

ANDREA SQUARTINI, RENATA TREVISAN

# *Come un impatto antropico nascosto possa essere testimoniato dalla diversità batterica e algale in un sistema naturale: il lago alpino del Colbricon superiore*

## *1. Introduzione*

Il Lago Colbricon Superiore si trova all'interno del Parco Naturale di Paneveggio - Pale di S.Martino (Trentino), nel bacino idrografico del torrente Avisio, affluente del fiume Adige. Il bacino imbrifero è costituito soprattutto da rocce acide, "porfidi quarziferi" (STELLA, 1931; TOMASI, 1962; TOMASI, 2004; TREVISAN & ROSSO, 2001). I dati raccolti permettono di ipotizzare che la genesi delle conche che ospitano le acque dei due laghi non sia di origine glaciale (laghi di circo) come era stato indicato in Tomasi (1963) ed in seguito da altri autori, ma abbia una dominante influenza strutturale (TREVISAN 2018).

Il Lago Colbricon S., come tutti i laghi d'alta quota, è alimentato per lo più dalla fusione delle nevi e dalle precipitazioni (TONOLLI, 1969; BOGGERO *et al.* 1996).

Un rifugio, aperto nel periodo estivo, si trova sulle rive del Lago si trova, che offre servizio di ristorazione. Fino al 1998 gli scarichi della cucina venivano conferiti direttamente nel lago, mentre quelli del bagno venivano trattati con calce e successivamente seppelliti lungo le rive del lago stesso. Un precedente studio sui batteri presenti nelle acque dello stesso lago (VENDRAMIN *et al.*, 2001) aveva rivelato la presenza di una comunità i cui rappresentanti più abbondanti risultavano legati alla presenza umana. Per

diminuire l'impatto antropico e cercare di ripristinare la naturalità dell'ambiente, che pure non mostrava alterazioni macroscopiche, nel 1998 sono state apportate delle modifiche ai sistemi di scarico: una condotta porta i reflui della cucina e dei servizi igienici a valle dei due laghi, in accordo con la politica dell'intero Parco, che invita i visitatori a riportare i rifiuti a casa. Rispetto ai precedenti anni di campionamento, il rapporto IASMAA per il 1998 (CORRADINI & FLAIM 2000) rivela una situazione migliorata, caratterizzata da una trasparenza maggiore e da una diminuita quantità di clorofilla, nonché dalla presenza di comunità fito e zooplanctoniche più equilibrate e diversificate. Il luogo è tuttavia molto visitato: si stima che i visitatori siano in genere un centinaio al giorno durante il periodo di apertura del rifugio (da giugno a settembre), con occasionali punte fino ad 800 presenze quotidiane nei mesi di luglio e agosto come riferito dai gestori del rifugio. L'impatto che i turisti hanno sui due laghi è sia diretto, proveniente cioè dal loro contatto con le acque del lago o con le zone circostanti (il terreno torboso che circonda i laghi è infatti imbevuto d'acqua, almeno in qualche periodo dell'anno, e tali acque percolano nei due laghi, che si trovano in una conca), sia indiretto, dovuto alle necessità del rifugio. Una prima parte di questa ricerca è stata sintetizzata in una precedente pubblicazione (VENDRAMIN *et al.*, 2007)

I laghi alpini d'alta quota si rivelano sensibili agli effetti dell'inquinamento globale, in particolare delle piogge acide, e sono utili per monitorare il verificarsi di cambiamenti climatici anche ridotti (TREVISAN E ROSSO, 2001). Sono ecosistemi particolarmente fragili, sottoposti a condizioni estreme, ma situati in un parco protetto, particolarmente utili per lo studio di una situazione di naturalità suscettibile di alterazioni, ed al contempo per la valutazione ed il monitoraggio dei meccanismi meno evidenti attraverso i quali si concretizza l'impatto antropico.

Gli Obiettivi del presente lavoro sono stati i seguenti:

(a) Analizzare i principali parametri chimico-fisici e la comunità planctonica del lago del Colbricon Superiore utilizzando sia approcci limnologici, per la componente eucariotica e per le cianofee, che metodi molecolari per la componente procariotica, definendone struttura, esponenti tassonomici, e loro proporzioni. (b) Valutare se i lavori di adeguamento fognario del rifugio turistico prospiciente il Lago abbiano eliminato la dominanza di specie ad ecologia legata a impatto umano, riscontrate abbondanti in campionamenti effettuati in anni precedenti i lavori suddetti

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Analisi chimico-fisiche e limnologiche

Il lago Colbricon S. è stato monitorato mensilmente da giugno ad ottobre, nel periodo libero dai ghiacci, dal 1998 al 2007. In ogni campionamento sono stati misurati il pH, la temperatura dell'acqua, la conducibilità utilizzando strumentazione portatile e il livello idrico su un'asta appositamente posizionata. E' stata campionata la comunità fitoplanctonica con un retino a maglie di 25 µm e un campione integrato della zona eufotica (0-6 m) a centro lago. I campioni sono stati osservati al microscopio ottico a 400 ingrandimenti, a fresco e dopo essere

stati fissati con soluzione di Lugol (1 %), per l'identificazione e il conteggio per il calcolo di densità e biomassa (VOLLENWEIDER 1974).

La classificazione delle alghe si è basata sul testo di VAN DEN HOECK *et al.*, (1995). Per l'identificazione sono stati inoltre utilizzati in supporto i seguenti testi: BOURRELLY P.(1972, 1981, 1985), HUBER-PESTALOZZI G.(1941, 1955), HUBER PESTALOZZI & FOTT (1968), KOMAREK & FOTT (1983), KRAMMER & LANGE -BERTALOT (1986, 1991, 1998), ANAGNOSTIDIS & KOMAREK (1999).

All'inizio e alla fine della stagione sono stati raccolti campioni di acqua del lago per la determinazione di altri parametri chimici quali: cloruri, nitrati, solfati, bicarbonati, ammonio, calcio, magnesio, sodio, potassio, ferro, manganese, alluminio e silice, secondo metodi standard (APHA, AWWA, WPCF, 1995). Le analisi sono state eseguite presso l'Istituto Italiano di Idrobiologia di Pallanza (VB).

### 2.2 Analisi generale del batterioplankton

In data 22/10/2004 sono stati prelevati 2 l di acqua dal Lago presso la riva Nord-Est. I campioni, conservati in taniche di polietilene di capacità pari a 1 l, precedentemente lavate con EtOH assoluto, sono stati processati il giorno stesso, entro poche ore dal prelievo. Durante il trasporto le taniche sono state mantenute refrigerate. Per la conta totale in microscopia (AKKERMANS *et al.* 1995) 19 ml di campione sono stati fissati con l'aggiunta di 1 ml di formaldeide 37% e conservati a 4°C. Su questi campioni e su loro aliquote colorate con blu di metilene 1% è stata effettuata la conta in contrasto di fase mediante camera di conteggio (THOMA FEINOPTIK, BAD BLANKENBURG, GERMANIA). L'analisi della frazione coltivabile della comunità planctonica è stata effettuata piastando diluizioni seriali su terreno PCA (Plate Count Agar: triptone 5,0 g/l; estratto di lievito 2,5 g/l; glucosio 1,0 g/l; agar 15 g/l). Le piastre sono state incubate al buio, a temperatura ambiente, e le colonie cresciute sono state contate dopo 3 giorni.

