

ANTONIO LONGINELLI *, ANNA PERETTI PADALINO **

UTILIZZAZIONE DI REPERTI OSSEI DI MAMMIFERI
PER STUDI QUANTITATIVI PALEOCLIMATICI:
PRIMI DATI SPERIMENTALI ***

RIASSUNTO. — Si è dato inizio ad una ricerca sperimentale tendente a provare l'utilizzabilità di reperti fossili di Mammiferi per studi paleoclimatici quantitativi. Il lavoro è stato orientato inizialmente verso i seguenti punti: 1) stabilire una tecnica di misura attendibile per la determinazione della composizione isotopica dell'ossigeno nell'acqua del sangue; 2) determinare quantitativamente la relazione esistente tra il $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua ambientale ed il $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua del sangue; 3) rilevare l'esistenza di variazioni del $\delta^{18}\text{O}$ del fosfato delle ossa di mammiferi al variare delle condizioni ambientali e quindi del $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua del sangue. I primi risultati ottenuti consentono di: — eseguire con buona accuratezza le determinazioni del $\delta^{18}\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ nel sangue di mammiferi; — calcolare una prima relazione quantitativa tra il $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua ingerita ed il $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua del sangue in ratti da laboratorio allevati in condizioni controllate e nell'uomo; — di mettere in evidenza un'ampia variazione del $\delta^{18}\text{O}$ (PO_4^{3-}) di ossa di mammiferi vissuti in aree climaticamente assai diverse. Sulla base di tali dati sperimentali è quindi lecito considerare con rinnovato interesse la possibilità di realizzare una nuova scala di « paleotemperature » isotopiche basata sullo studio di ossa fossili di mammiferi.

ABSTRACT. — Oxygen isotope measurements of the phosphate in mammal bones and teeth were suggested by LONGINELLI (1973) as a potential tool for paleoclimatic studies. Such a study could be carried out only after establishing the existence of a quantitative relationship between the oxygen isotopic composition of the environmental water and the oxygen isotopic composition of the body water. To check this point albino rats were reared under controlled conditions. They were fed with semi-dry food containing water of known and constant isotopic composition and supplied first with drinking water whose $\delta^{18}\text{O}$ was about -6 per mil and then with $\delta^{18}\text{O}$ enriched water. After changing the $\delta^{18}\text{O}$ of the drinking water, the $\delta^{18}\text{O}$ of the rats' blood water changed very quickly, according to the curve reported in Fig. 1. Steady state conditions were established about one week after changing drinking water. The $\delta^{18}\text{O}$ of the blood water under steady state conditions for different isotopic values of drinking water are given in Fig. 2 (a). Line b in the same Figure refers to the $\delta^{18}\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ in man's blood in different areas with different $\delta^{18}\text{O}$ of the environmental water. The results obtained indicate that the suggested relationship between $\delta^{18}\text{O}$ of the environmental water and $\delta^{18}\text{O}$ of body water does exist and is probably characteristic for each species of mammals. The $\delta^{18}\text{O}(\text{PO}_4^{3-})$ values measured on a first group of human bones from different latitudes (Table 1) indicate that this variable varies over a wide range, according to latitude, i.e. according to the average values of the environmental water. The results obtained are consistent with the starting hypothesis and further research in this direction looks quite promising.

Introduzione

Diversi anni or sono LONGINELLI (1973) proponeva di utilizzare i resti fossili di mammiferi (ossa e denti) per studi paleoclimatici. Tale proposta prendeva le

* Istituto di Mineralogia, Petrografia e Geochimica dell'Università, via Archirafi 36, 90123 Palermo. ** Istituto di Fisiologia Umana dell'Università, via Porcell 4, 09100 Cagliari.

*** Lavoro eseguito con il contributo finanziario del C.N.R.

mosse dalla considerazione che lo studio delle cosiddette « paleotemperature », basato sulla determinazione della composizione isotopica dell'ossigeno nel carbonato di calcio di fossili marini (lamellibranchi, gasteropodi, foraminiferi, ecc.) (EPSTEIN et alii, 1953) in pratica non ha soddisfatto uno degli scopi principali di ogni ricerca paleoclimatica, quello cioè di valutare, in termini quantitativi, le variazioni reali della temperatura media atmosferica. Ciò principalmente a causa della necessità di studiare solamente fossili marini, dell'impossibilità di stabilire con ragionevole accuratezza le variazioni di composizione isotopica dell'acqua del mare attraverso i tempi geologici (e particolarmente nel corso del Quaternario) e di tradurre le variazioni isotopiche rilevabili in termini di temperature medie atmosferiche.

