

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**Caratterizzazione della tossicità di
Ostreopsidaceae del Mediterraneo**

Relatore:

Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da:

Luca Canonico

Correlatore:

Dott.ssa Laura Pezsolesi

(III sessione)

Anno Accademico 2009/2010

INDICE

INTRODUZIONE	6
1. PROBLEMATICHE AMBIENTALI LEGATE ALLE FIORITURE	
ALGALI	7
2. LE BIOINTOSSICAZIONI	10
2.1. SAXITOSSINE	12
2.2. ACIDO OKADAICO	13
2.3. PECTENOTOSSINE	15
2.4. YESSOTOSSINE	15
2.5. ACIDO DOMOICO	16
2.6. BREVITOSSINE	17
2.7. AZASPIRACIDI	18
2.8. CIGUATERA	19
3. <i>OSTREOPSIS OVATA</i>	21
3.1. CLASSIFICAZIONE	21
3.2. CARATTERISTICHE GENERALI	21
3.3. IL GENERE <i>OSTREOPSIS</i> NEL MEDITERRANEO	24
3.4. <i>OSTREOPSIS OVATA</i> IN ITALIA	25
3.5. IL CASO DI GENOVA	27
3.6. INTOSSICAZIONI DA <i>OSTREOPSIS SP.</i>	28
3.7. PALITOSSINA E ANALOGHI	29

3.8. FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA DI <i>OSTREOPSIS</i>	
<i>OVATA</i>	32
3.8.1 EFFETTO DELLA TEMPERATURA	32
3.8.2.EFFETTO DEI NUTRIENTI	34
4. <i>COOLIA MONOTIS</i>	35
4.1. CLASSIFICAZIONE.....	35
4.2. <i>COOLIA MONOTIS</i> E POTENZIALI EFFETTI TOSSICI.....	36
SCOPO DELLA TESI	39
MATERIALI E METODI	43
5. COLTURE ALGALI	45
5.1. PREPARAZIONE DEL MEDIUM E INOCULO DELLE	
MICROALGHE.....	45
5.2. CONTEGGIO	47
5.3. CURVA DI CRESCITA	48
5.4. TASSO DI CRESCITA	49
5.5. BIOVOLUME	49
6. ANALISI DEI NUTRIENTI	50
6.1. ANALISI DELL'AZOTO NITRICO	50
6.2. ANALISI DEL FOSFORO	52
7. TEST DI TOSSICITA' SU <i>ARTEMIA SP.</i>	52
7.1. BIOLOGIA DI <i>ARTEMIA SP.</i>	52
7.2. SVOLGIMENTO DEL TEST	53
8. ANALISI CHIMICHE DELLA TOSSICITA'	54
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	55

9. TEST DI TOSSICITA' CON ARTEMIE	57
9.1. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' DI VARI CEPPI DI <i>COOLIA</i> <i>MONOTIS</i> TRAMITE TEST CON ARTEMIE	57
9.2. CONFRONTO E INTERAZIONE TRA LA TOSSICITA' DI <i>O. OVATA</i> E QUELLA DI <i>C.MONOTIS</i>	61
10. CRESCITA DI <i>O. OVATA</i> IN DIVERSE CONDIZIONI NUTRIZIONALI	63
10.1. ESPERIMENTO PRELIMINARE CON LIMITAZIONE DA AZOTO E FOSFORO	63
10.2. EFFETTO DELLA LIMITAZIONE DI AZOTO E FOSFORO SULLA CRESCITA DI <i>O. OVATA</i>	64
11. EFFETTO DELLA CARENZA DI NUTRIENTI SUL VOLUME CELLULARE	66
12. ANALISI DEI NUTRIENTI	70
12.1. ANALISI DEI NITRATI	70
12.2. ANALISI DEI FOSFATI	71
13. ANALISI DELLE TOSSINE	73
13.1. CONTENUTO DI TOSSINE PER CELLULA	73
13.2. ANALISI DEL CONTENUTO DI TOSSINE PER BIOVOLUME	74
13.3. ANALISI DEL CONTENUTO DI TOSSINE PER LITRO DI COLTURA	75

13.4. COMPOSIZIONE DELLE TOSSINE	77
CONCLUSIONI	79
BIBLIOGRAFIA	85

INTRODUZIONE

1. PROBLEMATICHE AMBIENTALI LEGATE ALLE FIORITURE ALGALI

Con il termine di fioriture algali/algal blooms, intendiamo un aumento improvviso di una popolazione di microalghe. In molti casi, la presenza di specifiche strategie adattative e di condizioni fisico-chimiche particolari permette alle specie di raggiungere una concentrazione di $10^4 - 10^6$ cellule per litro.

