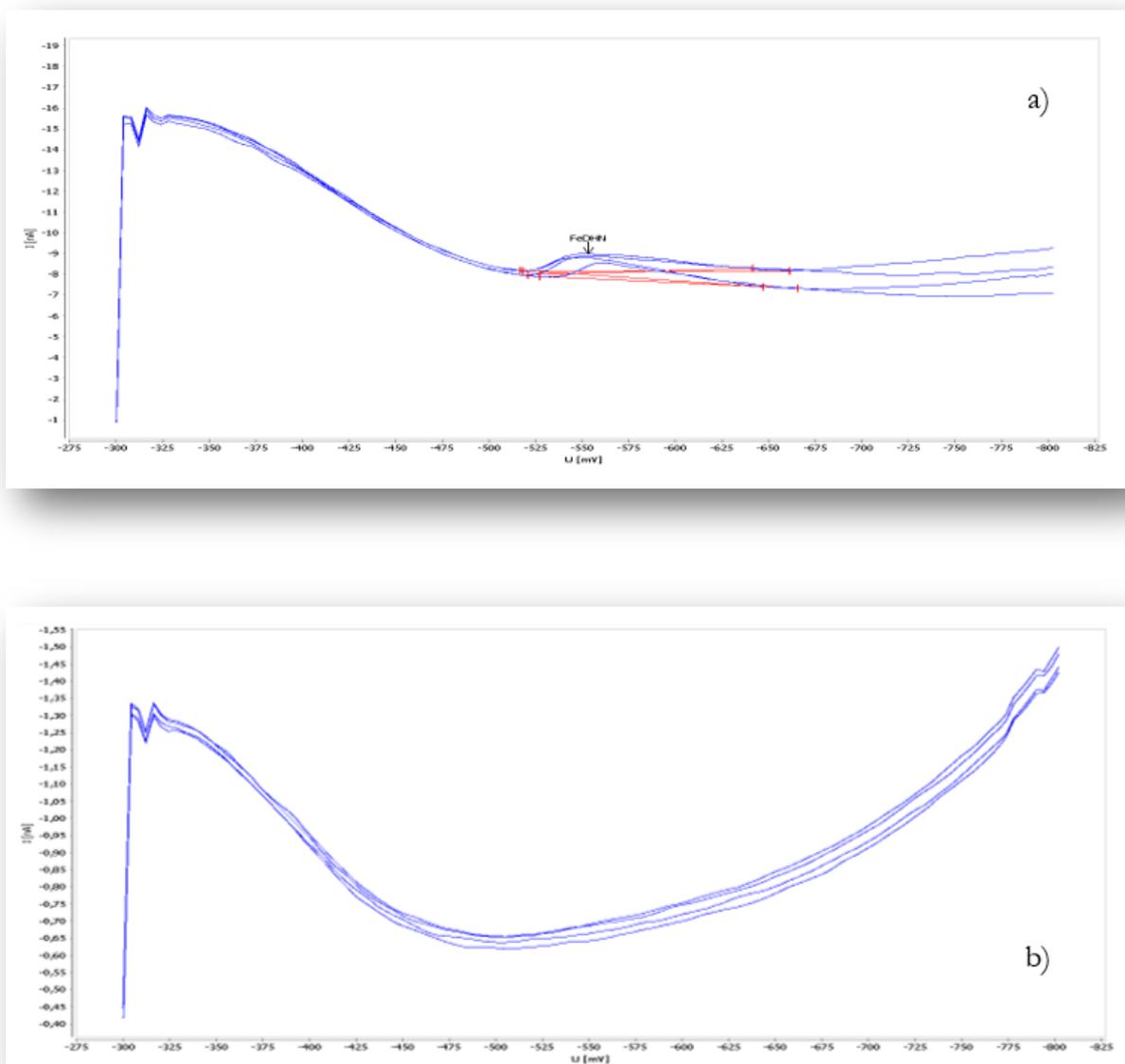
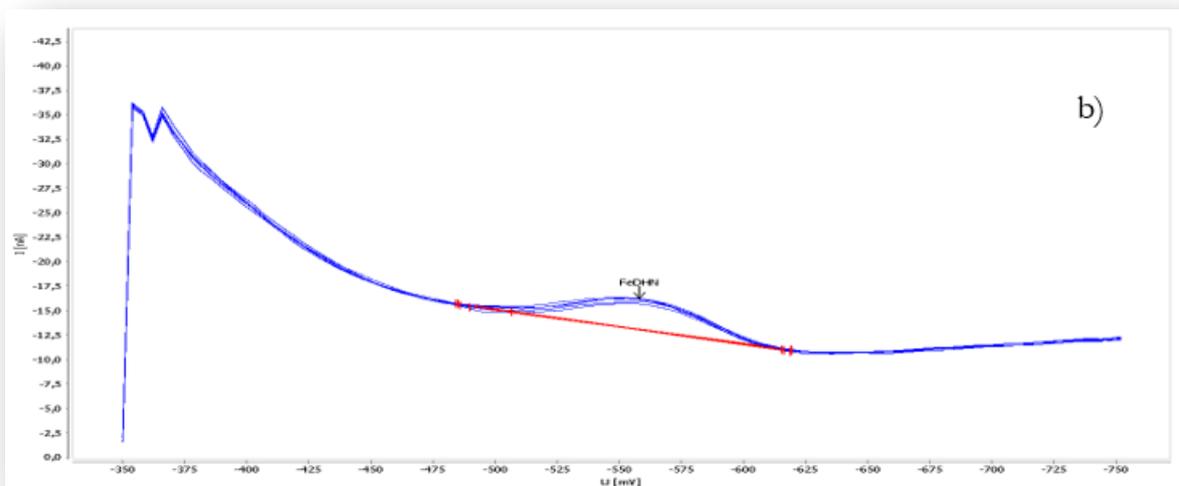
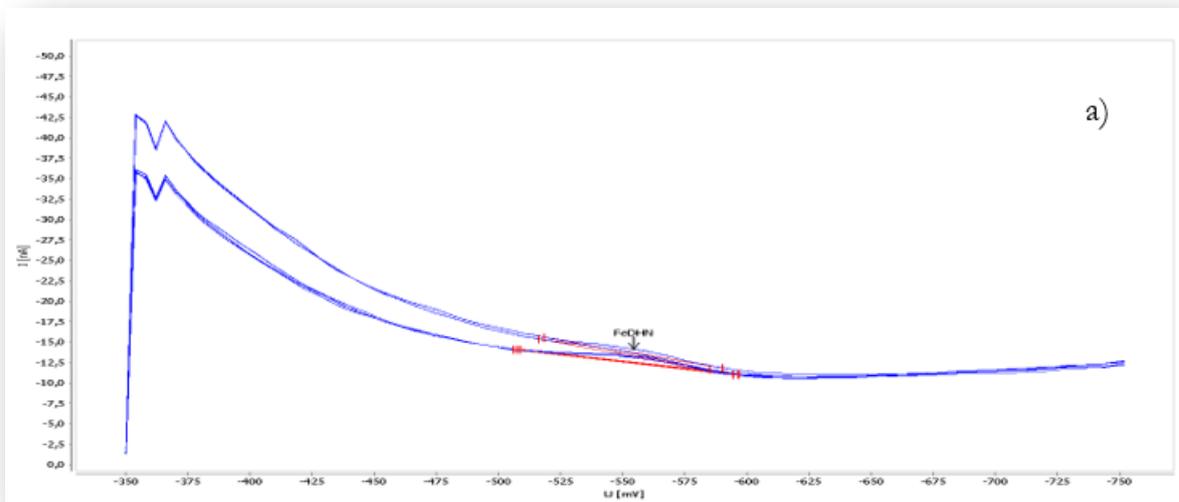


Figura 3.1 – Voltammogramma acquisito con il residuo di Fe-DHN (a) e senza impurezze (b). Sulle ascisse sono mostrati i potenziali in mV e sulle ordinate le intensità in nA.

Nel caso della determinazione del Fe_d , preparato il campione come descritto nel *paragrafo 2.3.2* e disponendo del dato di Fe_d totale ottenuto dalle precedenti analisi mediante ICP-MS, al momento dell'analisi sono addizionati 166 μL di HEPPS e opportuni volumi (50-100-150 μL) della soluzione standard di Fe(III) diluito in modo da incrementare la sua concentrazione in modo proporzionale.

I parametri strumentali sono stati impostati come segue: tempo di deposizione pari a 30 s, velocità di agitazione pari a 2400 rpm e 5 repliche per ogni analisi.

A titolo di esempio in *figura 3.2* si riportano i voltammogrammi dell'aggiunta 0 (a) e delle successive aggiunte di standard (b-d), ottenuti dall'analisi del campione Stazione 75_350 m con porosità 0,2 μm .



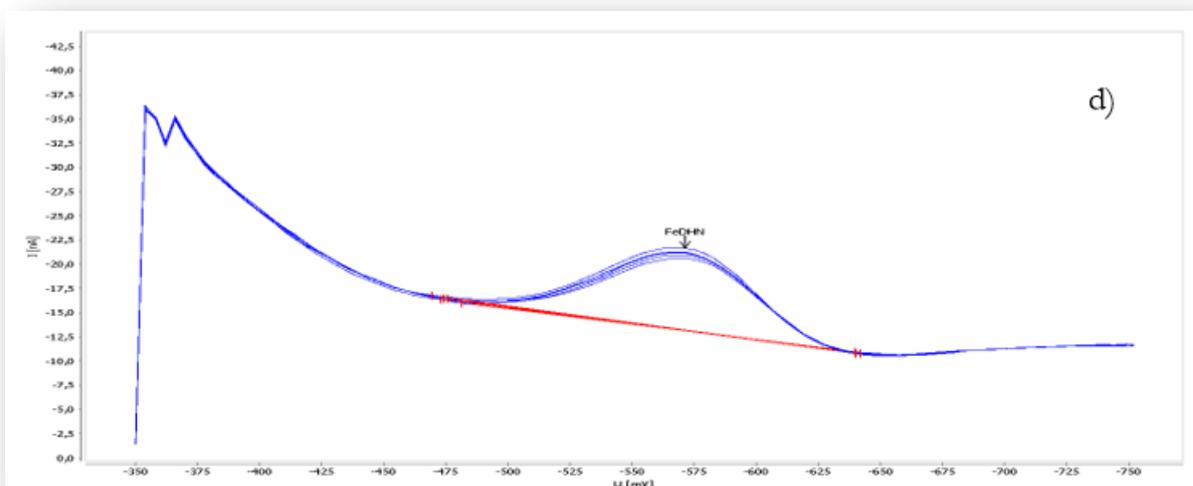
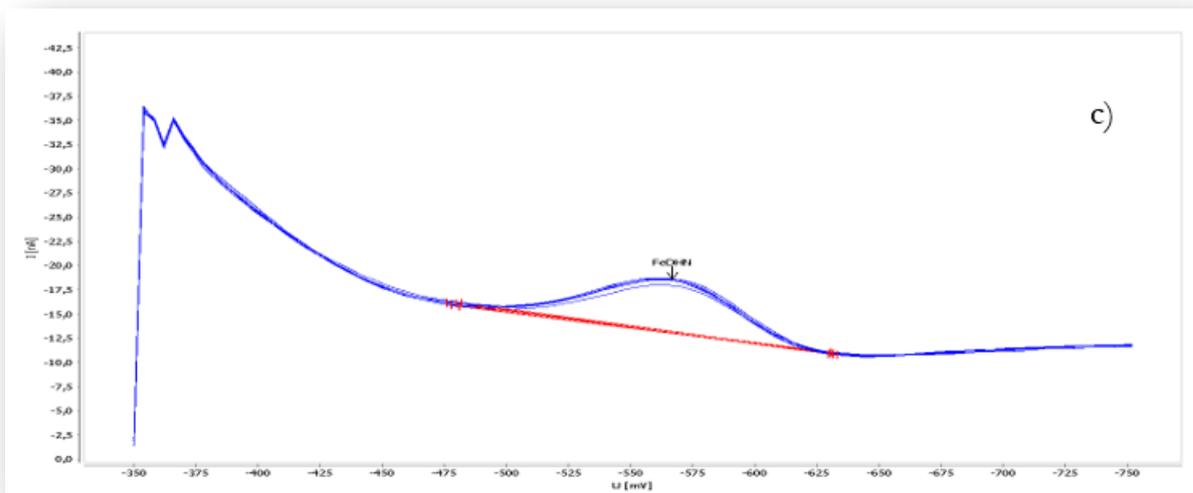


Figura 3.2 – Voltammogrammi relativi ad a) campione tal quale, b) 50 μL , c) 100 μL , d) 150 μL di standard di ferro diluito nel campione “St75_350m, filtro 0,2 μm ”. Sulle ascisse sono mostrati i potenziali in mV e sulle ordinate le intensità in nA.

L’elaborazione dei dati comprende la costruzione di una curva di titolazione da cui, tramite il rapporto tra l’intercetta e la pendenza, si ricava la concentrazione stimata di Fe_d totale nel campione (Figura 3.3).

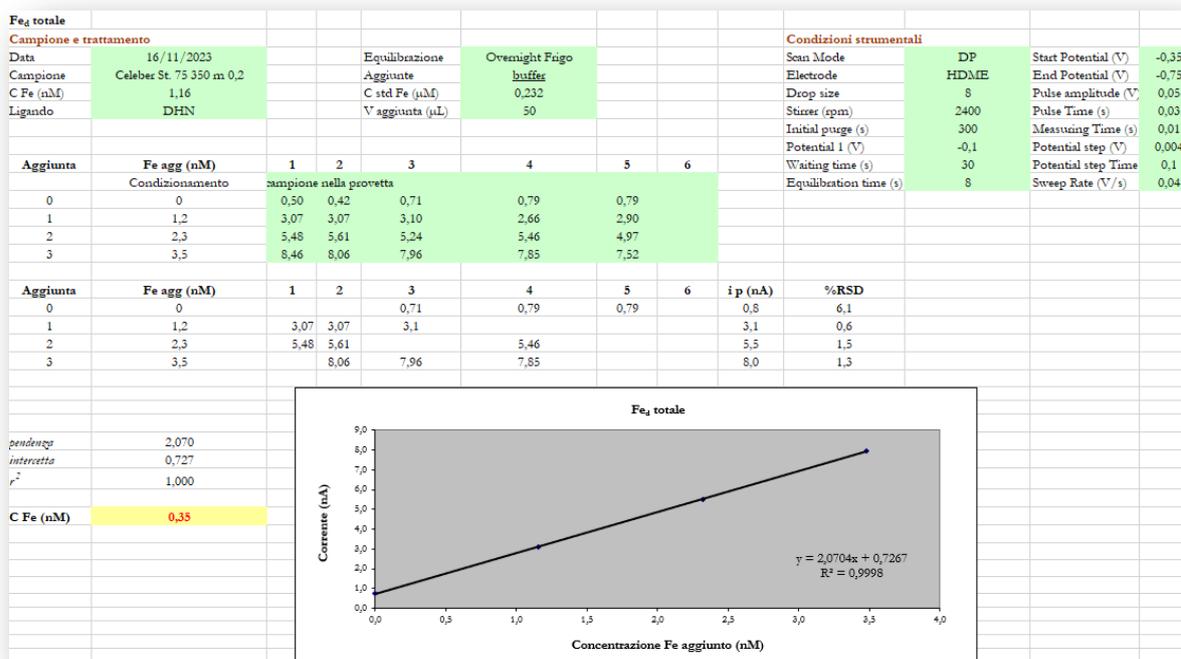


Figura 3.3 – Foglio di calcolo e relativa retta di calibrazione con annessa la concentrazione stimata di Fe_d totale nel campione St75_350m, filtro 0,2 µm

In tabella 3.1 sono riassunti i dati ottenuti da almeno due repliche dello stesso campione e i valori precedentemente determinati mediante ICP-MS.

Tabella 3.1 – Confronto tra la concentrazione di Fe_d totale determinata tramite ICP-MS e CLE-AdSV

Campioni	Profondità (m)	Fe _d totale (nM) ICP-MS	Fe _d totale (nM) CLE-AdSV
St. 73	435	1,13	0,1344 ± 0,0007
St. 74	268	0,36	0,15 ± 0,01
St. 75	350	1,16	0,31 ± 0,04
St. 76	250	0,61	0,28 ± 0,05
Mix St. 76-77	20	1,03	0,4 ± 0,3

Una considerazione generale riguarda l'ottima riproducibilità della misura voltammetrica che è possibile ottenere una volta che l'elettrodo di lavoro è stato adeguatamente pulito.

