

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**ECOLOGIA E DIVERSITÀ SPECIFICA DI
DIATOME E POTENZIALMENTE
TOSSICHE APPARTENENTI AL GENERE
PSEUDO-NITZSCHIA NEL GOLFO DI
TRIESTE**

Tesi di laurea in BOTANICA MARINA APPLICATA

Relatore

Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da

Vanessa Natali

Correlatore

Dott.ssa Marina Cabrini

Dott. Alfred Beran

Sessione Anno Accademico 2016/2017

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1 FITOPLANCTON MARINO E HARMFUL ALGAL BLOOM	1
1.1.1 CARATTERISTICHE DEGLI HABS	2
1.1.2 IMPATTI NEGATIVI DEGLI HABS	7
1.2 DIATOMEE	9
1.2.1 GENERE <i>PSEUDO-NITZSCHIA</i> H.PERAGALLO, 1900	12
1.2.1.1 Morfologia	13
1.2.1.2 Ecologia	15
1.2.1.3 Ciclo vitale	16
2. SCOPO	18
3. MATERIALI E METODI	20
3.1 AREA DI STUDIO	20
3.2 CAMPIONAMENTO, COLTURE E ANALISI MORFOLOGICA, GENETICA E TOSSICOLOGICA	21
3.2.1 CAMPIONAMENTO	21
3.2.2 ISOLAMENTO	23
3.2.2.1 Microscopia ottica	25
3.2.2.2 Microscopia elettronica	26
3.2.3 ANALISI GENETICA	27
3.2.3.1 Estrazione del DNA genomico	27
3.2.3.2 Amplificazione della regione barcode e sequenziamento	27
3.2.4 ANALISI TOSSICOLOGICA	31
3.3 DISTRIBUZIONE STAGIONALE ED INTERANNUALE DEL GENERE <i>PSEUDO-NITZSCHIA</i> NEL GOLFO DI TRIESTE DAL 2010 AL 2016	33
3.3.1 CAMPIONAMENTO, PARAMETRI CHIMICO-FISICI E FITOPLANCTON	33
3.3.2 IDENTIFICAZIONE DEL FITOPLANCTON	35
4. RISULTATI	36

4.1	DIVERSITÀ SPECIFICA DEL GENERE <i>PSEUDO-NITZSCHIA</i>, NEL GOLFO DI TRIESTE	36
4.2	DISTRIBUZIONE TEMPORALE DEL GENERE <i>PSEUDO-NITZSCHIA</i> DAL 2010 AL 2016 NEL GOLFO DI TRIESTE	45
4.2.1	PARAMETRI FISICO-CHIMICI	45
4.2.2	CICLO STAGIONALE	48
4.2.3	VARIABILITÀ INTERANNUALE	52
5.	<u>DISCUSSIONE</u>	60
5.1	DIVERSITÀ MORFOLOGICA E GENETICA	60
5.2	TOSSICITÀ	63
5.3	ECOLOGIA	66
6.	<u>CONCLUSIONI</u>	71
7.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	73
8.	<u>APPENDICE</u>	91
9.	<u>RINGRAZIAMENTI</u>	94

1. INTRODUZIONE

1.1 FITOPLANCTON MARINO E HARMFUL ALGAL BLOOM

Il fitoplancton marino, cioè la componente autotrofa del plancton (dal greco "phyton", pianta, e "planktos", che si lascia trasportare) è costituito da organismi unicellulari microscopici con dimensioni comprese tra 0,4 e 200 μm . Sono organismi fotosintetici che vivono negli strati superficiali ben illuminati della colonna d'acqua, fino a circa 200 metri nelle acque più trasparenti, dove utilizzano l'energia luminosa per convertire la componente inorganica disciolta in materia organica. Sebbene rappresentino meno dell'1% della biomassa fotosintetica della Terra, sono comunque responsabili per oltre il 45% della produzione annuale netta primaria del nostro pianeta (Falkowski e Raven, 1997; Field et al., 1998). Oltre ad essere i maggiori produttori primari dell'ecosistema marino, essi rappresentano anche la base nutrizionale per tutti gli altri livelli trofici, e quindi sono la condizione di esistenza di tutta la restante vita marina. Si stima che ci siano più di 50.000 differenti specie di microalghe presenti negli oceani e nelle acque dolci (fiumi, laghi e stagni) anche se ad oggi solo 30.000 sono state studiate e descritte (Richmond, 2004). Nonostante esistano condizioni in cui la crescita fitoplanctonica sia benefica rappresentando la base della catena alimentare negli ecosistemi marini, vi sono condizioni in cui, a seguito di un incontrollato sviluppo, possono verificarsi fioriture algali anomale che spesso comportano conseguenze negative per l'ecosistema e per i servizi ecosistemici, come per esempio la pesca, l'acquacoltura e, non ultimo, il turismo.

Tra tutto il fitoplancton si stima che 300 siano le specie considerate potenzialmente dannose a causa dell'elevata produzione di biomassa o mucillagine o perché possono determinare danni meccanici ad altri organismi marini oppure a causa della produzione di tossine (Hallegraeff, 2003). Di queste, circa 90 specie di microalghe sono ora incluse in una lista di

fitoplancton tossico (Intergovernmental Oceanographic Commission, 2002), lista che cresce costantemente sia per l'aggiunta di nuove specie descritte e sia per la scoperta di effetti tossici o dannosi in specie già conosciute.

La comunità scientifica si riferisce a queste alghe dannose e/o produttrici di tossine con il termine di "Harmful Species" o, quando includono anche i batteri, HAOP (Harmful Aquatic Organisms and Pathogens) (Mozetič et al., 2017). L'evento legato a tali specie è noto come "Harmful Algal Bloom" (HAB) che ha come caratteristica generale il fatto di causare effetti dannosi all'ecosistema marino, alla salute dell'uomo e alle risorse naturali.

1.1.1 CARATTERISTICHE DEGLI HABs

Gli HABs possono verificarsi in tutti i tipi di acque costiere ma anche in mare aperto, perciò i processi fisici, chimici ed ecologici coinvolti nella dinamica e nella manifestazione di effetti dannosi sono distinti da caso a caso.

Steidinger (1983) suggerisce quattro fasi di un bloom fitoplanctonico: di innesco, di crescita, di concentrazione e di dispersione. I fattori che permettono l'innesco di HABs riguardano la crescita di una determinata specie in risposta alla temperatura, salinità, luce, nutrienti, turbolenza e tratti vitali come l'incistamento o stadi sessuali.

Si conoscono molti fattori che possono contribuire a innesco e crescita di HABs, ma il legame tra questi fattori per creare una fioritura di alghe non è ancora stato ben capito e descritto. Molti studi indicano che diverse specie di alghe fioriscono quando il vento e le correnti d'acqua sono favorevoli. In altri casi, fenomeni di HAB possono essere collegati ad un eccesso di sostanze nutritive, principalmente fosforo, azoto, carbonio, oppure al loro rapporto sbilanciato. Alcuni HABs, invece, sono stati segnalati anche dopo certi fenomeni naturali come la lenta circolazione dell'acqua, le temperature dell'acqua insolitamente elevate ed eventi atmosferici estremi come uragani, inondazioni e siccità (Zingone et al., 2004; Montresor et al., 2002).

Per quanto riguarda eventi di HABs tossici, effettivamente vengono rilevati nei mari del mondo con una percentuale minore dell'1% (NOAA, 2017) rispetto alle maree colorate non tossiche.

La tossicità è una proprietà naturale di alcune alghe. Le tossine, infatti, sono i loro metaboliti secondari, anche se non sono fondamentali per il metabolismo basale dell'organismo che le produce. La frequenza di fioriture tossiche è parte del ciclo naturale in molte regioni, ma varia a seconda dell'area geografica e dalle condizioni ambientali (Trainer et al., 2012).

Quando si verificarono i primi blooms di queste specie, si conosceva poco su diversi aspetti riguardo la produzione delle tossine, la loro struttura e il meccanismo d'azione, così come il ruolo delle condizioni ambientali sulla produzione delle tossine. Perciò, il bisogno di aumentare la conoscenza sui potenziali rischi per l'uomo e l'ecosistema stimolò la ricerca in questo campo, soprattutto per quanto riguarda la caratterizzazione delle tossine in modo da sviluppare programmi di monitoraggio ambientale e biologico in particolare nelle aree di acquacoltura e nelle acque costiere, luogo di balneazione e altre attività turistiche.

Negli ultimi decenni, sembrerebbe essersi verificato un aumento dell'intensità, della frequenza e della distribuzione geografica degli HABs e questo può dipendere da diversi fattori, sia fisico-chimici che biologici, e non ultimi antropogenici. Più cause, capaci di agire contemporaneamente, i cui singoli effetti sono difficilmente distinguibili l'uno dall'altro, sembrerebbero responsabili, pertanto diverse possibili spiegazioni sono state prese in considerazione (Zingone e Enevoldsen, 2000):

- aumento della consapevolezza di questi fenomeni: a causa delle interazioni sempre crescenti con le acque costiere e con le risorse che esse forniscono. Soprattutto nei Paesi industrializzati, c'è un numero sempre maggiore di ricercatori che sorvegliano le acque marino-costiere, monitorando la proliferazione delle specie tossiche, e ciò ha portato ad evidenziare eventi di fioriture algali con frequenza maggiore rispetto al passato;
- aumento dell'utilizzo delle acque costiere per l'acquacoltura e la mitilicoltura;
- aumento della pressione antropica nelle aree costiere in termini di apporti di nutrienti (sali di fosforo e azoto, silicati, vitamine) e costruzione di porti, moli e barriere: i blooms di fitoplancton sono infatti

potenziati dall'eutrofizzazione e accumuli di microalghe sono favoriti da condizioni idrografiche insolite;

- introduzione accidentale di alghe tossiche tramite le acque di zavorra o tramite trasferimenti di molluschi bivalvi vivi da un mare ad un altro;
- impatto dei cambiamenti climatici: il riscaldamento globale può avere effetti sulla distribuzione delle specie responsabili di bloom tossici e sull'incidenza di tali eventi;
- impatti della pesca eccessiva sulla rete trofica marina.

Negli HABs è coinvolta un'ampia varietà di organismi, processi fisiologici ed ecologici, ed interazioni fisiche-biologiche. I processi fisici, chimici, ecologici e fisiologici coinvolti possono variare molto, dipendono dalle specie e dall'ambiente. Le proprietà specie-specifiche includono morfologie cellulari complesse, modi nutrizionali alternativi, la formazione di mucillagini, meccanismi di regolazione del galleggiamento, comportamento natatorio e migratorio, comportamento sociale, ciclo vitale, e la produzione di composti deterrenti per gli erbivori, ferormoni e altre molecole chimiche.

In generale, vi sono diverse tipologie di organismi che possono causare HABs, in dipendenza del tipo d'impatto e della dinamica di sviluppo del bloom (Zingone e Enevoldsen, 2000):

1. Organismi produttori di elevata biomassa
2. Organismi produttori di tossine
3. Organismi con entrambe le caratteristiche

Il primo gruppo comprende organismi che possono proliferare fino a raggiungere abbondanze di molto superiori ($>10^6$ cell L⁻¹) rispetto ai livelli normali, spesso con manifestazioni evidenti quali, per esempio, la colorazione dell'acqua o un aumento di mucillagine (Pistocchi et al., 2005). La densità algale può infatti essere così elevata da colorare tratti di mare anche estesi di rosso, da cui il termine "maree rosse", ma le colorazioni possono essere anche verdi, marroni o biancastre a seconda della microalga che prolifera.

Al secondo gruppo invece appartengono specie capaci di produrre composti tossici, generalmente descritti come ficotossine, che potrebbero avere un effetto dannoso anche a basse concentrazioni. La scoperta che alcune alghe

unicellulari contengano potenti tossine è stata fatta appena nel 1930 (Sommer et al., 1937). Successivamente queste tossine sono state trovate in un elevato numero di microalghe, fatto che ha determinato un aumento della ricerca scientifica e della consapevolezza pubblica di questo fenomeno (Hallegraeff 1993; Satake et al. 1997). Fino al 1970 fioriture di fitoplancton tossico erano conosciute solo in acque temperate del Nord America, Europa e Giappone (Hallegraeff, 1995). Tuttavia, è stato osservato un aumento globale dell'intensità e della frequenza di questi fenomeni che si sono espansi in nuove aree in entrambi gli emisferi (Lassus et al., 2016).

Le specie dannose sono ampiamente distribuite in varie categorie tassonomiche (Kraber et al., 2010):

- Cyanophyta
- Dinophyta
- Haptophyta
- Bacillariophyta

Le microalghe producono più di 100 differenti tossine che vengono suddivise in base alla loro struttura chimica (FAO/IOC/WHO, 2005):

- Saxitossine (STX)
- Acido okadaico (OA)
- Pectenotossine (PTX)
- Yessotossine (YTX)
- Acido domoico (DA)
- Brevitossine (BTX)
- Azaspiracido (AZA)
- Ciguatossine (CTX)
- Immine cicliche e palitossine (PLT)

Le saxitossine e l'acido domoico sono tossine idrofile mentre le altre sono lipofile, ad eccezione delle palitossine le quali hanno entrambe le proprietà. I principali gruppi di tossine e le specie che le producono sono riassunte nella Figura 1.

Saxitoxin (STX)	Paralytic Shellfish Poisoning (PSP)	Several species of <i>Alexandrium</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i>
Domoic acid (DA)	Amnesic Shellfish Poisoning (ASP)	Several species of <i>Pseudo-nitzschia</i> , <i>Nitzschia navis-varingica</i> , <i>Halamphora coffeaeformis</i>
Okadaic acid (OA), Dinophysistoxins (DTXs)	Diarrhetic Shellfish Poisoning (DSP)	Several species of <i>Dinophysis</i> , <i>Phalacroma</i> and <i>Prorocentrum</i>
Pectenotoxins (PTXs)	*	Several species of <i>Dinophysis</i>
Yessotoxin (YTXs)	*	<i>Gonyaulax spinifera</i> , <i>Lingulodinium polyedrum</i> , <i>Protoceratium reticulatum</i>
Azaspiracids (AZAs)	Azaspiracid Shellfish Poisoning (AZA)	<i>Azadinium spinosum</i>
Brevetoxins	Neurotoxic Shellfish Poisoning (NSP)	Several species of <i>Karenia</i>
Ciguatoxins (CTXs)	Ciguatera Fish Poisoning (CFP)	Several species of <i>Gambierdiscus</i>
Spirolides-SPXs, gymnodimines- GYM (part of cyclic imines group)	*Fast acting toxins	<i>Alexandrium ostenfeldii</i> (SPXs), <i>Karenia selliformis</i> (GYM)
Palytoxins (PLTs)		Several species of <i>Ostreopsis</i>

*adverse effect on human health has not yet been confirmed

Figura 1. Principali gruppi di tossine (Arapov, 2013).

Negli ultimi decenni, nel Mar Mediterraneo sono stati trovati principalmente l'acido okadaico e le yessotossine, in casi sporadici le saxitossine; è stata rivelata anche la presenza dell'acido domoico ma ad una concentrazione inferiore ai limiti previsti dalla legge (Ciminiello et al., 2009). Nell'Adriatico, l'acido domoico è stato trovato per la prima volta nei bivalvi agli inizi degli anni 2000 (Ciminiello et al. 2005). Questa tossina colpisce una parte del cervello, l'ippocampo, provocando uno stato di eccitazione dei neuroni. L'acido domoico è un acido tricarbossilico, il quale agisce come un neurotrasmettitore, legandosi ai recettori del glutammato, coinvolti nei processi della memoria. I sintomi di tale intossicazione compaiono nell'arco di 24 ore ed includono nausea, vomito, gastroenterite, crampi e diarrea. Disturbi neurologici quali atassia, confusione, persistente perdita di memoria a breve termine fino al coma si verificano generalmente dopo 48 ore dal consumo dei molluschi contaminati.

1.1.2 IMPATTI NEGATIVI DEGLI HABS

Gli HABS sono sempre eventi irregolari, imprevedibili e cospicui e possono provocare un'ampia gamma di impatti negativi:

- intossicazioni umane (Garcia et al., 2004; Gallitelli et al., 2005)
 - produzione di tossine
- danni all'ambiente marino (Scholin et al., 2000)
 - tossicità per la fauna marina
 - ipossia, anossia
 - riduzione della trasparenza dell'acqua
- perdite economiche a causa della chiusura di aree per la molluschicoltura (Trainer et al., 2012)
 - danni meccanici
 - intasamento delle branchie e necrosi
- attività turistiche e ricreative
 - produzione di schiume, mucillagini, colorazione delle acque, odori repellenti.

La proliferazione eccessiva di microalghe può provocare notevoli problemi all'uso ricreativo e turistico delle aree costiere per evidenti problemi estetici, ma anche non meno importanti problemi ecologici agli ecosistemi marini per gli eventi di anossia che accompagnano tali fioriture massive. Quando infatti grandi masse microalgali muoiono e si decompongono, possono causare l'esaurimento dell'ossigeno nell'acqua e questo processo porta all'allontanamento degli animali da questa area oppure alla loro morte. Infine, elevate biomasse algali possono avere effetti deleteri sugli organismi marini provocando intasamento di branchie e danni meccanici per la presenza di strutture rigide quali sete e spine silicee.

Le specie produttrici di tossine possono avere effetti sia sull'ecosistema marino con effetti tossici diretti su vertebrati e invertebrati marini sia sulle risorse marine naturali e di allevamento provocando notevoli perdite economiche. Infine, alcune fioriture algali hanno rilevanza dal punto di vista sanitario per gli effetti sulla salute umana, primariamente attraverso l'accumulo in frutti di mare, ma anche attraverso contatto con la pelle e inalazione. Alcuni

animali marini filtratori che si nutrono di plancton, i molluschi bivalvi, accumulano nei propri apparati digerenti le sostanze tossiche rilasciate nell'acqua dagli organismi produttori, senza esserne affetti. Tra questi, i mitili sono i principali accumulatori di grandi quantità di tossine prodotte da microalghe; tali organismi a causa della loro ecologia di filtratori, soprattutto nella parte superficiale della colonna d'acqua, accumulano le fitotossine nei loro tessuti quando si sviluppano le fioriture di specie tossiche. Questi vengono colpiti parzialmente dalla loro tossicità, ma possono essere responsabili del trasferimento della tossicità dal plancton all'uomo (Turner et al., 1997). I molluschi sono dunque dei buoni indicatori del grado di contaminazione delle acque da parte di specie microalgali tossiche.

Le biotossine algali in base al loro modo di azione sono raggruppate in categorie ognuna associata con distinte sindromi umane (Botana, 2008):

- PSP (Paralytic Shellfish Poisoning), Sindrome Paralitica da Bivalvi
- DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning), Sindrome Diarroica da Bivalvi
- NSP (Neurotoxic Shellfish Poisoning), Sindrome Neurotossica da Bivalvi
- AZP (Azaspiracid Poisoning), Sindrome da Azaspiracido
- ASP (Amnesic Shellfish Poisoning), Sindrome Amnesica da Bivalvi
- CFP (Ciguatera Poisoning), Sindrome della Ciguatera da Pesci
- Sindrome cianobatterica

L'aumento nella frequenza e nell'espansione di HABs ha portato, nella maggior parte dei paesi, a stabilire attività regolari di monitoraggio sia per monitorare il fitoplancton dannoso nelle acque costiere, sia per valutare il livello di tossicità nelle molluschicoltura. Per prevenire le intossicazioni umane dovute alla consumazione di bivalvi contaminati o altri prodotti marini, sono stati stabiliti programmi di monitoraggio in tutto il mondo.

In Italia le analisi delle tossine della DSP e PSP nei mitili sono iniziate nel 1977 (legge n. 192/1977) e sono state estese per l'ASP negli anni 90' (D.M. n° 131 del 1° settembre 1990, e successivamente Dir. 91/492/CEE e 91/493/CEE, norme incorporate nel D.M. del 16 maggio 2002).

Negli ultimi 15 anni, il Mare Adriatico è stato caratterizzato dalla presenza di alghe tossiche o potenzialmente tossiche con conseguenze per la salute dell'uomo e degli animali non sufficientemente chiarite (Pistocchi et al., 2012).

Le coste nord-occidentali del Mar Adriatico sono state soggette a ricorrenti casi di maree rosse dal 1975 (Honsell et al., 1992). Le fioriture sono state più frequenti nelle acque costiere dell'Emilia-Romagna (Boni, 1983), ma qualche volta sono state influenzate aree più ampie lungo la costa nord-occidentale, dall'Istria alle Marche (Artegiani et al., 1985, Honsell et al., 1990). Le maree rosse hanno frequentemente interessato anche aree costiere come il Golfo di Trieste (Fonda Umani, 1985). Quest'ultime, insieme alle fioriture fitoplanctoniche e agli aggregati di mucillagine, sono state presenti quasi annualmente dal 1975 nelle acque costiere del Mar Adriatico (Honsell et al., 1992). Tuttavia, raramente si raggiungono blooms di diversi milioni di cellule per litro nelle acque costiere dell'Adriatico (Boni et al., 1986; Milandri et al., 2005).

Attualmente, il campo della ricerca sulle specie tossiche si sta arricchendo del contributo di studiosi via via sempre più numerosi, dal momento che le ripercussioni sulla salute pubblica e sull'economia stanno assumendo le forme di una vera e propria emergenza mondiale.

1.2 DIATOMEE

Le diatomee appartengono alla divisione Bacillariophyta e sono responsabili di circa il 20-25% della produzione primaria globale. Colonizzano praticamente ogni ambiente, non solo oceani, mari, laghi e corsi d'acqua, ma anche suolo, ghiaccio, zone umide e addirittura possono trovarsi nell'aria in forma di aerosol. Possono essere planctoniche, bentoniche, epifite, epizoiche, endozoiche, ed endofitiche. Formano intense fioriture in acque costiere, di upwelling e acque polari.

Vanno da 2 μm a pochi mm in taglia e sono tassonomicamente estremamente diverse.

Sono alghe brune, il cui colore giallo brunastro è dato dalla presenza di un pigmento accessorio, la fucoxantina. Oltre le clorofille *a* e *c*, contengono vari

pigmenti accessori quali, oltre la fucoxantina, diadinoxantina, diatouxantina e β -carotene.

La caratteristica peculiare delle diatomee è la parete cellulare, detta frustulo, composta principalmente da silice cristallizzata, rigida e trasparente. Il frustulo è costituito da due valve, la parte superiore (epivalva o epiteca) e quella inferiore (ipovalva o ipoteca), collegate da bande cingolari (Figura 2). Tale parete cellulare costituisce la base principale per la tassonomia, perchè presenta sulla superficie una serie di ornamentazioni specie-specifiche, come per esempio strie, pori ed alveoli (Hasle, 1997).

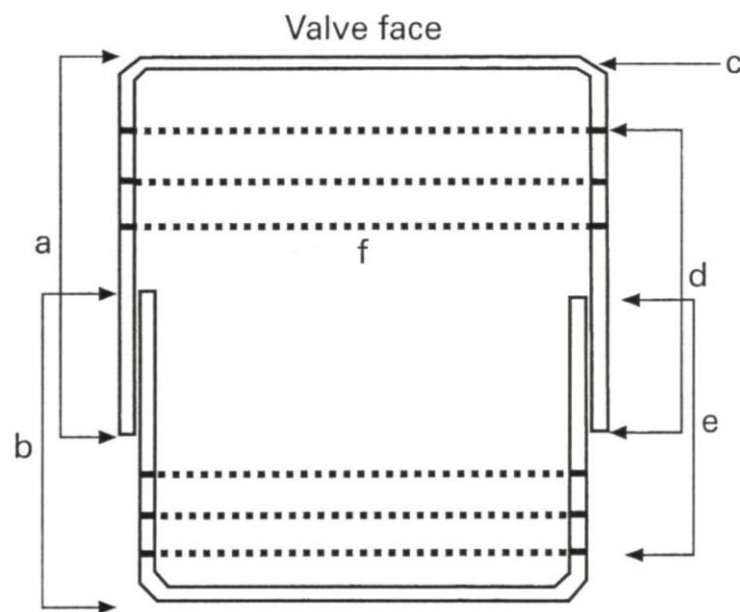


Figura 2. Sezione del frustulo di una diatomea. a) epiteca; b) ipoteca; c) mantello della valva; d) epicingolo; e) ipocingolo; f) bande del cingolo.

Le diatomee vengono generalmente suddivise in due gruppi morfologici in base alla loro simmetria:

- diatomee centriche a simmetria radiale;
- diatomee pennate a simmetria bilaterale.

Quest'ultime possono essere rafidee, cioè presentare o meno un rafe, una fessurazione nel frustulo, o arafidee, senza rafe. La presenza del rafe può essere associata alla capacità di compiere rapidi movimenti di strisciamento mediante l'espulsione di muco (Figura 3). Le diatomee pennate, infatti prediligono la vita bentonica o acque turbolente.

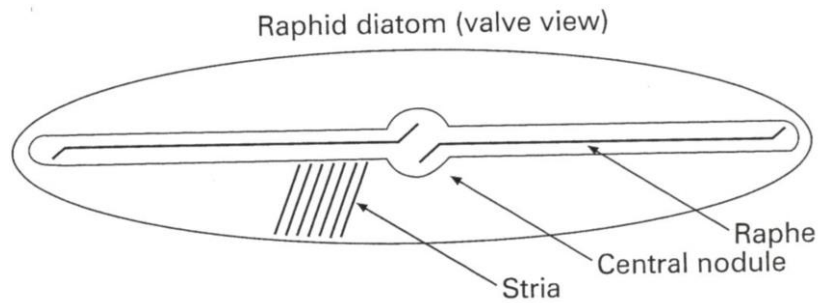


Figura 3. Rafe delle diatomee in vista valvare.

Sono unicellulari, ma possono formare colonie di forme diverse, a zig-zag, stellate, a nastro o a scalino.

Le diatomee sono uno dei componenti principali del fitoplancton marino, insieme ai dinoflagellati e altri flagellati. Come componente principale, costituiscono la base nutrizionale della maggior parte della vita marina, la quale è direttamente o indirettamente dipendente dalla loro produzione primaria.

Per effettuare la fotosintesi necessitano di luce e nutrienti disciolti, quali azoto e fosforo, ed in particolare silicio. Oltre al loro ruolo fondamentale nella fissazione del carbonio, svolgono un ruolo chiave nei cicli biogeochimici di azoto e silice.

Le diatomee raggiungono abbondanze più elevate in primavera, ma un altro picco più o meno abbondante si presenta anche in autunno (Hoppenrath et al., 2009; Cabrini et al., 2012).

Alcune specie di diatomee risultano tossiche per la produzione di acido domoico che può avere effetti oltre che sull'uomo, anche su mammiferi e uccelli marini. Nell'uomo può determinare la Sindrome Amnesica da Bivalvi (ASP) con disturbi gastrointestinali lievi quali nausea, vomito e crampi addominali e sintomi più gravi quali vertigini, confusione, perdita di memoria a breve termine fino a coma, paralisi e morte.

1.2.1 GENERE *PSEUDO-NITZSCHIA* H.PERAGALLO, 1900

Classificazione (Guiry e Guiry, 2018):

Dominio	<i>Eukaryota</i>
Regno	<i>Chromista</i>
Phylum	<i>Bacillariophyta</i>
Subphylum	<i>Bacillariophytina</i>
Classe	<i>Bacillariophyceae</i>
Subclasse	<i>Bacillariophycidae</i>
Ordine	<i>Bacillariales</i>
Famiglia	<i>Bacillariaceae</i>
Genere	<i>Pseudo-nitzschia</i>

Il genere *Pseudo-nitzschia* fu descritto per la prima volta da H. Peragallo nel 1897, anche se, successivamente, nel 1958 venne incluso da Hustedt nel genere *Nitzschia*. Nel 1994, Hasle, invece, distinse il genere *Pseudo-nitzschia* come un genere specifico di diatomee pennate formanti lunghe catene. Fino al 1960 circa, pochissime specie erano state identificate, tuttavia con l'avvento della microscopia elettronica prima e lo sviluppo di metodi molecolari poi, moltissime nuove specie sono state descritte. Attualmente, si stima un numero di 52 specie descritte e accettate tassonomicamente, ma esistono 65 nomi di specie e infraspecie nel database AlgaeBase (Appendice), 26 delle quali sono state confermate specie produttrici di acido domoico (Guiry & Guiry 2018; Lundholm 2016).

