

**DETERMINAZIONE DEL TASSO DI CRESCITA
DELL'ALGA *CORALLINA ELONGATA* (RHODOPHYTA)
IN AMBIENTE CONTROLLATO E IN AMBIENTE NATURALE
TRAMITE L'UTILIZZO DEI MARCATORI
ALIZARIN (RED) E CALCOFLUOR WHITE**

L. DE MARCHI, M. NANNINI, G. CERRATI, A. BORDONE, C. LOMBARDI

ENEA – Ambiente Marino e Sviluppo Sostenibile
Centro Ricerche Ambiente Marino S. Teresa, La Spezia

STEFANO ALIANI

CNR-ISMAR

FEDERICA RAGAZZOLA

The Department of Earth Sciences
University of Bristol, Bristol UK



AGENZIA NAZIONALE PER LE NUOVE TECNOLOGIE,
L'ENERGIA E LO SVILUPPO ECONOMICO SOSTENIBILE

DETERMINAZIONE DEL TASSO DI CRESCITA
DELL'ALGA *CORALLINA ELONGATA* (RHODOPHYTA)
IN AMBIENTE CONTROLLATO E IN AMBIENTE NATURALE
TRAMITE L'UTILIZZO DEI MARCATORI
ALIZARIN (RED) E CALCOFLUOR WHITE

L. DE MARCHI, M. NANNINI, G. CERRATI, A. BORDONE, C. LOMBARDI

ENEA – Ambiente Marino e Sviluppo Sostenibile
Centro Ricerche Ambiente Marino S. Teresa, La Spezia

STEFANO ALIANI

CNR-ISMAR

FEDERICA RAGAZZOLA

The Department of Earth Sciences
University of Bristol, Bristol UK

I Rapporti tecnici sono scaricabili in formato pdf dal sito web ENEA alla pagina
<http://www.enea.it/it/produzione-scientifica/rapporti-tecnici>

I contenuti tecnico-scientifici dei rapporti tecnici dell'ENEA rispecchiano l'opinione degli autori e non necessariamente quella dell'Agenzia.

The technical and scientific contents of these reports express the opinion of the authors but not necessarily the opinion of ENEA.

DETERMINAZIONE DEL TASSO DI CRESCITA DELL'ALGA *CORALLINA ELONGATA* (RHODOPHYTA) IN AMBIENTE CONTROLLATO E IN AMBIENTE NATURALE TRAMITE L'UTILIZZO DEI MARCATORI ALIZARIN (RED) E CALCOFLUOR WHITE

L. DE MARCHI, M. NANNINI, G. CERRATI, A. BORDONE, S. ALIANI, C. LOMBARDI, F. RAGAZZOLA

Riassunto

L'ordine Corallinales (Rhodophyta) è caratterizzato da alghe calcaree in grado di costruire strutture biogeniche giocando un ruolo chiave come promotori di biodiversità e produttori di carbonato di calcio. Per la loro importanza come indicatori ambientali, è stato effettuato uno studio con lo scopo di acquisire dati relativi al tasso di crescita di *Corallina elongata* in ambiente naturale (Lerici, La Spezia) e controllato utilizzando due diversi tipi di marcatori: Alizarin (red) e Calcofluor white. I risultati ottenuti hanno mostrato il successo dell'Alizarin (red) rispetto al Calcofluor white. Per quanto riguarda i tassi di crescita *C. elongata*, è cresciuta maggiormente in condizioni naturali rispetto a quelle controllate. Sono state trovate, inoltre, differenze statisticamente significative nei tassi di crescita in ambiente naturale dopo 30 e 90 giorni, con una crescita maggiore nei primi 30 giorni. Tali differenze potrebbero essere attribuite alla presenza del bivalve *Mytilus galloprovincialis* nell'area di studio.

Parole chiave: Alghe corallinacee, *Corallina elongata*, Alizarin (red), Calcofluor white, tasso di crescita.

Abstract

The order Corallinales (Rhodophyta) is characterized by calcareous algae able to build biogenic structures, thus playing a key-role as marine biodiversity promoters and as calcium carbonate producers. Due to their importance as environmental bio-indicators, a pilot study of the growth rate of Corallina elongata was conducted in its natural condition (Lerici, La Spezia) and laboratory setting using two staining methods with Alizarin (red) and Calcofluor white. The results show the success of Alizarin (red) as a growth marker compared to Calcofluor white. C. elongata showed a higher growth rates in situ compare to the cultured specimen. Moreover there is a significant differences between the growth rate in natural conditions after 30 and 90 days, with a decrease in growth rates after 30 days. This differences are likely to be related to the increase of Mytilus galloprovincialis population which occupies the same habitat zone of C. elongata.

Keywords: Coralline algae, *Corallina elongata*, Alizarin (red), Calcofluor white, growth rate.

INDICE

1.INTRODUZIONE.....	pag. 7
2.MATERIALE E METODI.....	9
2.1.Sito di studio.....	9
2.2.Allestimento del laboratorio.....	10
2.3. Marcatura di <i>Corallina elongata</i> con Calcofluor white e Alizarin (red).....	10
2.3.1.Attività di campo.....	10
2.3.2.Attività di laboratorio.....	11
2.4.Tasso di crescita.....	11
2.4.1. Analisi statistica.....	12
3.RISULTATI.....	12
4.DISCUSSIONE.....	16
5.RINGRAZIAMENTI.....	20
6.BIBLIOGRAFIA.....	20

1. INTRODUZIONE

Le Corallinales (Corallinaceae, Rhodophyceae) sono alghe calcaree che appartengono alla classe delle Florideophyceae. Hanno origine da una base incrostante da cui sviluppano diversi 'habitus' di crescita: forme articolate con talli a portamento eretto, non articolate con talli liberi dal substrato, forme erette con talli incrostanti, laminari, provvisti di escrescenze e forme prostrate con talli incrostanti, laminari, privi di escrescenze (Pueschel *et al.*, 1996).

Queste alghe sono abbondantemente diffuse lungo le coste di tutto il mondo, dalle regioni tropicali fino a quelle polari (Steneck, 1986) e si distribuiscono dal piano infralitorale superiore fino a quello circalitorale. Tra le principali componenti degli ecosistemi bentonici, le Corallinales svolgono un ruolo fondamentale dal punto di vista biologico ed ecologico (Foster, 2001, 2013) aumentando la complessità tridimensionale dell'habitat grazie alla complessità delle loro strutture. Quando i talli di queste alghe aderiscono ad un substrato duro possono edificare “bioconcrezionamenti” o “formazioni biocostruite” (Laborel *et al.*, 1994; Bellan & Santini, 1994) favorendo l'insediamento di molti organismi che trovano rifugio nelle loro strutture (es. nursery area) (Taylor, 1984; Arsenault & Himmelman, 1996; Lewis & Eby, 2002) giocando, così, un ruolo chiave nella promozione della biodiversità (Moberg & Folke, 1999). La loro presenza e distribuzione, il tasso di crescita e la deposizione di carbonato di calcio ad alto contenuto di magnesio (Mg) le rendono indicatori biologici capaci di fornire informazioni sui cambiamenti dell'ambiente in cui vivono. Inoltre, la loro abbondanza e la capacità di accumulo di cristalli di carbonato di calcio nella loro parete cellulare, le rendono organismi di fondamentale importanza nel ciclo del carbonio. La calcificazione è direttamente correlata al processo fotosintetico (Digby, 1977; Borowitzka, 1982) ed è stata osservata la presenza di bande di crescita, la cui deposizione avviene nelle diverse stagioni (estate e inverno), visibile sotto forma di successione di cellule a pareti sottili e cellule a pareti ispessite (Bressan & Tomini, 1981; Halfar *et al.*, 2000; Foster, 2001; Blake & Maggs, 2003; Kamenos *et al.*, 2008).

I tassi di crescita per le alghe incrostanti possono superare i 2–3 mm x mese⁻¹ (Gardiner, 1931; Adey & Vassar, 1975; Steneck, 1985), ma generalmente sono <1 mm x mese⁻¹ (Littler, 1972; Steneck & Adey, 1976; Johansen, 1981; Matsuda, 1989). Per le alghe corallinacee con un tallo di natura eretto invece, i tassi di crescita sono più veloci, circa 5 mm x mese⁻¹ (Haas *et al.*, 1935; Smith, 1972), con una media di 1,5-2 mm x mese⁻¹ (Johansen & Austin, 1970; Pearse, 1972; Andrade & Johansen, 1980, Blake & Maggs, 2003).

La natura dello scheletro delle alghe corallinacee (high-Mg calcite) le rende tra gli organismi più vulnerabili alle variazioni di pH e temperatura in ambiente marino (Halfar *et al.*, 2000 e 2008; Kamenos *et al.*, 2008; Malusà *et al.*, 2009; Ries 2011; Ragazzola *et al.*, 2013) quindi soggette a risentire più direttamente l'incremento della concentrazione di CO₂ che sta modificando

rapidamente il sistema dei carbonati in acqua (pressione parziale di anidride carbonica ($p\text{CO}_2$), pH, alcalinità e stato di saturazione del carbonato di calcio) (Feely *et al.*, 2004; Orr *et al.*, 2005; IPCC, 2013) con un conseguente abbassamento del pH e modifica dello stato di saturazione.

