

# La preparazione dei materiali algologici (acque interne)

Marco Cantonati  
Ermanno Bertuzzi

Sezione di Limnologia e Algologia, Museo Tridentino di Scienze Naturali, via Calepina, 14. I-38100 Trento.  
E-mail: cantonati@mtsn.tn.it; bertuzzi@mtsn.tn.it

## RIASSUNTO

Dal 2000 è stata formalmente istituita presso il Museo Tridentino di Scienze Naturali una Sezione di Limnologia e Algologia. Nel settore della ricerca l'obiettivo principale è lo studio non solo della struttura delle comunità e dei taxa più rilevanti (morfologia, autoecologia), ma, grazie a una rete di collaborazioni, anche di aspetti del metabolismo bioorganico e di caratterizzazione con tecniche di genetica molecolare. I materiali vengono organizzati in collezioni, particolarmente adatte come documentazioni tangibili di situazioni di qualità ambientale. La Sezione ha in affidamento anche una collezione storica (Ottocento) costituita da più di un migliaio di *exsiccata* (tutti i gruppi di alghe, ambienti d'acqua dolce e marini). Le attività in corso, tutte riferite ad ambienti d'acqua dolce, e le collezioni da gestire si prestano per commentare un ampio spettro di tecniche di preparazione dei materiali algologici. Un Progetto di ricerca multidisciplinare (Studio dell'arrossamento del Lago di Tovel, SALTO), finanziato dalla Provincia Autonoma di Trento, nell'ambito del quale lo studio del dinoflagellato un tempo responsabile dell'arrossamento del Lago di Tovel è stato eseguito con una molteplicità di approcci (morfologia, ultrastruttura, ecofisiologia, chimica bioorganica, biologia molecolare), viene utilizzato come caso emblematico per una discussione sul forte condizionamento che le tecniche di preparazione e conservazione impongono ai futuri utilizzi dei materiali. Gli *exsiccata*, molto meno utilizzati di un tempo in campo algologico (acque dolci), consentono tuttavia spesso un'ampia gamma di modalità di studio, in particolare in un'epoca in cui chemotassonomia e genetica molecolare si affiancano sempre più frequentemente a metodiche più tradizionali per la classificazione dei materiali.

Parole chiave:

alghe, cianoprocaroti, preparazione, *exsiccata*, diatomee, tecniche di conservazione.

## ABSTRACT

*The preparation of phycological materials (freshwater environments).*

Since 2000 a Limnology and Phycology Section was established within the Museo Tridentino di Scienze Naturali. As regards scientific research, the main goal is the study not only of community structure and of the most relevant taxa (morphology, autecology), but also of bioorganic metabolism and of the characterisation with molecular genetics techniques in partnership with other institutions and working groups. Samples are organised in collections which are also material documents of environmental quality conditions. The Section's legacy includes also a historical (Nineteenth century) algae collection, made up by more than thousand *exsiccata* (all groups of algae, marine and freshwater environments). Ongoing activities, all concerning freshwater environments, and the collections to manage offer examples and cases to discuss a wide range of preparation techniques of algological materials. A multidisciplinary research project (Studio dell'arrossamento del Lago di Tovel, SALTO / Blooms and Environment: Science for Tovel, BEST), financed by the Autonomous Province of Trento, in the frame of which the study of the dinoflagellate once responsible of the reddening of Lake Tovel was carried out with manifold approaches (morphology, ultrastructure, ecophysiology, bioorganic chemistry, molecular biology), is used as an emblematic case study for the discussion of the strong conditioning imposed by the preparation and conservation techniques on future possible uses of the materials. *Exsiccata*, far less used in phycology (freshwater) than in former times, nevertheless often allow a broad spectrum of investigative approaches, especially in recent times, when chemotaxonomy and molecular genetics more and more frequently come alongside with more traditional methods for the classification of materials.

Key words:

algae, cyanoprokaryotes, preparation, *exsiccata*, diatoms, preservatives.

## INTRODUZIONE

Senza la conservazione di reperti non vi sarebbero Musei. Alla tradizionale funzione primaria di luoghi con condizioni adatte per la conservazione di collezioni di studio si sono affiancate nel tempo, con sempre maggiore forza e in misura più o meno pronunciata, altre funzioni, quali la divulgazione e la didattica. La ricerca museale ha assunto, accanto ai tradizionali aspetti di revisione, studio, documentazione dei reperti conservati nelle collezioni, nuove attività e sfaccettature. Le campagne di raccolta naturalistiche sono divenute ricerca ecologica di campo e vengono ormai quasi esclusivamente eseguite nell'ambito di ricerche con obiettivi aggiuntivi rispetto al reperimento dei materiali, che vengono frequentemente campionati con grande attenzione agli aspetti quantitativi, stagionali e di rappresentatività delle comunità presenti in natura. Le collezioni stesse, anche grazie alla mole sempre più cospicua di dati ambientali che accompagna i campioni, vanno assumendo sempre più spesso il ruolo di archivi di testimonianze di situazioni di qualità ambientale. In molti casi i campioni non rappresentano infatti esemplari di singole specie, ma sono subcampioni di intere tassocenosi, associazioni o comunità. Gli indicatori che queste comunità spesso contengono possono consentire la ricostruzione dei valori di variabili ambientali chiave. Se i materiali sono stati ben preparati e conservati, questi parametri ambientali potranno essere ricostruiti con tecniche che si saranno sempre più raffinate nel tempo anche a distanza di molti anni. Queste testimonianze tangibili di qualità ambientale presentano quindi vantaggi aggiuntivi rispetto a semplici dati relativi a misure fisiche e chimiche o ai risultati di analisi biologiche non più corredati dai campioni sui quali sono state ottenute. Ad esempio, Van Dam et al. (1993) hanno potuto evidenziare fenomeni di acidificazione in sorgenti e fontane dei Paesi Bassi confrontando i valori di pH ricostruiti dalle associazioni di diatomee raccolte in questi ambienti nel 1974 e nel 1993. L'acidificazione non si poteva evincere dai valori di pH, perché i dati misurati nel 1974 non erano affidabili, a causa delle ben note difficoltà di misura di questo fattore in ambienti con acque a mineralizzazione estremamente ridotta. La maggior parte delle attività museografiche ha bisogno, direttamente o indirettamente, di reperti e materiali. Le possibilità di conservazione e utilizzo di questi ultimi vengono in realtà decise poco dopo la raccolta, nel momento in cui si sceglie quali tecniche di preparazione, fissaggio e conservazione utilizzare. La rassegna sintetica di preparazione dei materiali algologici che segue non ha la pretesa di essere esaustiva, ma vuole ricondurre l'attenzione su una fase di trattamento dei materiali spesso considerata se non proprio banale, perlomeno routinaria, e quindi talora effettuata senza particolari riflessioni. Gli esempi scelti e le metodologie citate riflettono fortemente le esperienze personali degli scriventi e sono riferite esclusivamente alle alghe d'acqua dolce.