### 2.3 Estrazione del DNA dai batteri presenti nelle acque

Per l'estrazione del DNA della comunità batterica totale, inclusiva sia della frazione coltivabile che di quella non coltivabile è stato sostanzialmente seguito il protocollo messo a punto da VENDRAMIN *et al.* (1998), basato sul metodo di ZHOU *et al.* (1996). Frazioni di 250 ml di acqua sono state filtrate su membrane 0,22  $\mu\text{m}$  utilizzando una pompa a vuoto. I 5 filtri ottenuti sono stati riposti in tubi falcon sterili da 50 ml e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'estrazione. I filtri sono stati reidratati mediante aggiunta di 1,8 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ sterile e agitazione manuale per alcuni secondi. Si è proceduto quindi con la lisi meccanica: 3 passaggi di rapido congelamento e scongelamento, immergendo il tubo falcon per 2' in  $\text{N}_2$  liquido e per 3' in un bagnetto termico riscaldato a  $65^{\circ}\text{C}$ ; seguito da vortex per 10". E' seguita una lisi chimica in due passaggi: aggiunta di 7,2 ml di tampone di lisi (NaCl 1,5 M; Tris/HCl 0,1 M pH=8,0;  $\text{H}_2\text{NaPO}_4/\text{HNa}_2\text{PO}_4$  0,1 M pH= 8,0; sodio EDTA 0,1 M pH=8,0; CTAB 1% in NaCl 0,7 M) e di proteinasi K (FERMENTAS, BURLINGTON, ONTARIO) ad una concentrazione finale di 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , con successiva incubazione a  $37^{\circ}\text{C}$  per 30'; aggiunta di SDS 2% e incubazione a  $65^{\circ}\text{C}$  per 1 h. La fase liquida è stata trattata con un ugual volume di cloroformio/alcol isoamilico 24:1 (ca. 10 ml); dopo mescolamento per inversione, si è centrifugato a 14600 g per 15'. La fase superiore è stata recuperata e sono stati aggiunti 0,6 volumi di isopropanolo (ca. 5 ml) e 100  $\mu\text{l}$  di una soluzione di blu destrano. Dopo 1 h di precipitazione a temperatura ambiente, l'estratto è stato centrifugato a 23700 g per 30'. Nel caso in cui non risultasse visibile alcun pellet, sono state ripetute 1-2 volte l'aggiunta di 100  $\mu\text{l}$  di soluzione di blu destrano e la successiva centrifugazione. Il pellet ottenuto è stato lavato 1-2 volte con 10 ml di EtOH 70% e centrifugazione a 23700 g per 10'. L'EtOH residuo è stato eliminato ponendo i tubi aperti a  $37^{\circ}\text{C}$  per 20-30'. Il pellet è stato infine risospeso in 500  $\mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ sterile. La sospen-

sione ottenuta è stata conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.4 Amplificazione dell' rDNA 16S

Gli estratti dai filtri sono stati centrifugati mediante evaporatore rotante e portati ad un volume compreso tra 1/10 e 1/5 del volume iniziale. L'amplificazione del DNA 16S è stata condotta mediante PCR in una soluzione contenente buffer 1X, dNTP 200  $\mu\text{M}$  ciascuno, primer U<sub>2</sub>/R<sub>1</sub>N 200 nM ciascuno, 1 U di Taq polimerasi (Amersham Biosciences) e 1  $\mu\text{l}$  delle diluizioni 1/10 o 1/100 dell'estratto concentrato, in un volume finale di reazione pari a 25  $\mu\text{l}$ . E' stato utilizzato il Thermal Cycler PE 480 (Perkin Elmer Inc. Wellesley MA) programmato secondo i cicli:  $94^{\circ}\text{C}/2'$ ; ( $94^{\circ}\text{C}/80''$ ,  $54^{\circ}\text{C}/60''$ ,  $72^{\circ}\text{C}/90''$ ) x35;  $72^{\circ}\text{C}/5'$ .

### 2.5 Costruzione di librerie geniche di DNA 16S dalle comunità totali planctoniche ed epilitiche.

La sospensione usata per il clonaggio del DNA 16S è stata ottenuta unendo gli amplificati delle repliche di estrazione, in quantità proporzionali ai segnali ottenuti in elettroforesi. In tutti i casi, 30  $\mu\text{l}$  di sospensione sono stati purificati tramite il QIAquick PCR Purification kit (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). Il clonaggio è stato effettuato in *Escherichia coli* XL-1Blue-MRF' usando come vettore il plasmide pGEM®-T (Promega Corp., Madison, WI). La ligazione è stata condotta overnight a  $10^{\circ}\text{C}$ . La trasformazione, eseguita mediante elettroporazione (2,5 KV, 200 Ohm, 25  $\mu\text{F}$ ), è stata effettuata in doppio, impiegando 80  $\mu\text{l}$  di cellule elettrocompetenti per ogni replica e rispettivamente 1,8 e 2,0  $\mu\text{l}$  di sospensione plasmidica., cui sono stati aggiunti 800  $\mu\text{l}$  di terreno SOC (triptone 2%; estratto di lievito 0,5%; NaCl 10 mM; KCl 2,5 mM;  $\text{MgCl}_2$  10 mM;  $\text{MgSO}_4$  10 mM; glucosio 20 mM). Aliquote di 100  $\mu\text{l}$  di sospensione batterica sono state piastrate in terreno LBA (Luria-Bertani: triptone 10,0 g/l; estratto di lievito 5,0 g/l; NaCl 5,0 g/l), cui erano

stati aggiunti X-Gal (40 µg/ml), IPTG (40 µg/ml) e Ampicillina (50 µg/ml). Le piastre sono state incubate overnight a 37°C. Per l'analisi della comunità batterica sono state prelevate e strisciate nel medesimo mezzo tutte le colonie bianche cresciute. Tutte le colonie strisciate sono state sottoposte a lisi (le colonie sono state prelevate e stemperate in 50 µl di soluzione NaOH 0,05 M, SDS 0,25%; seguivano vortex per 1', 94°C per 15', centrifugazione alla massima velocità (16100 rcf) per 10', diluizione 1:10 di 10 µl di surnatante). La diluizione 1:10 del lisato ha costituito lo stampo per l'amplificazione mediante PCR dell'inserto. La soluzione di reazione conteneva buffer 1X, dNTP 200 µM ciascuno, primer GEM-T1/GEM-T2 200 nM ciascuno, 1 U di Taq polimerasi (Amersham Biosciences), 2 µl di sospensione contenente il DNA stampo, in un volume finale di 50 µl. I primer GEM-T1 e GEM-T2 sono stati disegnati in modo da appaiarsi alle sequenze fiancheggianti l'inserto:

GEM-T1: 5'GCAGGCGGCCGCAC-TAGTGAT (21 bp)

GEM-T2: 5'CCGCCATGGCCGCGGGAT (18 bp.)