Soprattutto negli ultimi anni è emerso il problema degli HABs (Harmfull Algal Blooms) ovvero delle fioriture di quelle microalghe che direttamente o indirettamente sono pericolose per la salute umana e per l'ecologia di una regione (*Anderson D., 1994; Hallegraeff 1995*).

I fenomeni di HABs sono in aumento e si è cercato di comprenderne il motivo non senza difficoltà: le fioriture algali infatti dipendono da molteplici fattori come le caratteristiche biologiche delle specie causanti, le condizioni ambientali e, soprattutto, l'apporto di nutrienti inorganici che, ultimamente, risente pesantemente dell'attività umana risultando in cambiamenti drastici della disponibilità naturale di questi composti. Un esempio di questo caso è l'aumento dell'afflusso di azoto e fosforo dovuto all'eutrofizzazione: nelle zone costiere, infatti, aumentano gli scarichi di N e P dovuti ad attività antropica (come ad esempio l'agricoltura). L'incremento di questi nutrienti può anche causare cambiamenti nella popolazione fitoplanctonica andando a favorire la crescita di dinoflagellate (*Justic et al, 1995; Olivos, 2000*) che, in presenza di maggiori apporti di N e P, tendono ad aumentare a discapito di diatomee che crescono invece con quantità proporzionali ai livelli di silice (*Smayda, 1997*).

Tuttavia la correlazione tra eutrofizzazione e HABs non è né dimostrabile né applicabile a tutti i casi in quanto ancora non si conoscono bene i meccanismi e le caratteristiche che innescano una fioritura algale; inoltre questo fenomeno è causato sia da molti fattori dipendenti dalla biologia della specie che da fattori esterni agli organismi.

Come già detto, le fioriture algali possono avere effetti negativi causati dalla produzione di biotossine o dalla produzione di un'elevata biomassa. Molte specie che causano HABs sono collegate a entrambe queste caratteristiche. Delle 4000 specie di microalghe marine identificate,

circa 200 sono pericolose e circa 80 sono produttrici di tossine (*Zingone and Enevoldsen, 2000; Smayda and Reynolds, 2003*).

Possiamo suddividere gli effetti negativi degli HABs in quattro categorie:

- ***Rischi per la salute umana:*** alcune tossine prodotte da microalghe, riescono a raggiungere l'uomo mediante organismi vettori che accumulano al loro interno le sostanze tossiche, ma anche tramite inalazione di aerosol e contatto. Alcune sindromi possono addirittura essere letali.
- ***Impatti sugli organismi marini:*** le microalghe che causano HABs, non solo colpiscono pesci e altri invertebrati marini con la produzione di tossine, ma anche con la formazione di mucillaggini e con particolari appendici spinose delle cellule che possono causare l'ostruzione e addirittura lesioni alle branchie. Sono inoltre responsabili di casi di anossia e ipossia che hanno portato ad un alto tasso di moria di specie economicamente importanti (*Matthews and Pitcher, 1996*).
- ***Impatti sul turismo e le zone costiere:*** le fioriture algali causano le cosiddette maree colorate (red tides) che oltre ad abbassare la qualità delle

acque possono anche causare problemi di salute ponendo quindi un limite all'uso ricreazionale delle zone costiere (*Garcés E, Maso' M, Camp J, 1989*).

- ***Danni all'ecosistema marino:*** gli effetti delle fioriture algali possono essere devastanti per la composizione dell'ecosistema marino: la degradazione dell'elevata biomassa prodotta dagli HABs, può esaurire l'ossigeno e uccidere non solo specie economicamente importanti ma anche piante e animali che non sono in grado di lasciare la zona anossica; in altri casi possiamo avere un consumo eccessivo dei nutrienti, la riduzione di pascolo da parte del microzooplankton, la diminuzione delle praterie di fanerogame. E' stato notato che alcune tossine sembrano essere specifiche per certe popolazioni di mammiferi, uccelli e pesci (*Geraci J. et al. 1989*).

2. LE BIOINTOSSICAZIONI

In presenza di fitoplancton tossico, i molluschi bivalvi (e talvolta alcuni tipi di pesci, crostacei, echinodermi e tunicati) accumulano le tossine presenti senza che queste abbiano su di loro effetti letali. Successivamente, le tossine potranno essere trasmesse all'uomo tramite il consumo di questi organismi contaminati; a partire dagli '90, ogni anno sono stati contati all'incirca 2000 casi di avvelenamento (*Hallegraeff G.M., 1995*) di cui alcune centinaia letali. La pericolosità di queste tossine sta nel fatto che esse sono termostabili dunque non degradabili con la cottura.