All'interno di questo genere esistono molte specie criptiche (morfologicamente identiche ma differenti dal punto di vista molecolare) o pseudocriptiche (differenti dal punto di vista molecolare con solo piccolissime differenze ultrastrutturali) (Amato et al., 2007; Lundholm et al., 2012), che rendono spesso l'identificazione al microscopio ottico molto problematica. Escludendo infatti poche specie con una morfologia distintiva che possono quindi essere facilmente identificate a livello di specie, per tutte le altre la determinazione in

microscopia ottica non è possibile. Pertanto, vengono distinti solo due morfotipi, principalmente in base all'ampiezza della valva (asse transapicale, a.t.):

- *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex: a.t. < 3µm
- *Pseudo-nitzschia seriata* complex: a.t. > 3µm

Il gruppo *P. delicatissima* complex contiene un altro gruppo denominato *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* complex, il quale comprende specie morfologicamente simili ma geneticamente e biologicamente distinte, e si differenzia per (Lundholm et al., 2003; Amato et al., 2007):

- presenza di strie uniseriate (biseriate in *P. delicatissima* complex);
- estremità appuntite anziché arrotondate/tronche in visione commesurale;
- sovrapposizione delle estremità di due cellule adiacenti, in colonia, molto più pronunciata.

1.2.1.1 MORFOLOGIA

Il genere *Pseudo-nitzschia* comprende specie pennate a simmetria bilaterale. Le cellule sono allungate con punte arrotondate o appuntite. In vista valvare (valve view) le cellule risultano lanceolate o lineari, mentre in vista commesurale (girdle view) sono rettangolari o fusiformi. Per l'identificazione vengono misurate l'ampiezza, cioè l'asse transapicale, e la lunghezza della valva, cioè l'asse apicale; mentre in vista cingolare viene misurato lo spessore (Figura 4).

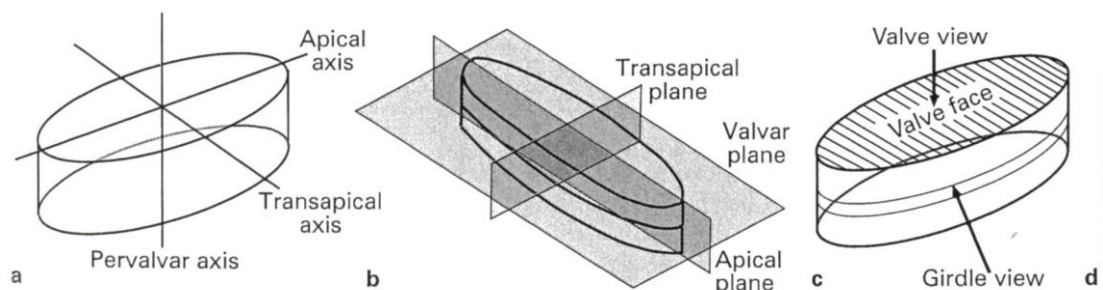


Figura 4. Tre dimensioni per l'identificazione della cellula in vista valvare e vista commesurale.

Le cellule formano rigide catene a gradini, connesse tramite la sovrapposizione delle estremità della cellula. Ogni cellula contiene due cloroplasti appiattiti.

Come tutte le diatomee, presentano un frustulo siliceo caratterizzato dalle due teche e dal cingolo (Boni et al., 2005). Sono caratterizzate dalla presenza di un rafe fortemente eccentrico, lungo il margine della valva.

Il frustulo è caratterizzato da una serie di strutture identificabili soltanto tramite microscopia elettronica (Figura 5). Le **striae** sono file di poroidi: sul lato inferiore di ogni valva ci sono delle scanalature fenestrate da pori detti **poroidi** o **areolae** che consentono gli scambi della cellula col mezzo esterno che altrimenti sarebbero difficili a causa della rigida e resistente parete. Le **interstriae** sono strisce silicee non perforate tra due striae. Il rafe, invece, corre lungo ogni valva rinforzata all'interno della cellula da ponti silicei detti **fibulae**. In alcune specie il rafe è interrotto da un **interspazio centrale** che è lo spazio tra le due fibule centrali.

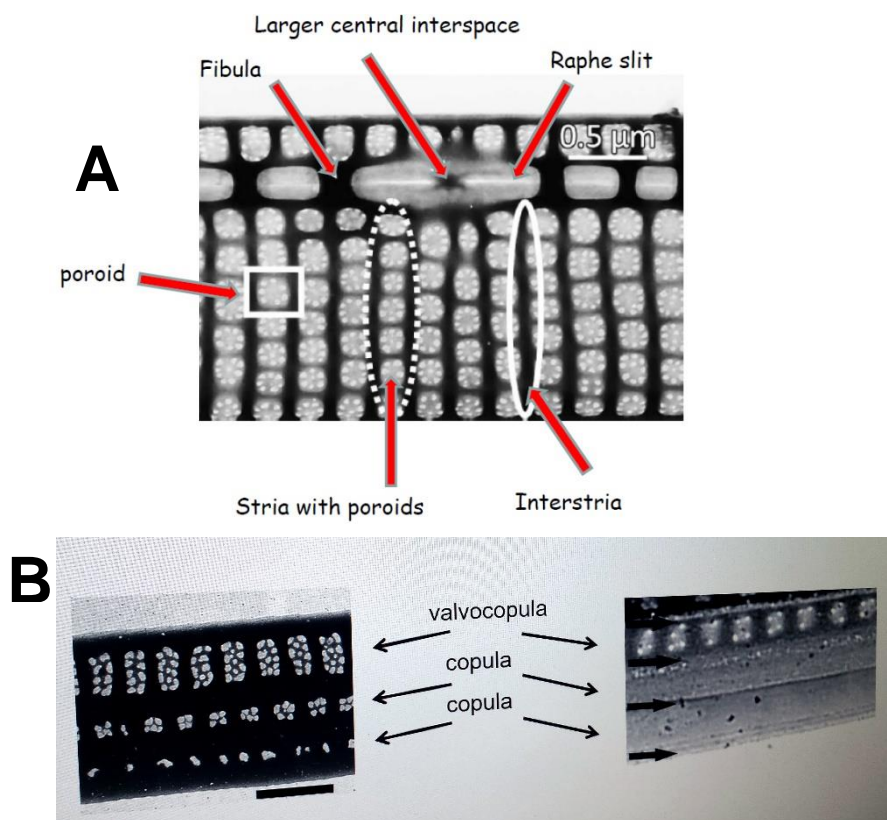


Figura 5. Descrizione delle caratteristiche ultrastrutturali del frustulo: vista valvare del frustulo (A), bande cingolari (B).

L'identificazione all'interno del genere si basa su (Lundholm et al., 2003):

- ampiezza e forma della valva
- presenza/assenza di un grande interspazio centrale
- densità delle interstrie e fibule
- struttura delle strie:
 - numero di file di poroidi
 - densità dei poroidi
 - struttura dei poroidi (settori)
- struttura delle bande cingolari:
 - densità di strie/poroidi
 - struttura delle strie

1.2.1.2 ECOLOGIA

Sono specie abbondanti e cosmopolite, presenti nelle acque costiere e oceaniche di tutto il mondo, infatti sono in grado di tollerare un ampio range di temperatura e salinità (Lelong et al., 2012; Trainer et al. 2012).

Circa 26 specie (IOC list) appartenenti a questo genere sono considerate potenzialmente tossiche (Appendice). La sindrome ASP venne attribuita al genere *Pseudo-nitzschia* quando venne riconosciuta per la prima volta come caso di tossicità nel 1987 in Canada, dopo la consumazione di mitili *Mytilus edulis* contaminati da acido domoico (Bates et al., 1989). Successivamente questo genere ha suscitato un elevato interesse scientifico con la scoperta di diverse specie potenzialmente tossiche e, al giorno d'oggi, è riconosciuto come il principale produttore microalgale di acido domoico (Moestrup et al., 2009).

Una densità di circa 10^5 cellule per litro di *Pseudo-nitzschia* spp. è l'innescò per provocare ASP secondo Bates et al. (1998). Ma rimane da capire quale densità e/o composizione di queste specie possano portare ad un accumulo tossico nei mitili. La produzione di tossine da parte di *Pseudo-nitzschia* è stata collegata allo stress da nutrienti. Alcuni studi hanno indicato che la limitazione sia dei fosfati che dei silicati, non dei nitrati, sia una condizione necessaria per la produzione di acido domoico (Bates, 1998; Fehling et al., 2005), che viene

prodotto maggiormente nella fase stazionaria quando la disponibilità di nutrienti è limitata. Tuttavia, altri fattori determinano la produzione di queste tossine durante eventi di bloom quali il rapporto dei nutrienti, la forma di azoto disponibile, la concentrazione dei metalli in tracce, le associazioni batteriche e la concentrazione parziale di anidride carbonica (Heisler et al., 2008; Thessen et al., 2009; Silver et al., 2010; Kaczmarska et al., 2005).

1.2.1.3 CICLO VITALE

Il ciclo vitale è diplonte, con una lunga fase di divisioni mitotiche (fase asessuale), durante cui le cellule diventano progressivamente più piccole, e una breve fase sessuale, durante cui la taglia viene ripristinata (Figura 6).

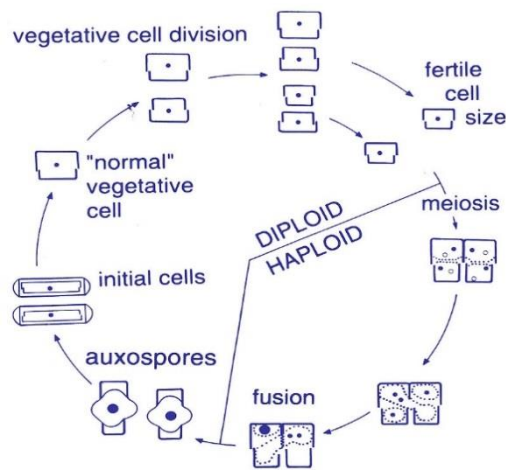


Figura 6. Riproduzione asessuale e sessuale di diatomee pennate.

La gran parte delle specie di *Pseudo-nitzschia* studiate sono eterotalliche (D'Alelio et al., 2009), ovvero la riproduzione sessuale richiede l'unione di due tipi di ceppi differenti per l'accoppiamento, ad eccezione di *P. brasiliiana*, unica specie omotallica documentata dove gli stadi sessuali sono stati osservati in colture clonali (Quijano-Scheggia et al., 2009).

Durante la riproduzione asessuata o vegetativa, la quale avviene per scissione binaria, l'ipoteca piccola parentale diventa l'epiteca della cellula figlia che vi formerà all'interno una nuova ipoteca. In questo modo però la dimensione, generalmente la lunghezza, non l'ampiezza, delle cellule figlie diminuirà ad ogni divisione, fino al raggiungimento di una dimensione minima incompatibile

con la vita. Al di sotto di questa dimensione minima le cellule non riescono più a riprodursi asessualmente ed andranno incontro a morte. Per ripristinare la taglia massima, si innesca invece la riproduzione sessuale.

Il modo della riproduzione sessuale è simile in tutte le specie: gameti aploidi non mobili sono prodotti tramite meiosi in gametangi, i quali accoppiandosi permettono la migrazione di due gameti attivi verso quello passivo; questa coniugazione dà origine a due auxospore, le quali sono inizialmente sferiche ma poi velocemente si allungano e vengono prodotte le cellule con le dimensioni iniziali. L'allungamento è possibile grazie al fatto che alle auxospore mancano le valve rigide di silicio, ma sono circondate da una parete soffice, il perizonium. Basandosi sui gametangi e la dimensione iniziale della cellula, sembra che la sessualità potrebbe essere indotta ad un determinato intervallo di dimensioni compreso tra il 42% e il 59% della dimensione massima della cellula (Sarno et al., 2010).

La riproduzione sessuata è quindi necessaria a ripristinare le dimensioni iniziali della cellula, ed è un evento regolare in natura. Può, inoltre, essere importante per la produzione di acido domoico, poiché diminuendo la taglia col tempo, le cellule perdono anche l'abilità a produrre le tossine. Tuttavia, una volta ripristinata la sua dimensione iniziale con la riproduzione sessuata, la cellula qualche volta può risultare più tossica di quanto fosse inizialmente (Bates et al., 1999).

2. SCOPO

Questo lavoro di tesi è stato svolto presso i laboratori della Sezione di Oceanografia dell'Istituto Nazionale di Oceanografia e di Geofisica Sperimentale (OGS) di Trieste e ha avuto come obiettivo principale lo studio con un approccio multidisciplinare della diversità ed ecologia delle diatomee appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia*.

Il genere *Pseudo-nitzschia* comprende alcune specie potenzialmente tossiche, produttrici di acido domoico, una neurotossina che provoca nell'uomo la Sindrome Amnesica da Bivalvi (ASP), con danni gastrointestinali e neuronali (Bates et al., 1989). In alcuni casi la loro intensa proliferazione determina l'accumulo di tali tossine nella rete trofica, con conseguente impatto sull'uomo ma anche sugli ecosistemi e sugli organismi marini, con ripercussioni notevoli anche socio-economiche.

Nei programmi di monitoraggio comunemente effettuati, la loro identificazione si limita al riconoscimento al livello di genere, per la mancanza di caratteristiche morfologiche evidenziabili in microscopia ottica e a causa della presenza di specie criptiche e pseudocriptiche. Per la determinazione a livello specifico è pertanto necessario ricorrere alla microscopia elettronica (a scansione o a trasmissione), essenziale per evidenziare caratteristiche ultrastrutturali, e alle analisi molecolari, per svelare la presenza di specie criptiche (Evans et al., 2007).

È ben noto che il genere *Pseudo-nitzschia* è molto diffuso nel bacino Mediterraneo (Orsini et al., 2002), ed è un componente persistente nei popolamenti fitoplanctonici lungo le coste italiane, soprattutto nelle acque dell'Adriatico, ricche di nutrienti. Tuttavia i dati sulla distribuzione spazio-temporale delle diverse specie di *Pseudo-nitzschia* sono insufficienti, anche nel Mar Adriatico (Marić et al., 2011; Arapov et al., 2017).

Nel Golfo di Trieste tale genere rappresenta una componente importante nella struttura della comunità fitoplanctonica (Cabrini et al., 2012), pertanto monitorare la sua presenza e conoscere le specie presenti è di fondamentale

importanza anche per la presenza in questa area di allevamenti di mitilicoltura, principale attività di maricoltura nel golfo, effettuata tradizionalmente da diversi centinaia di anni e industrialmente da più di 40 anni (Aleffi et al., 2006).

Fino ad oggi, in tutto il Mar Adriatico, le tossine prodotte da alcune specie di *Pseudo-nitzschia* sono state determinate a bassi livelli di concentrazione, ben al di sotto dei limiti di legge. Attualmente il limite di tolleranza previsto dalla legislazione vigente (Reg. CE 853/2004) per l'acido domoico è pari a 20 mg/kg di tessuto edibile di mollusco. Tuttavia le specie tossiche sono in continuo aumento e quelle potenzialmente tossiche in continua evoluzione (Ciminiello et al., 2009).

Per questo motivo è necessaria un'identificazione tassonomica fino a livello specifico, importante per lo sviluppo di misure adeguate per il monitoraggio locale della loro distribuzione, successione e frequenza in modo da contenere e mitigare i possibili impatti negativi (Heisler et al., 2008).

Pertanto, tale studio si è focalizzato su:

- identificazione a livello di specie tramite microscopia elettronica a trasmissione di diversi ceppi di *Pseudo-nitzschia* isolati dal Golfo di Trieste;
- caratterizzazione genetica di questi ceppi grazie al DNA-barcoding utilizzando il marcatore ITS2 con sistema di primers ITSU3-ITSp4;
- analisi tossicologica di tali ceppi per l'identificazione dell'acido domoico tramite il metodo della cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa in tandem (LC/MS/MS);
- analisi di dati abiotici e biotici raccolti dal 2010 al 2016 in una stazione di ricerca a lungo termine (C1-LTER) nel Golfo di Trieste, disponibili presso i laboratori della Sezione di Oceanografia di OGS, per comprendere la distribuzione temporale del genere *Pseudo-nitzschia*, ovvero il ciclo stagionale e la variabilità interannuale in relazione a differenti variabili ambientali.

3. MATERIALI E METODI

3.1 AREA DI STUDIO

Il Golfo di Trieste è un bacino semi-chiuso localizzato nella parte settentrionale del Mar Adriatico, caratterizzato da particolari proprietà oceanografiche grazie alla sua posizione geografica, alla limitata profondità dei fondali, con valori massimi di 25 metri nella parte meridionale, e la presenza di un vento particolare, quale la Bora. L'area superficiale del Golfo è di circa 600 km² con un volume di 9.5 km³ (Malej et al., 1995).

Le variazioni di temperatura del mare durante l'anno sono molto pronunciate, dalla minima invernale di 5°C alla massima estiva maggiore di 26 °C (Cardin e Celio, 1997).

La salinità del Golfo di Trieste aumenta durante l'inverno e diminuisce in superficie durante la primavera e l'estate per l'apporto di acqua dolce costiera, soprattutto da parte dei fiumi Isonzo e Timavo (Celio et al., 2002). Infatti, il più elevato apporto fluviale si osserva generalmente nella tarda primavera e in autunno, invece diminuisce durante l'inverno e l'estate (Malačič, 1991)

Gli apporti d'acqua dolce, principalmente dai fiumi Isonzo e Timavo nella parte nord-occidentale, ma anche dalle diverse sorgenti sottomarine lungo la costa orientale carsica, possono influenzare la circolazione superficiale e la struttura verticale della colonna d'acqua. Nel periodo estivo, l'apporto di acque dolci dai fiumi e il riscaldamento superficiale instaurano una netta stratificazione tra le acque superficiali, più calde e meno saline, e quelle di fondo, più fredde e saline. Nei mesi freddi, al contrario, a causa del minor irraggiamento, il rimescolamento è totale, con caratteristiche uniformi tra le acque di superficie e di fondo (Cozzi et al., 2012).

Durante l'anno la trasparenza varia, con un massimo principale in agosto ed un massimo secondario in gennaio, e minimi durante la primavera e l'autunno, in concomitanza della maggiore abbondanza di plancton e dell'apporto di sedimenti costieri a seguito delle precipitazioni (Fonda Umani, 1991).

La circolazione è generalmente ciclonica, determinata dalla Corrente Orientale Adriatica (EAC), la quale fluisce verso nord lungo la costa Istriana dalle acque più calde e salate provenienti dal Mar Ionio (Poulain et. al, 2001). Invece la circolazione delle masse d'acqua in profondità è interessata da una debole corrente antioraria di origine meridionale. La velocità delle correnti superficiali è legata ai venti: aumenta in presenza delle brezze di mare e diminuisce al prevalere delle brezze di terra. Le correnti di marea sono poco efficienti al fine del ricambio nel golfo, in quanto si limitano a spostare avanti e indietro di pochi chilometri, ogni sei ore, la stessa massa d'acqua (Stravisi, 1977).

Tuttavia, a causa della bassa profondità dei fondali, l'idrologia generale del Golfo e la struttura verticale della colonna d'acqua possono essere modificate in risposta a forze atmosferiche locali intense come i venti freddi provenienti da nord-est, ovvero la Bora, e i venti miti da sud, ovvero lo Scirocco (Lipizer et al., 2011). La Bora provoca un'intensa circolazione in senso antiorario dalla superficie al fondo. Nel Golfo di Trieste la Bora rappresenta quindi il meccanismo più efficiente per il ricambio dell'acqua, che si completa in circa due giorni (Querin et al., 2007).

3.2 CAMPIONAMENTO, COLTURE E ANALISI

MORFOLOGICA, GENETICA E TOSSICOLOGICA

3.2.1 CAMPIONAMENTO

Il campionamento è stato effettuato nell'ottobre del 2016 ad una stazione costiera, C1-LTER (45°42'2.99" N and 13°42'36.00" E, Figura 7), nel Golfo di Trieste, localizzata a 250 metri dalla linea di costa e ad una profondità di 17 metri. Questo sito fa parte della rete di Ricerca Ecologica a Lungo Termine (LTER) dal 2006, ma è monitorato già dal 1986 (Milani et al., 1987/88; Cabrini et al., 1987/88) ed è situato all'interno della Riserva Marina di Miramare, dichiarata Area Marina Protetta nel 1979.

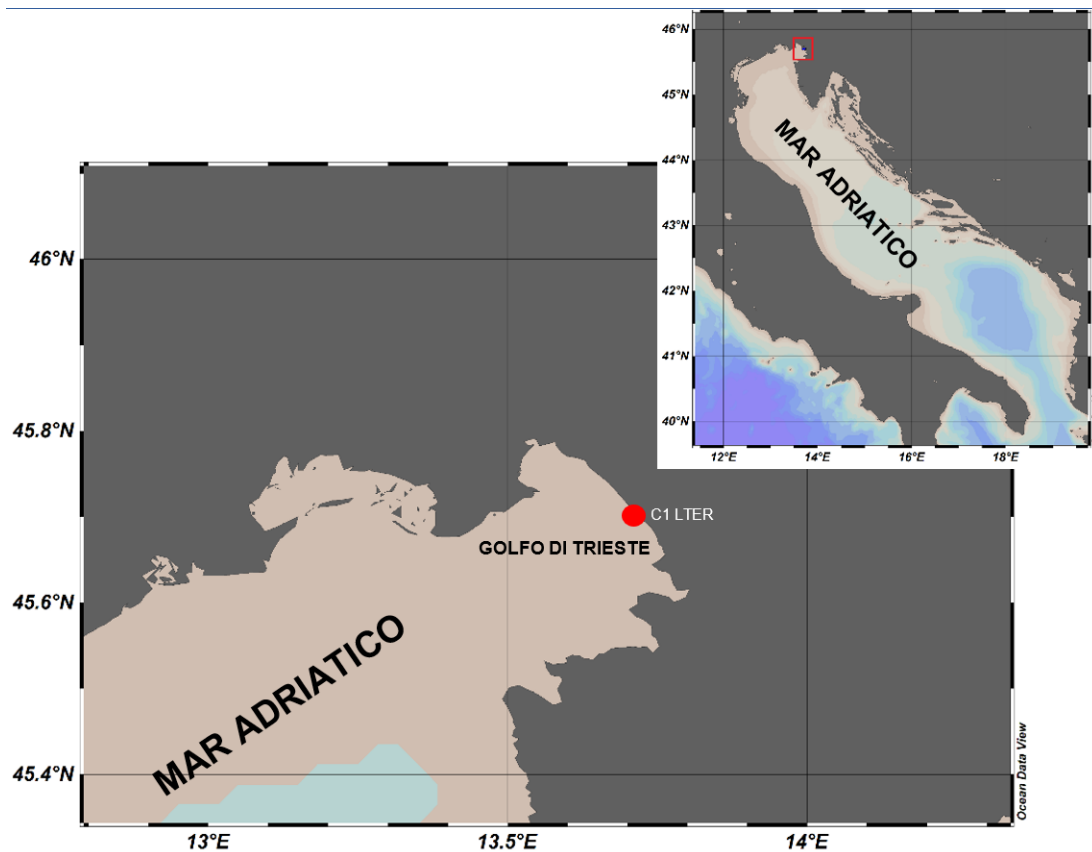


Figura 7. Mappa dell'area di studio nel Nord adriatico, con la posizione della stazione C1-LTER nel Golfo di Trieste.

I campioni per l'isolamento delle cellule sono stati raccolti mediante retinate verticali, dal fondo in superficie, utilizzando un retino con maglia di 20 μm , lungo 60 cm, dotato di un collettore terminale per la raccolta degli organismi (Figura 8).

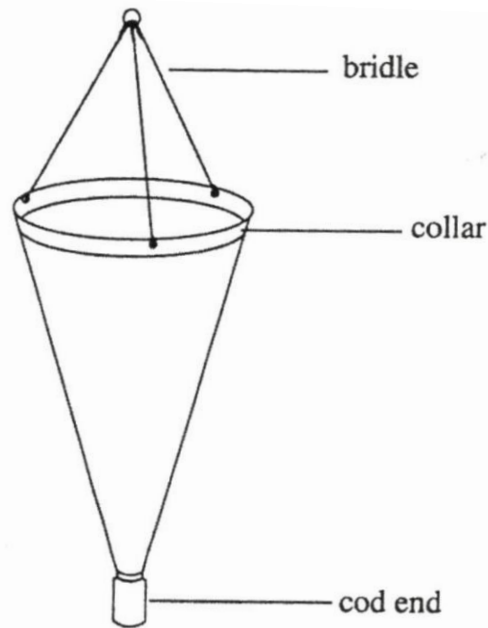


Figura 8. Retino per fitoplancton.

Il retino può essere utilizzato lungo la colonna d'acqua per una stima soltanto semiquantitativa delle cellule, non per valutare l'abbondanza quantitativa e neanche per determinare la loro distribuzione verticale. È molto utile per la raccolta d'informazioni qualitative di presenza/assenza, dal fondo alla superficie, oppure per descrivere la distribuzione orizzontale, nel caso in cui venga lentamente trainato dalla barca lungo la superficie. Inoltre, è particolarmente utile per raccogliere materiale vivo per isolare le cellule e mantenerle successivamente in coltura (Zingone et al., 2010).

I campioni dal collettore del retino sono stati trasferiti in bottiglie di vetro scuro e conservati al buio e al fresco fino al trasferimento in laboratorio per l'osservazione *in vivo* e l'allestimento delle colture.

3.2.2 ISOLAMENTO

Subcampioni della retinata sono stati osservati allo stereomicroscopio (Olympus SZX10, obiettivo PLAPO 1X-4, oculari 10X, ingrandimento da 6.3 a 63 volte) per l'individuazione di cellule di *Pseudo-nitzschia*. Una volta che è stata individuata una singola cellula, o più facilmente una catena, tramite micropipette Pasteur di vetro, sterili e preparate in modo da assottigliarne la punta (tirate dopo riscaldamento su fiamma), è stata trasferita in uno dei 12

pozzetti di una piastra multiwell contenente il terreno di coltura. L'alga è stata quindi trasferita più volte in diversi pozzetti per rimuovere i batteri o altre alghe eventualmente presenti. Una volta pulita, è stata posta in un pozzetto della nuova piastra, nella quale in ogni pozzetto è stata posta una singola cellula isolata e pulita. La piastra è stata quindi posta in cella termostata a $15 \pm 0,5$ °C, ciclo luce:buio 12:12 e intensità luminosa pari a $50 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. Ogni giorno, è stata controllata la crescita dell'alga e la pulizia della coltura.

Quando la coltura è risultata sufficientemente densa, circa 1 ml è stato trasferito in beute di vetro sterili contenenti 40 mL di terreno di coltura, allestendo una beuta per ogni ceppo. Anche le beute sono state mantenute in celle termostate alle stesse condizioni.

Il terreno di coltura è stato preparato con acqua di mare generalmente prelevata al fondo nella stessa stazione di campionamento. Tale acqua è stata portata alla salinità desiderata (33), filtrata e sterilizzata secondo la seguente procedura:

- filtrazione su filtri Durapore GVWP (Millipore) con porosità di $0,22 \mu\text{m}$ e diametro di 142 mm;
- aggiunta del 10 % di elementi in tracce con EDTA (acido etilenedinitrilotetraacetico), in modo da mantenere in soluzione i metalli pesanti;
- sterilizzazione in autoclave in bottiglie di teflon;
- aggiunta ad 1 L di acqua sterilizzata di:
 - 1 ml di elementi in tracce con EDTA (meno il 10% aggiunto prima)
 - 1 ml di nutrienti (nitrati + fosfati)
 - 1 ml di silicati
 - 0.5 ml di vitamine

Le concentrazioni finali di ciascun componente sono riportate in Tabella 1. Le soluzioni stock sono state filtrate su un filtro sterile da $0,2 \mu\text{m}$ e mantenute in frigorifero a 4 °C.

Tabella 1. Preparazione dello stock 1 e stock 2 in soluzioni individuali. Per lo stock finale si aggiunge 1 mL dello stock 1 e 0.1 mL dello stock 2 in 100 mL.