Gli inserti rappresentanti la comunità planctonica sono stati amplificati utilizzando il termociclatore Thermal Cycler PE 480, secondo il programma: 94°C/ 2'; (94°C/80"; 60°C/60"; 72°C/90") x35; 72°C/5'. Per gli inserti rappresentanti la comunità epilitica sono stati invece utilizzati un termociclatore iCycler 170-8740 (BioRad Laboratories Hercules CA) ed il programma: 94°C/ 2'; (94°C/80"; 60°C/30"; 72°C/60") x35; 72°C/5'. Ogni prodotto della reazione è stato analizzato mediante elettroforesi in gel d'agarosio 1,2% (filtri) TBE 0,5X e colorazione con etidio bromuro 0,3 µg/ml. La diluizione 1:10 del lisato e l'amplificato sono stati posti a -20°C.

## 2.6 Analisi dei cloni.

I cloni sono stati analizzati tramite tecnica ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), per la quale sono stati digeriti 5 µl di ogni amplificato utilizzando

10 U delle endonucleasi *HinfI*, *HhaI*, *HapII* (Amersham Biosciences) in un volume finale di reazione pari a 20 µl. L'incubazione è stata condotta per almeno 2 h a 37°C. L'analisi dei prodotti della digestione è stata eseguita mediante elettroforesi in gel d'agarosio 2% TBE 0,5X, condotta al voltaggio costante di 100 V, e colorazione con etidio bromuro 0,3 µg/ml. Le immagini dei gel sono state catturate e trasformate in formato digitale dal sistema EDAS 290 Image Capturing System (Kodak, Rochester, NY). I profili generati sono stati analizzati mediante il software GelComparII® (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), che ha permesso di raggruppare i cloni in base ai profili ottenuti da ognuno dei tre tagli enzimatici. In particolare, utilizzando l'indice di Dice sono state create 3 matrici di similarità, una per endonucleasi. La matrice usata per il raggruppamento finale è stata costruita calcolando la media delle 3 matrici.

## 2.7 Sequenziamento ed analisi bioinformatiche.

Il sequenziamento nucleotidico del gene 16S dei cloni ottenuti dalla comunità planctonica è stato condotto con il metodo dei didossinucleotidi fluorescenti in sequenziatore automatico ABI Prism (Applied Biosystems) utilizzando il primer GEM-T1. Le porzioni opportune dei cromatogrammi sono state sottoposte ad analisi BLAST on line utilizzando la piattaforma NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## 2.8 Analisi ecologica dei dati.

Per il calcolo degli indici ecologici di diversità ed equipartizione delle comunità, e per i confronti di similarità tra le stesse, è stato utilizzato il programma EcoStat versione 1.0.2 (Trinity Software/Loyola Marmount University). Per la stima del numero reale di specie della popolazione nell'ambiente considerato mediante analisi di rarefazione ed estimatori sia parametrici che non parametrici, è stato impiegato il programma

EstimateS versione 7.5.0, disponibile in rete telematica all'indirizzo <http://vicero.yeeb.uconn.edu/estimates>.

### 3. Risultati

#### 3.1 Parametri chimico-fisici

Sono inizialmente riportati (Fig. 1) i valori dei termoudogrammi sinottici di temperatura e piovosità che permettono di inquadrare climaticamente l'area di studio, appartenente alla fascia alpina montana. In Fig. 2 è riportato l'andamento annuo della temperatura di tutta la colonna dell'acqua e i periodi di congelamento, mentre nella Fig. 3 è esemplificata la differenza nella variazione

delle temperature in funzione di profondità e di epoca della misura. Si può notare come nel periodo di pre-congelamento in ottobre le temperature si uniformino lungo l'intera colonna. I risultati delle analisi chimico-fisiche dell'acqua del lago sono stati oggetto di precedente comunicazione (VENDRAMIN *et al.*, 2007).

I valori sono indicativi di uno stato oligomesotrofico. Per quanto riguarda i valori del livello idrico, possono così essere sintetizzati: il massimo riscontrato sull'asta fissa è stato di 112 cm nel 1999; anno in cui tutti i valori sono stati sopra i 100 cm; mentre il minimo, 92 è stato rilevato nel 2003 anno, particolarmente caldo, in cui tutti i valori sono risultati uguali o inferiori a 95.

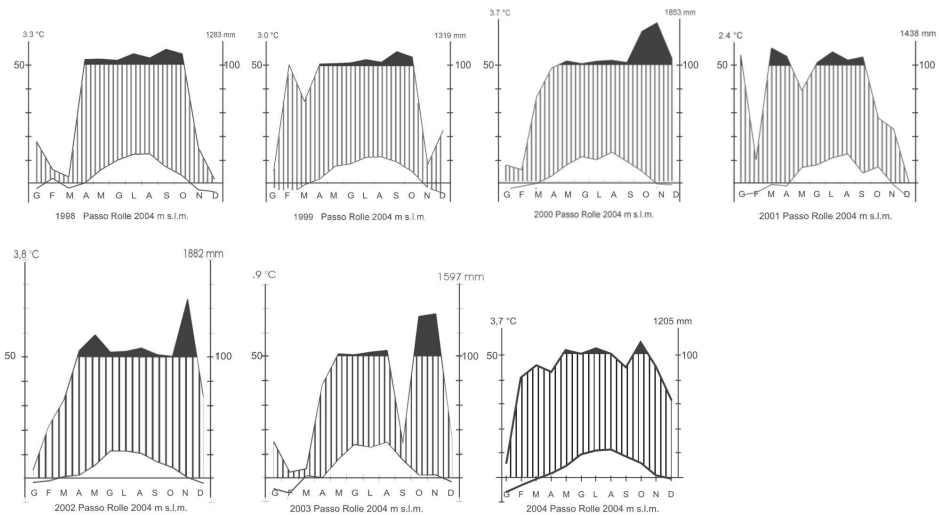


Fig.1 Diagrammi climatici (termoudogrammi) sec. Walter e Lieth (1960), per il periodo 1998-2004, rilevati presso la stazione meteorologica più prossima al Lago del Colbricon Superiore (Passo Rolle, 2004 m s.l.m.). Ordinata sinistra: temperatura media mensile (°C); valore di cima asse: temperatura media annua. Ordinata destra: precipitazione media mensile (mm); valore di cima asse: totale annuo precipitazioni. Area bianca: porzione sottesa dalla curva delle temperature; Le precipitazioni superiori a 100 mm mensili sono evidenziate dalle porzioni in nero, la cui scala è riprodotta con valore ridotto ad 1/10.

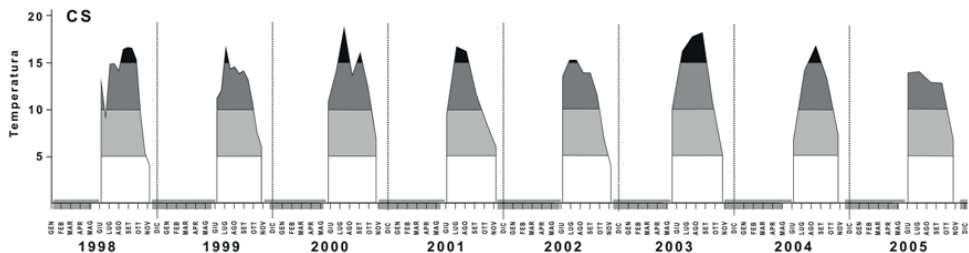


Fig. 2. Valori della temperatura di superficie dell'acqua del lago del Colbricon Superiore e decorso del congelamento nel periodo 1998-2005. Linea base ombreggiata doppia: strato di ghiaccio completo e portante, linea base singola ghiaccio fragile, sottile o parziale, di norma limitato alle coste.

