

Caratterizzazione morfologica e molecolare della flora microalgale dei fanghi del Centro Termale Pausilya Terme di Donn'Anna (Napoli, Campania)

Antonella Giorgio*, Francesco Aliberti, Federica Carraturo, Giuseppe Gargiulo, Marco Guida

Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Napoli Federico II, Via Cinthia, 21 – 80126 Napoli

* Referente per la corrispondenza: antonella.giorgio@unina.it

Pervenuto il 25.9.2015; accettato il 16.10.2015

RIASSUNTO

I fanghi termali sono stati ampiamente utilizzati fin dall'antichità per le loro proprietà benefiche. Essi sono costituiti da una miscela di argilla e acqua termale, arricchita da sostanze organiche di origine metabolica. Le specifiche proprietà terapeutiche sono attribuibili ad una ricca microflora algale, costituita principalmente da cianobatteri, alghe verdi e diatomee. Tra le sostanze di origine biologica si annoverano lipidi, carotenoidi e ficocianine le cui proprietà antiinfiammatorie, antiossidanti e antireumatiche sono ormai ben documentate. Nel presente lavoro sono riportati i risultati di uno studio preliminare condotto su un fango termale maturo al fine di caratterizzare la microflora algale in esso presente. A tale scopo sono state utilizzate tecniche di microscopia ottica e di biologia molecolare (estrazione del DNA, PCR ambientali, sequenziamento). I risultati hanno rivelato una biodiversità algale notevole, e la presenza di specie appartenenti a generi molto diffusi, tra cui *Leptolyngbya*, *Scenedesmus*, *Navicula*, *Amphora* e *Cladophora*.

PAROLE CHIAVE: Fango termale / Cianobatteri / Diatomee / Biologia molecolare / Microscopia

Morphological and molecular characterization of microalgal community in thermal muds of Pausilya Terme (Naples, Italy)

Thermal muds have been used since ancient times for their beneficial properties. Muds consist of clay, mineral thermal waters and organic substances derived from metabolic activities. A complex microalgal community, consisting of cyanobacteria, green algae and diatoms, are responsible for the therapeutic effects of peloids. Biological components of peloids are represented by lipids, carotenoids and phycocyanin whose anti-inflammatory, antireumatic and antioxidant properties are well documented. In this paper, the results of a preliminary study regarding the determination of microalgae of thermal mud are reported. Microscopic and molecular techniques were employed (DNA extraction, environmental PCR, sequencing). Results show a significant microalgal biodiversity in samples and a great number of taxa belonging to widely-diffused genera such as *Leptolyngbya*, *Scenedesmus*, *Navicula*, *Amphora* and *Cladophora*.

KEYWORDS: Thermal muds / Cyanobacteria / Diatoms / Molecular biology / Microscopy

INTRODUZIONE

I fanghi termali sono stati ampiamente utilizzati fin dall'antichità per le loro proprietà benefiche (Summa e Tateo, 1999; Minguzzi *et al.*, 1999; Viseras e Galindo, 1999). I fanghi sono particolarmente indicati in campo cosmetico e medico, per la cura della cellulite, nelle affezioni reumatiche croniche, nei processi di rigenerazione nei postumi di fratture, nelle affezioni croniche dei bronchi, dell'orecchio, del naso e della gola. Tecnicamente si definiscono fanghi o peloidi le melme ipertermalizzate (o ipertermali) derivate dalla mescolanza di

una frazione solida argillosa con una componente liquida termo-minerale (acqua termale). Quest'ultima può avere caratteristiche di salinità differenti ed essere di derivazione marina o lacustre. Dal processo di mescolamento dipendono le proprietà specifiche dei fanghi termali, tra cui il tenore idrico, la consistenza, l'adesività, la capacità termica, la capacità di raffreddamento e la capacità di scambio (Summa e Tateo, 1998). Una componente organica, prodotta dal metabolismo biologico di una specifica comunità microbica termofila non patogena,