Nutrienti	Stock [g/ 50mL]		
NaNO ₃	3.75		
Na ₂ glyceroPO ₄	0.153		
NaH ₂ PO ₄	0.25		
Na ₂ SiO ₃ x9H ₂ O	1.5		
Vitamine	Stock finale [g/100 mL]	Stock 1 [g/50 mL]	Stock 2 [g/50 mL]
Thiamine-HCl	20 mg		
Biotin		1.04	
Vitamin B ₁₂			11.1
Elementi in tracce	Stock finale [g/100 mL]	Stock 1 [g/100 mL]	Stock 2 [g/25 mL]
Na ₂ EDTA	0.372		
Fe-II-citrate	0.131		
MnCl ₂ x4H ₂ O		0.495	
ZnSO ₄ x7H ₂ O		0.072	
NaMoO ₄ x2H ₂ O		0.060	
CoCl ₂ x6H ₂ O		0.030	
CuSO ₄ x5H ₂ O			0.062
H ₂ SeO ₃			0.032
NaVO ₃			0.030
NiSO ₄ x6H ₂ O			0.066

3.2.2.1 MICROSCOPIA OTTICA

Il riconoscimento al microscopio ottico (MO) del genere *Pseudo-nitzschia* è basato su alcuni caratteri diagnostici:

- tipo di catene
- dimensione della cellula
- forma della valva
- numero di cloroplasti

Le cellule di ciascun ceppo sono state osservate a un microscopio ottico diritto (LeicaDM2500, Germany), fornito di camera digitale (Leica DFC490, Germany) e relativo software (Leica Application Suite LAS 4.12) per l'elaborazione delle immagini per la valutazione della forma e delle dimensioni.

Per ogni ceppo sono state misurate diverse cellule valutando quando possibile l'asse apicale, lo spessore in vista commesurale e l'asse transapicale in vista valvare.

3.2.2.2 MICROSCOPIA ELETTRONICA

A livello di specie l'identificazione è fondamentalmente basata sulle caratteristiche della parete cellulare, il frustulo.

In base alla diversa ultrastruttura della parete cellulare si applicano tecniche differenti per la preparazione dei campioni per la microscopia elettronica. È stato scelto di utilizzare il microscopio elettronico a trasmissione (TEM) perché permette l'osservazione di campioni di spessore ridotto, che si lasciano attraversare dal fascio di elettroni. Per definire i dettagli più sottili, lo studio della morfologia del frustulo, richiede la rimozione della materia organica. Il metodo adoperato per la pulizia dei frustuli di *Pseudo-nitzschia* è stato il metodo di von Stosch (1974), il quale utilizza come reagenti l'acido nitrico e l'acido solforico secondo la seguente procedura:

- concentrazione del campione mediante centrifuga a 3000 giri per 10 minuti;
- rimozione del surnatante con una pipetta;
- aggiunta di acqua deionizzata e successiva centrifugazione;
- aggiunta di acido nitrico (in quantità pari a quella del campione) e acido solforico (in quantità pari a 2 volte quella del campione);
- riscaldamento su becco Bunsen fino ad ebollizione;
- dopo raffreddamento, centrifugazione e rimozione del surnatante;
- serie di lavaggi fino al raggiungimento di un pH neutro.

Una goccia di materiale pulito è stato quindi posto su retino per il TEM (griglia in carbonio con maglia da 300), pronto per l'osservazione una volta asciugato.

Per ogni ceppo sono state effettuate le foto al TEM (Olympus Quemesa iTEMon FEI EM208) del CSPA - Settore Microscopia Elettronica, Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, in modo da poter analizzare le seguenti caratteristiche:

- striae in 10 μm
- interstriae in 10 μm
- fibulae in 10 μm
- poroidi in 1 μm (righe, settori e forma)
- interspazio centrale

- punte
- bande cingolari

Le principali linee guida utilizzate per l'identificazione, oltre la letteratura più recente, sono state Horner (2002) e Hoppenrath et al. (2009).

3.2.3 ANALISI GENETICA

L'applicazione delle tecniche molecolari allo studio del fitoplancton è iniziata negli anni '70, ora sono sempre più utilizzate nello studio di aspetti evolutivi ed ecologici, per identificare le specie e per verificare le classificazioni basate sui caratteri fenotipici (Penna et al., 2010).

Cangelosi et al. (1997) ipotizzò il possibile uso delle regioni ITS (Internal Transcribed Spacer) come target per l'identificazione molecolare delle specie *Pseudo-nitzschia*.

Le analisi molecolari sono state effettuate in collaborazione con il Prof. Alberto Pallavicini e la dott.ssa Valentina Torboli del Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università degli Studi di Trieste.

3.2.3.1 ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO

Il DNA è stato estratto da colture di *Pseudo-nitzschia*, centrifugate e pellettate, mediante protocollo di estrazione Quick-DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep Kit (Zymo Research), idoneo per trattare tessuti sia freschi che congelati di vegetali, batteri e funghi, il quale comprende un passaggio di lisi meccanica attraverso l'agitazione con biglie per garantire la rottura delle pareti cellulari e la solubilizzazione del DNA.

Il buon esito dell'estrazione è stato confermato attraverso la quantizzazione del DNA per mezzo dello spettrofotometro NanoDrop 2000.

3.2.3.2 AMPLIFICAZIONE DELLA REGIONE BARCODE E SEQUENZIAMENTO

Il DNA-barcoding è una tecnica molecolare che permette l'identificazione di identità biologiche grazie all'analisi della variabilità di alcuni marcatori molecolari definiti, appunto "barcode", che permettono il riconoscimento specie-specifico di tutti gli organismi contenuti in un campione ambientale. Per

l'attribuzione sistematica di *Pseudo-nitzschia* è stato utilizzato il marcatore ITS (Internal Transcribed Spacer) (ITS2) con sistema di primers ITSU3-ITSp4 (White, 1990), una sequenza di circa 600 nucleotidi, altamente variabile, che circonda la sequenza che codifica per il 5.8S, la quale si trova tra la sequenza codificante la SSU (Small Subunit) e la LSU (Large Subunit) dell'operone ribosomiale. (Cheng et al., 2016; Figura 9). Il profilo termico per l'amplificazione in PCR della regione comprende uno step iniziale di attivazione della polimerasi (PCRBIO HS Taq DNAPolymerase) a 95°C per 1 minuto, seguita da 35 cicli comprendenti una fase di denaturazione a 95°C per 30 secondi, una fase di annealing dei primer a 55°C e una fase di estensione a 72°C per 1 minuto.

L'amplificato è stato controllato su gel di agarosio al 2%.

Le sequenze ITS2 dei ceppi analizzati di *Pseudo-nitzschia* sono state ottenute mediante sequenziamento Sanger e allineate con BLASTn contro il database nucleotidico disponibile in GenBank. Inoltre, sono state allineate con 54 sequenze da GenBank (Tabella 2) usando MAFFT (Kato, 2013). L'analisi filogenetica di maximum likelihood (ML) è stata effettuata con MEGA v7 (Kumar et al., 2016) con 1000 repliche di bootstrap e dopo aver stabilito che il modello HKY+G+I era il migliore modello evolutivo in accordo a AIC per ML.

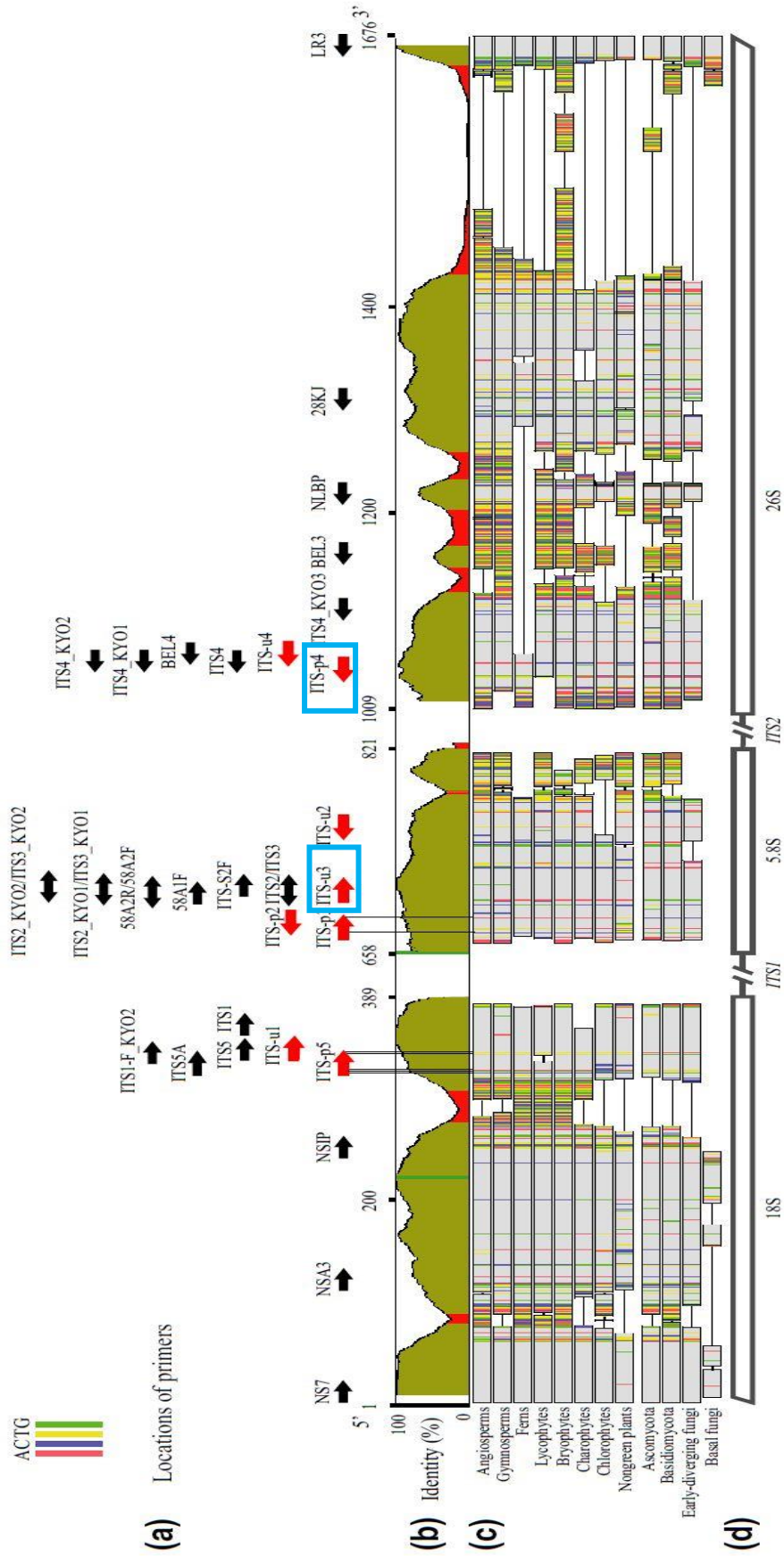


Figura 9. Primers utilizzati (evidenziati in blu).

Tabella 2. Lista delle specie di *Pseudo-nitzschia* per l'analisi filogenetica del rDNA della sequenza ITS2 con il codice di accesso nel database informatico GenBank e relativo nome del ceppo.

Species name	GenBank accession code	Strain name
<i>P. abrensis</i>	KC409108.1	Ner-J2
<i>P. abrensis</i>	KR021327.1	Pnmi19
<i>P. americana</i>	EU523099.1	
<i>P. arenysensis</i>	DQ813830.1	AL-24
<i>P. australis</i>	AY257842.1	OEM1
<i>P. batesiana</i>	KC147514.1	PnTb19
<i>P. batesiana</i>	KR021333.1	Pnmi29
<i>P. bipertita</i>	KR021322.1	Pnmi74
<i>P. brasiliana</i>	JN252429.1	Pnkk31
<i>P. caciantha</i>	DQ813834.1	AL-56
<i>P. calliantha</i>	DQ813841.1	AL-112
<i>P. calliantha</i>	HE663436.1	CBA75
<i>P. cuspidata</i>	DQ813827.1	AL-17
<i>P. decipiens</i>	DQ336157.1	GranCan4-1
<i>P. decipiens</i>	DQ336156.1	Mex13
<i>P. delicatissima</i>	DQ813832.1	AL-22
<i>P. delicatissima</i>	AY257848.1	Tasm 10
<i>P. delicatissima</i>	AY257849.1	Laesoe5
<i>P. delicatissima</i>	KY399476.1	NMBguh002-1-2
<i>P. dolorosa</i>	DQ813835.1	AL-59
<i>P. fraudulenta</i>	AY257840.1	Limens1
<i>P. fraudulenta</i>	FJ222755.1	NWFSC 200
<i>P. fryxelliana</i>	JN050288.1	NWFSC 241
<i>P. fukuyoi</i>	KC147516.1	PnTb25
<i>P. fukuyoi</i>	KR021317.1	Pnmi158
<i>P. galaxiae</i>	AY257850.1	Mex23
<i>P. galaxiae</i>	DQ336158.1	Sydney4
<i>P. granii</i>	EU051654.1	
<i>P. hasleana</i>	JN050282.1	NWFSC 186
<i>P. inflatula</i>	DQ329204.1	no7
<i>P. kodamae</i>	KR021310.1	Pnmi92
<i>P. limii</i>	KR021313.1	Pnmi06
<i>P. lineola</i>	JN050284.1	NWFSC 188
<i>P. lundholmiae</i>	KC147523.1	PnTb10
<i>P. lundholmiae</i>	KR021316.1	Pnmi28
<i>P. mannii</i>	DQ813839.1	AL-101
<i>P. mannii</i>	KX215915.1	CIM_D-4
<i>P. micropora</i>	AY257847.1	VPB-B3
<i>P. micropora</i>	DQ329209.1	no16
<i>P. multiseriata</i>	AY257844.1	mu3
<i>P. multistriata</i>	AY257843.1	KoreaA
<i>P. multistriata</i>	KR021314.1	Pnmi07
<i>P. plurisecta</i>	KC409089.1	Ner-F1
<i>P. pseudodelicatissima</i>	DQ813826.1	AL-15
<i>P. pungens</i>	HQ111412.1	PnMt45
<i>P. pungens</i>	KR021303.1	Pnmi136
<i>P. pungens</i> var. <i>aveirensis</i>	AY257845.1	P-24
<i>P. sabit</i>	KP288511.1	Ps283
<i>P. seriata</i>	AY257841.1	Nissum3
<i>P. seriata</i> f. <i>obtusa</i>	DQ062667.1	T5
<i>P. simulans</i>	MF374770.1	MC282
<i>P. subfraudulenta</i>	KR021299.1	Pnmi71
<i>P. turgidula</i>	JN091764.1	NWFSC220
<i>P. turgiduloides</i>	AY257839.1	3-19

3.2.4 ANALISI TOSSICOLOGICA

Le biotossine rappresentano un problema per quanto riguarda la loro identificazione a causa dell'estrema varietà strutturale e dell'ampio range di polarità e di pesi molecolari che sono propri di tali composti. Sono perciò richiesti metodi analitici che permettano la rivelazione delle biotossine in una varietà di matrici biologiche. Generalmente i metodi analitici vengono suddivisi in due gruppi: i saggi biologici e le analisi chimico strumentali (Quilliam, 2001).

Il metodo utilizzato per l'analisi tossicologica dell'acido domoico nelle culture di *Pseudo-nitzschia* è l'LC/MS/MS, ovvero la cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa in tandem. Il vantaggio della spettrometria di massa eseguita due volte è dovuta all'aumento della sensibilità e al miglioramento delle informazioni strutturali dell'analisi.

Le analisi sono state effettuate in collaborazione con la dott.ssa Anna Milandri e la dott.ssa Silvia Pigozzi del Laboratorio Nazionale di Riferimento per le Biotossine Marine, presso il Centro di Ricerche Marine di Cesenatico.

Sono stati prelevati da ciascuna coltura di *Pseudo-nitzschia* 10 mL che sono stati filtrati su filtri Millipore di cellulosa (diametro del poro: 0,22 μm), per eliminare quanto più terreno di coltura possibile, e poi congelati.

Il metanolo rappresenta il solvente d'estrazione per la tossina. Si aggiungono 3 mL di solvente di estrazione metanolo/acqua (MeOH-50%: H₂O, 1:1) e poi si procede alla sonicazione dei campioni, per mezzo di un sonicatore ad asta (Ultrasonic Liquid Processor, modello XL2020) ad impulsi per 20 minuti. Per migliorare la purificazione è stato filtrato con una siringa con un filtro da 0,22 μm . Ciascun campione estratto con MeOH/H₂O 1:1 è stato sottoposto ad una procedura di clean-up, per purificare i campioni ed eliminare eventuali interferenti.

La procedura di clean-up consiste in un'estrazione in fase solida (Solid Phase Extraction, SPE) tramite scambio anionico, metodica descritta da Quilliam et al. (1995), utilizzando come eluente un buffer costituito da acido citrico e citrato di ammonio. La soluzione così ottenuta è stata resa omogenea e poi è stato prelevato 1 mL per l'analisi cromatografica.

Per l'analisi chimica delle tossine ASP è stato utilizzato un metodo sviluppato dal Centro Ricerche Marine, utilizzando la cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS, Figura 10)

Il metodo consiste in una tecnica cromatografica di separazione accoppiata ad una tecnica di rivelazione spettrometrica (MS). Una miscela viene separata in base all'affinità dei diversi componenti verso una fase stazionaria immobilizzata in una colonna ed una fase mobile liquida (cromatografia liquida, LC) che fluisce in continuo attraverso essa.

Le concentrazioni di acido domoico sono state poi calcolate in confronto a soluzioni di acido domoico a concentrazione nota, il cui range andava da 0,02 a 4 µg/mL, e infine riferite al numero di cellule alla raccolta.

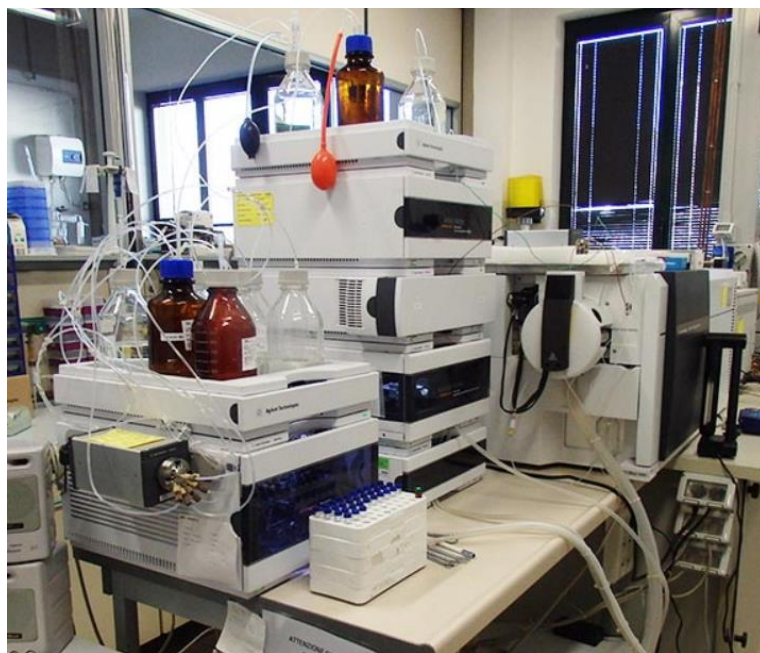


Figura 10. Strumento LC-MS/MS nel laboratorio del Centro Ricerche Marine di Cesenatico.

3.3 DISTRIBUZIONE STAGIONALE ED INTERANNUALE DEL GENERE *PSEUDO-NITZSCHIA* NEL GOLFO DI TRIESTE DAL 2010 AL 2016

3.3.1 CAMPIONAMENTO, PARAMETRI CHIMICO-FISICI E FITOPLANCTON

Il campionamento è stato condotto mensilmente da gennaio 2010 a dicembre 2016 alla stazione C1-LTER nel Golfo di Trieste.

L'acquisizione di dati idrografici, quali temperatura e salinità, è stata effettuata tramite l'utilizzo di una sonda multiparametrica CTD, ovvero Conduttività-Temperatura-Profondità (SBE 19 Plus Seacat). La profondità è una misura indiretta, viene fornita rivelando la pressione. La sonda può essere utilizzata sia come profilatore della colonna d'acqua o come strumenti di campionamento a punto fisso, rappresentando rispettivamente un profilo verticale di diversi parametri fisico-chimici o una serie temporale in un preciso punto dello spazio.

Campioni discreti di acqua di mare sono stati raccolti in bottiglie Niskin da 5 L (Figura 1111) a quattro profondità: 0.5, 5, 10, 15 m.

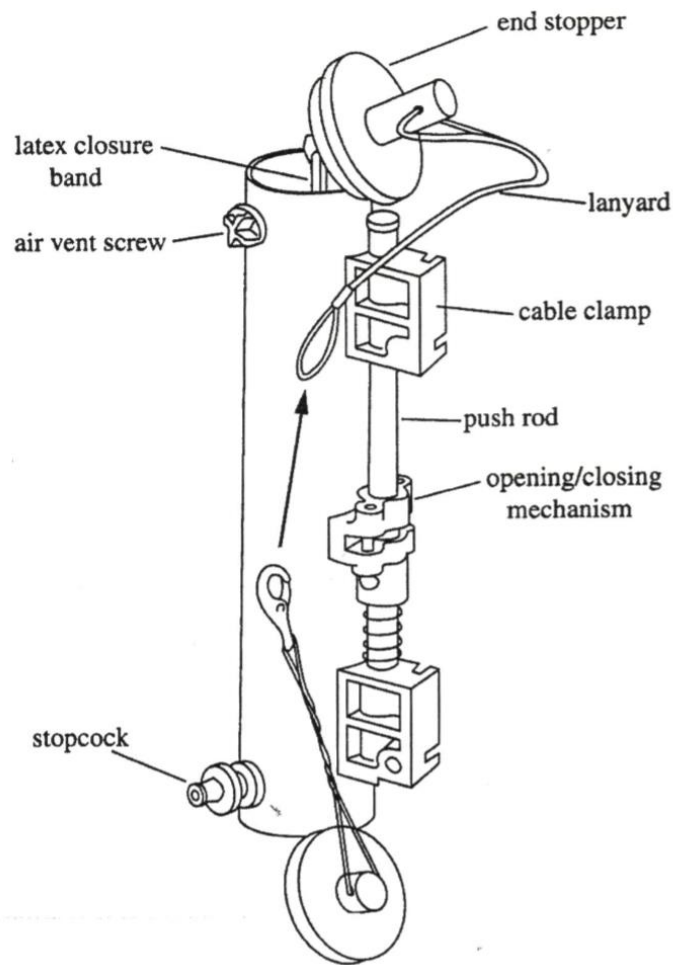


Figura 11. Bottiglia Niskin.

Campioni per l'analisi della concentrazione dei nutrienti inorganici disciolti (nitrito, N-NO₂, nitrato N-NO₃, ammonio, N-NH₄, fosfato P-PO₄, e silicato, Si-Si(OH)₄) sono stati prefiltrati su filtri in fibra di vetro con dimensione dei pori di 0,7 µm (Whatmann GF/F), conservati a -20 °C e poi analizzati colorimetricamente con un Bran + Luebbe Autoanalyzer 3, secondo Hansen e Koroleff (1999).

I dati chimico-fisici sono stati graficati con il software ODV (Ocean Data View, Schlitzer, 2017).

Per le analisi quali-quantitative del fitoplancton, oltre il campionamento discreto con le bottiglie Niskin, è stata effettuata anche una retinata verticale. In entrambi i casi, i campioni sono stati raccolti in bottiglie di vetro scuro ed immediatamente fissati con formaldeide prefiltrata e neutralizzata (1.6% di concentrazione finale) (Throndsen, 1978).

3.3.2 IDENTIFICAZIONE DEL FITOPLANCTON

Un volume variabile di acqua di mare (10-50 ml) a seconda dell'abbondanza delle cellule è stato fatto sedimentare in una camera Utermöhl (Utermöhl, 1958; Zingone et al., 2010). Il conteggio delle cellule è stato effettuato lungo transetti (1-2) (Hasle, 1978), contando un minimo di 200 cellule, utilizzando un microscopio ottico invertito (Olympus IX71 e Leica BMI3000B), dotato di contrasto di fase e ad un ingrandimento di 400x. Per i taxa microfitoplanctonici (> 20 µm) meno abbondanti, è stata esaminata metà camera di sedimentazione ad un ingrandimento di 200x, per ottenere una valutazione più corretta.

Alcuni campioni (luglio 2010, novembre 2010, aprile 2011, marzo 2012, novembre 2013, ottobre 2014, agosto 2015, febbraio 2016), sia di bottiglia che di retino, che mostravano picchi elevati di abbondanza di *Pseudo-nitzschia*, sono stati selezionati e preparati per l'osservazione al TEM (vedi paragrafo 3.2.2.2) in modo da identificare le specie di *Pseudo-nitzschia* presenti.

4. RISULTATI

4.1 DIVERSITÀ SPECIFICA DEL GENERE *PSEUDO-NITZSCHIA*, NEL GOLFO DI TRIESTE

Dal campionamento effettuato il 12/10/2016 sono stati isolati 15 ceppi (Tabella 3).

In una prima valutazione al microscopio ottico si è potuto attribuire questi ceppi, attraverso le misure dell'ampiezza dell'asse trans-apicale in vista valvare, ai due complessi '*delicatissima*' e '*seriata*' con:

- 13 ceppi appartenenti al *P. delicatissima* complex (<3µm);
- 2 ceppi appartenenti al *P. seriata* complex (>3µm).

Le ulteriori osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione hanno permesso di identificare tre specie diverse tra questi 15 ceppi:

1. *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle, 2003;
2. *Pseudo-nitzschia mannii* Amato & Montresor, 2008;
3. *Pseudo-nitzschia subfraudulenta* (Hasle) Hasle, 1993.

Tabella 3. Misure morfometriche di ceppi di *Pseudo-nitzschia* isolati nel Golfo di Trieste.

Specie	Ceppo	Asse apicale (µm)	Asse transapicale (µm)	Spessore (µm)	Interspazio centrale	Fibulae in 10 µm	Interstriae in 10 µm	Striae in 10 µm	Righe di poroidi	Settori in poroidi	Poroidi in 1 µm
<i>P. mannii</i>	PS1	87.2-91.8	1.6-2.6	2.5-3.5	presente	18-23	34-37	34-37	1	5-7	4-5
	PS3	92.5-95.8	1.6-2	2.5-3.5	presente	16-22	32-36	32-36	1	2-5	4-5
	PS5	63.2-107.7	1.6-1.9	1.9-3.1	presente	17-18	34-35	34-35	1	2-5	4-5
	PS7	86.2-92.1	1.8-2.5	2.3-3.1	presente	16-20	35-38	35-37	1	2-5	4-5
	PS8	86.2-95.8	1.8-2.2	2.1-3.5	presente	19-25	35-39	34-38	1	5-7	4-5
	PS9	87.1-92.4	1.8-2.3	1.8-4.6	presente	14-21	32-36	33-35	1	2-5	4-5
	PS11	88.9-98.3	1.5-2	1.8-3.2	presente	19-21	34-37	33-36	1	2-5	4-5
	PS12	90.3-95.8	1.8-2.4	1.8-3.4	presente	18-22	33-35	32-35	1	2-5	4-5
<i>P. calliantha</i>	PS6	72.2-76.5	1.7-2	2.2-3.2	presente	18-22	35-38	36-39	1	7-9	4-5
	PS10	82.4-88.2	1.4-2	1.8-3.2	presente	16-19	34-36	34-36	1	6-9	4-5
	PS1D	70.6-75.2	1.5-1.9	1.7-3.1	presente	17-18	35	35	1	7-9	4-5
	PS3D	80.6-86.5	1.4-1.9	2.1-3.4	presente	18-20	36-37	35-38	1	7-9	4-5
	PS4D	70.5-76.3	1.5-2.3	1.7-3.2	presente	17-22	35-39	36-38	1	7-9	4-5
<i>P. subfraudulenta</i>	PS4	113.1-119.8	3.5-4.3	3.2-4.7	presente	14-15	23-25	24-25	2	5-9	5
	PS14	88.6-95.9	3.5-4.3	3.6-5.7	presente	13-18	23-25	24-25	2	5-9	5

Pseudo-nitzschia calliantha

Microscopia ottica. Cellule caratterizzate da valve lineari sia in visione valvare che commesurale (Figura 12 A-B), di circa 1.5-2.2 μm di ampiezza (asse trans-apicale) e di 80-110 μm di lunghezza (asse apicale) con l'estremità del frustulo appuntite (Figura 12 C).