A lungo la classificazione delle biotossine è avvenuta raggruppandole in base ai sintomi clinici che provocavano:

- **Paralytic shellfish poisoning (PSP):** sindrome paralitica da molluschi bivalvi
- **Diarrhoetic shellfish poisoning (DSP):** sindrome diarroica da molluschi bivalvi
- **Neurotoxic shellfish poisoning (NSP):** sindrome neurotossica da molluschi bivalvi
- **Azaspiracid poisoning (AZP):** o sindrome da azaspiracido, tutte causate da dinoflagellate
- **Amnesic shellfish poisoning (ASP):** sindrome amnesica da molluschi bivalvi causata da diatomee
- **Ciguatera fish poisoning (CFP):** sindrome della ciguatera.

Oggigiorno però si preferisce classificare le biotossine in gruppi che si basano sulla loro struttura chimica:

- **Saxitossine(STX)**
- **Acido okadaico (OA)**
- **Pectenotossine (PTX)**
- **Yessotossine(YTX)**
- **Acido domoico (DA)**
- **Brevitossine (BTX)**
- **Azaspiracid group (AZA)**
- **Ciguatera**

2.1. SAXITOSSINE

Le saxitossine (fig. 1) sono una famiglia di tossine idrofile isolate per la prima volta dal bivalve *Saxidomus giganteus* (Schantz, et al. 1957).

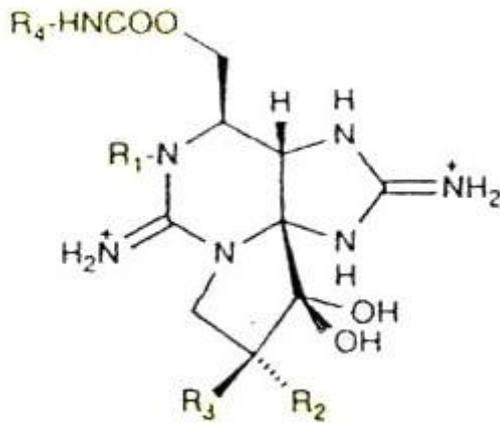


Fig. 1: Saxitossina

L'intossicazione avviene via ingestione e provoca una varietà di sintomi, che dipendono dalla quantità di tossina assunta, soprattutto a livello neurologico, tra cui formicolio, parestesia alla bocca, labbra, lingua e alle estremità degli arti, profonda astenia muscolare, impossibilità a mantenere la stazione eretta, andatura atassica. Sintomi a livello gastrointestinale sono possibili ma meno comuni.

La paralisi è dovuta al fatto che le saxitossine agiscono sui canali del sodio impedendo il trasporto di questi ioni attraverso la membrana; in questo modo, viene bloccata la trasmissione degli impulsi nervosi verso i nervi e i muscoli con conseguente paralisi respiratoria e morte. Generalmente i primi sintomi appaiono dopo circa 30 minuti dall'ingestione e la morte può sopraggiungere entro 2-12 ore (Kao CY, 1972).

Un'ulteriore dimostrazione della pericolosità di queste tossine sono i cambiamenti a cui queste vanno incontro una volta ingerite: subiscono infatti una serie di

trasformazioni chimiche che vanno a influenzare la loro tossicità. Possiamo distinguere quindi 3 tipi di saxitossine:

- carbamiltossine (maggiormente tossiche)
- sulfocarbamiltossine (a minore tossicità).
- Decarbamiltossine (di tossicità intermedia)

Le saxitossine sono prodotte da dinoflagellate dei generi *Alexandrium*, *Gymnodinium* e *Pyrodinium* ma ci sono anche Cyanophyceae che le producono.

Recependo le direttive europee, la legislazione italiana ha imposto un limite di tolleranza per questa tossina nei bivalvi di 800µg/kg di parte edibile.

2.2. ACIDO OKADAICO

Le tossine del gruppo dell'acido okadaico causano sindromi di tipo DSP i cui sintomi sono principalmente di natura gastrointestinale con nausea, vomito e diarrea. Il periodo di incubazione è variabile da 30 min. ad alcune ore. La patologia nei casi più severi può durare qualche giorno.

L'acido okadaico (fig. 2) possiede anche dei derivati chiamati dinofisitossine (DTX) come la DTX-1, DTX-2 e DTX-3, anche se quest'ultima sembra essere un derivato metabolico della DTX-1 (fig. 3).

