

DETERMINAZIONE DELLE ALGHE

0. Generalità e definizioni

Le alghe fitoplanctoniche, visibili solo al microscopio ottico sono le alghe che rivestono maggiore interesse per la valutazione della qualità delle acque destinate alla produzione di acqua potabile. Sono organismi vegetali fotoautotrofi e comprendono specie unicellulari, pluricellulari e coloniali.

Possiedono plastidi, organuli discoidali che, a seconda delle specie, possono essere, non solo in numero vario, ma presentarsi disposti in modo diverso a pile o nastriformi, oppure trovarsi singolarmente nella matrice cellulare se le dimensioni sono piuttosto grandi. I plastidi contengono clorofilla ed altri pigmenti fotosintetici e sono di fondamentale importanza per lo studio tassonomico. Particolare rilievo assume la determinazione numerica e tassonomica delle alghe appartenenti a specie potenzialmente tossiche ed a specie capaci di produrre sostanze odorigene, nonché la sorveglianza sulla periodicità dei fenomeni di fioritura (*blooms*). Infatti, con adeguate condizioni ambientali, le alghe possono produrre spessi strati di cellule nei corpi idrici superficiali. Le fioriture sono comunemente costituite da Cianobatteri, molte specie dei quali sono in grado di produrre diverse categorie di tossine. Oltre alle tossine, i Cianobatteri possono essere produttori di una grande varietà di sostanze, molte delle quali sono dotate di proprietà odorose acute e persistenti che possono rendere l'acqua potabilizzata inaccettabile per gli utenti. Altri taxa producono sostanze che conferiscono odori o sapori particolari all'acqua: Crisoficee, Criptoficee, alcune specie di Dinoficee pigmentate, di Cloroficee e di Diatomee.

È stato più volte evidenziato che i trattamenti convenzionali di potabilizzazione delle acque (coagulazione/filtrazione, filtrazione su sabbia, clorazione) sono in grado di rimuovere soltanto basse percentuali di tossine algali disciolte. L'ozono e il carbone attivo granulare sembrano invece avere una elevata efficacia nella rimozione di cianotossine. Per acque sottoposte a trattamento di potabilizzazione è altresì importante rilevare la presenza di alghe con tendenza alla flottazione, particolarmente difficili da rimuovere nel processo di chiariflocculazione.

Il metodo riportato permette di stabilire il numero delle unità algali e non delle cellule algali, intendendo, come unità algale, la singola cellula nelle forme unicellulari e l'intera colonia nelle forme coloniali (*Volvox*, *Pediastrum* vengono, in questo caso, considerate unità algale), e come cellule algali, una unità costituita dalla singola cellula anche se appartenente ad una colonia (ad esempio, nelle forme coloniali, come *Volvox* o *Pediastrum*, vengono enumerate le singole cellule).

Nel Decreto Legislativo n. 31 del 2001 e successive modifiche ed integrazioni, al paragrafo Avvertenza dell'Allegato I, è prevista la determinazione qualitativa del parametro con riferimento ad un litro di campione di acqua, equivalente al volume minimo da analizzare, così come stabilito dal Decreto Legislativo n. 27 del 2002. Tuttavia, il metodo di seguito riportato fornisce la possibilità di ottenere risultati quantitativi. Ai sensi dell'attuale normativa, le alghe nelle acque destinate al consumo umano sono da considerare come un indice di qualità; pertanto la loro presenza è ammessa, anche se ne è auspicabile l'assenza.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per le acque sorgive, sotterranee e superficiali destinate o da destinarsi al consumo umano.

2. Principio del metodo

Nonostante la normativa richieda soltanto una determinazione qualitativa della presenza di alghe, con il metodo di seguito riportato viene data la possibilità di quantificare il numero degli elementi algali eventualmente presenti. Il metodo descritto prevede l'osservazione diretta al microscopio ottico invertito dopo sedimentazione del campione in apposite camere di vetro con fondo quadrettato. In questo modo viene assicurata l'osservazione di un campione inalterato, poiché il materiale particolato in esso contenuto viene osservato direttamente dopo un solo passaggio di sedimentazione spontanea; viene contestualmente consentita la valutazione microscopica e macroscopica delle caratteristiche morfologiche degli individui presenti e la qualità complessiva del preparato e tutto viene registrato nel referto analitico.

Il principio è derivato dal metodo di Utermohl (1958); inoltre è possibile distinguere e contare alghe pigmentate (individui vivi) ed alghe non pigmentate (individui morti).