Tuttavia, confrontando i dati medi di concentrazione si osserva che i valori ottenuti con CLE-AdSV sono minori rispetto a quelli ottenuti con ICP-MS. La differenza è da imputarsi alla

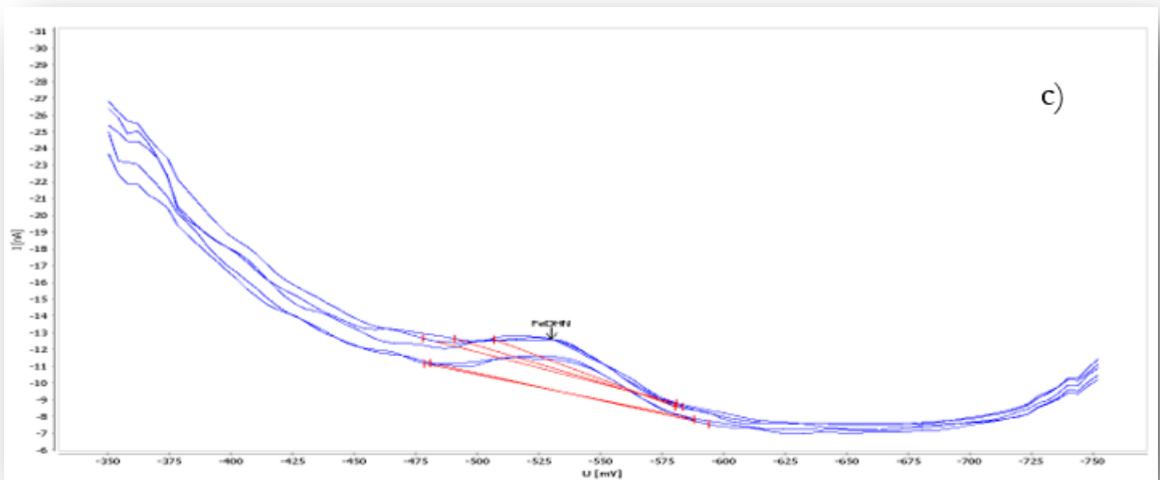
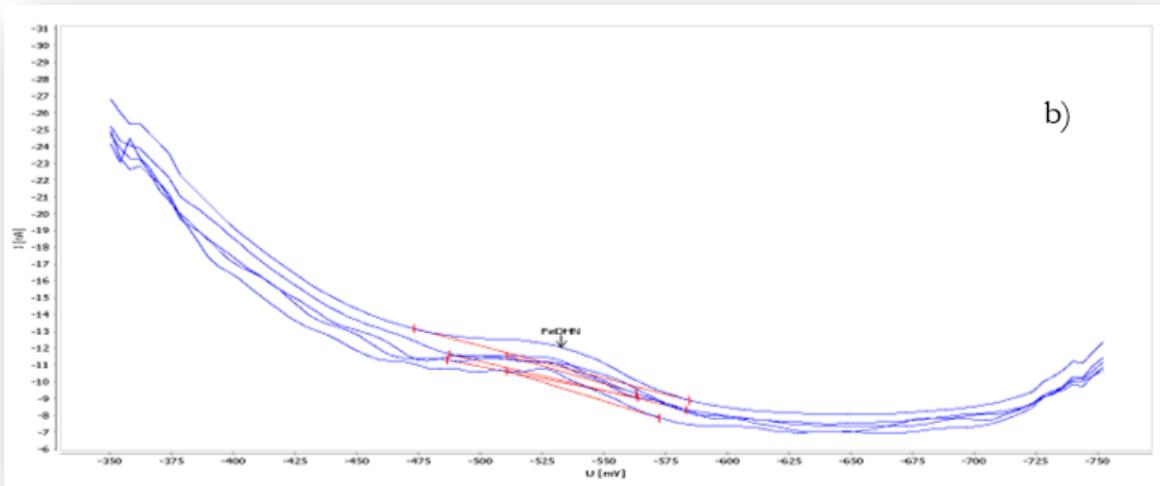
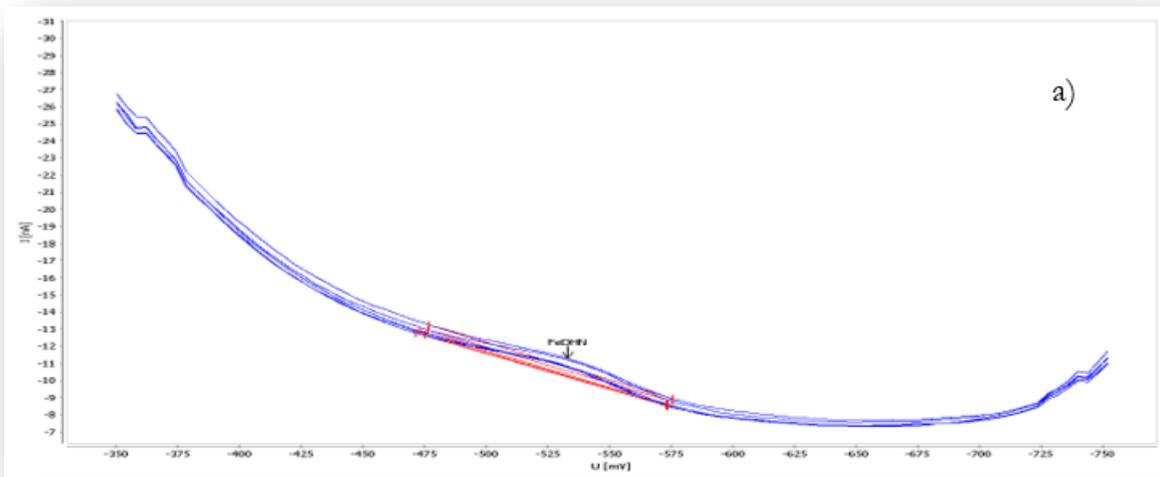
lunga conservazione del campione a +4 °C che può avere alterato la concentrazione originale del campione. In un precedente studio condotto nel gruppo di ricerca, in cui venivano applicati i due metodi all'analisi del Fe_d totale in campioni di acqua di mare antartica i dati ottenuti con CLE-AdSV risultavano sovrastimati rispetto all'impiego del metodo spettroscopico, con differenze statisticamente significative [63]. Tale studio aveva messo in evidenza oltre alla necessità di valutare un bianco procedurale o un bianco dei reattivi, anche l'impossibilità di valutare l'accuratezza del metodo voltammetrico tramite l'analisi di materiali di riferimento certificati (CRM). Il problema principale è legato al fatto che i CRM sono venduti già acidificati affinché possano conservarsi meglio nel tempo. Il metodo di preparazione del campione, tuttavia, non prevede fasi di acidificazione (*cfr. paragrafo 2.3.2*) e pertanto occorrerebbe basificare fino al pH di lavoro, impiegando un reattivo che non rientra nel procedimento analitico in esame. La valutazione del bianco sarà, indubbiamente, uno dei principali oggetti di studi futuri in modo da poter ottenere dati che siano più accurati e confrontabili.

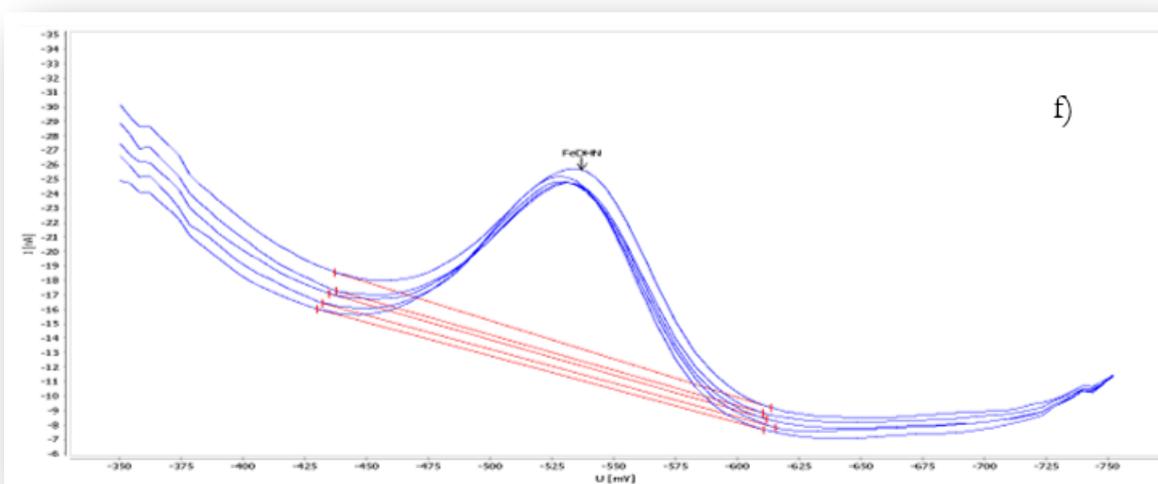
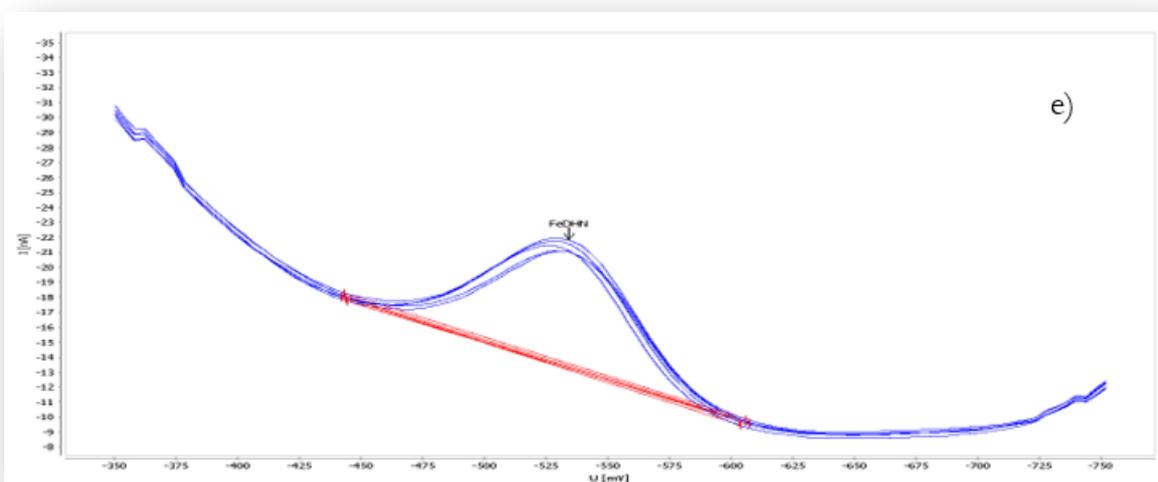
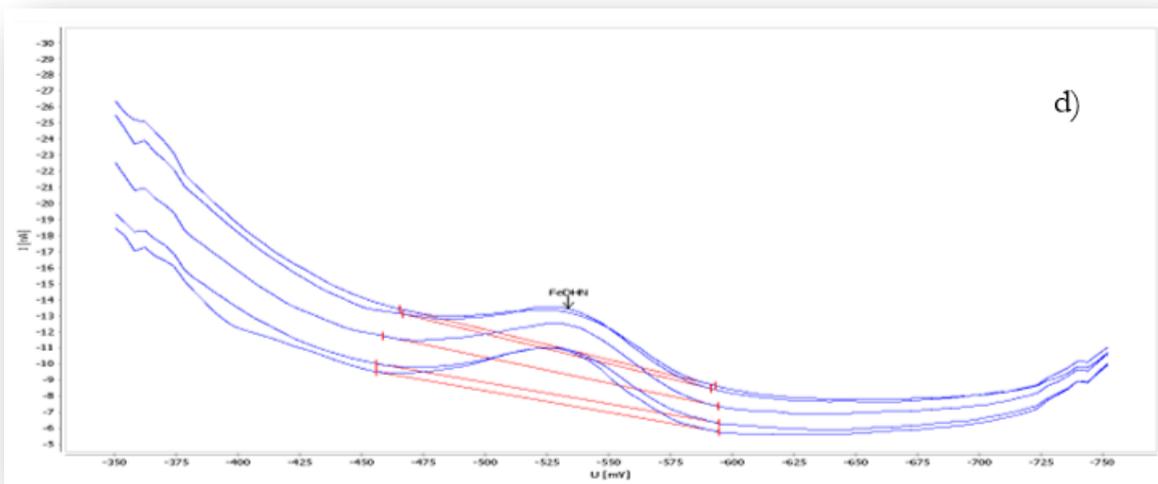
3.1.2 Determinazione della speciazione chimica del Fe_d nel settore nordoccidentale del Mare di Ross mediante CLE-AdSV

Il metodo è stato applicato a 27 campioni prelevati nella zona nordoccidentale del Mare di Ross in prossimità di Cape Adare nell'ambito delle attività del progetto CELEBeR. Inoltre, sono stati anche analizzati 2 campioni prelevati nella zona della polynya di Baia Terra Nova. Come detto nel *paragrafo 2.3.3*, la misura voltammetrica viene eseguita nelle aliquote di campione contenenti una uguale concentrazione di legante AL (DHN) e aggiunte crescenti di soluzione standard di Fe(III), dopo averle lasciate una notte a equilibrare. In questo modo si effettua una titolazione costruendo una curva di corrente in funzione della concentrazione totale di Fe (Fe_{tot}). Quest'ultimo è dato dalla somma del Fe originariamente presente nel campione (precedentemente determinato tramite ICP-MS) e del Fe aggiunto.

Al momento dell'analisi si addizionano, ad ogni aliquota, 300 µL di tampone HEPPS e si procede con la misura. Il metodo prevede un tempo di deposizione di 60 s, una velocità di agitazione pari a 2000 rpm e 5 repliche per ogni analisi.

A titolo di esempio dei segnali che vengono ottenuti dall'analisi del campione tal quale e dalle aggiunte, in *figura 3.4* sono riportati i voltammogrammi relativi alla determinazione del campione prelevato nella stazione 69 a 20 m di profondità.





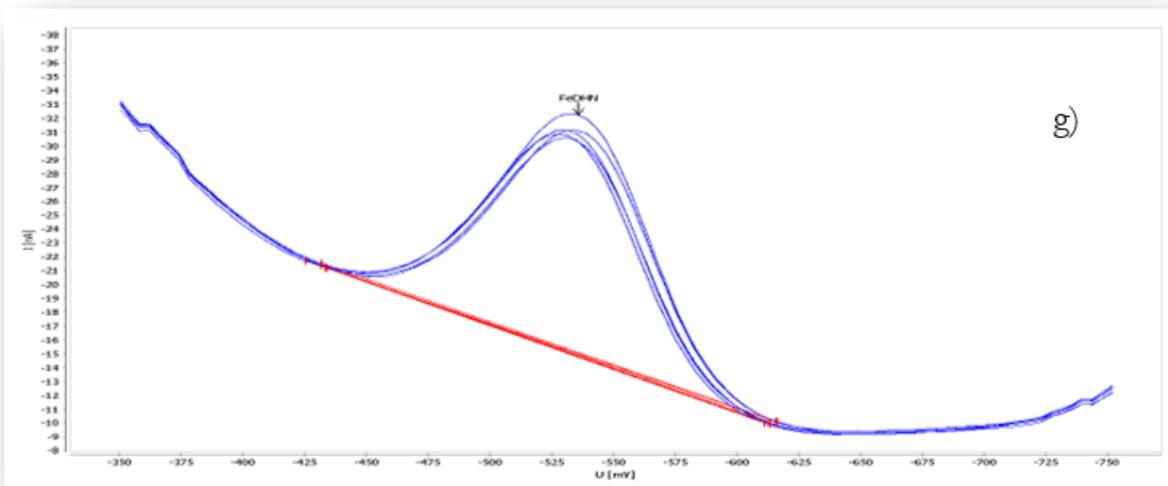


Figura 3.4 – Voltammogrammi relativi ad a) campione tal quale, b) 60 μL , c) 120 μL , d) 180 μL della soluzione standard di Fe(III) 60 nM; e) 120 μL , f) 180 μL , g) 240 μL della soluzione standard di Fe(III) 240 nM nel campione “St69_20m”. Sulle ascisse sono mostrati i potenziali in mV e sulle ordinate le intensità in nA.

I dati sperimentali vengono poi elaborati secondo un modello che può essere derivato indicando con C_L la concentrazione totale dei ligandi naturali del Fe nel campione, scrivendo il seguente bilancio di massa:

$$C_L = [L'] + [FeL] \quad (3)$$

Dove $[L']$ è la concentrazione dei ligandi non complessati con Fe, cioè il ligando libero e il ligando complessato con elementi diversi dal Fe, e $[FeL]$ la concentrazione di Fe complessato con i ligandi naturali L. Per la reazione di formazione di tale complesso con lo ione libero Fe^{3+} è possibile calcolare la relativa costante di formazione condizionale $K'_{Fe^{3+}L}$, denominata in questo modo perché dipende dalla composizione del campione (pH, salinità, metalli in traccia competitivi):

$$K'_{Fe^{3+}L} = \frac{[FeL]}{[Fe^{3+}][L']} \quad (4)$$

Derivando $[L']$ dalla (3) e sostituendola nella (4), otteniamo, seguendo diversi passaggi matematici, l'espressione (10):

$$K'_{Fe^{3+}L} = \frac{[FeL]}{[Fe^{3+}] \cdot (C_L - [FeL])} \quad (5)$$

$$(6)$$

$$K'_{Fe^{3+}L} = \frac{[FeL]}{[Fe^{3+}] \cdot C_L - [Fe^{3+}] \cdot [FeL]} \quad (7)$$

$$\frac{1}{K'_{Fe^{3+}L}} = \frac{[Fe^{3+}] \cdot C_L - [Fe^{3+}] \cdot [FeL]}{[FeL]} \quad (7)$$

$$\frac{1}{K'_{Fe^{3+}L}} = \frac{[Fe^{3+}] \cdot C_L}{[FeL]} - \frac{[Fe^{3+}] \cdot [FeL]}{[FeL]} \quad (8)$$

$$\frac{[Fe^{3+}] \cdot C_L}{[FeL]} = \frac{[Fe^{3+}] \cdot [FeL]}{[FeL]} + \frac{1}{K'_{Fe^{3+}L}} \quad (9)$$

$$\frac{[Fe^{3+}]}{[FeL]} = \frac{[Fe^{3+}]}{C_L} + \frac{1}{K'_{Fe^{3+}L} \cdot C_L} \quad (10)$$

da cui si deduce una relazione lineare tra il rapporto $[Fe^{3+}]/[FeL]$ e $[Fe^{3+}]$, detta linearizzazione di van den Berg-Ruzic [65]. Questo andamento lineare si verifica solo se il Fe forma un complesso con un singolo ligando o con più ligandi aventi costanti di stabilità simili, mentre in presenza di due o più classi di ligandi con costanti diverse la relazione risulterà non lineare, richiedendo una trattazione diversa.

Il segnale voltammetrico misurato nei diversi campioni dipende dalla sensibilità (s) e dalla concentrazione di Fe “labile” (Fe_{labile}):

$$i_p = s \cdot [Fe_{labile}] \quad (11)$$

Il termine s può essere derivato dalla parte finale della titolazione, cioè quando tutti i leganti organici naturali sono stati saturati e il segnale dipende linearmente dal Fe aggiunto.

Fe_{labile} include sia il Fe rilasciato all'equilibrio da complessi con ligandi naturali dopo l'aggiunta del ligando AL competitivo, sia tutto il Fe inorganico.