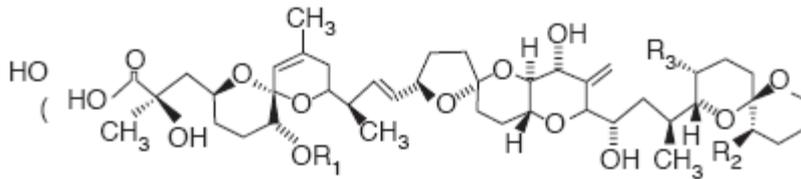


Fig. 2: Acido okadaico

	R1	R2	R3
AO	H	H	CH ₃
DTX1	H	CH ₃	CH ₃
DTX2	H	H	CH ₃
DTX3	acyl	CH ₃	CH ₃
7-O-acylOA	acyl	CH ₃	H
7-O-acylDTX2	acyl	H	CH ₃

Fig. 3: Analoghi di acido okadaico

Queste tossine, essendo liposolubili, possono attraversare facilmente la membrana cellulare e vanno a inibire le proteino-fosfatasi PP1 e PP2A; in questo modo alterano i processi di fosforilazione che sono importanti per la regolazione dell'attività cellulare. L'acido okadaico probabilmente provoca diarrea aumentando la fosforilazione che controlla la secrezione del sodio delle cellule intestinali; inoltre, assieme alla DTX-1, è ritenuto essere un promotore tumorale (*Sugamuma M. et al. 1988*); sembra cioè, che possa accelerare il processo di cancerogenesi determinato da vari inquinanti chimici (iniziatori) che hanno un'azione diretta sul DNA.

L'acido okadaico e i suoi derivati vengono prodotti dai generi *Dinophysis* e *Prorocentrum*. Il limite di legge per la commercializzazione è di 160 µg/kg.

2.3. PECTENOTOSSINE

Le pectenotossine sono un gruppo di polieteri ciclici (fig. 4) e generalmente vengono collegate alle sindromi di tipo DSP.

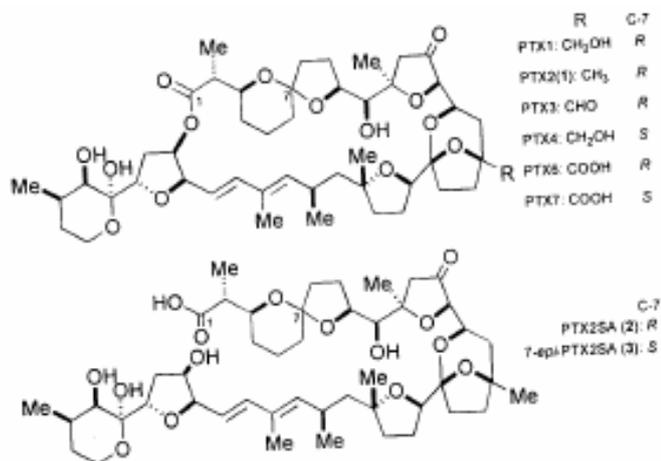


Fig. 4: Pectenotossina

Test in laboratorio su topi però, hanno dimostrato come queste tossine siano particolarmente dannose per gli epatociti (Zhou J et al. 1994). Anche queste molecole sono prodotte dal genere *Dinophysis*.

2.4. YESSOTOSSINE

La yessotossina è un etere policiclico a forma di scala (fig. 5) di cui esistono diversi analoghi.

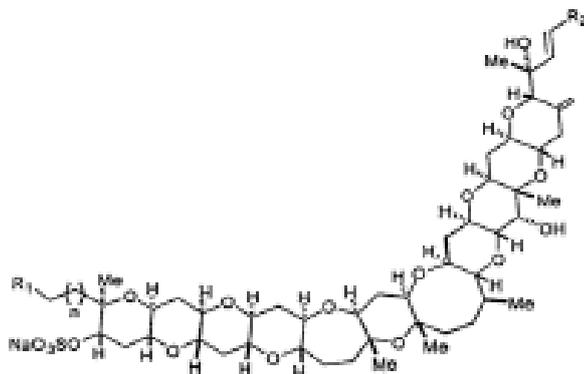


Fig. 5: Yessotossina

Isolata per la prima volta dal bivalve *Patinopecten yessoensis* (Murata et al., 1987), inizialmente, veniva associata alla sindrome di tipo DSP in quanto era spesso rilevata assieme all'acido okadaico. Successivi studi su topi hanno evidenziato la tossicità propria della tossina nella sua forma pura e desulfata: la prima agisce sul miocardio mentre la seconda sul fegato e pancreas (Terao K. et al. 1990). Le YTX sono prodotte da *Gonyaulax spinifera*, *Coolia monotis* (la cui tossina è un analogo), *Lingulodinium polyedrum* e *Protoceratium reticulatum*. Il limite massimo per la commercializzazione è 1mg/kg.

