

Corso di Formazione Criteri e metodologie per lo studio ed il controllo delle alghe in acque destinate alla potabilizzazione.
AGAC - Reggio Emilia, 2-5 giugno 1997.

Dinamica stagionale delle comunità algali e analisi microscopica del fitoplancton

Giuseppe Morabito¹

1. Dinamica stagionale delle comunità algali

- 1.1 RELAZIONI CON LE VARIAZIONI DELL'AMBIENTE FISICO
- 1.2. RELAZIONI CON LE MODIFICAZIONI DELL'AMBIENTE CHIMICO
- 1.3. RAPPORTI CON ALTRI LIVELLI TROFICI
- 1.4. LA SUCCESSIONE STAGIONALE
- 1.5. PRINCIPALI ASSOCIAZIONI FITOPLANCTONICHE

2. Analisi microscopica di un campione di fitoplancton

- 2.1. GENERALITÀ
- 2.2. PRECISIONE DEL CONTEGGIO
- 2.3. CONTEGGIO PER TRANSETTI
- 2.4. CONTEGGIO PER CAMPI CASUALI
- 2.5. CONTEGGIO SULL'INTERA CAMERA
- 2.6. CONTEGGIO PER PRESENZA - ASSENZA
- 2.7. CONTEGGIO DI ORGANISMI COLONIALI
- 2.8. DETERMINAZIONE DEI VALORI DI DENSITÀ E BIOVOLUME ALGALI

3. Ricerca e determinazione dei principali pigmenti algali

4. Introduzione ai *taxa* algali tossici

5. Indicazioni bibliografiche

Appendice A

METODO DI ANALISI SPETTROFOTOMETRICA DELLA CLOROFILLA A
(DA MANUALE UNICHIM N.168 - PARTE II, 1995)

¹ C.N.R. - Istituto Italiano di Idrobiologia
L.go V. Tonolli 50/52 - 28048 Pellanza (VB)
Tel. 0323-556571; Fax 0323-556513;
E-mail ospiii@ccrs1.imgc.to.cnr.it

1. Dinamica stagionale delle comunità algali

La Figura 1 descrive in un unico schema le relazioni che legano lo svolgimento della dinamica di una comunità algale, intesa in senso generale, ai principali fattori fisici, chimici e biotici con cui le alghe interagiscono in un ecosistema lacustre. Nei paragrafi successivi saranno brevemente descritti gli effetti di queste interazioni e la risposta delle alghe, dalla quale dipende il risultato del bilancio tra tassi di crescita e tassi di perdita nell'arco della successione stagionale.

Da notare la posizione centrale occupata dal fattore "dimensioni cellulari": in effetti queste svolgono un ruolo chiave nel condizionare lo svolgimento dell'intero metabolismo di una cellula algale (produzione, respirazione, scambi con l'esterno, efficienza fotosintetica), nonché la sua possibilità di contrastare, con maggiore o minore successo, fattori come la predazione o la sedimentazione.

1.1. RELAZIONI CON LE VARIAZIONI DELL'AMBIENTE FISICO

Le variazioni dell'ambiente fisico sono considerate determinanti nel controllare la dinamica di una comunità algale. In particolare la profondità della zona eufotica (z_{eu}) e quella di rimescolamento delle acque (z_m) influiscono pesantemente sull'attività fotosintetica (Fig.1): è stata individuata una relazione di proporzionalità inversa tra il rapporto z_{eu}/z_m ed il rapporto P/R. Infatti il regime circolatorio delle acque superficiali condiziona la permanenza delle alghe nella zona eufotica e la loro possibilità di sottrarsi ad una esposizione prolungata alla radiazione luminosa, evitando di essere fotoinibite con conseguente riduzione dell'efficienza di produzione. E' noto come i diversi gruppi siano diversamente adattati alle modificazioni della stabilità della colonna d'acqua: le diatomee hanno il rapporto P/R più elevato, le dinoflagellate il più basso, le cloroficee sono intermedie fra i due gruppi. La

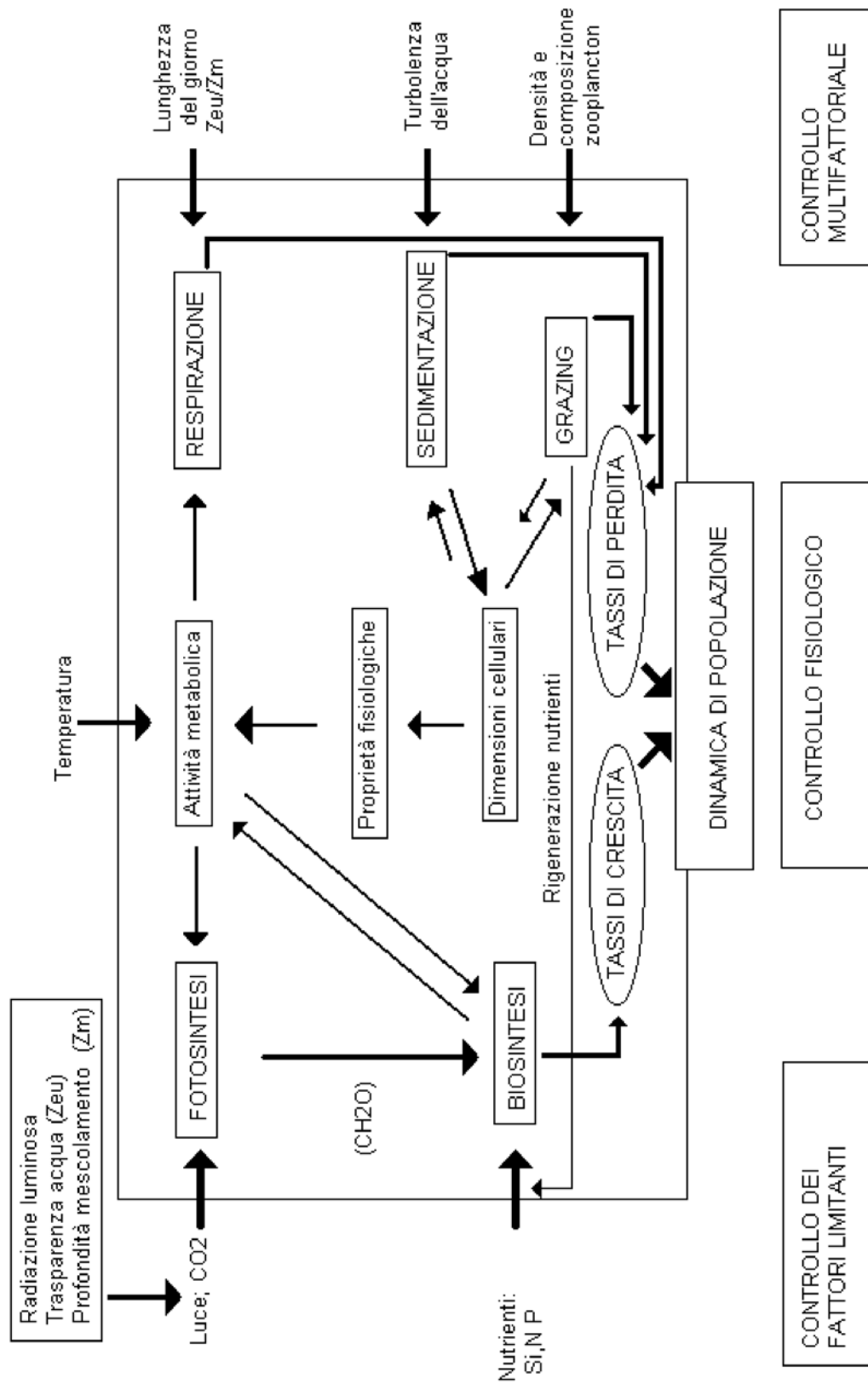


Fig. 1. Fattori di controllo della dinamica della comunità fitoplanctonica e loro interazioni.

sequenza della riduzione dei rapporti P/R dalle diatomee ai dinoflagellati rispecchia la progressione stagionale della ridotta profondità di mescolamento e porta ad una spiegazione fisiologica della successione stagionale delle specie.

Il fitoplancton in crescita attiva nelle acque superficiali può rispondere ai cambiamenti nell'intensità della radiazione incidente (I_0) e nella profondità di mescolamento (z_m) con adattamenti fisiologici, per esempio variando il contenuto cellulare dei pigmenti fotosintetici.

D'altra parte i limiti di adattamento delle varie specie sono alquanto ristretti, cosicché forti oscillazioni in I_0 e z_m su scala di giorni portano a cambiamenti nella composizione specifica della comunità, piuttosto che ad adattamenti fisiologici delle specie presenti.

1.2. RELAZIONI CON LE MODIFICAZIONI DELL'AMBIENTE CHIMICO

Per quanto le modificazioni dell'ambiente fisico sembrano svolgere il ruolo fondamentale nel guidare la successione stagionale delle specie algali, non bisogna tuttavia trascurare l'interazione delle alghe con altri fattori biotici o abiotici, alcuni dei quali possono assumere un ruolo di primo piano in certe condizioni ed in certi periodi dell'anno. Tra questi, la disponibilità di nutrienti, in particolare di quelli presenti in quantità limitante, è probabilmente il fattore che più condiziona la crescita algale, dopo luce e temperatura (Fig.1).