La specie oggetto di questo studio è *Corallina elongata* J. Ellis & Solander (1786) (Fig.1). Questa specie ha un tallo a portamento eretto, ramificato, con alternanza di articolazioni calcificate e non (Bressan & Babbini, 1997). Le fronde erette, alte 5-7 cm di colore grigio-violaceo, con bordi talvolta più chiari, hanno origine da una spessa crosta basale da cui si sviluppa successivamente un portamento cespuglioso. L'anatomia dell'alga consiste in una *medulla* (filamenti più interni - “core filaments” (Woelkerling 1988) che curva verso l'esterno ramificandosi e formando il *cortex* (o “peripheral derivatives of core filaments”).

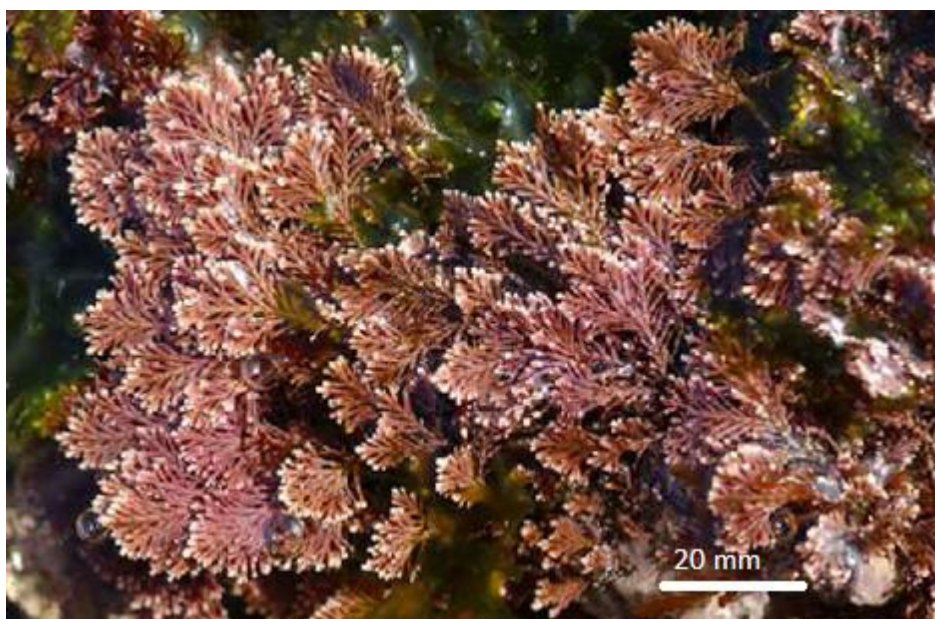


Figura 1 - *Corallina elongata* Ellis & Solander (1786) (Fonte: <http://www.guiry.org>).

C. elongata è una delle specie più diffuse in Mediterraneo (Fig.2). Cresce generalmente su pareti rocciose verticali, occupando la porzione più bassa del mesolitorale fino al limite superiore della frangia infralitorale, ed è emersa solo per brevi periodi dell'anno (El Haïkali *et al.*, 2004; Cerrano *et al.*, 2004). La specie è presente anche nelle pozze di scogliera (Morris and Taylor 1983; Huggett and Griffiths 1986), ambienti di transizione e in quelli soggetti ad ampie variazioni di temperatura, $p\text{CO}_2$, salinità. Informazioni sulla distribuzione, l'abbondanza e i tassi di crescita di questa specie sono fondamentali al fine di monitorare eventuali cambiamenti che incorrono a livello dell'organismo come risposta a variazioni di condizioni ambientali.

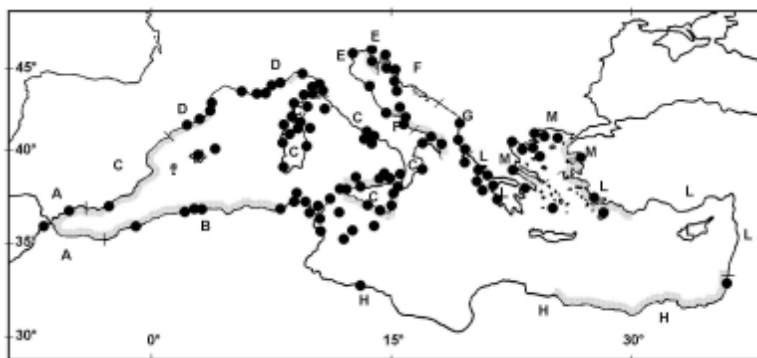


Figura 2 - Distribuzione di *Corallina elongata* nel Mar Mediterraneo (Fonte: <http://www2.units.it/biologia/Corallinales/>).

Il presente lavoro ha avuto come obiettivo lo studio del tasso di crescita della specie *in situ*, nel Golfo di La Spezia (periodo: primavera-estate), e in ambiente controllato. In particolare, il presente lavoro di ricerca ha avuto i seguenti scopi: i) trapianto e mantenimento dell'alga *Corallina elongata* in ambiente controllato (acquari); ii) marcatura dell'alga in ambiente naturale (Golfo di La Spezia) e controllato con l'utilizzo di due diversi marcatori; iii) stima del tasso di crescita *in situ* e in ambiente controllato (acquari).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Sito di studio

Il Golfo di La Spezia (Mar Ligure) si estende per 5 km di larghezza e 10 km di profondità ad ovest dall'isola del Tino, per arrivare ad est fino a Punta Bianca, ed è diviso in due zone da una diga: la zona più interna, dove si trova il porto di La Spezia, che ha una profondità media di 10 m, e la zona esterna, in contatto diretto con il mare aperto, che raggiunge una profondità massima di 25 m nei pressi dell'isola della Palmaria (Gasparini *et al.*, 2009). La temperatura dell'acqua superficiale, è diversa all'interno e all'esterno della diga, la salinità è, invece, pressoché costante in tutto il golfo ($S=36,8-36,9\text{‰}$) (Gasparini *et al.*, 2009). Vanno, inoltre, evidenziate le concentrazioni relativamente basse di nutrienti all'esterno della diga, che caratterizzano queste acque come oligotrofiche e indicano che l'apporto di sostanze di origine antropica non sembra essere di grande rilievo (ENEA 1996; 2000; Gasparini *et al.*, 2009).

2.2. Allestimento del laboratorio

Per la realizzazione del presente studio è stato allestito un acquario (50x35x35 cm) di 60 litri dotato di 2 pompe (AQUAPUMP HJ-311) per la riproduzione delle correnti, una pompa per l'ossigenazione dell'acqua, 4 luci (2 neon bianchi e 2 neon blu) con un intensità luminosa costante di $300 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (LI-COR 189) e un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 di buio, in grado di simulare condizioni di corrente, ossigenazione e luminosità il più possibile fedeli a quelli ambientali (Fig.3).



Figura 3 – Acquario (50x35x35 cm) per la crescita di *C. elongata* (Foto: De Marchi & Nannini).

Per valutare le fluttuazioni giornaliere di temperatura, ossigeno disciolto, salinità e densità dell'acqua una sonda (RBR XR-420 CTD; www.rbr-global.com) è stata tenuta per 14 giorni nell'acquario allestito per l'esperimento. Per tutto il periodo di studio, la temperatura in ambiente controllato è stata monitorata giornalmente alla stessa ora (9.30 di mattina) mentre settimanalmente in ambiente naturale, i nutrienti quali N-NO₃, P-PO₄, Si-Si(OH)₄ e N-NO₂ sono stati controllati settimanalmente dal 06/05/2013 al 11/07/2013, sia in ambiente controllato che in quello naturale, mediante il prelievo di campioni di acqua. L'acqua nell'acquario è stata cambiata 2 volte a settimana e filtrata con l'utilizzo di una rete da zooplancton (maglia di 100 µm).

2.3. Marcatura di *Corallina elongata* con Calcofluor white e Alizarin (red)

2.3.1. Attività di campo

Per la marcatura di *C. elongata* in ambiente naturale è stato scelto il sito di Baia Blu (44° 4' 58.35" N, 009° 53' 2.05 E)(Lerici, La Spezia)(Fig.4). La marcatura è stata effettuata il 21/04/2013 lungo due aree (25x25 cm² ciascuna) su substrato verticale, ad una profondità di 80/90 cm e ad intensità luminosa media di 1200 µmol s⁻¹ m⁻² utilizzando i reagenti Alizarin (red) e Calcofluor white, rispettivamente in concentrazioni di 0.25gr/l per 24 h (Johansen, 1974) e 0.02% per 5min (Martone, 2010). Per la marcatura con Alizarin (red) è stato posizionato sull'area 25x25 cm² un sacchetto trasparente in plastica con una catena fissata alla base per garantire una migliore adesione al substrato, così che il marcatore, iniettato all'interno del sacchetto, non fuoriuscisse. Inoltre, una corda elastica è stata fissata all'area di marcatura per evitare lo spostamento del sacchetto dovuto al moto ondoso e/o le correnti.