rende il fango maturo e conferisce ad esso specifiche proprietà benefiche (Sanchez *et al.*, 2002; Veniale *et al.*, 2004; Tserenpil *et al.*, 2010; Suarez *et al.*, 2011). L'intero processo di maturazione avviene in apposite vasche, nelle quali si assiste all'unione tra la componente argillosa inorganica del fango termale depurata e l'acqua termale. L'impasto è generalmente tenuto in continuo mescolamento a una temperatura di circa 60°C e a intensità luminose costanti. Questo rappresenta lo stadio critico per lo sviluppo della microflora algale che, a sua volta, influenzerà l'intero processo di maturazione dell'argilla (Centini *et al.*, 2015). Data la notevole variabilità dei parametri chimico-fisici dei fanghi e delle acque termali di cui sono composti, in essi si possono ritrovare organismi diversi, tra i quali batteri, protozoi, microalghe e cianobatteri (Tolomio *et al.*, 1999; 2002; 2004).

Tra i possibili colonizzatori dei fanghi termali i cianobatteri risultano i più abbondanti in termini di biomassa. Inoltre, in quanto specie pioniere, creano biofilm di considerevole ampiezza sulla superficie colonizzata. Numerosi studi scientifici hanno inoltre dimostrato la relazione tra i cianobatteri e la produzione di diversi composti bioattivi, come ad esempio le ficocianine, i flavonoidi, gli acidi grassi poliinsaturi, gli esopolisaccaridi, che possono essere sfruttati in diverse applicazioni, tra le quali le terapie mediche (Eriksen, 2008; Sivonen e Börner, 2008). Numerosi studi hanno infatti dimostrato l'attività antiossidante dei flavonoidi oltre che le proprietà antiinfiammatorie e antitumorali delle ficocianine (Cao *et al.*, 1997; Bath e Madyastha, 2001).

Il lavoro è stato svolto in collaborazione con il centro termale Pausilya Terme di Donn'Anna (Napoli, Campania), nell'ambito della concessione di ricerca mineraria. L'obiettivo è stato quello di caratterizzare, da un punto di vista morfologico e molecolare, la flora microalgale naturalmente presente nei fanghi termali e responsabile delle loro proprietà benefiche.

MATERIALI E METODI

I campioni di fango termale sono stati prelevati dalle vasche di maturazione del complesso termale e trasferiti in condizioni asettiche in laboratorio. Prima del prelievo il fango è stato omogenato, al fine di ottenere un campione rappresentativo da sottoporre ad analisi. Per l'analisi in laboratorio è stato preferito un approccio multidisciplinare, basato su tecniche colturali, microscopiche e molecolari. Le tecniche colturali sono volte alla preparazione di colture monoalgali; solo dopo le metodiche di isolamento è possibile procedere all'identificazione microscopica (Normal 9/88). In questo modo è più immediata e semplice la caratterizzazione morfologica e la classificazione tassonomica dei microorganismi, in base all'osservazione delle caratteristiche

fenotipiche.

A tal fine una parte del campione è stata inoculata in terreni di coltura liquidi e solidi. In particolare sono stati utilizzati i terreni Bold Basal Medium (Bischoff e Bold, 1963), Blue Green 11 (Castenholz, 1988) e WC Medium (Guillard e Lorenzen, 1972) per consentire la crescita rispettivamente di alghe verdi, cianobatteri e diatomee che, da analisi bibliografiche, rappresentano i principali componenti fotosintetici dei fanghi termali.