## LA SEZIONE DI LIMNOLOGIA E ALGOLOGIA DEL MUSEO TRIDENTINO DI SCIENZE NATURALI

Può forse ad alcuni sembrare curiosa l'istituzione, presso un Museo scientifico collocato in un contesto ambientale chiaramente alpino, di una Sezione di Limnologia e Algologia, cioè per definizione concentrata sullo studio degli ambienti acquatici con particolare attenzione alla componente algale dei biota. Lo stupore deriva probabilmente in parte dalla netta preponderanza nel nostro paese, tra gli algologi, di studiosi interessati all'ambiente marino. Il Trentino comprende quasi esclusivamente territorio montagnoso, che tuttavia ospita ben più di trecento laghi (oltre il 70% sono di alta montagna), la porzione settentrionale del più grande lago italiano, numerosissime torbiere, zone umide e una grande ricchezza di corsi d'acqua di varia origine (sorgenti, ghiacciai - nel Trentino occidentale ve ne sono fra i più estesi delle Alpi italiane - laghi, nevai e acque di ruscellamento). Praticamente in tutti questi ambienti la componente algale è rilevante e, nella maggioranza di essi, le alghe sono i principali produttori primari. Per esempio, le diatomee colonizzano con un gran numero di taxa tutti questi ambienti (la sola eccezione è rappresentata dal tratto iniziale dei torrenti glaciali torbidi a causa del detrito minerale fine in sospensione), le desmidiacee, per lo più acidofile, sono rappresentate con particolare ricchezza su substrato siliceo nelle torbiere e nei litorali sabbiosi o con vegetazione acquatica dei laghetti di montagna e anche negli inospitali torrenti glaciali torbidi non mancano taxa reobionti caratteristici, come la crisofita *Hydrurus foetidus* (Villars) Trevisan e rodofite della Famiglia Lemnaceae. La più famosa problematica ambientale relativa a un bacino lacustre in Trentino ha come protagonista un dinoflagellato, che fino al 1964 causava, con poderose fioriture, l'arrossamento estivo, della porzione sud-occidentale del celebre Lago di Tovel delle Dolomiti di Brenta. Alghe e cianoprocaroti sono anche i protagonisti, questa volta in negativo, di fioriture che causano problemi di qualità e balneabilità alle acque di rari laghi di fondovalle e di innocue, ma fastidiose, schiume che talora deturpano una ristretta porzione del litorale di Riva del Garda e che sono generate dal turbinamento delle acque e del fitoplancton, che giungono attraverso una condotta forzata dal soprastante Lago di Ledro, nella centrale idroelettrica del Ponale. Le alghe sono anche tra gli indicatori biologici più diffusi ed efficaci in questi ambienti. Sono per esempio stati sviluppati indici basati sulle diatomee o sulle macroalghe per la valutazione dello stato trofico e saprobico dei corsi d'acqua (per es. EPI-D; Dell'Uomo, 1999), o indici che consentono di utilizzare tutti i gruppi algali per la valutazione di aspetti più specifici delle acque correnti, quali la saprobicità (Rott et al., 1997), il trofismo e il carattere geolitologico (Rott et al., 1999). Anche in questo settore, tuttavia, l'attenzione in Italia è stata tradizionalmente rivolta perlopiù

agli aspetti zoologici e, in particolare, verso l'utilizzo dei macroinvertebrati come indicatori di qualità. Esistono, inoltre, indici basati sulle diatomee, per la valutazione dello stato trofico delle rive dei laghi (Hofmann, 1994). Per quanto riguarda i laghi, impossibile non ricordare anche che la maggior parte delle valutazioni più solide per l'inquadramento dello stato trofico dell'intero specchio lacustre viene fatta sulle alghe del fitoplancton (concentrazioni della clorofilla *a*, biovolume fitoplanctonico, *taxa* guida).

Non mancano quindi aspetti di cui una Sezione di Limnologia e Algologia di un Museo scientifico in Trentino possa occuparsi, in sinergia con le altre istituzioni deputate anche alla sorveglianza, al controllo, o alla ricerca su aspetti, generalmente applicativi, della biologia delle acque interne. Laver posto una disciplina ecologica in primo piano nella denominazione di una Sezione musearia vuole porre l'accento sull'utilizzo primario delle collezioni algologiche come archivi di testimonianze tangibili di situazioni di qualità ambientale. Tra i compiti di un Museo non vi è tuttavia solo la ricerca e la cura delle collezioni, ma anche la divulgazione e la didattica. La Sezione viene quindi visitata da appassionati e curiosi (per es., a fine maggio-inizio giugno, quasi ogni anno, qualcuno porta campioni di acqua vivacemente colorata per la presenza di specie rosse di *Euglena* Ehrenberg, con la malcelata speranza che il fenomeno osservato in una pozza d'alpeggio sui monti di casa possa presentare analogie con il ben più noto e spettacolare arrossamento di Tovel) e frequentata da stagisti di scuole superiori, diplomandi, laureandi e dottorandi. Le attività della Sezione vengono elencate in maniera analitica e strutturata nella scheda relativa a "Obiettivi e finalità della Sezione" (o "mission" per gli anglofili) riportata in figura 1.

Nell'ambito di un progetto Life (Life Tovel di cui sono stati partner il Comune di Tuenno nel cui territorio ricade il Lago di Tovel, il Museo e il Parco Naturale Adamello-Brenta), il Comune di Tuenno ha ceduto in comodato gratuito al Museo un "baitino dei forestali" (una casetta in legno), sulle rive del lago. Grazie al Progetto Life il Comune ha potuto procedere all'acquisto di attrezzature scientifiche per la struttura e il Museo Tridentino di Scienze Naturali, in cambio del comodato, si è assunto l'onere della ristrutturazione di questa sua nuova Sezione territoriale. La Stazione Limnologica del Museo al Lago di Tovel, che afferisce alla Sezione di Limnologia e Algologia, nasce con lo scopo di svolgere attività di alta formazione (sono già state realizzate, in via sperimentale, "summer schools" per studenti universitari italiani e stranieri) e di ricerca, in particolare a medio e lungo termine sul Lago di Tovel. Per quanto riguarda la ricerca algologica la struttura si è rivelata strategica per l'effettuazione di osservazioni su materiale fresco di particolare interesse.