Uno studio paleoclimatico diventerebbe infatti pienamente soddisfacente qualora consentisse di costruire, per una determinata area in studio, una curva delle temperature medie atmosferiche in modo da poter stabilire rapporti quantitativi tra i risultati di diverse ricerche quali ad esempio quelle paleontologiche, paleobotaniche, isotopiche e non isotopiche sulle concrezioni calcaree delle grotte, sui paleosuoli, ecc.. La proposta di utilizzare ossa fossili di mammiferi per studi paleoclimatici era basata su una serie di considerazioni teoriche, sull'attendibilità di alcune delle quali non esistevano a quel tempo evidenze sperimentali di alcun genere. Tali considerazioni si possono brevemente riassumere come segue:

- 1) la temperatura corporea dei mammiferi ovviamente non risente delle variazioni climatiche in quanto, per ogni specie, i centri termoregolatori provvedono a mantenerla ad un valore costante, con la sola eventuale eccezione di brevi periodi legati a condizioni patologiche;
- 2) in ogni mammifero l'organismo è costituito, per circa il 65 %, di acqua che, per gli individui che appartengono ad una stessa specie, e quindi con le stesse caratteristiche biologiche e fisiologiche, dovrebbe avere una composizione isotopica dell'ossigeno pressochè identica o, quanto meno, molto simile. Infatti, la composizione isotopica dell'acqua nell'organismo di un mammifero dovrebbe essere legata essenzialmente:
 - a) alla composizione isotopica media dell'acqua introdotta;
 - b) alle caratteristiche fisiologiche della specie (processi metabolici caratteristici, quantità di CO_2 prodotta nell'organismo e quantità di acqua metabolica prodotta nella sintesi dei composti organici necessari all'organismo stesso, come ad esempio le proteine);
- 3) la precipitazione del fosfato di calcio delle ossa avviene nei diversi individui di una stessa specie con le medesime caratteristiche chimico-fisiche in quanto ha luogo a temperatura costante (quella caratteristica di ogni singola specie), in un'acqua corporea che, per le ragioni sopra esposte, dovrebbe avere la stessa composizione isotopica dell'ossigeno. Ne consegue che, indipendentemente dal fatto che la precipitazione del fosfato abbia luogo in condizioni di equilibrio isotopico con l'acqua corporea o in condizioni cinetiche, dovrebbe esistere una relazione quantitativa tra la composizione isotopica dell'ossigeno nel fosfato e la composizione isotopica dell'ossigeno nell'acqua corporea;

- 4) essendo la condizione 2 b) sopra enunciata caratteristica di una specie e non di un singolo individuo, ne consegue che la composizione isotopica dell'ossigeno nel fosfato precipitato è funzione solamente della variabile 2 a) e cioè, in ultima analisi, della composizione isotopica media dell'acqua ambientale;
- 5) è ben noto (CRAIG, 1961; DANSGAARD, 1964) che la composizione isotopica media delle precipitazioni in una certa zona è generalmente funzione diretta della temperatura media annua al suolo. Anche fluttuazioni relativamente modeste della temperatura si traducono in variazioni della composizione isotopica dell'acqua meteorica nel senso di una negativizzazione del rapporto $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ per temperature decrescenti e di una positivizzazione di tale rapporto per temperature crescenti.

Oggi sappiamo che la relazione quantitativa tra la temperatura ed il $\delta^{18}\text{O}$ non è sempre applicabile nella forma stabilita da DANSGAARD, tuttavia esiste pur sempre una relazione quantitativa tra le due variabili, relazione che rimane sostanzialmente valida per una stessa zona, anche se di superficie notevolmente estesa. Ciò è particolarmente vero quando si prendano in considerazione periodi non troppo brevi e quindi non soggetti a fluttuazioni di tipo statistico.