La manipolazione di campioni per analisi biologiche, in generale, può esporre l'operatore al rischio di contatto con organismi patogeni, quindi si raccomanda di seguire le norme di sicurezza previste dal Decreto Legislativo 626/94; prima e dopo l'esecuzione dell'osservazione microscopica, procedere alla disinfezione degli oculari del microscopio con disinfettante diluito in acqua.

3. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio è necessario avere a disposizione:

- Pipette Pasteur in vetro
- Parafilm
- Microscopio ottico invertito corredato di obiettivi 4x, 10x, 20x, 40x, 60x;
- Micrometro oculare
- Camere di sedimentazione

Indicativamente, si possono utilizzare camere di sedimentazione in vetro della capacità di 500 mL, di forma cilindrica e altezza di 95 mm, con base quadrettata per fotoincisione (dimensione quadretti 1 mm x 1 mm, area osservabile 0,9216 mm² per ciascun quadrato escludendo le aree coperte dai bordi dei quadretti) di diametro 95 mm ed area di base totale osservabile di 7084,625 mm². Durante il periodo di sedimentazione, le camere possono essere coperte con capsule di Petri adatte alla camera utilizzata.

La scelta della capacità maggiore o minore delle camere è dettata rispettivamente dalla maggiore o minore presunta presenza numerica di alghe nel campione esaminato.

3.1. Pulizia delle camere di sedimentazione

Per maggiore precisione e orientativamente, si descrive l'operazione di pulizia delle camere di sedimentazione.

Riempire la camera di una soluzione acquosa di disinfettante (4.2.) e lasciarla in contatto con il disinfettante per alcune ore (preferibilmente, 3-4 ore); quindi lavare accuratamente la superficie della camera, particolarmente il fondo e la porzione interna che è stata a contatto con il campione di acqua, con detergente cremoso non abrasivo, spugnetta non abrasiva ed acqua di rubinetto. Sciacquare con acqua di rubinetto, risciacquare con acqua distillata e mettere ad asciugare in stufa a 55-60°C per alcune ore.

In alternativa, è possibile, dopo il risciacquo con acqua distillata, asciugare la camera con carta assorbente e metterla in stufa a 55-60°C fino a completa asciugatura; si tenga presente che eventuali microrganismi particolarmente affini alla superficie interna della camera di sedimentazione, come ad esempio le microamebe, non vengono rimossi con quest'ultimo metodo e di ciò si dovrà tener conto nella lettura del campione successivo.

Prima di utilizzare la camera per un nuovo campione, è bene verificare al microscopio invertito che il fondo sia perfettamente pulito, prima con l'obiettivo 4x, poi, se necessario, con gli obiettivi a maggiore ingrandimento. Nel caso che la camera sia stata asciugata con carta assorbente, saranno

visibili sul fondo alcuni filamenti di carta dall'aspetto caratteristico, che, tuttavia, non interferiranno con la lettura del campione.

4. Reagenti e prodotti di consumo

4.1. Reattivo di Lugol

Composizione:		
Iodio	5	g
Ioduro di potassio	10	g
Acido acetico glaciale	10	mL
Acqua distillata	100	mL

Da usare, con le dovute precauzioni, sotto cappa chimica.

4.2. Soluzione disinfettante

Possono essere utilizzati Desogen o Citrosil al 3% in acqua per la disinfezione degli oculari del microscopio e delle camere di sedimentazione.

4.3. Detergente e accessori

Detergente cremoso non abrasivo e spugnetta non abrasiva per la pulizia delle camere di sedimentazione; usare carta assorbente per asciugare la camera.

5. Procedura

5.1. Volume da analizzare

Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 1 litro, può anche essere esaminato in due aliquote da 500 mL ciascuna per campioni di acque a basso grado di contaminazione (acque finali, distribuite, fasi intermedie del trattamento di potabilizzazione).

Il campione deve essere raccolto in bottiglie di vetro pulite, ma non necessariamente sterili; in ogni caso è necessario evitare di raccogliere il campione in bottiglie contenenti tiosolfato di sodio.

5.2. Campionamento

Prelevare, in maniera idonea, almeno 1 litro di acqua in una bottiglia di vetro pulita e asciutta, scegliendo, in funzione della qualità dell'acqua il volume più idoneo di campione.

5.3. Preparazione del campione a fresco

Agitare accuratamente il campione e versare, preferibilmente dividendo in due aliquote separate da 500 mL ciascuna, in camere di sedimentazione. Fare sedimentare per un periodo minimo di 4 ore e, di norma, non superiore alle 24 ore; in questo modo tutto il materiale eventualmente presente nel campione risulterà inalterato e chiaramente visibile sul fondo.