Microscopia elettronica. Il rafe eccentrico viene diviso da un grande interspazio centrale, con un nodulo centrale (Figura 12 D-E). Le striae presentano un'unica fila di poroidi di forma variabile, da circolare a quadrata. Sono presenti 17-22 fibulae in 10 μm , più o meno spaziate regolarmente, e 35-39 interstriae in 10 μm . La densità dei poroidi è di 4-5 in 1 μm . L'imene del poroide è suddiviso in 5-10 settori disposti intorno ad una perforazione, con la forma paragonata ad un fiorellino. Le perforazioni, sia della valva che delle bande, sono organizzate a forma esagonale (Figure 12 D). La valvocopula contiene diverse striae, ogni due o tre poroidi di larghezza e da quattro a cinque poroidi di altezza (Figura 12 F-G). Le striae della prima copula sono due poroidi di larghezza e due a tre poroidi di altezza. La terza e ultima copula contiene striae che sono due poroidi larghi e da uno a due poroidi in altezza, oppure contiene poroidi sparsi.

Genetica. I ceppi PS10, PS1D, PS3D, PS4D sono stati analizzati dal punto di vista genetico. La determinazione della specie *P. calliantha* è stata confermata dal blast nucleotidico contro le sequenze di *Pseudo-nitzschia* depositate in Genbank.

Tossicologia. I ceppi analizzati (PS6, PS3D, PS4D) non sono risultati positivi all'acido domoico.

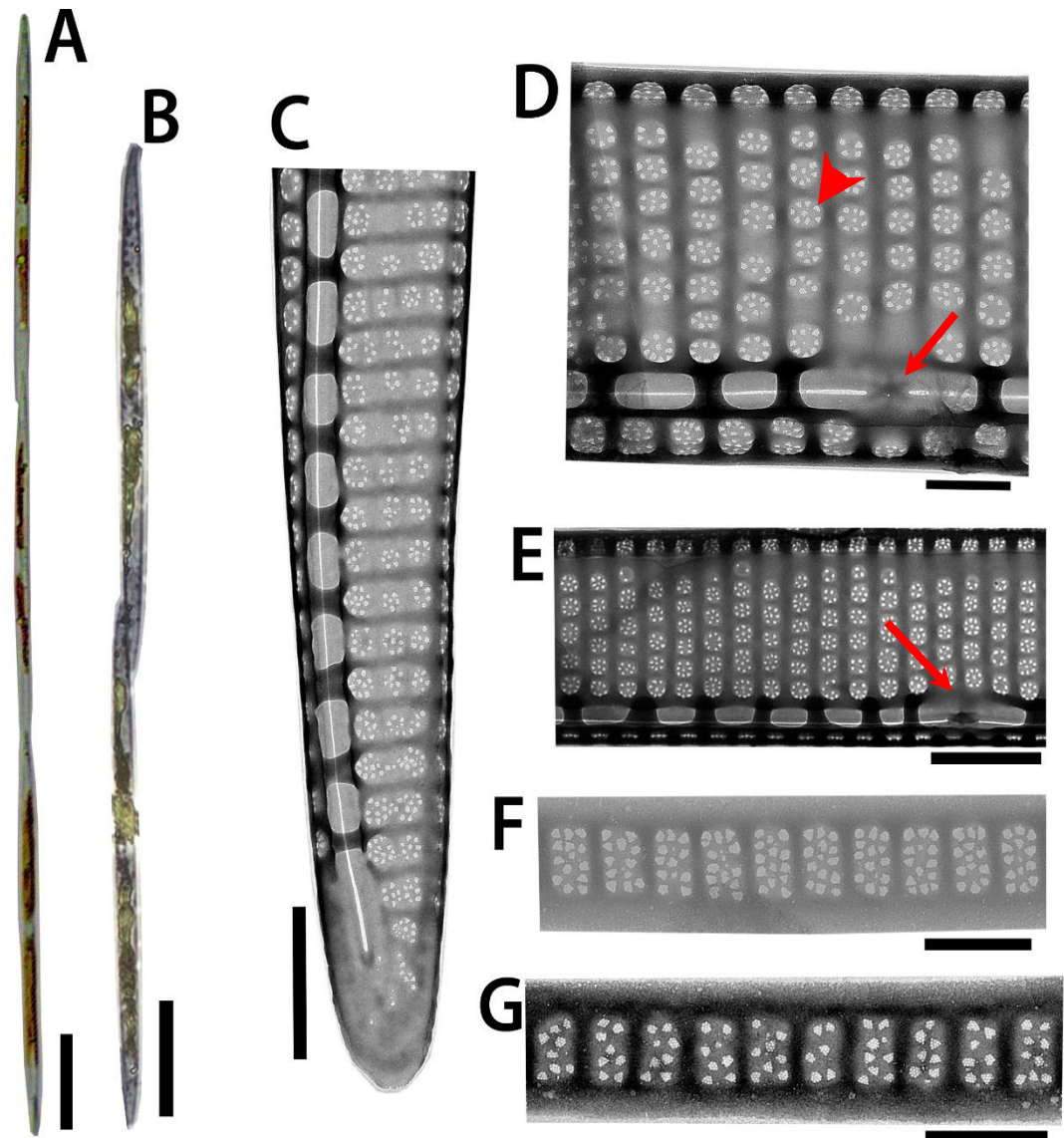


Figura 12. Micrografie di *Pseudo-nitzschia calliantha* in MO (A-B) e TEM (C-G). A) Catena di 3 cellule in vista valvare; B) catena di 2 cellule in vista commessurale; C) punta arrotondata; D) poroidi (freccia) e interspazio centrale (punta di freccia); E) interspazio centrale (freccia); F-G) valvocopula. Scale bar: 20 μm (A-B), 1 μm (C e E), 0,5 μm (D, F-G).

Pseudo-nitzschia mannii

Microscopia ottica. Cellule lineari sia in vista valvare che commessurale (Figura 133 A, B e C), con apici affusolati verso le estremità della valva (Figura 133 D). La loro lunghezza, ovvero l'asse apicale, varia da 86 a 96 μm , la larghezza, l'asse transapicale, varia da 1,5 a 2,6 μm e lo spessore varia da 2,1 a 3,5 μm .

Microscopia elettronica. Al centro del rafe è presente l'interspazio centrale (Figura 13 H). La densità delle interstriae in 10 μm varia da 32 a 38 e delle fibulae da 14 a 22. Ciascuna stria contiene una riga di poroidi (Figura 13 G) con forma da quadrata a circolare, con una densità di 4-5 in 1 μm . I poroidi sono divisi in 2-5 settori con una disposizione radiale, raramente si trova il settore centrale. Le perforazioni mostrano una forma esagonale. La valvocopula della banda cingolare (Figura 13 D) è ornamentata da striae biseriate con 3-4 poroidi di altezza. La seconda banda (Figura 13 E) è meno silicizzata rispetto alla valvocopula con striae biseriate di 2 poroidi di altezza e la terza banda presenta striae simili alla seconda.

Genetica. I ceppi PS5, PS7, PS9, PS11 sono stati analizzati dal punto di vista genetico. La determinazione della specie *P. mannii* è stata confermata dal blast nucleotidico contro le sequenze di *Pseudo-nitzschia* depositate in Genbank.

Tossicologia. I ceppi analizzati (PS1, PS3, PS11) non sono risultati positivi all'acido domoico.

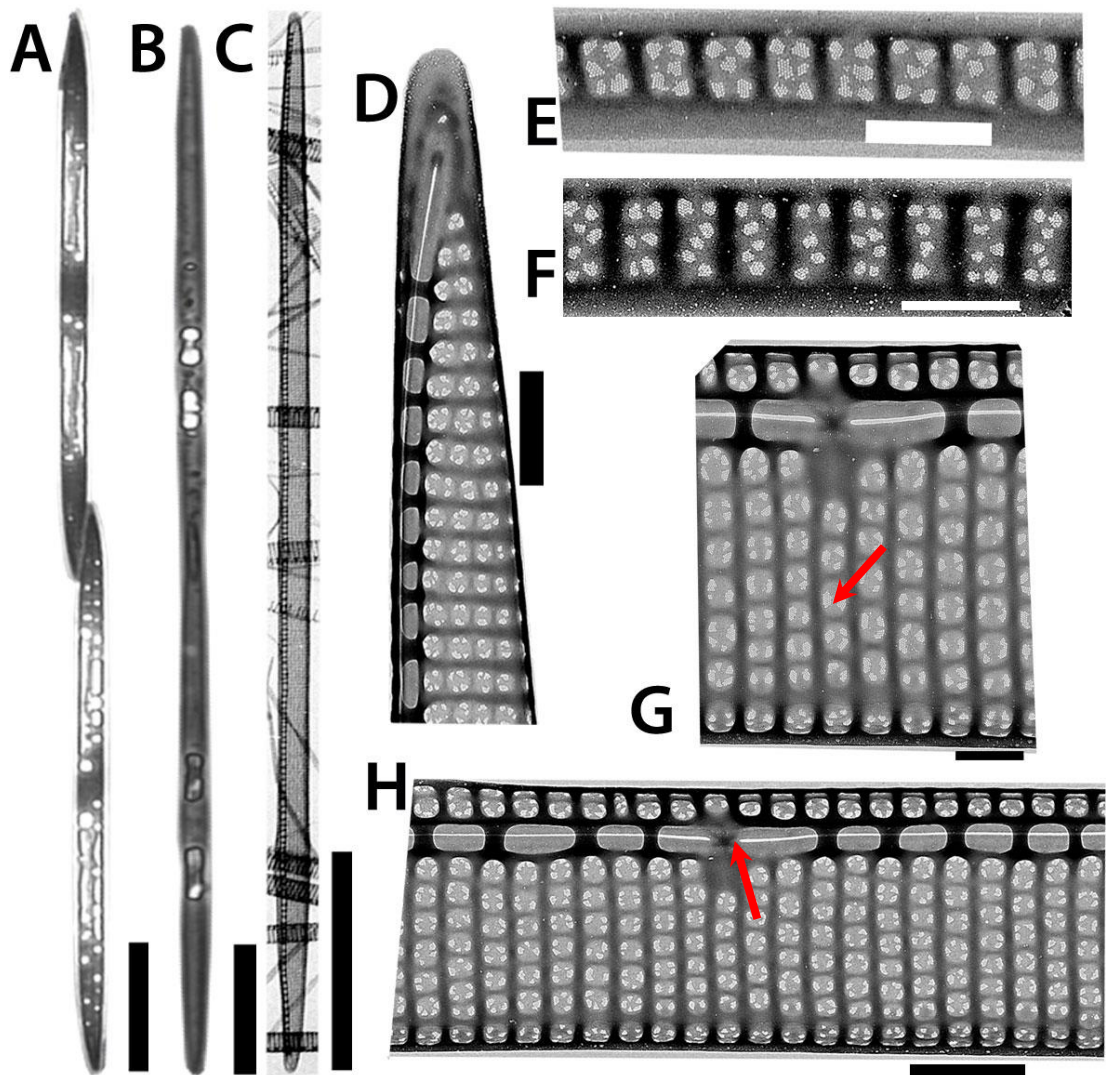


Figura 13. Micrografie di *Psuedonitzschia mannii* al MO (A-B) e al TEM (C-H). A) Catena di 2 cellule in vista commessurale; B) catena di 2 cellule in vista valvare; C) cellula intera in cui è osservabile la forma lineare della cellula; D) punta arrotondata; E) seconda banda cingolare; F) valvocopula; G) poroidi (freccia); H) interspazio centrale (freccia). Scale: 20 μm (A-C), 1 μm (D e H), 0,5 μm (E-G).

Pseudo-nitzschia subfraudulenta

Microscopia ottica. Cellule costituite da valve fusiformi in vista valvare (Figura 14 B), lineari soprattutto nella parte centrale, con apici appuntiti in vista commessurale (Figura 14 A), con apici arrotondati. La loro lunghezza, ovvero l'asse apicale, varia da 88 a 119 μm , la larghezza, l'asse transapicale, varia da 3,5 a 4,3 μm e lo spessore varia da 3,2 a 5,7 μm .

Microscopia elettronica. Il rafe ha un nodulo centrale (Figura 14 E), il quale è lungo da tre a cinque striae. Il numero di interstriae è superiore al numero di fibule, rispettivamente 23-25 e 13-18 in 10 μm . La stria è perforata da due file di poroidi (5-6 poroidi in 1 μm), disposti alternativamente all'interno della stria e perforati da 5-9 settori irregolarmente spazati (Figura 14 F). Ciascuna stria della valvocopula presenta un'ampiezza di due poroidi e un'altezza di 5-7 poroidi (Figura 14 D).

Genetica. I ceppi PS4, PS14 sono stati analizzati dal punto di vista genetico. La determinazione della specie *P. subfraudulenta* è stata confermata dal blast nucleotidico contro le sequenze di *Pseudo-nitzschia* depositate in Genbank.

Tossicologia. I ceppi analizzati (PS4, PS14) non sono risultati positivi all'acido domoico.

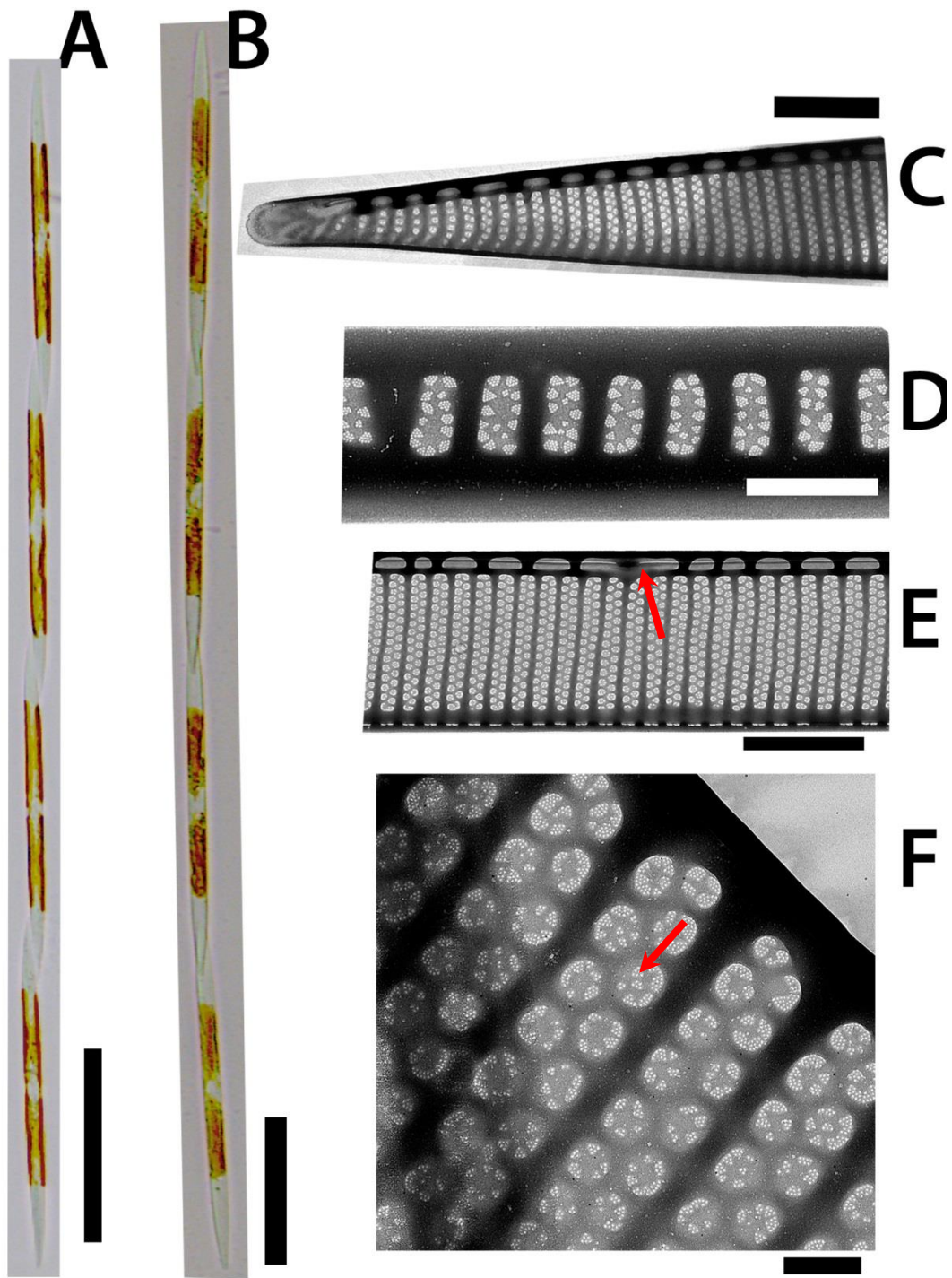


Figura 14. Micrografie di *Pseudo-nitzschia subfraudulenta* al MO (A-B) e al TEM (C-H). A) Catena di 4 cellule in vista commessurale; B) catena di 4 cellule in vista valvare; C) punta arrotondata; D) valvocopula; E) interspazio centrale (freccia) F) poroidi (freccia); Scale: 50 μm (A e B), 2 μm (C e E), 0,5 μm (D), 0,2 μm (F).

Dall'analisi filogenetica basata sull' ITS2 (Figura 15), le sequenze dei ceppi PS10, PS1D, PS3D, e PS4D, morfologicamente assegnati a *P. calliantha*, sono risultate identiche tra loro e clusterizzavano insieme a 2 sequenze di *P. calliantha* presenti in GenBank in un clade ben supportato (97); anche le sequenze dei ceppi PS5, PS8, PS9 e PS11, identificati come *P. mannii*, erano identiche tra loro e alla sequenza presente in GenBank e formavano un clade ben supportato (99); infine, le sequenze dei ceppi PS4 e PS14, identificati come *P. subfraudulenta*, identiche fra loro, formavano un clade ben supportato (85) con la sequenza di GenBank di *P. subfraudulenta*, dalla quale differivano solo per una transizione (T→C).

I cladi di *P. calliantha* e *P. mannii* erano 'sister clade', mentre il clade di *P. subfraudulenta* era 'sister clade' a quello di *P. fraudulenta* e a loro volta formavano un clade non supportato con *P. inflatula* e *P. granii*.

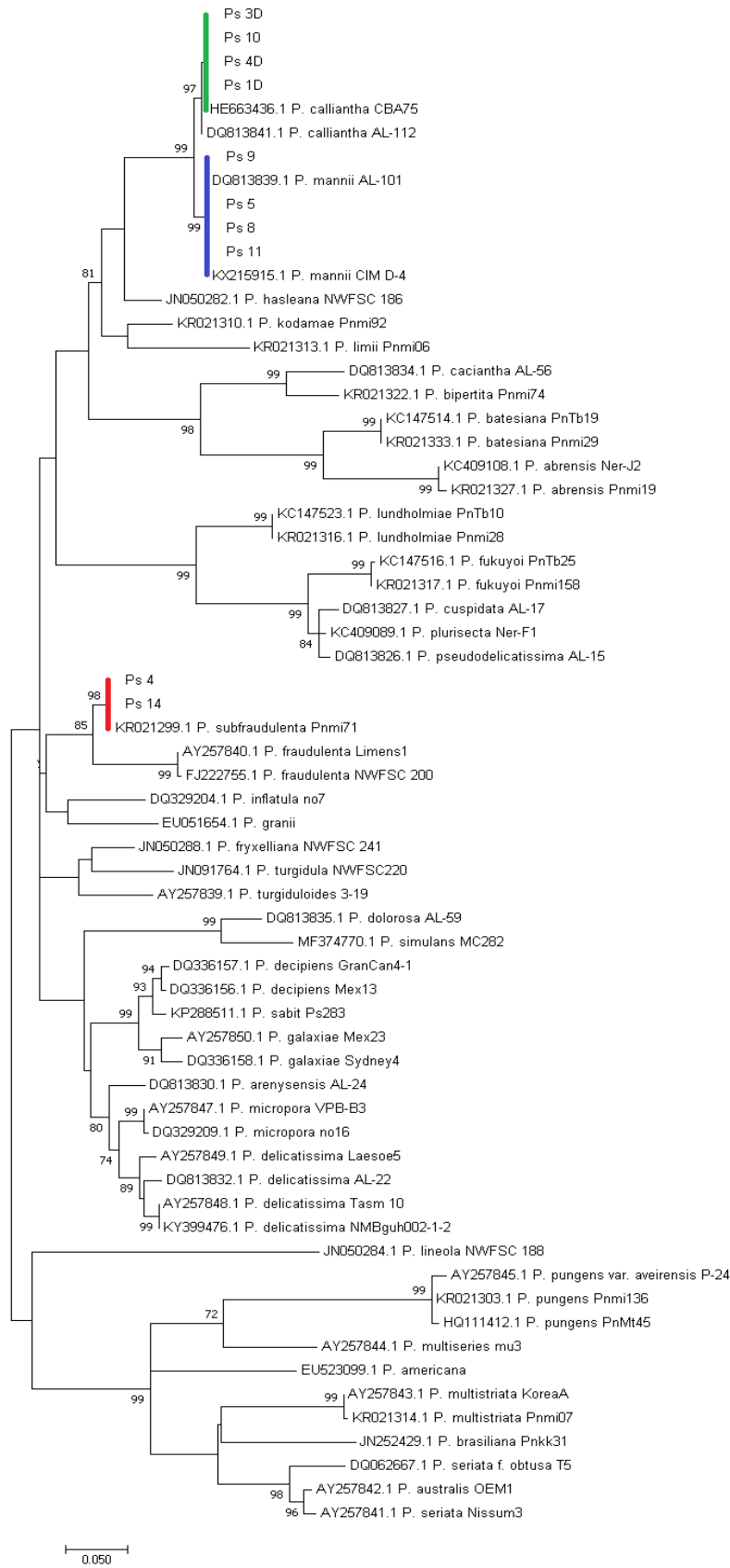


Figura 15. Albero filogenetico ottenuto dall'analisi di Maximum Likelihood (ML) basata sulla regione ITS2 dell'RNA ribosomiale di *Pseudo-nitzschia*. L'albero è privo di outgroup. Solo i valori di bootstrap superiori al 70% sono mostrati. In verde il clade di *P. calliantha*, in blu il clade di *P. mannii* e in rosso il clade di *P. subfraudulenta*.

4.2 DISTRIBUZIONE TEMPORALE DEL GENERE

PSEUDO-NITZSCHIA DAL 2010 AL 2016 NEL GOLFO DI TRIESTE

Tramite il costante monitoraggio alla stazione C1-LTER nell'Area Marina Protetta di Miramare, è stato possibile effettuare le analisi dal 2010 al 2016 dei parametri fisico-chimici dell'acqua e dell'abbondanza cellulare per litro del fitoplancton marino, dal quale vengono distinti i seguenti gruppi: diatomee, dinoflagellati, coccolitofori, e altri flagellati denominati fitoflagellati.

All'interno del gruppo delle diatomee si è analizzato il genere *Pseudo-nitzschia*, all'interno del quale si sono considerati i singoli taxa evidenziabili in microscopia ottica:

- ❖ *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex
- ❖ *Pseudo-nitzschia seriata* complex
- ❖ *Pseudo-nitzschia multistriata*
- ❖ *Pseudo-nitzschia galaxiae*

4.2.1 PARAMETRI FISICO-CHIMICI

I parametri ambientali sono mostrati in Figura 15.

La temperatura, nel periodo 2010-2016, variava tra 4,79 a 28,34 °C con un chiaro ciclo stagionale, con estati calde e inverni anche molto freddi (Figura 16 A). Nei mesi invernali, la temperatura non superava mai 11 °C, con l'eccezione dell'inverno del 2014 con valori sempre compresi tra circa 11 e 14 °C. I valori variavano in media da 4,79 (febbraio 2012) a 13,84 (marzo 2014) °C, con un valore di medio 9,37 °C. Nei mesi estivi, i valori di temperatura oscillavano tra 16,81 (luglio 2010) e 28,34 (luglio 2015), con un valore medio di 22,53 °C.

Per quanto riguarda la salinità, si nota un gradiente stagionale elevato con valori compresi tra 21,66 (maggio 2010) e 38,48 (febbraio 2012) (Figura 16 B). Gli anni 2010 e 2014 avevano i valori di salinità più bassi (in media, 35,62 e 35,95, rispettivamente).

La concentrazione media stagionale dell'azoto inorganico disciolto (DIN) variava da 0,43 a 71,27 μM con un valore medio di 3,28 μM (Figura 16 C). Il picco massimo eccezionale deriva dalla concentrazione del nitrato di 70,30 μM nel gennaio 2014 in superficie. La concentrazione del nitrito era molto bassa (valore medio 0,39 μM) con picchi invernali in tutti gli anni, sopra 1,2 μM fino ad un massimo di 2,2 μM nel dicembre 2015 in superficie, con l'eccezione dell'anno 2010, dove si trovavano valori alti anche in autunno fino a 1,77 μM a novembre. La concentrazione dell'ammonio mostrava un valore medio di 0,95 μM , e si osservavano in tutta la colonna d'acqua dei valori molto alti nell'agosto 2015 (da 4,85 a 5,21 μM), anche se il valore massimo di 5,34 μM , nel periodo esaminato, era nel settembre 2010 a 15 metri di profondità.

La concentrazione del fosfato raggiungeva valori molto bassi, variando da <0,01 a 0,28 μM (valore trovato a 15 metri di profondità nell'agosto 2016) durante il periodo analizzato (Figura 16 D). Invece la concentrazione dei silicati (Figura 16 E) aveva un valore medio di 3,97 μM , con due grandi picchi massimi di 31,70 e 40,73 μM rispettivamente a settembre 2010 a 15 metri (stessa data e profondità del valore massimo della concentrazione di ammonio) e a gennaio 2014 in superficie (in parallelo al valore massimo della concentrazione di nitrato).

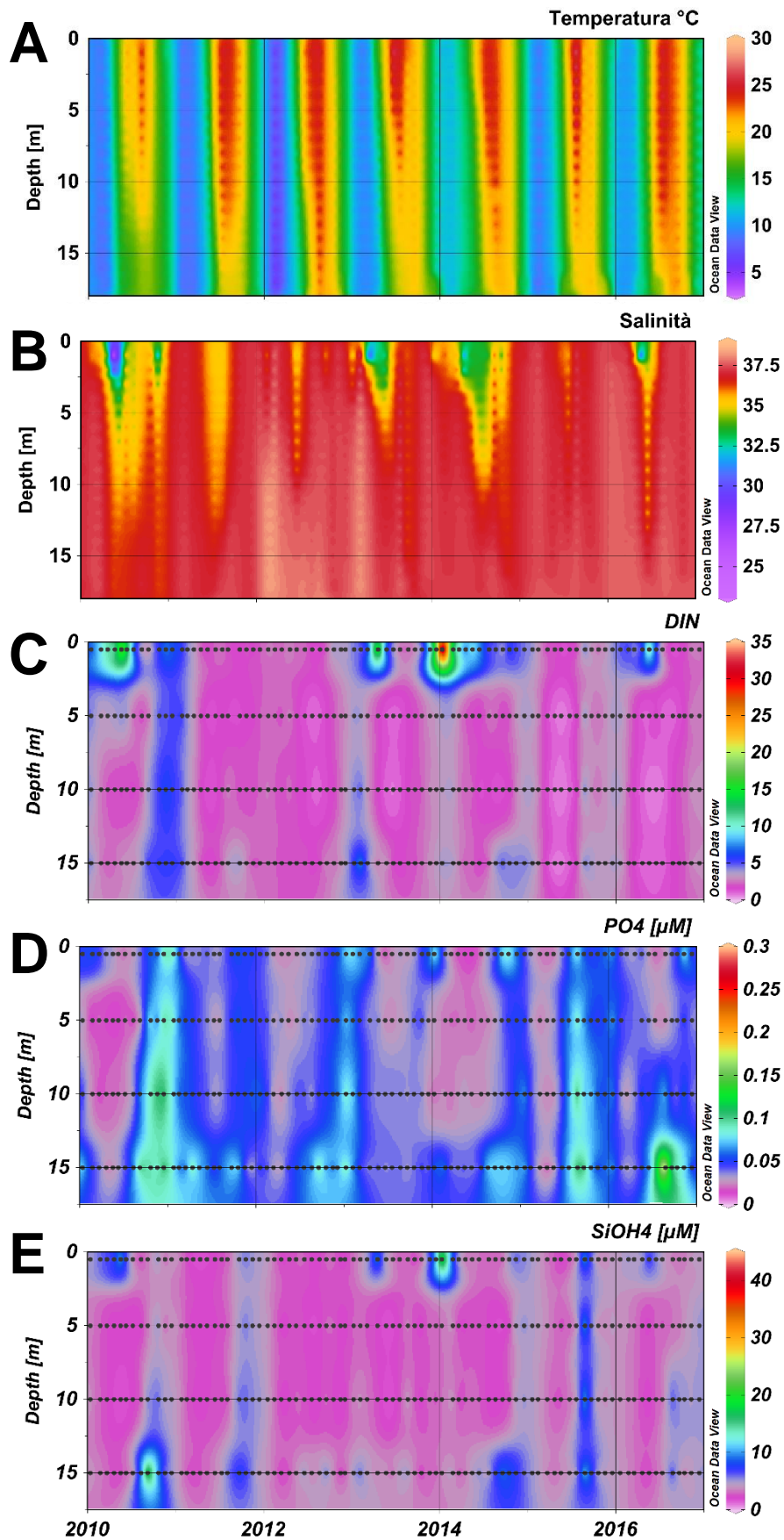


Figura 16. Sezioni verticali dei profili CTD di temperatura (A) e salinità (B) e concentrazioni di azoto inorganico disciolto (DIN: somma di nitrito N-NO₂, nitrato N-NO₃ e ammonio N-NH₄) (C), fosfato P-PO₄ (D), e silicato Si-Si(OH)₄ (E) a profondità discrete alla stazione C1-LTER negli anni 2010-2016.