Sulla base di tali considerazioni si dovrebbe concludere che esiste la possibilità di stabilire una relazione quantitativa tra la composizione isotopica dell'ossigeno nel fosfato delle ossa e la temperatura media annua nel periodo durante il quale tale fosfato è stato precipitato, una volta che siano provate sperimentalmente alcune delle ipotesi sopra avanzate e, specificatamente:

- I) l'esistenza di una relazione quantitativa $\delta^{18}\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ nel sangue/ $\delta^{18}\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ ambientale per ogni specie che si intende prendere in esame;
- II) la costanza del rapporto $\delta^{18}\text{O}(\text{PO}_4^{3-})/\delta^{18}\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ nel sangue per individui della stessa specie che vivono nella stessa zona e quindi la variabilità del $\delta^{18}\text{O}(\text{PO}_4^{3-})$ per individui della stessa specie che vivono in aree con acque ambientali a diversa composizione isotopica.

Si riportano in questa nota i risultati fin qui ottenuti nel corso di una ricerca indirizzata a questo scopo e si sviluppano alcune considerazioni sul significato di tali risultati.

Campioni studiati e risultati ottenuti

Il metodo più semplice per ottenere informazioni nella direzione voluta è allevare in laboratorio gruppi di mammiferi in condizioni controllate e rilevare le variazioni che si verificano a livello del $\delta^{18}\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ del sangue al variare dei valori isotopici dell'acqua introdotta. Su questo argomento esistono alcuni lavori (LEE e LIFSON, 1960; ZIMMERMANN e CEGLA, 1973; LIFSON et alii, 1975; LONGINELLI e PERETTI PADALINO, in stampa). Nel caso dei primi tre autori citati il problema è stato studiato in termini di bilancio energetico o di relazioni qualitative con l'ambiente per cui dai loro risultati non è possibile ottenere alcun dato quantitativo da utilizzare per gli scopi da noi perseguiti.

Di conseguenza, abbiamo allevato ratti albi in laboratorio, somministrando loro un alimento semi secco a tenore di umidità noto ed acqua a composizione isotopica costante. Dopo un periodo di alcune settimane, durante il quale veniva periodicamente controllata la composizione isotopica dell'ossigeno nell'acqua del sangue, il $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua somministrata veniva bruscamente cambiato, utilizzando acqua arricchita in ^{18}O da un minimo del 14 per mille ad un massimo del 50 per mille circa rispetto all'acqua iniziale.

Periodicamente, gruppi di tre ratti venivano sacrificati e la composizione isotopica dell'acqua nel sangue misurata secondo tecniche ormai da tempo stabilite (EPSTEIN e MAYEDA, 1953). L'acqua per l'effettuazione delle misure veniva separata dai campioni di sangue mediante distillazione sotto vuoto spinto fino a totale secchezza del residuo organico.

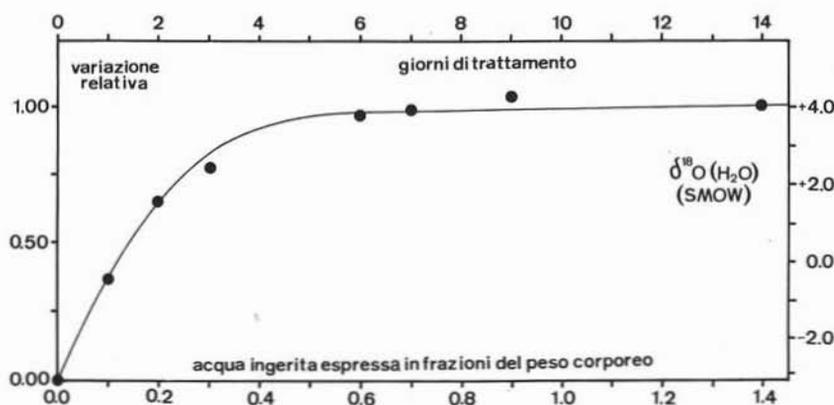


Fig. 1. — Curva rappresentativa dell'evoluzione del $\delta^{18}\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ del sangue di ratti, al variare del $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua da circa -6‰ a circa $+10\text{‰}$.