La concentrazione di Fe labile è legata alla concentrazione di Fe^{3+} dal coefficiente di reazione collaterale α , che considera i complessi inorganici del Fe e quelli con il ligando aggiunto:

$$[Fe_{labile}] = [Fe^{3+}] \cdot \alpha' \quad (12)$$

$$\alpha' = \alpha'_{Fe} + \alpha'_{Fe^{3+}AL} \quad (13)$$

Dove α'_{Fe} è il coefficiente di reazione collaterale per la complessazione inorganica di Fe^{3+} e $\alpha'_{Fe^{3+}AL}$ è l'analogo coefficiente per la complessazione di Fe^{3+} con il ligando aggiunto.

Derivando $[Fe^{3+}]$ dalla (12) e sostituendolo nella (10), si ottiene la seguente espressione:

$$\frac{[Fe_{labile}]}{[FeL]} = \frac{[Fe_{labile}]}{C_L} + \frac{\alpha'_{Fe} + \alpha'_{Fe^{3+}AL}}{K'_{Fe^{3+}C_L}} \quad (14)$$

Ciò da un'espressione simile alla (10), ma espressa in funzione del Fe labile, che è la specie effettivamente misurabile. Pertanto, rappresentando graficamente il rapporto $[Fe_{labile}]/[FeL]$ in funzione di $[Fe_{labile}]$, otteniamo una retta dalla cui pendenza (m) e intercetta (b) si ricava la concentrazione totale dei ligandi e la costante di formazione del loro complesso con Fe ($K'_{Fe^{3+}L}$):

$$C_L = 1/m \quad (15)$$

$$K'_{Fe^{3+}L} = \frac{\alpha'_{Fe^{3+}} + \alpha'_{Fe^{3+}AL}}{C_L \cdot b} \quad (16)$$

Il tipo di legante aggiunto e la sua concentrazione determinano la cosiddetta *finestra di speciazione*, la quale definisce l'intervallo di valori della costante di formazione dei complessi tra il ferro e i leganti naturali che possono essere rivelati con un dato metodo CLE-AdSV.

La finestra di speciazione è centrata su α'_{FeAL} e ha come estremi un ordine di grandezza inferiore e un ordine di grandezza superiore a tale valore [66][67]. Il coefficiente α'_{FeAL} è a sua volta legato alla *costante cumulativa di formazione* β'_{FeAL} e alla concentrazione di legante non complessato con il ferro :

$$\alpha'_{FeAL} = \beta'_{FeAL} \cdot [AL]^x \quad (17)$$

L'esponente x tiene conto della stechiometria della formazione del complesso (per il DHN $x=1$). Poiché $C_{AL} \gg C_{Fe}$, nel calcolo della finestra di speciazione (D) si può considerare la concentrazione totale del legante aggiunto C_{AL} :

$$D = \beta'_{FeAL} \cdot C_{AL}^x \quad (18)$$

Il ligando DHN forma un complesso con stechiometria $FeDHN$ e, pertanto, si possono definire le seguenti costanti:

$$\beta'_{Fe^{3+}DHN} = \frac{[FeDHN]}{[Fe^{3+}][DHN']} \quad (19)$$

$$\alpha'_{Fe^{3+}DHN} = \beta'_{Fe^{3+}DHN} \cdot [DHN'] = \beta'_{Fe^{3+}DHN} \cdot C_{DHN} \quad (20)$$

Le stesse costanti possono anche essere definite in riferimento a tutto il ferro inorganico Fe' e si può passare dalle une alle altre dividendo per α'_{Fe} .

Tale costante di stabilità condizionale $\beta'_{Fe^{3+}_{DHN}}$, in acqua di mare, è pari a $10^{18,51} M^{-1}$ [16]. Perciò, utilizzando una concentrazione di DHN di 0,5 e 1 μM , i valori di α'_{Fe} sono, rispettivamente, pari a 166 e 366.

Ad esempio, la *figura 3.5* mostra il risultato della linearizzazione della curva di titolazione CLE-AdSV del campione “CELEBeR St.16_20 m”.

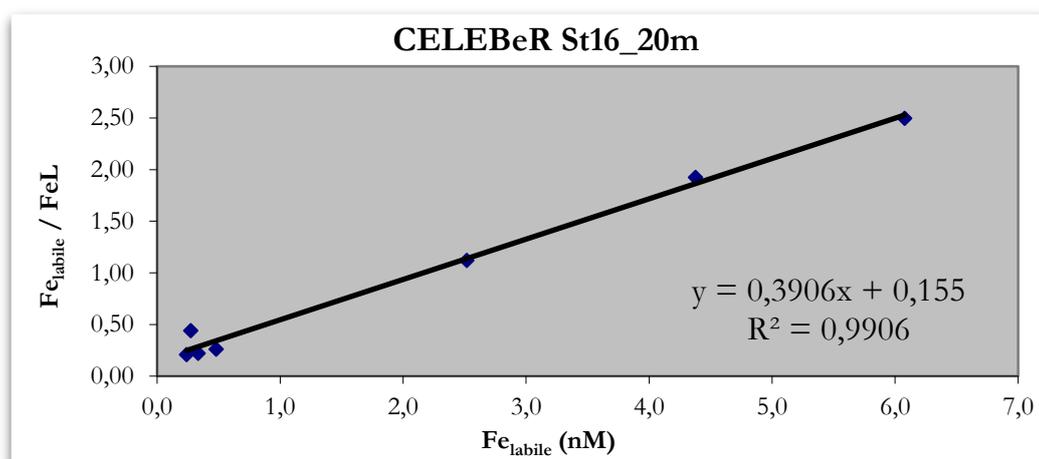


Figura 3.5 – Esempio di linearizzazione della curva di titolazione CLE-AdSV relativa al campione CELEBeR St.16_20 m

Le elaborazioni vengono effettuate mediante RStudio [62] che è un software open source che permette di elaborare dati ed eseguire calcoli complessi, ottenendo i valori dei parametri di speciazione permettendone anche la rappresentazione grafica.

Le rappresentazioni grafiche possono essere ricondotte a tre differenti modelli, rispettivamente il metodo Gerringa/Maas (di riferimento), il metodo van den Berg/Ruzic ed il metodo Scatchard.

In questo studio si è adoperato il modello Gerringa [50].

La *figura 3.6-a* mostra una curva di titolazione (in questo caso, a titolo d’esempio, la stazione 70_20m) in funzione della regressione lineare con relativo R^2 (indice di correlazione lineare), dove sull’asse y viene indicata la corrente misurata del picco i_p (nA) la quale rappresenta il ferro legato dal legante concorrente aggiunto in quantità note, e sull’asse x la concentrazione in nM di ferro totale disciolto. La *figura 3.6-b* mostra l’andamento dei dati sperimentali in funzione di una regressione non lineare, da cui si ricava la sensibilità della misura.

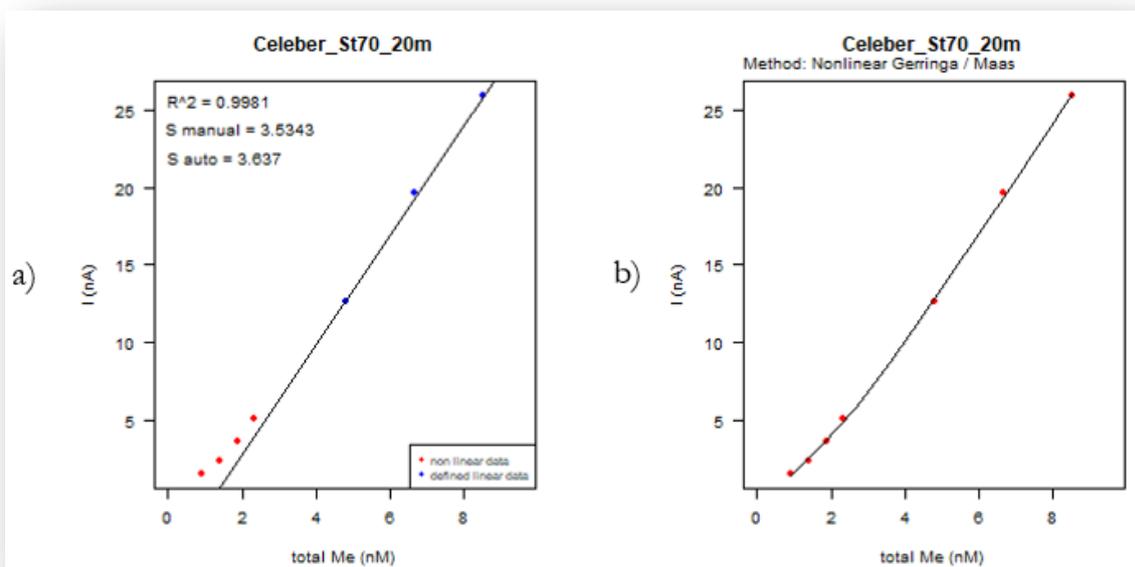


Figura 3.6 – Modello Gerringa con a) curva di titolazione in funzione della regressione lineare e b) curva di titolazione in funzione della regressione non lineare

Nella figura 3.6-b, inoltre, nel presente campione viene evidenziata l'aderenza dei valori calcolati rispetto a quelli predetti dal modello.

Di seguito sono mostrati i valori dei parametri, elaborati tramite il software RStudio, ottenuti dall'analisi della speciazione del ferro nei campioni di acqua di mare antartici insieme alla concentrazione del ferro totale disciolto (Fe_d). In tabella 3.2 si riportano le concentrazioni di Fe disciolto totale (Fe_d) determinata in un precedente studio [62], dei ligandi totali (L_t), dei ligandi liberi (L), del rapporto L_t/Fe_d , di Fe libero (Fe'), del logaritmo della costante di stabilità del complesso Fe-Ligandi ($\log K'_{FeL}$) e della percentuale di ferro complessato ($FeL\%$) ottenuti.

Sono evidenziati tre campioni (St.63_109m e 300m, St.64_300m) per i quali non è stato possibile elaborare i dati tramite RStudio a causa o di una possibile contaminazione delle aliquote o di una errata acquisizione dell'intensità di corrente durante l'analisi voltammetrica e che pertanto verranno scartati dalle successive elaborazioni.

Tabella 3.2 – Valori della concentrazione del ferro disciolto (Fe_d) e dei parametri descrittivi della sua speciazione ottenuti dall'elaborazione dei dati mediante software RStudio impiegando il modello di Gerringa

Campione	Fe_d (nM)	L_t (nM)	SD	$\log K'_{FeL}$	SD_{up}	SD_{down}	L' (nM)	L_t/Fe_d	Fe' (pM)	FeL%
St6_240m	0,48	6,86	3,51	22,89	0,07	0,09	6,38	14,28	0,010	100
St16_20m	0,90	2,42	0,31	23,77	0,16	0,27	1,52	2,68	0,010	100
St62_190m	1,90	2,46	0,34	24,86	0,61	NA	0,56	1,30	0,005	100
St63_109m	0,63	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
St63_300m	0,77	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
St64_100m	0,48	1,67	0,60	23,58	0,30	1,57	1,19	3,49	0,011	100
St64_300m	0,36	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
St65_400m	0,72	1,88	1,39	22,94	0,30	1,84	1,16	2,61	0,071	100
St66_20m	0,28	1,56	0,34	23,81	0,25	0,66	1,28	5,57	0,003	100
St66_120m	0,65	1,02	0,17	24,01	0,28	1,13	0,37	1,57	0,017	100
St66_300m	0,29	4,04	2,57	22,85	0,19	0,34	3,75	13,93	0,011	100
St67_220m	0,30	1,81	0,41	23,16	0,13	0,20	1,51	6,02	0,014	100
St67_320m	0,40	2,35	0,59	23,07	0,13	0,19	1,95	5,88	0,017	100
St68_20m	0,28	0,75	0,28	23,15	0,21	0,44	0,47	2,67	0,042	100
St68_225m	0,93	1,42	1,10	22,94	0,31	NA	0,49	1,53	0,217	100
St68_350m	1,37	2,36	0,58	23,32	0,18	0,30	0,99	1,72	0,065	100
St69_20m	1,32	1,46	0,21	24,23	0,36	NA	0,14	1,11	0,055	100
St69_247m	1,13	2,18	1,82	23,53	0,51	NA	1,05	1,93	0,032	100
St69_400m	0,50	2,01	0,66	23,90	0,43	NA	1,51	4,03	0,004	100
St70_20m	0,93	1,56	0,32	23,20	0,13	0,20	0,63	1,68	0,094	100
St70_289m	1,13	1,70	0,39	23,95	0,31	NA	0,57	1,51	0,022	100
St70_440m	0,51	8,67	1,35	23,66	0,15	0,22	8,16	17,01	0,001	100
St71_420m	1,60	1,40	0,15	24,29	0,36	NA	NA	NA	NA	NA
St72_310m	0,93	2,61	0,68	23,20	0,15	0,24	1,68	2,81	0,035	100
St74_268m	0,54	4,33	1,52	22,81	0,11	0,14	3,79	8,01	0,022	100
St75_20m	0,89	1,04	0,18	23,42	0,16	0,25	0,15	1,16	0,231	100
St75_350m	1,16	3,15	1,51	23,32	0,29	1,40	1,99	2,72	0,028	100
St77_20m	1,10	2,18	1,03	23,53	0,30	NA	1,08	1,98	0,030	100
St77_280m	1,33	1,59	0,26	24,27	0,40	NA	0,26	1,20	0,027	100

La concentrazione di ligandi organici totali (L_t) è compresa tra 0,75 nM, relativa alla stazione 68_20m, e 8,67 nM, relativa alla stazione 70_440m. I ligandi complessati del ferro comprendono un'ampia gamma di specie organiche, comprese sostanze umiche, siderofori e prodotti biologici di degradazione (ad esempio sostanze esopolimeriche e saccaridi), caratterizzati da differenti percorsi di produzione e di perdita, funzioni e reattività.

L'intervallo di valori è confrontabile con precedenti studi di speciazione condotti nella polynya di Baia Terra Nova [68], con qualche eccezione (St.68_20m e St.70_440m) ma senza discostarsi significativamente. Tutti i campioni presentano una concentrazione di L_t maggiore rispetto a quella del Fe_d , l'unica anomalia riguarda la stazione 71_420m.

Il parametro L' rappresenta la concentrazione dei ligandi con siti disponibili per complessare il ferro, ed è dato dalla differenza tra la concentrazione di L_t ed Fe_d ; più piccolo è il valore di L' più la saturazione dei siti disponibili è maggiore. In questo caso, la concentrazione nei campioni analizzati è compresa tra 0,14 nM, relativa alla stazione 69_20m, e 8,16 nM, relativa alla stazione 70_440m. Dunque, l'intervallo di valori non rispecchia appieno l'andamento misurato in studi pregressi [68]; in particolare, alcune stazioni esaminate presentano valori ben oltre il range studiato e questo può indicare una scarsa saturazione dei siti dei ligandi in tali acque profonde. Inoltre, un valore difforme dal resto delle stazioni esaminate riguarda la stazione 71_420m, la quale mostra un valore negativo che si potrebbe declinare come la completa saturazione dei siti disponibili a legare il ferro.

Un secondo parametro indicativo lo stato di saturazione dei ligandi organici è il rapporto L_t/Fe_d . Tale rapporto è regolarmente costante in mare aperto. Un valore prossimo all'unità corrisponde a ligandi relativamente saturati con il ferro e indica una bassa capacità dei ligandi a complessare e tamponare ulteriori aggiunte di ferro. D'altra parte, un valore relativamente elevato (>5) indica che il pool dei ligandi è sottosaturato rispetto al ferro e può tamponare ulteriori aggiunte di questo elemento. Pertanto, un elevato rapporto L_t/Fe_d aumenta la potenziale solubilità del Fe e lo mantiene in fase disciolta [69].

La costante di stabilità condizionale ($\log K'_{FeL}$) varia di due ordini di grandezza, compreso tra 22,81 e 24,86; questi valori sono coerenti con quelli nell'Oceano Meridionale in studi pregressi [11][70]. Si ricorda che in base alle loro affinità per il ferro, i ligandi possono essere suddivisi in diverse classi: L_1 include ligandi più forti, con $\log K'_{FeL} = 22-23$ o superiore, mentre i tipi da L_2 a L_4 raccolgono ligandi più deboli, con $\log K'_{FeL} = 20-22$ o inferiore. L'analisi di speciazione del ferro ha permesso di identificare in base al valore del $\log K'_{FeL}$ l'appartenenza dei ligandi alla classe L_1 .

L'intervallo di valori è confrontabile con precedenti studi di speciazione condotti nella polynya di Amundsen nell'Oceano Meridionale [69], ad eccezione di alcune aliquote di acque profonde che superano tale intervallo. Di particolare rilievo, che suggerisce condizioni molto variabili tra i campioni in esame, è la stazione 71_420m la quale dimostra una significativa differenza rispetto alle altre aliquote profonde esaminate. In questo caso, i ligandi sono particolarmente saturati con il ferro e non sono più in grado di tamponare ulteriori aggiunte di questo elemento; tale dato è supportato anche da un valore di ferro inorganico (Fe') particolarmente elevato.

Per quanto riguarda le due stazioni relative alla zona della polynya di Baia Terra Nova e, in particolare, la stazione 6_240m mostra valori di concentrazione di L' elevati (6,86 nM), quindi alte concentrazioni di ligandi con siti disponibili per complessare il ferro. Simultaneamente, il rapporto L_t/Fe_d risulta elevato (14,28) dunque capacità dei ligandi a complessare e tamponare ulteriori aggiunte di ferro.

La quasi totalità dei campioni presenta il 100% del Fe_d legato a ligandi organici ($FeL\%$); questo dato percentuale è ottenuto dal rapporto tra la concentrazione del ferro legato a ligandi organici (FeL) e la concentrazione di Fe_d , moltiplicato per 100.

Le stazioni esaminate mostrano differenti andamenti in funzione della profondità, pertanto, a titolo di esempio, sono state investigate le distribuzioni verticali del rapporto L_t/Fe_d nelle stazioni 66, 68, 69 e 70 (Figura 3.7).