I campioni sono stati conservati in termostato ad una temperatura di $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e ad un'intensità luminosa di circa $7,6 \text{ W m}^{-2}$ (PAR) con fotoperiodo di 12/12 ore. Ogni 15 giorni le colture sono state rinnovate al fine di garantire alle comunità microbiche una completa disponibilità delle sostanze nutritive necessarie per la crescita e per garantire il mantenimento della variabilità specifica dei fanghi oggetto di studio. Per un ottimale riconoscimento morfologico delle diatomee presenti all'interno del campione, le colture algali sono state ossidate con perossido di idrogeno a caldo 130 volumi, adattando il protocollo previsto da Apat (2007). Le analisi di microscopia sono state eseguite su un'aliquota di campione in coltura tramite l'utilizzo del microscopio ottico Nikon Eclipse E800 con ingrandimenti 400X, 600X e 1000X; sono state scattate microfotografie degli organismi osservati per l'allestimento di un database per il successivo riconoscimento tassonomico. L'identificazione tassonomica delle microalghe è stata effettuata utilizzando monografie e tavole di riconoscimento tassonomico e impiegando quali elementi diagnostici, la forma e dimensione cellulare, presenza e assenza del pirenoide, numero e forma del cloroplasto, lunghezza e larghezza dei filamenti (Bourrelly, 1986; Van den Hoeck *et al.*, 1995). Il riconoscimento morfologico delle diatomee si è basato su specifici caratteri sistematici presenti nella parete cellulare di queste alghe: forma e dimensioni del frustulo, numero e disposizione delle strie e delle fibule e delle coste. La determinazione delle diatomee sino al livello di specie è stata fatta consultando le monografie di Krammer e Lange-Bertalot (1986; 1988; 1991a; 1991b), i testi di riferimento (Krammer 1992; 2000; 2002), Lange-Bertalot (1993; 2001) e Werum and Lange-Bertalot (2004).

Le tecniche di biologia molecolare basate sull'analisi di specifiche sequenze di DNA sono state utilizzate per individuare microorganismi a crescita lenta e difficile. Tali tecniche richiedono una ridotta quantità di campione su cui condurre le analisi e consentono di ottimizzare le informazioni sul tipo di microorganismi che colonizzano i fanghi termali. È stato utilizzato il metodo cTAB di Doyle e Doyle (1987) per estrarre il DNA genomico dai campioni. La purezza e la concentrazione del DNA estratto sono state stimate mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio 0,8% in tampone TAE 0,5% per circa 40' a 70V. Una stima

più precisa della quantità del DNA estratto è stata eseguita al NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). La caratterizzazione genetica è stata condotta secondo un approccio multigenico, mediante l'utilizzo di diversi marker molecolari (Nubel *et al.*, 1997; Bruder e Medlin, 2007). Per l'identificazione della componente algale è stata utilizzata la coppia di primer A: EuKA1F (5'-CTGGTTGATCCTGCCAG-3') e EuK516Rev (5'-ACCAGACTTGCCCTCC-3'), specifica per una regione di DNA ribosomiale 18S di lunghezza pari a 500bp. Per la componente cianobatterica è stata amplificata una specifica regione del DNA ribosomiale 16S utilizzando la coppia di primer B: Cya371F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTCAC-3') e Cya783Rev (5'-GACTACAGGGGTATC-TAATCCCT-3'), con prodotto di amplificazione atteso lungo circa 400bp. Per la componente diatomica è stata utilizzata la coppia di primer C: Dia18SF (5'-AGTAGTCATACGCTCGTCT-3') e Dia18SR (5'-AAGGTTTAGACAAGTTCTCG-3'). I prodotti di amplificazione sono stati analizzati attraverso elettroforesi su gel di agarosio alla concentrazione di 1,5 % in tampone TAE 0,5 % e, utilizzando un marcatore a peso molecolare noto, ne è stata stimata la concentrazione.

Per ciascun prodotto di amplificazione è stata ottenuta una sequenza consenso attraverso sequenziamento automatico (Genetic Analyzer mod. 3130_Applied Biosystems). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite secondo il protocollo standard del BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies). La sequenza ottenuta da ciascun clone è stata editata, controllata con programma Bioedit e utilizzata per le successive analisi di riconoscimento tassonomico in GenBank, attraverso il database online del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

RISULTATI

Le tecniche colturali, seguite dalle osservazioni al microscopio ottico, hanno permesso l'identificazione solo di alcune delle specie microalgali facenti parte della biomassa fotosintetica, in particolare cianobatteri, alghe verdi e alcune diatomee. Le analisi molecolari hanno confermato la presenza dei taxa identificati su base microscopica ed hanno consentito l'identificazione di microorganismi presenti anche in tracce, la cui caratterizzazione morfologica è risultata difficile. Tra questi *Scenedesmus* sp., *Chlamydomonas* sp., *Pseudococcomyxa simplex* (Mainx) Fott 1981, *Monodus* sp. e *Coccomyxa* sp.