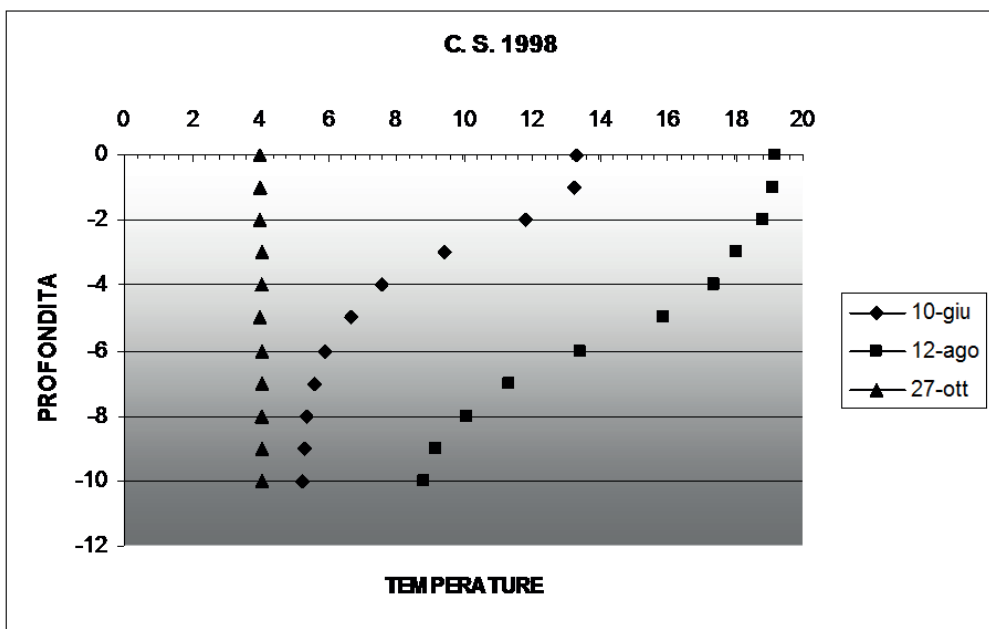


Fig. 3. Esempio di decorso termico sulla colonna d'acqua (anno 1998) in funzione della profondità nel periodo libero da ghiacci nel lago del Colbricon Superiore.

### 3.2 Analisi limnologiche

L'elenco floristico del lago per il fitoplankton, mediante determinazione in microscopia ha permesso di rilevare 142 taxa, di cui 17 *Cyanophyceae*, 23 *Chlorophyceae*; 22 *Zygnematophyceae*; 7 *Crysophyceae*; 3 *Cryptophyceae*; 6 *Dinophyceae*; 62 *Bacillariophyceae* e 2 *Euglenophyceae*. Per quanto riguarda la densità, il numero cellule per ml è stato osservato variare tra un minimo di 66 e un massimo di 2927. I taxa presenti

con maggior densità appartengono al gruppo delle *Diatomee*, seguono nell'ordine le *Dinophyceae* e le *Chlorophyceae*. Le specie dominanti, reperite dal 1998 al 2004 con densità (individui/litro) superiore al 5% del totale comprendono: *Bitrichia chiodati*, *Chroococcus sp.*, *Cosmarium sp.*, *Cocconeis sp.*, *Cyclotella spp.*, *Dinobryon sociale*, *Freagilaria capucina*, *Kephyrion sp.*, *Laghareimia sp.*, *Mallomonas sp.*, *Melosira sp.*, *oocystis sp.*, *Peridinium aciculiferum*, *Rhodomonas sp.*, *Scenedesmus bicaudatus*

*x linearis*, *Spondylosium planum*, *Tabellaria flocculosa*.

Per quanto riguarda in particolare il gruppo delle cyanophyceae, in genere nei laghi d'alta quota le queste sono presenti sporadicamente e la loro densità e biomassa sono scarse (TOLTOTTI *et al.*, 2006; MARCHETTO *et al.*, 2004). Quelle riscontrate nel lago in esame dal 1998 al 2004 si possono raggruppare in 12 generi e appartengono ai seguenti taxa: *Anabaena sp.*; *Anabaena constricta* (Szafer) Gentler; *Aphanocapsa sp.*; *Aphanothece spp.*; *Chroococcus sp.*; *Chroococcus dispersus* G.M. Smith; *Chroococcus minutus* (Kütz.) Nägeli; *Chroococcus turgidus* (Kuetz) Naegeli; *Cyanoteche sp.*; *Gloeocapsa sp.*; *Microcystis sp.*; *Oscillatoria sp.*; *Planktothrix sp.*; *Planktothrix planctonica* Elenk.; *Pseudoanabaena sp.*; *Spirulina sp.*; *Spirulina abbreviata* Lemmerman; *Thyconema tenue* (Skuia) An & Komarek. Tra queste sono presenti prevalentemente la forma coccale con *Chroococcus sp.* e la forma filamentosa con *Anabaena sp.*, gli altri taxa sono da considerarsi sporadici o rari.

Già molti studi eseguiti su laghi d'alta quota hanno evidenziato il delicato equilibrio delle *cyanophyceae*; la localizzazione geografica e la composizione geo-litologica del bacino imbrifero influenzano direttamente i piccoli, semplici ed estremamente labili ecosistemi in grado di ospitarne e sono al tempo stesso sensibili indicatori del cambiamento del clima e delle deposizioni acide (KOINIG *et al.*, 1998; MOSELLO *et al.*, 1999; SOMMARUGA-WOGRATH *et al.*, 2000; MARCHETTO *et al.*, 2004).

### 3.3 Studio della popolazione batterica totale

#### 3.3.1 Costruzione di una libreria genica di DNA 16S.

Le cellule presenti e raccolte per filtrazione sono state lisate e dal loro DNA genomico si è ottenuto mediante PCR il pool di amplificati dei geni per l'rRNA ribosomiale 16S, utile alla identificazione tassonomi-

ca. Ciascuna copia è stata separata dalle altre clonando gli ampliconi in plasmidi e inserendoli in *Escherichia coli* per elettroporazione. Dalla trasformazione sono state ottenute 396 colonie ampicillino-resistenti, di cui 355 risultavano bianche, cioè  $\beta$ -galattosidasi-negative, quindi indicative della presenza di inserto di DNA ricombinante, mentre 41 erano blu, per una resa di clonaggio pari al 90%.