A partire dai primi anni '70 numerosi sono stati gli studi volti ad individuare i nutrienti maggiormente limitanti per lo sviluppo delle alghe, soprattutto in relazione alle ricerche finalizzate al recupero degli ambienti eutrofizzati. Anche se è emerso chiaramente che fattori come la silice, l'azoto e soprattutto il fosforo controllano fortemente la crescita algale, il significato del concetto di fattore limitante in ambienti naturali va rivisto: infatti la limitazione da nutrienti in natura è un fenomeno estremamente raro. Ciò non significa che le singole specie non siano soggette a tale limitazione, ma che in ogni situazione la comunità fitoplanctonica modifica la sua composizione specifica per ovviare ad eventuali limitazioni. Alcuni esperimenti hanno dimostrato, confrontando il tasso di crescita, la composizione chimica e i rapporti C:P ed N:P di popolazioni cresciute in coltura (dunque in condizioni ottimali e senza essere soggette a limitazione da nutrienti) ed in condizioni naturali, come in natura le alghe crescano sempre ad un tasso di crescita prossimo a quello massimo misurabile in condizioni di laboratorio.

Dunque, se è difficile che le alghe siano limitate dalla disponibilità di nutrienti, tuttavia i tempi e i modi in cui i nutrienti si rendono disponibili possono essere importanti fattori di controllo sulla loro crescita. Specie diverse hanno diverse periodicità giornaliere nell'assimilare i

nutrienti e possono quindi utilizzare lo stesso flusso di nutrienti (dipendente dalla disponibilità degli stessi nel corpo d'acqua, da ingressi dall'esterno e dalla rigenerazione in loco) in tempi diversi senza entrare in competizione. Inoltre la frequenza e l'abbondanza con cui i nutrienti sono messi a disposizione delle alghe possono avere come effetto un cambiamento della composizione specifica di una comunità. Da esperimenti in coltura ed in condizioni naturali è emerso come aggiunte frequenti di piccole quantità di nutrienti favoriscano le alghe di piccole dimensioni, mentre aggiunte abbondanti e meno frequenti siano più favorevoli per alghe di taglia maggiore, che hanno maggiori possibilità di accumulo.

1.3. RAPPORTI CON ALTRI LIVELLI TROFICI

La disponibilità di nutrienti per le alghe è spesso legata all'attività di organismi appartenenti ad altri livelli trofici. Il ciclo dei nutrienti nella colonna d'acqua costituisce, per esempio, un legame importante tra fitoplancton e zooplancton: infatti, soprattutto nelle acque oligotrofe, ma anche nell'epilimnio estivo di quelle eutrofe, i nutrienti rigenerati dallo zooplancton rappresentano una fonte di sostentamento di particolare importanza per le alghe (Fig.1).

D'altro canto lo zooplancton può influire negativamente sullo sviluppo algale (Fig.1) attraverso la predazione (*grazing*), di cui risentono maggiormente le alghe di minori dimensioni, che di solito sono quelle con i più alti tassi di crescita e di assimilazione. La riduzione della biomassa algale causata dal *grazing* può indurre una minore richiesta di nutrienti, col risultato di aumentarne la disponibilità per le alghe meno edibili, altrimenti sfavorete dai loro bassi tassi di assimilazione.

È quindi probabile che gli effetti contrastanti dello zooplancton sul fitoplancton (rigenerazione a favore della crescita algale e *grazing* a sfavore) agiscano in modo da avvantaggiare certe specie algali e svantaggiarne altre.

Accanto al controllo *top-down* esercitato dallo zooplancton sulle alghe, esiste anche una efficiente azione di controllo *bottom-up*, esercitata dai batteri, i quali possono entrare in competizione con le alghe per i nutrienti, in particolare per il fosforo. Il rapporto tra alghe e batteri è peraltro molto complesso. In varie occasioni si osserva una sorta di mutualismo tra i due gruppi di organismi: i batteri mineralizzano il fosforo per le alghe e queste producono carbonio per la crescita batterica. Lo spostamento da una situazione di competizione ad una di mutualismo sembra essere legato alle disponibilità di carbonio e di fosforo (Fig.2). Quando il rapporto C:P è molto elevato la crescita batterica è limitata dal fosforo e si instaura la competizione con le alghe per questo elemento. Se invece questo rapporto è più basso, al punto che sia C che P

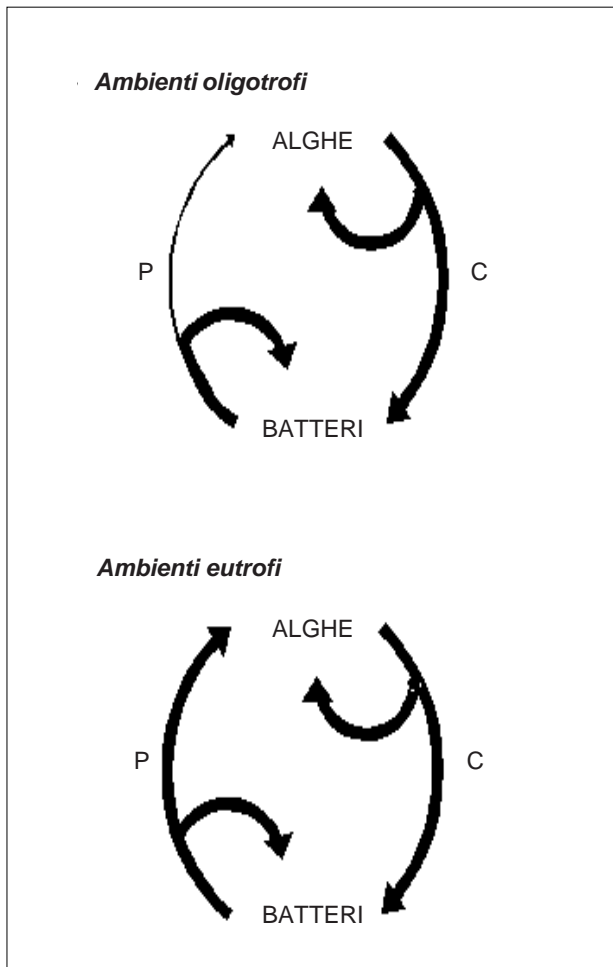


Fig. 2. Competizione e mutualismo tra alghe e batteri in ambienti a diverso grado di trofia.

divengono fattori limitanti per la crescita batterica, la competizione si riduce (l'assimilazione di fosforo da parte dei batteri richiede carbonio come fonte energetica) e si tende verso una forma di cooperazione.

Poiché il rapporto C:P è spesso condizionato dallo stato trofico, è evidente come quest'ultimo influenzi anche la natura del rapporto tra alghe e batteri. In ambienti oligotrofici la disponibilità di fosforo può essere un fattore limitante per entrambi: questa situazione innesca di solito fenomeni di competizione che vedono prevalere i batteri. In ambienti eutrofici, invece, il rapporto C:P si abbassa, riducendo il vantaggio dei batteri, che diventano dipendenti dalle alghe per il rifornimento di carbonio: la competizione lascia così il posto al mutualismo.

1.4. LA SUCCESSIONE STAGIONALE

Una comunità fitoplanctonica è dunque controllata da numerosi fattori, le fluttuazioni dei quali ne modellano la

struttura, creando, in ogni momento dell'anno, condizioni di vita favorevoli ad alcune specie e sfavorevoli ad altre. Secondo alcuni Autori questa sostituzione di specie segue un cammino successionale quasi obbligato. Nella comunità fitoplanctonica potrebbe esistere una sorta di riserva, costituita da quella specie che sono in grado di persistere attraverso le modificazioni delle condizioni ambientali. Tali specie, molto rare durante i periodi per loro non ottimali, potrebbero essere paragonate agli anelli di una catena che lega le varie fasi della successione fitoplanctonica, in modo che la risposta ai cambiamenti ambientali non sarà casuale, ma sarà vincolata in una certa direzione dalla natura delle specie presenti.

Nei modelli classici di successione fitoplanctonica è possibile individuare una "sequenza principale", che si svolge nel corso delle stagioni, partendo da specie a strategia *r*, tipiche del periodo circolatorio, caratterizzato da condizioni ambientali instabili, per andare verso la prevalenza di specie a strategia *K*, tipiche di un periodo in cui la colonna d'acqua è più stabile.

Un esempio di successione tipicamente osservata nei grandi laghi subalpini italiani è quella descritta nello schema sotto riportato. Sulla base di questo schema possiamo dividere la successione fitoplanctonica in cinque periodi, ognuno caratterizzato dalla predominanza di precisi fattori di controllo, cui corrisponde una altrettanto precisa risposta della comunità algale:

1. Periodo Marzo-Maggio: rappresenta la fase iniziale della successione coincidente, nei laghi subalpini, con la circolazione primaverile delle acque. L'ambiente è fortemente instabile e le alghe sono trascinate spesso al di sotto della zona eufotica, sperimentando quindi condizioni di elevata variabilità per quanto riguarda l'intensità della radiazione luminosa. La circolazione, inoltre, rifornisce di nutrienti le acque superficiali. Le alghe meglio adattate a vivere in queste condizioni sono le diatomee: infatti esse sfruttano la circolazione per mantenersi a galla (in acque ferme tenderebbero a sedimentare dato il loro peso), sono in grado di crescere bene anche a basse radiazioni luminose ed hanno elevati tassi di crescita, risultando perciò avvantaggiate su altre alghe a crescita più lenta.

2. Periodo Maggio-Giugno: la colonna d'acqua comincia a stratificarsi e quindi si rendono necessari meccanismi di galleggiamento per evitare la sedimentazione: in queste condizioni viene meno il vantaggio delle diatomee, che lasciano il posto ad alghe coloniali o flagellate (cianofitee, clorofitee o peridinee), che spesso sono anche di grandi dimensioni. Ciò conferisce loro due vantaggi: da un lato sono in grado di accumulare i nutrienti, che ormai scarseggiano nella zona eufotica, in quanto il rifornimento dalle acque profonde è bloccato dalla stratificazione

termica, dall'altro sono meno edibili delle diatomee e quindi meno sensibili alla predazione da parte dello zooplancton, che alla fine della primavera diventa un fattore di controllo decisivo, contribuendo al forte declino della popolazione di diatomee.