Tale metodica è stata utilizzata in precedenza per indagini sulla crescita di organismi con scheletro in carbonato di calcio, presenti però a maggiori profondità (Cocito & Ferdeghini, 1998; Lamberts, 1978; Schiller, 1993). Nel presente studio è stata applicata questa metodica per la prima volta per un'indagine condotta in ambienti superficiali, interessati da moto ondoso e/o correnti.

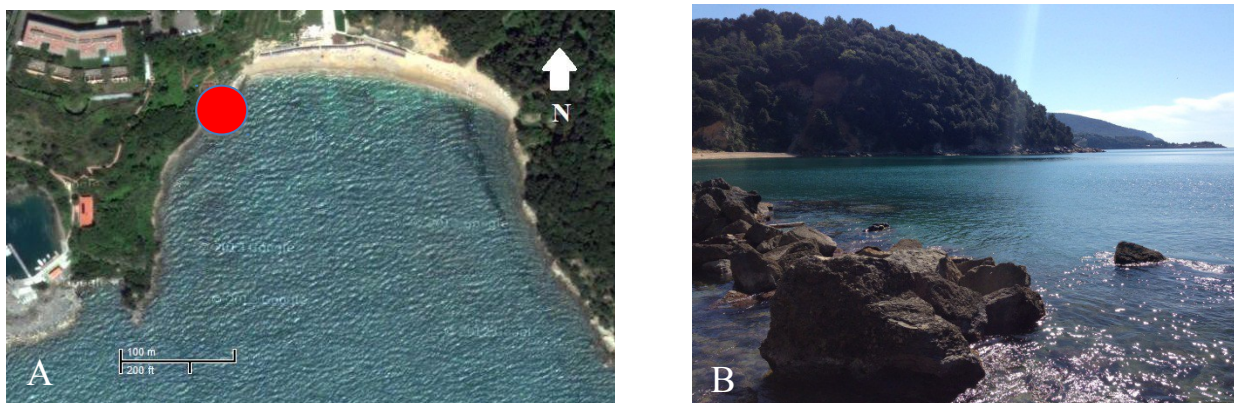


Figura 4 – A. Baia Blu (Lerici, La Spezia). Il cerchio indica il sito di campionamento ($44^{\circ} 4' 58.35''$ N, $009^{\circ} 53' 2.05$ E) (Fonte: Google Map, modificata). B. Sito di campionamento (Foto: De Marchi & Nannini).

2.3.2. Attività in laboratorio

Campioni di *C. elongata* appartenenti alla stessa popolazione sono stati prelevati dal substrato verticale ad una profondità di 80/90 cm utilizzando un martello ed uno scalpello per staccare il tallo, senza danneggiarlo, dal substrato. I campioni sono stati messi in sacchetti in plastica trasparenti con all'interno acqua di mare e sistemati in un frigo portatile, quindi trasferiti immediatamente nell'acquario del Centro ENEA di Santa Teresa (La Spezia). Dopo un mese di acclimatazione in acquario, allestito con una pompa (NEW-JET 400) e 4 luci (2 bianchi e 2 blu) con un fotoperiodo di 12 ore di luce e 12 ore di buio, le alghe sono state sistemate in un nuovo acquario dedicato in cui è stata effettuata la marcatura con Alizarin (red), per 24 ore e alla stessa concentrazione impiegata *in situ* (Johansen, 1974) (Fig.5). In seguito sono state incubate in un nuovo acquario per altre 24 ore per favorire la rimozione del marcatore in eccesso, quindi riposizionate nell'acquario originario.

2.4. Tasso di crescita

Il Calcofluor white, legandosi alle cellule, forma una banda fluorescente visibile allo stereomicroscopio utilizzando lampade ultraviolette (Martone, 2010). Alizarin (red) viene incorporata nello scheletro carbonatico dell'alga in formazione, precipitando come cristalli rossi-violacei (Lamberts, 1978): la banda lasciata dal marcatore rimane in modo stabile all'interno della struttura calcificata della parete cellulare al momento della marcatura. La distanza dalla banda al nuovo margine dell'alga individua la crescita lineare del tallo (Fig.6 A e B). I campioni cresciuti in vasca e *in situ* sono stati essiccati e osservati allo stereo microscopio (NIKON AZ 100). Le misure sulla crescita di

20 campioni di alga marcati in ambiente naturale e in ambiente controllato sono state effettuate utilizzando il programma gratuito ImageJ. Per poter confrontare la crescita nei diversi periodi di studio (30 e 90 giorni), dei campioni provenienti dall'ambiente naturale, è stata calcolata la differenza tra le crescite lineari medie dei relativi esemplari (Δ).

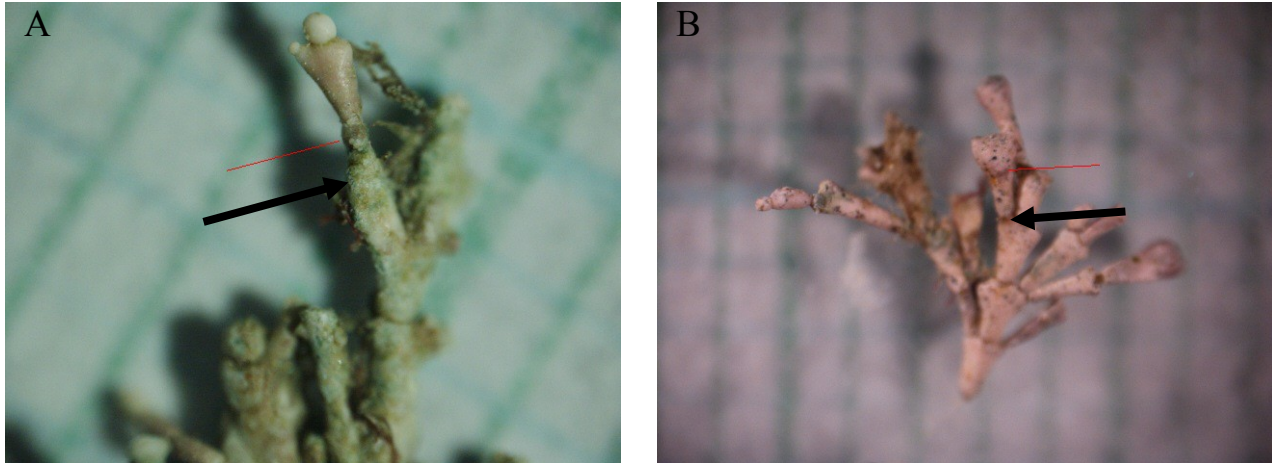


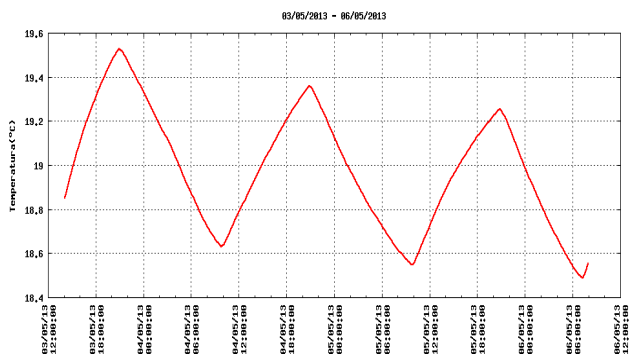
Figura 6 - A. Linea di marcatura (freccia) di Alizarin (red) su campione di *C. elongata* cresciuto *in situ*. B. Linea di marcatura (freccia) Alizarin (red) su campione di *C. elongata* cresciuto in vasca. Il lato del quadrato sullo sfondo corrisponde a 1 mm. (Foto: De Marchi & Nannini).

2.4.1. Analisi statistica

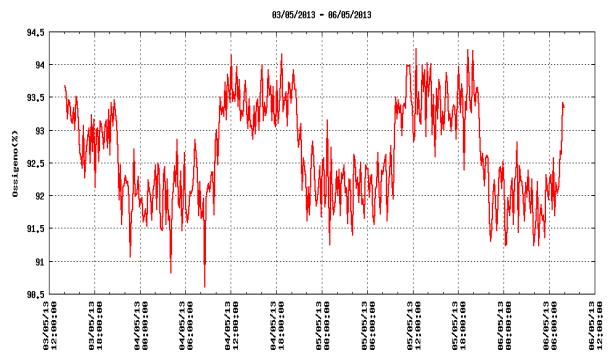
Al fine di testare le eventuali differenze del tasso di crescita di *C. elongata* in ambiente naturale e controllato, è stata affettata l'analisi della Varianza - ANOVA ad una Via (Statistica®). Prima dell'applicazione del test, è stata verificata la normalità e omogeneità della varianza tramite il test di Levene.

3. RISULTATI

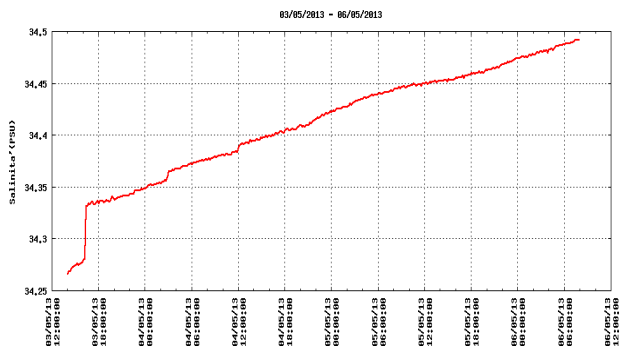
Per quanto riguarda il monitoraggio dei parametri ambientali, la figura 7 mostra le fluttuazioni giornaliere della temperatura (A), ossigeno disciolto (B), salinità (C) e densità dell'acqua (D) misurate in acquario dal 03/05/2013 al 06/05/2013. Il monitoraggio, effettuato per 14 giorni nel periodo di maggio, ha mostrato un andamento costante dei parametri indagati ad esclusione della salinità che ha mostrato un trend crescente durante il periodo di osservazione.