#### 3.3.2 Analisi dei cloni.

L'isolamento degli inserti è stato ottenuto amplificandoli selettivamente mediante PCR, a partire dal lisato di 355 cloni da colonie bianche. L'analisi in elettroforesi ha permesso di valutare la riuscita dell'amplificazione e di stimare la quantità di amplificato a disposizione per le successive digestioni, nonché di individuare e quindi escludere gli amplificati di dimensioni inferiori all'atteso o caratterizzati da una doppia banda. L'analisi ARDRA è proseguita su 226 sequenze, conformi ai requisiti, che sono state digerite con gli enzimi *HinfI*, *HhaI*, *HapII*. Una prima analisi, effettuata sommando le bande di ogni profilo ottenuto dal taglio con *HinfI*, è servita a valutare la completezza della digestione e l'eventuale perdita di un numero eccessivo di frammenti più corti di 80-100 bp, e quindi di informazione. Per 6 campioni il risultato della somma era superiore all'atteso, anche dopo aver ripetuto la digestione utilizzando una quantità maggiore di enzima (15 U, cioè il 50% in più), probabilmente a causa della presenza di più di una sequenza nell'amplificato. Tali cloni sono stati scartati dall'analisi, che è quindi proceduta su 220 amplificati.

I tre enzimi riconoscono sequenze di 4 basi. Il programma *GelComparII* si è rivelato utile per l'analisi di allineamento dei numerosi profili di restrizione ottenuti, in quanto ha consentito di trattarli in maniera uniforme ed ha reso più veloce il raggruppamento. In Fig.4 è visibile il risultato della clusterizzazione che ha permesso di scegliere i campioni per il sequenziamento.

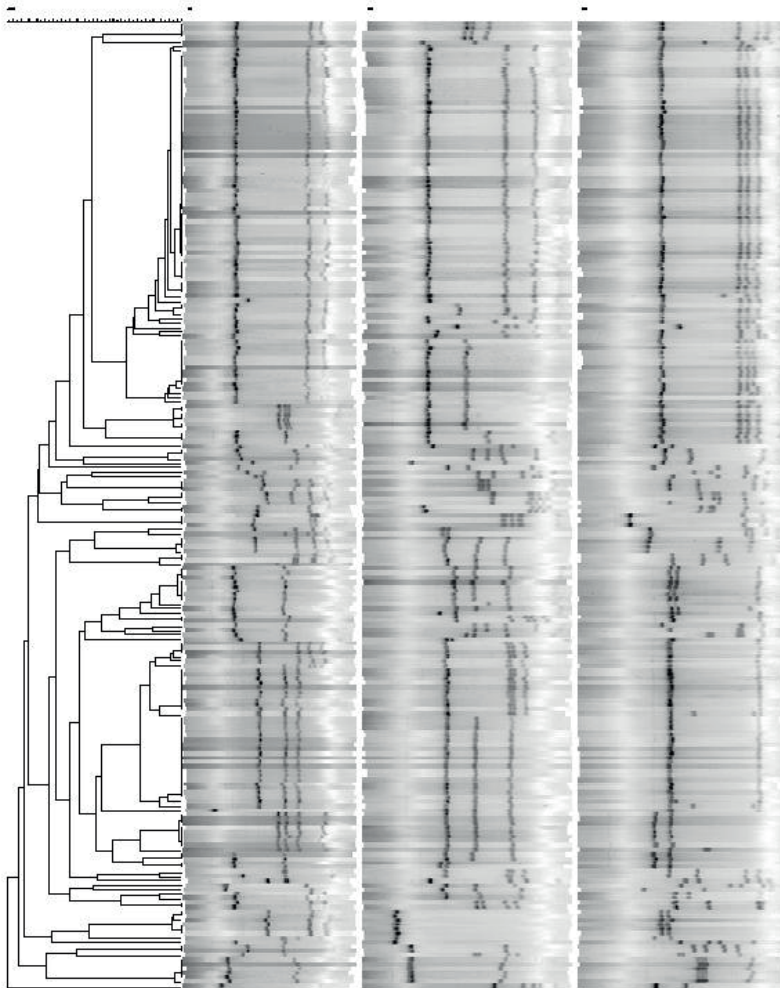


Fig. 4. Analisi elettroforetica dei DNA digeriti con i tre enzimi di restrizione e clusterizzazione GelComparII dei profili di 220 cloni della banca di sequenze batteriche di rDNA 16S ottenuta dalle acque del lago

### 3.3.3. Sequenziamento e classificazione per via bioinformatica

Il sequenziamento ha fornito 78 unità tassonomiche operazionali, in termini pratici coincidenti con il concetto di specie. La numerosità di ciascuna è stata precedentemente riportata (VENDRAMIN *et al.*, 2007). Le sequenze ottenute sono state confrontate

con quelle presenti nella banca dati telematica GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/amite>) il programma BLAST. Le identità riscontrate sono state precedentemente descritte (VENDRAMIN *et al.*, 2007). La maggioranza dei batteri presenti appar-



tiene ai gruppi degli attinomiceti e dei beta-proteobatteri, indicando una spiccata natura eterotrofica della popolazione. La maggioranza delle sequenze è risultata omologa a sequenze di banca dati appartenenti a batteri riferiti come non coltivati dagli autori che ne hanno depositato il dato. Il fatto è coerente con il generale fenomeno di preponderanza di organismi a strategia quiescente e non coltivabili nella gran parte degli ambienti naturali.

### 3.3.4 *analisi ecologica dei dati e validazione del campionamento*

Il prospetto ecologico dei dati, come desunto dai suddetti indicatori di ricchezza di specie e di livello di esaustività delle stime è stato descritto precedentemente (VENDRAMIN *et al.*, 2007) Una verifica della completezza dell'analisi effettuata può essere infatti condotta avvalendosi di procedure di stima della esaustività del campionamento (coverage). Tali metodi considerano la quantità di specie (filotipi, equivalenti alle OTU) riscontrati una sola volta (singletons), due volte (doubletons) o quella dei casi reperiti meno di dieci volte, rispetto al totale degli individui campionati. Alla base di tali stime vi è la constatazione che in una comunità non estensivamente campionata abbondano i gruppi rappresentati da un singolo individuo, che in generale si ridurranno rispetto al totale con il procedere del campionamento. I dati ottenuti per la comunità planctonica forniscono un valore di 0,79 se si utilizza l'estimatore di copertura di Good (GOOD, 1953), numero che si riduce a 0,66 se si applica una correzione per la rarità e si calcola quindi la copertura di ACE (ABUNDANCE COVERAGE ESTIMATOR, CHAO *et al.*, 1993). I valori indicano quindi che la nostra analisi di 220 cloni dovrebbe essere stata sufficiente a rivelare almeno i 2/3 della biodiversità totale della popolazione dell'habitat in esame. Oltre alle stime di copertura sono inoltre possibili estrapolazioni del numero presunto di specie a partire dal numero riscontrato e dalle ripartizioni suddette. Gli indici in uso, Chao1 e ACE, applicabili mediante il programma EstimateS portano

rispettivamente a valori di 147,03 e 141,58. I due risultati sono piuttosto concordi, a testimonianza di una buona attendibilità, e in definitiva indicano che la comunità planctonica del lago del Colbricon superiore all'epoca del campionamento ammonterebbe a valori intorno alle 140 specie, 78 delle quali rivelate dalla presente analisi.