2.5. ACIDO DOMOICO

Oltre a disturbi di tipo gastrointestinali, l'acido domoico è responsabile per sindromi di tipo ASP che causano problemi di natura neurologica: stato confusionale, disorientamento, perdita della memoria e addirittura coma nei casi più gravi. Agisce a livello del sistema nervoso centrale (Isbister and Kiernan, 2005), colpendo in particolare l'ippocampo e l'amigdala.

L'acido domoico (fig. 6), così come i suoi 10 isomeri, è idrosolubile e termostabile; è un amminoacido tricarbossilico con una struttura analoga a quella dell'acido glutammico e dell'acido kainico.

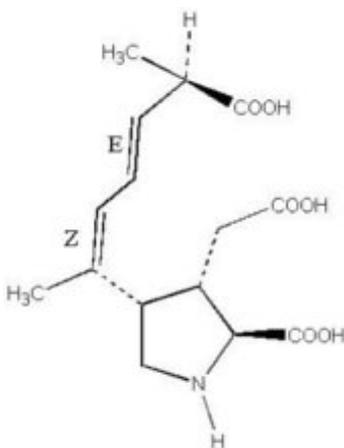


Fig. 6: acido domoico

Agisce sui recettori dell'acido glutammico: legandosi a questi infatti, apre i canali degli ioni calcio il cui aumento provoca il rigonfiamento e la lisi delle cellule neuronali (*Wright et al, 1990*).

L'acido domoico viene prodotto dalle diatomee del genere *Pseudonitzschia* (tra cui *P. multiseriata*, *P. pungens*, *P. seriata*, *P. pseudodelicatissima*, *P. delicatissima*, *P. australis*).

Visto che l'acido domoico agisce ad alte concentrazioni, anche il suo limite è piuttosto alto rispetto a quello di altre tossine: ben 20 mg/kg.

2.6. BREVITOSSINE

Sono causa delle intossicazioni di tipo NSP provocando sintomi gastrointestinali e neurologici come parestesia a labbra, lingua e gola, dolori muscolari, vertigini, brividi, diarrea e vomito; non sono stati registrati casi letali.

Le brevittossine (di cui sono note 5 forme) costituiscono un sistema di 11 anelli eterociclici contenenti ossigeno, terminante con una lattone insaturo ad una estremità e un'aldeide insatura nell'altra (*Alaman et al, 1975*; fig. 7)

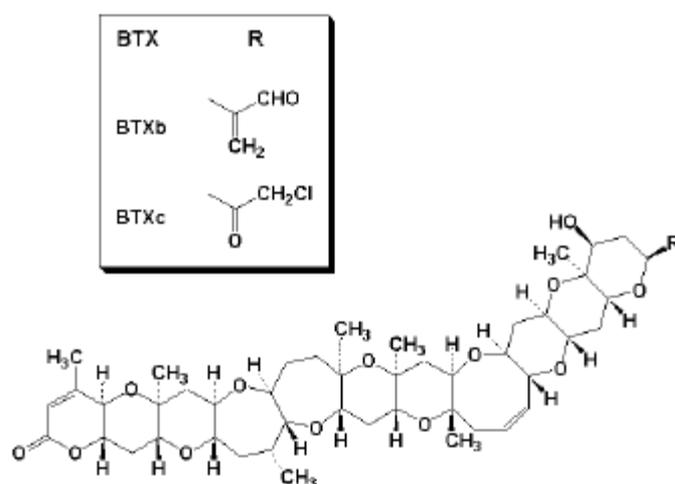


Fig. 7: Brevitossine e analoghi

Le brevitossine agiscono come agente depolarizzante all'interno della cellula: causano l'apertura dei canali degli ioni sodio provocando effetti neurotossici (*Risk et al, 1979*).

Oltre che per ingestione, le brevi tossine possono essere assunte anche mediante aerosol e contatto.

Sono prodotte dalla dinoflagellata *Karenia brevis* che, tramite bloom intensi, causa anche imponenti morie di pesci.

Il livello massimo di tolleranza consentito è di 800 µg/kg.

2.7. AZASPIRACIDI

L'azaspiracido (fig. 8), una tossina scoperta solo recentemente, è costituito da una catena polieterica a spirale e possiede 4 analoghi (*Satake et al, 1998; Ofuji et al, 1999*).