Le analisi di microscopia ottica hanno evidenziato la presenza di organismi unicellulari (solitari e in colonie filamento), attribuibili per morfologia al genere *Leptolyngbya* (Classe Cyanophyceae, Ordine Oscillatoriales, Famiglia Pseudanabaenaceae). I filamenti di questo cianobatterio al microscopio si presentano lunghi, solitari o raggruppati in intrecci privi di organizzazione; sono generalmente arcuati, isopolari con le cellule apicali tonde o leggermente coniche (Fig. 1).

Le cellule di ciascun filamento sono isodiametriche, sviluppate nel senso della lunghezza; il contenuto, omogeneo, appare al microscopio privo di granulazioni specifiche. Caratteristica è la colorazione blu-verde dei filamenti. Altri organismi identificati morfologicamente appartengono alla famiglia delle Nostocaceae (Ordine Nostocales). Si tratta di cianobatteri filamentososi la cui caratteristica metabolica rilevante è la capacità di fissare l'azoto atmosferico. I filamenti, non ramificati, sono formati da cellule tondeggianti e sono rivestiti da sostanze mucillaginose (Fig. 2).

Gli individui attribuibili su base morfologica al

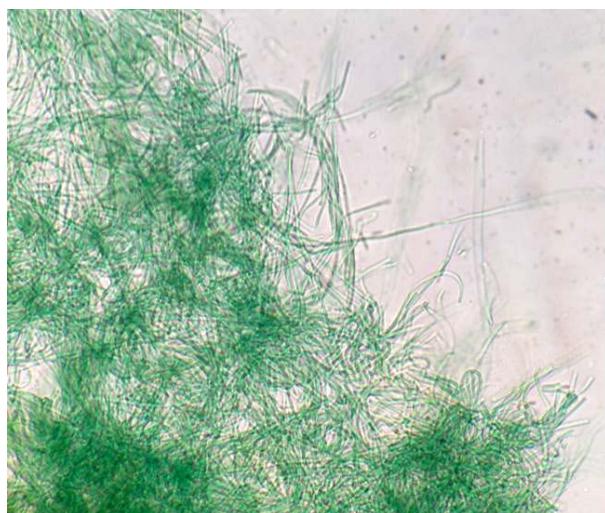


Fig. 1. *Leptolyngbya* sp. A: Osservazione microscopica ad ingrandimento 400X; B: Osservazione ad ingrandimento 1000X.

genere *Cladophora* (Classe Ulvophyceae, Ordine Cladophorales, Famiglia Cladophoraceae) hanno l'aspetto di lunghi filamenti ramificati, le cui cellule possiedono un cloroplasto in posizione parietale e numerosi nuclei (Fig. 3).

Le analisi di microscopia ottica hanno evidenziato anche la presenza di numerose diatomee, appartenenti ai generi *Navicula*, *Gomphonema*, *Nitzschia* e *Amphora*. Tra le specie rappresentative si annoverano *Navicula cincta* (Ehrenberg) Ralfs in Pritchard 1861, *Gomphonema acuminatum* Ehrenberg 1832, *Amphora ovalis* (Kützing) Kützing 1844, *Surirella brebissonii* Krammer and Lange-Bertalot 1987, *Rhoicosphenia abbreviata* (C. Agardh) Lange-Bertalot 1980, *Cocconeis placentula* Ehrenberg 1838 e *Nitzschia palea* (Kützing) W. Smith 1856 (Fig. 4).

CONCLUSIONI

Le analisi morfologiche e molecolari condotte sui campioni di fango provenienti dal complesso termale Pausilya hanno evidenziato la presenza di numerosi microorganismi, appartenenti a differenti gruppi tassonomici tra cui cianobatteri, alghe verdi e diatomee. La presenza di questi microorganismi, in aggiunta alle caratteristiche fisico-chimiche intrinseche dei fanghi, ne spiegherebbe le proprietà benefiche in quanto responsabili della secrezione di sostanze metabolicamente attive (Gerwick *et al.*, 2008; Sivonen e Börner, 2008) tra cui carotenoidi e sostanze lipidiche. Ulteriori analisi potrebbero essere condotte sui fanghi in fasi di maturazione successive, per evidenziarne la maggior complessità biologica. Infatti, trattandosi di campioni di origine ambientale non è da escludere la possibi-