## 4. *Discussione*

La preponderanza, tra le specie risultanti dal sequenziamento, di batteri non coltivati può essere assunta come segno di naturalità del sistema, in contrasto con ambienti antropizzati, in cui lo stress fornito alla comunità (sotto forma ad esempio di input di materia organica o di altre sostanze) determinerebbe il prevalere di specie opportuniste, e delle quali sono note forme coltivabili. L'analisi sul prelievo effettuato nel 1997, sempre in epoca autunnale di fine stagione prima del congelamento, aveva evidenziato la presenza di una comunità diversificata, tra i cui rappresentanti più numerosi vi erano anche specie legate alla presenza umana. Per quanto riguarda il confronto della comunità presente nel prelievo 2004 con quella corrispondente su prelievo del 1997. Dal punto di vista della sovrapposizione le due comunità risultano totalmente diverse. Nessuna specie, per quanto giudicabile dai triplici profili ARDRA, è risultata comune alle due analisi. Il taxon maggiormente rappresentato nel sequenziamento dalle acque campionate nel 1997 era data da *Rhodospirillum photometricum* (33,8%), seguita in ordine di abbondanza da *Stenotrophomonas maltophilia* (14,7%) e *Ochrobactrum sp.*(10,3%). Queste ultime due sono note come specie opportuniste di origine antropica e dalle deboli attitudini patogeniche. La loro scomparsa, nonostante rappresentassero congiuntamente oltre un quarto delle cellule dei batteri del lago, testimonia come i lavori eseguiti nel 1998 per allontanare i rifiuti fognari e gli scarichi della cucina deviandoli oltre il lago, abbiano avuto efficacia. Le acque campionate nel 2004, a sei anni dall'intervento di bonifica idraulica,

non contengono invece più traccia di specie legate a deiezioni umane, e presentano una prevalenza di rappresentanti di bacini idrici. In particolare, dominano i microrganismi d'acqua dolce, e specialmente quelli rinvenuti a latitudini o altitudini elevate, concordando in tal senso con il parallelismo latitudine-altitudine, valido per i laghi del Colbricon che si trovano a quasi 2000 metri di quota. Ma una ulteriore interessante e nuova informazione è la presenza di una proporzione rilevante (16 taxa su 78, e con un'abbondanza pari a un quinto delle cellule totali) di casi con sequenze omologhe a quelle di specie rinvenute da altri autori in ambienti contaminati da sostanze chimiche, per lo più petrolio ed idrocarburi, fatto che costituisce un'anomalia per un lago d'alta montagna, posto in un'area naturale a legislazione protetta, accessibile solo per sentieri a piedi, in un bacino di raccolta che vede a monte soltanto le impervie catene del complesso del Lagorai, e naturalmente nessun insediamento industriale, né antropico di sorta al di fuori del semplice rifugio, alimentato energeticamente a pannelli solari. Le nostre ricognizioni in loco per indagare sui motivi di tale presenza di microrganismi oleo-degradatori hanno permesso di constatare che il rifugio dispone, quale supporto al sistema di fotoconversione dell'energia, anche di un piccolo generatore con motore a gasolio, che viene acceso nelle prime ore della giornata, per permettere di avviare le macchine di bar e cucina (forni e macchine per caffè) prima che la disponibilità luminosa raggiunga valori sufficienti a procedere in autonomia. Il comignolo del generatore, è posto ad alcuni metri di altezza sopra le acque, ma abbiamo potuto personalmente constatare come i fumi, in caso di brezza da nord-nord-est vengono direttamente sospinti sulla superficie del lago, e il terreno sopra la cisterna del generatore da cui sbocca il comignolo presenta, oltre all'assenza di vegetazione, un annerimento ed un odore indicativi dei residui di combustione. Sebbene il lago si presenti assolutamente pulito e privo di evidenti tracce di oli pesanti, e sebbene un'analisi gascromatografica per idrocarburi nelle acque abbia dato esito ne-

gativo (dati non mostrati), è utile considerare che tale metodica ha come limite di sensibilità le 10 ppm. Ciò permette di speculare che se in un lago dal volume di 162900 m<sup>3</sup>, come è il Colbricon superiore (TREVISAN E ROSSO, 1999), una perdita fino a 1630 litri di gasolio (10 ppm) potrebbe teoricamente passare inosservata anche ad un'analisi al gascromatografo, e richiederebbe applicazioni di almeno tre ordini di grandezza più sensibili quali la spettrometria di massa. Poiché nel caso in esame è ipotizzabile che l'entità dell'influsso sia anche di molto minore delle 10 ppm, e possa essere dovuta alla semplice convezione di fumi, oltre a possibili microperdite da cisterna e taniche, il caso rivela come l'analisi microbiologica abbia potuto fungere da spia sensibile del fenomeno, più accuratamente delle tecniche analitiche alla portata del laboratorio medio.

Considerando quindi la storia degli interventi sul Lago e il loro esito, se da un lato è stato quindi possibile verificare come l'avvenuta deviazione degli scarichi abbia positivamente influito sulla scomparsa delle specie antropogene, dall'altro i lavori contestuali all'operazione e l'introduzione del generatore hanno aperto un altro potenziale problema ambientale che ha avuto il proprio impatto nella composizione della comunità microbica. In entrambi i casi quest'ultima ha permesso l'indicazione puntuale e precoce dei fenomeni in corso e prospettato i possibili interventi di adeguamento. Nel caso del secondo fenomeno è inoltre importante sottolineare come la natura della popolazione microbica, adeguatasi ai nuovi input organici, oltre a fungere da indicatrice del fenomeno di perturbazione assolve al contempo anche il compito di contribuire già alla risoluzione del problema stesso, dato che i nuovi microrganismi rilevati sono per l'appunto attivi degradatori di oli pesanti e idrocarburi.

E' da rilevare inoltre come i dominanti della comunità siano attinomiceti, i quali anche se non citati specificamente in letteratura su acquiferi inquinati da petroli, sono una ben nota componente di degradatori di sostanza organica di natura complessa e ben

si associano ad un quadro come quello descritto, al quale si aggiungono anche altri 8 taxa a sequenza omologa a batteri associati a situazioni di abbondanza di sostanza organica. In generale, confrontando la comunità del 1997 con quella del 2004 si può descrivere un netto shift da comunità dominata da produttori autotrofi a fotosintesi anossigenica e solfuro-ossidanti (*R. photometricum*) ad una di degradatori eterotrofi riferibili ad un quadro di transizione verso una possibile relativa eutrofia. In questo senso è possibile inoltre aggiungere che le cellule totali e quelle coltivabili del prelievo 1997 ammontavano rispettivamente a  $1,5 \times 10^5$  /ml e  $0,7 \times 10^2$  /ml, mentre nel corrispondente prelievo del 2004 facevano rilevare valori  $8,3 \times 10^7$ /ml e  $1,3 \times 10^3$  /ml, delineando un aumento della biomassa ed un calo della sua coltivabilità.