3. Periodo Luglio-Ottobre: è il periodo di piena stratificazione, durante il quale dominano solitamente alghe in grado di contrastare le perdite per sedimentazione, adottando sistemi di galleggiamento, come i flagelli (le peridinee) oppure l'aumento di superficie ottenuto tramite la formazione di colonie (cianoficee o cloroficee), che possono anche essere immerse in una matrice gelatinosa che ne riduce il peso specifico. Nei mesi estivi le condizioni dell'ambiente fisico rappresentano ancora un fattore di controllo importante, tuttavia anche la scarsità di nutrienti gioca un ruolo chiave: le alghe di questo periodo sono infatti le tipiche specie a strategia *K*, caratterizzate da bassi tassi di crescita, ma abili a sfruttare nel modo migliore i flussi di nutrienti che occasionalmente si rendono disponibili.

4. Periodo Ottobre-Novembre: il raffreddamento delle acque determina l'inizio di una nuova fase di circolazione, con condizioni simili a quelle del periodo primaverile. Il rimescolamento ed un nuovo flusso di nutrienti possono favorire un secondo sviluppo di diatomee, che tuttavia possono essere associate con altre alghe, come le criptoficee, le crisoficee o anche cianoficee che prediligono acque fredde, come *Oscillatoria* spp. La temperatura sempre più fredda e la radiazione sempre più bassa impediscono peraltro alla comunità algale di raggiungere valori di densità elevati.

5. Periodo Novembre-Marzo: le acque sono completamente rimescolate, ma la temperatura rigida e la radiazione solare molto bassa rappresentano dei forti ostacoli allo sviluppo del fitoplancton. In questi mesi la densità algale è molto scarsa e non è raro che la comunità sia dominata da specie, solitamente appartenenti alle criptoficee o alle crisoficee, in grado di nutrirsi anche per via eterotrofa.

All'interno di questo schema generale la composizione specifica della comunità può variare, essenzialmente in relazione allo stato trofico del bacino lacustre, dando origine ad associazioni fitoplanctoniche differenti.

1.5. PRINCIPALI ASSOCIAZIONI FITOPLANCTONICHE

I testi classici di limnologia individuano un certo numero di associazioni fitoplanctoniche, variabili a seconda delle preferenze trofiche delle specie dominanti e, quindi, a seconda dello stato dei diversi ambienti lacustri.

Le più tipiche sono le seguenti:

1) *Plancton oligotrofico a desmidiacee*

Dominano *Staurodesmus* e *Staurastrum*, associate con

altre desmidiacee. Tra le cloroficee si trovano *Sphaerocystis schroeteri* e *Gloeocystis* sp. Associazione tipica di acque molto povere di nutrienti (laghi alpini).

2) *Plancton oligotrofo a diatomee*

In Europa il genere caratteristico è *Cyclotella* sp. Le specie associate possono variare molto: *Fragilaria crotonensis*, *Rhizosolenia eriensis*, *Synedra* sp. Oppure si trovano associati *Dynobryon divergens*, *Dynobryon bavarium* e *Melosira distans*. Nei laghi oligotrofici del Nord America i generi dominanti sono *Asterionella*, *Tabellaria* e *Melosira*, spesso associate a *Dynobryon*.

3) *Plancton a crisoficee*

L'associazione a crisoficee si ritrova sia in laghi oligotrofici sia in laghi a grado di trofia più alto nei periodi in cui i nutrienti sono esauriti. Le crisoficee sono in generale scarsamente esigenti riguardo al fosforo. Le specie più tipiche appartengono ai generi *Dynobryon*, *Uroglena*, *Mallomonas*, *Synura*.

4) *Plancton oligotrofico a clorococchi*

Alcuni grandi laghi poco produttivi vedono la prevalenza di *Oocystis* sp. nel plancton.

5) *Plancton oligotrofico a dinoflagellati*

Associazione in cui dominano *Peridinium* (*incospicuum* e *willei*) e *Ceratium hirundinella*. Tipica di alcuni laghi finlandesi e del Nord Europa.

6) *Plancton meso- o eutrofico a dinoflagellati*

Associazioni studiate in laghi della Finlandia, in cui *P.willei* era sostituita da altre specie di *Peridinium* (*bipes*, *cinctum*). *Ceratium* e *Gymnodinium* erano anch'essi presenti.

7) *Plancton eutrofo a diatomee*

I laghi altamente produttivi possono essere dominati da *Asterionella* sp., *Fragilaria crotonensis*, *Synedra* spp., *Stephanodiscus* spp. e *Melosira* spp. Molti di questi generi sono comuni anche in acque oligotrofe. Per esempio *Asterionella* è organismo tipico dei laghi oligotrofici (Canada), mentre altrove (Europa e Nord America) studi paleolimnologici hanno rivelato il suo aumento in seguito all'aumentato impatto delle attività umane sul bacino.

8) *Plancton meso- o eutrofico a desmidiacee*

Poche specie di desmidiacee (*Staurastrum gracile*, *S.pingue*, *S.planctonicum*) e una o due specie di *Cosmarium* (*C. bioculatum*) possono essere dominanti in laghi contenenti concentrazioni di carbonati abbastanza elevate. Talora *Cosmarium* è stato ritrovato associato anche a

cianobatteri.

9) *Plancton eutrofico a clorococchi*

I generi tipici sono *Pediastrum* e *Scenedesmus*, ma anche *Actinastrum*, *Ankistrodesmus*, *Crucigenia*, *Dictyosphaerium* e *Tetraedron* possono essere abbondanti in acque eutrofe, spesso in laghi piuttosto piccoli.

10) *Plancton a cianobatteri*

In molte località temperate, nel periodo estivo, laghi ad elevata trofia sono caratterizzati da fioriture di *Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena* o *Lyngbya* sp. Alcune specie di *Oscillatoria* (*O. rubescens* in particolare), vivono bene in acque fredde e durante l'estate si stratificano al margine superiore dell'ipolimnio e possono dar luogo a fioriture nei mesi del tardo autunno o inizio inverno. Una fioritura può essere vista come una situazione in cui si realizza un equilibrio monospecifico, favorito dal perdurare di condizioni di elevata temperatura ed elevato apporto di nutrienti, in corpi d'acqua termicamente molto stabili.

11) *Plancton ad euglenoficee*

Fioriture di *Euglena* possono verificarsi in laghi molto piccoli e ricchi di sostanza organica. In laghi piccoli meno inquinati possono essere dominanti *Trachelomonas volvocina* e *Lepocinclis fusiformis*.

2. Analisi microscopica di un campione di fitoplancton

Va premesso che in questa sezione si farà sempre riferimento a campioni preparati facendo sedimentare un opportuno volume in camere di sedimentazione realizzate per l'uso con il microscopio invertito.

2.1. GENERALITÀ

Un campione algale può essere esaminato ad ingrandimenti differenti. In generale 400 ingrandimenti sono sufficienti per contare organismi compresi in un ampio intervallo dimensionale. Per le cellule di grandi dimensioni è possibile, peraltro, utilizzare un ingrandimento minore, per esempio 250x, mentre per risolvere eventuali problemi di identificazione può essere utile disporre di obiettivi ad immersione ad elevato ingrandimento (per es. 1000x). Il volume di campione da preparare per il conteggio varia in funzione dell'abbondanza della popolazione nell'ambiente studiato. Nella maggior parte dei casi un volume di 10 ml è adatto per concentrare una quantità di organismi idonea al conteggio.

Tutti gli individui osservati nel campo oculare vanno conteggiati, eccetto le cellule morte. La distinzione tra cellule vive e morte è talvolta difficile: si possono valutare

le condizioni generali della cellula (se è intatta o meno, se sono visibili organuli all'interno o se la cellula appare vuota) e la sua pigmentazione. Di solito l'uso di un fissativo che colora l'interno della cellula aiuta a fare questa distinzione.

E' necessario fare attenzione che gli organismi situati a cavallo tra un campo oculare e l'altro non siano conteggiati due volte.

Se si incontrano degli organismi sconosciuti è più pratico procedere alla loro identificazione al termine del conteggio, dopo essersi annotati la posizione dell'alga da identificare prendendo a riferimento le coordinate degli assi x ed y lungo i quali si muove il tavolino traslatore.

Spesso capita di non riuscire ad identificare un organismo: in questo caso è comunque buona prassi contare ugualmente gli individui trovati e, se possibile, fare qualche disegno della cellula o qualche fotografia, che potranno servire per una eventuale identificazione successiva.

2.2. PRECISIONE DEL CONTEGGIO

Il prelievo di un campione d'acqua da un ambiente naturale di solito molto eterogeneo ha associato un errore che può essere più o meno elevato. In seguito, ogni passaggio compiuto per la preparazione di una o più frazioni del campione iniziale da fissare e di una o più ulteriori frazioni per il conteggio, comporta un certo errore. L'accumulo di tutti gli errori influirà, ovviamente, sulla stima della densità della popolazione ottenibile attraverso il conteggio. Tenendo conto di ciò, la precisione del conteggio, per quanto importante di per sé, non è necessario che sia maggiore di quanto giustificato dalla precisione che si ottiene nel campionamento e nelle successive manipolazioni.