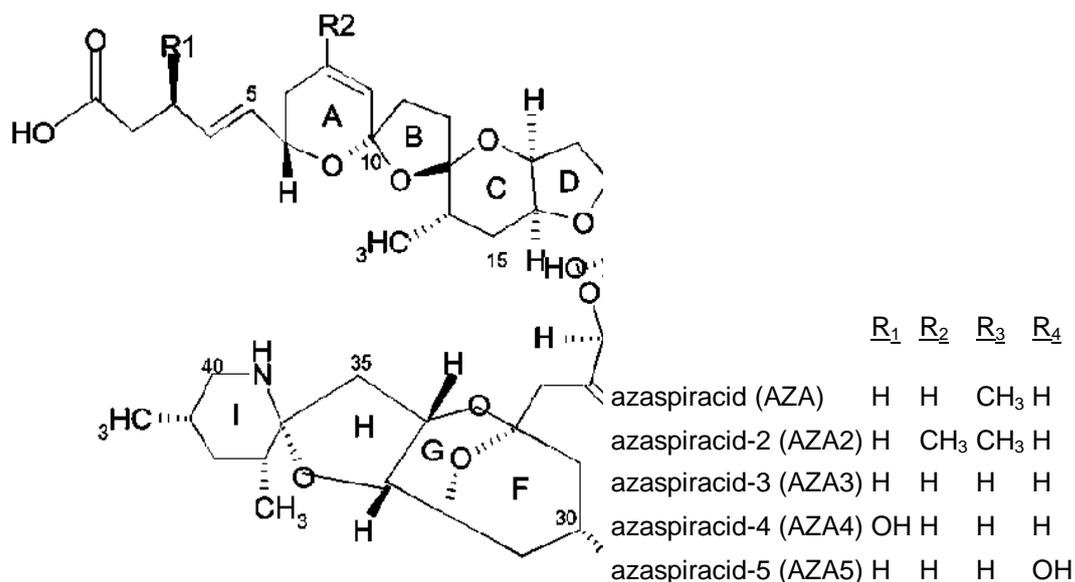


Fig. 8: azaspiracido e analoghi

Questo composto provoca gravi danni al fegato, al pancreas, al tratto digestivo e ai tessuti linfatici (*Ito E et al, 1998*).

Per molto tempo si è pensato che l'azaspiracido venisse prodotto da dinoflagellate del genere *Protoperdinium* ma in seguito a studi approfonditi si è osservato che l'organismo produttore è un nuovo genere: l'*Azaniidum spinosum*. Questa nuova alga è una dinoflagellata di cui si nutrono altre dinoflagellate eterotrofe come appunto il *Protoperdinium*: da qui la "confusione" sull'organismo produttore della tossina.

Anche per questa tossina, i vettori sono i mitili e la commercializzazione è permessa solo per valori inferiori a 160 µg/kg.

2.8. CIGUATERA

La ciguatera è un'intossicazione tipica delle regioni tropicali dovuta al consumo di pesce contaminato; si manifesta con svariati sintomi tra cui alterazioni di natura neurologica, gastrointestinale e, a volte, problemi cardiovascolari.

Sono state riconosciute 5 tossine responsabili di questa intossicazione di cui due sono le più importanti: la ciguatossina e la maitotossina.

La ciguatossina (fig. 9) è un composto liposolubile e termoresistente con una struttura ad anelli che richiama quella delle brevitossine. La sua azione principale è quella di aumentare la permeabilità delle membrane cellulari agli ioni Na⁺ causandone la depolarizzazione (*Lewis et al, 2000*).