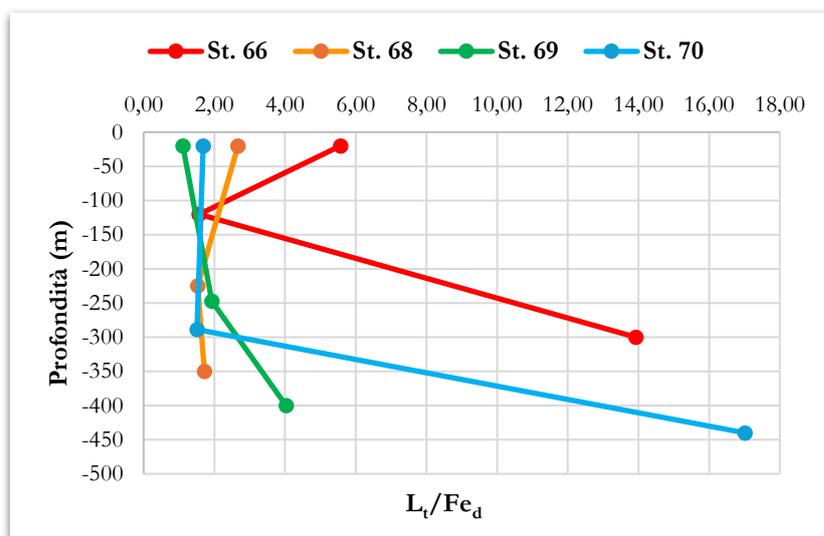


Figura 3.7 – Distribuzione verticale del rapporto L_t/Fe_d nelle stazioni 66, 68, 69 e 70

Esaminando tale distribuzione si nota come il rapporto L_t/Fe_d , nelle stazioni 66 e 70, decresce ad un valore prossimo ad 1 (quindi ligandi saturati con il ferro) nelle quote sub superficiali ed aumenta con la profondità fino a raggiungere il valore massimo. Mentre la stazione 69 presenta un andamento opposto, cioè più ligandi saturati con il ferro in superficie e, scendendo in profondità, una maggior disponibilità a complessare tale elemento. Infine, la stazione 68 presenta un andamento piuttosto lineare con caratteristiche intermedie rispetto alle precedenti stazioni.

La variabilità della distribuzione dei parametri in funzione della profondità può dipendere dalla presenza di diverse masse d'acqua con proprietà biogeochimiche differenti.

Cape Adare è un promontorio situato nella parte più settentrionale della terra della regina Vittoria (latitudine 71°17' S e longitudine 170°14' E) che separa il Mare di Ross (ad est) dai restanti mari antartici (ad ovest) e che identifica il limite tra l'area di piattaforma continentale e la scarpata oceanica. La regione è importante da un punto di vista oceanografico per l'intrusione di CDW e il suo mescolamento con HSSW (prodotta a Baia Terranova e qui trasportata da moti di circolazione attraverso cui avviene la formazione di *Antarctic Bottom Water* (AABW) (cfr. paragrafo 1.2) [2][3]. Il tasso di formazione delle AABW è un fattore critico nel contesto della ventilazione oceanica poiché da questo dipende la circolazione profonda oceanica e il trasferimento di gas (O₂ e gas clima alteranti quali CO₂) [5].

La CDW è la più grande massa d'acqua in termini di volume dell'Oceano Meridionale, ha temperature positive, bassa concentrazione di O₂ ed elevate concentrazioni di nutrienti e CO₂. La sua intrusione rappresentando una sorgente di calore, può favorire la fusione del ghiaccio continentale e il distacco degli iceberg e si ipotizza che per effetto del riscaldamento globale in futuro il suo ruolo potrebbe essere ancora più rilevante. Inoltre, la CDW è di per sé una sorgente di ferro e di CO₂ che riduce localmente il pH, modificando la speciazione del Fe e aumentandone la biodisponibilità. L'aumento degli apporti di Fe o della sua biodisponibilità potrebbe stimolare la pompa biologica e mitigare gli effetti dell'aumento del CO₂ atmosferico. Le misure condotte nell'ambito dei progetti CELEBeR e P-ROSE (cfr. paragrafo 2.2) avevano lo scopo di fornire risposte a queste considerazioni.

Considerando l'effetto della marea nell'area di indagine, il progetto CELEBeR ha adottato una strategia di campionamento che tenesse conto di questo fattore. In particolare, la finestra temporale in cui sono state campionate le stazioni è stata in concordanza con il massimo della marea sigiziale che favorisce l'intrusione della CDW sulla piattaforma continentale.

Attraverso l'analisi dei parametri fisici (temperatura e salinità) raccolti dall'unità di ricerca oceanografia fisica dell'Università Parthenope di Napoli, è stato possibile identificare le differenti masse d'acqua presenti nella zona al momento del campionamento del progetto CELEBeR. In base ai valori di salinità, temperatura potenziale, e profondità sono state individuate:

- *Antarctic Surface Water* (AASW), caratterizzata da salinità inferiore a 34,3 e da temperature variabili e profondità inferiore a 100 m
- *High Salinity Shelf Water* (HSSW), definita da temperatura inferiore a 1,85 °C e da salinità maggiore di 34,7 a profondità maggiore di 300 m;
- *Circumpolar Deep Water* (CDW), individuata da temperatura positiva maggiore di 0,70 °C e salinità maggiore di 34,68 a profondità tra 250 e 500 m;
- *Modified Circumpolar Deep Water* (mCDW) identificata da temperatura tra -0,89 e 0,70 °C e salinità tra 34,52 e 34,68 a profondità tra 100 e 400 m.

Dal momento che nell'ambito del progetto CELEBeR erano stati raccolti anche dati relativi alla distribuzione di parametri chimici quali ossigeno disciolto (O₂), nutrienti (NO₂+NO₃, NH₄, PO₄, Si(OH)₄), parametri descrittivi del sistema del carbonio inorganico (alcalinità totale A_T, pH, carbonio inorganico totale C_T) e di fluorescenza che fornisce una stima dell'attività fotosintetica, i dati di speciazione del Fe_d sono stati elaborati mediante l'analisi delle componenti principali (PCA) impiegando il software di elaborazione chemiometrica CAT (*Chemometric Agile Tool*) [71]. La PCA è stata effettuata su una matrice composta da 23 oggetti (campioni) descritti da 19 variabili.

La PCA rappresenta una delle tecniche più utilizzate per l'esplorazione dei dati in modalità multivariata. Ovvero, permette di trasformare le variabili originali in nuove, chiamate componenti principali (PC), che vengono ottenute per combinazione lineare di quelle originali in modo tale da essere ortogonali tra loro. Ad ogni PC è associata una quantità, chiamata autovalore, vale a dire una misura di quanta parte della varianza nel set di dati originale è descritta da quella componente, tale valore è definito come varianza spiegata.

La varianza spiegata di ogni componente è generalmente espressa come percentuale della varianza totale. In *figura 3.8* è mostrato lo *scree plot* che illustra le percentuali di varianza spiegata da ciascuna PC. Dal momento che le prime 2-3 PC contengono la maggior parte delle informazioni, i set di dati multidimensionali possono essere facilmente visualizzati in due o tre dimensioni, utilizzando gli *score plot* ed i *loading plot*.

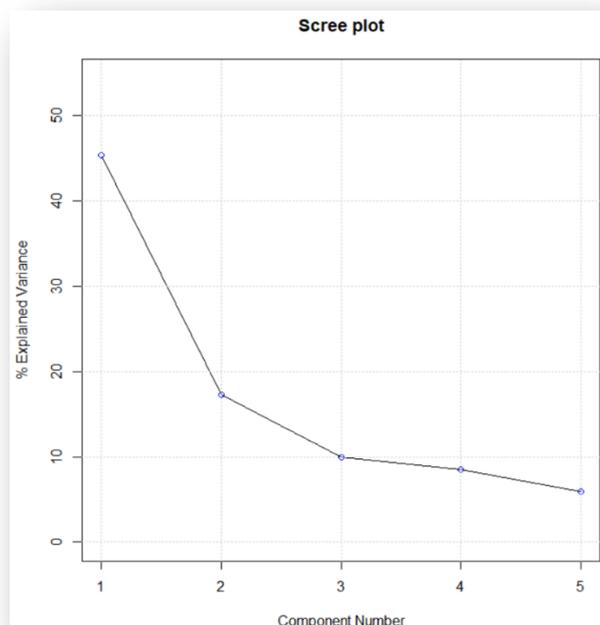


Figura 3.8 – Scree plot dove sulle ascisse sono presenti le PC_n e sulle ordinate le relative varianze spiegate in %

Il *loading plot* rimarca le correlazioni tra le variabili, in particolar modo consente di analizzare il ruolo di ciascuna variabile nelle diverse componenti, le loro correlazioni dirette e inverse, nonché la loro importanza. Lo *score plot* visualizza, invece, gli oggetti in uno spazio dimensionalmente ridotto, evidenziandone somiglianze e differenze. Permette, inoltre, di analizzare il comportamento degli oggetti (campioni) nelle loro diverse componenti, evidenziando le loro similarità (*cluster*) e differenze (*outlier*).

Si è scelto di considerare solo le prime due PC dal momento che spiegano circa il 63% della varianza totale (PC₁: 45,4 %, PC₂: 17,3%); percentuale abbastanza paragonabile a studi recenti [50][51] dunque sufficiente per un'analisi multivariata applicata a studi ambientali.

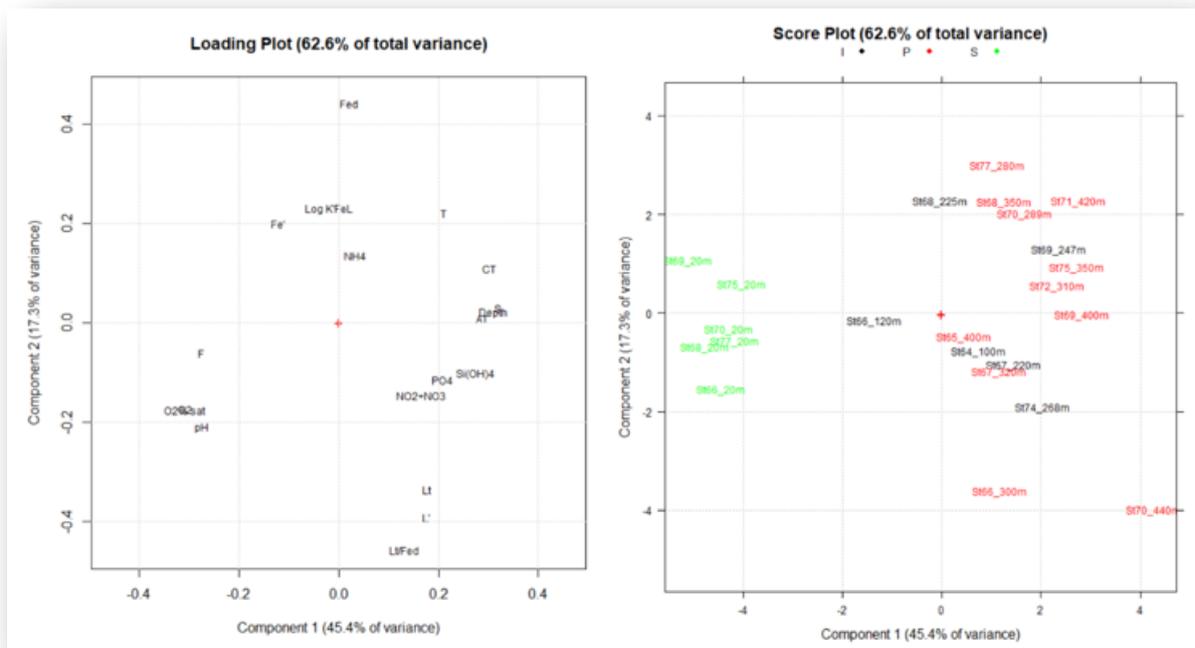


Figura 3.9 – a) Loading plot e b) score plot ottenuti dall'analisi PCA applicata al dataset della zona di Cape Adare (progetto CELEBeR). Le tre colorazioni identificano la classe di profondità, in verde i sub-superficiali (S), in nero gli intermedi (I) e in rosso i profondi (P)

Per quanto concerne il *loading plot* (Figura 3.9-a), nutrienti (ad eccezione di NH_4), salinità, temperatura, alcalinità totale, carbonio inorganico totale, fluorescenza, ossigeno disciolto e pH pesano sulla PC_1 . Nello specifico O_2 e pH sono anticorrelati con la T; F è anticorrelato con la profondità, S, AT e CT . Inoltre, mostra una correlazione significativa e positiva con O_2 e pH ed una correlazione negativa con i nutrienti (escluso NH_4). I parametri legati alla speciazione del ferro (L_t , $\log K'_{\text{FeL}}$, L' , L_t/Fe_d , Fe'), Fe_d e NH_4 pesano sulla PC_2 , dove si nota l'anticorrelazione di L_t e L' con $\log K'_{\text{FeL}}$ e Fe' . Infine, l' NH_4 non mostra nessuna correlazione significativa con alcun parametro e non pesa in maniera rilevante né sulla PC_1 né sulla PC_2 .

Lo *score plot* (Figura 3.9-b) mostra la suddivisione dei campioni in due clusters, a seconda della profondità alla quale sono stati campionati. Tali campioni sono distribuiti lungo PC_1 e può essere considerata il descrittore del fattore profondità di campionamento. Infatti, muovendosi lungo la PC_1 da sinistra (dove sono posizionati i campioni sub-superficiali) verso destra (dove sono collocati i campioni raccolti in profondità) diminuiscono la concentrazione di O_2 , pH e F mentre, all'opposto, aumenta S, AT e CT .

Inoltre, i campioni profondi e di profondità intermedia si distribuiscono anche lungo la PC_2 . In particolare, i valori dei parametri Fe_d totale e T aumentano dalla stazione 70_440m alla

stazione 77_280m. Quest'ultimo campione è stato raccolto nella zona maggiormente influenzata dall'intrusione di CDW.

È possibile quindi dimostrare, attraverso la precedente analisi della PCA, come le profondità esaminate sono relazionate con i parametri fisici e chimici, differenti componenti biologiche e masse d'acqua.

La distribuzione dei ligandi non appare dipendente dall'attività biologica poiché la fluorescenza pesa sulla PC₁, mentre L_t sulla PC₂. Una ricerca effettuata nella Ross Sea Polynya ha riscontrato che la distribuzione di ligandi non variava significativamente in funzione della quantità di Chl-a [4]. *Gerringa et al.*, riportano una correlazione negativa e significativa dei ligandi con la biomassa procariotica, suggerendo un ruolo delle attività microbiche nel determinare la distribuzione di ligandi. Queste valutazioni non sono state effettuate durante il progetto CELEBeR e pertanto non è possibile trarre alcuna conclusione in merito. Inoltre, le reazioni fotochimiche possono partecipare alla degradazione dei ligandi organici assieme alle attività batteriche nello strato superficiale oscurando una possibile relazione tra ligandi e i parametri della biomassa fitoplanctonica, ovvero fluorescenza o clorofilla [43].

Come visto i ligandi non presentano una distribuzione comune per tutte le stazioni in funzione della profondità. Questo risultato è in accordo con i dati riportati da [73] che riportano la presenza ubiquitaria a tutte le profondità con una diversa distribuzione in relazione anche all'area di campionamento.

Soffermandoci sull'identificazione delle masse d'acqua nella zona di Cape Adare, è stata effettuata una nuova PCA sulla medesima matrice utilizzata in precedenza. Questa volta, sono state considerate due correlazioni sulle prime tre PC: la prima tra PC₁ (45,4%) e PC₂ (17,3%) con varianza totale spiegata del 63% (come nel precedente caso), la seconda tra PC₁ (45,4%) e PC₃ (10%) che spiegano circa il 55% della varianza totale.

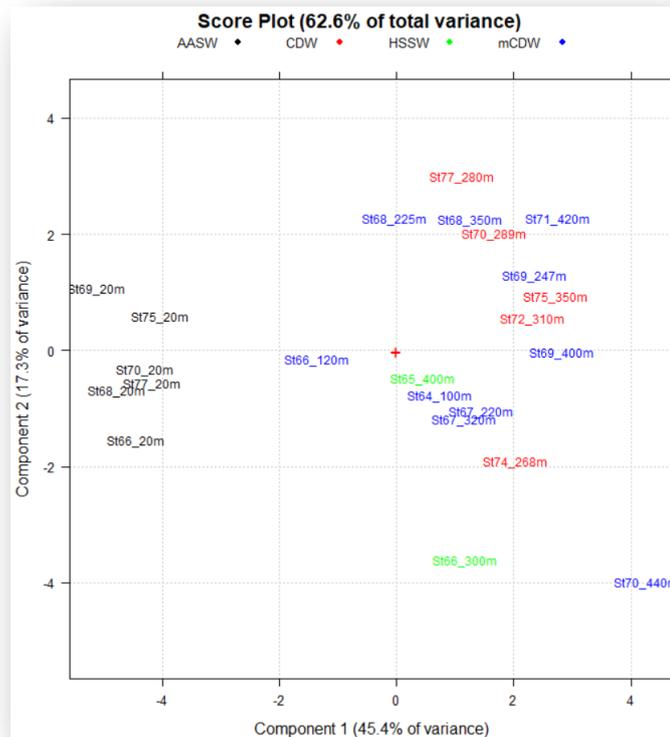


Figura 3.10 – Score plot ottenuto dall’analisi PCA sulle componenti PC_1 e PC_2 applicata al dataset della zona di Cape Adare. Le quattro colorazioni identificano le masse d’acqua, in nero le AASW, in rosso la CDW, in blu la mCDW e in verde la HSSW

Andando ad investigare il primo caso, il *loading plot*, avendo utilizzato la stessa matrice precedente e le stesse componenti principali, è il medesimo della precedente analisi PCA (Figura 3.9-a). Riguardo lo *score plot* (Figura 3.10), vengono evidenziati due macro gruppi che consentono di fare una prima distinzione dei campioni in funzione della loro appartenenza a masse d’acqua differenti. La distribuzione dei campioni lungo PC_1 , che può essere quindi considerata il descrittore della distribuzione dei parametri fisici e chimici (T , S , pH , O_2 disciolto, A_T e C_T), permette di discriminare le masse d’acqua nella zona studiata. In particolare, è possibile notare come le CDW e mCDW hanno valori di pH più acidi, salinità maggiore e minor concentrazione di O_2 disciolto, oltre a valori di temperatura positivi o poco al di sotto dello zero rispetto alle AASW. Ciò è dovuto al fatto che le AASW, a seguito della fusione del ghiaccio marino, ricevono elevate quantità di acqua dolce che ne diminuiscono la salinità. Inoltre, i campioni relativi alle masse d’acqua CDW, mCDW e HSSW sono distribuiti lungo gran parte della PC_2 ; pertanto, non si ha un’identificazione univoca di tali masse d’acqua.