## RASSEGNA SINTETICA DEI PRINCIPALI METODI DI PREPARAZIONE DEI MATERIALI ALGOLOGICI

È nostro intento fornire di seguito un quadro complessivo sintetico dei principali metodi di preparazione delle alghe delle acque dolci per la loro conservazione in collezioni.

Qualche indicazione su un ridotto numero delle tecniche che verranno illustrate di seguito (in particolare protocolli per l'isolamento di alghe e la gestione di colture algali) può essere trovata in manuali di metodologie algologiche (per esempio, Stein, 1973). Rari siti Internet offrono indicazioni sulla preparazione dei materiali algologici per lo più riferite alle alghe marine (per esempio, Smithsonian Institution: <http://botany.si.edu/projects/algae/collpres.htm>).

### Essiccazione e talli conservati interi sul substrato

La realizzazione di *exsiccata* è probabilmente la forma di preparazione più antica utilizzata per la conservazione delle alghe. Tuttavia, per quanto riguarda le alghe dolci, questa tecnica di preparazione è ampiamente caduta in disuso in campo scientifico. Viene invece tuttora utilizzata per le macroalghe in alcuni paesi (per es. Giappone) anche come forma di espressione artistica (vengono realizzati anche oggetti di uso comune, come biglietti da visita) e si rivela anche utile strumento didattico per la dimostrazione della struttura dei talli nell'ambito di corsi pratici. È probabilmente la forma di preparazione delle alghe che consente di ottenere le maggiori soddisfazioni estetiche dal preparato finito e questo spiega e giustifica l'esistenza di numerosi manuali, anche in Internet (per esempio, Smithsonian Institution cit.), che illustrano la procedura, peraltro adottata, con modalità del tutto simili anche per l'essiccazione delle piante acquatiche. I cartoncini che fungeranno da supporto vengono immersi in una bacinella piana con acqua nella quale viene quindi immersa delicatamente l'alga da preparare. Particolare cura viene quindi posta nel facilitare, con le dita, pinzette o altro, la perfetta distensione delle strutture del tallo. Il cartoncino viene quindi sollevato lentamente dal fondo della bacinella e posto ad essiccare. All'acqua possono essere aggiunti glicerina, che conferisce flessibilità ai tessuti, e fissativi, come la formalina, che garantiscono la preservazione. Nel caso di *taxa* algali epilitici e per i licheni acquatici un'ottima, quanto semplicissima, tecnica consiste nel prelevare il tallo con il substrato sul quale si è insediato e nel conservare i campioni (pezzi di roccia, ciottoli) previa essiccazione (fig. 2). Struttura e colore del tallo possono essere ben apprezzati inumidendone delle parti e osservandole al microscopio binoculare.

### Microscopia a luce trasmessa (formalina, Lugol)

Per l'osservazione al microscopio a luce trasmessa tradizionale generalmente i campioni si fissano con formalina. Quando nel campione non sono presenti grossi



## Museo Tridentino di Scienze Naturali Sezione di Limnologia e Algologia

### Compiti e finalità

La Sezione di Limnologia e Algologia:

- esegue ricerche sulla biodiversità degli ambienti acquatici del Trentino, con particolare attenzione a quelli di montagna e ai popolamenti algali; le indagini avvengono nel contesto di un'articolata rete di collaborazioni con centri di eccellenza a livello internazionale, nazionale e locale;
- si occupa soprattutto di studi di base, orientati alla conoscenza dei sistemi ecologici e degli organismi (dalla morfologia alla chimica bioorganica), della loro distribuzione (di dettaglio nei singoli ambienti e dal punto di vista biogeografico), delle loro preferenze ecologiche (quindi del loro potenziale valore come indicatori), e delle comunità di cui sono parte (struttura, diversità, associazioni caratteristiche);
- concentra i propri sforzi di ricerca su specifiche tipologie ambientali (situazione attuale e ricostruzioni paleoambientali basate su studi paleolimnologici), quali le sorgenti, i ruscelli sorgivi e i laghi d'alta quota, prestando particolare attenzione al possibile utilizzo di questi ecosistemi come indicatori di cambiamenti a lungo termine, imputabili a problematiche a impatto globale (riscaldamento, aumento irraggiamento UV, acidificazione, eutrofizzazione);
- fatto salvo il proprio specifico settore di competenza, tende alla sinergia con le altre Istituzioni trentine che eseguono ricerche in settori disciplinari affini, in particolare promuovendo progetti di ricerca svolti in collaborazione, e mette i propri risultati a disposizione delle strutture deputate alla sorveglianza, tutela e gestione del territorio, per favorire una pianificazione territoriale orientata al rispetto degli organismi e dei sistemi naturali e a un'ottica di sviluppo sostenibile;
- dedica ogni sforzo al mantenimento di un'elevata qualificazione nello studio di specifici gruppi di organismi, in particolare le alghe diatomee;
- conserva i materiali raccolti e la parte del patrimonio naturalistico storico del Museo di competenza in collezioni scientifiche, per le quali predispone strumenti di informatizzazione in modo da promuoverne il ruolo di veri e propri archivi di condizioni ambientali e favorirne la fruizione;
- rende noti i risultati dei propri studi tramite pubblicazioni su riviste scientifiche specialistiche internazionali e nazionali e la partecipazione a congressi;
- informa sulle proprie attività e divulga conoscenze naturalistiche su ambienti e organismi acquatici tramite esposizioni permanenti e temporanee, scritti su riviste divulgative, conferenze su invito e interventi a tavole rotonde, pagine *web*, video;
- cura la realizzazione di progetti didattici – a tutti i livelli, dall'Università alle elementari - dedicati agli ecosistemi e agli organismi acquatici.

Fig. 1. Obiettivi e finalità ("Mission") della Sezione di Limnologia e Algologia del Museo Tridentino di Scienze Naturali.

quantitativi di sostanza organica, è sufficiente una concentrazione finale di formaldeide pari al 2%. A questa concentrazione la distorsione della parete e delle strutture cellulari delle alghe è frequentemente limitata e la conservazione dei colori ottima. Il fissativo che trova il maggior impiego per la conservazione dei campioni di fitoplancton è senz'altro il Liquido di Lugol, che è so-

stanzialmente una soluzione di iodio che viene aggiunta ai campioni d'acqua in proporzione di 1:100. Spesso alla soluzione iodina viene aggiunto un 10% di acido acetico. Il Lugol presenta lo svantaggio di colorare le alghe di rosso stravolgendo le tonalità originali.