La stima della precisione del conteggio può darci una indicazione riguardo alla differenza tra la densità media della popolazione da cui deriva il nostro campione e la densità media calcolata a partire dal numero di organismi conteggiati. Il numero di organismi contati rappresenta dunque il punto chiave della nostra stima: maggiore è questo numero e maggiore sarà la precisione del conteggio. Peraltro, nella maggior parte dei casi, solamente una frazione dell'area di base della camera di sedimentazione viene esaminata: diventa dunque importante anche il modo in cui le alghe si distribuiscono sul fondo della cameretta. E' importante che gli organismi abbiano una distribuzione omogenea e casuale: questo si ottiene agitando il campione prima della rimozione del volume da contare e versandone poi la quantità necessaria nella cameretta facendo attenzione a non creare dei vortici che portino le alghe a concentrarsi in certe zone (assolutamente da evitare l'uso di pipette per trasferire il materiale destinato al conteggio!).

Se seguiamo queste precauzioni possiamo calcolare la precisione del nostro conteggio utilizzando le equazioni più comuni, la cui applicabilità si basa sull'assunzione che le cellule siano distribuite sul fondo della cameretta secondo una distribuzione di Poisson o secondo una distribuzione normale. Ricordiamo che per densità superiori a 50 cellule la distribuzione di Poisson approssima la distribuzione normale standardizzata.

Supponiamo ora di contare l'intero campione: per popolazioni fino a 50 cellule il livello di precisione ottenibile nel conteggio, sulla base del numero di individui contati, si può ottenere da tabelle o grafici dei limiti fiduciali della distribuzione di Poisson (vedi anche Tabella 1). Per valori superiori a 50 individui si fa riferimento alla distribuzione normale standardizzata: in questo caso l'intervallo di variazione per la media vera basata su un conteggio di x individui è dato da:

e la precisione relativa da:

$$z_{\alpha} (100\%) / \sqrt{x}$$

dove z_{α} rappresenta la variabile standardizzata per un certo livello di probabilità α .

È interessante osservare che ogni volta che raddoppia il numero di cellule contate l'errore relativo non viene dimezzato: di questo si deve tenere conto per ottimizzare il numero di conteggi.

Quando invece si conta una frazione del campione, per esempio un certo numero di campi oculari, oppure una serie di subcampioni si fa riferimento alla distribuzione del t di Student. L'uso della statistica t assume che la popolazione sia normalmente distribuita: se la distribuzione non è normale si può fare un errore più o meno grave, che tuttavia può essere ridotto aumentando il numero n di subcampioni o campi esaminati. Infatti al crescere di questi la distribuzione di t approssima la curva normale standardizzata. In particolare quando $n > 30$ la distribuzione di t e quella di z sono praticamente coinci-

enti. Dunque la statistica t va usata quando $n < 30$, la popolazione è normalmente distribuita e non si conoscono la sua media μ e la sua varianza σ^2 , ma si conosce o può essere calcolata una varianza s^2 .

Facendo riferimento alla distribuzione di t , l'intervallo della media vera della popolazione ed il suo errore relativo sono dati rispettivamente dalle equazioni:

$$\frac{t_{(\alpha)(n-1)} \sqrt{\bar{x}/n}}{\bar{x}} (100\%)$$

dove \bar{x} rappresenta la media degli individui contati nei diversi campi o subcampioni, s^2 la varianza e n il numero di campi o subcampioni.

Con densità medie uguali, il parametro $t_{(\alpha)(n-1)}$ è una funzione del numero di campioni, dunque l'errore relativo si riduce aumentando il numero di campioni o di campi esaminati (Tabella 2).

Tabella 2. Esempi di errore relativo in funzione del numero di subcampioni o campi oculari esaminati, ipotizzando una densità media di 50 individui.

n. campioni o campi	Errore relativo	$t_{0.05}$	G.d.L.
2	127 %	12.71	1
3	35 %	4.30	2
5	18 %	2.78	4
10	10 %	2.26	9
30	5 %	2.05	29

Se consideriamo che ogni campione contiene un numero finito N di subcampioni e che ogni cameretta un numero finito N di campi microscopici, di cui solo una frazione n viene conteggiata, possiamo applicare la seguente correzione, che permette di ridurre il numero di

Tabella 1. Esempi di intervalli di variazione della media in relazione al numero di individui contati ($\alpha = 0.05$).

n. individui	Intervallo della media	Errore relativo	Distribuzione
5	2-12	60-140%	Poisson
10	5-18	50-80%	Poisson
50	40-70	20-40%	Poisson
100	100±20	20%	Normale Standardizzata ($z=1.96$)
200	200±28	14%	Normale Standardizzata ($z=1.96$)
400	400±39	10%	Normale Standardizzata ($z=1.96$)
800	800±55	7%	Normale Standardizzata ($z=1.96$)

cellule da contare:

$$\bar{x} = t_{(\alpha)(n-1)} \sqrt{s_x^2 [(N-n)/N]}$$

2.3. CONTEGGIO PER TRANSETTI

Il conteggio per transetti nasce dall'esigenza di ottimizzare la relazione tra il tempo di lavoro e la precisione del conteggio. Con questa tecnica è infatti possibile contare solo una frazione del campione, riuscendo comunque a raggiungere numeri significativi di individui contati per le specie più importanti. Il numero di transetti, cioè di diametri della camera di sedimentazione esaminati, può andare da un minimo di due ad un massimo dettato dal numero di individui che si vuole arrivare a conteggiare, quindi della precisione che si vuole raggiungere. Un'alternativa al conteggio per transetti è quella di contare delle strisce verticali od orizzontali alternate: per esempio una ogni due, ogni tre, ogni quattro o più. Anche in questo caso il numero delle strisce da esaminare è legato al numero di individui contati.

2.4. CONTEGGIO PER CAMPI CASUALI

Un altro metodo per contare una frazione del campione è quello di esaminare un certo numero di campi microscopici scelti in modo casuale, estraendo delle copie di coordinate sugli assi x ed y del tavolino traslatore, per esempio attraverso un generatore di numeri casuali. È importante controllare che le coppie di coordinate selezionate rientrino effettivamente all'interno dell'intervallo di coordinate in cui si localizza l'area della cameretta visibile al microscopio. La scelta del numero di campi casuali da esaminare è in funzione della densità del materiale, essendo, come già detto, la precisione del conteggio legata al numero di cellule enumerate. Prima di decidere il numero di campi sarebbe quindi opportuno esaminare a piccolo ingrandimento l'intera superficie della camera, per valutare la densità degli organismi. In ogni caso, per quanto detto a proposito della precisione del conteggio in riferimento alla distribuzione del t , può essere sufficiente contare 30 campi. È invece più utile esaminare, se possibile, più di una cameretta, in modo da avere una stima anche della varianza tra subcampioni.

2.5. CONTEGGIO SULL'INTERA CAMERA

Ha il vantaggio di superare l'assunzione che gli organismi siano distribuiti in un certo modo nella camera di sedimentazione. Tuttavia è un conteggio che richiede molto tempo e viene quindi impiegato per contare solo le specie rare oppure specie di grandi dimensioni, che possono essere riconosciute a basso ingrandimento (250x o 100x). L'esame dell'intera camera a basso ingrandimento può essere utile, inoltre, per avere una visione qualitativa

del campione.

Il conteggio dell'intera camera viene effettuato posizionando l'obiettivo sul margine sinistro (o destro) dell'area della cameretta, dove si esamina il primo campo oculare. In seguito si sposta l'obiettivo verso l'alto o verso il basso, fino ad arrivare sul campo adiacente: è importante porsi dei riferimenti per delimitare la superficie del campo ed essere sicuri di non contare due volte lo stesso individuo. Quando una intera striscia viene esaminata, ci si sposta lateralmente, ci si posiziona di nuovo in corrispondenza del margine sinistro, destro, superiore od inferiore, a seconda del punto in cui ci si trova e della direzione intrapresa e si conta una nuova striscia. Si continua così fino a raggiungere il margine laterale opposto.

2.6. CONTEGGIO PER PRESENZA - ASSENZA

È il tipo di conteggio più rapido, in quanto si rileva solo la presenza o meno degli organismi. Tuttavia una determinazione precisa dell'assenza necessita l'esame di una larga frazione del materiale. Per esempio, per stabilire l'assenza di una specie da un campione al livello di significatività $\alpha = 0.05$ su un campione di 1000 campi oculari, dovrebbe essere necessario esaminarne 950 (1-a).

2.7. CONTEGGIO DI ORGANISMI COLONIALI

Il conteggio è un'operazione relativamente semplice nel caso di organismi unicellulari, mentre può diventare complessa quando si tratta di contare i singoli individui di specie coloniali. In alcuni casi infatti le singole cellule sono molto facili da distinguere e possono essere quindi conteggiate facilmente, come in molte diatomee (*Asterionella*, *Fragilaria*, *Melosira*), cloroficee (*Sphaerocystis*, *Mougeotia*, *Coelastrum*) o crisoficee (*Dynobryon*) coloniali. In altri casi, invece, non è semplice distinguere i singoli individui, come capita con la maggior parte delle cianoficee (*Microcystis*, *Aphanizomenon*, *Anabaena*, *Lynghya*, *Oscillatoria*). Una ulteriore distinzione va inoltre fatta per le colonie filamentose e per quelle sferiche. Nel primo caso capita molte volte di riuscire a distinguere la separazione tra due cellule all'interno del filamento: è dunque possibile misurare, usando un'oculare micrometrico, la lunghezza di un certo numero di individui (in filamenti diversi), in modo da poter ricavare un valore di lunghezza medio per individuo. A questo punto è sufficiente misurare la lunghezza di tutti i filamenti che si ritrovano nel campione per calcolare il numero totale di cellule. Nel caso di colonie sferiche il calcolo del numero di individui è molto difficile da valutare: essendo la colonia sferica disposta su piani focali diversi, si può stimarne la dimensione spostandosi con la manopola della messa a fuoco dal piano focale più alto a quello più

basso e ricavando poi lo spessore della colonia sulla base dello spostamento compiuto sulla scala della messa a fuoco. Conoscendo le dimensioni degli individui è poi possibile stimare lo spessore della colonia (equivalente al diametro se la colonia approssima una sfera). Ricavando le altre misure (per esempio lunghezza e larghezza se la forma non è sferica) è possibile calcolare il volume della colonia e, da questo, risalire al numero degli individui che la compongono.