Per quanto concerne la PC₂, può essere considerata il descrittore della speciazione del ferro e Fe_d totale. Infatti, secondo la *figura 3.9-a*, la AASW ha concentrazioni di ferro piuttosto elevate (da 0,28 nM a 1,32 nM), questo perché la fusione del ghiaccio marino gioca un ruolo importante nel ciclo biogeochimico antartico del ferro. Durante il periodo invernale viene accumulato il ferro nel ghiaccio marino, e successivamente nel periodo estivo questo viene rilasciato nell'oceano assieme a sostanze nutritive e microelementi di origine meteorica. Dunque, la presenza di AASW favorisce intense fioriture di fitoplancton e, come conseguenza, un aumento della produttività primaria.

Per quanto riguarda le masse d'acqua CDW e mCDW, invece, esse presentano una maggior variabilità di concentrazione di Fe_d. A titolo di esempio, le stazioni 70_440m e 71_420m (entrambe facenti parte della mCDW) presentano, rispettivamente, una concentrazione di Fe_d di 0,51 nM e 1,60 nM. Inoltre, tali valori di Fe_d sono giustificati anche dal parametro L' che dimostra come, nella stazione 70_440m, la concentrazione dei ligandi con siti disponibili per complessare il ferro è maggiore data la carenza di Fe_d; situazione opposta per quanto riguarda la stazione 71_420m.

Tale variabilità permette di confermare che, la CDW, essendo la più grande massa d'acqua in termini di volume dell'Oceano Meridionale, presenta un range di temperature positive, basse concentrazioni di O₂ disciolto ed elevate concentrazioni di nutrienti. Inoltre, tale massa d'acqua può risalire la scarpata e intrudere nella piattaforma trasformandosi in mCDW.

Dall'analisi PCA sulle componenti PC₁ e PC₂, perciò, risultano ben distinte esclusivamente le acque sub-superficiali (AASW) rispetto alle altre masse d'acqua in esame. Di conseguenza, si è optato per elaborare un'ulteriore PCA in modo da identificare, se possibile, un migliore aggregato tra campioni con la medesima massa d'acqua e per verificare le considerazioni dette in precedenza; sono state selezionate, quindi, la PC₁ e la PC₃.

Nonostante il valore della varianza totale sia inferiore alla precedente PCA, si nota come i campioni tendano a formare dei cluster più definiti (*Figura 3.11*), ma poco distinguibili gli uni dagli altri; questo per quanto riguarda le masse d'acqua HSSW e CDW rispetto la PC₃.

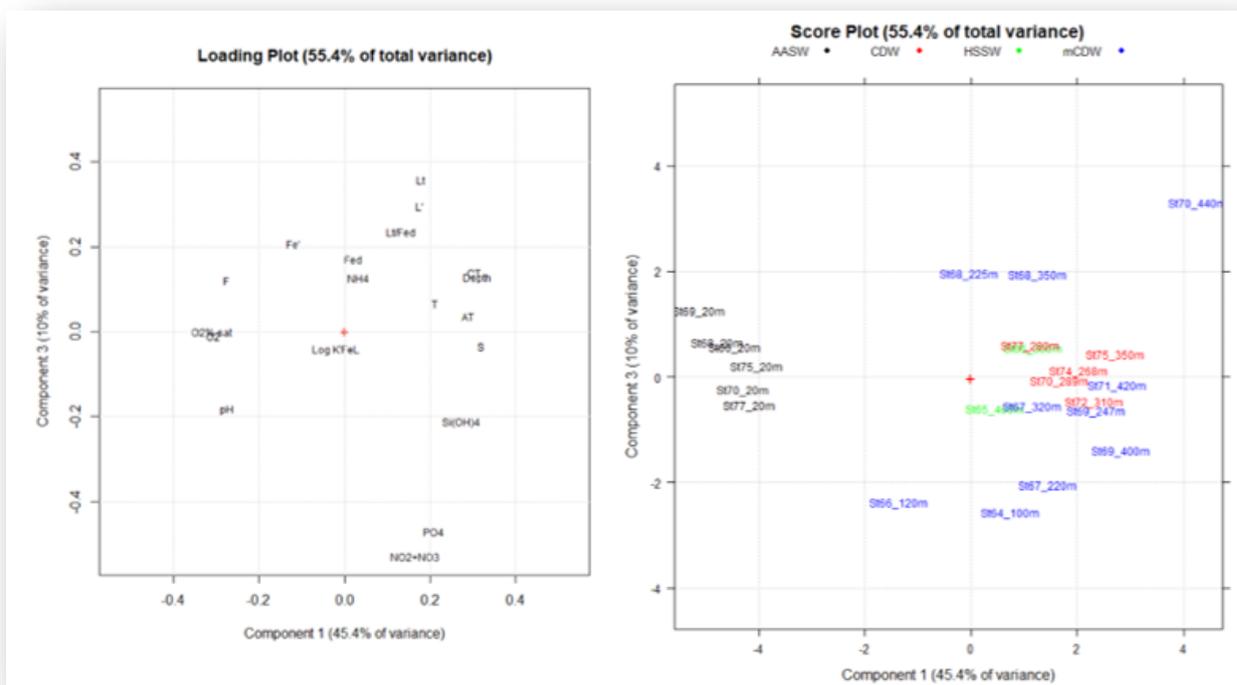


Figura 3.11 – a) Loading plot e b) score plot ottenuti dall'analisi PCA sulle componenti PC_1 e PC_3 applicata al dataset della zona di Cape Adare. Le quattro colorazioni identificano le masse d'acqua, in nero le AASW, in rosso la CDW, in blu la mCDW e in verde la HSSW

Le mCDW, invece, sono distribuite più uniformemente lungo la componente 3, a dimostrazione di quanto detto in precedenza sulla variabilità dei parametri di ferro disciolto totale e sua speciazione. Tuttavia, osservando tali parametri più attentamente, si nota come le correlazioni tra essi, rispetto alla precedente PCA, non risultino concordi e in linea con le considerazioni fatte finora. Di conseguenza, la presente elaborazione non può essere presa come riferimento.

Sulla base dei dati della PCA, sono stati indagati i dati di Fe_d e dei ligandi nelle diverse masse d'acqua. I risultati vengono rappresentati di seguito tramite dei grafici “scatola e baffi” o “box-plot”. I box plot riportano gli intervalli di valori riscontrati nelle diverse masse d'acqua evidenziando massimo e minimo, mediana, primo e terzo quartile ed eventuali “outliers”.

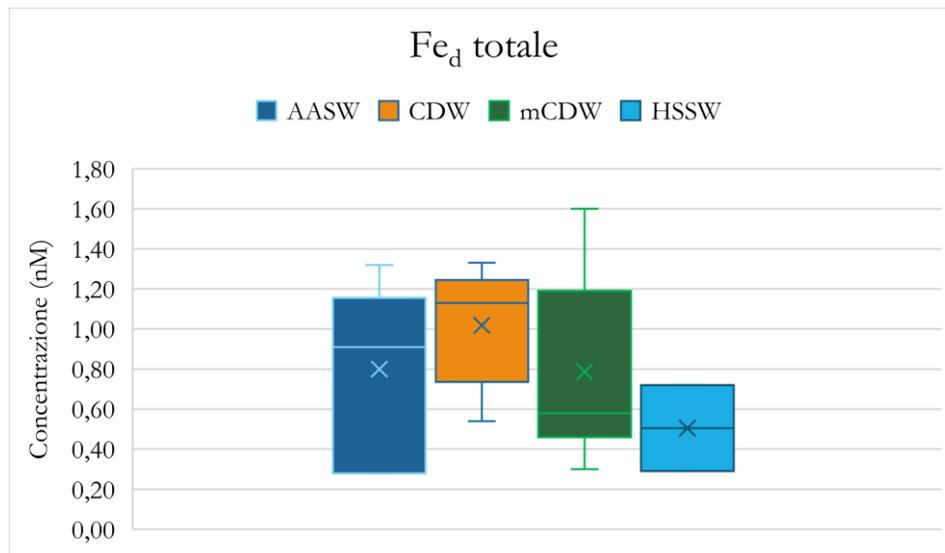


Figura 3.12 – Confronto tra gli intervalli di concentrazione di Fe_d riferiti alle diverse masse d'acqua individuate nella zona di Cape Adare

In figura 3.12 sono riportati gli intervalli dei valori ottenuti per il Fe_d totale da cui si possono osservare delle differenze tra le quattro masse d'acqua identificate: AASW e CDW presentano valori delle mediane maggiori rispetto a mCDW e HSSW, per la quale, occorre sottolineare che sono stati identificati solamente due campioni sulla base dei parametri fisici (stazione 65_400m e 66_300 m). Ciò può essere giustificato considerato l'apporto di Fe_d rilasciato dalla fusione del ghiaccio marino nel caso delle AASW e conferma il ruolo della CDW come sorgente di questo elemento in tracce per la zona di piattaforma del Mare di Ross.

L'AASW è caratterizzata inoltre da un intervallo di valori più ampio analogamente alla mCDW. Nel caso dell'AASW può essere giustificato dall'elevata variabilità degli apporti locali e dal possibile ruolo giocato dall'attività biologica, mentre nel caso dell'mCDW dai processi di risalita della CDW in area di piattaforma e dal suo mescolamento con le acque locali che si riflettono in una maggiore variabilità dei dati.

La figura 3.13 mostra il *box plot* del rapporto L_t/Fe_d .

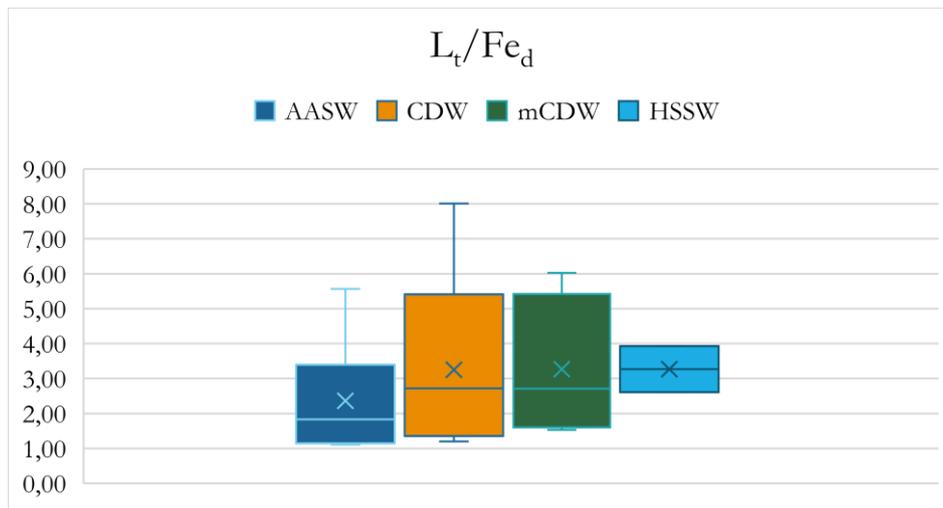


Figura 3.13 – Confronto tra gli intervalli di concentrazione dei valori del rapporto L_t/Fe_d riferiti alle diverse masse d'acqua individuate nella zona di Cape Adare

Come precedentemente osservato, i valori di tale rapporto a differenza di zone oceaniche di altura è risultato estremamente variabile e maggiore dell'unità, suggerendo l'elevata capacità di complessare e ulteriori apporti di ferro, mantenendolo in soluzione.

Dall'esame del *box plot* si può osservare che la CDW è la massa d'acqua che presenta i massimi valori dell'intervallo di dati che è anche più ampio rispetto a quello delle altre masse d'acqua. Possiamo pertanto concludere che la CDW è una sorgente di Fe_d per la zona di piattaforma del Mare di Ross, mantenuto in soluzione dall'elevata concentrazione dei ligandi.

Si può concludere affermando che, il Mare di Ross è un'area particolarmente sensibile al cambiamento climatico ed è caratterizzato inoltre da variabilità annuale e interannuale delle proprietà biogeochimiche dell'acqua marina in funzione anche dell'estensione del ghiaccio marino [74]. In particolare, la riduzione dell'estensione del ghiaccio marino e il rimescolamento convettivo possono diminuire l'apporto di Fe alle acque superficiali durante la stagione di crescita del fitoplancton, anche se allo stesso tempo questi effetti di riduzione potrebbero essere mitigati da un maggiore apporto di acqua di fusione da parte dei ghiacci continentali e marini e dalla CDW [19][20][52].

3.2 DETERMINAZIONE DEL Fe_d TOTALE NEL SETTORE ORIENTALE DEL MARE DI ROSS MEDIANTE ICP-MS/MS

– Interferenze da ^{54}Cr

L'analisi dei metalli in tracce in campioni di acqua di mare tramite ICP-MS risulta problematica a causa della complessità della matrice. Lo strumento in uso presso i laboratori di ricerca di chimica analitica e ambientale del DCCI, grazie alla cella di reazione dinamica, è capace di sopprimere i segnali derivanti dagli ioni poliatomici, mostrati di seguito, che interferiscono sulla misura del segnale del ^{54}Fe :



Per una quantificazione accurata del ^{54}Fe è fondamentale considerare l'interferenza isobarica dovuta al ^{54}Cr , che porterebbe ad una sovrastima della misura.

Tale interferenza viene corretta basandosi sull'abbondanza isotopica naturale degli isotopi del Cr mediante la misura del segnale dell'isotopo privo di interferenze $^{52}Cr^+$ e utilizzando la seguente equazione correttiva:

$$I(^{54}Fe) = I(54) - 0,028226 \cdot I(^{52}Cr) \quad (21)$$

In cui $I(^{54}Fe)$ rappresenta il segnale dell'analita corretto dall'interferenza del cromo, $I(54)$ è l'intensità ionica misurata relativa al rapporto m/z pari a 54, il numero 0,028226 è il rapporto tra le abbondanze isotopiche di ^{54}Cr e ^{52}Cr e, infine, $I(^{52}Cr)$ è l'intensità ionica misurata al rapporto m/z pari a 52 [36].

– Valutazione del bianco analitico

Ogni qualvolta si abbia il bisogno di determinare livelli molto bassi di Fe in acqua di mare, è necessario valutare correttamente il bianco analitico in modo da ottenere risultati accurati e confrontabili.

La metodica analitica utilizzata in questo studio non consente la preparazione di un bianco procedurale, perché applicare l'intera metodica di preparazione del campione utilizzando solo acqua MilliQ non permette la coprecipitazione del ferro, a causa dell'assenza del magnesio nella matrice.

È quindi necessario utilizzare un bianco che consenta l'individuazione di possibili contaminanti provenienti dai reagenti previsti dalla metodica. In questo caso l'unica aggiunta di un reagente è l'utilizzo della soluzione di ammoniaca che, pur essendo ultrapura, può costituire un veicolo di contaminazione da metalli presenti in tracce, tra cui il ferro. Per questa ragione si utilizza il *reagent blank* secondo la metodologia del gruppo di ricerca [36][75].

Tale bianco ($0,21 \pm 0,05$ nM) viene quindi sottratto ai valori ottenuti dall'analisi dei campioni di acqua di mare antartica. Nel presente lavoro di tesi, non si è valutato il limite di rilevabilità (LOD) poiché è stato calcolato in precedenti studi risultando pari a 0,09 nM [75].

– ***Valutazione dell'accuratezza***

L'accuratezza del metodo della coprecipitazione con ammoniaca è stata valutata mediante l'analisi di un materiale di riferimento interno di acqua di mare (IRM-SW1) del Mar Ligure al largo di Portofino prelevata a 10 metri di profondità.

Tramite il t-test di Student è stata valutata la significatività delle misure effettuate con quelle relative ad un precedente studio [76] ad un livello di confidenza del 95%. Il test ha dato come risultato che le differenze non sono statisticamente significative e, dunque, l'analisi è risultata accurata.

In fase di elaborazione i dati sono stati preventivamente sottratti del bianco.

– ***Determinazione della concentrazione del Fe_d totale tramite metodo delle aggiunte standard***

La determinazione della concentrazione di Fe_d totale è stata effettuata mediante una variante del classico metodo delle aggiunte standard con una soluzione standard di Fe(III) avente una concentrazione pari a $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Tale concentrazione di Fe in ciascuna aggiunta è stata scelta in modo da raddoppiare il segnale misurato per il campione senza aggiunte. La variante del metodo consiste nella costruzione della retta di calibrazione operando le aggiunte direttamente sulla stessa aliquota. Nello specifico, la retta di calibrazione viene costruita mediante quattro aggiunte standard in sequenza, del volume di 0,250 mL al campione, misurando il segnale analitico dopo ogni aggiunta.

Questa quantità è pari al volume del campione consumato durante ogni lettura, di fatto operando in questo modo non si altera la concentrazione nel corso delle aggiunte [77]. Per le analisi erano disponibili quattro miscele di acqua di mare antartica, derivanti dalle rimanenze dei campioni del progetto ESTRO precedentemente analizzati [78] e suddivisi sulla base dell'appartenenza a masse d'acqua differenti e tipiche della zona d'indagine: *Antarctic Surface Water* (AASW), *Amundsen Sea Water* (ASW), *Circumpolar Deep Water* (CDW) e *Low Salinity Shelf Water* (LSSW). In *tabella 3.3* sono riportate le masse di campione a disposizione.

Tabella 3.3 – Quantità delle relative miscele di campioni suddivise in base alla massa d'acqua

Miscele di campioni	Massa (g)
Mix ASW ESTRO	50,2
Mix AASW ESTRO	50,2
Mix CDW ESTRO	50,1
Mix LSSW ESTRO	50,7

Nella costruzione della curva di calibrazione (*Figura 3.14*) è stata utilizzato il campione LSSW.