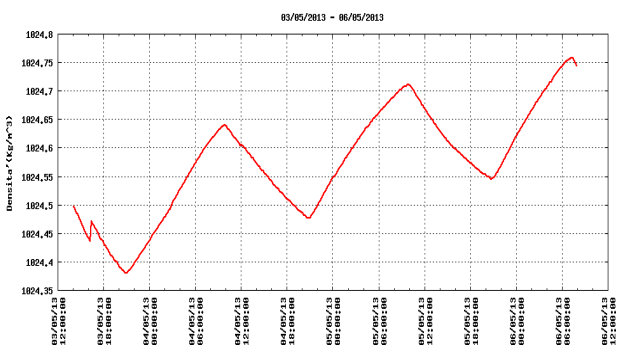
A



B



C



D

Figura 7 – Andamento di temperatura (A), ossigeno disciolto (B), salinità (C) e densità dell'acqua (D) in acquario dal 03/05/2013 al 06/05/2013.

Le analisi dei nutrienti hanno mostrato un andamento costante con bassi valori di concentrazione per quanto riguarda $P-PO_4$, $Si-Si(OH)_4$ e $N-NO_2$ mentre i nitrati ($N-NO_3$) hanno mostrato fluttuazioni per tutto il periodo di analisi (Fig.8).

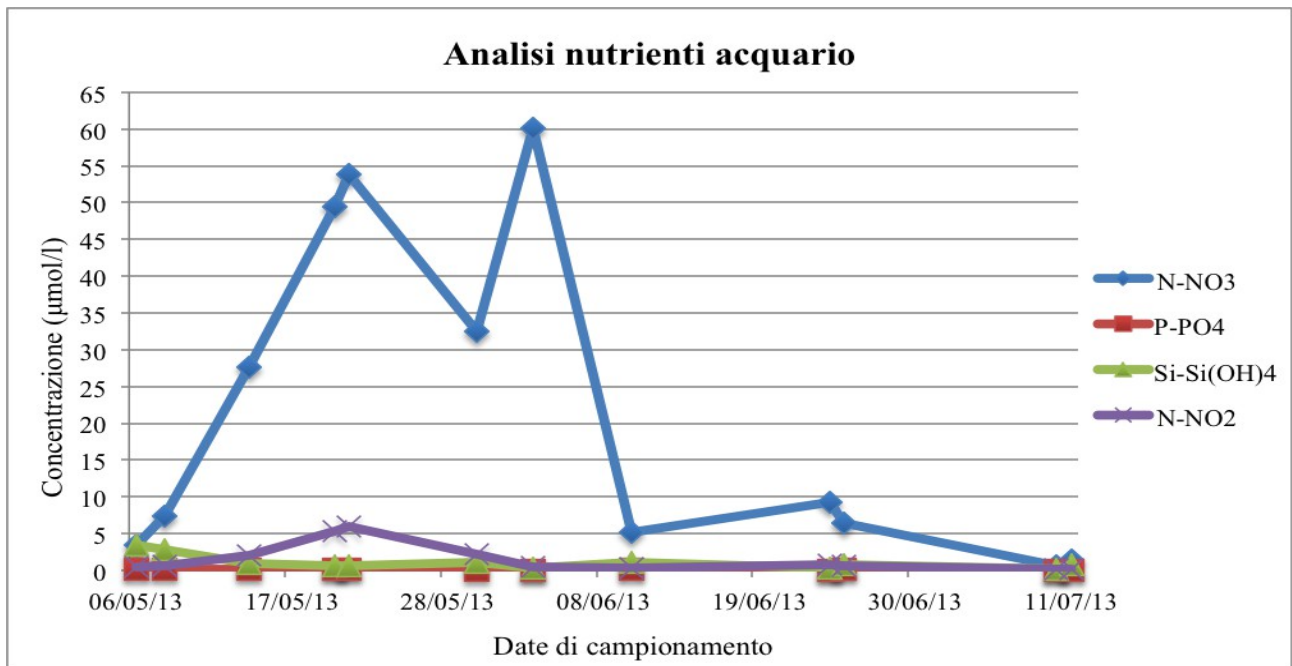


Figura 8 – Variazione nelle concentrazioni di nutrienti (N-NO₃, P-PO₄, Si-Si(OH)₄ e N-NO₂) (μmol/l) in ambiente controllato nel periodo compreso fra 06/05/2013 e 11/07/2013.

La marcatura in ambiente naturale effettuata con il Calcofluor white non ha avuto successo, in quanto non è stata osservata la presenza della banda blu-violacea attesa sia per campioni di 30 e 90 giorni. Diversamente, la marcatura con Alizarin (red) ha funzionato, ma con differenti percentuali di successo. Infatti, circa il 27% delle fronde cresciute in ambiente naturale erano marcate, mentre in ambiente controllato solamente il 10%. Come mostrato in tabella 1, il tasso di crescita medio osservato nelle 20 fronde marcate in ambiente naturale è stato di $1,46 \pm 1,17$ mm dopo circa 30 giorni e di $2,00 \pm 1,35$ mm dopo circa 90 giorni (Fig.9)(ANOVA a una Via: $F_1 = 4.47$, $p = 0.04$). Il confronto tra le crescite lineari medie dei 30 e 90 giorni ha rivelato un Δ di 0.54 mm corrispondenti alla crescita avvenuta in 60 giorni 0.27 mm mensili con una drastica riduzione del tasso di crescita rispetto al primo mese (1.46 mm \pm $1,17$ mm) (Tab.1). Nei campioni cresciuti in ambiente controllato dopo 30 giorni non è stata osservata la banda rossa del marcatore, mentre dopo circa 90 giorni la crescita lineare osservata nelle fronde marcate è stata di $1,39 \pm 0,58$ mm. Dal confronto della crescita lineare delle fronde cresciute in ambiente naturale con quelle in ambiente controllato (90 giorni), quest'ultime hanno mostrato un crescita lineare inferiore ($1,39$ mm \pm $0,58$), rispetto quelle *in situ* ($2,00$ mm \pm $1,35$)(Fig.10).

Tabella 1 - Lunghezza lineare (mm) (\pm d.s.) osservati in ambiente naturale e controllato di *Corallina elongata* dopo 30 e 90 giorni dalla marcatura.

	Lunghezza media (mm)	Lunghezza DS	Fronde raccolte	Fronde marcate
Campo 30 giorni	1,46	1,17	50	20
Campo 90 giorni	2,00	1,35	100	20
Laboratorio 30 giorni	0	0	100	0
Laboratorio 90 giorni	1,39	0,58	100	20

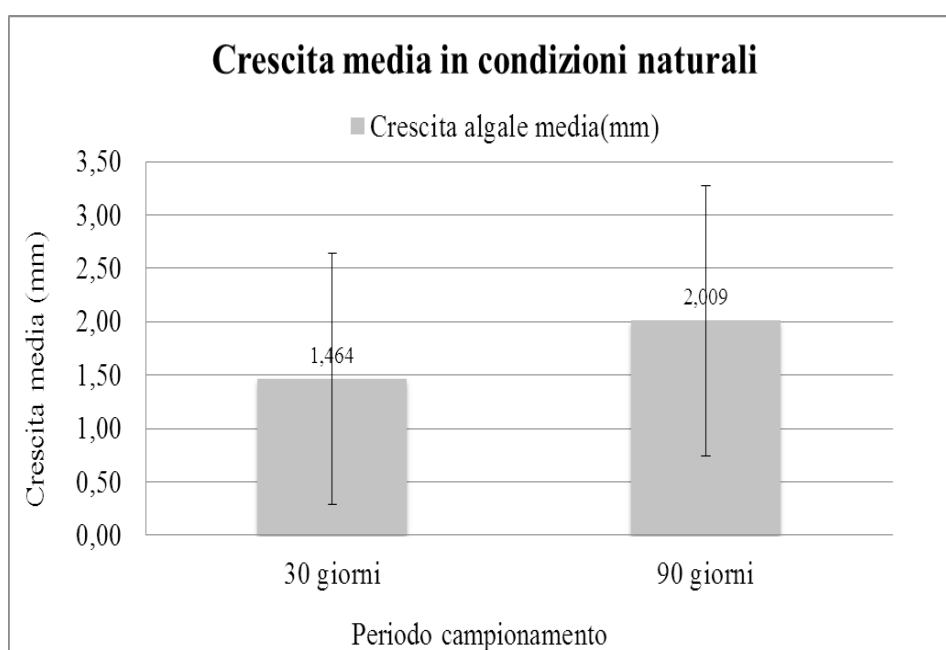


Figura 9- Crescita lineare media (mm)(\pm d.s) di *Corallina elongata* dopo 30 e 90 giorni in ambiente naturale.