Il metodo, tuttavia, comporta un errore elevato, poiché le colonie possono avere una forma geometrica spesso molto complessa, con diramazioni nelle tre dimensioni spaziali. Inoltre non sempre gli individui sono perfettamente uniti l'uno all'altro, ma possono restare tra loro degli spazi vuoti, in particolare se si tratta di colonie mucillaginose. Una seconda possibilità, che però comporta un impegno più gravoso in termini di tempi necessari, è quella di rompere la colonia, per esempio tramite ultrasuoni, e contare separatamente le cellule, a patto che queste siano facilmente distinguibili da alghe unicellulari.

Per queste ragioni un campione in cui siano abbondanti le specie coloniali può avere associato un errore di conteggio molto elevato: è opportuno precisare che quando si valuta il numero di individui conteggiati, ogni colonia andrebbe presa come un individuo singolo. In caso contrario non è possibile assumere una distribuzione omogenea degli organismi, poiché le colonie rappresentano degli aggregati di cellule.

2.8. DETERMINAZIONE DEI VALORI DI DENSITÀ E BIOVOLUME ALGALI

Una volta terminato il conteggio la densità può essere espressa in individui per millilitro o per litro, tenendo conto della frazione di campione conteggiato e del volume sedimentato. La frazione di campione esaminato si ricava conoscendo il numero totale di campi oculari contenuti nell'area di base della camera di sedimentazione. Questo numero si ottiene, a sua volta, sapendo quale è l'area di base della camera e quale è l'area di un singolo campo microscopico. Ricordo che l'area di un campo varia a seconda dell'ingrandimento utilizzato e di conseguenza la frazione di campione esaminato, anche se il numero di campi è lo stesso. L'area di un campo microscopico può essere calcolata con l'uso di un oculare micrometrico.

In molti casi può essere utile stimare il biovolume delle alghe: infatti non è detto che densità e biovolume si corrispondano, potendo essere presenti con alte densità cellule piccole o, viceversa, cellule grandi con densità più scarse. Il biovolume di una comunità algale è infatti spesso correlato con parametri ecofisiologici della comunità stessa, come il contenuto in pigmenti, il tasso di

crescita ed i rapporti trofici con altri livelli della rete alimentare lacustre. Il volume cellulare di una specie algale può essere molto variabile a seconda delle stagioni, della latitudine o del tipo di ambiente. Sarebbe quindi opportuno misurare il volume delle specie algali ogni volta che si conta un nuovo campione. In pratica, poiché le misure da effettuare sulle cellule algali per stimare il loro biovolume richiedono molto tempo, si preferisce effettuare qualche decina di misure per ogni specie, nell'arco di un certo periodo di tempo (un anno è l'intervallo migliore), calcolando poi un valore medio di biovolume. Tale valore può essere mantenuto valido, per le specie sviluppatesi nell'ambiente in cui sono state effettuate le misurazioni, per un periodo di due o tre anni. In generale è meglio non utilizzare misure che si trovano in letteratura, di solito comprese in un ampio intervallo di variazione.

Il biovolume algale viene dunque calcolato assimilando le alghe a forme geometriche semplici. Qualora le cellule avessero una forma complessa, il biovolume si ottiene scomponendo le cellule in parti paragonabili a solidi semplici e calcolando i singoli volumi di questi.

3. Ricerca e determinazione dei principali pigmenti algali

L'identificazione degli organismi algali tramite l'esame microscopico, pur fornendo risultati molto accurati riguardo alla composizione specifica di una comunità algale, è tuttavia un esame che richiede tempi lunghi e, soprattutto, l'acquisizione di una notevole esperienza da parte dell'operatore. Per questi motivi non sempre viene eseguito nella pratica quotidiana di un laboratorio di microbiologia delle acque. Esistono peraltro metodi diversi, più rapidi e più semplici, per accertare la eventuale presenza di alghe in campioni d'acqua da destinare alla potabilizzazione. Questi metodi fanno uso di analisi chemiotassonomiche, basate sulla identificazione di molecole specifiche, tipiche degli organismi fitoplanctonici. Le molecole che meglio identificano le alghe sono i pigmenti coinvolti nei processi fotosintetici, cioè le clorofille ed i pigmenti accessori, in quanto possedute solo da questa categoria di microorganismi acquatici.

Le tecniche di indagine chemiotassonomica sono diverse e numerose, a seconda del tipo e del numero di pigmenti che si vogliono separare ed isolare e, di conseguenza, differiscono per la strumentazione impiegata (spettrofotometri, fluorimetri, hplc) e/o per i solventi usati per la separazione (acetone, alcoli, solventi puri o diluiti, miscele di solventi). Solo a titolo di esempio possiamo ricordare che il solvente maggiormente usato è l'acetone, poiché il suo coefficiente di estinzione in diverse situazioni sperimentali è ben noto, per quanto esso sia più costoso di altri (come etanolo o metanolo) ed abbia un potere di

estrazione minore degli alcoli in presenza di certe alghe (cloroficee o cianoficee). D'altro canto gli alcoli hanno coefficienti di estinzione ancora approssimativi, non sono impiegabili in tutte le situazioni analitiche ed alcuni di essi sono tossici (metanolo).

La possibilità di individuare i diversi pigmenti fotosintetici si basa sulle loro proprietà ottiche, cioè sulle caratteristiche di assorbanza e fluorescenza connesse con la struttura molecolare di ogni pigmento: i pigmenti più facili da determinare sono naturalmente quelli che hanno proprietà ottiche che li rendono ben distinguibili da altri pigmenti.

Il metodo più semplice e più rapido per valutare la presenza di organismi algali in un campione d'acqua è la misura della clorofilla *a*, pigmento comune a tutte le alghe, che può essere facilmente distinto da altri pigmenti in quanto in solventi organici mostra un picco di assorbanza tipico a 663 nm (Fig. 3). La misura della clorofilla è una tecnica relativamente semplice (vedi Appendice A), ma decisamente aspecifica, poiché fornisce solo una indicazione di presenza/assenza di organismi algali: questa indicazione è peraltro sicura (Fig. 4), tanto che la concentrazione della clorofilla *a* è di solito presa come stimatore della biomassa algale.

Un livello di specificità un poco più elevato può essere raggiunto attraverso la determinazione delle clorofille *b* e *c* che, in quanto pigmenti esclusivi di alcune classi algali (cloroficee e alghe brune rispettivamente), possono dare una informazione aggiuntiva riguardo alla qualità degli

organismi presenti in un campione d'acqua. Queste tre diverse clorofille possono essere risolte spettrofotometricamente, senza sottoporre il campione ad alcuna preliminare operazione di separazione dei pigmenti: tuttavia il dato quantitativo riguardante le concentrazioni delle clorofille *b* e *c* è poco affidabile, poiché i loro picchi di assorbanza nel rosso tendono a sovrapporsi (Fig. 3).

Per avere un dato quantitativo di applicabilità generale riguardo alla concentrazione di pigmenti che non mostrano picchi di assorbanza ben separati è necessario un approccio differente, con variazioni metodologiche più o meno sostanziali.

Ritornando alla Figura 3, si nota una larga porzione dello spettro luminoso, compresa tra 400 e 500 nm, in cui l'assorbanza raggiunge i valori più elevati: infatti pressoché tutte le molecole coinvolte nel processo fotosintetico assorbono preferenzialmente in questa regione, in particolare a circa 440 nm. La misura dell'assorbanza nell'azzurro si presta dunque bene per valutare la concentrazione di numerosi pigmenti, non solo clorofille, ma anche pigmenti accessori, come carotenoidi e xantofille. D'altro canto il fatto che tutte queste molecole mostrino un picco nella stessa regione dello spettro rende impossibile distinguerli senza prima separarli. La possibilità di identificare separatamente i più importanti pigmenti accessori rappresenta attualmente la tecnica di indagine chemiotassonomica più raffinata, poiché le sei classi di alghe più diffuse (*Cyanobacteria*, *Bacillariophyceae*, *Chrysophyceae*, *Cryptophyta*, *Dinophyceae* e *Chlorophyta*) si differenziano tra

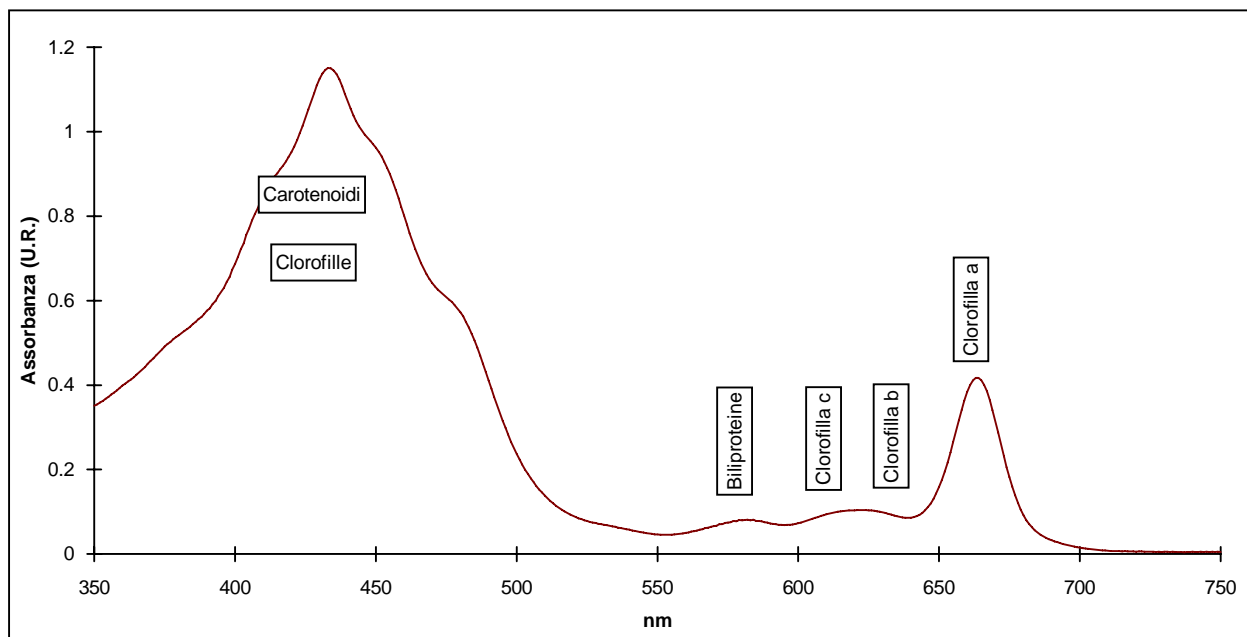


Fig.3 - Spettro di assorbanza in etanolo 90% di un campione contenente alghe.