I risultati ottenuti si possono così riassumere. Nei ratti ai quali viene cambiata la composizione isotopica dell'acqua somministrata si verifica un rapido cambiamento della composizione isotopica dell'acqua del sangue, cambiamento che raggiunge condizioni di stato stazionario nel giro di 7-8 giorni, seguendo una variazione esponenziale (fig. 1). L'equazione che si può calcolare sulla base dei punti sperimentali per la curva di variazione nel tempo del $\delta^{18}\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ corporea è la seguente:

$$y = \frac{e^{4x} - e^{-4x}}{e^{4x} + e^{-4x}} \quad (1)$$

Tale equazione è analoga a quella della tangente iperbolica, la sola differenza essendo il coefficiente 4 riportato all'esponente. Questo coefficiente è dovuto al fatto che la variazione interviene assai rapidamente nel caso dei ratti, particolarmente in

relazione all'alto valore del rapporto H_2O introdotta giornalmente/peso corporeo, valore che, nel nostro caso, è dell'ordine di 0,1. Il tempo di dimezzamento della variazione totale è di 1,38 giorni. Ovviamente, i tempi richiesti per il raggiungimento delle condizioni di stato stazionario saranno diverse per specie diverse. Le equazioni relative dovrebbero essere però analoghe alla (1) con la sola differenza di una variazione del coefficiente all'esponente. Se si riportano su un grafico i valori del $\delta^{18}O(H_2O)$ dell'acqua introdotta contro il $\delta^{18}O(H_2O)$ del sangue allo stato stazionario si ottiene una serie di punti che consentono il calcolo dell'equazione della retta di regressione. Il coefficiente angolare di questa retta dovrebbe essere caratteristico della specie studiata, nelle condizioni verificatesi.

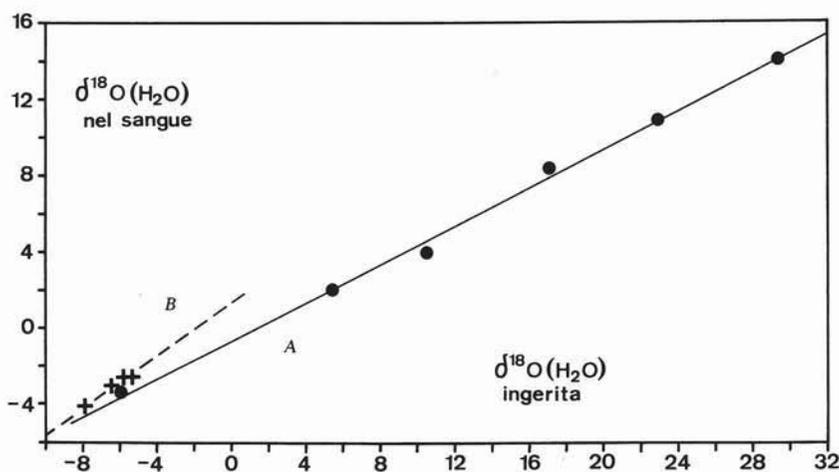


Fig. 2. — Composizione isotopica dell'acqua ingerita contro composizione isotopica dell'acqua del sangue (ratti albi) in condizioni di stato stazionario (retta A). La retta B si riferisce al $\delta^{18}O$ dell'acqua del sangue umano riportata contro il $\delta^{18}O$ medio dell'acqua ambientale.

Nel caso dei ratti da noi studiati (fig. 2, retta A) la relazione quantitativa tra composizione isotopica dell' H_2O ingerita e dell' H_2O corporea è la seguente:

$$y = 0,506 x - 0,64 \quad (2)$$

Ciò significa che per ogni specie che si intende considerare si deve poter ottenere un'analogia equazione nella quale varieranno il coefficiente angolare e la costante additiva. La valutazione di tali equazioni, relative ad esempio alle specie i cui resti fossili si rinvencono più facilmente nelle grotte abitate dall'uomo nel corso del Quaternario, quali capra, bue, maiale, daino ecc., rappresenta lo scopo immediato nello sviluppo della ricerca in questo campo. Ovviamente, trattandosi di animali di rilevanti dimensioni si deve escludere la possibilità di un trattamento in laboratorio con acqua arricchita e si deve pertanto ricorrere allo studio in aree diverse con differenze misurabili della composizione isotopica dell'acqua ambientale. Ciò presenta alcune difficoltà pratiche che stiamo attualmente cercando di superare.

Come primo contributo in questa direzione abbiamo effettuato alcune serie di misure della composizione isotopica dell'acqua nel sangue umano prelevando campioni da gruppi di individui scelti a caso sia in aree con differenti $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua ambientale (Pisa, Palermo e Petralia (comune a 1000 m sul livello del mare in provincia di Palermo)), sia in aree con uguale o simile composizione isotopica dell'acqua (Cagliari e Palermo). I risultati medi ottenuti per ogni gruppo di individui sono riportati in fig. 2 (retta B).