Nel caso di acque grezze e con elevato contenuto di alghe, mettere a sedimentare un volume non inferiore ai 5 mL, utilizzando camere più piccole e lasciando sedimentare per un periodo minimo di 1 ora e non superiore alle 24 ore.

5.4. Preparazione del campione fissato

Nel caso si renda necessario, soprattutto quando il conteggio viene eseguito oltre le 24 ore dall'inizio dell'analisi, è possibile fissare il campione aggiungendo reattivo di Lugol (4.1.) a goccia a goccia fino a che l'acqua non assumerà una colorazione "cognac"; la fissazione del campione può essere effettuata sia nella bottiglia di prelievo sia nella camera di sedimentazione. Dopo l'aggiunta del Lugol, per la volatilità dei componenti, è necessario coprire i contenitori (bottiglia di prelievo o camera di sedimentazione) e sigillare bene con il parafilm o, in alternativa, conservare sotto cappa chimica accesa.

La fissazione con il reattivo di Lugol può comportare l'alterazione dei Nematodi e di altri organismi sensibili ed, in ogni caso, impedisce la distinzione tra elementi vivi e morti.

5.5. Centratura del microscopio

Per maggiore precisione, si descrive la procedura corretta per la centratura del microscopio. L'operazione consiste nel mettere a fuoco e centrare il condensatore in modo che la luce che lo attraversa formi l'immagine nella giusta posizione sopra il preparato; in questo modo si ottengono le migliori condizioni di risoluzione e di contrasto. In teoria l'operazione sarebbe da ripetere ad ogni cambio di obiettivo e/o di oculare, ma in pratica è consigliabile eseguirla periodicamente, per mantenere nel tempo le stesse condizioni di lavoro. La procedura prevede le seguenti fasi:

- mettere a fuoco il preparato con l'obiettivo 10x;
- chiudere completamente il diaframma di campo ed aprire il diaframma di apertura; nel campo ottico sarà visibile il campo luminoso nella minima estensione consentita;
- alzare al massimo il condensatore ed, agendo sulle apposite manopole, regolarne la posizione in modo da centrare il campo luminoso del diaframma al centro del campo ottico;
- quindi regolare in altezza il condensatore finché i bordi dell'immagine del diaframma di campo non diventano nitidi;
- riaprire parzialmente il diaframma di campo in modo da ottenere un campo luminoso di diametro leggermente inferiore al campo ottico;
- regolare, infine, il diaframma di apertura prima chiudendolo lentamente fino a percepire nell'immagine una variazione di contrasto, quindi riaprendolo leggermente.

Prima e dopo l'esecuzione dell'osservazione microscopica, procedere alla disinfezione degli oculari con un agente disinfettante al 3% in acqua (4.2.) per evitare la trasmissione di eventuali infezioni oculari da un operatore all'altro.

5.6. Screening del campione

Volendo eseguire uno screening del campione prima del conteggio degli organismi, si consiglia di applicare la procedura di seguito descritta.

Lo screening è utile per la valutazione dell'omogenea distribuzione del materiale sedimentato al fine di scegliere i campi su cui effettuare la conta mediante l'ausilio di obiettivi a maggiore risoluzione.

Per la fase di screening utilizzare l'obiettivo 4x ed osservare tutto il fondo della camera di sedimentazione; questo ingrandimento consente di osservare ogni volta un campo microscopico di 16 riquadri (4 x 4).

Mettere a fuoco i campi per verificare che la sedimentazione sia completata e per rilevare l'eventuale presenza di alghe flottanti annotando l'osservazione nel responso analitico.

Annotare la presenza nel campione di materiale inerte (ad esempio, sabbia, carbone ecc.) o di residui vegetali osservabili nel campo microscopico inquadrato valutandoli come:

- 1 assenti
- 2 rari (1 - 2)
- 3 alcuni (2 - 10)
- 4 numerosi (10 - 20)
- 4 abbondanti (30 - 100)
- 5 eccessivi (maggiori di 100)

Annotare sul referto la valutazione complessiva della qualità del campione.

Durante l'esecuzione di questa procedura è possibile enumerare, oltre alle alghe, anche Nematodi, nonché tutte le altre forme di Metazoi piuttosto comuni nelle acque superficiali, come Rotiferi, Gastrotrichi, Tardigradi, Briozoi ed alcune classi di Crostacei (Fillopodi, Ostracodi e Copepodi), e Protozoi. Possono essere osservati anche altri reperti, come uova, larve di insetti, semi, pollini e varie strutture circolari difficilmente riconducibili ad organismi definiti. È possibile discriminare la presenza di materiali inerti o detriti, di strutture vegetali e/o animali (frammenti e filamenti) dagli organismi strutturati, viventi e non viventi e valutare complessivamente la qualità del campione in quanto ad elementi figurati.