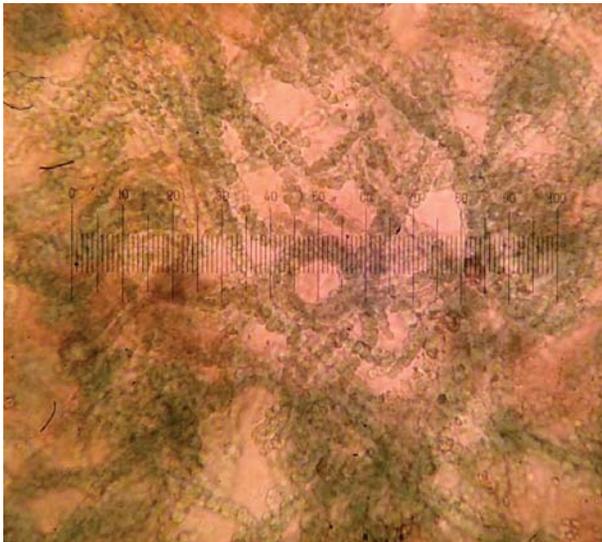


Fig. 2. Porzione di film biologico costituito principalmente da individui appartenenti alla famiglia Nostocaceae. Osservazione microscopica ad ingrandimento 400X.

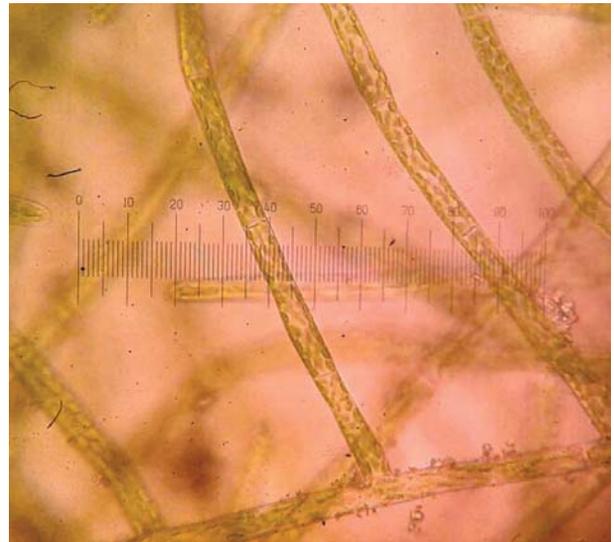


Fig. 3. *Cladophora* sp. presente nel fango termale in esame. Osservazione microscopica ad ingrandimento 400X.

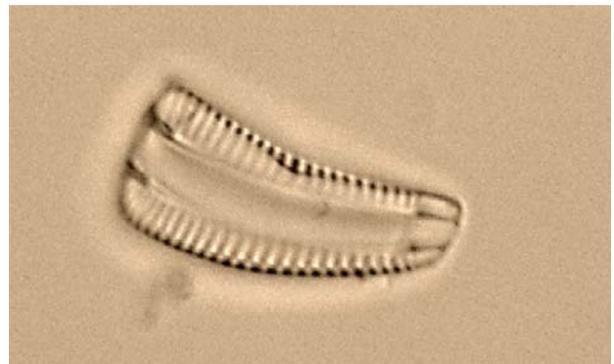
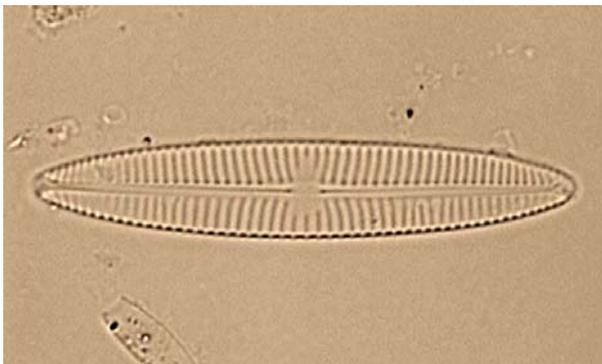


Fig. 4. Microfotografie delle diatomee *Navicula tripunctata* (a sinistra) e *Rhoicosphenia abbreviata* (a destra).

lità di differenziamento dei consorzi investigati, espressa in termini di variazione quantitativa e/o qualitativa della biodiversità. *Cladophora* sp. così come dimostrato in altri studi scientifici (Soltani *et al.*, 2011) possiede note capacità antiossidanti e antimicrobiche.