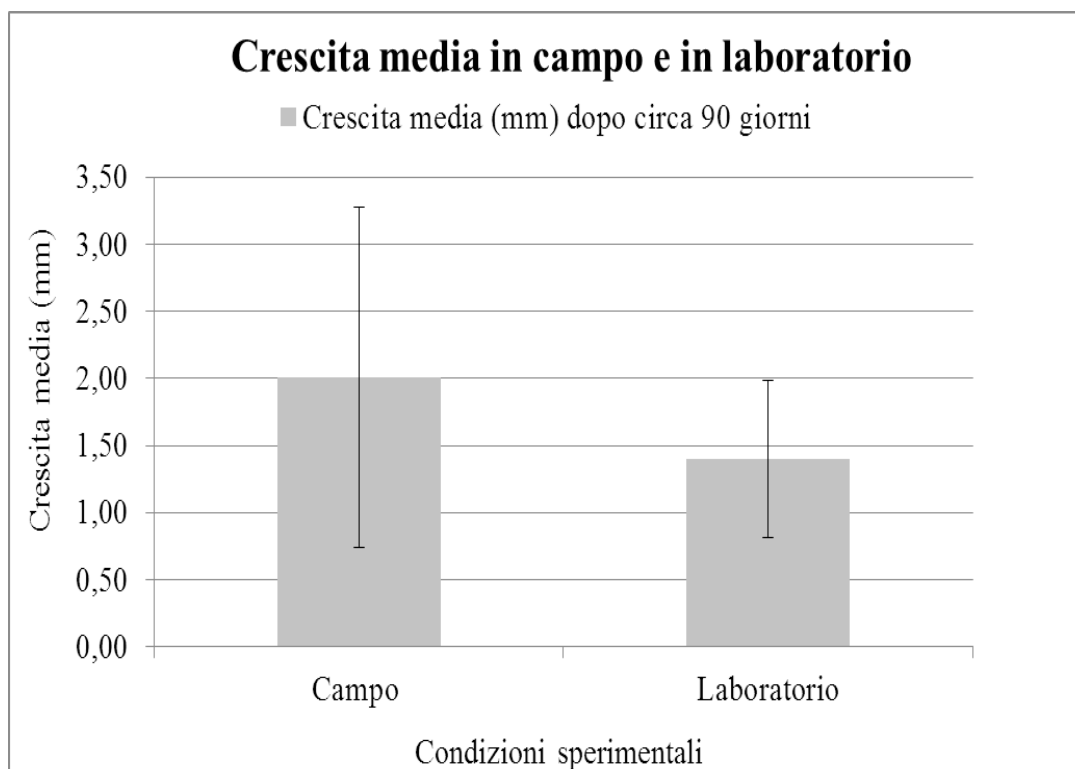


Figura 10 - Crescita lineare media (mm)(\pm d.s) di *Corallina elongata* dall'ambiente naturale e controllato dopo circa 90 giorni dalla marcatura con Alizarin (red).

4. DISCUSSIONE

Il presente lavoro preliminare ha rivelato per *C. elongata* un tasso di crescita di $1,46 \pm 1,17$ mm durante il mese di aprile - maggio nel Golfo di La Spezia. I dati relativi al tasso di crescita dell'alga in ambiente naturale, dopo 30 giorni, concordano con i dati relativi a *Corallina officinalis* Linnaeus (1758) (Andrake *et al.*, 1980) che riportano un tasso di crescita a 30 giorni dalla marcatura di 1,4 mm e 1,2 mm, rispettivamente in ambiente naturale e controllato. Sebbene per i campioni cresciuti in ambiente controllato non sia stato possibile distinguere la banda dall'apice, a causa della scarsa crescita nei primi trenta giorni in ambiente controllato, l'Alizarin (red) si è dimostrato essere un marcatore di successo per le fronde di *C. elongata*. Una possibile spiegazione dell'assenza della banda nei campioni cresciuti in ambiente controllato può essere attribuita allo stress subito dalle alghe durante il processo di marcatura o alle condizioni ambientali del laboratorio, non fedeli a quelle dell'ambiente naturale. Infatti, mentre le condizioni di temperatura sono state mantenute in linea con le variazioni di stagionalità dell'ambiente naturale, le condizioni d'intensità luminosa (circa $300 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) e fotoperiodo sono state mantenute costanti per tutto la durata dell'esperimento, ma ridotte rispetto a quelle dell'ambiente naturale (intensità luminosa massima, registrata intorno a mezzogiorno, circa $1205 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). Essendo proprio la temperatura e la luminosità due fattori fondamentali che agiscono sulla produttività delle alghe corallinacee (Algarrá

et al., 1990), aver mantenuto la luminosità e il fotoperiodo può aver rallentato, in parte, l'attività metabolica dell'alga e dunque averne causato un rallentamento della crescita. Inoltre, le analisi dei nutrienti hanno mostrato una variabilità nella concentrazione di N-NO₃ soprattutto nel periodo di acclimatazione delle alghe in acquario probabilmente dovuta al fatto che non è stato utilizzato un sistema di filtraggio dell'acqua. Queste osservazioni saranno prese in considerazione per la realizzazione del progetto futuro nel quale l'acqua utilizzata sarà filtrata mediante un sistema di filtraggio meccanico e a raggi UV e, intensità luminosa e fotoperiodo seguiranno anch'essi la stagionalità come gli altri parametri ambientali in modo da ridurre il più possibile qualsiasi forma di stress cui le alghe possono essere sottoposte.

L'evidente diminuzione con il tempo del tasso di crescita dell'alga in ambiente naturale (da $1,46 \pm 1,17$ mm nel primo mese a 0,54 mm dei successivi 60 potrebbe essere attribuita all'elevata presenza del mollusco bivalve *Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819 (Fig.11) tra giugno e settembre 2013, che ha interessato l'habitat di *C. elongata* causandone una diminuzione in termini di abbondanza e una riduzione del tasso di crescita nelle popolazioni rimanenti ricoperte dal mitilo. Il mitilo ha una rilevante importanza a livello commerciale, ed il suo allevamento nel Golfo di La Spezia risale al 1887, costituendo un solido e tradizionale elemento dell'economia locale (Ercolini *et al.*, 1997). Nello studio condotto da Cordisco *et al.* (1997) è stato riscontrato che lo sviluppo degli stati larvali del mitilo avviene tra marzo e giugno, quando i valori di temperatura dell'acqua si aggirano tra 10-20 °C, e il fissaggio delle larva al substrato avviene all'inizio della primavera. Il periodo riproduttivo di *C. elongata* va da febbraio - marzo a giugno (Bressan & Babbini, 2003). Dall'analisi dei dati ottenuti con la tecnica del *visual census* dal 2010 ad oggi dall'attività di *Seawatching*, (attività di citizen science promossa dall'Area Marina Protetta delle Cinque Terre (AMP), che prevede il coinvolgimento dei cittadini nella raccolta dati in snorkeling su specie marine di interesse), è stato possibile osservare come, nell'AMP Cinque Terre, le percentuali di ricoprimento del *Mytilus* (M) e dell'alga *C. elongata* (C), si siano invertite dall'agosto 2010 all'agosto 2013. L'alga corallinacea è passata da valori di ricoprimento medio percentuale di 65,5% (agosto 2010), 40% e 80% (agosto, settembre 2012) al 7% (agosto 2013). I mitili, al contrario, sono passati da valori medi di ricoprimento del 12,5% (agosto 2010), assente ad agosto e settembre 2012 ad un ricoprimento medio percentuale del 51,6% (agosto del 2013) (Fig. 11). Questi dati, relativi all'AMP Cinque Terre, danno un'indicazione di un fenomeno che presumibilmente ha interessato tutta l'area del Golfo di La Spezia.