La variabilità da individuo a individuo si è dimostrata relativamente modesta (entro il campo di 3σ , un σ essendo dell'ordine di $\pm 0,15\%$ che è assai prossimo alla deviazione standard che si ottiene nelle normali misure isotopiche di acqua). Tale variabilità si può comunque imputare sia a cause fisiologiche sia, molto più verosimilmente, a cause nutrizionali. Infatti, l'alimentazione umana comporta oggi l'uso di un'estrema varietà di cibi e bevande di origine e provenienza diversissime che possono quindi influire sul risultato finale. A parte ciò è possibile dedurre dai dati ottenuti una proporzionalità tra i valori medi dell'acqua meteorica locale ed i valori medi del $\delta^{18}\text{O}(\text{H}_2\text{O})$ del sangue. Nel caso delle misure riportate in fig. 2 il calcolo della retta di regressione passante per i punti ottenuti fornisce la seguente equazione:

$$y = 0,624 x + 0,87 \quad (3)$$

La differenza dalla (2), relativa al caso dei ratti, è senz'altro considerevole e questo è particolarmente incoraggiante dal punto di vista dell'utilizzazione di queste rette per scopi paleoclimatici. Infatti, maggiore la differenza tra i coefficienti angolari delle rette relative alle diverse specie, minore l'errore complessivo che potrà risultare all'atto della conversione dei dati isotopici in temperature medie ambientali. Le differenze in questione sono imputabili a fattori biochimici ed in particolare agli effetti di scambio isotopico tra la CO_2 prodotta nei processi metabolici e l'acqua corporea nonché al miscelamento tra l' H_2O metabolica (di composizione isotopica per ora sconosciuta) e l'acqua corporea.

Abbiamo anche cominciato ad effettuare misure della composizione isotopica dell'ossigeno nel fosfato delle ossa e dei denti di uomini di diversa provenienza per ottenere le prime informazioni relative ai valori del $\delta^{18}\text{O}(\text{PO}_4^{3-})$ ed alla loro variabilità nel caso di zone diverse e quindi con diversa composizione isotopica dell'acqua ambientale. Le preparazioni e le misure sono state effettuate secondo il metodo già illustrato a suo tempo da LONGINELLI (1965, 1966). I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 1. Tali dati sembrano indicare che la composizione isotopica dell'ossigeno nel fosfato delle ossa varia al variare delle condizioni climatiche. Alte temperature medie (e quindi acque ambientali arricchite in ^{18}O) determinano un arricchimento in ^{18}O del fosfato, arricchimento che decresce progressivamente al diminuire della temperatura media raggiungendo i valori minimi nel caso dei reperti provenienti dalla Finlandia e dalla Terra del Fuoco. Campioni provenienti dalla stessa zona (Lapponia e Finlandia, Italia) mostrano valori simili

tra di loro pur se entro limiti abbastanza ampi. Ciò è ragionevole tenendo conto della variabilità delle zone climatiche che si possono avere in ogni paese ed in particolare in Italia. È chiaro che, allo stato attuale della ricerca, si può accettare come valida solamente una relazione qualitativa. Per passare a considerazioni quantitative sarà necessario effettuare un notevole numero di misure su materiali la cui provenienza sia nota con grande precisione per poter far riferimento sia ad un ben preciso valore del $\delta^{18}\text{O}$ dell'acqua ambientale, sia ad un preciso valore della temperatura media annuale.

TABELLA 1

Composizione isotopica dell'ossigeno del fosfato di ossa e denti umani di diversa origine e provenienza

n.camp.	Provenienza	Campione	$\delta^{18}\text{O}$	n.camp.	Provenienza	Campione	$\delta^{18}\text{O}$
1	Laponnia	costola	+11,1	9	USA, Mississ.	dente	+17,2
2	Laponnia	costola	+11,7	10	Italia	tibia	+18,8
3	Finlandia	naso	+12,5	11	Italia	tibia	+16,8
4	Finlandia	tibia	+12,7	12	Italia	costola	+17,6
5	Terra d. Fuoco	costola	+14,5	13	Libia	costola	+18,2
6	USA, Mass.	dente	+15,7	14	Somalia	costola	+21,1
7	USA, Washing.	dente	+15,0	15	Somalia	tibia	+22,3
8	USA, Texas	dente	+16,7	16	Somalia	tibia	+21,9

I valori di $\delta^{18}\text{O}$ sono riportati contro lo standard V-SMOW

I valori di $\delta^{18}\text{O}$ sono riportati contro lo standard V-SMOW.