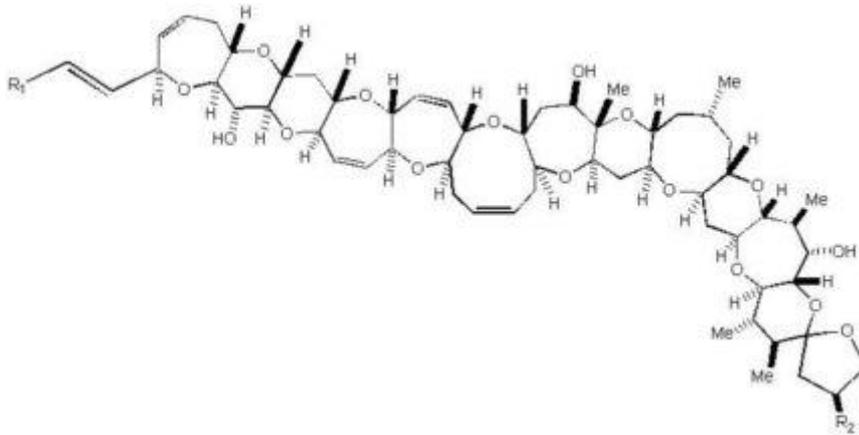


Fig. 9: Ciguatossina

La maitotossina (con formula molecolare: $C_{164}H_{256}O_{68}S_2Na_2$) è un composto idrosolubile isolato assieme alla ciguatossina ma in quantità molto modeste tale da rendere il suo ruolo nella sindrome molto marginale (*Estacion, 2000; Yasumoto, 2000/2001*) anche perché è stato accertato che non si accumula nelle carni dei pesci consumatori. E' un potente attivatore dei canali del Ca^{2+} : questo causa un aumento dei livelli del Ca^{2+} nel citosol stimolando i processi calcio-dipendenti e portando addirittura alla morte della cellula (*Escobar et al, 1998; Estacion, 2000; Morales-Tialpan and Vace, 2002*).

Le tossine, accumulate nella catena alimentare, vengono prodotte dal dinoflagellato bentonico *Gambierdiscus toxicus* (*Yasumoto T. et al, 1997*). Nelle zone tropicali, vista la variabilità dei sintomi, spesso si è ipotizzato il coinvolgimento di altre dinoflagellate che vivono in associazione con *G.toxicus* come ad esempio i generi *Ostreopsis*, *Coolia*, *Prorocentrum* ed *Amphidinium* (*Faust et al., 1996*).

3. *OSTREOPSIS OVATA*

3.1. CLASSIFICAZIONE

Phylum Dinoflagellata

Classe Dinophyceae

Ordine Peridiniales (GenBank Taxonomy)

Famiglia Ostreopsidaceae

Genere *Ostreopsis*

Specie *O.ovata* (fig. 10)

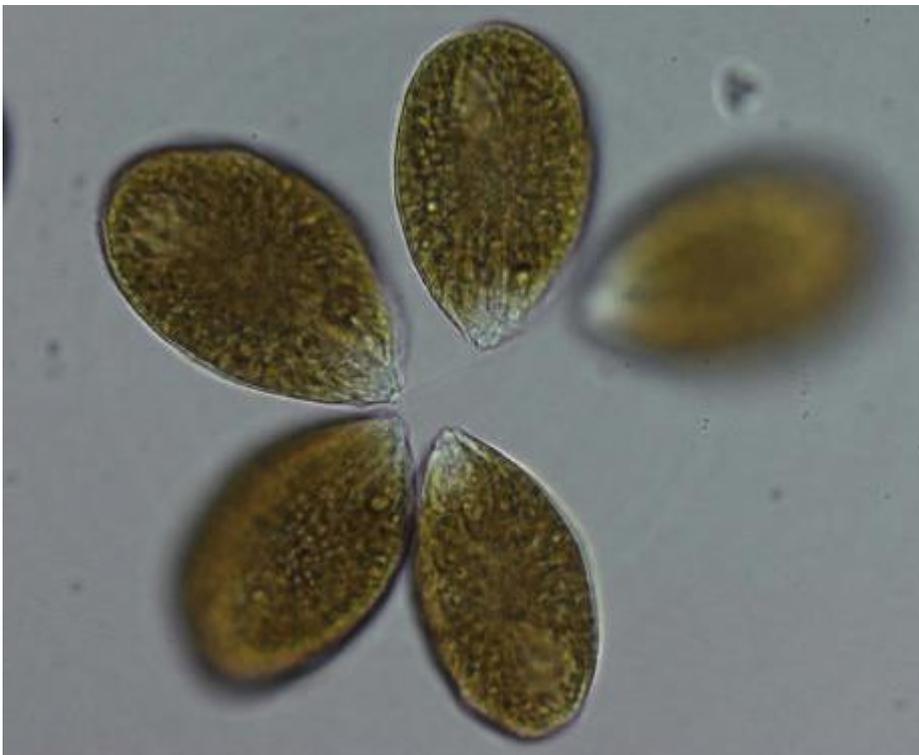


Fig. 10: *O.ovata*

3.2. CARATTERISTICHE GENERALI

Il genere *Ostreopsis* è rappresentato da organismi unicellulari bentonici, occasionalmente planctonici. Si tratta di microalghe non particolarmente specifiche per quanto riguarda il substrato in quanto crescono indifferentemente su macroalghe, vari tipi di sedimenti e aggregati di detriti costruendo una matrice

mucillaginosa dove, peraltro, le cellule rimangono generalmente mobili; è anche possibile il distacco di flocculi, ospitanti un numero molto elevato di cellule, che causano il passaggio di questi dinoflagellati nella colonna d'acqua e la loro conseguente dispersione. A causa della forma di questa mucillagine, che ricorda quella di una ragnatela (fig. 11), questa tipologia di crescita viene anche chiamata “spider’s strategy” (Barone et al, 2007).