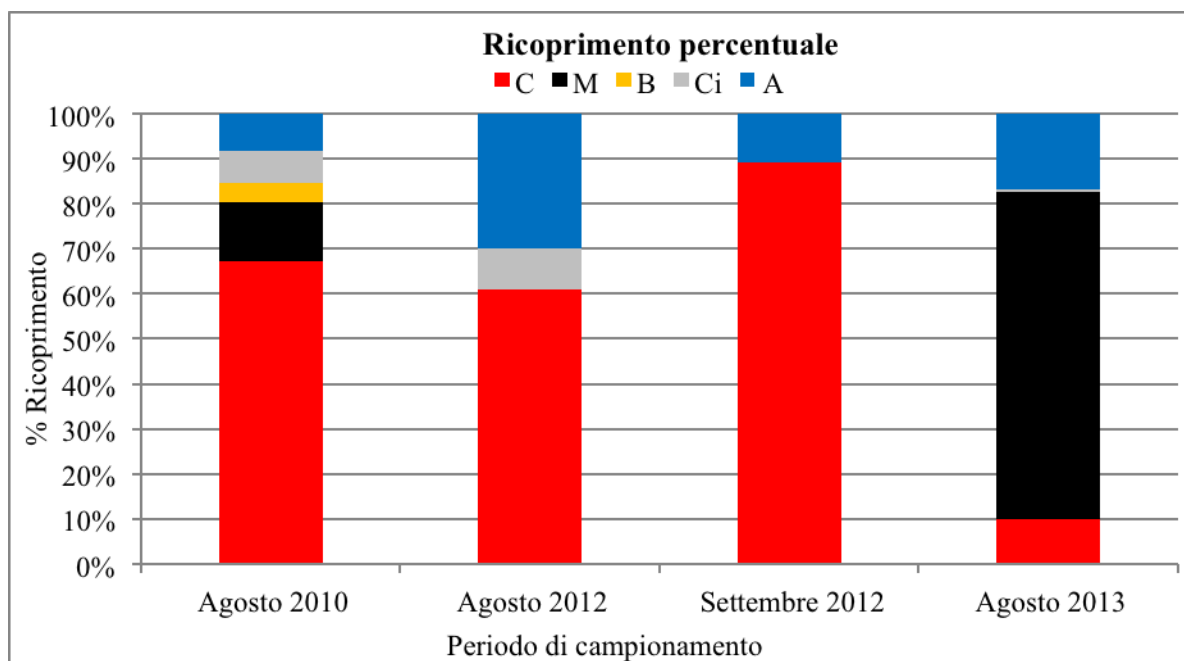


Figura 11- Percentuale di ricoprimento (%) di C=*Corallina sp.*; M=*Mytilus*; B=Briozoi; Ci=Cirripedi; A=Alghe corallinacee incrostanti da agosto 2010 ad agosto 2013 lungo il versante Nord della grotta di Manarola, zona C dell'AMP delle Cinque Terre (Golfo di La Spezia).

Una possibile spiegazione a questo risultato può essere attribuita alla variazione del trend di temperatura dell'agosto 2013 rispetto a quello di agosto 2010 e agosto/settembre 2012 (Fig. 12 – 13). Come mostrato dal grafico, la temperatura durante il periodo di osservazione oscillava intorno ai 26 °C nell'agosto 2010 e 2012, mentre nello stesso mese dell'anno 2013 la temperatura si aggirava intorno al valore di 21°C. Poiché il ciclo riproduttivo del *Mytilus Galloprovincialis* avviene tra i 10-20 °C (Cordisco *et al.*, 1997), la sua elevata percentuale di ricoprimento osservata nell'agosto 2013 potrebbe essere attribuita alla permanenza di temperature più basse rispetto agli anni passati, che ha generato le condizioni ideali per lo sviluppo del mitilo e un conseguente decremento dell'abbondanza di *Corallina elongata*.

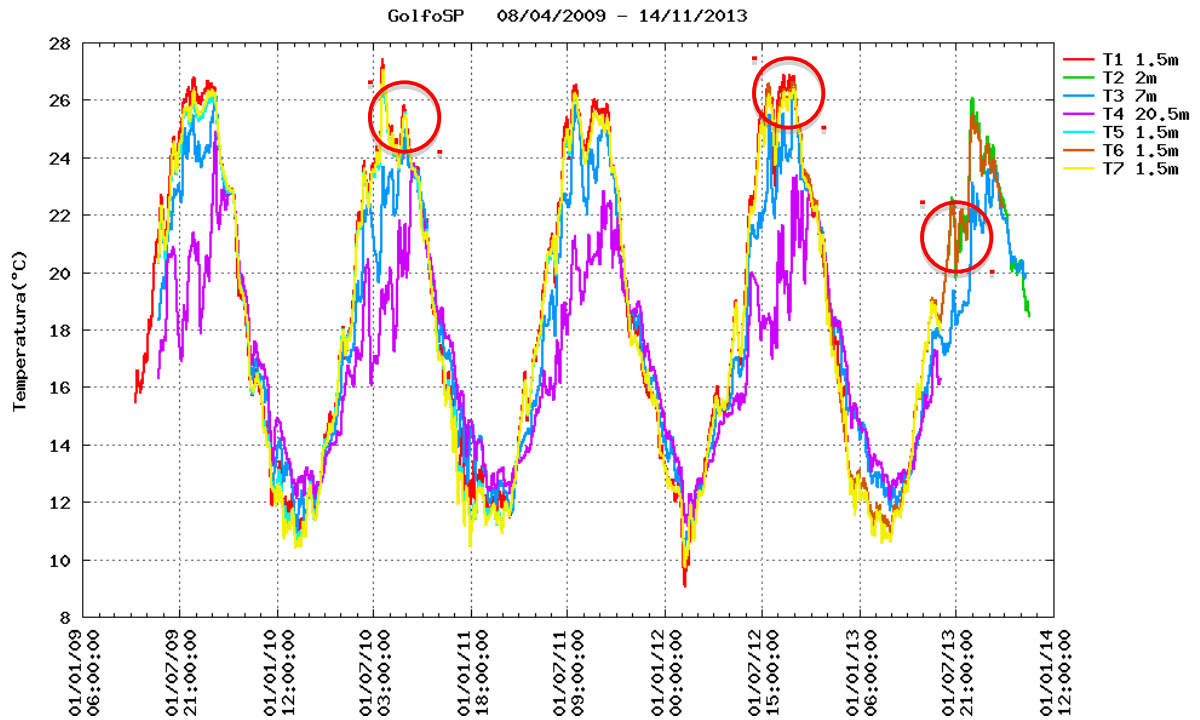


Figura 12 – Grafico delle temperatura (C°) nel Golfo di La Spezia da 01/01/09 al 01/01/14. I cerchi rossi evidenziano i periodi di campionamento tramite le attività di *Seawatching* promossa dall'Area Marina Protetta delle Cinque Terre.

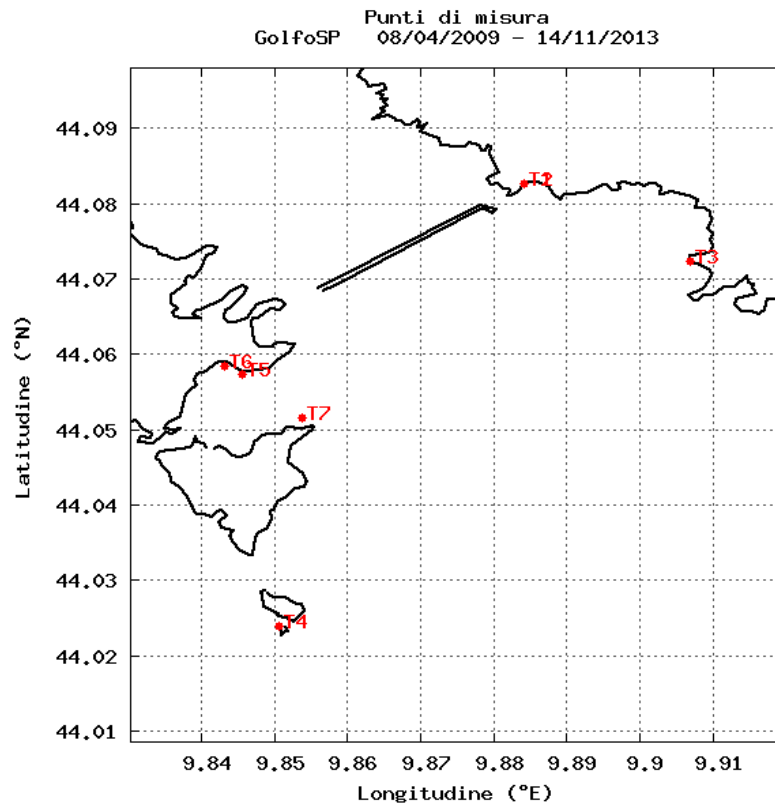


Figura 13 – Mappa dei punti di campionamento per le misurazioni di temperatura (C°) all'interno del Golfo di La Spezia.

Questo studio preliminare ha permesso, di ottenere i dati dei tassi di crescita di *C. elongata*

nel Golfo di La Spezia per il periodo primavera - estate 2013, di predisporre un laboratorio idoneo alla realizzazione di sperimentazione in vasca sulle alghe carbonatiche all'interno del Centro Ricerche Ambiente Marino ENEA S. Teresa, e di produrre i dati preliminari necessari alla realizzazione di un progetto più ampio per studiare l'effetto delle variazioni di temperatura e pH, su crescita, calcificazione, densità, morfologia, e mineralogia di *C. elongata*, in condizioni naturali e controllate.