Le analisi molecolari hanno evidenziato la presenza di specie microalgali non patogene, la cui attività

metabolica, secondo quanto riportato in letteratura (Gerwick *et al.*, 2008; Sivonen e Börner, 2008) è responsabile della produzione di acidi grassi, lipidi e altre macromolecole. Ulteriori studi sono in via di sviluppo, al fine di caratterizzare le classi di molecole secrete e valutare il loro coinvolgimento nell'organizzazione strutturale della matrice oltre che le eventuali proprietà terapeutiche.

BIBLIOGRAFIA

- Apat, 2007. *Campionamento ed analisi delle diatomee bentoniche dei corsi d'acqua* - Metodi biologici per le acque. Parte I.
- Bhat V.B., Madyastha K.M., 2001. Scavenging of peroxy-nitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **285** (2): 262-266.
- Bischoff H.W., Bold, H.C., 1963. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. *Phycological Studies* IV. University of Texas, **6318**: 1-95.
- Bourelly P., 1986. *Les Algues d'Eau Douce. Tome III. Les Algues Bleues et Rouges, Les Eugléniens, Peridiniens et Cryptomonadines*. Second Edition. N. Boubée et Cie, Paris.
- Bruder K., Medlin L.K., 2007. Molecular assessment of phylogenetic relationships in selected species/genera in the naviculoid diatoms (Bacillariophyta). I. The genus *Placoneis*. *Nova Hedwigia*, **85**: 331-352.
- Cao C., Sofic E., Prior R.L., 1997. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationship. *Free Radical Biology & Medicine*, **22**: 749-760.
- Centini M., Tredici M.R., Biondi N., Buonocore A., Maffei Facino R., Anselmi C., 2015. Thermal mud maturation: organic matter and biological activity. *International Journal of Cosmetic Science*, **1**: 1-9.
- Castenholz R. W., 1988. Culturing methods for cyanobacteria. *Methods in Enzymology*, **167**: 68-93.
- Doyle J.J., Doyle J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Analysis*, **19**: 11-15.
- Eriksen N.T., 2008. Production of phycocyanin – a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **1**: 1-14.
- Gerwick W.H., Coates R.C., Engene N., Gerwick L., Grindberg R.V., Jones A.C., Sorrels C.M., 2008. Marine Cyanobacteria produce exciting potential pharmaceuticals. *Microbe* **3**: 277-284.
- Guillard R.R.L., Lorenzen C.J., 1972. Yellow-green algae with chlorophyllide C. *Journal of Phycology*, **8**: 10-14.
- Krammer K., 1992. *Pinnularia*, eine monographie der europäischen taxa. *Bibliotheca Diatomologica*, **26**: 1-353.
- Krammer K., 2000. The genus *Pinnularia*. In: Lange-Bertalot, H. (ed.), *Diatoms of Europe*, 1. A.R.G. Gantner Verlag, Ruggell, 572 pp..
- Krammer K., 2002. *Diatoms of Europe. Diatoms of the European inland waters and comparable habitats. Cymbella*, vol. 3. A.R.G. Gantner Verlag K.G, Ruggell, 530 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1986. *SüBwasswasserflora von Mitteleuropa, Bacillariophyceae 1, Naviculaceae*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 876 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1988. *SüBwasswasserflora von Mitteleuropa, Bacillariophyceae 2, Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 596 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1991a. *SüBwasswasserflora von Mitteleuropa, Bacillariophyceae 3, Centrales, Fragilariaceae, Eumotiaceae*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 576 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1991b. *SüBwasswasserflora von Mitteleuropa, Bacillariophyceae 4, Achnantheaceae, Literaturverzeichnis*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 437 pp.
- Lange-Bertalot H., 1993. 85 *New Taxa*, 2/1-4. J. Cramer, Berlin, 453 pp.
- Lange-Bertalot H., 2001. Diatoms of Europe. *Diatoms of the European inland waters and comparable habitats. Navicula sensu stricto. 10 Genera Separated from Navicula sensu lato*. Frustulia, vol. 2. A.R.G. Gantner Verlag K.G., Ruggell, 526 pp.
- Minguzzi V., Morandi N., Tagnin S., Tateo F., 1999. Le argille curative in uso negli stabilimenti termali emiliano-romagnoli: verifica della composizione e delle proprietà. *Mineralogica et Petrographica Acta*, **XLII**: 287-298.
- Normal 9/88, 1988. *Microflora autotrofa ed eterotrofa: tecniche di isolamento in coltura*. Istituto Centrale del Restauro-Commissione Normal, ICR-CNR, Rome, Italy.
- Nubel U., Garcia-Pichel F., Muyzer G., 1997. PCR primers to Amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** (8): 3327-3332.
- Sanchez C.J., Parras J., Carretero M.I., 2002. The effect of maturation upon the mineralogical and physico-chemical properties of illitic-smectitic clays for pelotherapy. *Applied Clay Science*, **37**: 457-463.
- Sivonen K., Börner T., 2008. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In Herraro, A., Flores E. (ed.), *The cyanobacteria: Molecular Biology, Genomics and Evolution*: 159-197, Caister Academic Press, Norfolk.
- Soltani S., Saadatmand S., Khavarinejad R., Nejadstarrati T., 2011. Antioxidant and antibacterial activities of *Cladophora glomerata* (L.) Kütz. in Caspian Sea Coast, Iran. *African Journal of Biotechnology* **10** (39): 7684-7689.
- Suarez M., Gonzales P., Dominguez R., 2011. Identification of organic compounds in San Diego de los Baños Peloid (Pinar del Rio, Cuba). *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **17**: 155-165.
- Summa V., Tateo F., 1998. The use of pelitic raw materials in thermal centres: mineralogy, geochemistry, grain-size and leaching tests. Examples from Lucania area (southern