Come già ricordato nessun taxon è stato rilevato comune alle due comunità, indicando una netta successione compositiva. Questa non sembrerebbe legata a fattori ciclici di avvicendamento destinati a ripristinarsi, poiché entrambi i prelievi sono relativi allo stesso momento climatico (fine ottobre) che rappresenta la fine della stagione di crescita e precede di poco il congelamento del lago. Una sostituzione delle comunità, anche in seguito a piccoli influssi di cambiamento è piuttosto attendibile in un lago piccolo e facilmente perturbabile, quando sia intercorsa una così grande distanza di tempo. È importante anche ricordare che in tale epoca, come consistentemente riscontrato da tutte le edizioni dei rapporti IASMAA, si ha il vantaggio di una totale omeotermia del lago del Colbricon, attraverso tutte le profondità, senza le stratificazioni epi-ipolimniche del periodo estivo, che per quanto moderate, danno luogo a salti di ossigenazione, pH e temperatura. In questo caso si può considerare che prelevando a fine stagione la comunità di superficie sia meglio rappresentativa della situazione generale del lago di quanto non risulterebbe effettuando prelievi estivi.

## 5. Conclusioni

In base ai risultati di tutte le diverse analisi effettuate è possibile trarre le seguenti considerazioni conclusive: Per quanto riguarda analisi chimico-fisiche e limnologiche, la variabilità interannuale della composizione specifica è consistente, i parametri meteoroclimatici spiegano una buona parte di questa variabilità. È difficile individuare, a livello di proprietà generali del fitoplancton eucariotico e delle cianofitiche, relazioni chiare. Alcune indicazioni possono venire dall'esame delle relazioni osservate a livello di specie. Ancora una volta emerge, quindi, la necessità di acquisire informazioni approfondite sull'ecologia di singoli taxa. In merito alle analisi batteriologiche è possibile concludere che: la comunità planctonica a fine stagione vegetativa del lago del Colbricon Superiore risultava nell'anno 2004 dominata da actinomiceti e da beta proteobatteri eterotrofi, per una ricchezza di specie stimata intorno alle 140. I lavori di adeguamento fognario del rifugio turistico hanno eliminato la dominanza delle specie di influsso antropico presenti nel 1997 prima delle opere, ma oggi sostituite da una insolita ricchezza di specie oleovore, imputabili alla concomitante installazione di un generatore ausiliario alimentato a gasolio. Nonostante l'aspetto sano e naturale che il lago continua a presentare e nonostante l'analisi del fitoplankton eucariote e quelle chimiche non denotassero variazioni, l'analisi microbiologica ha permesso quindi di rilevare i processi in corso quali l'eccessivo contatto antropico ed i residui di combustione.

## 6. Ringraziamenti

Si ringraziano Elena Vendramin e Clelia Donà per la collaborazione nelle analisi microbiologiche, Gabriele Tartari e Rosario Mosello dell'Istituto di Idrobiologia di Pallanza (VB) per l'analisi delle acque e Giuseppe Morabito per la collaborazione nell'interpretazione dei dati limnologici. Si ringrazia sentitamente l'Ente Parco Naturale Paneveggio-Pale di S.Martino per aver

ospitato la ricerca e fornito assistenza logistica per i campionamenti. Gli autori sono inoltre grati ai gestori del Rifugio dei Laghi del Colbricon per le informazioni cortesemente fornite. Al Dr. Ettore Sartori, all'epoca Direttore del Parco, vanno in particolare i ringraziamenti degli autori per aver stimolato e reso possibile la realizzazione di questi studi.

## BIBLIOGRAFIA

- ADDISCOFF TM, 2010 - *ENTROPY, NON-LINEARITY AND HIERARAKKERMANS A.D.L., VAN ELSAS J.D. & DE BRUIJN F.J., 1995 - Molecular Microbial Ecology Manual*. Kluwer Academic Publisher, 488 pp.
- ANAGNOSTIDIS K. & KOMAREK J., 1988 - *Modern approach to the classification system of Cyanophytes*. 3-Oscillatoriales. Arch. Hydrobiol. Suppl. 80: 327-472.
- A.P.H.A., A.W.W.A., W.P.C.F., 1995 - *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Am. Publ. Health ass., Washington, 1268 pp.
- BARBANTI L., DE BERNARDI R., GIUSSANI G. & GIULIZZONI P., 1993 - *Laghi*. In: Marchetti R. (ed), *Ecologia applicata*, Parte I, Città Studi, Milano, pp. 70-87.
- BOGGERO A., MARCHETTO A., BARBIERI A., SASSI A., CONEDERA M., TARTARI G.A. & MOSELLO R., 1996 - *Idrochimica dei laghi alpini del Canton Ticino (Alpi Centrali) in relazione con la chimica delle precipitazioni*. Documenta Ist. Ital. Idrobiol. 57: 1-57.
- BOURELLY P., 1972; 1981; 1985 - *Les Algues d'eau douce*. 3 voll. N. Boubée & Cie, Paris.
- CHAO A., MA M.-C., YANG M. C. K., 1993 - *Stopping rules and estimation for recapture debugging with unequal failure rates*. Biometrika 80:193-201.
- GOOD I.L., 1953 - *The population frequencies of species and the estimation of population parameters*. Biometrika 40:237-26.
- HUBER-PESTALOZZI G., 1941-1961 - *Das Phytoplankton des Süßwassers, Teil 2-5, Die Binnengewässer 16*. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- HUBER-PESTALOZZI G. & FOTT B., 1968 - *Cryptophyceae, Chloromonadophyceae, Dinophyceae*. In *Huber-Pestalozzi G. Das Phytoplankton des Süßwassers*. Systematik und Biologie. 3. Teil. (Die Binnengewässer, Band XVI). E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
- CORRADINI F. & FLAIM G. 2000 - *Caratteristiche limnologiche dei laghi del Trentino - Rapporto 1998*. Istituto Agrario di S. Michele all'Adige. pp 94
- KOMAREK J. & FOTT B., 1983 - *Chlorophyceae (grunalgen) Ordnung: Chlorococcales*. Das Phytoplankton des Süßwassers. Die Binnengewässer. XVI, 7(1). E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart: 1044 pp.
- KRAMMER K. & LANGE-BERTALOT H., 1986-1991-1998 - *Bacillariophyceae*. In: A. Pascher (ed.) *Süßwasserflora von Mitteleuropa*. Gustav Fischer Verlag: Teil 1 Naviculaceae, 876 pp.; teil 2 Bacillariaceae, Epithemiaceae, Surirellaceae, 596 pp.; Teil 3 Centrales, Fragilariaceae, Eunotiaceae, 576 pp.; Teil 4 Achnanthaceae, Ergänzungen zu Navicula (Lineolate) und Gomphonema, 436 pp.
- KOINIG K.A., SCHMIDT R., SOMMARUGA-WOGRATH S., TESSADRI R. & PSENNER R., 1998 - *Climate change as the primary cause for pH shifts in a high alpine lake*. Water Air Soil Pollut., 104: 167-180.
- MARCHETTO A., MOSELLO R., ROGORA M., MANCA M., BOGGERO A., MORABITO G., MUSAZZI S., TARTARI G., NOCENTINI A.M., PUGNETTI A., BETTINETTI R., PANZANI P., ARMIRAGLIO M., CAMMARANO P., LAMI A. 2004 - *The chemical and biological response of two remote mountain lakes in the Southern Central Alps (Italy) to twenty years of changing physical and chemical climate*. J. Limnol., 63: 77-89.
- MOSELLO R., BOGGERO A., MARCHETTO A., TARTARI G.A. & ROGORA M., 1999 - *Evoluzione pluriennale dell'idrochimica di due laghi alpini (laghi Paione, Val D'Ossola) in relazione agli apporti atmosferici*. Atti AIOL, 13, pp.189-201.
- SOMMARUGA-WOGRATH S., PSENNER R. & SOMMARUGA R., 2000 - *DOC and chlorophyll-a concentrations in high-mountain lakes of the Austrian Alps: potential effects of climatic warming*. Verh. Internat. Verein. Limnol., 27: 506.
- STELLA E., 1931 - *Intorno ad alcuni laghi alpini del Trentino, dell'Ampezzano e dell'Alto Adige*. Mem. Museo storia Naturale Venezia Tridentino, 1: 45-66.
- TOLOTTI M., CALLIARI D. & CORRADINI F., 2006 - *Variabilità interannuale del fitoplancton del Lago di Tovel (Trentino, Italia)*. In: Studio sul mancato arrossamento del Lago di Tovel (A cura di B. Borghi et al.) Trento, Museo Tridentino di Scienze Naturali. Studi Trent. Sci. Nat., Acta. Biol: 81 (2004) Suppl. 2: 327-340.
- TONOLLI V., 1969 - *Introduzione allo studio della limnologia*. (Ecologia e biologia delle acque dolci). Edizioni dell'Istituto Italiano di Idrobiologia, Verbania Pallanza: 389 pp.
- TOMASI G., 1962 - *Origine, distribuzione, catasto e bibliografia dei laghi del Trentino*. Studi Trent. Sci. Nat., 39 (1-2), pp. 251-252.
- TOMASI G., 2004 - *I trecento laghi del Trentino*. Artimedia-Temi Editrice, pp. 536.
- TREVISAN R., 2018 - *Uno studio integrato dei Laghi di Colbricone Cavallazza*. Parco Naturale Pale di San Martino Paneveggio. Collana Quaderni del Parco, n. 15 (2018).
- TREVISAN R. & ROSSO A., 2001 - *I laghi di Colbricon (Trentino orientale): principali caratteristiche morfometriche e limnologiche*. Studi Trentini di Scienze Naturali - Acta Biologica, 76 (1999), pp. 87-104.
- VAN DEN HOECK C., MANN D.G. & JAHNA H.M., 1995 - *Algae*. An introduction to Phycology. Cambridge University Press.