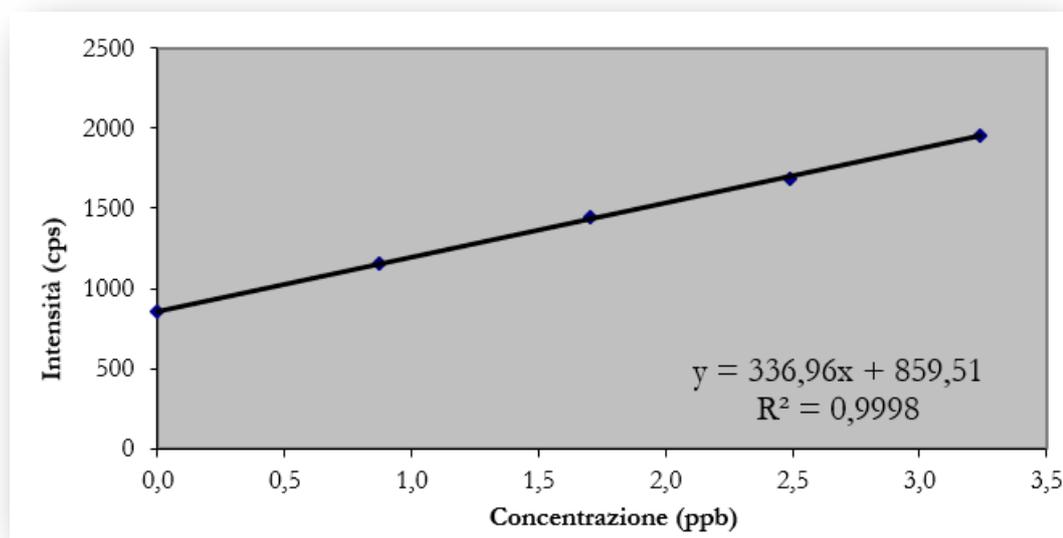


Figura 3.14 – Curva di calibrazione della miscela LSSW con metodo delle aggiunte standard

Il coefficiente angolare ottenuto da tale retta è stato quindi usato per calcolare la concentrazione di Fe_d negli altri campioni analizzati nella medesima giornata. Ai campioni è stato sottratto il valore del *reagent blank* (0,21 nM).

I campioni presentano valori di concentrazione di Fe_d totale compresi tra 4,28 nM e 6,47 nM, come riportato nella *tabella 3.4*.

Tabella 3.4 – Concentrazioni di Fe_d totale di ciascuna miscela ricavati mediante curva di calibrazione

Miscela di campioni	Concentrazione (nM)
Mix ASW ESTRO	5,96
Mix AASW ESTRO	6,47
Mix CDW ESTRO	4,82
Mix LSSW ESTRO	4,28

I valori estrapolati non risultano coerenti con gli intervalli riportati in letteratura per le acque di piattaforma del Mare di Ross, poiché sono risultati significativamente maggiori anche delle analisi svolte precedentemente [68][78][79].

Tale sovrastima è dovuta, probabilmente, alle numerose manipolazioni compiute sia in precedenza sui singoli campioni, sia sulle miscele, con conseguente loro contaminazione. Un ulteriore fattore a cui si può attribuire il discostamento dai valori in letteratura riguarda il lungo tempo di conservazione dei campioni a +4 °C, dal momento che le analisi sono state svolte a distanza di tre anni dal campionamento.

3.3 IDENTIFICAZIONE DEI LIGANDI DELLA CLASSE L_1 (SIDEROFORI)

L'identificazione dei ligandi è fondamentale per comprendere meglio il ciclo biogeochimico del Fe nell'ambiente marino con particolare riguardo alla sua speciazione e biodisponibilità.

Nonostante l'esito negativo della verifica della concentrazione di Fe_d , si è deciso di impiegare le mix dei campioni ESTRO, in cui precedentemente era stata valutata la speciazione chimica mediante CLE-AdSV [78], oltre a campioni di CELEBeR analizzati in questo studio per la determinazione dei ligandi della classe L_1 (siderofori). In entrambi i casi, infatti, i valori di $\log K'_{FeL}$ erano elevati, sottolineando la presenza di complessi stabili tra Fe_d e L senza

differenze sostanziali tra i campioni, lasciando ipotizzare che i ligandi appartenessero alla classe L₁.

Innanzitutto, si è proceduto con l'acquisizione dei cromatogrammi e spettri degli standard.

La *figura 3.15* mostra il cromatogramma della miscela standard del derivato della stafiloferrina A e della ferriossamina E con le relative correnti ioniche estratte, mentre la *figura 3.16* mostra gli spettri MS e MS/MS dei due composti. La concentrazione di entrambi gli standard è di 20 mg·L⁻¹ e la separazione è avvenuta mediante gradiente di eluizione (*cf. paragrafo 2.4.3*). L'acquisizione del segnale in modalità TIC (*Total Ion Current*) ha permesso di valutare che le condizioni cromatografiche utilizzate separano efficientemente i due composti.

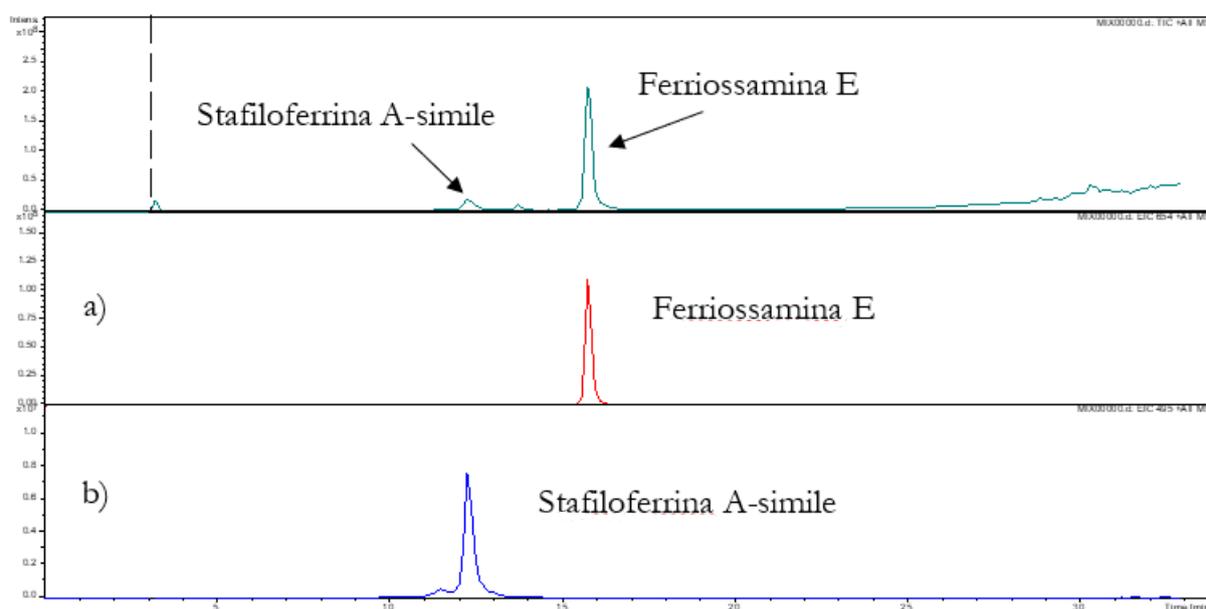
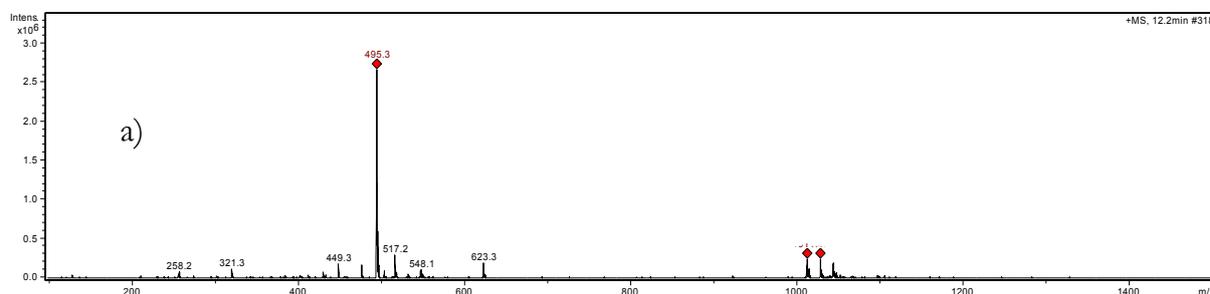


Figura 3.15 – Cromatogramma ottenuto dall'analisi della miscela di standard del derivato della stafiloferrina A e ferriossamina E in modalità TIC con relative correnti ioniche estratte per (a) stafiloferrina A-simile ($m/z \approx 495,3$) e (b) ferriossamina E ($m/z \approx 654,4$)



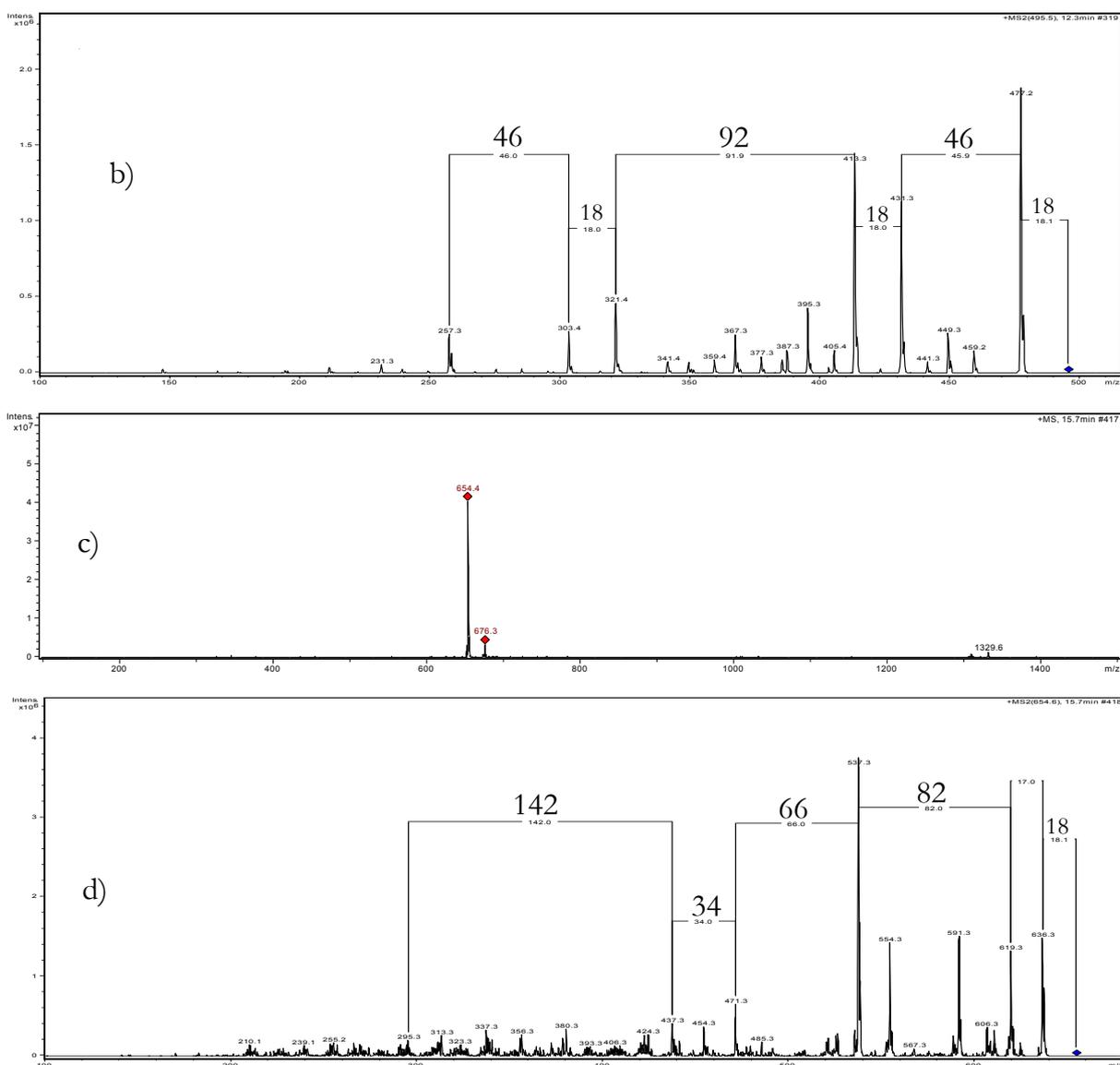


Figura 3.16 – Spettri MS e MS/MS relative ai picchi cromatografici del derivato della stafiloferrina A (a-b) e ferriossamina E (c-d)

La massa relativa al picco base del derivato della stafiloferrina A corrisponde allo ione pseudomolecolare $[M+H]^+$, e quindi $m/z = 495,3$ (Figura 3.16-a). Un confronto con gli spettri MS/MS della stafiloferrina A in letteratura si sono rivelati utili sulla frammentazione di questa molecola. Purtroppo pochi studi sono stati svolti sulla caratterizzazione di tale molecola e, per di più, viene caratterizzata in modalità ionizzazione negativa, rendendo così gli spettri di massa non comparabili con la presente procedura [80]. Sulla base dei frammenti diagnostici e delle perdite di massa più frequenti sono state fatte alcune ipotesi sui frammenti generati; ossia negli spettri MS/MS (Figura 3.16-b) sono stati identificati i seguenti frammenti diagnostici: $m/z = 477,2$; $431,3$; $321,4$ e $257,3$. Facendo una valutazione delle perdite di massa possiamo attribuire al valore 18 la perdita di H_2O , il valore 46 relativo ad una perdita di CH_2O_2 o C_2H_6O , il valore

64 (somma di 46 e 18) attribuibile ad una perdita di C_5H_4 e, infine, il valore 110 (somma di 92 e 18) attribuibile ad una perdita di C_6H_8NO .

La massa del picco base della ferriossamina E corrisponde allo ione pseudomolecolare $[M+H]^+$, e quindi $m/z = 654,3$ (*Figura 3.16-c*). In letteratura sono stati reperiti diversi lavori relativi allo studio della frammentazione in spettrometria di massa della ferriossamina E e, più in generale, dei siderofori idrossamati. Le frammentazioni ottenute dall'analisi della ferriossamina E sono concordanti con quelle riportate nei seguenti studi [55][56][57]. In particolare, negli spettri MS/MS (*Figura 3.16-d*) sono stati identificati i seguenti frammenti diagnostici: $m/z = 636,3$ relativo alla perdita di H_2O ; 619,3 con perdita di N(1)-C(2), C(33)-N(1), (N(7)-O)-Fe e scissione N(7)-O; 537,3 tramite scissione C(6)-N(7), C(11)-N(12) e (N(7)-O)-Fe; $m/z = 471,3$ con perdita di $C_{18}H_{33}N_5O_6Fe^+$; $m/z = 437,3$ risultato dalla scissione in tre posizioni: (1) tra il gruppo α -metilene (C2) e N(1), (2) l'ammide in C(22)-N(23), e (3) (N(29)-O)-Fe, per la perdita neutra di 217,1 u.m.a. corrispondente a $C_9H_{19}N_3O_3$ e, in ultimo, $m/z = 295,3$ relativo alla perdita di $C_{12}H_{10}N_2O_3Fe^+$.

Il metodo per l'estrazione e la preconcentrazione dei siderofori in acqua di mare artificiale è stato ottimizzato in precedenti studi [58][59]. In particolare, tale metodo può essere utilizzato per indagini qualitative confrontando gli spettri di massa dei campioni e quello delle molecole standard.

La linearità della risposta strumentale è stata valutata mediante una curva di calibrazione, iniettando concentrazioni crescenti di ferriossamina E (FOE) e del composto simile alla stafiloferrina A per mettere in relazione l'area del picco ottenuta con la concentrazione del composto. L'intervallo di concentrazione era compreso tra 0,75 e 100 $mg \cdot L^{-1}$ nel caso della FOE e tra 1,25 e 20 $mg \cdot L^{-1}$ nel caso del composto simile alla stafiloferrina A (*Figura 3.17*).

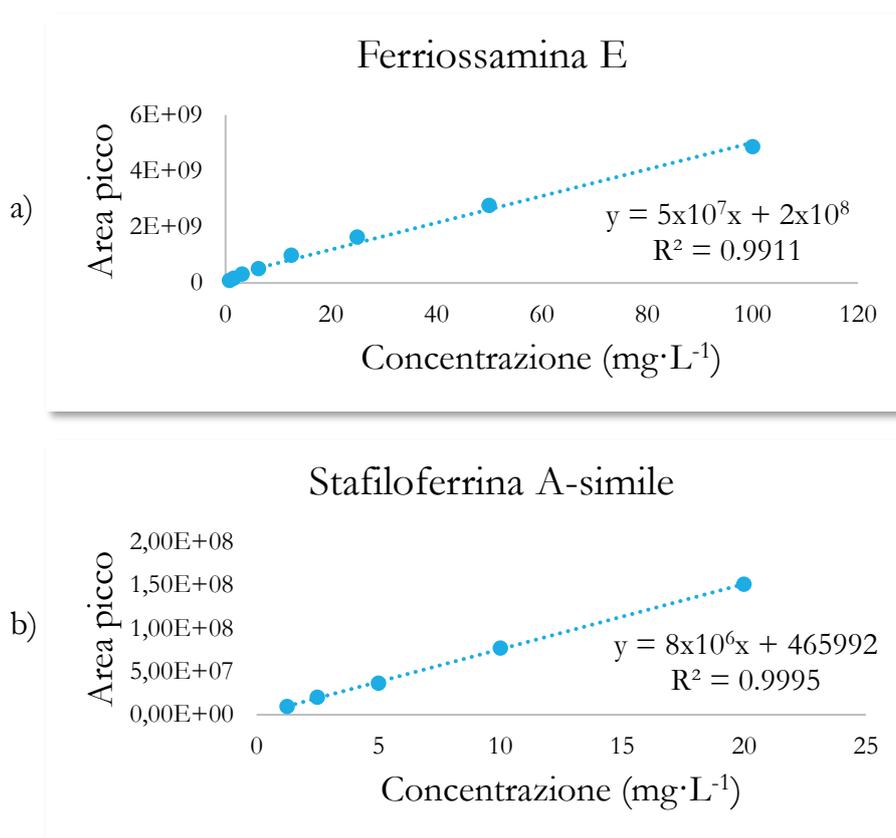


Figura 3.17 – Curva di calibrazione della ferriossamina E (a) e del composto simile alla stafiloferrina (b) [78]

Il coefficiente di determinazione (R^2), rispettivamente di 0,9911 per la ferriossamina E e 0,9995 per il composto derivato della stafiloferrina A, è risultato coerente con quello ottenuto in precedenti prove [84], confermando la buona linearità del metodo all'interno degli intervalli di concentrazione stabiliti. Riguardo il limite di rilevabilità (LOD) calcolato si hanno, rispettivamente, 0,39 mg·L⁻¹ per la ferriossamina E e 0,62 mg·L⁻¹ per il derivato della stafiloferrina A; mentre il limite di quantificazione (LOQ) è di 0,78 e 1,25 mg·L⁻¹ rispettivamente per la ferriossamina E e il derivato della stafiloferrina A.