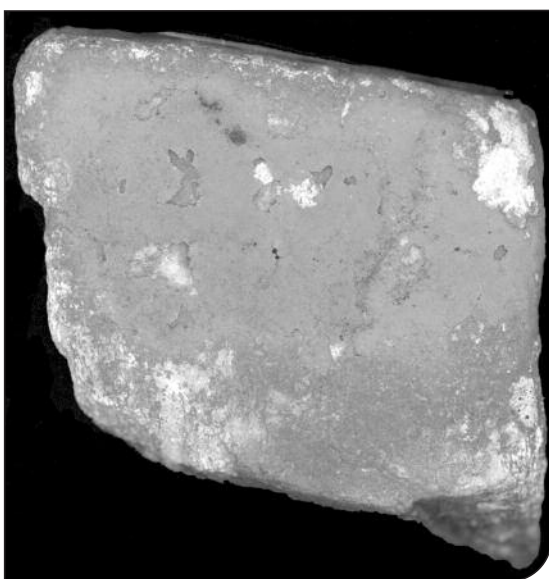


Fig. 2. Un tallo dell'alga verde *Trentepohlia* sp. conservato sul substrato naturale (ciottolo).

**Microscopia elettronica** (SEM: glutaraldeide, tetrossido d'osmio; TEM: paraformaldeide, glutaraldeide in tampone cacodilato)

Per quanto riguarda l'osservazione al microscopio elettronico, nel caso delle immagini a scansione (SEM) è importante evitare in tutti i modi "raggrinzimenti" o comunque alterazioni della parete cellulare. Tra i fissativi che trovano maggior utilizzo a questo fine vi sono la glutaraldeide (conc. finale del 2.5 %) e il tetrossido d'osmio (conc. finale dell'1 %). Questi fissativi, e quelli menzionati nel paragrafo precedente sono tossici e pericolosi e andrebbero maneggiati con opportuni D.P.I. (camicia, guanti ecc.) e sotto cappa. La glutaraldeide viene consigliata da taluni (per es. Wetzel & Likens, 1990) anche per fissare campioni di fitoplancton quando si suppone siano presenti forme delicate, che risulterebbero fortemente alterate dopo il trattamento con altri fissativi. Nel caso sia necessario realizzare sezioni per l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (TEM), è particolarmente consigliata per le alghe la fissazione con paraformaldeide e glutaraldeide in tampone cacodilato.

**Cariologia** (etanolo assoluto e acido acetico 3:1)

Nello studio di alcune alghe [per es. popolazioni della rodofita *Bangia atropurpurea* (Roth) Greville, che colonizza con individui morfologicamente identici, ma con assetto cromosomico leggermente differente, ambienti con salinità diversissime quali le coste marine e corsi d'acqua montani] può essere molto informativo procedere alla determinazione di numero e forma dei cromosomi e questo risulta particolarmente agevole su campioni fissati in Liquido di Carnoy, cioè una miscela di etanolo assoluto e acido acetico nella proporzione di 3:1.

**Metabolismo bioorganico** (materiale fresco, disidratazione parziale e etanolo assoluto)

Per l'analisi dei metaboliti secondari (per esempio tramite una combinazione di cromatografia HPLC, spettro UV in tempo reale tramite PhotoDiode Array e spettrometria di massa) per affrontare, per esempio, problemi di chemotassonomia o di presenza e concentrazione di composti particolarmente significativi dal punto di vista ecologico (per esempio, composti fotoprotettivi quali la scytonemina, tipica di cianobatteri che si trovano a dover fronteggiare periodi di esposizione a elevato irraggiamento in condizione di metabolismo ridotto) la soluzione migliore, quando attuabile, è senz'altro quella di consegnare in tempi brevi il materiale fresco non trattato al laboratorio dove saranno svolte queste analisi. In alternativa, si cercherà di allontanare dal campione quanta più acqua possibile aggiungendo etanolo assoluto "reagent grade". Lo stesso solvente sarà infatti utilizzato in laboratorio per l'estrazione dei metaboliti, mentre l'acqua rimasta nel campione dovrà essere eliminata.

**Genetica molecolare** (etanolo assoluto e "freezer")

Ormai sempre più frequentemente il sequenziamento di regioni del DNA altamente conservate e il confronto dei risultati con le banche dati disponibili per i vari gruppi di alghe consente di fare importanti progressi nell'esatta collocazione tassonomica di specie algali difficilmente trattabili con il solo approccio morfologico tradizionale. Per queste analisi il materiale che deve essere il più puro possibile va fissato con etanolo assoluto "reagent grade" e conservato in "freezer" fino al momento dell'analisi.

**Le collezioni di colture algali**

Per l'analisi dei metaboliti secondari o del DNA è fondamentale poter disporre di campioni puri (unialgali) e, nel caso della chimica bioorganica, molto abbondanti. In natura questo è possibile solo in casi fortunati in cui si verificano fioriture o crescite massicce, che possono essere spontanee, o indotte in strutture sperimentali in situ, di solito tramite l'aggiunta di sali nutritivi all'acqua. Per svincolarsi dalla difficoltà di dover reperire in natura materiale sufficientemente puro e abbondante è necessario isolare l'alga che interessa e avviare colture algali. Per i diversi gruppi vengono consigliati specifici mezzi di coltura (per es. DM, Diatom Medium) ed è necessario disporre perlomeno di una camera fitologica che consenta di impostare i livelli e i ritmi di illuminazione e la temperatura. Esiste anche la possibilità di acquistare colture già avviate da centri specializzati. In Europa, uno dei più noti è quello dell'Università di Göttingen (SAG, Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen). Il mantenimento di una vera e propria collezione di colture algali richiede laboratori e personale appositamente dedicato ed è quindi possibile solo per strutture specializzate di una certa dimensione. Molto più praticabile è invece procurarsi o costruirsi una camera termostatica in cui mantenere, per la durata delle ricerche, colture di alcuni ceppi algali.