5.7. Esame microscopico

L'osservazione del campione in giornata è sempre da preferire; è comunque accettabile l'osservazione effettuata nel giorno successivo perché potrebbe essere trascurabile il grado di alterazione del campione se non sono presenti protozoi vivi, predatori di elementi algali. L'osservazione effettuata sul campione a fresco (non fissato) nei 3-4 giorni successivi al prelievo può essere comunque attendibile, fatto salvo che va comunque considerata qualitativa, giacché potrebbero essere intervenuti fenomeni di alterazione del campione e processi riproduttivi.

La camera di sedimentazione dovrà preferibilmente essere tenuta vicino al microscopio per ridurre al minimo il rischio di agitazione del campione.

5.8. Conteggio delle unità algali

Il conteggio viene effettuato con obiettivi 10x o 20x; per l'identificazione può essere necessario l'ausilio di obiettivi a risoluzione maggiore.

Si consiglia di procedere come di seguito descritto. Scegliere 3 quadrati grandi, di lato 1 cm, non adiacenti, marcati da una linea più spessa (costituiti ognuno da 10 x 10 quadretti) identificati con A B C ed effettuare la conta di tutte le unità algali depositate nell'area di lettura individuata. La scelta dei campi microscopici può essere effettuata con l'ausilio della tabella dei numeri randomizzati e la verifica della casualità della distribuzione delle particelle algali nei campi considerati mediante una serie di 5 conteggi replicati e l'applicazione del test del χ^2 .

Per ogni campo scelto discriminare numericamente i gruppi algali (ad esempio, Cianobatteri, Crisofite, Diatomee, Flagellate, Coniugate, Dinoflagellati, Clorofite). Segnalare se un gruppo od una singola specie (ove è possibile effettuare la speciazione) è prevalente sugli altri.

Si considera sufficiente l'identificazione a livello del genere. Per l'identificazione può essere utile avvalersi della misura delle dimensioni delle singole alghe presenti, da effettuarsi con l'uso del micrometro oculare e dell'ausilio dei manuali per l'identificazione indicati in bibliografia.

Conteggiare il numero di unità algali/mL presenti nel campione utilizzando un foglio di calcolo predisposto od applicando la formula descritta in 5.9.

5.8.1. Misurazione con il micrometro oculare del materiale osservato

Volendo determinare le dimensioni (in μm) degli elementi algali individuati, procedere moltiplicando il numero delle tacche misurate col micrometro oculare per i coefficienti micrometrici (i coefficienti micrometrici si ottengono dal rapporto fra il micrometro-oculare ed il micrometro-oggetto), considerando che ad ogni obiettivo corrisponde un coefficiente micrometrico.

5.9. Calcolo delle Unità Algali

Calcolare il numero medio di unità algali presenti in un quadrato di lato 1 mm come risultato della media dei valori letti su tre quadrati di lato 1 cm (A, B e C); quindi calcolare il numero di unità algali (N°) per mL applicando la seguente formula e riportando il numero a 1000 mL di campione:

$$N^\circ/\text{mL} = N_i \times A/a \times 1/N_i \times 1/V$$

dove:



N_i = numero totale di unità algali contate nelle aree considerate
 A = area totale della camera di sedimentazione in mm^2
 a = area del campo microscopico in mm^2
 N_i = numero di campi contati
 V = volume del campione sedimentato in mL

6. Interferenze

Possono essere causa di interferenza nella lettura dei risultati la presenza di cristalli ed altri materiali, artefatti dovuti alla fissazione od alla raccolta del campione in bottiglie contenenti tiosolfato di sodio; presenza di graffi e di bolle di aria sul fondo della camera di sedimentazione spesso dovuti ad errata pulizia della camera.

7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come numero di individui/1000 mL.

Bibliografia

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewaters, 20 th Edition, 1998.
Metodo Unichim N. 963; Manuale N.168 - Acque destinate al consumo umano - Metodi microbiologici parte II - "Ricerca e determinazione delle alghe". UNICHIM Associazione per l'Unificazione nel Settore dell'Industria Chimica, 1995.
Streble - Krauter "Atlante dei microrganismi acquatici"; Franco Muzzio editore, 1984.
P. Bourrelly "Les algues d'eau douce" editions N.Boubee & C., 1972.
G.W. Prescott "How to know the Freshwater algae" Wm. C. Brown Company Publishers Dubuque, Iowa.
Utermohl, H. "Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik." Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. 9:1-38, 1958.