In figura 3.18 sono messi a confronto il cromatogramma del bianco procedurale (acqua di mare artificiale) e del campione di acqua di mare superficiale prelevato nell'ambito del progetto ESTRO, da cui si può osservare la presenza di picchi nel cromatogramma del campione che non compaiono nel tracciato del bianco.

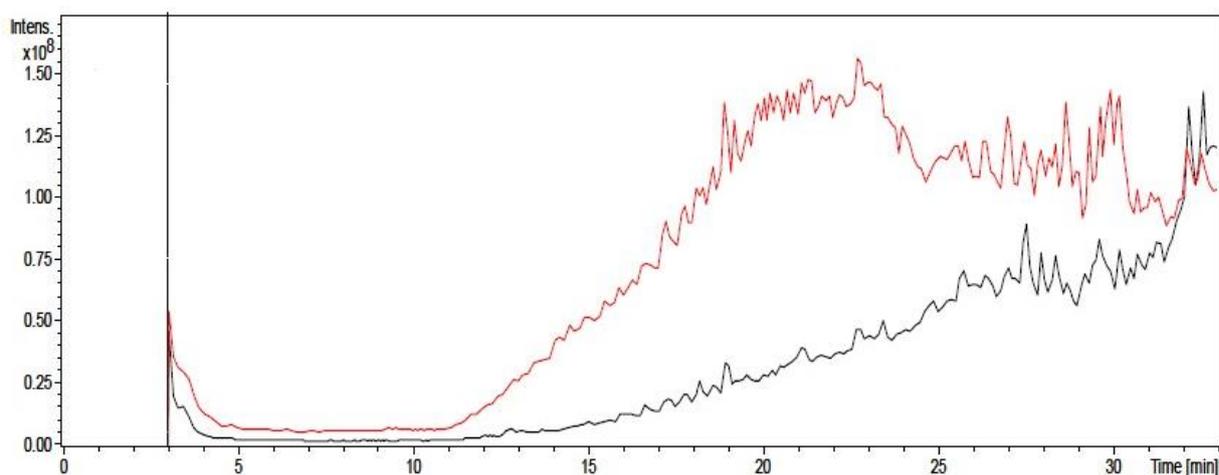


Figura 3.18 – Confronto tra il cromatogramma del bianco procedurale (in nero) e del campione di acqua di mare superficiale (in rosso) [78]

Purtroppo, l'analisi svolta su campioni reali non ha riportato risultati incoraggianti. I cromatogrammi e la successiva analisi degli spettri di massa non hanno mostrato i picchi e i frammenti della ferriossamina E e della stafiloferrina A-simile in questo studio, a differenza di quanto osservato da [78] per campioni del progetto CELEBeR provenienti dall'area costiera di Baia Terra Nova, nei quali era stata identificata la perdita di frammenti con massa 19, 44, 46, 56 e 64 molto simile a quella ottenuta dall'analisi del composto di struttura simile alla stafiloferrina A. Sono pertanto necessari ulteriori approfondimenti e ricerche nelle librerie di spettri per l'individuazione dei composti.

A titolo di esempio in *figura 3.19* sono riportati i picchi cromatografici e le relative correnti ioniche estratte del campione superficiale.

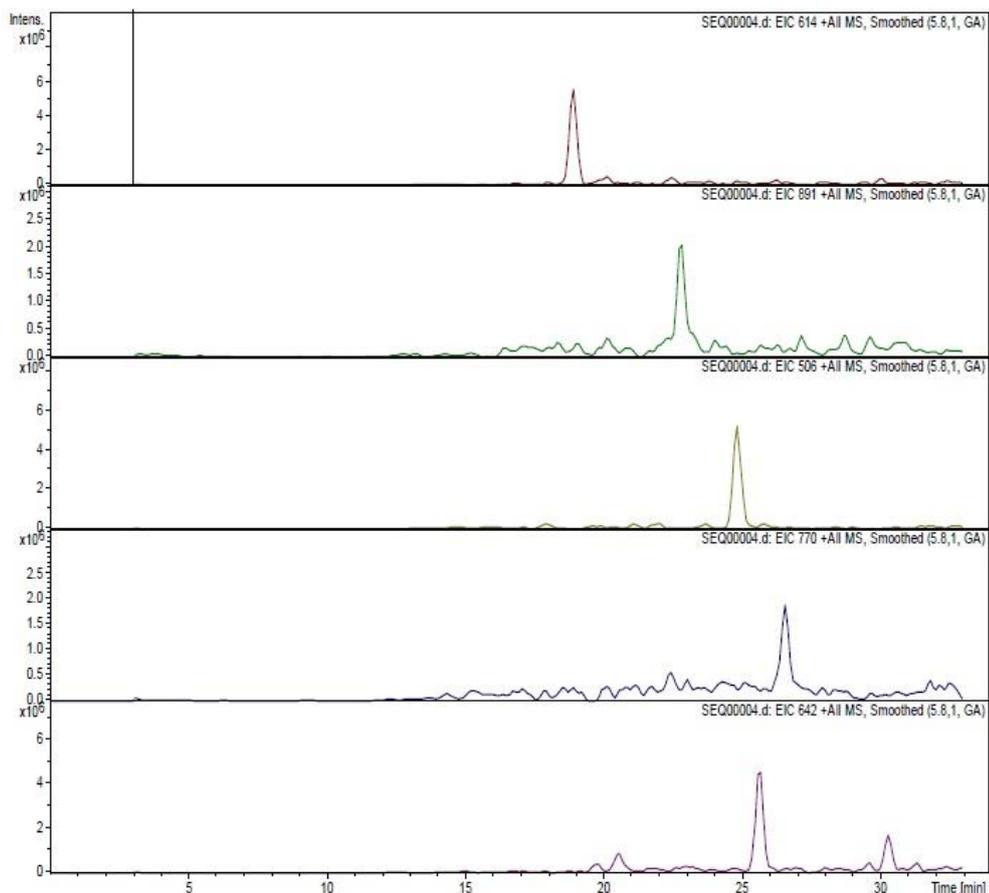


Figura 3.19 – Picchi cromatografici in un campione superficiale con le relative correnti ioniche estratte [78]

Tale risultato può essere attribuito alla concentrazione dei composti inferiore al LOD del metodo, oppure al lungo tempo di conservazione e/o alle svariate manipolazioni dei campioni di acqua che hanno causato una degradazione degli analiti.

4. CONCLUSIONI

Il lavoro di tesi si è articolato, sostanzialmente, in due linee principali:

1. l'applicazione della tecnica voltammetrica di adsorbimento e ridissoluzione catodica (CLE-AdSV) per l'analisi del Fe_d totale previa digestione UV e della sua speciazione nelle acque del settore nordoccidentale del Mare di Ross (Antartide)
2. l'impiego di ICP-MS e di HPLC-ESI-MS/MS per la caratterizzazione di ligandi organici in campioni di acqua di mare prelevata nel settore orientale del Mare di Ross (Antartide).

Per quanto concerne il primo punto, il lavoro svolto si è inserito nell'ambito del progetto CELEBeR, completando le misure sui campioni raccolti durante la campagna oceanografica della XXXII Spedizione del Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA) e fornendo in tal modo un contributo ai suoi obiettivi.

Le concentrazioni di Fe_d totale ottenute con CLE-AdSV sono risultate minori rispetto a quelle ottenute precedentemente sugli stessi campioni con ICP-MS, a causa della lunga conservazione del campione a +4 °C.

Tuttavia, il metodo voltammetrico per la determinazione del Fe_d totale ha confermato l'ottima riproducibilità della misura e rappresenta una valida alternativa ai metodi spettroscopici, essendo più semplice ed economico e presentando il grande vantaggio di poter essere effettuato anche direttamente sul campo.

Lo studio di speciazione del Fe disciolto ha permesso di aggiungere importanti informazioni allo stato di conoscenze sul ciclo biogeochimico di questo elemento nell'area occidentale del Mare di Ross e sul ruolo delle acque circumpolari nel modulare gli apporti di questo micronutriente nella zona di piattaforma.

Il Fe_d è risultato per la quasi totalità complessato a ligandi, la cui concentrazione è risultata elevata, variabile e confrontabile con quella di zone costiere maggiormente produttive dal punto di vista biologico, rispetto all'area di Cape Adare investigata in questo studio.

Gli elevati valori del rapporto tra la concentrazione dei ligandi totali e del ferro disciolto confermano che i ligandi disciolti aumentano la solubilità del Fe, mantenendolo in fase disciolta con concentrazioni elevate.

In base ai valori del $\log K'_{FeL}$ calcolati, il pool dei ligandi appartiene alla classe L_1 , ovvero ligandi che formano complessi con il ferro caratterizzati da elevata stabilità.

L'impiego di un approccio multivariato (PCA) all'analisi della distribuzione dei dati di speciazione e di altre variabili oceanografiche ha permesso di distinguere i campioni in funzione della profondità e delle caratteristiche delle quattro masse d'acqua individuate nella zona di Cape Adare (ASSW, HSSW, CDW, mCDW).

In particolare, AASW e CDW sono risultate caratterizzate da concentrazioni maggiori di Fe_d rispetto a mCDW e HSSW, giustificabili considerato l'apporto di Fe_d rilasciato dalla fusione del ghiaccio marino nel caso delle AASW e confermando in tal modo il ruolo della CDW come sorgente di questo elemento in tracce per la zona di piattaforma del Mare di Ross. La CDW, è anche risultata caratterizzata dai valori più elevati di ligandi e dal maggiore intervallo di valori del rapporto concentrazione di ligandi rispetto alla concentrazione del ferro. L'elevata stabilità dei complessi formati però potrebbe ridurre la biodisponibilità del ferro per gli organismi fitoplanctonici.

La seconda parte dello studio si è incentrata sullo studio dei ligandi del ferro tramite analisi all'HPLC-ESI-MS/MS, previa procedura di estrazione e preconcentrazione su colonnine SPE. Le analisi HPLC-ESI-MS/MS su campioni di acqua di mare prelevata nel settore orientale del mare di Ross hanno evidenziato la presenza di picchi nel cromatogramma dei campioni che non comparivano nel tracciato del bianco procedurale (acqua di mare artificiale).

Purtroppo, l'analisi svolta sui campioni non ha riportato risultati confortanti. Infatti, dal confronto delle frammentazioni degli ioni presenti solo nei campioni con gli spettri MS/MS degli standard disponibili e in base alla ricerca in letteratura non è però stato possibile associare i segnali rilevati nei cromatogrammi ai ligandi di tipo sideroforo.

Tale risultato può essere attribuito a svariate cause: concentrazione dei composti inferiore al LOD del metodo, lungo tempo di conservazione e/o svariate manipolazioni dei campioni di acqua che hanno causato una degradazione degli analiti.

Tuttavia, non si può escludere la presenza nei campioni di altre classi di ligandi organici del ferro, oltre a quelle considerate. Infatti, il campione in cui è stato riscontrato il maggior numero di picchi nel cromatogramma e di frammenti nello spettro MS/MS era costituito da acqua superficiale, lasciando supporre che essi siano collegati alla presenza di ligandi organici prodotti da organismi fitoplanctonici e rilasciati attraverso escrezione o essudazione cellulare.

5. BIBLIOGRAFIA

- [1] «Antartide - Blog sulla meteorologia e tutte le dinamiche ad essa correlate». [Online]. Disponibile su: <https://portaledellameteorologia.it/antartide/>
- [2] «Thermohaline circulation | Global Ocean Conveyor Belt, Water Density & Climate Effects | Britannica». [Online]. Disponibile su: <https://www.britannica.com/science/thermohaline-circulation>
- [3] «Antartide | PNRA». [Online]. Disponibile su: <https://www.pnra.aq/it/antartide>
- [4] L. J. A. Gerringa, P. Laan, K. R. Arrigo, G. L. van Dijken, e A.-C. Alderkamp, «The organic complexation of iron in the Ross sea», *Mar. Chem.*, vol. 215, 2019, doi: 10.1016/j.marchem.2019.103672.
- [5] G. Budillon *et al.*, «An optimum multiparameter mixing analysis of the shelf waters in the Ross Sea», *Antarct. Sci.*, vol. 15, fasc. 1, pp. 105–118, 2003, doi: 10.1017/S095410200300110X.
- [6] G. Budillon, S. Gremes Cordero, e E. Salusti, «On the dense water spreading off the Ross Sea shelf (Southern Ocean)», *J. Mar. Syst.*, vol. 35, fasc. 3–4, pp. 207–227, 2002, doi: 10.1016/S0924-7963(02)00082-9.
- [7] G. Budillon e G. Spezie, «Thermohaline structure and variability in the Terra Nova Bay polynya, Ross Sea», *Antarct. Sci.*, vol. 12, fasc. 4, pp. 493–508, 2000, doi: 10.1017/s0954102000000572.
- [8] D. D. Kurtz e D. H. Bromwich, «Satellite observed behaviour of the Terra Nova Bay polynya (Antarctica).», *J. Geophys. Res.*, vol. 88, fasc. C14, pp. 9717–9722, 1983, doi: 10.1029/JC088iC14p09717.
- [9] S. S. Jacobs, R. G. Fairbanks, e Y. Horibe, «Origin and Evolution of Water Masses Near the Antarctic continental Margin: Evidence from H218O/H216O Ratios in Seawater», in *Oceanology of the Antarctic Continental Shelf*, American Geophysical Union (AGU), 1985, pp. 59–85. doi: 10.1029/AR043p0059.
- [10] G. Budillon, P. Castagno, S. Aliani, G. Spezie, e L. Padman, «Thermohaline variability and Antarctic bottom water formation at the Ross Sea shelf break», *Deep-Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, vol. 58, fasc. 10, pp. 1002–1018, 2011, doi: 10.1016/j.dsr.2011.07.002.
- [11] E. Ibanami, S. G. Sander, P. W. Boyd, A. R. Bowie, e K. A. Hunter, «Vertical distributions of iron-(III) complexing ligands in the Southern Ocean», *Deep-Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 58, fasc. 21–22, pp. 2113–2125, 2011, doi: 10.1016/j.dsr2.2011.05.028.

- [12] P. W. Boyd e M. J. Ellwood, «The biogeochemical cycle of iron in the ocean», *Nat. Geosci.*, vol. 3, fasc. 10, pp. 675–682, 2010, doi: 10.1038/ngeo964.
- [13] M. M. Abualhaja e C. M. G. van den Berg, «Chemical speciation of iron in seawater using catalytic cathodic stripping voltammetry with ligand competition against salicylaldoxime», *Mar. Chem.*, vol. 164, pp. 60–74, 2014, doi: 10.1016/j.marchem.2014.06.005.
- [14] M. Gledhill e K. N. Buck, «The organic complexation of iron in the marine environment: A review», *Front. Microbiol.*, vol. 3, fasc. FEB, 2012, doi: 10.3389/fmicb.2012.00069.
- [15] J. Wu e E. A. Boyle, «Low Blank Preconcentration Technique for the Determination of Lead, Copper, and Cadmium in Small-Volume Seawater Samples by Isotope Dilution ICPMS», *Anal. Chem.*, vol. 69, fasc. 13, pp. 2464–2470, 1997, doi: 10.1021/ac961204u.
- [16] M. G. Constant e D. Van Berg, «Chemical speciation of iron in seawater by cathodic stripping voltammetry with dihydroxynaphthalene», *Anal. Chem.*, vol. 78, fasc. 1, pp. 156–163, 2006, doi: 10.1021/ac051441+.
- [17] K. A. Hunter e P. W. Boyd, «Iron-binding ligands and their role in the ocean biogeochemistry of iron», *Environ. Chem.*, vol. 4, fasc. 4, pp. 221–232, 2007, doi: 10.1071/EN07012.
- [18] B. A. Bergquist, J. Wu, e E. A. Boyle, «Variability in oceanic dissolved iron is dominated by the colloidal fraction», *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 71, fasc. 12, pp. 2960–2974, 2007, doi: 10.1016/j.gca.2007.03.013.
- [19] A. Tagliabue, A. R. Bowie, P. W. Boyd, K. N. Buck, K. S. Johnson, e M. A. Saito, «The integral role of iron in ocean biogeochemistry», *Nature*, vol. 543, fasc. 7643, pp. 51–59, 2017, doi: gled.
- [20] D. Lannuzel, V. Schoemann, J. de Jong, J.-L. Tison, e L. Chou, «Distribution and biogeochemical behaviour of iron in the East Antarctic sea ice», *Mar. Chem.*, vol. 106, fasc. 1-2 SPEC. ISS., pp. 18–32, 2007, doi: 10.1016/j.marchem.2006.06.010.
- [21] M. Grotti, F. Soggia, C. Ianni, e R. Frache, «Trace metals distributions in coastal sea ice of Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica», *Antarct. Sci.*, vol. 17, fasc. 2, pp. 289–300, 2005, doi: 10.1017/S0954102005002695.
- [22] J. De Jong *et al.*, «Iron in land-fast sea ice of McMurdo Sound derived from sediment resuspension and wind-blown dust attributes to primary productivity in the Ross Sea, Antarctica», *Mar. Chem.*, vol. 157, pp. 24–40, 2013, doi: 10.1016/j.marchem.2013.07.001.