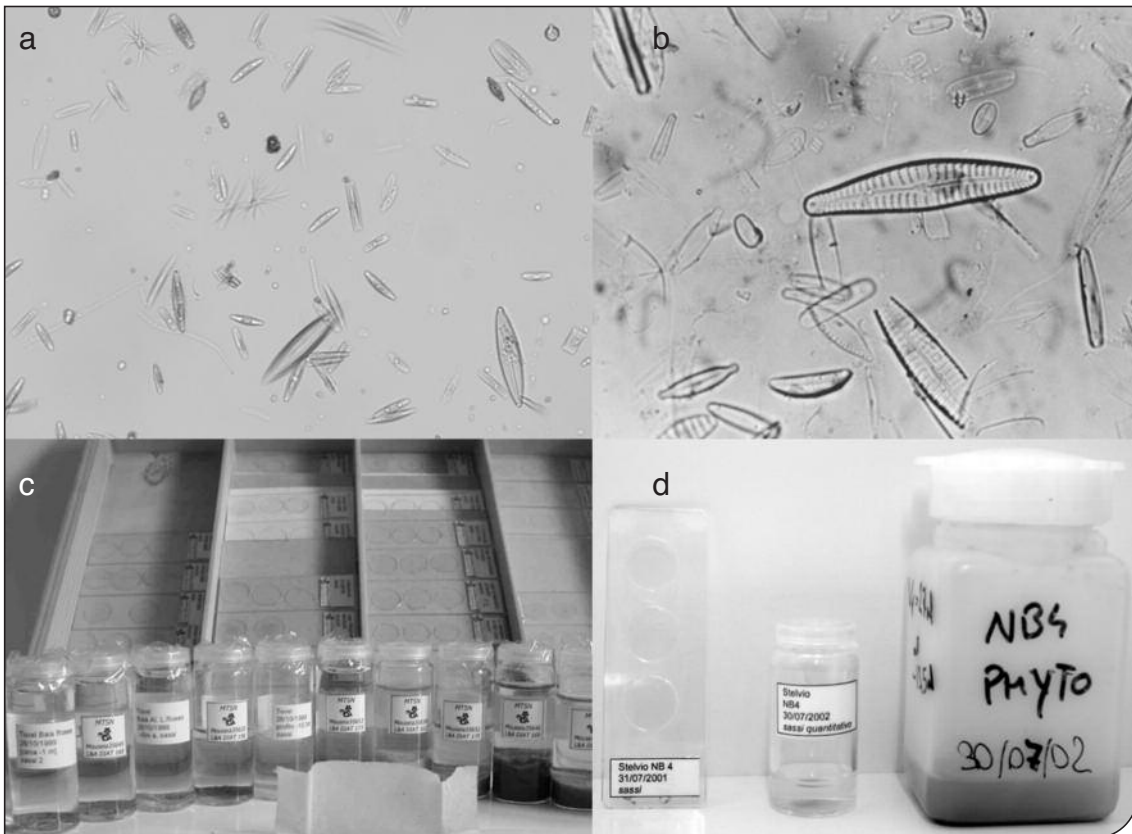


Fig. 3. a) Diatomee non-preparate (materiale fresco); b) preparate (incluse in resina) viste al microscopio; c) sospensioni di materiale preparato, vetrini permanenti e campioni originario non trattato (d).

### Materiale fresco

Per un'agevole e corretta identificazione di molte alghe e dei cianobatteri è di grande aiuto poter osservare materiale fresco non fissato. Per tempi brevi la maggior parte delle alghe si conserva bene in recipienti con molta acqua in frigo. Alcune specie, per esempio certe alghe verdi coniugate o alghe gialle del genere *Vaucheria* de Candolle, in molti periodi dell'anno possono essere conservate anche semplicemente sul davanzale della finestra, nell'attesa che producano le strutture riproduttive necessarie per l'identificazione a livello di specie. La possibilità di poter disporre di una camera fitologica rende ovviamente molto più agevole la conservazione di materiale vivo per brevi periodi. Nel caso di forme molto mobili (per es. dinoflagellati e criptofite) può essere inevitabile aggiungere qualche goccia di glicerina o formalina per rallentare il movimento che può precludere un'osservazione attenta.

### Preparati semi-permanenti e permanenti (glicerina, resine per vetrini di diatomee - Naphrax®, Zrax®)

Molto spesso dal materiale fresco o fissato si realizzano preparati temporanei che devono durare solo per il tempo necessario per l'identificazione e per l'eventuale documentazione iconografica (disegni, fotografia digitale o tradizionale). In questo caso si procede di solito, per le alghe bentoniche, a generare dei preparati tem-

poranei esercitando una certa pressione sulle alghe racchiuse tra coprioggetti e portaoggetti ("squash preparation"). Nel caso di cianoprocarioni epilitici con colonie compatte, la pressione necessaria per poter osservare le singole cellule può essere notevole. Solo l'esperienza derivante da ripetuti tentativi può consentire di apprendere questa semplice, ma utilissima, tecnica di realizzazione di preparati temporanei, che possono eventualmente essere conservati per brevi periodi in capsule Petri tra fogli di carta da filtro inzuppata d'acqua. Preparati di maggior durata possono essere ottenuti includendo le alghe in glicerina e lutando i margini del coprioggetto con smalto o paraffina.

Nel caso delle diatomee, le valve ripulite da eventuali carbonati e dalla sostanza organica con procedure che saranno illustrate con maggior dettaglio nel paragrafo successivo possono essere incluse in resine (fig. 3). Si ottengono in questo modo vetrini che, se ben realizzati, possono conservarsi inalterati per decenni senza che sia necessario adottare particolari precauzioni. Una delle resine maggiormente utilizzate è il Naphrax® che veniva fornito dalla Ditta inglese Northern Biological Supplies fino alla scomparsa del proprietario (2002). Attualmente questa resina ampiamente utilizzata dai diatomologi di tutto il mondo viene fornita per esempio dalla Brunel Microscopes Ltd., UK.