4.2.2 CICLO STAGIONALE

Durante il periodo esaminato, tramite il metodo Utermöhl è stato possibile determinare l'abbondanza totale del fitoplancton e dei suoi maggiori sottogruppi, e quindi la loro distribuzione stagionale nel Golfo di Trieste. Il ciclo stagionale medio del fitoplancton totale era caratterizzato da valori massimi nei mesi primaverili-estivi (Figura 17 A). I fitoflagellati e le diatomee erano i gruppi più abbondanti, rappresentando rispettivamente il 70% e il 21% del fitoplancton totale (Tabella 4).

Tabella 4. Variabilità stagionale media del fitoplancton totale e dei suoi sottogruppi: diatomee, dinoflagellati, coccolitofori e fitoflagellati. I colori determinano una scala delle abbondanze: dalle più abbondanti (valore massimo in verde) a quelle meno abbondanti (valore minimo in rosso); il colore giallo rappresenta il 50 percentile. I dati rappresentano i valori medi di ciascun mese nei sei anni esaminati e dell'intera colonna d'acqua (0-15 metri).

	Diatomee	Dinoflagellati	Coccolitofori	Fitoflagellati	Fitoplancton tot
Gen	2,47E+04	1,11E+04	1,08E+05	3,33E+05	4,77E+05
Feb	2,35E+05	1,16E+04	6,82E+04	4,74E+05	7,89E+05
Mar	6,73E+05	1,06E+04	7,66E+03	7,18E+05	1,41E+06
Apr	7,19E+05	4,58E+04	2,06E+04	1,48E+06	2,26E+06
Mag	1,47E+06	5,27E+04	3,84E+04	1,72E+06	3,28E+06
Giu	1,88E+05	4,73E+04	1,05E+04	1,83E+06	2,08E+06
Lug	6,75E+05	2,08E+04	8,48E+03	1,62E+06	2,32E+06
Ago	1,61E+05	3,63E+04	6,68E+04	7,50E+05	1,01E+06
Set	8,55E+04	6,43E+04	4,10E+04	8,06E+05	9,97E+05
Ott	2,36E+05	2,09E+04	7,78E+04	5,83E+05	9,18E+05
Nov	5,94E+05	1,10E+04	4,33E+04	3,48E+05	9,96E+05
Dic	7,14E+04	1,34E+04	4,86E+04	3,66E+05	4,99E+05
MIN	2,47E+04	1,06E+04	7,66E+03	3,33E+05	4,77E+05
MAX	1,47E+06	6,43E+04	1,08E+05	1,83E+06	3,28E+06
MEDIA	4,28E+05	2,88E+04	4,49E+04	9,18E+05	1,42E+06

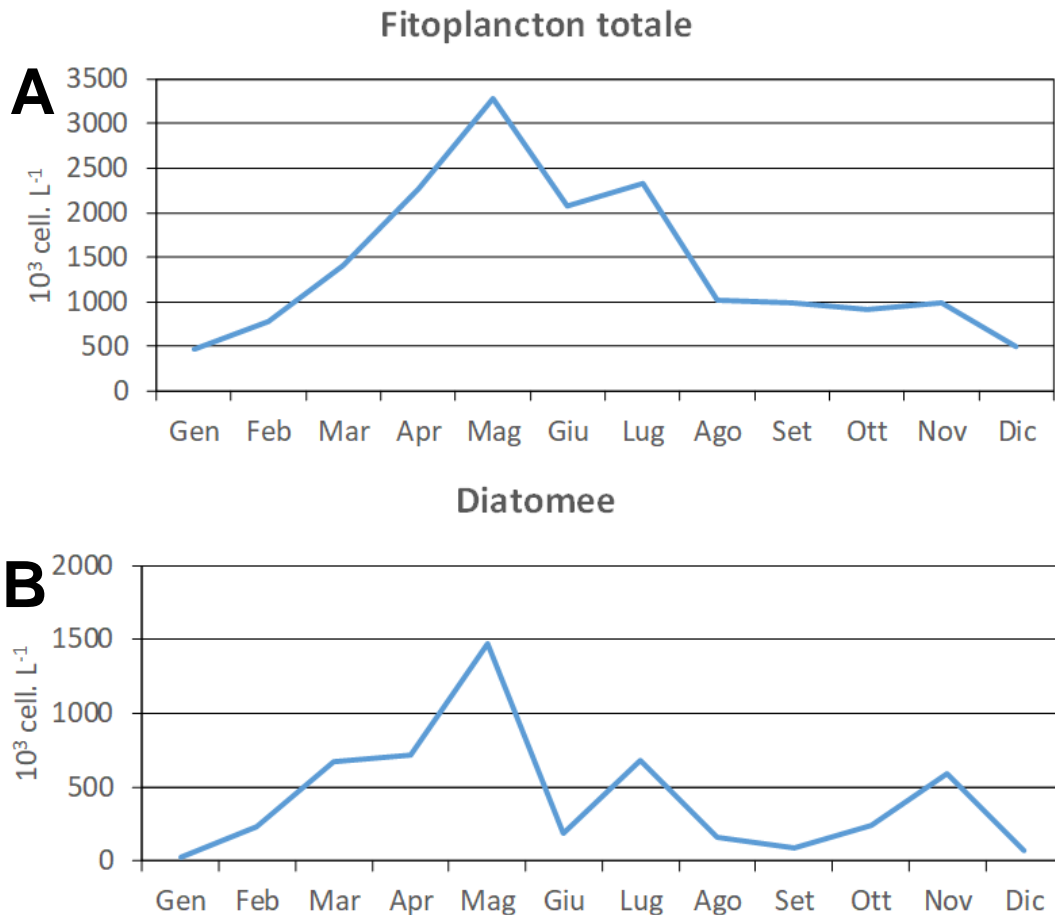


Figura 17. Andamento stagionale medio nel periodo 2010-2016 dell'abbondanza del fitoplancton totale (A) e delle diatomee (B).

Il genere *Pseudo-nitzschia* rappresentava in media il 16% delle diatomee totali ma con valori molto spesso oltre il 50% in differenti periodi dell'anno e con massimi fino al 98% (novembre 2010). Il loro ciclo stagionale medio era caratterizzato dalla presenza di 3 picchi (Figura 18 A):

- Primavera, ad aprile con un valore medio di $2,25 \cdot 10^5$ cellule L⁻¹;
- Estivo, a luglio con un valore di $2,62 \cdot 10^5$ cellule L⁻¹;
- Autunnale, a novembre con un valore medio di $3,79 \cdot 10^5$ cellule L⁻¹.

Quest'ultimo era il picco più elevato durante l'anno, mentre il valore minimo è stato registrato a gennaio con un valore medio di $1,92 \cdot 10^2$ cellule L⁻¹.

Le specie appartenenti al gruppo *P. delicatissima* complex rappresentano il 50% del totale dei taxa di *Pseudo-nitzschia*, per questo motivo il suo andamento era molto simile a quello di *Pseudo-nitzschia* spp., rispetto al

gruppo *P. seriata* complex, il quale mostrava solo un picco nei mesi primaverili (da marzo a maggio) con un valore massimo ad aprile di $2,1 \cdot 10^5$ cellule L⁻¹ (Figura 18 C), rappresentando solamente il 14% dei taxa totali di *Pseudo-nitzschia*.

P. delicatissima complex mostrava un'elevata abbondanza nel mese di novembre (valore medio di $3,6 \cdot 10^5$ cellule L⁻¹) (Figura 18 B). Tipica di questo mese, anche *P. multistriata*, con un picco autunnale da ottobre a dicembre, non molto abbondante (valore medio massimo $3 \cdot 10^2$ cellule L⁻¹), rappresentando solo il 3% dei taxa di *Pseudo-nitzschia* totali (Figura 18 E).

Invece, la specie *P. galaxiae* risultava un po' più abbondante (9% sui taxa totali di *Pseudo-nitzschia*). Il suo ciclo stagionale medio era caratterizzato da due picchi stagionali: primaverile (valore medio di marzo: $8,2 \cdot 10^3$ cellule L⁻¹) e autunnale (valore medio di ottobre: $8,3 \cdot 10^3$ cellule L⁻¹) (Figura 18 D).

Tabella 5. Variabilità stagionale media del genere *Pseudo-nitzschia* totale, includendo la sua suddivisione nei due gruppi principali, *P. delicatissima* complex e *P. seriata* complex, e due specie identificabili in MO (*P. galaxiae* e *P. multistriata*). I colori determinano una scala delle abbondanze: dalle più abbondanti (valori massimi in verde) a quelle meno abbondanti (valori minimi in rosso); il giallo rappresenta il 50 percentile. I dati rappresentano i valori medi di ciascun mese nei sei anni esaminati e dell'intera colonna d'acqua (0-15 metri).

	<i>P. galaxiae</i>	<i>P. multistriata</i>	<i>P. 'delicatissima complex'</i>	<i>P. 'seriata complex'</i>	<i>Pseudo-nitzschia spp.</i>
Gen	53,00	0,00	11,43	131,43	1,96E+02
Feb	159,00	0,00	551,43	1400,00	2,11E+03
Mar	8182,86	0,00	90019,32	1154,29	9,94E+04
Apr	1739,96	10,00	14481,43	208892,14	2,25E+05
Mag	530,14	2,86	34293,18	372,14	3,52E+04
Giu	11,43	0,00	898,57	60,00	9,70E+02
Lug	3882,25	0,00	257719,29	0,00	2,62E+05
Ago	4584,50	0,00	65654,96	2478,57	7,27E+04
Set	4743,50	0,00	27036,89	3241,21	3,50E+04
Ott	8291,43	312,86	57643,36	18997,21	8,52E+04
Nov	4876,00	322,86	365524,50	8187,14	3,79E+05
Dic	141,07	185,71	452,86	1528,57	2,31E+03
MIN	11,43	0,00	11,43	0,00	1,96E+02
MAX	8291,43	322,86	365524,50	208892,14	3,79E+05
MEDIA	3099,60	69,52	76190,60	20536,89	9,99E+04

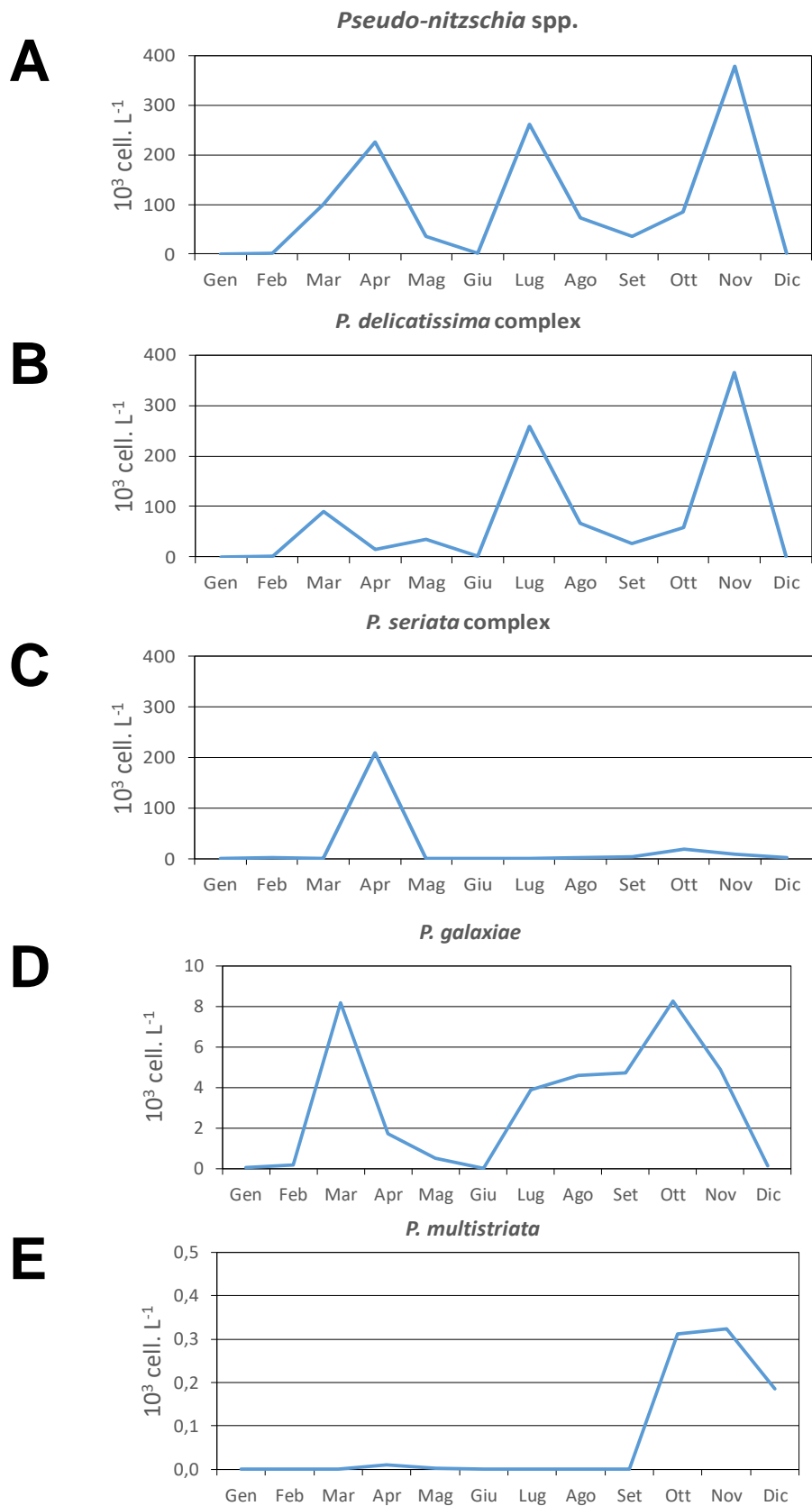


Figura 18. Andamento stagionale medio nel periodo 2010-2016 di: specie totali appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia* (A), *P. delicatissima* complex (B), *P. seriata* complex (C), *P. galaxiae* (D) e *P. multistriata* (E).

4.2.3 VARIABILITÀ INTERANNUALE

Il Golfo di Trieste presenta un'ampia variabilità interannuale per quanto riguarda la comunità fitoplanctonica, anche lungo la colonna d'acqua, l'abbondanza varia da $2,0 \cdot 10^4$ a $9,9 \cdot 10^6$ cellule L^{-1} . Come si nota dalla Figura 19 A in tutto il periodo esaminato vi è un'elevata abbondanza soprattutto sia nei mesi primaverili-estivi, ad eccezione dell'anno 2012, sia nella parte superficiale della colonna d'acqua; si osserva solo nel 2010 un'abbondanza elevata anche a 15 metri di profondità.

Uno dei maggiori gruppi che contribuiscono a questa distribuzione temporale sono le diatomee (Figura 19 B), soprattutto negli anni 2010-2011, a luglio 2010 a 15 metri di profondità e nel resto della colonna d'acqua, nei mesi tra ottobre-dicembre e tra marzo-maggio rispettivamente negli anni. Al contrario, negli anni 2012 e 2016, le fioriture sono meno abbondanti, non si notano picchi elevati, al massimo $1,5 \cdot 10^6$ cellule L^{-1} .

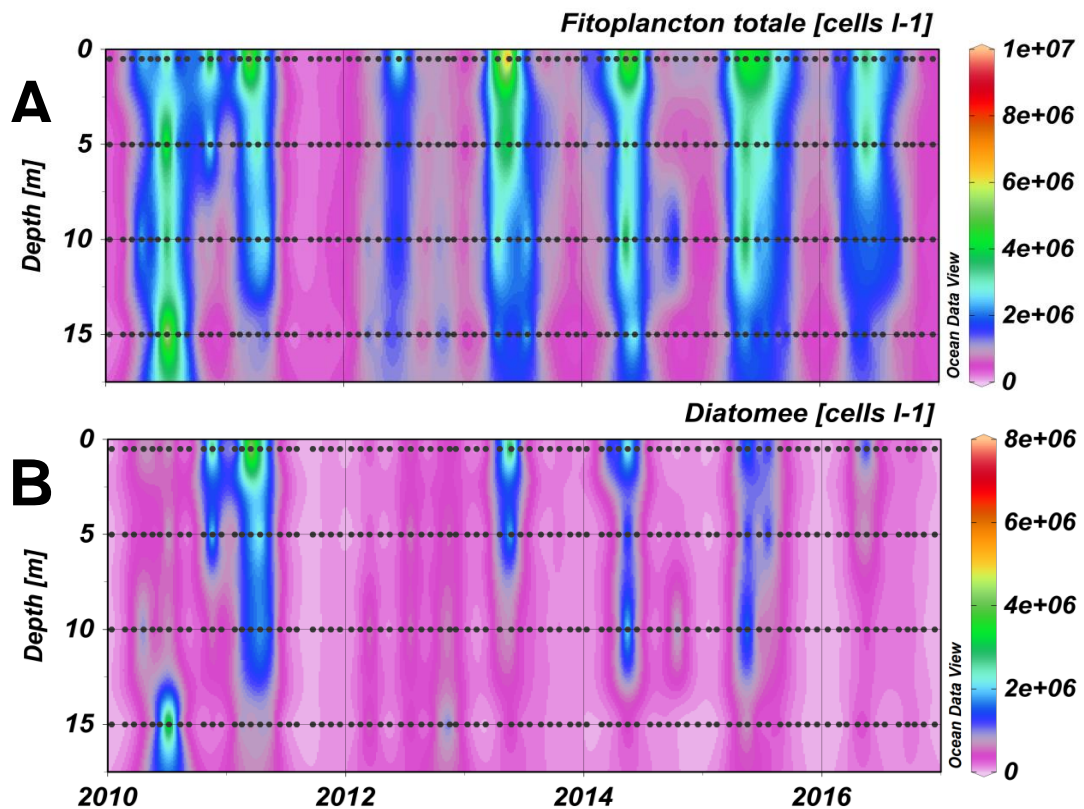


Figura 19. Distribuzione temporale del fitoplancton (A) e delle diatomee (B) nel periodo 2010-2016 lungo la colonna d'acqua (0-15 metri). I punti neri indicano i mesi e le profondità campionati.

Negli anni 2010-2016, *Pseudo-nitzschia* presentava picchi elevati nel luglio 2010 con oltre $5 \cdot 10^6$ cellule L^{-1} a 15 metri di profondità, a novembre 2010 a 0-5 metri e ad aprile 2011 a livello superficiale, da 3 a $5 \cdot 10^6$ cellule L^{-1} (Figura 20 A).

I differenti taxa mostravano un'elevata variabilità interannuale. *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex, per esempio, era il taxon più abbondante ma con densità molto diverse nei vari anni con massimi nell'anno 2010 (fino a $5 \cdot 10^6$ cellule L^{-1}) e valori più bassi nel 2012, 2014 e 2015 (Figura 20 B). Al contrario, *Pseudo-nitzschia seriata* complex era più abbondante nell'anno 2011 ($2,6 \cdot 10^6$ cellule L^{-1}) ma poi presente in bassissime abbondanze negli anni successivi (Figura 20 C). A livello specifico sono state analizzate le specie *P. galaxiae* e *P. multistriata*. Durante il periodo esaminato *P. galaxiae* (Figura 20 D) è risultata molto abbondante negli anni 2010 e 2013, soprattutto nell'anno 2013 si nota un'abbondanza elevata nei mesi estivi negli strati più profondi e verso la superficie in autunno con valori più abbondanti fino a $1,1 \cdot 10^5$ cellule L^{-1} .

Invece la specie *P. multistriata* (Figura 20 E) è meno frequente e abbondante, raggiunge solamente valori di $6.9 \cdot 10^3$ cellule L⁻¹ in autunno nell'anno 2013 a 5 metri di profondità, corrispondenti al picco più elevato durante il periodo analizzato. Un picco meno abbondante si nota anche nell'anno 2014, lungo tutta la colonna d'acqua, sempre nel tardo autunno.

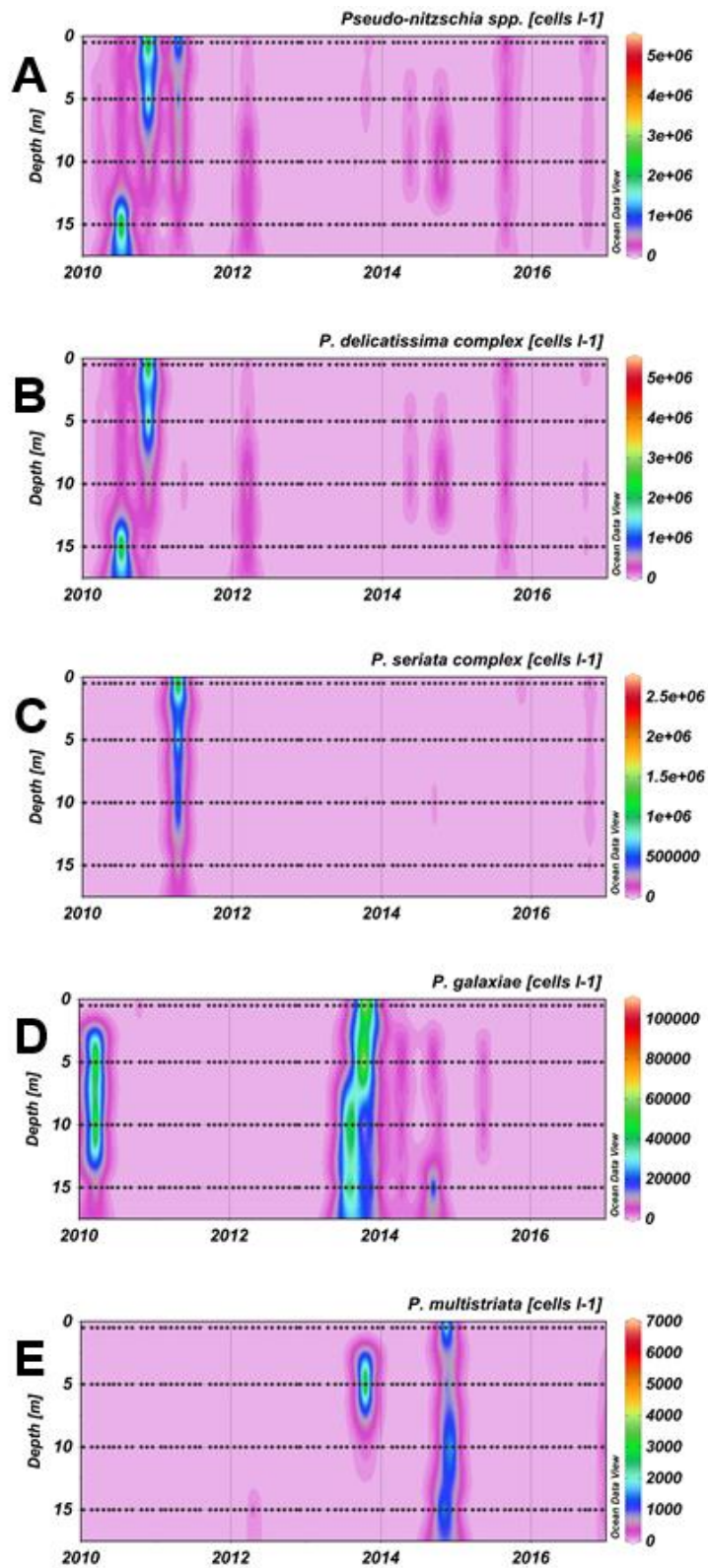


Figura 20. Distribuzione temporale di: specie totali del genere *Pseudo-nitzschia* (A), *P. delicatissima* complex (B), *P. seriata* complex (C), *P. galaxiae* (D) e *P. multistriata* (E), nel periodo 2010-2016 lungo la colonna d'acqua (0-15 metri). I punti neri indicano i mesi e le profondità campionati.

Dalle osservazioni al TEM, sono state individuate 6 specie diverse appartenenti sia al gruppo *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex sia al gruppo *Pseudo-nitzschia seriata* complex:

- *P. subfraudulenta* (Figura 21 A e B). Asse transapicale: 3,9-4,7 μm ; nodulo centrale presente; fibulae in 10 μm : 12-15; interstriae in 10 μm : 23-25; poroidi in 1 μm : 5; 2 righe di poroidi.
- *P. calliantha* (Figura 21 C e D). Asse transapicale: 1,2-1,8 μm ; nodulo centrale presente; fibulae in 10 μm : 16-23; interstriae in 10 μm : 29-38; poroidi in 1 μm : 4-5; 1 riga di poroidi, divisi in 5-10 settori.
- *P. cf. pseudodelicatissima* (Figura 21 E e F). Asse transapicale: 1,1-1,4 μm ; nodulo centrale presente; fibulae in 10 μm : 22-24; interstriae in 10 μm : 38-40; poroidi in 1 μm : 4-7; 1 riga di poroidi, divisi in 2 settori.
- *P. cf. delicatissima* (Figura 22 A e B). Asse transapicale: 0,9-1,5 μm ; nodulo centrale presente; fibulae in 10 μm : 20-23; interstriae in 10 μm : 33-44; poroidi in 1 μm : 8-10; 2 righe di poroidi.
- *P. fraudulenta* (Figura 22 C e D). Asse transapicale: 4,7-5,7 μm ; nodulo centrale presente; fibulae in 10 μm : 17-21; interstriae in 10 μm : 21-23; poroidi in 1 μm : 5; 2 righe di poroidi.
- *P. pungens* (Figura 22 E e F). Asse transapicale: 2,3-3,3 μm ; fibulae in 10 μm : 11-12; interstriae in 10 μm : 10-12; poroidi in 1 μm : 2-4; 2 righe di poroidi.

L'identificazione non è sempre precisa poichè le misure sono limitate e incomplete a causa dello stato di conservazione dei campioni, quindi spesso non è stato possibile misurare la lunghezza e lo spessore al TEM.

Nell'anno 2010, come si nota dal grafico (Figura 20 B), *P. delicatissima* complex presentava due picchi elevati di abbondanza, uno estivo e uno autunnale. Analizzando al TEM i campioni, sono state individuate due specie: *P. cf. delicatissima* (Figura 22 A e B) a luglio e *P. calliantha* (Figura 21 C e D) a novembre. Anche nell'aprile 2011 e nel marzo 2012 era presente la specie *P. cf. delicatissima*, anche se nella primavera del 2011, come si nota nella Figura 20 C, c'è stata un'abbondanza elevata anche delle specie appartenenti

a *P. seriata* complex, sebbene non siano state individuate specie appartenenti a questo gruppo al TEM.