- Italy). *Applied Clay Science*, **12**: 403-417.
- Summa V., Tateo F., 1999. Geochemistry of two peats suitable for medical uses and their behavior during leaching. *Applied Clay Science*, **15**: 477-489.
- Tolomio C., Ceschi-Berrini C., De Apollonia F., Galzigna L., Masiero L., Moro I., Moschin E., 2002. Diatoms in the thermal mud of Abano Terme, Italy (Maturation peloid). *Algological study* **105**: 11-27.
- Tolomio C., Ceschi-Berrini C., Moschin E., Galzigna L., 1999. Colonization by diatoms and antirheumatic activity of thermal muds. *Cell Biochemistry and Function*, **17**: 29-33.
- Tolomio C., De Apollonia F., Moro I., Ceschi-Berrini C., 2004. Thermophilic microalgae growth on different substrates and at different temperature in experimental tanks in Abano Terme (Italy). *Algological study* **111**: 145-157.
- Tserenpil Sh., Dolmaa G., Voronkov M.G., 2010. Organic matters in healing muds from Mongolia. *Applied Clay Science*, **49**: 55-63.
- Van den Hoek C., Mann D. G., Jahns H. M., 1995. *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge, University Press, Cambridge. 627 pp.
- Veniale F., Barberis E., Carcangiu G., Morandi N., Setti M., Tamanini M., 2004. Formulation of muds for pelotherapy: effects of "maturation" by different mineral waters. *Applied Clay Science*, **25**: 135-148.
- Viseras C., Lopez Galindo A., 1999. Pharmaceutical applications of some Spanish clays (sepiolite, palygorskite, bentonite): some preformulation studies. *Applied Clay Science*, **14**: 69-82.
- Werum M., Lange-Bertalot H., 2004. Diatoms in springs from Central Europe and elsewhere under the influence of hydrogeology impacts. In: H. Lange-Bertalot (ed.), *Iconographia Diatomologica*. 13: Koeltz, Koenigstein: 417 pp.