## MATERIALI ALGOLOGICI IDEALI DAL PUNTO DI VISTA DELLA MUSEOGRAFIA "TRADIZIONALE": LE DIATOMEE

Il fatto che le diatomee (fig. 3) possiedano delle valve con una ricca ornamentazione, che include i caratteri diacritici che ne permettono il riconoscimento, le rende effettivamente reperti naturalistici ideali. Il protoplasma delle cellule e la sostanza organica in genere viene allontanata dal campione trattandolo con acidi forti (per es. acido solforico) o con perossido di idrogeno fortemente concentrato (130 volumi, circa il 35%) a caldo (Krammer & Lange-Bertalot, 1986; EN 13946). L'ossidazione della sostanza organica viene completata con ossidanti forti quali il nitrato di potassio (metodo degli acidi forti) o dicromato di potassio (metodo del perossido di idrogeno). Gli eventuali carbonati vengono rimossi con acido cloridrico. Questi reagenti vengono aggiunti a beute contenenti i campioni riscaldate su piastre da laboratorio sotto cappa (per effettuare questa preparazione è necessario indossare tutti i D.P.I. del caso, quali camice, grembiule e guanti antiacido, occhiali da laboratorio). La sostanza organica può anche essere ossidata semplicemente tramite combustione del campione in muffola o alla fiamma. La sospensione di valve di diatomee così ottenuta e opportunamente diluita viene applicata sui coprioggetti accuratamente ripuliti con acqua ossigenata. Dopo un'essiccazione graduale in ambiente protetto dalla polvere (è sufficiente il coperchio di una scatola), i coprioggetti con le valve di diatomee vengono fatti aderire a un vetrino portaoggetti grazie a una resina (di solito il già citato Naphrax®). Queste resine sono solubili in solventi, quali il toluene, che devono essere allontanati passando il vetrino sulla fiamma di una lampada ad alcool. La resina, privata del solvente, indurisce rapidamente e il vetrino e il coprioggetto aderiscono l'uno all'altro in maniera stabile e duratura. Anche il materiale fossile e subfossile può essere preparato con tecniche del tutto analoghe (per es. Battarbee et al., 2001). Nel caso di sedimenti di laghi carbonatici in cui gli elevati pH possono favorire la dissoluzione della silice rendendo molto delicate le valve, la preparazione può ridursi a semplici lavaggi in acqua distillata che viene rimossa tramite centrifugazione. Nel caso sia necessario ottenere abbondanze assolute occorre raccogliere un campione di diatomee quantitativo (N. di valve per cm<sup>2</sup> o per g di peso secco di sedimento), preparare un noto del campione originale e quindi aggiungere alla sospensione di valve un'aliquota di una sospensione a titolo noto di microsfele di divinilbenzene del diametro di circa 6 µm. Nel conteggio al microscopio ottico si contano microsfele e diatomee ottenendo infine un valore di abbondanza assoluta (Battarbee et al., 2001).

I preparati permanenti di diatomee si conservano facilmente per lunghi periodi senza particolari precauzioni. Inoltre, gli spazi necessari per l'alloggiamento e la con-

servazione di collezioni diatomologiche sono limitati. In casi molto specifici, per esempio per montare o smontare preparati per SEM con singole valve di diatomee rivela esser il tipo nuove specie (Russell, 1989), un ciglio di maiale viene usato da abili preparatori per isolare e trasferire singole valve con infinita pazienza. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, i preparati permanenti di diatomee contengono associazioni di diatomee e non individui appartenenti a un singolo taxon. Questo da una parte può comportare dei problemi di catalogazione, in quanto viene meno il tradizionale abbinamento museario una scheda / un taxon / un oggetto. Nel caso del Museo di Trento, questo problema è stato risolto sviluppando, per la catalogazione su supporto informatico, un'apposita scheda, denominata Sinecologica, nella quale, tramite singole schede taxon collegate, possono essere inseriti tutti i taxa presenti in un campione con le relative abbondanze. La scheda, oltre ai totali, alla verifica della nomenclatura tramite vocabolari controllati fornisce anche i valori dei più comuni indici di diversità e dominanza (Cantonati et al., 2004). Nella scheda sono riportati anche tutti i dati ambientali utili alla caratterizzazione morfologica, fisica e chimica dell'ambiente di provenienza del campione per rafforzare l'utilità di tali raccolte come archivi di situazioni di qualità ambientale. In una scheda oggetto collegata alla Sinecologica trovano spazio tutte le tradizionali informazioni relative al vetrino o campione considerato come "classico" reperto naturalistico museario (caratteristiche, stato di conservazione, collocazione ecc.). Questa scheda permette anche di conoscere se, oltre al preparato permanente di diatomee, sono stati conservati anche la sospensione di valve preparate (preziosa, per esempio, per studi di approfondimento al SEM) e un'aliquota del campione originale non preparato. Conservare tutti e tre i reperti è sicuramente una buona pratica in quanto, per esempio, per alcune ricerche ecologiche è necessario sapere quale era la frazione di valve corrispondenti a cellule effettivamente viventi al momento del campionamento. Un metodo per stabilirlo consiste nell'osservazione di materiale non preparato al microscopio invertito, previa sedimentazione in apposite camere e - nel caso di campioni di benthos - disaggregazione per sonicazione. Generalmente si considerano "vive" al momento del campionamento quelle diatomee che presentano strutture citoplasmatiche (in particolare i plastidi) con forma, colore e dimensioni normali (Cantonati et al., in stampa).

## I CASI "DIFFICILI": CAMPIONI FISSATI CON LUGOL

Se le collezioni di diatomee sono, tra i materiali algo-logici, sicuramente quelli più adatti per la conservazione in Museo, quelli più problematici sono i campioni fissati con Lugol. Il Lugol infatti dopo un certo periodo di tempo degrada (è anche fotosensibile e i campioni



Fig. 4. Algario dell'Ottocento. Esempi di exsiccata con tallo completo (filamenti dell'alga rossa *Bangia atropurpurea*), in un caso con disegni relativi all'aspetto microscopico, e con fanghiglia contenente diatomee (*Diatoma hyemalis*) seccata su vetro.

da conservare andrebbero quindi trasferiti in bottiglie con vetro scuro) e va rimpiazzato periodicamente. Il buon mantenimento di una collezione di fitoplancton implica, quindi, il regolare lavoro di un tecnico, che, a scadenze prefissate, verifichi lo stato di conservazione dei campioni procedendo, eventualmente, alla rigenerazione del liquido conservante. Questo problema, particolarmente evidente nel caso delle collezioni in Lugol, che degrada rapidamente, riguarda in realtà tutte le collezioni algologiche in liquido. Cruciale è anche identificare contenitori con dei tappi che siano veramente a tenuta sul lungo periodo. Un tempo, per ovviare a questo problema, i tappi venivano sigillati con paraffina, pratica che tuttavia rende laboriosa la consultazione dei campioni.

## I "CLASSICI": EXSICCATA DELL'OTTOCENTO

La Sezione di Limnologia e Algologia del Museo Tridentino di Scienze Naturali ha anche in custodia un algario storico di cui è stata effettuato un primo inventario. Si tratta di 1062 esemplari posizionati su cartoncini e raccolti da diversi studiosi in anni compresi tra il 1828 ed il 1887, da ambienti d'acqua dolce e soprattutto acqua salata. Alcuni esemplari riportano l'intestazione "Erbario Crittogamico Italiano" (fig. 4). È prevista per i

prossimi anni la graduale revisione tassonomica per gruppi (a iniziare dalle diatomee).

Nell'ambito delle microalghe è stato recentemente evidenziato come questo materiale essiccato sia ancora sorprendentemente osservabile al microscopio elettronico (Novarino & Couté, 2000), anche nel caso di specie prive di strutture rigide. Gianfranco Novarino e collaboratori (The Natural History Museum, London), esaminando al microscopio elettronico del materiale ritenuto il tipo di una specie di cianobatteri, hanno constatato che si trattava in realtà di una criptofita e questo materiale storico è inoltre da ritenersi il lectotipo di un genere ecologicamente importante e molto diffuso di questo gruppo di microalghe (Novarino & Oliva, 1998; Novarino, 2003).