Nell'anno 2013, *P. galaxiae* mostrava un picco elevato in autunno (Figura 20 D), ma questa specie non è stata ritrovata nei campioni osservati al TEM probabilmente perché essendo molto delicata potrebbe non essersi ben conservata. È stata invece trovata *P. subfraudulenta* (Figura 21 A e B) a novembre.

Invece nell'ottobre 2014 c'è stata una fioritura comprendente diverse specie: *P. cf. pseudodelicatissima* (Figura 21 E e F), *P. cf. delicatissima* e *P. calliantha*. Al microscopio ottico queste specie sono risultate nel gruppo *P. delicatissima* complex (Figura 20 B).

Nell'estate 2015, sono state identificate nel mese di agosto *P. cf. delicatissima* e *P. fraudulenta* (Figura 22 C e D). Quest'ultima specie è stata trovata anche nel febbraio 2016, insieme a *P. pungens* (Figura 22 E e F).

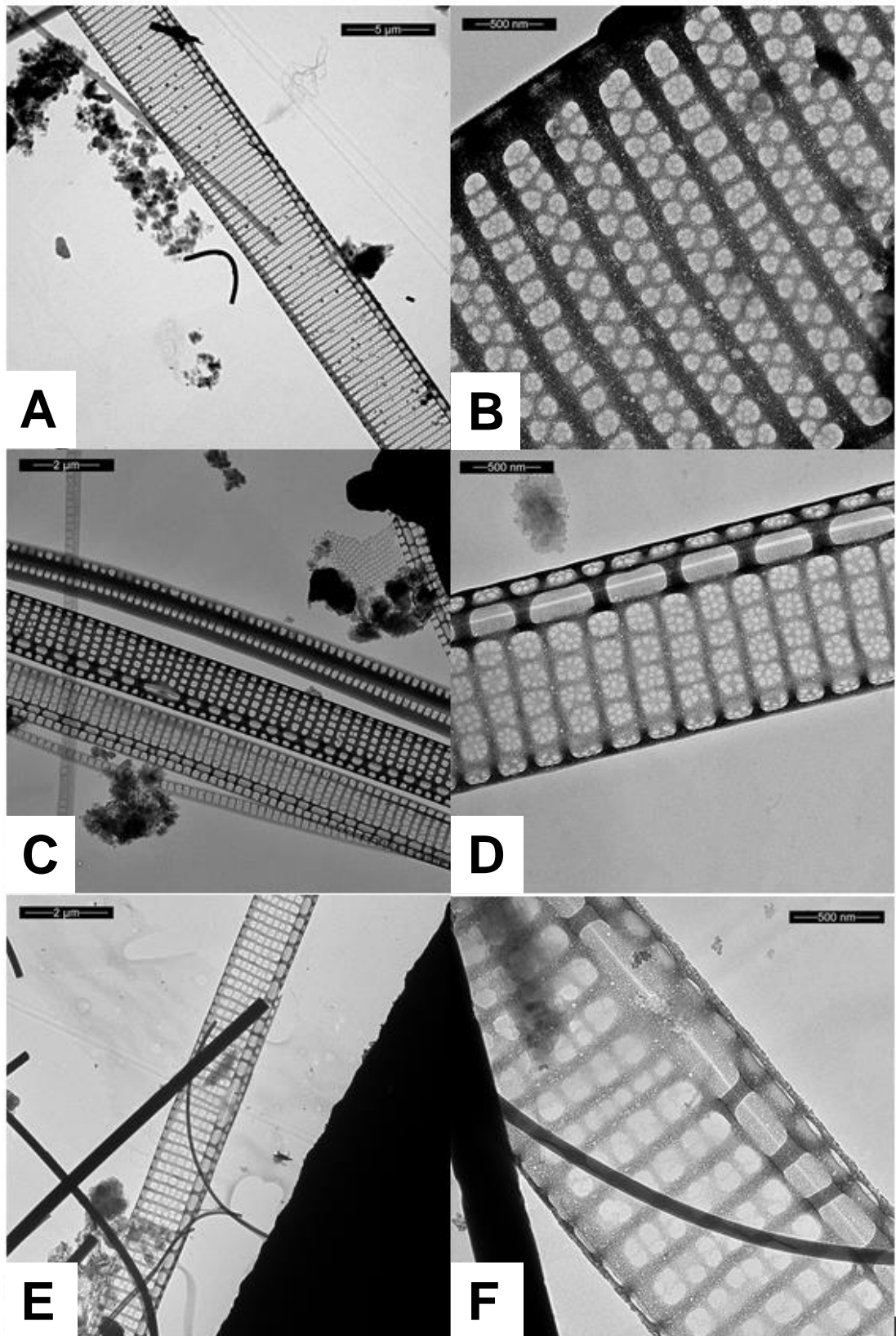


Figura 21. Micrografie al TEM di specie di *Pseudo-nitzschia* spp.: *P. subfraudulenta*, valva lineare (A), *P. subfraudulenta*, poroidi (B), *P. calliantha*, due frustuli diversi, uno più silicizzato dell'altro (C), *P. calliantha* poroidi con settori disposti a fiore (D), *P. cf. pseudodelicatissima*, interspazio centrale (E), *P. cf. pseudodelicatissima*, poroidi (F).

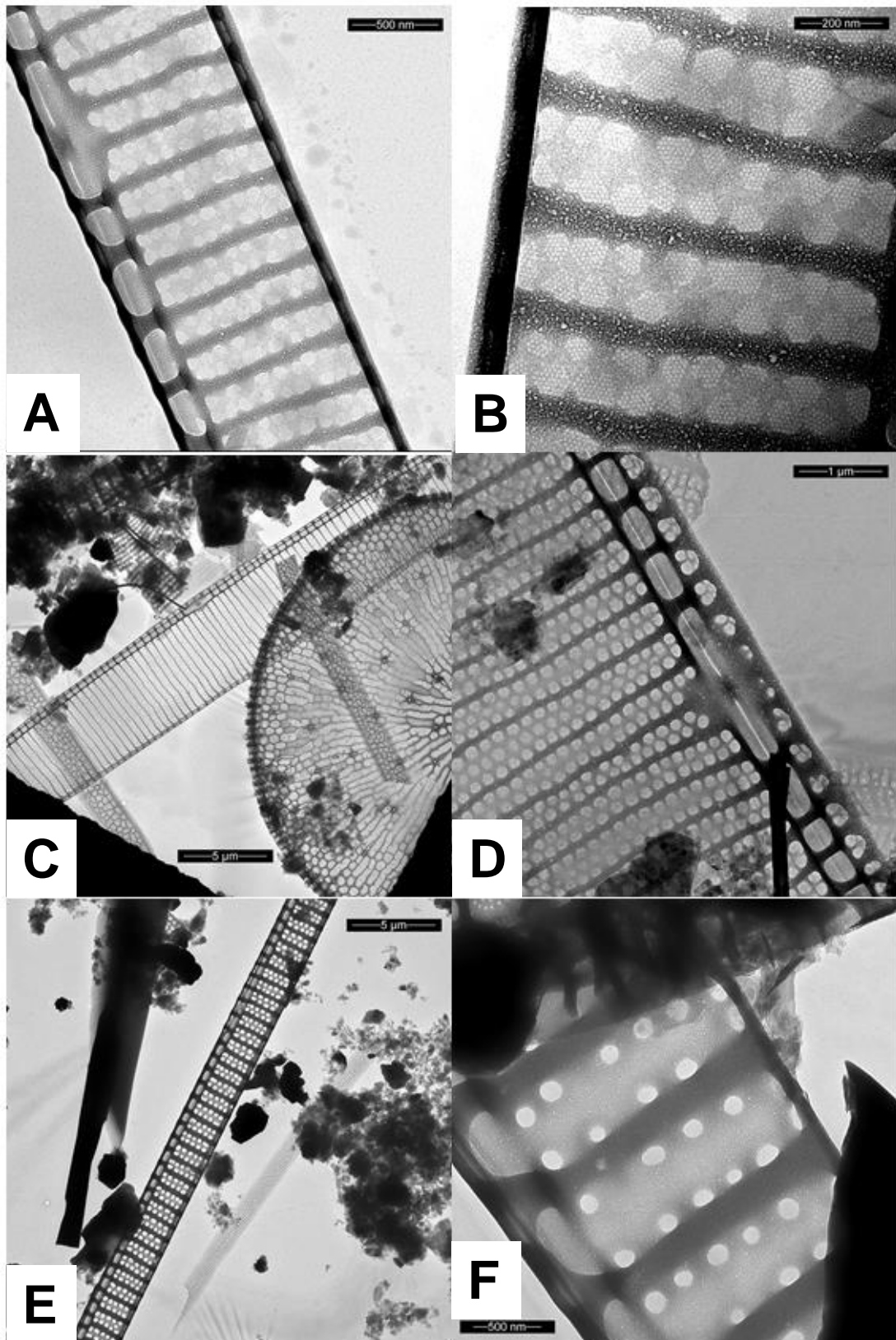


Figura 22. Micrografie al TEM di specie di *Pseudo-nitzschia* spp.: *P. cf. delicatissima*, interspazio centrale (A), *P. cf. delicatissima* poroidi (B), *P. fraudulenta*, interspazio centrale (C) *P. fraudulenta*, poroidi (D), *P. pungens*, striae (E) *P. pungens*, poroidi (F).

5. DISCUSSIONE

5.1 DIVERSITÀ MORFOLOGICA E GENETICA

L'identificazione delle specie appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia*, come per molte diatomee, si basa sulla morfologia del frustulo. Tuttavia, molti caratteri necessari per l'identificazione non sono visibili in microscopia ottica, da cui l'impossibilità spesso di riconoscere gli organismi a livello di specie. Inoltre, la scoperta di un numero sempre maggiore di specie criptiche o pseudocriptiche ha determinato ulteriori difficoltà e ambiguità. Una precisa identificazione infatti è possibile solo combinando osservazioni morfologiche in microscopia ottica ed elettronica con analisi genetiche (Amato e Montresor, 2008; Lundholm et al., 2012). Finora, le sequenze nucleari del gene ribosomiale si sono rivelate uno dei migliori marcatori molecolari per la caratterizzazione molecolare e filogenetica per le specie di *Pseudo-nitzschia* (Hubbard et al., 2008). Nelle diatomee, le regioni 18S del rDNA hanno tassi evolutivi conservativi e sono considerate inadeguate per l'analisi delle relazioni filogenetiche, eccetto per i più alti livelli tassonomici (Medlin et al., 1993; Sorhannus 1997, 2007; Zhang et al., 2007; Moniz e Kaczmariska, 2010; Lundholm et al., 2012). Le regioni spaziatrici non codificanti ITS1 e ITS2 esibiscono invece una variazione genetica migliore per il genere *Pseudo-nitzschia*, perciò vengono utilizzate per le analisi filogenetiche a livello intergenerico, interspecifico e intraspecifico (Coleman 1999; Lundholm et al., 2003, Lim et al., 2016; Grbin et al., 2017).

In questo studio, dalle osservazioni ultrastrutturali al TEM e dall'analisi molecolare dei ceppi isolati nell'ottobre 2016 nel Golfo di Trieste, sono state individuate 3 specie appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia*: *P. calliantha*, *P. mannii* e *P. subfraudulenta*.

P. mannii e *P. calliantha* fanno entrambe parte del morfotipo *P. pseudodelicatissima* complex, identificabili al MO dagli apici appuntiti delle cellule in vista commesurale e dall'ampia zona di sovrapposizione delle

cellule in colonia (Hasle 1965; Hasle et al., 1996). Tuttavia, in MO, sono difficilmente distinguibili, differiscono infatti per la disposizione uniseriata e la densità dei poroidi e per il numero di settori dell'imene del poroide (Lundholm et al., 2003). I dati morfometrici di *P. calliantha* ricavati in questo studio sono in accordo con quelli della descrizione originale della specie (Lundholm et al., 2003), mentre differiscono da quelli riportati in altri studi, come per esempio nell'Adriatico (Marić et al., 2011; Burić et al., 2008; Caroppo et al., 2005), nel Mediterraneo nord- occidentale (Quijano- Scheggia et al., 2008), o nel Mar Tirreno (Amato et al., 2007). La morfometria delle cellule di *P. mannii* è conforme alla descrizione originale della specie (Amato e Montresor, 2008) e corrisponde anche alle misure effettuate nello studio di Moschandreou et al. (2010). Confrontando con altri ceppi individuati nell'Adriatico settentrionale la maggior parte dei dati morfometrici corrispondono, con l'eccezione dell'ampiezza della valva che risultava 1.5-2.6 μm in questo studio, ma leggermente più stretta (1.3-1.8 μm) in Ljubešić et al. (2011) e Grbin et al. (2017). La comparazione con le sequenze presenti in GeneBank confermava l'assegnazione dei nostri ceppi a *P. calliantha* e *P. mannii*. Nell'analisi filogenetica dell'ITS2, i ceppi di *P. calliantha* e di *P. mannii* formavano due 'sister clades' ben supportati confermando risultati precedenti (Amato et al., 2008, Grbin et al., 2017; Lim et al., 2018).

La specie *P. subfraudulenta* è molto simile a *P. fraudulenta*, da cui si distingue per il numero maggiore di interstriae per fibula, e per la forma della valva che risulta lineare quasi fino agli apici in *P. subfraudulenta*, invece curva per tutta la lunghezza in *P. fraudulenta*. Inoltre, condividono la somiglianza della struttura dei poroidi avendo due righe di poroidi divisi in settori: più frammentati in *P. subfraudulenta* rispetto a *P. fraudulenta*. Per questa specie non è stato possibile confrontare la morfometria con ceppi dell'Adriatico dove tale specie non è mai stata riportata in studi precedenti. Nel Mediterraneo invece è stata riportata soltanto nello studio di Moschandreou e Nikolaidis (2010), ma le misure non corrispondono: nel nostro studio l'asse apicale era 87-120 μm e l'asse transapicale era 3.5-4.3 μm rispetto ai ceppi greci più corti e larghi (70-78 μm e 4.3-5 μm , rispettivamente). Risultano, invece, più concorde le misure effettuate negli studi di Teng et al. (2016) nell' Asia sud-orientale, anche se

l'asse transapicale nel presente studio risulta sempre leggermente più stretto. La comparazione con le sequenze presenti in GeneBank confermava l'assegnazione dei nostri ceppi a *P. subfraudulenta*. Nell'analisi filogenetica dell'ITS2, i ceppi di *P. subfraudulenta* formavano un 'sister clade' ben supportato con *P. fraudulenta* come già osservato in studi precedenti (Lim et al., 2018).

L'osservazione al TEM di campioni naturali nel periodo 2010-2016 ha evidenziato la presenza di altre specie nel Golfo di Trieste: *P. cf. delicatissima*, *P. cf. pseudodelicatissima*, *P. pungens* e *P. fraudulenta*.

L'identificazione della specie *P. delicatissima* risulta difficile: morfologicamente non ci sono differenze con la specie *P. arenysensis* (Quijano-Scheggia et al., 2009), perciò in questo studio viene identificata come *P. cf. delicatissima*. *P. delicatissima* può, in realtà, comprendere diverse specie criptiche (Amato et al., 2007).

La specie *P. cf. pseudodelicatissima* presentava misure in accordo con quelle effettuate da Hasle (1965) e Lundholm et al. (2003), ma non è stato possibile differenziarla dalla specie *P. cuspidata*, a causa delle limitate misure al TEM, soprattutto per quanto riguarda l'asse apicale, importante per queste due specie, che possono essere distinte dalla forma della valva: in *P. pseudodelicatissima* è lineare, mentre in *P. cuspidata* è lanceolata (Lundholm et al., 2003). Tuttavia, l'ampiezza della valva di *P. pseudodelicatissima* risultava più stretta rispetto a quella di *P. cuspidata* (Lundholm et al., 2003), perciò per le misure effettuate dell'asse transapicale è stata decisa l'assegnazione a *P. cf. pseudodelicatissima*.

P. pungens, invece, può presentare sottili variazioni dei caratteri morfologici e genetici tra ceppi isolati in regioni molto lontane (Casteleyn et al., 2008). Tutte le specie registrate in Grecia infatti corrispondono a *P. pungens* var. *pungens*, la quale è distribuita ampiamente in entrambi gli emisferi delle acque temperate (Casteleyn et al., 2008; 2009).

Al microscopio ottico è stato possibile identificare soltanto due specie: *P. galaxiae* e *P. multistriata*. Le cellule di *P. galaxiae* sono sottili e debolmente silicizzate, per questo motivo probabilmente non sono state individuate al TEM, come per esempio nei campioni di ottobre 2014 dove si registravano

elevate abbondanze (Figura 18 D). Esistono tre morfotipi, osservati nel Mediterraneo (Cerino et al., 2005): cellule più corte ($< 10 \mu\text{m}$), cellule medie ($25\text{-}41 \mu\text{m}$) e cellule più lunghe ($> 82 \mu\text{m}$). Il morfotipo più piccolo risulta con una forma diversa dalle altre specie di *Pseudo-nitzschia*, dove l'asse transapicale diminuisce proporzionalmente molto di più rispetto all'asse apicale. Perciò potrebbe essere difficilmente identificata al MO, soprattutto perché si osservano come cellule singole e raramente in coppia, perché l'estremità delle cellule sono troppo corte per permettere la sovrapposizione per la formazione di una colonia stabile (Cerino et al., 2005). Invece, le cellule di *P. multistriata* sono facilmente identificabili al MO perché in vista commensurale hanno una caratteristica forma sigmoide, conferendo alla colonia una forma ondulata.

5.2 TOSSICITÀ

Alcune specie appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia* sono potenziali produttrici di acido domoico, il quale può indurre nell'uomo la sindrome ASP. Poiché queste specie sono spesso abbondanti nella comunità fitoplanctonica dell'Adriatico settentrionale, il rischio di trasferimento dell'acido domoico ai livelli trofici più elevati è abbastanza probabile. E in effetti, valori fino a $6.55 \mu\text{g g}^{-1}$ sono stati occasionalmente rilevati nei mitili del Mar Adriatico, lungo la costa orientale (Marić et al., 2011). Di conseguenza ciò rende importante il monitoraggio e il controllo a livello specifico di questo genere, anche se l'acido domoico è sempre stato rilevato sotto i limiti di legge (Arapov et al., 2016; Ciminiello et al., 2005; Ujevic' et al., 2010).

Durante lo sviluppo di un bloom di *Pseudo-nitzschia*, l'aumento della produzione dell'acido domoico si osserva nella fase stazionaria di crescita (Fehling et al., 2005; Trainer et al., 2009). Fioriture di *Pseudo-nitzschia* spp. sono definite come HABs e sono state spesso relazionate ai regimi dei nutrienti modificati dalla pressione antropica (Gilbert et al., 2005).

L'abilità di produrre acido domoico è ceppo-specifica (Bates, 1998; Thessen et al., 2009; Lelong et al., 2012; Trainer et al., 2012) e la produzione di tossine può variare in differenti stadi di crescita (Lelong et al., 2012) e con le diverse

condizioni ambientali. Infatti, per esempio, *P. calliantha* è stata trovata produttrice di acido domoico in diverse aree del mondo, tuttavia in coltura alcuni ceppi sono risultati tossici (Martin et al., 1990, Lundholm et al., 1997, 2003; Besiktepe et al., 2008, Zingone et al., 2006, Thessen et al., 2009; Marić et al., 2011), mentre altri no (Orsini et al., 2002; Lundholm et al., 2003; Besiktepe et al., 2008, Penna et al., 2012), come nel caso del presente studio. In uno studio effettuato nel Golfo di Trieste nel 2005 moderate abbondanze ($5,4 \cdot 10^3$ cellule L⁻¹) di *P. calliantha* furono rilevate ma le concentrazioni di acido domoico risultavano al di sotto del limite di rilevamento (Honsell et al. 2006). Questo fatto può significare o un'abbondanza di *P. calliantha* troppo bassa oppure la presenza di alcuni ceppi non tossici. Nelle culture osservate nello studio di Thessen et al. (2009), la produzione di acido domoico avviene soltanto nella fase stazionaria, una volta che le cellule smettono di dividersi e la cultura è limitata da fosforo o silicio, ma con sufficiente azoto. Ciò è stato confermato anche nello studio di Marić et al. (2011), dove è stata rilevata la produzione di acido domoico nel bloom di *P. calliantha*, quando la popolazione era già in tarda fase stazionaria e limitata da nutrienti. Tali osservazioni possono spiegare perché in questo studio non è stato rilevato acido domoico: infatti le culture non erano fosforo e silicio limitate e le cellule sono state prelevate per l'analisi tossicologica durante la fase di crescita esponenziale. Finora, nessuna tossicità è stata associata con la specie *P. mannii*, né in questo studio né in studi precedenti. La specie è stata riportata per la prima volta nel Mar Adriatico nello studio di Ljubesić et al. (2011) e precedentemente è stata descritta e riportata soltanto nel Mar Tirreno (Amato e Montresor, 2008).

P. subfraudulenta è stata riportata per la prima volta come produttrice di acido domoico nello studio di Teng et al. (2016): i livelli di tossicità sono relativamente bassi comparati ad altre specie altamente tossiche (Trainer et al., 2012), ma comparabili a quelli di *P. delicatissima* (Baugh et al., 2006), *P. calliantha* e *P. fraudulenta* (Thessen et al., 2009). In studi precedenti, alcuni ceppi di questa specie sono stati riportati con livelli di acido domoico non rilevabili (Alvarez et al., 2009; Teng et al., 2014).

P. galaxiae e *P. multistriata*, specie monitorate costantemente nel Golfo di Trieste visto la facilità di riconoscerle al MO, risultano entrambe tossiche in diversi studi nel Mediterraneo (Cerino et al., 2012; Pistocchi et al., 2012; Zingone et al., 2006). *P. multistriata*, oltre ad essere potenzialmente tossica, può essere considerata specie aliena invasiva (Corriero et al., 2016; Mozetič et al., 2017). Recentemente è stata campionata nelle acque di zavorra di navi ormeggiate nei porti di Venezia e di Koper (Cabrini et al., 2018), dimostrando come questo potrebbe essere uno dei meccanismi di dispersione di tale specie da un mare ad un altro. È stata descritta nei mari giapponesi ed è stata per la prima volta osservata nelle acque costiere occidentali italiane nel 1995 (Zingone et al., 2003). Più tardi è stata trovata anche in Grecia (Moschandreou e Nikolaidis, 2010) e nell'Adriatico occidentale (Pistocchi et al., 2012). Dal 2015 in poi, questa specie è stata regolarmente osservata nella comunità fitoplanctonica della parte meridionale del Golfo di Trieste (Francè, risultati non pubblicati), mentre nella parte settentrionale del Golfo era già registrata dal 2005 (Mozetič et al., 2017). *P. galaxiae* nella descrizione originale (Lundholm e Moestrup, 2002) non era descritta come tossica, mentre ceppi isolati nel Golfo di Napoli mostravano bassi livelli di tossicità (Cerino et al., 2005).

Le altre specie identificate al TEM in questo studio sono tutte specie potenzialmente tossiche, alcune delle quali vengono riportate come tossiche in alcune aree ma non in altre. Per esempio, *P. delicatissima* è un complesso di specie criptiche contenente sia ceppi tossici (Fryxell et al., 1997) che ceppi non tossici (Fehling et al., 2005). Il genotipo e le condizioni ambientali, incluso lo stato nutrizionale, sono stati indicati come inneschi della variabilità nella produzione di tossine (GEOHAB, 2005). Nell'Adriatico nord-occidentale, alcuni ceppi di *P. delicatissima* sono risultati produrre bassi livelli di acido domoico (Penna et al., 2012), mentre in altri luoghi del Mar Mediterraneo altri ceppi non sono risultati tossici (Orsini et al., 2002; Quijano- Scheggia et al., 2010).

Ceppi di *P. pseudodelicatissima* nel Mar Mediterraneo sono stati riportati tossici (Moschandraou et al., 2010). Tuttavia la variabilità morfologica, genetica ed ecologica di questa specie non è ancora stata completamente esaminata (Hallegraeff, 1994; Priisholm et al., 2002; Lundholm et al., 2003; Kaczmarska et al., 2005).

P. pungens è una specie di quelle più comunemente riportate come potenzialmente tossiche (Hasle, 2002). Cloni isolati da varie aree geografiche esibivano capacità differenti di produrre acido domoico (Hasle, 1995; Bates et al., 1998; Trainer et al., 1998; Rhodes et al., 1996; Chepurnov et al., 2005; Casteleyn et al., 2008). Tuttavia nel Mar Mediterraneo questa specie è stata descritta come non tossica (Trainer et al., 2012; Penna et al., 2012).

Questa discrepanza, tra ceppi tossici e non tossici, potrebbe essere relazionata all'influenza delle condizioni di coltura, alla sensibilità variabile nei metodi utilizzati per l'analisi e alle variazioni nel numero totale di cellule analizzate (Penna et al., 2012).

5.3 ECOLOGIA

L'aumento del numero di specie tossiche e degli eventi dannosi potrebbe essere una conseguenza del riscaldamento globale (Hallegraff, 2010) con conseguenti alterazioni nelle dinamiche dei microrganismi marini. Diversi studi dimostrano che la biodiversità del Mar Mediterraneo sta subendo alterazioni rapide, ma molti di questi studi si riferiscono a organismi macroscopici e poco si conosce riguardo i cambiamenti delle comunità fitoplanctoniche (Gomez, 2010). Perciò è importante aumentare la comprensione della struttura della comunità fitoplanctonica attraverso l'analisi di serie temporali in aree dove si svolge un monitoraggio continuo nel tempo e nello spazio.

Infatti, precedenti analisi delle serie temporali alla stazione C1-LTER nel Golfo di Trieste hanno fornito importanti informazioni sulle variazioni stagionali e interannuali nell'abbondanza e nella composizione del fitoplancton dal 1986 (Cabrinì et al., 2012). Nell'Adriatico settentrionale diversi cambiamenti sono stati descritti negli ultimi anni, come per esempio l'aumento della temperatura (Russo et al., 2005) e della salinità (Solidoro et al., 2009). Inoltre, anche una chiara riduzione nelle concentrazioni di fosfato e ammonio è stata riportata (Solidoro et al., 2009), probabilmente indotta dall'applicazione delle nuove normative sugli scarichi industriali e sull'agricoltura.

Durante il periodo 2010-2016, il sito C1-LTER era caratterizzato da condizioni tipiche di questa area (Cossarini et al., 2012) con una stratificazione estiva da

aprile a settembre e temperature molto basse in inverno (valore minimo 4,7 °C nel febbraio 2012).

La comunità fitoplanctonica del Golfo di Trieste nel periodo 2010-2016 mostrava una notevole abbondanza nei mesi primaverili-estivi, arrivando fino a 10^7 cellule L^{-1} (Figura 19 A). Le diatomee erano uno dei gruppi dominanti che contribuivano alla distribuzione temporale fitoplanctonica (Figura 19 B), soprattutto negli anni 2010-2011 raggiungendo abbondanze di $8 \cdot 10^6$ cellule L^{-1} , con picchi corrispondenti alle fioriture tipiche dei mesi primaverili e autunnali. Precedentemente, dal 1986 al 2000, le specie appartenenti al genere *Pseudo-nitzschia* contribuivano occasionalmente alle prime fioriture dell'anno, verso tardo inverno e inizio primavera (Cabrini et al., 2012). Le dinamiche annuali tipiche del fitoplancton nel Mar Adriatico settentrionale mostrano successioni tra la dominanza di diatomee e la dominanza di fitoflagellati. Le diatomee generalmente dominano i picchi tardo invernali e autunnali quando c'è alta disponibilità di nutrienti, mentre i fitoflagellati sono più tipici di condizioni oligotrofiche e spesso rappresentano la componente dominante nelle altre stagioni (Cabrini et al., 2012; Totti et al., 2000).