5. RINGRAZIAMENTI

Per la realizzazione di questo progetto si ringrazia il Centro Ricerche Ambiente Marino ENEA di Santa Teresa (Lerici, SP) in particolare la Dott.ssa Silvia Cocito, la Dott.ssa Noelle Lucey dell'Università degli Studi di Pavia, il Dott. Nick Kamenos dell'Università di Glasgow, la Dott.ssa Annalisa Caragnano dell'Università degli Studi di Milano-Bicocca e Professor Albero Castelli dell'Università di Pisa. Si ringrazia inoltre l'Associazione For-Mare, per il supporto alle attività, la Cooperativa Natour (Fortezza delle Brunella, Aulla) e gruppo Seawatching e il Parco Nazionale delle Cinque Terre per la concessione dei dati del monitoraggio e supporto alle attività di campionamento.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adey W. H. & Vassar J. M. (1975), "Succession and accretion rates in Caribbean crustose corallines". *Phycologia*, **14**: 55–70.
- Algarra P. & Niell F. X. (1990), "Short-term pigment response of *Corallina elongata* Ellis et Solander to light intensity". *Aquatic Botany*, **36**: 127-138.
- Andrake W. & Johansen, H. W. (1980), "Alizarin red dye as a marker for measuring growth in *Corallina officinalis* (Corallinaceae, Rhodophyta)". *Journal of Phycology*, **16**: 620–2.
- Anthony K. R. N., Kline D. I., Diaz-Pulido G., Dove S. & Hoegh-Guldberg O. (2008), "Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 17442– 17446.
- Arsenault D. J. & Himmelman J. H. (1996), "Size-related changes in vulnerability to predators and spatial refuge use by juvenile Iceland scallops *Chlamys islandica*". *Marine Ecology Progress Series*, **140**: 115–122.
- Babbini L. & Bressan G. (1997), "Recensement des Corallinacées de la Mer Méditerranée et considérations phytogéographiques". *Bibliotheca Phycologia*, **Vol. 1-103**: 421.
- Bellan D. & Santini D. (1994), "Les Biocénoses benthiques: Substrates durs". In: Bellan-Santini D., Lacaze J-C., Poizat C (eds.), *Les biocénoses marines et littorals de Méditerranée, synthèse*,

menaces et perspectives, Museum National d'Histoire Naturelle, Paris, 77-87 pp.

- Blake C. & Maggs C. A. (2003), "Comparative growth rates and internal banding periodicity of maerl species (Corallinales, Rhodophyta) from northern Europe". *Phycologia*, **42**: 606–612.
- Borowitzka M. A. (1982), "Mechanisms of algal calcification". *Progress in Phycology Research*, **1**: 137-177.
- Brenchley G. A. (1981), "Disturbance and community structure: an experimental study of bioturbation in marine soft-bottom environments". *Journal of Marine Research*, **39**: 767-790.
- Bressan G. & Babbini L. (2003), "Biodiversità marina delle coste Italiane: Corallinales del Mar Mediterraneo: guida alla determinazione". *Biologia Marina del Mediterraneo*, vol. **10** (Suppl. 2).
- Bressan G. & Tomini I. (1981), "Quelques observations sur la croissance des algues rouges calcaires du genre *Fosliella* (Rhodophycophyta, Corallinaceae)". *Vie et Milieu*, **31(3-4)**: 283-291.
- Broecker W. S. & Takahashi T. (1977), "Neutralization of fossil fuel CO₂ by marine calcium carbonate". In: *The fate of fossil fuel in the Oceans*. N.R. Andersen & A. Malahoff, Eds.: 213–241 pp. Plenum Press, New York.
- Broecker W. S., Takahashi T., Simpson H. J. & Peng T. H. (1979), "Fate of fossil fuel carbon dioxide and the global carbon budget". *Science*, **206**: 409–418.
- Cerrano C., Ponti M. & Silvestri S. (2004), "Gli ambienti sottomarini: Biostrutture". *Guida alla Biologia Marina del Mediterraneo*, 266 pp.
- Cocito S. & Ferdeghini F. (1998), "Marcatura con colorante ed etichettatura: due metodi per misurare la crescita in briozio calcificati". *Atti 12° Congresso AIOL, Vol. II Piccazzo (ed.)*: 351-358 pp.
- Cole, K. M. (1964), "Induced fluorescence in gametophytes of some Laminariales". *Canadian Journal of Botany-revue*. **42**:1173–81.
- Colombo G., Ferrari I., Rossi R., Ceccherelli V. & Cavallini G. (1979), "Risorse biologiche di una sacca del Delta del Po". *Atti Conv. Sci. Naz. P.F. 'Oceanografia e Fondi marini'*, Roma, Marzo, 199-214 pp.
- Cordisco C. A. (1997), "Identificazione di stadi larvali di bivalvi filtratori, ricorrenti in ambienti lagunari e costieri". *Relazione consuntiva dell'attività svolta per l'ISEC- CNR*, luglio 1996-febbraio 1997.
- De Marchi L., Nannini M., Savini D., Ragazzola F. & Lombardi C. (2013), "Distribuzione ed abbondanza di quattro generi di Corallinales del il piano infralitorale superiore di due aree marine protette liguri (Parco Regionale di Porto Venere e Parco Nazionale delle Cinque Terre)". *Biologia Marina del Mediterraneo (2012)*, **20 (1)**: 146-147.
- Digby P.S.B. (1977), "Photosynthesis and respiration in the coralline algae, *Clathromorphum*

circumscriptum and *Corallina officinalis* and the metabolic basis of calcification”. *The Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*.

- El Haïkali B., Bensoussan N., Romano J. C. & Bousquet V. (2004), “Estimation of photosynthesis and calcification rates of *Corallina elongata* Ellis and Solander, 1786, by measurements of dissolved oxygen, pH and total alkalinity”. *Scientia Marina*, **68**, 45–56.
- Egilsdottir H., Noisette F., Noel L. M. L. J., Olafsson J. & Martin, S., (2013), “Effects of pCO₂ on physiology and skeletal mineralogy in a tidal pool coralline alga *Corallina elongata*”. *Marine Biology*, 1–10. <http://dx.doi.org/10.1007/s00227-012-2090-7>.
- ENEA, (1996), “Monitoraggio ambientale delle acque del Golfo della Spezia ai sensi della L. 502/93 (art. 3 C.2) - Relazione di sintesi”. ED. EE.LL. La Spezia, 150 pp.
- ENEA, (2000), “Sistema Informativo e di Monitoraggio Marino Costiero della Provincia della Spezia”. ENEA–CRAM S.Teresa, La Spezia, 134 pp.
- Ercolini C., Pasini G., Scaffardi R. & Serracca L. (1997), “Piano di controllo sanitario e sorveglianza sulla produzione, depurazione, commercializzazione dei molluschi bivalvi del golfo di La Spezia”. *Il Pesce*, **3**: 94-98.
- Feely R. A., & Chen C. T. A. (1982), “The effect of excess CO₂ on the calculated calcite and aragonite saturation horizons in the Northeast Pacific”. *Geophysical Research Letters*, **9**: 1294–1297.
- Feely R. A., Sabine C. L., Lee K., Berelson W., Kleypas J., Fabry V. J. & Millero F. J. (2004), “Impact of anthropogenic CO₂ on the CaCO₃ system in the oceans”. *Science*, **305**: 362–366.
- Foster M. S. (2001), “Rhodoliths: between rocks and soft placet”. *Journal of Phycology*.
- Frandsen R. P. & Dolmer, P. (2002), “Effects of substrate type on growth and mortality of blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to the predator *Carcinus maenas*”. *Marine Biology*, **141**: 253–262.
- Gao K., Aruga Y., Asada K, Ishihara T., Akano T. & Kiyohara M. (1993), “Calcification in the articulated coralline alga *Corralina pilulifera*, with special reference to the effect of elevated CO₂ concentration”. *Marine Biology*, **117**, 129–132.
- Gardiner J. S.,(1931), “Coral Reefs and Atolls”. *Macmillan and Co.*, London: 181 pp.
- Gasparini G. P., Abbate M., Bordone A., Cerrati G., Galli C., Lazzoni E. & Negri A. (2009), “Circulation and biomass distribution during warm season in the Gulf of La Spezia (north-western Mediterranean)”, *Journal of Marine Systems*.
- Haas P., Hill G. & Karstens, W. K. H. (1935), “The metabolism of calcareous algae. II. The seasonal variation in certain metabolic products of *Corallina squamata*”. *Ellis Annals of Botany*, **49**: 609–19.
- Halfar J., Zack T., Kronz A. & Zachos J. C. (2000), “Growth and high-resolution paleoenvironmental signals of rhodoliths (coralline red algae): a new biogenic archive”. *Journal of Geophysical Research*, **105 (22)**: 107–122.