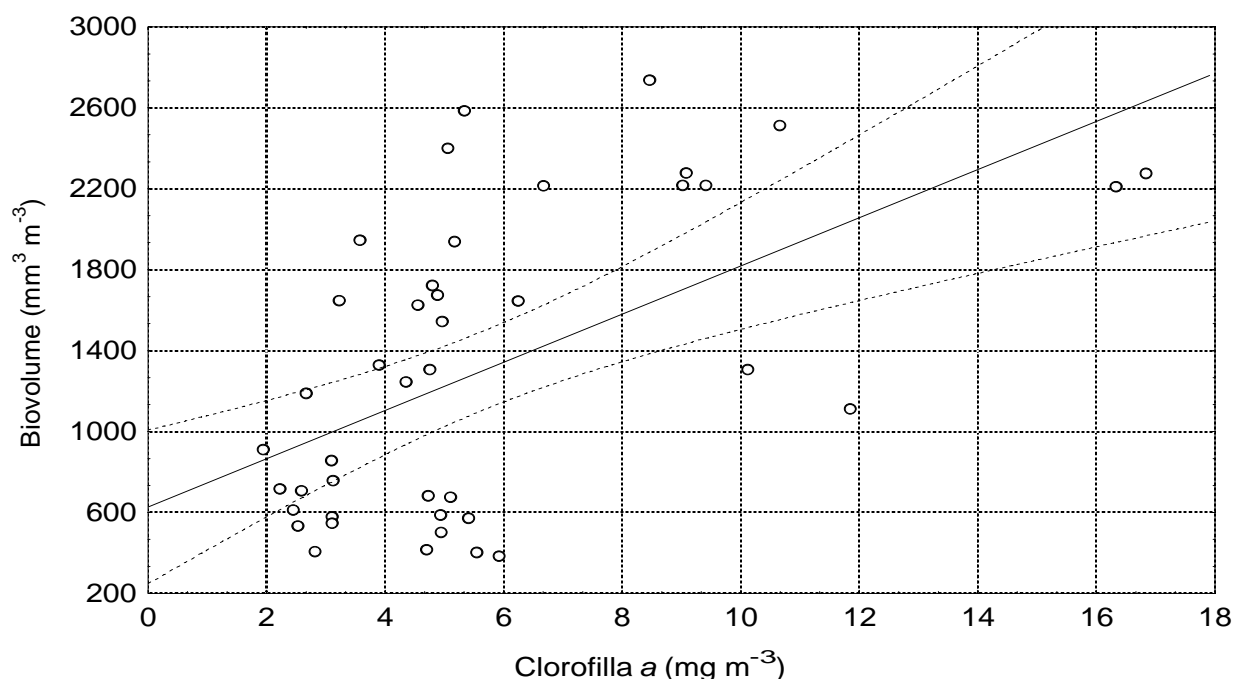


Fig. 4 - Correlazione tra concentrazione della clorofilla *a* ed il biovolume totale delle alghe nel Lago Maggiore (1994). La regressione tra le due variabili è significativa al livello del 99.9 % ($r = 0.549$; $n=60$).

loro per la composizione del loro corredo di pigmenti accessori. Alcuni di questi sono molto specifici e caratteristici di classi ben precise, altri sono più diffusi e possono essere posseduti da più di una classe algale (Tab. 3).

Tabella 3. Pigmenti accessori principali e loro riferimento alle classi algali

Pigmento	Classi algali di appartenenza
Clorofillide <i>a</i>	Artefatto di estrazione, specie contenenti clorofillasi (alcune diatomee)
Clorofilla <i>c1+c2</i>	<i>Bacillariophyceae</i> (diatomee), <i>Chrysophyceae</i> (crisoficee)
Peridina	<i>Dinophyceae</i> (dinoflagellati)
Fucoxantina	<i>Bacillariophyceae</i> (diatomee), <i>Chrysophyceae</i> (crisoficee)
Diadinoxantina	<i>Dinophyceae</i> (dinoflagellati), <i>Bacillariophyceae</i> (diatomee)
Alloxantina	<i>Cryptophyta</i> (criptoficee)
Luteina	<i>Chlorophyta</i> (cloroficee)
Zeaxantina	<i>Cyanobacteria</i> (cianobatteri), <i>Chlorophyta</i> (cloroficee)
Clorofilla <i>b</i>	<i>Chlorophyta</i> (cloroficee)
Allomero Cl. <i>a</i>	Tutte le classi
Clorofilla <i>a</i>	Tutte le classi
$\alpha + \beta$ carotene	Tutte le classi, abbonda in alcune diatomee e cianobatteri

In genere più due classi algali sono sistematicamente lontane tra loro, maggiori sono le differenze nel tipo di pigmenti ausiliari posseduti e viceversa: per esempio, *Bacillariophyceae* e *Chrysophyceae*, entrambe alghe brune, hanno corredi di pigmenti molto simili, ma decisamente diversi da quelli posseduti da *Chlorophyta* (alghe verdi) o *Cyanobacteria* (alghe azzurre). La differenziazione dei gruppi algali risulterà dunque tanto più facile e precisa quanto più semplice sarà la struttura dei popolamenti.

La separazione dei pigmenti algali accessori viene effettuata tramite tecniche cromatografiche: in passato era usata la cromatografia su strato sottile (TLC), mentre oggi si preferisce la cromatografia liquida ad alta precisione (HPLC), che rende questa analisi molto più rapida e precisa. La possibilità di separare un buon numero di pigmenti diversi si basa sull'abilità a sfruttare le loro caratteristiche molecolari, impiegando miscele di solventi con polarità differenti: i vari solventi possono essere mescolati in proporzioni diverse nel corso dell'analisi secondo gradienti lineari, per ottimizzare la eluizione dei vari pigmenti in tempi opportuni, facilitando così l'identificazione dei singoli picchi di assorbimento. Una volta separati i diversi pigmenti, la concentrazione di ognuno di essi viene calcolata in base all'assorbimento misurato spettrofotometricamente, utilizzando i coefficienti di estinzione forniti dalla letteratura. In letteratura si trovano de-

scritti numerosi metodi di separazione cromatografica, variabili in base al tipo ed al numero dei solventi utilizzati, alle condizioni del gradiente, al tipo di colonna impiegata, alla raffinatezza nella risoluzione dei pigmenti.

Queste tecniche di indagine, seppure a diversi livelli di sensibilità, possono rappresentare un'alternativa ai metodi tradizionali di ricerca e determinazione delle alghe.

Tuttavia, l'indagine chemiotassonomica non è da considerarsi in assoluto sostitutiva dell'esame microscopico, ma piuttosto rappresenta un'utilissimo complemento di questo, soprattutto se la determinazione dei pigmenti è raffinata: infatti la verifica della effettiva presenza o assenza di specie nocive deve essere comunque effettuata per mezzo del microscopio nei casi in cui l'identificazione dei pigmenti algali abbia evidenziato la presenza di gruppi algali potenzialmente tossici. Peraltro la possibilità di dirigere la ricerca solamente verso l'individuazione di specie tossiche, può ridurre sensibilmente anche i tempi dell'osservazione microscopica.

Nel caso specifico delle acque destinate al consumo umano queste metodologie possono costituire, grazie alle loro caratteristiche (rapidità, semplicità di esecuzione e specificità) e grazie al fatto che non richiedono una competenza approfondita nel riconoscimento delle alghe, un valido metodo rapido per la ricerca degli organismi fitoplanctonici.

4. Introduzione ai taxa algali tossici

Il perdurare di condizioni ambientali favorevoli (temperature elevate, abbondanza di nutrienti, stagnazione delle acque) può, talvolta, portare allo sviluppo di popolazioni algali pressoché monospecifiche, che può anche assumere il carattere di una vera e propria fioritura (in genere si parla di fioritura quando il popolamento raggiunge densità dell'ordine di 100×10^6 ind l^{-1} o superiori).

In teoria tutti i gruppi algali possono dar luogo a fioriture ma, in pratica, diatomee, dinoflagellati (di solito in ambiente marino) e cianoficee sono quelli che più comunemente danno vita a questo fenomeno. Le fioriture algali possono in molti casi pregiudicare l'uso dei corpi idrici, sia per scopi ricreativi che potabili, non solo perché conferiscono all'acqua colori, sapori e odori sgradevoli, ma soprattutto perché alcune delle specie algali responsabili di fioriture sono produttrici di metaboliti potenzialmente tossici per l'uomo.