In molti studi condotti nel Mar Adriatico il genere *Pseudo-nitzschia* è riportato come uno di quelli frequentemente presenti, spesso con specie diverse durante tutto il corso dell'anno e con alcune dominanti la comunità (Viličić et al., 2007, 2008, 2009). Anche in questo studio il genere *Pseudo-nitzschia* è comunemente presente nella frazione delle diatomee, arrivando a raggiungere il 98% in alcuni periodi dell'anno, come per esempio nei mesi estivi-autunnali del 2010 con ordini di grandezza fino a 10^6 cellule L^{-1} . Tale fioritura era dovuta alle specie appartenenti al gruppo *P. delicatissima* complex ed alla specie *P. galaxiae* (Figura 20, vedi paragrafo 4.2.2). Una situazione simile è riportata nello studio di Penna et al. (2012), dove si evidenzia la presenza di *Pseudo-nitzschia* fino al 20% dell'abbondanza totale di diatomee, con un picco nell'aprile 2010 di più di 10^6 cellule L^{-1} . Nello stesso studio, l'analisi filogenetica ha permesso l'identificazione di *P. delicatissima*, *P. calliantha*, *P. pungens* e *P. manni*, mentre l'analisi tossicologica ha rilevato che solo il ceppo di *P. delicatissima* presentava bassi livelli di acido domoico (Penna et al., 2013).

L'identificazione di *Pseudo-nitzschia* a livello di specie dovrebbe essere attentamente considerata poiché il numero di specie descritte è aumentato di più del doppio negli ultimi 30 anni e tra queste molte sono le specie potenzialmente tossiche (Trainer et al., 2012). Considerata la difficoltà di un'identificazione rapida e accurata delle specie, durante il monitoraggio di routine, l'intero genere è pertanto, per il principio di precauzione, considerato dannoso (Bernardi Aubry et al., 2012).

Questo genere può nascondere diverse specie con una chiara successione temporale (Pistocchi et al., 2012). La distribuzione spaziale e temporale di *Pseudo-nitzschia* spp., durante tutto l'anno e in un ampio range di condizioni ecologiche, è probabilmente spiegabile da una diversità considerevole all'interno del genere. Infatti, come si nota dalla Figura 18 B il gruppo *P. delicatissima* complex presenta diversi picchi, più o meno abbondanti, ciò potrebbe indicare che all'interno di questo gruppo vi siano diverse specie con diversi periodi di fioritura. In generale, ciò potrebbe rappresentare nicchie ecologiche differenti delle specie fitoplanctoniche, le quali tendono ad esibire frequenze stagionali o presenze persistenti ma con episodi di bloom periodici (McDonald et al., 2007).

All'interno di *P. delicatissima* complex, in questo studio sono state identificate per la prima volta nel Golfo di Trieste da un punto di vista sia morfologico che molecolare due specie: *P. calliantha* e *P. mannii*. *P. calliantha* è probabilmente una specie cosmopolita (Lundholm 1997, 2003). Nel Mar Adriatico è stata scoperta per la prima volta in campioni provenienti da due siti, nel nord e nel centro (Ljubešić et al., 2011); questa specie poi è stata riportata anche a sud lungo le coste occidentali (Caroppo et al., 2005) e nell'Adriatico centro-orientale (Burić et al., 2008). Studi basati sulla successione stagionale dimostrano che *P. calliantha* è la specie più comune ed è ampiamente distribuita insieme a *P. delicatissima* e *P. pungens* (Zingone et al., 2006). Riguardo a queste ultime specie pochi dati genetici sono attualmente disponibili nel Mar Mediterraneo, fondamentali non solo per i risultati tassonomici ma anche nella distribuzione geografica e il livello di differenziazione genetica delle popolazioni, di conseguenza essenziali per la valutazione delle frequenze, espansioni e/o abbondanze di specie tossiche

(Penna et al., 2012; Lundholm et al., 2006; Casteleyn et al., 2009). Invece, per quanto riguarda la specie *P. mannii* è stata solamente trovata nelle aree occidentali del Mediterraneo (Amato e Montresor, 2008; Quijano-Scheggia et al., 2010), mentre *P. subfraudulenta* è stata ritrovata nel Mediterraneo solamente lungo le coste greche (Moschandreu e Nikolaidis, 2010).

Il genere sembra avere una distribuzione cosmopolita, specialmente nei mari temperati e tropicali (Hasle et al., 2002). Infatti è ampiamente distribuito e frequente non solo nell'Adriatico ma anche nel Mediterraneo (Socal et al., 1999; Orsini et al., 2002), dove vi sono popolamenti persistenti lungo le coste italiane: nel Mar Ionio settentrionale le specie *Pseudo-nitzschia* rappresentano fino al 68% della comunità fitoplanctonica (Caroppo et al., 2005), invece nel Mar Tirreno centrale arrivano ad una densità di oltre 10^7 cellule L^{-1} (Congestri et al., 2004); nel Golfo di Napoli, dove è disponibile una lunga serie temporale di dati sulle specie di *Pseudo-nitzschia*, è presente un'elevata variabilità interannuale (Zingone et al., 2003), come è risultato anche nel presente studio.

Finora, ancora poco si conosce riguardo la relazione tra le differenti specie di *Pseudo-nitzschia* e le condizioni ambientali che portano alla loro crescita, anche se alcuni studi dimostrano correlazioni significative con i fattori abiotici (Trainer et al., 2012; Marić et al., 2011; Kaczmarska et al., 2007). Una correlazione significativa è stata dimostrata nello studio di Marić et al. (2011) in Adriatico, tra l'abbondanza delle specie di *Pseudo-nitzschia* e temperatura, salinità, azoto e silicio inorganico totale. La correlazione positiva con la temperatura corrispondeva con l'osservazione del bloom autunnale quando le temperature dell'acqua erano ancora elevate, così come rinvenuto anche nel Mediterraneo nord-occidentale (Quijano-Scheggia et al., 2008). La correlazione negativa con l'azoto e il silicio inorganico totale invece era probabilmente dovuta all'elevata abbondanza che ha portato ad un esaurimento dei nutrienti lungo la colonna d'acqua. Queste conclusioni sono in contrasto con quelle di Caroppo et al. (2005) nell'Adriatico meridionale, dove un bloom di *P. calliantha* avveniva nei mesi invernali, negativamente correlato con la temperatura dell'acqua e positivamente correlato con la disponibilità di nutrienti. Un'altra correlazione negativa è stata riportata anche nelle acque costiere dell'Adriatico nord-occidentale tra l'abbondanza delle specie di

Pseudo-nitzschia e la concentrazione del fosfato (Penna et al., 2006). Una correlazione con il fosfato, ma positiva, è stata riscontrata anche nel presente studio attraverso la correlazione di Spearman per ranghi (significativa a $p < 0,5$), però risultata significativa soltanto per la specie *P. galaxiae* ($p = 0.31$). Tale correlazione può spiegare l'importanza del fosforo nell'ambiente quando vi è una fioritura di *P. galaxiae*.

In definitiva, le specie del genere *Pseudo-nitzschia* presentano in generale un ampio range di tolleranze fisiologiche, dimostrando una capacità di dominare in condizioni ambientali e disponibilità di nutrienti diversi, presenti da latitudini temperate a quelle antartiche e quindi di riuscire a colonizzare una grande varietà di habitat marini (Bates et al., 1998).

6. CONCLUSIONI

Questo studio affronta per la prima volta l'identificazione a livello di specie del genere *Pseudo-nitzschia* nel Golfo di Trieste. Considerata la complessità della determinazione, il riconoscimento al MO è solitamente limitato ai due gruppi principali: *P. delicatissima* complex e *P. seriata* complex. Per il riconoscimento morfologico a livello specifico, quindi le osservazioni al TEM sono necessarie. Inoltre, per la presenza di specie criptiche e pseudocriptiche anche l'analisi molecolare risulta fondamentale per una corretta identificazione.

In questo lavoro attraverso l'utilizzo di tecniche di microscopia ottica ed elettronica e mediante analisi molecolari è stato possibile identificare tre specie: *P. calliantha*, *P. mannii* e *P. subfraudulenta*. Nonostante alcune di queste specie siano state ritenute potenzialmente tossiche in studi precedenti in diverse aree dell'Adriatico, i ceppi analizzati in questo studio non sono risultati tossici.

Le analisi effettuate per il riconoscimento delle tossine sono state limitate dal numero ridotto dei ceppi disponibili in coltura. Inoltre, diversi studi hanno evidenziato come la produzione di tossine possa variare a seconda della fase della crescita e delle condizioni di coltura (Thessen et al., 2009) e dello stadio del ciclo vitale (Bates, 1998).

Pertanto, per avere un quadro completo delle specie presenti e descrivere il ciclo stagionale di ciascuna nel Golfo di Trieste, sarebbe necessario isolare un maggior numero di ceppi in differenti periodi dell'anno. Inoltre, sarebbe necessario verificare la produzione di tossine in diverse condizioni di coltura per valutare il potenziale tossico di tali ceppi in condizioni ambientali e fasi del ciclo vitale differenti.

La problematica dell'identificazione del genere *Pseudo-nitzschia* e delle tossine microalgali è comunque piuttosto complessa e le conseguenze di eventi di tossicità ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) possono rappresentare un rischio per la salute umana e provocare un notevole danno economico nei servizi ecosistemici in particolare al settore della molluschicoltura.

Infine, per ottenere un quadro ecosistemico molto più dettagliato sulla dinamica delle microalghe tossiche e sui fattori ambientali che ne favoriscono la proliferazione, è importante integrare i parametri chimico-fisici con quelli di presenza delle specie che vengono periodicamente rilevati dai programmi di controllo effettuati lungo il litorale costiero e in aree sedi di acquacoltura per gestire l'impatto di potenziali blooms tossici a tutela dell'uomo e dell'ambiente.

7. BIBLIOGRAFIA

Aleffi, I.F., Bettoso, N., Solis-Weiss, V., Tamberlich, F., Predonzani, S., Fonda-Umani, S., 2006.

Effects of suspended mussel culture on the macrozoobenthos in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea, Italy). *Series historia naturalis* 16: 135-146.

Amato, A., Kooistra, W. H. C. F., Levialedi Ghiron, J. H. Et Al., 2007.

Reproductive isolation among sympatric cryptic species in marine diatoms. *Protist*, 158: 193–207.

Amato, A., Montresor, M., 2008.

Morphology, phylogeny, and sexual cycle of *Pseudo-nitzschia mannii* sp. nov. (Bacillariophyceae): a pseudo-cryptic species within the *P. pseudodelicatissima* complex. *Phycology*, 47: 487–497.

Arapov, J., 2013.

A review of shellfish phycotoxin profile and toxic phytoplankton species along croatian coast of the Adriatic Sea. *Acta Adriatica*, 54: 283–298.

Arapov, J., Skejić, S., Bužančić, M., Bakrač, A., Vidjak, O., Bojanić, N., Ujević I., Gladan Ž. N., 2017.

Taxonomical diversity of *Pseudo-nitzschia* from the central Adriatic Sea. *Phycological Research*, 65: 280-290.

Artegiani, A., R. Azzolini, M. Marzocchi, M. Morbidoni, A. Solazzi, and F. Cavolo, 1985.

Prime osservazioni su un "bloom" fitoplanctonico lungo la costa marchigiana nell'anno 1984. *Nova Thalassia* 7: 137–142.

Bates, S. S., Bird, C. J., De Freitas, A. S. W., Foxall, R., Gilgan, M., Hanic, L. A., Johnson, G. R., Mcculloch, A. W., Odense, P., Pocklington, R., Quilliam, M. A., Sim, P. G., Smith, J. C., Subba Rao, D. V., Todd, E. C. D., Walter, J. A. & Wright, J. L. C., 1989.

Pennate diatom *Nitzschia pungens* as the primary source of domoic acid, a toxin in shellfish from Eastern Prince Edward Island, Canada. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46:1203–15.

Bates, S. S., 1998.

Ecophysiology and metabolism of ASP toxin production. In Anderson, D. M., Cembella, A. D. & Hallegraeff, G. M. [Eds.] *Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms*. Springer-Verlag, Heidelberg: 405–26.

Bates, S.S., Hiltz, M.F., Le'Ger, C., 1999.

Domoic acid toxicity of large new Cells of *Pseudo-Nitzschia multiseriis* resulting from sexual reproduction. Martin J.L., Haya K. (Eds.), *Proceedings of the sixth canadian workshop on Harmful Marine Algae, Canadian translations of fisheries and aquatic sciences*, 2261: 21–26.

Baugh, K. A., Bush, J. M., Bill, B. D., Lefebvre, K. A. & Trainer, V.L., 2006. Estimates of specific toxicity in several *Pseudo-nitzschia* species from the Washington coast, based on culture and field studies. *African Journal of Marine Science*, 28: 403–7.

Bernardi Aubry F., Cossarini G., Acri F., Bastianini M., Bianchi F., Camatti E., De Lazzari A., Pugnetti A., Solidoro C., Socal G., 2012.

Plankton communities in the northern Adriatic Sea: patterns and changes over the last 30 years. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 115: 125-137.

Besiktepe, S., Ryabushko, L., Ediger, D., Yilmaz, D., Zenginer, A., Ryabushko, V., Lee, R., 2008.

Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle (bacillariophyta) isolated from the Black Sea. *Harmful Algae* 7: 438-442.

Boni L., Pompei M., Reti M., 1983.

The occurrence of *Gonyaulax tamarensis* Lebour bloom in the Adriatic Sea along the coast of Emilia-Romagna. *Giornale botanico italiano* Vol. 117, Iss. 3-4.

Boni L., Pompei, M., Reti, M., 1986. Maree colorate e fioriture algali lungo le coste dell'Emilia-Romagna dal 1982 al 1985 con particolare riguardo alla comparsa di *Protogonyaulax tamarensis*. *Nova Thalassia* 8, 237e245.

Botana L.M., 2008.

Seafood and freshwater toxins – pharmacology, physiology, and detection. CRC Press (Taylor and Francis Group), Boca Raton, FL, USA, 2000.

Burić, Z., Vilčić, D., Mihalić, K.C., Carić, M., Kralj, K., Ljubesić, N., 2008.

Pseudo-nitzschia blooms in the Zrmanja River estuary (Eastern Adriatic Sea). *Diatom Research* 23:51-63.

Cabrini M., Milani L. Honsell G., e Fonda Umani S., 1987/88.

Il fitoplancton in una stazione del Golfo di Trieste da marzo 1986 a settembre 1988: dati. *Nova Thalassia*, 9: 11-52.

Cabrini M., Fornasaro D., Cossarini G., Lipizer M, Virgilio D., 2012.

Phytoplankton temporal changes in a coastal Northern Adriatic site during the last 25 years estuarine. *Coastal and Shelf Science* 115: 113-124.

Cabrini, M., Cerino, F., de Olazabal, A., Di Poi, E., Fabbro, C., Fornasaro, D., Goruppi, A., Flander-Putrlle, V., Francé, J., Gollasch, S., M. Hure, S., Lipej, L., Lučić, D., Magaletti, E., Mozetič, P., Tinta, T., Tornambè, A., Turk, V., Uhan, J., David, M., 2018.

Potential transfer of aquatic organisms via ballast water with a particular focus on harmful and non-indigenous species: a survey from Adriatic ports. *Marine Pollution Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.02.004>.

Cangelosi, G. A., Hamlin, A. M., Marin III, R. & Scholin, C. A., 1997.

Detection of stable pre-rRNA in toxigenic *Pseudo-nitzschia* species. *Applied and environmental microbiology*, 63: 59–65.

Cardin V., Celio M., 1997.

Cluster analysis as a statistical method for identification of the water bodies present in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Bollettino di Geofisica Teorica ed Applicata* 38: 1-2.

Caroppo, C., Congestri, R., Bracchini, L., Albertano, P., 2005.

On the presence of *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup et Hasle and *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden in the Southern Adriatic Sea (Mediterranean Sea, Italy). *Journal of Plankton Research* 27: 763-774.

Casteleyn, G., Chepurnov, V. A., Leliaert, F., Mann, D. G., Bates, S. S., Lundholm, N., Rhodes, L., Sabbe, K. & Vyverman, W., 2008.

Pseudo-nitzschia pungens (Bacillariophyceae): a cosmopolitan diatom species? *Harmful Algae* 7: 241–57.

Casteleyn, G., Adams, N. G., Vanormelingen, P., Debeer, A. E., Sabbe, K. & Vyverman, W., 2009.

Natural hybrids in the marine diatom *Pseudo-nitzschia pungens* (Bacillariophyceae): genetic and morphological evidence. *Protist* 160:343–54.

Celio, M., Comici, C., Bussani, A., 2002.

Thermohaline anomalies in the spring and early summer of 2000 in the Gulf of Trieste., *Marine Ecology*, 23: 100-110.

Cerino, F., Orsini, L., Sarno, D., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Zingone, A., 2005.

The alternation of different morphotypes in the seasonal cycle of the toxic diatom *Pseudo-nitzschia galaxiae*. *Harmful Algae* 4: 33-48.

Cheng, T., Xu, C., Lei, L., Li, C., Zhang, Y., Zhou, S., 2016.

Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources* 16: 138-149.

Chepurnov, V.A., Mann, D.G., Sabbe, K., Vannerum, K., Casteleyn, G., Verleyen, E., Peperzak, L., Vyverman, W., 2005.

Sexual reproduction, mating system, chloroplast dynamics and abrupt cell size reduction in *Pseudo-nitzschia pungens* from the North Sea (Bacillariophyta). *European Journal of Phycology*, 40, 379–395.

Ciminiello, P., Dell'aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Magno, G. S., Tartaglione, L., Quilliam, M. A., Tubaro, A. & Poletti, R., 2005.

Hydrophilic interaction liquid chromatography/mass spectrometry for determination of domoic acid in Adriatic shellfish. *Rapid communications in mass spectrometry*, 19: 2030-2038.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., 2009.

Recent developments in mediterranean harmful algal events. *Advances in molecular toxicology*, 3: 1.

Coleman, A. W. 1999.

Phylogenetic analysis of "Volvocaceae" for comparative genetic studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 13892–7.

Congestri, R., Polizzano, S., Micheli, L. et al., 2004.

On the presence of *Pseudo-nitzschia* spp. and domoic acid in natural samples from the middle Tyrrhenian Sea (Mediterranean Sea). In XIth International Conference on Harmful Algal Blooms, Cape Town, South Africa, 14–19 November 2004. *Creda Communications*, South Africa. Abstract book, p. 93.

Corriero, G., Alabiso, G., Bavestrello, G., Barbone, E., Bastianini, M., Bazzoni, A., Bernardi Aubry, F., Boero, F., Buia, M., Cabrini, M., Cardone, F., Cataletto, B., Cattaneo Vietti, R., Cecere, E., Chiapparelli, S., Cibic, T., De Olazabal, A., D'onghia, G., Finotto, S., Fiore, N., Fornasaro, D., Frascchetti, S., Giangrande, A., Longo, C., Lorenti, M., Lugliè, A., Maiorano, P., Mazzocchi, M., Mercurio, M., Mastrototaro F., Mistri M., Monti M., Munari C., Nonnis-Marzano C., Padedda B., Patti F., Petrocelli A., Pierri C., Portacci

G., Pugnetti A., Pulina S., Rosati I., Sarno, D., Satta, C., Sechi, N., Scipione B., Sion, L., Terlizzi A., Tirelli V., Totti, C., Tursi, A., Ungaro, N., Zingone, A., Zupo, V., Basset, A., 2016.

Ecosystem fragility to alien and invasive species: a case study on marine habitats along the Italian coast. *Aquatic Conservation: Marine Freshwater Ecosystem*, 26: 392-409.

Cossarini, G., Solidoro, C., Fonda Umani, S., 2012.

Dynamics of biogeochemical properties in temperate coastal areas of freshwater influence: Lessons from the Northern Adriatic Sea (Gulf of Trieste). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115: 63-74.

Cozzi, S., Falconi, C., Comici, C., Čermelj, B., Kovak, N., Turk, V., Giani, M., 2012.

Recent evolution of river discharges in the Gulf of Trieste and their potential response to climate changes and anthropogenic pressure. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 115: 14-24.

D'alelio, D., A. Amato, A. Luedeking, And M. Montresor. 2009.

Sexual and vegetative phases in the planktonic diatom *Pseudo-nitzschia multistriata*. *Harmful Algae* 8: 225–232.

Evans K.M., Wortley A.H., Mann D.G., 2007.

An assessment of potential diatom “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in *Sellaphora* (Bacillariophyta). *Protist* 158: 349–364.

Falkowsky, P.G., Raven J.A., 1997.

An introduction to photosynthesis in aquatic systems. In: *Aquatic photosynthesis*. Blackwell Science, 1-32.

FAO/IOC/WHO, 2005.

Report of the Joint FAO/IOC/WHO ad hoc expert consultation on biotoxins in bivalve molluscs. Oslo, Norway, Sept. 26-30, 2004.

Fehling, J., Davidson, K., Bates, S.S., 2005.

Growth dynamics of non-toxic *Pseudo-nitzschia delicatissima* and toxic *P. seriata* (Bacillariophyceae) under simulated spring and summer photoperiods. *Harmful Algae* 4: 763–769.

Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T., & Falkowski, P., 1998. Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281: 237-240.

Fonda Umani, S., 1985.

Hydrology and "red tides" in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Oealia* 11: 141–147.

Fonda Umani S., 1991.

General features of the planktonic system in the Gulf of Trieste and their variations in the last decade. *Map Tech Rep Ser*, 47:82–101.

Fryxell, G. A., Villac, M. C., Shapiro, L. P., 1997.

The occurrence of the toxic diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) on the West Coast of the USA, 1920–1996: a review. *Phycologia*, 36, 419–437.

Gallitelli, M., N. Ungaro, L.M. Addante, N. Gentiloni Silver & C. Sabbà., 2005.

Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *Jama*, 293: 2599-2600.

Garcia, C., M. Del C. Bravo, M. Lagos & N. Lagos., 2004.

Paralytic Shellfish Poisoning: post-mortem analysis of tissue and body fluid samples from human victims in the Patagonia fjords. *Toxicon*, 43: 149-158.

Genbank <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

GEOHAB. (eds), 2005.

Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms, GEOHAB Core Research Project: HABs in Upwelling Systems. IOC and SCOR, Paris and Baltimore.

Gilbert, P. M., Seitzinger, S., Heil, C. A., 2005.

The role of eutrophication in the global proliferation of harmful algal blooms: new perspectives and new approaches. *Oceanography*, 18: 198–209.

Gómez, F., 2010.

Changes in the Mediterranean phytoplankton community related to climate warming. In: Briend, F. (Ed.), *Phytoplankton Responses to Mediterranean Environmental Changes*. CIESM Workshop Monographs 40. pp. 37–42 Monaco.

Grbin, D., Pfannkuchen, M., Babić, I., Mejdandžić, M., Mihanović, H., Marić Pfannkuchen, D., Godrijan, J., Štefanić, P.P., Oluj ić, G., Ljubešić, Z., 2017.

Multigene phylogeny and morphology of newly isolated strain of *Pseudo-nitzschia mannii* Amato & Montresor (Adriatic Sea). *Diatom Research*, 32: 127-131.

Guillard R.R.L., Kilham P., 1977.

The ecology of marine planktonic diatoms. Werner D. (Ed): *The Biology of Diatoms*. Blackwell, London, Pp 372-469.

Guiry, M.D., Guiry, G.M., 2018.

Algaebase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. [Http://www.algaebase.org](http://www.algaebase.org); searched on 26 February 2018.

Hallegraeff, G.M., 1993.

A review of Harmful Algal Blooms and their apparent global increase. *Phycologia*, 32: 79-99.

Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D., Hara, Y., 1995.

Taxonomy of harmful marine Raphidophytes. *Manual on harmful marine microalgae* (Ed), Paris, 1: 365-372

Hallegraeff, G. M., 2003.

Harmful Algal Blooms: A global overview. D.M. Anderson & A.D. Cembella (Editors). *Manual on Harmful Marine Microalgae*. Unesco, Pariz. Pp. 25-49.

Hansen, H.P., Koroleff, F., 1999.

Determination of nutrients in *Methods of Seawater Analysis*, eds Grasshoff K, Kremling K, Ehrhardt M (Wiley, Weinheim, Germany), pp 75-90.

Hasle, G.R., 1965.

Nitzschia and *Fragilariopsis* species studied in the light and electron microscopes. II. The group *Pseudo-nitzschia*. *Skrifter av det Norske Videnskaps-Akademi I Oslo I Matematisk-Naturvidenskapelig Klasse* 18: 1–45.

Hasle, G.R., 1978.

Using the inverted microscope. In: *Phytoplankton Manual* (ed. Sournia A.) UNESCO, Paris: 191-196.

Hasle, G.R., 1995.

P. pungens and *P. multiseriata* (Bacillariophyceae)-nomenclatural history, morphology and distribution. *Journal of Phycology*, 31: 428–435.

- Hasle, G.R., Lange C.B., Syvertsen E.E. 1996.
A review of *Pseudo-nitzschia*, with special reference to the Skagerrak, North Atlantic, and adjacent waters. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 50: 131–175.
- Hasle, G.R., Syvertsen E.E., 1997.
Marine Diatoms. Identifying Marine Phytoplankton (A Cura Di C.R.Tomas), Academic Press, Pp. 5-385.
- Hasle, G.R., 2002.
Are most of the domoic acid-producing species of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* cosmopolites? *Harmful Algae* 1: 137-146.
- Heisler, J., Glibert, P. M., Burkholder, J. M. et al., 2008.
Eutrophication and harmful algal blooms: a scientific consensus. *Harmful Algae*, 8: 3–13.
- Honsell, G., Cabrini, M., 1990.
Il fitoplancton durante il «mare sporco» dell'agosto 1988 nel golfo di Trieste (Adriatico settentrionale). *Bollettino della Società Adriatica di Scienze*, 72: 1-14.
- Honsell, G., L. Boni, M. Cabrini & M. Pompei, 1992.
Toxic or potentially toxic dinoflagellates from the Northern Adriatic Sea. In *Marine coastal eutrophication* pp. 107-114.
- Honsell, G., Dell'Aversano, C., Vuerich, F., Sosa, S.S., Tartaglione, L., Tubaro, A., 2006.
Pseudo-nitzschia and ASP in the northern Adriatic Sea, In: 12th International Conference on Harmful Algae, Copenhagen, Denmark, pp. 193.
- Hoppenrath, M., Elbrächter M., Drebes G., 2009.
Marine Phytoplankton. Selected Phytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. *Kleine Serckenerg – Reihe 49*, E. Schweizerbart Science Publishers, Stuttgart, Germany, 264 pp.
- Horner, R.A., 2002.
A taxonomic guide to some common marine phytoplankton. *Biopress* - 195 pagine.
- Hubbard, K. A., Rocap, G., Armbrust, E., 2008.

Inter- and intraspecific community structure within the diatom genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae). *Journal of phycology*, 44: 637-649.

Kaczmarek, I., LeGresley, M.M., Martin, J.L., Ehrman, J., 2005.
Diversity of the diatom genus *Pseudo-nitzschia* Peragallo in the Quoddy Region of the Bay of Fundy, Canada. *Harmful Algae*, 4, 1–19.

Kaczmarek, I., Martin, J.L., Ehrman, J.M., LeGresley, M.M., 2007.
Pseudo-nitzschia species population dynamics in the Quoddy Region, Bay of Fundy. *Harmful Algae* 6: 861-874.

Katoh, K., Standley, D. M., 2013.
MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution*, 30: 772-780.

Kraberg, A., Baumann, M., And Durselen, C., 2010.
Coastal phytoplankton: photo guide for northern European seas. Pfeil Verlag, Munchen, 204 Pp.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016.
MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33:1870-1874.

IOC-The Ioc Harmful Algal Bloom Programme. The Intergovernmental Oceanographic Commission of Unesco. <<http://loc.unesco.org/hab>>.

Lassus, P., Chomérat, N., Hess, P., Nézan E., 2016.
Toxic and harmful microalgae of the world ocean. International society for the study of harmful algae/Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, Denmark. IOC manuals and Guides 68.

Lelong, A., Hégaret, H., Soudant, P., Bates, S. S., 2012.
Pseudo-nitzschia (Bacillariophyceae) species, domoic acid and amnesic shellfish poisoning: revisiting previous paradigms. *Phycologia* 51:168–216.

Lim, H.C., Teng, S.T., Lim, P.T., Wolf, M., Pin, Leaw, C., 2016.
18S rDNA phylogeny of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) inferred from sequence-structure information. *Phycologia* 55: 134–146.