Nel caso in cui gli antichi preparatori non abbiano aggiunto fissativi al materiale prima dell'essiccazione e i cartoncini di erbario non siano successivamente stati trattati, questi reperti si prestano anche per analisi decisamente moderne, come analisi di chimica bioorganica o di genetica molecolare. Nell'ambito dei campionamenti della Sezione di Limnologia e Algologia si cerca quindi di reintrodurre, quando la tipologia di materiale raccolto lo consente, anche questa tipologia di preparazione e conservazione.

## UN ESEMPIO EMBLEMATICO: LO STUDIO DEL DINOFLAGELLATO UN TEMPO RESPONSABILE DELL'ARROSSAMENTO DEL LAGO DI TOVEL NELL'AMBITO DEL PROGETTO SALTO

Il Lago di Tovel si trova nelle Dolomiti di Brenta, nel Trentino occidentale. Le condizioni fisico-chimico-biologiche e climatiche dell'ambiente di Tovel nelle estati precedenti il 1965 provocavano la fioritura di un dinoflagellato, denominato *Glenodinium sanguineum* dal Marchesoni nel 1941 (Marchesoni, 1941), che si distingue per la capacità di sintetizzare e accumulare un pigmento carotenoidale che colora intensamente tutta la cellula; quest'alga raggiungeva densità tali da colorare di un rosso intenso le acque del bacino minore di SO (Baia Rossa) dello specchio lacustre. Nell'estate 2001 ha avuto inizio al Lago di Tovel la fase operativa del progetto SALTO (Studio sul mancato Arrossamento del Lago di Tovel), finanziato tramite il Fondo per i Progetti di Ricerca della Provincia Autonoma di Trento. Si tratta di una ricerca scientifica sul Lago di Tovel per indagare e capire le cause dell'arrossamento e della sua scomparsa. Tale ricerca, che prevede numerose attività svolte dai ricercatori del Museo in collaborazione con diversi altri istituti di ricerca trentini (Istituto Agrario di S. Michele all'Adige-IASMA, Laboratorio di Chimica Bioorganica del Dipartimento di Fisica e Dip. di Ingegneria Civile e Ambientale dell'Università di Trento, Parco Naturale Adamello-Brenta), nazionali e stranieri,





Fig. 5. Museo del Plancton della Sezione di Idrobiologia dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi di Pallanza (Lago Maggiore): scaffale, campione sigillato con paraffina e scheda di catalogazione.



Fig. 6. Serie di campioni raccolti per lo studio del dinoflagellato di Tovel: campioni fissati con diversi liquidi conservanti e materiale fresco molto concretato (a destra).

era suddivisa in 6 sottoprogetti (work packages, o WPs). La Sezione di Limnologia e Algologia del Museo Tridentino di Scienze Naturali-MTSN ha coordinato due di questi filoni (WP2 - Paleolimnologia e WP6 - Ecofisiologia del dinoflagellato in situ in strutture sperimentali). Un problema chiave nell'ambito del progetto era fare chiarezza sull'identità biologica delle varie forme, considerate fasi fisiologiche o stadi del ciclo vitale di *Glenodinium sanguineum* Marchesoni (Baldi, 1941; Miola & Trevisan, 1982; Dodge et al., 1987). In particolare, da Baldi (1941) in poi, si riteneva che la forma verde e la forma rossa fossero stadi fisiologici di un'unica specie e che specifici fattori ambientali scatenanti (quali l'elevato irraggiamento e la carenza di nutrienti) potessero stimolare il passaggio da uno stadio all'altro tramite accumulo di carotenoidi nel citoplasma. Le ricerche degli anni Novanta faticavano a fare chiarezza su questo punto per la rarità della forma rossa. Nelle strutture sperimentali installate dal Museo nel lago dal 1997 al 2003 e trattate per lo più tramite l'ag-

giunta di fosforo inorganico si sviluppava immancabilmente una maggioranza nettissima di dinoflagellati della serie verde del Baldi. La difficoltà nel riscontrare forme rosse indusse persino il Coordinatore del Progetto (dott. Basilio Borghi, IASMA) a lanciare un appello alla comunità trentina per reperire esemplari di cartoline che, secondo alcuni testimoni, venivano ottenute, negli anni dell'arrossamento, immergendo dei cartoncini nell'acqua resa rossa dai dinoflagellati: si era, in definitiva, alla disperata ricerca di *exsiccata* relativi alla specie in questione, che, se ben conservati (buio, ecc.) avrebbero consentito osservazioni al microscopio ottico ed elettronico, analisi genetiche e (quantitativi consentendo) analisi bioorganiche sui carotenoidi. La prima possibilità di osservare dinoflagellati della serie rossa venne invece offerta dal rinvenimento di alcuni campioni originali del Baldi presso il Museo del Plancton della Sezione di Idrobiologia dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi di Pallanza (VB). Si trattava di campioni conservati in liquido (formalina), conser-

vatisi in buone condizioni per decenni grazie all'accortezza di sigillare i contenitori di vetro con paraffina. Solo nel maggio del 2003 ricercatori del Museo poterono evidenziare forme rosse in acqua libera a Tovel. Decisivo, nel consentire l'identificazione delle forme rosse e la successiva osservazione e documentazione fotografica di tutti gli stadi e le fasi del ciclo vitale, fu il poter disporre di un laboratorio attrezzato per la microscopia sulle rive del lago (Stazione Limnologia del Museo Tridentino di Scienze Naturali in convenzione con il Comune di Tuenno nel Parco Naturale Adamello-Brenta). Fu così infatti possibile, ripetutamente e in tutte le ore del giorno, osservare materiale fresco vivo a brevissimo tempo dalla raccolta. Successive importanti osservazioni (Moestrup et al., 2006), svolte su linee pure ottenute facendo schiudere (excistare) singole cisti isolate dal sedimento di Tovel, hanno mostrato che la forma verde e la forma rossa sono taxa distinti.

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

È importante acquisire consapevolezza dell'irreversibilità delle conseguenze della scelta effettuata al momento della preparazione del campione.