Le specie algali con la tossicità più elevata rientrano tutte nel gruppo dei *Cyanobacteria* o cianoficee o alghe azzurre. In particolare i generi *Gomphosphaeria*, *Microcystis*, *Anabaena*, *Pseudanabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, piuttosto comuni nelle acque dolci italiane, comprendono alcune specie in grado

di produrre tossine. Bisogna peraltro rilevare che, all'interno di una specie, vi sono sia ceppi tossigenici che ceppi non produttori di tossine. È dunque più corretto parlare di specie *potenzialmente tossiche*, piuttosto che di specie tossiche.

Le tossine coinvolte sono metaboliti secondari di varia natura (peptidi, alcaloidi, fenoli) ed hanno effetti epatotossici o neurotossici (Tab. 4).

Tabella 4. *Principali specie di cianoficee produttrici di tossine ed effetti noti di queste.*

Specie	Tossina	Effetto noto
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Microcistina	Epatotossico
<i>M. botrys</i>	Microcistina	Epatotossico
<i>M. viridis</i>	Microcistina	Epatotossico
<i>Pseudanabaena cathenata</i>	Sconosciuta	Neurotossico
<i>Gomphosphaeria lacustris</i>	Sconosciuta	Sconosciuto
<i>G. naegeliana</i>	Sconosciuta	Sconosciuto
<i>Oscillat. agardhii/rubescens</i>	Oscillotossina	Neurotossico /Epatotossico
<i>Lyngbya maiuscola</i>	Lyngbyatossina	Sconosciuto
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Afantossina	Neurotossico
<i>Anabaena sp.</i>	Peptidi ed alcaloidi	Neurotossico

Effetti meno gravi includono nausea, vomito, diarrea, dermatiti da contatto e reazioni allergiche.

Le tossine delle cianoficee sono endotossine, cioè sono contenute all'interno della cellula algale e vengono rilasciate all'esterno solo dopo la morte dell'organismo, come si verifica quando le alghe vengono ingerite dall'uomo o da animali, oppure quando l'acqua viene sottoposta a trattamenti di potabilizzazione.

Bisogna inoltre considerare che le tossine già presenti in soluzione non vengono rimosse o inattivate nel corso dei normali processi di trattamento delle acque (flocculazione, sedimentazione, filtrazione) e che, inoltre, sono resistenti alla bollitura.

In caso di fioriture di cianoficee vi sono poche possibilità di evitare contaminazioni dell'acqua con tossine algali. In qualche caso è possibile isolare con delle barriere galleggianti le aree del bacino dove si è concentrata la fioritura, sfruttando il fatto che molte cianoficee sono in grado di galleggiare grazie a vacuoli gassosi intracellulari. Il modo più sicuro di evitare intossicazioni è tuttavia quello di prevenire il verificarsi di fioriture, attraverso interventi di risanamento che riducano il carico di nutrienti in ingresso al bacino o rallentino il rilascio di quelli già presenti nei sedimenti lacustri.

In ogni caso, ogni fioritura di cianoficee deve essere tenuta sotto controllo: una indagine microscopica per rilevare la presenza di *taxa* potenzialmente tossici an-

rebbe effettuata ogni volta che ci si trovi in presenza di fioriture che conferiscano all'acqua superficiale colorazioni verde prato, indicative della presenza di *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, oppure rosso bruno, imputabili ad *Oscillatoriaceae*.

Attualmente non vi sono norme internazionali per valutare le situazioni in cui vi sia il pericolo di intossicazioni da tossine algali in acque destinate a scopi ricreativi o potabili. Norme in vigore in Australia raccomandano $1 \mu\text{g l}^{-1}$ di tossina come limite superiore per un uso sicuro dell'acqua, sulla base di test di tossicità condotti sui topi, cui, per un anno, era stata somministrata una dose giornaliera di $0.5 \mu\text{g}$ di microcistina per grammo di peso corporeo, senza rilevare effetti dannosi significativi. Sulla base di questa concentrazione il limite superiore di densità algale per un consumo dell'acqua privo di rischi è stato fissato in $5000 \text{ cell ml}^{-1}$. Bisogna peraltro ricordare che questi valori sono basati sulla tossicità a livello epatico e sarà necessaria una revisione qualora studi epidemiologici sulla popolazione umana rivelassero effetti cancerogeni della microcistina.

5. Indicazioni bibliografiche

Ho volutamente evitato di riempire il testo di citazioni bibliografiche, spesso difficili da reperire. Tuttavia ritengo utile segnalare alcuni testi nei quali ritrovare i concetti ed i metodi sopra descritti, aggiungendo alcune indicazioni sui testi di sistematica più comuni.

PER LA BIOLOGIA E L'ECOLOGIA DELLE ALGHE:

Harris, G.P. 1986. *Phytoplankton ecology. Structure, functions and fluctuations*. Chapman and Hall, Londra. (Disponibile anche una edizione italiana, a cura di D.Ruggiu, pubblicata nel 1994 da CLUEB, Bologna, con lo stesso titolo tradotto, ISBN: 88-8091-047-7).

Hutchinson, G.E. 1967. *A treatise on limnology. Vol II, Introduction to lake biology and the limnoplankton*. Wiley & Sons, Inc., New York (ormai pressoché introvabile).

Reynolds, C.S. 1984. *The ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press (ISBN: 0-521-28222-5).

PER I METODI DI CONTEGGIO:

Sournia, A. (Ed.). 1978. *Phytoplankton manual*. UNESCO, Parigi (ISBN: 92-3-101572-9).

PER LA SISTEMATICA:

Bourrelly, P. 1966, 1968, 1970. *Les algues d'eau douce*. Voll. I-III. Ed. N. Boubée et Cie, Paris. (Testo che riporta le specie più diffuse, consentendo una determinazione fino al genere).

Hüber-Pestalozzi, G. 1938, 1941, 1942, 1950, 1955, 1961, 1972, 1983, 1983. *Das Phytoplankton des Süßwasser*. Die

Binnengewasser. Voll. I-XVI. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Ed.), Stuttgart. (Serie di volumi, ognuno dedicato ad un gruppo tassonomico diverso. Descrivono in modo dettagliato numerosissime specie, comuni e rare. I suoi limiti principali sono il fatto che molti volumi sono ormai superati dall'avvento di nuove tecniche di analisi microscopica ed il fatto che il tedesco non aiuta la consultazione di un testo di per sé già alquanto complesso.)

Pascher, A. 1978-1990 (continua). *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Voll. I-XXIV. Gustav Fischer Verlag (Ed.), Jena, Stuttgart. (Serie non ancora completa di volumi, ognuno dedicato ad un genere diverso e curato da uno specialista del settore. Comprendono non solo le alghe fitoplanctoniche, ma tutta la flora delle acque dolci europee. E' curato e completo nelle descrizioni delle specie come l'Hüber-Pestalozzi, ma ha il vantaggio di essere più aggiornato e di riportare disegni di alghe tratti da fotografie al microscopio, nonché diverse microfotografie. I primi volumi sono in tedesco, ma gli ultimi pubblicati sono in inglese.)

Tiffany, L.H. and M.E. Britton. 1951. *The algae of Illinois*. The University of Chicago Press. Chicago.

(Volume unico, che riporta descrizioni abbastanza accurate di diverse specie algali, molte delle quali frequenti anche nei nostri laghi. Ovviamente, trattando tutti i gruppi in un solo volume, le specie considerate non sono moltissime. Ha il vantaggio di essere in inglese e di facile consultazione.)

PER NOTIZIE PIÙ APPROFONDITE SULLE ALGHE TOSSICHE:

Flaconer, I. R. 1993. *Algal toxins in seafood and drinking water*. Academic Press. London (ISBN: 0-12-247990-4).

Appendice A

Metodo di analisi spettrofotometrica della clorofilla *a*¹

Acque destinate al consumo umano

DETERMINAZIONE DELLA CLOROFILLA *a*

Water intended for human consumption
CHLOROPHYLL *a* DETERMINATION

0. Introduzione

La clorofilla è una molecola organica complessa che svolge un ruolo chiave nel processo fotosintetico operato dagli organismi vegetali. Grazie alla natura dei legami chimici tra gli atomi che la compongono, questa molecola è infatti in grado di funzionare come accettore e donatore degli elettroni provenienti dalla radiazione luminosa, innescando così la catena di eventi biochimici che portano alla sintesi di carboidrati a partire dalla anidride carbonica.

La clorofilla *a* è il tipo di pigmento fotosintetico più comune, in quanto universalmente diffuso tra gli organismi vegetali. Tra le alghe questo pigmento è presente in tutti i gruppi sistematici, mentre altri tipi di clorofille (*b*, *c* e *d*) sono esclusive di alcuni gruppi. Per questo motivo il metodo proposto prende in esame la determinazione della sola clorofilla *a*. Il contenuto cellulare di clorofilla *a* delle cellule algali varia tra lo 0,3 ed il 2,0 % del peso secco, a seconda dello stato fisiologico delle cellule o del loro adattamento a particolari condizioni di radiazione luminosa. Quando le cellule algali muoiono e vengono decomposte, la clorofilla viene degradata e si formano altre molecole che prendono il nome di feopigmenti. Spesso il rapporto tra feopigmenti e clorofilla *a* fornisce utili indicazioni sullo stato di salute di una popolazione fitoplanctonica.

¹ La metodica di seguito illustrata è stata proposta dall'Autore ad UNICHIM quale metodo rapido per la ricerca delle alghe ed è stata pubblicata sul MANUALE UNICHIM N.168 - Acque destinate al consumo umano, Metodi microbiologici. Parte II. Edizione 1995

1. Scopo e campo di applicazione

Il ritrovamento di clorofilla *a* in un campione d'acqua è indizio certo della presenza di cellule algali. La metodologia di determinazione della clorofilla *a* può dunque costituire un valido strumento per ottenere, in tempi brevi ed in modo relativamente semplice, una informazione preliminare sulla eventuale presenza di alghe in acque destinate al consumo umano. Il metodo proposto permette inoltre di ottenere una stima dei feopigmenti degradando artificialmente, con l'aggiunta di acido cloridrico, la clorofilla presente nel campione in esame.