- [23] D. Lannuzel *et al.*, «Iron in sea ice: Review & new insights», *Elementa*, vol. 4, 2016, doi: 10.12952/journal.elementa.000130.
- [24] P. W. Boyd *et al.*, «Mesoscale iron enrichment experiments 1993-2005: Synthesis and future directions», *Science*, vol. 315, fasc. 5812, pp. 612–617, 2007, doi: 10.1126/science.1131669.
- [25] P. J. Worsfold, M. C. Lohan, S. J. Ussher, e A. R. Bowie, «Determination of dissolved iron in seawater: A historical review», *Mar. Chem.*, vol. 166, pp. 25–35, 2014, doi: 10.1016/j.marchem.2014.08.009.
- [26] C. Sweeney *et al.*, «Biogeochemical regimes, net community production and carbon export in the Ross Sea, Antarctica», *Deep-Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 47, fasc. 15–16, pp. 3369–3394, 2000, doi: 10.1016/S0967-0645(00)00072-2.
- [27] M. R. Dennett, S. Mathot, D. A. Caron, W. O. Smith Jr., e D. J. Lonsdale, «Abundance and distribution of phototrophic and heterotrophic nano- and microplankton in the southern Ross Sea», *Deep-Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 48, fasc. 19–20, pp. 4019–4037, 2001, doi: 10.1016/S0967-0645(01)00079-0.
- [28] W. O. Smith, J. Marra, M. R. Hiscock, e R. T. Barber, «The seasonal cycle of phytoplankton biomass and primary productivity in the Ross Sea, Antarctica», *Deep-Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 47, fasc. 15–16, pp. 3119–3140, 2000, doi: 10.1016/S0967-0645(00)00061-8.
- [29] J.-E. Tremblay e W. O. Smith Jr., «Chapter 8 Primary Production and Nutrient Dynamics in Polynyas», *Elsevier Oceanogr. Ser.*, vol. 74, pp. 239–269, 2007, doi: 10.1016/S0422-9894(06)74008-9.
- [30] G. R. DiTullio e W. O. Smith, «Spatial patterns in phytoplankton biomass and pigment distributions in the Ross Sea», *J. Geophys. Res. Oceans*, vol. 101, fasc. C8, pp. 18467–18477, 1996, doi: 10.1029/96JC00034.
- [31] W. O. Smith *et al.*, «Phytoplankton photosynthetic pigments in the Ross Sea: Patterns and relationships among functional groups», *J. Mar. Syst.*, vol. 82, fasc. 3, pp. 177–185, 2010, doi: 10.1016/j.jmarsys.2010.04.014.
- [32] N. Mochizuki *et al.*, «The cell biology of tetrapyrroles: A life and death struggle», *Trends Plant Sci.*, vol. 15, fasc. 9, pp. 488–498, 2010, doi: 10.1016/j.tplants.2010.05.012.
- [33] C. F. Sukekava, J. Downes, M. Filella, B. Vilanova, e L. M. Laglera, «Ligand exchange provides new insight into the role of humic substances in the marine iron cycle», *Geochim. Cosmochim. Acta*, vol. 366, pp. 17–30, 2024, doi: 10.1016/j.gca.2023.12.007.

- [34] P. V. Bhaskar e N. B. Bhosle, «Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes», *Curr. Sci.*, vol. 88, fasc. 1, pp. 45–53, 2005.
- [35] D. Bhatia *et al.*, «Fluorescence detection to determine proteins and humic-like substances fingerprints of exopolymeric substances (EPS) from biological sludges performed by size exclusion chromatography (SEC)», *Bioresour. Technol.*, vol. 131, pp. 159–165, 2013, doi: 10.1016/j.biortech.2012.12.078.
- [36] F. Ardini, E. Magi, e M. Grotti, «Determination of ultratrace levels of dissolved metals in seawater by reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry after ammonia induced magnesium hydroxide coprecipitation», *Anal. Chim. Acta*, vol. 706, fasc. 1, pp. 84–88, 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.07.046.
- [37] J. H. Martin e R. Michael Gordon, «Northeast Pacific iron distributions in relation to phytoplankton productivity», *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, vol. 35, fasc. 2, pp. 177–196, 1988, doi: 10.1016/0198-0149(88)90035-0.
- [38] M. J. Ellwood, P. W. Boyd, e P. Sutton, «Winter-time dissolved iron and nutrient distributions in the Subantarctic Zone from 40-52S; 155-160E», *Geophys. Res. Lett.*, vol. 35, fasc. 11, 2008, doi: 10.1029/2008GL033699.
- [39] M. Grotti, M. L. Abemoschi, F. Soggia, e R. Frache, «Determination of trace metals in sea-water by electrothermal atomic absorption spectrometry following solid-phase extraction: Quantification and reduction of residual matrix effects», *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 17, fasc. 1, pp. 46–51, 2002, doi: 10.1039/b108225f.
- [40] L. Yang, S. Willie, e R. E. Sturgeon, «Determination of total chromium in seawater with isotope dilution sector field ICP-MS following on-line matrix separation», *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 24, fasc. 7, pp. 958–963, 2009, doi: 10.1039/b900554d.
- [41] J. Wu e E. A. Boyle, «Determination of iron in seawater by high-resolution isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry after Mg(OH)₂ coprecipitation», *Anal. Chim. Acta*, vol. 367, fasc. 1–3, pp. 183–191, 1998, doi: 10.1016/S0003-2670(98)00145-7.
- [42] L. M. Laglera e D. Monticelli, «Iron detection and speciation in natural waters by electrochemical techniques: A critical review», *Curr. Opin. Electrochem.*, vol. 3, fasc. 1, pp. 123–129, 2017, doi: 10.1016/j.coelec.2017.07.007.
- [43] P. L. Croot, K. Andersson, M. Öztürk, e D. R. Turner, «The distribution and speciation of iron along 6°E in the Southern Ocean», *Deep-Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 51, fasc. 22–24, pp. 2857–2879, 2004, doi: 10.1016/j.dsr2.2003.10.012.

- [44] L. J. A. Gerringa *et al.*, «Fe-binding dissolved organic ligands near the Kerguelen Archipelago in the Southern Ocean (Indian sector)», *Deep-Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 55, fasc. 5–7, pp. 606–621, 2008, doi: 10.1016/j.dsr2.2007.12.007.
- [45] P. Rivaro *et al.*, «Analysis of physical and biogeochemical control mechanisms on summertime surface carbonate system variability in the western Ross Sea (Antarctica) using in situ and satellite data», *Remote Sens.*, vol. 11, fasc. 3, 2019, doi: 10.3390/rs11030238.
- [46] M. Gledhill e C. M. G. van den Berg, «Measurement of the redox speciation of iron in seawater by catalytic cathodic stripping voltammetry», *Mar. Chem.*, vol. 50, fasc. 1–4, pp. 51–61, 1995, doi: 10.1016/0304-4203(95)00026-N.
- [47] P. L. Croot e M. Johansson, «Determination of iron speciation by cathodic stripping voltammetry in seawater using the competing ligand 2-(2-thiazolylazo)-p-cresol (TAC)», *Electroanalysis*, vol. 12, fasc. 8, pp. 565–576, 2000, doi: 10.1002/(SICI)1521-4109(200005)12:8<565::AID-ELAN565>3.0.CO;2-L.
- [48] M. Boye *et al.*, «The chemical speciation of iron in the north-east Atlantic Ocean», *Deep-Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, vol. 53, fasc. 4, pp. 667–683, 2006, doi: 10.1016/j.dsr.2005.12.015.
- [49] K. N. Buck, J. Moffett, K. A. Barbeau, R. M. Bundy, Y. Kondo, e J. Wu, «The organic complexation of iron and copper: An intercomparison of competitive ligand exchange-adsorptive cathodic stripping voltammetry (CLE-ACSV) techniques», *Limnol. Oceanogr. Methods*, vol. 10, fasc. JULY, pp. 496–515, 2012, doi: 10.4319/lom.2012.10.496.
- [50] L. J. A. Gerringa, M. J. A. Rijkenberg, C.-E. Thuróczy, e L. R. M. Maas, «A critical look at the calculation of the binding characteristics and concentration of iron complexing ligands in seawater with suggested improvements», *Environ. Chem.*, vol. 11, fasc. 2, pp. 114–136, 2014, doi: 10.1071/EN13072.
- [51] J. D’Andrilli, T. Dittmar, B. P. Koch, J. M. Purcell, A. G. Marshall, e W. T. Cooper, «Comprehensive characterization of marine dissolved organic matter by fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization», *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 24, fasc. 5, pp. 643–650, 2010, doi: 10.1002/rcm.4421.
- [52] I. Velasquez, B. L. Nunn, E. Ibisani, D. R. Goodlett, K. A. Hunter, e S. G. Sander, «Detection of hydroxamate siderophores in coastal and Sub-Antarctic waters off the South Eastern Coast of New Zealand», *Mar. Chem.*, vol. 126, fasc. 1–4, pp. 97–107, 2011, doi: 10.1016/j.marchem.2011.04.003.

- [53] T. Dittmar, B. Koch, N. Hertkorn, e G. Kattner, «A simple and efficient method for the solid-phase extraction of dissolved organic matter (SPE-DOM) from seawater», *Limnol. Oceanogr. Methods*, vol. 6, fasc. 6, pp. 230–235, 2008, doi: 10.4319/lom.2008.6.230.
- [54] E. Mawji, M. Z. Gledhill, P. J. Worsfold, e E. P. Achterberg, «Collision-induced dissociation of three groups of hydroxamate siderophores: Ferrioxamines, ferrichromes and coprogens/fusigens», *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 22, fasc. 14, pp. 2195–2202, 2008, doi: 10.1002/rcm.3604.
- [55] L. Zhang, D.-X. Yuan, K. Fang, e B.-M. Liu, «Determination of siderophores in seawater by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with solid phase extraction», *Chin. J. Anal. Chem.*, vol. 43, fasc. 9, pp. 1285–1290, 2015, doi: 10.1016/S1872-2040(15)60854-4.
- [56] P. McCormack, P. J. Worsfold, e M. Gledhill, «Separation and detection of siderophores produced by marine bacterioplankton using high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry», *Anal. Chem.*, vol. 75, fasc. 11, pp. 2647–2652, 2003, doi: 10.1021/ac0340105.
- [57] M. Dubois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, e F. Smith, «Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances», *Anal. Chem.*, vol. 28, fasc. 3, pp. 350–356, 1956, doi: 10.1021/ac60111a017.
- [58] B. Schwyn e J. B. Neilands, «Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores», *Anal. Biochem.*, vol. 160, fasc. 1, pp. 47–56, 1987, doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.
- [59] D. B. Alexander e D. A. Zuberer, «Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria», *Biol. Fertil. Soils*, vol. 12, fasc. 1, pp. 39–45, 1991, doi: 10.1007/BF00369386.
- [60] A. A. Albalasmeh, A. A. Berhe, e T. A. Ghezzehei, «A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry», *Carbohydr. Polym.*, vol. 97, fasc. 2, pp. 253–261, 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2013.04.072.
- [61] S. van den Berg, «UV digestion apparatus». [Online]. Disponibile su: https://pcwww.liv.ac.uk/~sn35/Site/UV_digestion_apparatus.html
- [62] G. Prati, «Potenziali sorgenti di ferro disciolto e particellato nelle acque del Mare di Ross Occidentale (Antartide)», Tesi di laurea in Scienze Chimiche, Università degli studi di Genova, a.a 2017-2018.

- [63] E. Verardo, «Confronto tra metodi voltammetrici e spettroscopici per la determinazione di ferro disciolto totale e della sua biodisponibilità nel Mare di Ross (Antartide)», Tesi di laurea in Scienze Chimiche, Università degli studi di Genova, a.a 2017-2018.
- [64] A. Astegiano, «Analisi della speciazione del ferro disciolto in campioni di acqua di mare antartica tramite CLE-AdSV», Tesi di laurea in Scienze Chimiche, Università degli studi di Genova, a.a 2020-2021.
- [65] L. J. A. Gerringa, P. M. J. Herman, e T. C. W. Poortvliet, «Comparison of the linear Van den Berg/Ružić transformation and a non-linear fit of the Langmuir isotherm applied to Cu speciation data in the estuarine environment», *Mar. Chem.*, vol. 48, fasc. 2, pp. 131–142, 1995, doi: 10.1016/0304-4203(94)00041-B.
- [66] C. M. G. Van Den Berg, M. Nimmo, P. Daly, e D. R. Turner, «Effects of the detection window on the determination of organic copper speciation in estuarine waters», *Anal. Chim. Acta*, vol. 232, fasc. C, pp. 149–159, 1990, doi: 10.1016/S0003-2670(00)81231-3.
- [67] S. C. Apte, M. J. Gardner, e J. E. Ravenscroft, «An evaluation of voltammetric titration procedures for the determination of trace metal complexation in natural waters by use of computers simulation», *Anal. Chim. Acta*, vol. 212, fasc. C, pp. 1–21, 1988, doi: 10.1016/S0003-2670(00)84124-0.
- [68] P. Rivaro *et al.*, «Mesoscale variability related to iron speciation in a coastal Ross Sea area (Antarctica) during summer 2014», *Chem. Ecol.*, vol. 35, fasc. 1, pp. 1–19, 2019, doi: 10.1080/02757540.2018.1531987.
- [69] C.-E. Thuróczy *et al.*, «Key role of organic complexation of iron in sustaining phytoplankton blooms in the Pine Island and Amundsen Polynyas (Southern Ocean)», *Deep-Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 71–76, pp. 49–60, 2012, doi: 10.1016/j.dsr2.2012.03.009.
- [70] R. F. Nolting, L. J. A. Gerringa, M. J. W. Swagerman, K. R. Timmermans, e H. J. W. De Baar, «Fe (III) speciation in the high nutrient, low chlorophyll Pacific region of the Southern Ocean», *Mar. Chem.*, vol. 62, fasc. 3–4, pp. 335–352, 1998, doi: 10.1016/S0304-4203(98)00046-2.
- [71] R. Leardi, C. Melzi, G. Polotti, «CAT (Chemometric Agile Tool)». [Online]. Disponibile su: <https://www.gruppochemiometria.it/index.php/software/19-download-the-r-based-chemometric-software>

- [72] M. Celussi, B. Cataletto, S. Fonda Umani, e P. Del Negro, «Depth profiles of bacterioplankton assemblages and their activities in the Ross Sea», *Deep-Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, vol. 56, fasc. 12, pp. 2193–2205, 2009, doi: 10.1016/j.dsr.2009.09.001.
- [73] K. N. Buck, B. Sohst, e P. N. Sedwick, «The organic complexation of dissolved iron along the U.S. GEOTRACES (GA03) North Atlantic Section», *Deep-Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, vol. 116, pp. 152–165, 2015, doi: 10.1016/j.dsr2.2014.11.016.
- [74] W. O. Smith, P. N. Sedwick, K. R. Arrigo, D. G. Ainley, e A. H. Orsi, «The Ross Sea in a sea of change», *Oceanography*, vol. 25, fasc. 3, pp. 90–103, 2012, doi: 10.5670/oceanog.2012.80.
- [75] M. Grotti, F. Soggia, F. Ardini, e R. Frache, «Determination of sub-nanomolar levels of iron in sea-water using reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry after Mg(OH)₂ coprecipitation», *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 24, fasc. 4, pp. 522–527, 2009, doi: 10.1039/b818236a.
- [76] B. Cossu, «Analisi elementare di acqua di mare antartica», Tesi di laurea in Scienze Chimiche, Università degli studi di Genova, a.a 2020-2021.
- [77] M. A. Vieira, B. Welz, e A. J. Curtius, «Determination of arsenic in sediments, coal and fly ash slurries after ultrasonic treatment by hydride generation atomic absorption spectrometry and trapping in an iridium-treated graphite tube», presentato al *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 2002, pp. 2057–2067. doi: 10.1016/S0584-8547(02)00211-2.
- [78] D. Vivado, «Study of iron speciation in antarctic marine matrices in relation to climate change», tesi di doctorate in “Science and Technologies of Chemistry and Materials” Curriculum: Chemical sciences and technologies XXXV Ciclo Università degli studi di Genova, 2023.
- [79] P. Rivaro *et al.*, «Combined effects of hydrographic structure and iron and copper availability on the phytoplankton growth in Terra Nova Bay Polynya (Ross Sea, Antarctica)», *Deep-Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, vol. 62, pp. 97–110, 2012, doi: 10.1016/j.dsr.2011.12.008.
- [80] F. C. Beasley *et al.*, «Characterization of staphyloferrin A biosynthetic and transport mutants in *Staphylococcus aureus*», *Mol. Microbiol.*, vol. 72, fasc. 4, pp. 947–963, 2009, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06698.x.
- [81] M. Gledhill, «Electrospray ionisation-mass spectrometry of hydroxamate siderophores», *Analyst*, vol. 126, fasc. 8, pp. 1359–1362, 2001, doi: 10.1039/b101268l.

- [82] A. M. Sidebottom, J. A. Karty, e E. E. Carlson, «Accurate Mass MS/MS/MS Analysis of Siderophores Ferrioxamine B and E1 by Collision-Induced Dissociation Electrospray Mass Spectrometry», *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, vol. 26, fasc. 11, pp. 1899–1902, 2015, doi: 10.1007/s13361-015-1242-7.
- [83] M. Pelissetto, «Distribuzione di ferro disciolto nel Mare di Ross orientale (Antartide) e sviluppo di metodi analitici per la caratterizzazione dei suoi ligandi organici», Tesi di laurea in Scienze Chimiche, Università degli studi di Genova, a.a 2021-2022.
- [84] P. Rivaro, D. Vivado, C. Ianni, A. Salis, A. Parodi, e E. Millo, «A New Approach to Characterize Siderophore-Type Ligands in Seawater by Solid Phase Synthesis and SPE-HPLC-ESI-MS/MS Analysis», *J. Mar. Sci. Eng.*, vol. 12, fasc. 1, 2024, doi: 10.3390/jmse12010110.