- Halfar J., Steneck R. S., Joachimski M., Kronz A. & Wanamaker A. D. (2008), “Coralline red algae as high-resolution climate recorders”.
- Hall-Spencer J. M., Rodolfo-Metalpa R., Martin S. *et al.* (2008), “Volcanic carbon dioxide vents reveal ecosystem effects of ocean acidification”. *Nature*, **454**, 96–99.
- Hsaio, S. I. C. & Druehl, L. D. (1973), “Environmental control of gametogenesis in *Laminaria saccharina*. IV. In situ development of gametophytes and young sporophytes”. *Journal of Phycology*. **9**:160–4.
- Huggett J. & Griffiths C. L. (1986), “Some relationships between elevation, physico-chemical variables and biota of the intertidal rock pools”. *Marine Ecology Progress Series* **29**:189–197
- Ichiki S., Mizuta H. & Yamamoto H. (2000), “Effects of irradiance, water temperature and nutrients on the growth of sporelings of the crustose coralline alga *Lithophyllum yessoense* Foslie (Corallinales, Rhodophyceae)”. *Phycology Research*. **48**: 115-120.
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) (2007), Climate change., 2007: the AR4 synthesis report. In: Pachauri, R.K., Resinger, A. (Eds.), Contribution of Working Groups I, II, and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Johansen H. W. (1974), “Articulated coralline algae”. *Oceanography and Marine Biology. An Annual Review*, **12**: 77-127.
- Johansen H. W. (1981), “Coralline Algae, A First Synthesis”. *CRC Press, Boca Raton, Florida*: 239 pp.
- Johansen H. W. & Austin L. F. (1970), “Growth rates in the articulated coralline *Calliarthron* (Rhodophyta)”. *Canadian Journal of Botany*, **48**: 125–32.
- Kaleb S., Bressan G. & Princivalle F. (2009), “Processi di biomineralizzazione di alcune Corallinales del Mediterraneo”. *Hydrores*, **29**: 7-18.
- Kamenos N. A., Cusak M. & Moore P. G. (2008), “Coralline algae are global palaeothermometers with bi-weekly resolution”. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **72**: 771–779.
- Kuffner I. B., Andersson A. J., Jokiel P. L., Rodgers K. S. & Mackenzie F. T. (2008), “Decreased abundance of crustose coralline algae due to ocean acidification”. *Nature Geoscience*, **1**, 114–117.
- Laborel J., Boudouresque C. F & Laborel-Deguen F. (1994), “Les bioconcretionnements littoraux de la Méditerranée”. In Bellan-Santini D., Lacaze J-C., Poizat C. (eds.), Les biocénoses marines et littorales de Méditerranée, synthèse, menaces et perspectives. *Museum National d’Histoire Naturelle*, Paris: 88-126 pp.
- Lamberts A. S. (1978), “Coral growth: Alizarin method”. In Coral reef: research methods (Stoddard

- D. R. & Johannes R. E. eds) UNESCO, Parigi: 523-527 pp.
- Lewis D. B. & Eby L. A. (2002), "Spatially heterogeneous refugia and predation risk in intertidal salt marshes". *Oikos*, **96**: 119–129.
- Littler M. M. (1972), "The crustose Corallinaceae. *Oceanography and Marine Biology. An Annual Review*, **10**: 311–47.
- Malusà A., Kaleb S., Bressan G. & Princivalle F. (2009), "Processi di biomineralizzazione di alcune Corallinales del Mediterraneo". *Hydrores*, **29**: 7-18.
- Martin S., Rodolfo-Metalpa R., Ransome E., Rowley S., Buia M.C., Gattuso J.P. & Hall-Spencer J. (2008), "Effects of naturally acidified seawater on seagrass calcareous epibionts". *Biology Letters*, **4**: 689–692.
- Martin S. & Gattuso J. P. (2009), "Response of Mediterranean coralline algae to ocean acidification and elevated temperature". *Global Change Biology*, 1-12 pp.
- Martone P. T. (2010), "Quantifying growth and calcium carbonate deposition of *Calliarthron cheilosporioides* (Corallinales, Rhodophyta) in the field using a persistent vital stain". *Journal of Phycology*, **46**: 13–17.
- Matsuda S. (1989), "Succession and growth rates of encrusting crustose coralline algae (Rhodophyta, Cryptonemiales) in the upper fore-reef environment off Ishigaki Island, Ryukyu Islands". *Coral Reefs*, **7**: 185–95.
- Moberg F. & Folke C. (1999), "Ecological goods and services of coral reef ecosystems". *Ecology and Economy*, **29**: 215-233.
- Morris S. & Taylor A.C. (1983), "Diurnal and seasonal variation in physicochemical conditions within intertidal rock pools". *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **17**: 339–355.
- Morse J. W., Andersson A. J. & Mackenzie F. T. (2006), "Initial response of carbonate-rich shelf sediments to rising atmospheric $p\text{CO}_2$ and "ocean acidification": Role of *high Mg-calcites*". *Geochimica et Cosmochimica Acta*, **70**: 5814-5830.
- Nakazawa S., Takamura K. & Abe M. (1969), "Rhizoid differentiation in *Fucus* eggs labeled with calcofluor white and birefringence of cell wall. *Botanical Magazine, Tokyo*, **82**: 41–4.
- Nelson W. A. (2009), "Calcified macroalgae critical to coastal ecosystems and vulnerable to change: a review". *Marine and Freshwater Research*, **60**: 787–801.
- Orr J. C., Fabry V. J., Aumont O., Bopp L., Doney S. C., Feely R. A., Gnanadesikan A., Gruber N., Ishida A., Joos F., Key R. M., Lindsay K., Maier-Reimer E., Mateae R., Monfray P., Mouchet A., Najjar R. G., Plattner G. K., Rodgers K. B., Sabine C. L., Sarmiento J. L., Schlitzer R., Slater R. D., Totterdell I. J., Weirig M. F., Yamanaka Y. & Yool A. (2005), "Anthropogenic ocean acidification over the twenty-first century and its impact on calcifying organisms". *Nature*, **437**: 681–686.

- Pearse V. B. (1972), "Radioisotopic study of calcification in the articulated coralline alga *Bossiella orbigniana*". *Journal of Phycology*, **8**: 88–97.
- Pueschel C. M. (1996), "Formation and mobilization of protein bodies in ephemeral epithallial cells of *Clathromorphum loculosum* (Corallinales, Rhodophyta)". *European Journal of Phycology*, **31**: 249-254.
- Ragazzola F., Foster L. C., Form A., Anderson P. S. L., Hansteen T. H. & Fietzke J. (2012), "Ocean acidification weakens the structural integrity of coralline algae". *Global Change Biology*, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2486.2012.02756.x> (published online first).
- Riedl R. (2005), "Fauna e flora del Mediterraneo. Dalle alghe ai mammiferi: una guida sistematica alle specie che vivono nel mar Mediterraneo". *Franco Muzzio Editore*.
- Ries J. B (2011), "Skeletal mineralogy in a high-CO₂ world". *Journal of Experimental Biology and Ecology*, **403**: 54-64.
- Schiller C. (1993), "Ecology of the symbiotic Coral *Cladocora caespitosa* (L.)(Favidae, Scleractinia) in the Bay of Piran (Adriatic Sea): I. Distribution and biometry". *P.S.Z.N.I: Marine Ecology*, **14 (3)**: 205-219.
- Skirrow G. & Whitfield M. (1975), "The effect of increases in the atmospheric carbon dioxide content on the carbonate ion concentration of surface water at 25°C". *Limnology and Oceanography*, **20**: 103–108.
- Smith S. V., (1972), "Production of calcium carbonate on the mainland shelf of southern California". *Limnology and Oceanography*, **17**: 28–41.
- Smith A. D. & Roth A. A. (1979), "Effect of carbon dioxide concentration on calcification in the red coralline alga *Bossiella orbigniana*". *Marine Biology*, **52**: 217–225.
- Soltan D., Verlaque M., Boudouresque C. F. & Francour P. (2001), "Changes in macroalgal communities in the vicinity of a Mediterranean sewage outfall after the setting up of a treatment plant". *Marine Pollution Bulletin*, **42**: 59–70.
- Sousa W. P. (1984), "The role of disturbance in natural communities". *Annual Review of Ecology System*, **15**: 353–391.
- Sponaugle S. & Lawton P. (1990), "Portunid crab predation on juvenile hard clams: effect of substrate type and prey density". *Marine Ecology Progress Series*, **67**: 43–53.
- Steneck R. S. (1985), "Adaptations of crustose coralline algae to herbivory: patterns in space and time". In Toomey, D. & Nitecki, M. (eds.) *Paleoalgology*. *Springer-Verlag*, Berlin: 352–66 pp.
- Steneck R. S. (1986), "The ecology of coralline algal crusts: convergent patterns and adaptive

strategies”. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **17**: 273-303.

Steneck, R. S. & Adey, W. H., (1976), “The role of environment in control of morphology in *Lithophyllum congestum*, a Caribbean algal ridge builder”. *Botanica Marina*, **19**: 197–215.

Taylor R. J. (1984), “Prey refugia Predation”. *Chapman & Hall*, New York: 69–81 pp.

Tynan S. & Opdyke B. N. (2010)(2011), “Effects of lower surface ocean pH upon the stability of shallow water carbonate sediments”. *Science of The Total Environment* doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.12.007. *Science of The Total Environment* **409** (6): 1082-1086 (in alternativa)

Underwood A. J. (1985), “Physical factors and biological interactions: the necessity and nature of ecological experiments”. In: Moore, P.G., Seed, R. (Eds.). *The Ecology of Rocky Coasts*, *Hodder & Stoughton*, London, 372-390 pp.

Whitfield M. (1975) “Future impact of fossil CO₂ on sea–Reply”. *Nature*, **254**: 274–275.

Woelkerling W. J. (1988), “The Coralline red algae: an analysis of the genera and subfamilies of nongeniculate Corallinaceae”. *British Museum (Natural History)*. *Oxford University Press*, 268 pp.

Wong M. C. & Barbeau M. A. (2003), “Effects of substrate on interactions between juvenile sea scallops (*Placopecten magellanicus* Gmelin) and predatory sea stars (*Asterias vulgaris* Verrill) and rock crabs (*Cancer irroratus* Say)”. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **287**: 155–178.

Edito dall' **ENEA**
Servizio Comunicazione

Lungotevere Thaon di Revel, 76 - 00196 Roma

www.enea.it

Stampa: Tecnografico ENEA - CR Frascati
Pervenuto il 8.05.2014

Finito di stampare nel mese di maggio 2014