Lim, H. C., Tan, S. N., Teng, S. T., Lundholm, N., Orive, E., David, H., Quijano-Scheggia, S., Leong, C.S.Y., Wolf, M., Bates, S.S., Leaw, C.P., Lim, P. T., 2018.

Phylogeny and species delineation in the marine diatom *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyta) using *cox1*, LSU, and ITS2 rRNA genes: A perspective in character evolution. *Journal of phycology*. doi: 10.1111/jpy.12620.

Lipizer, M., Cossarini G., Falconi, C., Solidoro C., Fonda Umani S., 2011.
Impact of different forcing factors on N:P balance in a semi-enclosed bay: the Gulf of Trieste (North Adriatic Sea). *Continental Shelf Research*, 16: 1651-1662.

Ljubešić, Z., Bosak, S., Viličić, D., Borojević, K. K., Marić, D., Godrijan, J., Ujević, I., Peharec, P., Đakovac, T., 2011.
Ecology and taxonomy of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* species in Lim Bay (north-eastern Adriatic Sea). *Harmful algae*, 10: 713-722.

Lundholm, N., Skov, J., Pocklington, R., Moestrup, Ø., 1997.
Studies on the marine planktonic diatom *Pseudo-nitzschia*. 2. Autecology of *P. pseudodelicatissima* based on isolates from Danish coastal waters. *Phycologia* 36: 381-388.

Lundholm, N., Moestrup, Ø., Hasle, G.R., Hoef-Emden, K., 2003.
A study of the *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima/cuspidata* complex (Bacillariophyceae): What is *P. pseudodelicatissima*? *Journal of Phycology* 39: 797–813.

Lundholm, N., Moestrup, Ø., Kotaki, Y., Hoef-Emden, K., Scholin, C., & Miller, P., 2006.
Inter- and intraspecific variation of the *Pseudo-nitzschia delicatissima* complex (Bacillariophyceae) illustrated by rRNA probes, morphological data and phylogenetic analyses. *Journal of Phycology*, 42: 464-481.

Lundholm, N., Bates, S. S., Baugh, K. A., 2012.
Cryptic and pseudocryptic diversity in diatoms—with descriptions of *Pseudo-nitzschia hasleana* sp. nov. and *P. fryxelliana* sp. nov. *Journal of Phycology*, 48: 436–454.

Lundholm, N., 2016.
Bacillariophyceae, In *loc-Unesco Taxonomic Reference List of Harmful Micro Algae*. Available From: <http://www.marinespecies.org/Hab>.

Malej, A., Mozetič, P., Malačič, V., Terzić, S., Ahel, M., 1995.
Phytoplankton responses to freshwater inputs in a small semi-enclosed gulf (Gulf of Trieste, Adriatic Sea). *Marine Ecology Progress Series*, 120: 111-121.

Malačić V., 1991.

Estimation of the vertical eddy diffusion coefficient of heat in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic). *Oceanologica Acta*. 14: 23-32.

Mann, D.G., 1999.

The Species Concept in Diatoms. *Phycology* 38: 437–495.

Marić, D., Ljubešić, Z., Godrijan, J., Viličić, D., Ujević, I., & Precali, R., 2011. Blooms of the potentially toxic diatom *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle in coastal waters of the northern Adriatic Sea (Croatia). *Estuarine, coastal and shelf science*, 92: 323-331.

Martin, J.L., Haya, K., Burrige, L.E., Wildish, D.J., 1990.

Nitzschia pseudodelicatissima - a source of domoic acid in the Bay of Fundy, eastern Canada. *Marine Ecology Progress Series*, 67: 177-182.

McDonald, S. M., Sarno, D., Scanlan, D. J. et al., 2007.

Genetic diversity of eukaryotic ultraphytoplankton in the Gulf of Naples during an annual cycle. *Aquatic Microbial Ecology*, 50: 75–89.

Medlin, L.K., Williams, D.M., Sims, P.A., 1993.

The evolution of the diatoms (Bacillariophyta). I. Origin of the group and assessment of the monophyly of its major divisions. *European Journal of Phycology* 28: 261–275.

Milandri, A., Pompei, M., Poletti, R., 2005.

Fioriture tossiche in Emilia Romagna e attività del centro nazionale di riferimento per le biotossine marine. In: Mattei, D., Melchiorre, S., Messineo, V., Bruno, M. (Eds.), *Toxic Algal Blooms in Italy: Risk Assessment and Epidemiology*. Rapporti ISTISAN 05/29. Tipografia Facciotti, Roma, Italy, pp. 123–129.

Milani, L., Cabrini, M., Fonda Umani, S., Honsell, G., 1987/88.

Parametri ambientali (temperatura, salinità, ossigeno disciolto, clorofilla a e feopigmenti) in una stazione del Golfo di Trieste. *Nova Thalassia*, 9: 97-145.

Moestrup, Ø., Codd, G.A., Elbrächter, M., Faust, M.A., Fraga, S., Fukuyo, Y., Cronberg, G. & Halim, Y., 2009.

loc-Unesco Taxonomic Reference List of Harmful Microalgae. Available At: <http://www.marinespecies.org/Hab>.

- Moniz, M., Kaczmarska, I., 2010.
Barcoding of diatoms: nuclear encoded ITS revisited. *Protist* 161: 7–34.
- Montresor, M., Smetacek, V., 2002.
The impact of harmful algal blooms in natural and human-modified systems of northern Europe. *Climate development and history of the North Atlantic realm*, 457-471.
- Moschandreou, K.K., Nikolaidis, G., 2010.
The genus *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in Greek coastal waters. *Botanica Marina*, 53: 159–172.
- Moschandreou, K.K., Papaefthimiou, D., Katikou, P., Kalopesa, E., Panou, A., Nikolaidis, G., 2010.
Morphology, phylogeny and toxin analysis of *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Bacillariophyceae) isolated from the Thermaikos Gulf, Greece. *Phycologia*, 49: 260–273.
- Mozetič, P., Cangini, M., Francé, J., Bastianini, M., Bernardi Aubry, F., Bužancic, M., Cabrini, M., Cerino, F., Calic, M., D'Adamo, R., Drakulovic, D., Finotto, S., Fornasaro, D., Grilli, F., Kraus, R., Kužat, N., Maric Pfannkuchen, D., Nincevic Gladan, Ž., Pompei, M., Rotter, A., Servadei, I., Skejic, S., 2017.
Phytoplankton diversity in Adriatic ports: Lessons from the port baseline survey for the management of harmful algal species. *Marine Pollution Bulletin*. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.12.029>.
- Orsini, L., Sarno, D., Procaccini, G., Dahlmann, J., Montresor, M., 2002.
Toxic *Pseudo-Nitzschia multistriata* (Bacillariophyceae) from the Gulf of Naples: morphology, toxin analysis and phylogenetic relationships with other *Pseudo-nitzschia* species. *European Journal Phycology*, 37: 247–257.
- Orsini, L., Procaccini, G., Sarno, D. et al., 2004.
Multiple rDNA ITStypes within diatom *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Bacillariophyceae) and their relative abundances across a spring bloom in the Gulf of Naples. *Marine Ecology Progress Series*, 271: 87–98.
- Penna, A., Ingarao, C., Ercolessi, M., Rocchi, M., Penna, N., 2006.
Potentially harmful microalgal distribution in an area of the NW Adriatic coastline: sampling procedure and correlations with environmental factors. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 70: 307-316.
- Penna, A., Kooistra, W.H.C.F., Procaccini, G., Cerino, F., 2010.

Metodi molecolari per l'analisi del fitoplancton marino. In: Socal, G., Buttino, I., Cabrini, M., Mangoni, O., Penna, A., Totti, C. (Eds.), Metodologie di studio del plancton marino. Manuali e linee guida 56/2010. ISPRA SIBM, Roma, pp. 213-237.

Penna, A., Casabianca, S., Perini, F., Bastianini, M., Riccardi, E., Pigozzi, S., & Scardi, M., 2012.

Toxic *Pseudo-nitzschia* spp. in the northwestern Adriatic Sea: characterization of species composition by genetic and molecular quantitative analyses. *Journal of plankton research*, 35: 352-366.

Pistocchi R., Cangini M., Totti C., Urbani R., Guerrini F., Romagnoli T., Sist P., Palamidesi S., Boni L., Pompei M., 2005.

Relevance of the dinoflagellate *Gonyaulax fragilis* in mucilage formations of the Adriatic Sea. *Science of the Total Environment*, 353: 307-316.

Pistocchi, R. Guerrini, F., Pezzolesi, L., Riccardi, M., Vanucci, S., Ciminiello, P., Dell'aversano, C., Forino, M., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Milandri, A., Pompei, M., Cangini, M., Pigozzi S., Riccardi E., 2012.

Toxin levels and profiles in microalgae from the north-western Adriatic Sea, 15 years of Studies on Cultured Species. *Marine Drugs*, 10: 140-162.

Poulain, P.M., Cushman-Roisin, B., Gačić, M., Artegiani, A., 2001.

Physical oceanography of the Adriatic Sea. Past, present and future. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, 340 Pp.

Querin, S., Crise, A., Deponte, D., Solidoro, C., 2007.

Numerical study of the role of wind forcing and freshwater buoyancy input on the circulation in a shallow embayment (Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea). *Journal Geophysical Research*, 112: 1-19.

Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Sampedro, N., Van Lenning, K., Flo, E., Andree, K., Fortuño, J.M., Camp, J., 2008.

Identification and characterisation of the dominant *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) along the NE Spanish coast (Catalonia, NW Mediterranean). *Scientia Marina*, 72: 343-359.

Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Andree, K., Fortuño, J.M., Camp, J., 2009. Homothallic auxosporulation in *Pseudo-nitzschia brasiliensis* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, 45: 100–107.

Quijano-Scheggia, S., Garcés, E., Andree, K. B., De la Iglesia, P., Diogène, J., Fortuño, J. M., & Camp, J., 2010.

Pseudo-nitzschia species on the Catalan coast: characterization and contribution to the current knowledge of the distribution of this genus in the Mediterranean Sea. *Scientia Marina*, 74: 395-410.

Quilliam, M.A.; Hess, P., Dell'Aversano, C., 2001.

Mycotoxins and phycotoxins in perspective at the turn of the century, Eds: W.J. deKoe, R.A. Samson, H.P. van Egmond, J. Gilbert and MMM. Sabino, pp. 383.

Quilliam, M. A., 1995.

Analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins in shellfish tissue by liquid chromatography with fluorometric and mass spectrometric detection. *Journal-Aoac International*, 78: 555-570.

Rhodes, L.L., White, D., Syhre, M., Atkinson, M., 1996.

Pseudo-nitzschia species isolated from New Zealand coastal waters: domoic acid production in vitro and links with shellfish toxicity. *Harmful and toxic algal blooms*, 155-158.

Richmond, A., 2004.

Biological principles of mass cultivation. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, 125-177.

Russo, A., Maccaferri, S., Djakovic, T., Precali, R., Degobbis, D., Deserti, M., Paschini, E., Lyons, D.M., 2005.

Meteorological and oceanographic conditions in the NAS during the period June 1999-July 2002. Influence on the mucilage phenomenon. *The Science of Total Environment*, 353: 24–38.

Sarno, D., Zingone, A., & Montresor, M. (2010). A massive and simultaneous sex event of two *Pseudo-nitzschia* species. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 57: 248-255.

Satake, M., Mackenzie, L., Yasumoto, T., 1997

Identification of *Protoceratium reticulatum* as the biogenetic origin of yessotoxin. *Natural Toxins*, 5: 164–167.

Schlitzer, R., 2017.

Ocean Data View. <http://odv.awi.de>.

Scholin, C.A., Gullard, F., Douchette, G.J., Benson, S., Busman, M., Chavez, F.P., Cordaro, J., DeLong, R., De Vogelaere, A., Harvey, J., Haulena, M., Lefebvre, K., Lipscomb, T., Loscutoff, S., Lowenstine, L.J., Marine, R.I., Miller

P.E., Mclellan, W.A., Moellermoeller, P.D.R., Powell, C.L., Rowles, T., Silvagni, P., Silver M., Spraker T., Trainer ,V., Van Dolah, F.M., 2000.
Mortality of sea lions along Central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, 403: 80-84.

Silver, M.W., Bargu, S., Coale, S.L., Benitez-Nelson, C.R., Garcia, A.C., Roberts, K.J., Sekula-Wood, E., Bruland, K.W., Coale, K.H., 2010.
Toxic diatoms and domoic acid in natural and iron enriched waters of the oceanic Pacific. *Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 20762–20767.

Socal, G., Boldrin, A., Bianchi, F., Civitarese, G., De Lazzari, A., Rabitti, S., Totti, C., Margherita, M., Turchetto, M. M., 1999.
Nutrient, particulate matter and phytoplankton variability in the photic layer of the Otranto strait. *Journal of Marine Systems*, 20: 381-398.

Solidoro, C., Bastianini, M., Bandelj, V., Codermatz, R., Cossarini, G., Melaku Canu, D., Ravagnan, E., Salon, S., Trevisani, S., 2009.
Current state, scales of variability, and trends of biogeochemical properties in the northern Adriatic Sea. *Journal of Geophysical Research* 114C7.

Sommer, H.; Meyer, K. F., 1937.
Paralytic shellfish poisoning. *Archives of Pathology*. 24: 560-98.

Sorhannus, U., 1997.
The origination time of diatoms; an analysis based on ribosomal RNA data. *Micropaleontology* 43: 215–218.

Sorhannus, U., 2007.
A nuclear-encoded small-subunit ribosomal RNA timescale for diatom evolution. *Marine Micropaleontology* 65: 1–12.

Stravisi, F., 1977.
Il regime dei venti a Trieste (1951e1975). *Bollettino della società adriatica di scienze* 61: 87-104.

Teng, S. T., Lim, H. C., Lim, P. T., Dao, V. H., Bates, S. S., Leaw, C. P., 2014a.
Pseudo-nitzschia kodamae sp. nov. (Bacillariophyceae), a toxigenic species from the Strait of Malacca, Malaysia. *Harmful Algae* 34:17–28.

Teng, S. T., Tan S.N., Lim, H. C., Dao, V. H., Bates, S. S., Leaw, C. P., 2016.

High diversity of *Pseudo-nitzschia* along the northern coast of Sarawak (Malaysian Borneo), with descriptions of *P. bipertita* sp. nov. And *P. limii* Sp. Nov. (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, 52: 973–989.

Thessen, A.E., Bowers, H.A., Stoecker, D.K., 2009.

Intra-and interspecies differences in growth and toxicity of *Pseudo-nitzschia* while using different nitrogen sources. *Harmful algae*, 8: 792–810.

Thronsdon, J., 1978.

Preservation and storage. In: Sournia, A. (Ed.), *Phytoplankton Manual*. UNESCO, Paris, pp. 69-74.

Totti, C., Civitarese, G., Acri, F., Barletta, D., Candelari, G., Paschini, E., Solazzi, A., 2000.

Seasonal variability of phytoplankton populations in the middle Adriatic sub-basin. *Journal of Plankton Research*, 22: 1735–1756.

Trainer, V.L., Wekell, J.C., Horner, R.A., Hatfield, C.L., Stein, J.E., 1998. Domoic acid production by *Pseudo-nitzschia pungens*. In: Reguera, B., Blanco, J., Fernández, M.L., Wyatt, T. (Eds.), *Harmful Algae*. Xunta de Galicia and the IOC of UNESCO, 337–340.

Trainer, V.L., Wells, M.L., Cochlan, W.P., Trick, C.G., Bill, B.D., Baugh, K.A., Beall, B.F., Herndon, J., Lundholm, N., 2009.

An ecological study of a massive bloom of toxigenic *Pseudo-nitzschia cuspidata* off the Washington State coast. *Limnology and Oceanography*, 54: 1461–1474.

Trainer, V. L., Bates, S. S., Lundholm, N., Thessen, A.E., Cochlan, W.P., Adams, N.G., Trick, C.G., 2012.

Pseudo-Nitzschia physiological ecology, phylogeny, toxicity, monitoring and impacts on ecosystem health. *Harmful Algae*, 14: 271-300

Turner, J.T., Tester, P.A., 1997.

Toxic marine phytoplankton, zooplankton grazers, and pelagic food webs. *Limnology and Oceanography*, 42: 1203–1213.

Ujevic, I., Nincevic-Gladan, Ž., Roje, R., Skejic, S., Arapov, J., Marasovic, I., 2010.

Domoic acid - a new toxin in the Croatian Adriatic shellfish toxin profile. *Molecules*, 15: 6835–6849.

Utermöhl, H., 1958.

Zur Vervollkommnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik: Mit 1 Tabelle und 15 abbildungen im Text und auf 1 Tafel. Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie: Mitteilungen, 9: 1-38.

Viličić, D., Bosak, S., Burić, Z., Caput-Mihalić, K., 2007.

Phytoplankton seasonality and composition along the coastal NE Adriatic Sea during the extremely low Po River discharge in 2006. *Acta Botanica Croatica*, 66: 101-115.

Viličić, D., Terzić, S., Ahel, M., Burić, Z., Jasprica, N., Carić, M., Mihalić, K.C., Olujčić, G., 2008.

Phytoplankton abundance and pigment biomarkers in the oligotrophic, eastern Adriatic estuary. *Environmental Monitoring and Assessment*, 142: 199-218.

Viličić, D., Djakovac, T., Burić, Z., Bosak, S., 2009.

Composition and annual cycle of phytoplankton assemblages in the northeastern Adriatic Sea. *Botanica Marina*, 52: 291-305.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J.W., 1990.

Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (ed.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., San Diego, California, 315–322.

Zhang, H., Bhattacharya, D., Lin, S., 2007.

A three-gene dinoflagellate phylogeny suggest monophyly of Prorocentrales and a basal position for Amphidinium and Heterocapsa. *Journal of Molecular Evolution*, 65: 463–474.

Zingone, A., Enevoldsen, H.O., 2000

The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean and coastal management*, 43: 725-748.

Zingone, A., Licandro, P., Sarno, D., 2003.

Revising paradigms and myths of phytoplankton ecology using biological time series. In: Briand, F. (Ed.), *Mediterranean Biological Time Series*. CIESM Workshop Monographs, 22: 109–114 Monaco.

Zingone, A., Wyatt, T., 2004.

Harmful algal blooms: keys to the understanding of phytoplankton ecology. In: Robinson AR, Brink KH (eds) The global coastal ocean: multi-scale interdisciplinary processes. The sea, Harvard University Press, Cambridge, MA, 13: 867–926.

Zingone, A., Siano, R., D'Alelio, D., Sarno, D., 2006.

Potentially toxic and harmful microalgae from coastal waters of the Campania region (Tyrrhenian Sea, Mediterranean Sea). *Harmful Algae* 5: 321–337.

Zingone, A., Totti, C., Sarno, D., Cabrini, M., Caroppo, C., Giacobbe, M.G., Luglio, A., Nuccio, C., Socal, G., 2010.

Fitoplancton: metodiche di analisi quali-quantitativa. In: Socal, G., Buttino, I., Cabrini, M., Mangoni, O., Penna, A., Totti, C. (Eds.), *Metodologie di studio del plancton marino. Manuali e Linee Guida 56/2010*. ISPRA SIBM, Roma, pp. 213-237.

8. APPENDICE

Pseudo-nitzschia H.Peragallo, 1900 (AlgaeBase, 2018)

1. *Pseudo-nitzschia abrensis* Pérez-Aicua & Orive C *
2. *Pseudo-nitzschia americana* (Hasle) Fryxell C
3. *Pseudo-nitzschia antarctica* Manguin C
4. *Pseudo-nitzschia arctica* Percopo & Sarno C
5. *Pseudo-nitzschia arenysensis* Quijano-Scheggia, Garcés, Lundholm C
6. *Pseudo-nitzschia australis* Frenguelli C *
7. *Pseudo-nitzschia barkeleyi* var. *obtusa* Manguin C
8. *Pseudo-nitzschia barkleyi* (Hustedt) Manguin S
9. *Pseudo-nitzschia barkleyi* var. *obtusa* Manguin S
10. *Pseudo-nitzschia batesiana* H.C.Lim, S.T.Teng, C.P.Leaw, P.T.Lim C *
11. *Pseudo-nitzschia bipertita* S.T.Teng, H.C.Lim & C.P.Leaw C
12. *Pseudo-nitzschia brasiliiana* Lundholm, Hasle & G.A.Fryxell C *
13. *Pseudo-nitzschia caciantha* Lundholm, Moestrup & Hasle C *
14. *Pseudo-nitzschia calliantha* Lundholm, Moestrup & Hasle C *
15. *Pseudo-nitzschia circumpora* H.C.Lim, C.P.Leaw & P.T.Lim C
16. *Pseudo-nitzschia cuspidata* (Hasle) Hasle C *
17. *Pseudo-nitzschia decipiens* Lundholm & Moestrup C
18. *Pseudo-nitzschia delicatissima* (Cleve) Heiden C *
19. *Pseudo-nitzschia dolorosa* Lundholm & Moestrup C
20. *Pseudo-nitzschia fossilis* Frenguelli S
21. *Pseudo-nitzschia fraudulenta* (Cleve) Hasle C *
22. *Pseudo-nitzschia fryxelliana* Lundholm C
23. *Pseudo-nitzschia fukuyoi* H.C.Lim, S.T.Teng, Ch.P.Leaw, P.T.Lim C *
24. *Pseudo-nitzschia galaxiae* N.Lundholm & Moestrup C *

25. *Pseudo-nitzschia granii* (Hasle) Hasle C *
26. *Pseudo-nitzschia granii* var. *curvata* Hasle C
27. *Pseudo-nitzschia hasleana* Lundholm C *
28. *Pseudo-nitzschia heimii* Manguin C
29. *Pseudo-nitzschia hustedtii* Meister S
30. *Pseudo-nitzschia inflatula* (Hasle) Hasle C
31. *Pseudo-nitzschia kodamae* S.T.Teng, H.C.Lim, C.P.Leaw, P.T.Lim C *
32. *Pseudo-nitzschia limii* S.T.Teng, H.C.Lim & C.P.Leaw C
33. *Pseudo-nitzschia linea* Lundholm, Hasle and G.A.Fryxell C
34. *Pseudo-nitzschia lineola* (Cleve) Hasle C
35. *Pseudo-nitzschia lundholmiae* H.C.Lim, S.T.Teng, C.P.Leaw, P.T.Lim C*
36. *Pseudo-nitzschia mannii* Amato & Montresor C
37. *Pseudo-nitzschia micropora* Priisholm, Moestrup e Lundholm C
38. *Pseudo-nitzschia multiseriis* (Hasle) Hasle C *
39. *Pseudo-nitzschia multistriata* (H.Takano) H.Takano C *
40. *Pseudo-nitzschia obtusa* (Hasle) Hasle & Lundholm C *
41. *Pseudo-nitzschia pacifica* (Cupp) Hustedt S
42. *Pseudo-nitzschia plurisecta* Orive e Pérez-Aicua C *
43. *Pseudo-nitzschia prolongata* Manguin S
44. *Pseudo-nitzschia prolongatoides* (Hasle) Hasle C
45. *Pseudo-nitzschia pseudodelicatissima* (Hasle) Hasle C *
46. *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex Cleve) Hasle C *
47. *Pseudo-nitzschia pungens* f. *multiseriis* Hasle S
48. *Pseudo-nitzschia pungens* var. *aveirensis* Lundholm, Churro, Carreira e Calado C
49. *Pseudo-nitzschia pungens* var. *cingulata* M.C.Villac C
50. *Pseudo-nitzschia pungiformis* (Hasle) Hasle C
51. *Pseudo-nitzschia roundii* D.U.Hernández-Becerril C

52. *Pseudo-nitzschia sabit* S.T.Teng, H.C.Lim, P.T.Lim & C.P.Leaw C
53. *Pseudo-nitzschia seriata* (Cleve) H.Peragallo C *
54. *Pseudo-nitzschia seriata* f. *obtusa* (Hasle) Hasle S
55. *Pseudo-nitzschia seriata* var. *fraudulenta* (Cleve) H.Peragallo S
56. *Pseudo-nitzschia sicula* (Castracane) H.Peragallo S
57. *Pseudo-nitzschia sicula* var. *bicuneata* (Grunow) H.Peragallo S
58. *Pseudo-nitzschia sicula* var. *migrans* (Cleve) H.Peragallo S
59. *Pseudo-nitzschia simulans* Y.Li, C.X.Huang & G.S.Xu C *
60. *Pseudo-nitzschia sinica* Y.Z.Qi & J.Wang U
61. *Pseudo-nitzschia subcurvata* (Hasle) G.A.Fryxell C
62. *Pseudo-nitzschia subfraudulenta* (Hasle) Hasle C *
63. *Pseudo-nitzschia subpacifica* (Hasle) Hasle C *
64. *Pseudo-nitzschia turgidula* (Hustedt) Hasle C *
65. *Pseudo-nitzschia turgiduloides* (Hasle) Hasle C

'C' indica un nome attualmente accettato tassonomicamente; 'S' sinonimo omotipico o eterotipico; 'U' stato tassonomico non certo, ancora in discussione di ricerca tassonomica; * indica specie tossiche.

9. RINGRAZIAMENTI

Terminato questo percorso vorrei ringraziare prima di tutti la prof.ssa Rossella Pistocchi, la quale con le sue lezioni mi ha suscitato un grande interesse per quanto riguarda il mondo marino del fitoplancton.

Un ringraziamento alla dott.ssa Marina Cabrini, la quale ha accettato la mia proposta di tirocinio presso l'OGS dandomi l'opportunità di realizzare questa tesi.

Ringrazio il dott. Alfred Beran, che mi ha seguito fin da subito in laboratorio, con i suoi insegnamenti e tutti i suoi consigli sulle colture algali mi ha fatto provare grandi soddisfazioni nel vedere la crescita delle mie colture, tenute ancora sempre sotto controllo e dalle quali sarà difficile separarmene.

Un ringraziamento speciale va alla dott.ssa Federica Cerino, la quale è stata sempre disponibile per tutti gli insegnamenti di cui avevo bisogno in laboratorio, e senza di lei non avrei fatto il corso di microscopia elettronica con il quale siamo riuscite a fare tutte le osservazioni al TEM per questa tesi. Oltre a ciò mi ha aiutata ad affrontare tutti i problemi riscontrati in questo lavoro e mi ha sempre spronata con la stesura di questa tesi, perciò un semplice ringraziamento non basterebbe.

Un ringraziamento va alla dott.ssa Daniela Fornasaro per avermi incoraggiata e ben consigliata su molti miei dubbi.

Ringrazio, per avermi messo a disposizione tutti i dati della comunità fitoplanctonica, la dott.ssa Daniela Fornasaro, produttrice di tutti i dati, e la dott.ssa Marina Cabrini, responsabile del laboratorio del fitoplancton. Per i dati fisico-chimici, ringrazio il dott. Michele Giani, responsabile del laboratorio di chimica, e i suoi colleghi chimici.

Per le analisi effettuate al microscopio elettronico ringrazio il dott. Paolo Bertocin, responsabile del Settore Microscopia Elettronica all'Università degli studi di Trieste.

Per le analisi tossicologiche ringrazio il Centro Ricerche di Cesenatico, soprattutto il direttore del Settore Chimico, la dott.ssa Anna Milandri, e la dott.ssa Silvia Pigozzi, per avermi ospitato alcuni giorni per assistere alle analisi tossicologiche.

Per le analisi molecolari ringrazio il Prof. Alberto Pallavicini dell'Università degli Studi di Trieste e la dott.ssa Valentina Torboli, la quale ha avuto la pazienza di spiegarmi tutto il procedimento e ripetere più volte le analisi per una maggior accuratezza dei dati qui presentati.

Un ringraziamento di cuore va a tutta la mia famiglia per avermi supportata ma soprattutto sopportato nei momenti peggiori. Ringrazio soprattutto i miei genitori per non avermi mai ostacolato nella scelta del mio percorso di studi, ma anche nella scelta di frequentare l'università a 250 km da casa.

Ringrazio tutti quelli che mi sono stati vicino, le mie sorelle, mio fratello, il mio ragazzo Davide, i miei amici, e tutti quelli che hanno creduto in me!

Vanessa