Questo porta, tra l'altro, a una rivalutazione delle semplici tecniche di essiccazione per la produzione di campioni che consentono una serie notevole di approcci. Quindi, per affrontare problemi complessi e per taxa di particolare interesse, una strategia laboriosa, ma potenzialmente vincente, potrebbe essere quella di fissare un gran numero di campioni con tecniche diverse. La lotta contro il tempo, contro il deterioramento dei materiali e soprattutto il confronto con futuri scenari plasmati da discipline scientifiche in rapida evoluzione che sviluppano continuamente nuove possibilità di studio - spesso caratterizzate da precise esigenze nei confronti dei materiali da studiare - è difficile e probabilmente impari, ma proprio per questo l'optare per una pluralità di soluzioni e il tenere adeguatamente conto anche di quelle che, sebbene apparentemente troppo semplici e inadeguate, lasciano aperte la maggior parte delle possibilità, può essere una strategia vincente.

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il dr Gianfranco Novarino (The Natural History Museum, London) per preziose informazioni relative a osservazioni di microscopia elettronica su materiale prelevato da exsiccata storici, i colleghi della Sezione di Idrobiologia dell'Istituto per lo Studio degli Ecosistemi di Pallanza di Verbania (Lago Maggiore) per aver favorito con ogni mezzo la consultazione di campioni del Museo del Plancton di quell'Istituto e il Servizio Ricerca Scientifica della Provincia Autonoma di Trento per il finanziamento del Progetto SALTO, che ha fornito spunti interessanti per la stesura del presente contributo.

## BIBLIOGRAFIA

- Baldi E., 1941. *Ricerche idrobiologiche sul Lago di Tovel. Memorie del Museo di Storia Naturale della Venezia Tridentina*, 6: 1-297.
- Battarbee R.W., Jones V.J., Flower R.J., Cameron N.G., Bennion H., Carvalho L., Juggins S., 2001. *Diatoms. In: Smol J.P., Birks H.J.B., Last W.M. (eds.), Tracking Environmental Change Using Lake Sediments*, 3, Terrestrial, Algal, and Siliceous Indicators. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 8: 155-202.
- Cantonati M., Bertuzzi E., Angeli N., Parola E., 2004. *Mouseia®*, a museum relational database application for the management of diatom collections. *Proceedings of the 17th International Diatom Symposium*. Ottawa, Canada, 25-31 Agosto 2002.
- Cantonati M., Silvia S., Angeli N., Guella G., Frassanito R., in stampa. *Environmental controls of epilithic diatom depth-distribution in an oligotrophic lake characterised by marked water-level fluctuations. European Journal of Phycology*.
- Dell'Uomo A., 1999. *Use of algae for monitoring rivers in Italy: current situation and perspectives. In: Prygiel J., Whittom B.A., Bukowska J. (eds.), Use of algae for monitoring rivers, Agence de l'Eau Artois-Picardie*, 3: 17-25.
- Dodge J.D., Mariani P., Paganelli A., Trevisan R., 1987. *Fine structure of the red-bloom dinoflagellate Glenodinium sanguineum, from Lake Tovel (N. Italy). Algological Studies*, 78(2): 125-138.
- EN 13946, 2003. *Water quality. Guidance standard for the routine sampling and pretreatment of benthic diatoms from rivers*, pp. 1-18.
- Hofmann G., 1994. *Aufwuchs-Diatomeen in Seen und ihre Eignung als Indikatoren der Trophie. Bibliotheca Diatomologica*, 30, J. Cramer, Berlin, Stuttgart, 241 pp.
- Krammer K., Lange-Bertalot H., 1986. *Süßwasserflora von Mitteleuropa. In: Ettl H., Gerloff J., Heynig H., Mollenhauer D. (eds.), Bacillariophyceae. Naviculaceae*, 2/1. G. Fischer, Stuttgart, New York, 876 pp.
- Marchesoni V., 1941. *Sulla posizione sistematica del Glenodinium sanguineum March. determinante l'arrossamento del Lago di Tovel. Studi Trentini di Scienze Naturali*, A. 22(1): 11-18.
- Miola A., Trevisan R., 1982. *Un contributo su ciclo biologico e contenuto in clorofilla di Glenodinium sanguineum March. del Lago di Tovel (Trento). Studi Trentini di Scienze Naturali, Acta Biologica*, 59: 23-29.
- Moestrup Ø., Hansen G., Daugbjerg N., Flaim G., D'Andrea M., 2006. *Studies on woloszynskioïd dinoflagellates II: On Tovellia sanguinea sp. nov., the dinoflagellate responsible for the reddening of Lake Tovel, N. Italy. European Journal of Phycology*, 41: 47-65.
- Novarino G., 2003. *A companion to the identification of cryptomonad flagellates (Cryptophyceae = Cryptomonadea). Hydrobiologia*, 502 (Developments in Hydrobiology, 172): 225-269.
- Novarino G., Oliva E., 1998. *Typification and ultrastructural characterization of long-described flagellate taxa based on original type material. Proceedings of The Flagellates Symposium, University of Birmingham, 7-11 Settembre 1998*.
- Novarino G., Couté A., 2000. *Typification and ultrastructural characterization of flagellate taxa from museum collections. I. Some Trachelomonas (Euglenophyta = Euglenozoa p.p.) from the Deflandre collections in Paris. Nova Hedwigia*, 70: 505-522.

- Rott E., Hofmann G., Pall K., Pfister P., Pipp E., 1997. *Projekt BMLF: Indikationslisten für Aufwuchsalgen in Fließgewässern Österreichs, Teil 1: Saprobielle Indikation* - WWK, Bundesministerium Land - und Forstwirtschaft, Wien, 73 pp.
- Rott E., Pfister P., Pipp E., Pall K., Binder N., Ortler K., 1999. *Projekt BMLF: Indikationslisten für Aufwuchsalgen in Fließgewässern Österreichs, Teil 2: Trophieindikation und autökologische Anmerkungen* - WWK, Bundesministerium Land - und Forstwirtschaft, Wien, 248 pp.
- Russell S., 1989. Glass slide preservation of SEM mounted diatoms. *Diatom Research*, 4(2): 401-402.
- Stein J.R., 1973. *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge at the University Press, 448 pp.
- Van Dam H., Mertens A., Janmaat L.M., 1993. *De invloed van atmosferische depositie op diatomeeën en chemische samenstelling van het water in sprengen, beken en bronnen (The impact of atmospheric deposition on diatoms and chemistry in running waters in The Netherlands)*. IBN-report 052. DLO Institute for Forestry and Nature Research, Wageningen, 124 pp.
- Wetzel R.G., Likens G.E., 1990. *Limnological analyses*. Springer New York, 391 pp.
- Siti web (accessed 30.10.08)**  
<http://botany.si.edu/projects/algae/collpres.htm>  
 National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, U.S. National Herbarium - The Algal Collection.