2. Riferimenti

ISO 3696 (1987) "Acqua in uso nei laboratori di analisi - Specifiche e metodi di prova"

Manuale UNICHIM N.157 (1988) "Metodi di campionamento acque destinate al consumo umano"

Metodo UNICHIM N.1006 (1993) "Guida generale per determinazioni microbiologiche"

3. Metodologia di indagine

Applicare la tecnica di filtrazione su membrana. Porre la membrana sopra l'apposito supporto del sistema di filtrazione. Non è necessario mantenere la sterilità. Agitare il contenitore del campione e procedere alla filtrazione secondo quanto descritto nel paragrafo 7.1.

4. Terreni di coltura e reagenti

Nel corso dell'analisi, se non è altrimenti indicato, utilizzare solo terreni di coltura e reagenti puri per analisi, come definito nel metodo UNICHIM N. 1006 e acqua di purezza equivalente al grado 2 dell'ISO 3696.

AVVERTENZE: L'analisi biologica comporta, talvolta, l'utilizzo e la manipolazione di sostanze chimiche che possono individuare uno specifico rischio per l'operatore.

Seguire sempre le indicazioni in tal senso riportate sulle confezioni e porre in atto le precauzioni e gli accorgimenti suggeriti.

Uniformarsi inoltre alle normative vigenti relativamente allo smaltimento dei rifiuti.

4.1 GEL DI SILICE GRANULARE

4.2 ACETONE DILUITO AL 90%

A 90 ml di acetone (CH_3COCH_3) aggiungere 10 ml di acqua.

4.3 ACIDO CLORIDRICO, SOLUZIONE 0.1 N.

5. Apparecchiatura

Normale vetreria di laboratorio trattata secondo quanto descritto nel metodo UNICHIM N.1006.

- 5.1 MEMBRANA MICROPOROSA IN FIBRA DI VETRO CON POROSITÀ NOMINALE 1 μM , DIAMETRO 47 MM.
- 5.2 RAMPA PER FILTRAZIONE SOTTO VUOTO.
- 5.3 POMPA DA VUOTO.
- 5.4 OMOGENEIZZATORE.
- 5.5 CENTRIFUGA.
- 5.6 SPETTROFOTOMETRO DOPPIO RAGGIO.

6. Campionamento

Prelevare i campioni e trasferirli in fustini di plastica secondo le procedure e le cautele descritte nel Metodo UNICHIM N.1006 e nel Manuale UNICHIM N.157.

Conservare il campione al riparo dalla luce solare diretta ed eseguire la filtrazione entro il più breve tempo possibile, comunque non oltre 4-5 ore dal prelievo.

Il volume minimo consigliato di campione da prelevare per questa determinazione è di 10 l.

7. Procedimento

Si raccomanda di operare in ogni fase del procedimento al riparo dalla luce solare diretta.

7.1 FILTRAZIONE

Filtrare un volume opportuno di campione attraverso una membrana (5.1). Il volume da filtrare è molto variabile, in quanto dipendente dalla densità dei popolamenti algali, legata a sua volta alle caratteristiche dell'ambiente in esame ed ai fattori che stagionalmente controllano la crescita algale. Orientativamente si può consigliare di sospendere la filtrazione quando sulla membrana si è concentrata una quantità di materiale tale da conferire alla membrana stessa una colorazione ben visibile ad occhio. La pressione di vuoto non deve superare 0,3-0,4 Bar, onde evitare danni alle cellule algali e perdita dei pigmenti.

7.2 CONSERVAZIONE DEL FILTRO

Eseguita la filtrazione, asciugare delicatamente la membrana filtrante con carta da filtro, avendo cura di non asportare le alghe su di essa concentrate. A questo punto si può preparare il filtro per l'estrazione della clorofilla (7.3), oppure conservarlo in attesa di poter effettuare l'analisi. In questa seconda eventualità il filtro va posto in una bustina di carta di alluminio e conservato in congelatore a -20 C su gel di silice.

7.3 ESTRAZIONE DEI PIGMENTI

Tagliare il filtro in piccoli pezzi avendo cura di non toccare con le dita l'area su cui si concentrano le alghe e

trasferire i frammenti in una provetta da centrifuga numerata. Aggiungere 5 ml di acetone diluito (4.2). Macinare il filtro con un apparecchio omogeneizzatore (5.4) immergendo l'asta di questo nella provetta e azionando lo strumento per 1 minuto a circa 10000 giri. Dopo di ciò sciacquare l'asta dell'omogeneizzatore immergendola in una provetta contenente 5 ml di acetone diluito (4.2) e azionando lo strumento per qualche decina di secondi. L'acetone usato per il lavaggio va successivamente trasferito nella stessa provetta contenente il filtro. Poiché per ogni filtro è opportuno eseguire due lavaggi dell'asta con acetone, alla fine di queste operazioni il volume totale di solvente nella provetta da centrifuga sarà di 15 ml. Conservare la provetta al buio in ambiente fresco per 12-14 ore.

7.4 SEPARAZIONE DELL'ESTRATTO

Centrifugare la provetta per 10 minuti a 10000 giri. Terminata la centrifugazione trasferire il supernatante in una nuova provetta. Il volume di estratto sufficiente per la lettura spettrofotometrica è di circa 10 ml. In alternativa alla centrifugazione il contenuto della provetta può essere nuovamente filtrato su filtri in fibra di vetro utilizzando una siringa provvista di supporto per il filtro. Se viene seguita questa seconda procedura il filtro applicato alla siringa va sostituito ogni volta che si cambia il campione e la siringa va sciacquata con acetone.

7.5 LETTURA SPETTROFOTOMETRICA

Utilizzare acetone diluito (4.2) come riferimento (bianco). Trasferire l'estratto in una cuvetta da 4 cm di lunghezza. Effettuare una prima lettura a 663 nm (picco di assorbimento della clorofilla *a*) ed a 750 nm (usata per normalizzare la lettura a 663 nm). La lettura a 750 nm non dovrebbe superare un valore di assorbimento di 0,02 in una cuvetta da 4 cm: in caso contrario l'estratto è troppo torbido e dovrebbe essere nuovamente centrifugato o filtrato. Dopo la prima serie di letture aggiungere nella cuvetta 250 μl di acido cloridrico 0,1 N:(4.3).

Questa quantità di acido cloridrico è sufficiente a produrre nella cuvetta un pH di 2,6 - 2,8, ottimale per completare la reazione di acidificazione in tempi relativamente brevi (circa 5 minuti), evitando al contempo le conseguenze negative di una acidificazione troppo spinta. Trascorsi i 5 minuti necessari al completamento della reazione di acidificazione effettuare la seconda serie di letture: Poiché l'aggiunta dell'acido cloridrico determina un leggero spostamento del picco di assorbimento della clorofilla *a*, è bene eseguire le letture a 665 e 750 nm.

8. Espressione dei risultati

Esprimere il risultato in milligrammi al metro cubo

procedendo al calcolo della concentrazione nel modo seguente:

Normalizzare i valori di assorbanza dell'estratto per le letture a 750 nm, prima (E_1) e dopo l'acidificazione (E_2):

$$E_1 = E_{663} - E_{750}$$

$$E_2 = E_{ac665} - E_{ac750}$$

Calcolare la concentrazione della clorofilla a e dei feopigmenti utilizzando la seguente equazione:

$$\text{Clorofilla } a = (E_1 - E_2) \times (R / R - 1) \times [v / (l \times V \times \alpha)] \times 10^3$$

Feopigmenti = $1.7 \times E_2 \times [v / (l \times V \times \alpha)] \times 10^3$ - Clorofilla a dove:

$R = E_1/E_2$ per la clorofilla pura ($= 1.7$)

$\alpha =$ coefficiente di assorbanza specifico per la clorofilla a in acetone 90% ($= 91$)

$v =$ volume, in millilitri, di acetone

$l =$ lunghezza, in centimetri, della cuvetta

$V =$ volume, in litri, di acqua filtrato (l)

Semplificando le due equazioni diventano:

$$\text{Clorofilla } a = 26.7 \times (E_1 - E_2) \times v / (V \times l)$$

$$\text{Feopigmenti} = 18.7 \times E_2 \times v / (V \times l) - \text{Clorofilla } a$$

9. Precisione

Non sono attualmente disponibili i valori di ripetibilità e riproducibilità del metodo.

10. Resoconto di prova

Il resoconto di prova dovrà contenere le indicazioni seguenti:

- il riferimento al metodo impiegato;
- i dati per l'identificazione del campione;
- il risultato ed il modo di espressione usato;
- ogni altra informazione relativa ai dettagli operativi che possono aver influenzato il risultato.

Appendice A

(Informativo)

Bibliografia

A.1. LORENZEN C.J. - Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations. *Limnol.Oceanogr.*, **12**: 343-346. 1967.

A.2. MOED I.R., HALLEGRAEFF G. M. - Some problems in the estimation of chlorophyll a and phaeopigments from pre- and post-acidification spectrophotometric measurements. *Int.Rev. ges.Hydrobiol.*, **63**: 787-800. 1978.

A.3. NUSCH E.A. - Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. *Arch. Hydrobiol. Ergeb. Limnol.*, **14**: 14-36. 1980.

A.4. Standard methods for the examination of water and wastewater - APHA AWWA WPCF - 18th Edition APHA, Washington D.C., 1992.