Conclusioni

Nella parte introduttiva di questa nota sono state precisate le relazioni fondamentali che devono essere provate sperimentalmente per poter considerare attendibile il metodo proposto per studi paleoclimatici. I primi gruppi di misure effettuate a questo scopo, pur se assolutamente insufficienti dal punto di vista di una statistica di sicura attendibilità, forniscono precise ed interessanti indicazioni che si possono riassumere come segue:

- a) esiste indubbiamente una relazione diretta tra la composizione isotopica dell'ossigeno nell'acqua ambientale e la composizione isotopica dell'ossigeno nell'acqua del sangue di mammiferi. Tale relazione è traducibile in equazioni caratteristiche per ogni specie che, una volta esaurita la necessaria sperimentazione, dovrebbero consentire di costituire un riferimento quantitativo per la traduzione in termini di temperatura ambientale delle composizioni isotopiche misurate su reperti di ossa fossili;
- b) la composizione isotopica dell'ossigeno nel fosfato delle ossa di mammiferi sembra rimanere abbastanza omogenea tra individui vissuti nella stessa zona

e quindi con acque ambientali analoghe. Inoltre il $\delta^{18}\text{O}(\text{PO}_4^{3-})$ delle ossa sembra variare parallelamente al variare della composizione isotopica media delle acque ambientali e quindi, in ultima analisi, delle temperature medie annue al suolo.

È lecito quindi, sulla base dei risultati sperimentali, considerare con rinnovato interesse la possibilità di realizzare una nuova scala di « paleotemperature » isotopiche che consenta finalmente l'esecuzione di studi paleoclimatici quantitativi almeno nel caso dei periodi geologicamente più recenti e forse più interessanti dal punto di vista paleoclimatico.

BIBLIOGRAFIA

- CRAIG H. (1961) - *Standards for reporting concentrations of deuterium and oxygen-18 in natural waters*. Science, 133, 1833-1835.
- DANSGAARD W. (1964) - *Stable isotopes in precipitation*. Tellus, XVI, 4, 436-468.
- EPSTEIN S., BUCHSBAUM R., LOWENSTAM H. A., UREY H. C. (1953) - *Revised carbonate-water isotopic temperature scale*. Geol. Soc. Am. Bull., 64, 1315-1326.
- EPSTEIN S., MAYEDA T. (1953) - *Variation of ^{18}O content of waters from natural source*. Geochim. Cosmochim. Acta, 4, 213-224.
- GONFIANTINI R. (1978) - *Standards for stable isotopes measurements in natural compounds*. Nature, 271, 534-536.
- LEE J. S., LIFSON N. (1960) - *Measurement of the total energy and material balance in rats by means of doubly labeled water*. Am. Journ. Physiol., 199, 238-242.
- LIFSON N., LITTLE W. S., LEVITT D. G., HENDERSON R. M. (1975) - *D_2^{18}O method for CO_2 output in small mammals and economic feasibility in man*. Journ. Appl. Physiol., 39, 657-664.
- LONGINELLI A. (1965) - *Oxygen isotopic composition of orthophosphate from shells of living marine organisms*. Nature, 207, 716-719.
- LONGINELLI A. (1966) - *Ratios of oxygen-18 : oxygen-16 in phosphate and carbonate from living and fossil marine organisms*. Nature, 211, 923-927.
- LONGINELLI A. (1973) - *Preliminary oxygen-isotope measurements of phosphate from mammal teeth and bones*. Colloques Internat. du CNRS, n. 219, 267-271.
- LONGINELLI A., PERETTI PADALINO A. (1980) - *Oxygen isotopic composition of water from mammal blood: first results*. Mass. Spectr. in Bioch. Med. and Envir. Res., in stampa.
- ZIMMERMANN U., CEGLA U. (1973) - *Der Deuterium- und Sauerstoff-18-Gehalt der Körperflüssigkeit des Menschen und seine Änderung bei Ortswechsel*. Naturwissenschaften, 60, 243-249.