New York: 637 pp.

VENDRAMIN E., CORICH V., TREVISAN R. & SQUARTINI A., 1998 - *Comparison between culturable and non culturable bacterial communities in an alpine lake ecosystem*. Eighth International Symposium on Microbial Ecology (ISME-8), Halifax, Canada 9-14 August, Abst. Vol. p 337.

VENDRAMIN E., CAGNAZZO A. & SQUARTINI A., 2001 - *Microbiodiversità dei laghi del Colbricon (Trentino, Italy): un approccio di tassonomia molecolare*. Studi Trent. Sci. Nat., Acta Biol., 78:117-127.

VENDRAMIN E., DONA' C., TREVISAN R., SQUARTINI A. - *Diversità microbica e algale in funzione dell'impatto antropico in un sistema naturale: il lago del Colbricon Superiore*. Studi trentini di Scienze Naturali. Acta Biologica 80. 200.

VOLLENWEIDER R.A., 1974 - *A Manual on Methods for Measuring Primary Production in Aquatic Environments*. 2nd edition, IBP Handbook No 12, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 225.

WALTER H. & LIETH H., 1960 - *Klimadiagramm, Weltatlas*. Fischer Verlag, Jena. 472 pp.

ZHOU J., BRUNS M. A. & TIEDJE J. M., 1996 - *DNA recovery from soils of diverse composition*. Appl. Environ. Microbiol. 62:316-322.

### Andrea Squartini

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti,  
Risorse Naturali e Ambiente DAFNAE  
Università di Padova,  
Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro Padova  
E-mail: squart@unipd.it

### Renata Trevisan

Dipartimento di Biologia - DiBio,  
via U. Bassi 58/b, 35121 Padova  
E-mail: renata.trevisan@unipd.it

**PAROLE CHIAVE:** *Laghi Colbricon, Parco Paneveggio Microbiodiversità, Impatto antropico.*

### RIASSUNTO

Un'analisi delle comunità microbiche procariotiche ed eucariotiche del lago del Colbricon Superiore è stata effettuata al fine di verificare la conformità ecologica del biotopo, presunta alta in quanto situato a quota 1922 m

s.l.m., nel Parco Naturale Paneveggio-Pale di S. Martino. Si tratta di un ambiente ad alto indice di naturalità ma caratterizzato anche dalla presenza di un rifugio frequentemente visitato nella stagione estiva. L'analisi è stata condotta per un arco temporale di oltre dieci anni con un duplice approccio parallelo. Da un lato di natura limnologica, mediante la determinazione in microscopia per fitoplankton e cianofitee, affiancato da uno studio biomolecolare per lo studio di comunità batteriche totali con attribuzione sistematica mediante allineamento bioinformatico delle sequenze di DNA in banca dati pubblica GenBank. Sono stati rilevati 125 taxa di fitoplankton eucariote e 17 cianofitee. Il campionamento batterico nell'autunno 2004 ha rilevato 78 taxa procariotici. La struttura della comunità batterica è stata confrontata con quanto era stato nello stesso sito riscontrato, con gli stessi metodi, in epoca precedente a opere di adeguamento fognario degli scarichi di bagno e cucina del rifugio. Il confronto ha permesso di verificare la sostituzione delle specie dominanti, precedentemente rappresentate da microrganismi a debole carattere patogenico e spia di un impatto antropico, con specie di diversa attitudine ecologica, indicative di un aumento di trofia e della presenza di residui di idrocarburi, la cui origine potrebbe essere messa in relazione con la installazione di un generatore ausiliario a gasolio presso il rifugio.

**KEY WORDS:** *Lakes Colbricon, Paneveggio Park, Microbiodiversity, human impact*

### ABSTRACT

An analysis of the prokaryotic and eukaryotic microbial communities of Lake Colbricon Superiore was carried out in order to verify the ecological compliance of the biotope, presumed to be high as it is located in the Paneveggio-Pale di S. Martino Natural Park. It is an environment with a high naturalness index but also characterized by the presence of a refuge frequently visited in the summer season. The structure of the bacterial community was compared with what had been found in the same site, with the same methods, in the period prior to works to adapt the sewerage of the bathroom and kitchen drains of the refuge. A replacement of the dominant species, previously represented by microorganisms with a weak pathogenic character and indicator of an anthropic impact was observed, with species of different ecological aptitude, indicative of an increase in trophy and the presence of hydrocarbon residues, whose origin could be related to the installation of an auxiliary diesel generator at the refuge.