Fig.11: Spider’s strategy

O. ovata è morfologicamente ben definita (Faust M, Gualledge R.A., 2002): le cellule possiedono una teca biconvessa, comunemente a forma di lacrima, compressa anteroposteriormente e distorta dorsoventralmente (Fig. 12).

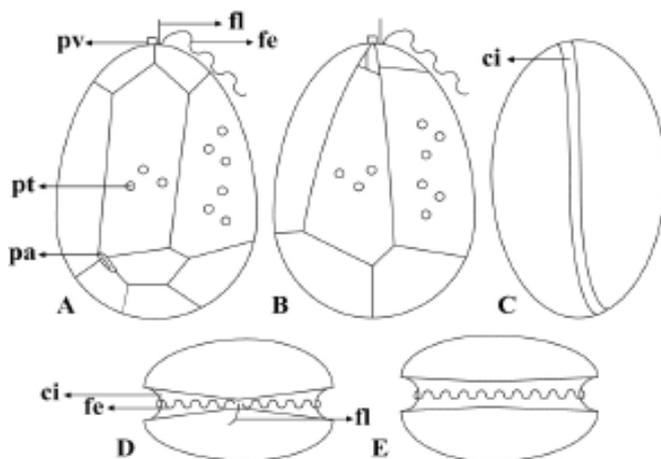


Fig. 12 : *Ostreopsis*. A = epiteca; B = ipoteca; C = vista laterale; D = vista ventrale; E = vista dorsale; ci = cingolo; fe = flagello equatoriale; fl = flagello longitudinale; pa = poro apicale; pt = poro a tricisti; pv = poro ventrale.

Nella teca sono stati osservati numerosi pori a tricocisti, peculiari strutture implicate nella difesa, la cui estrusione determina un repentino allontanamento della cellula dalla fonte di disturbo. Il nuoto manifesta una rotazione attorno all'asse dorso-ventrale. Le cellule producono fibrille di sostanze esopolimeriche che, aggregate, realizzano una matrice mucillaginosa (che permette l'adesione al substrato) nella quale gli individui rimangono mobili (*Faust et al.*, 1996). I cloroplasti, piccoli e numerosi, sono comunemente di colore bruno-dorato. Il ciclo biologico implica, in condizioni ambientali sfavorevoli, la formazione di uno stadio di resistenza (cisti) rappresentato, probabilmente, da un ipnozigote.

Da un punto di vista nutrizionale, *O. ovata* è un organismo mixotrofo (fotoautotrofo e facoltativamente eterotrofo) il cui comportamento alimentare eterotrofo è ancora poco noto. Una peculiare struttura protrusa, denominata poro ventrale, è stata implicata nella cattura della preda in condizioni di fagotrofia tant'è che all'interno della cellula è possibile osservare resti di altre microalghe e batteri (*Faust M., Morton S.L.*, 1995).

Cosmopolita in acque marine costiere e d'estuario di aree temperate, tropicali e subtropicali, prolifera più comunemente nella stagione estiva, in ambienti caratterizzati da basso idrodinamismo e da elevata disponibilità di nutrienti. La sua presenza nel mar Mediterraneo non sembra, pertanto, connessa ad una recente introduzione, mentre il suo carattere invasivo appare una manifestazione attuale determinata dall'interazione di un complesso di fattori chimici, fisici e biologici. Peculiari condizioni climatiche e meteomarine, eutrofizzazione costiera e maggiore disponibilità di aree con ridotto scambio idrico, associate alla costruzione di moli e porti turistici, potrebbero aver giocato un ruolo significativo nello sviluppo e nell'amplificazione del fenomeno.

3.3. IL GENERE *OSTREOPSIS* NEL MEDITERRANEO

Segnalazioni di specie del genere *Ostreopsis* sono state riportate nel Mediterraneo fin dagli anni '70 nella zona di Villefranche (Taylor, 1979). In seguito a numerose analisi e controlli periodici sul fitoplancton tossico, sono state identificate due specie riconducibili al genere *Ostreopsis*: *O.ovata* e *O.siamensis*.

O.ovata è diffusa in tutto il Mediterraneo (fig. 13), soprattutto nella parte nordoccidentale, ed è responsabile di fioriture che hanno causato sia intossicazioni all'uomo sia danni all'ecosistema marino.



Fig. 13: Segnalazioni di *O.ovata* in Mediterraneo

3.4. *OSTREOPSIS OVATA* IN ITALIA

Ostreopsis ovata è una microalga presente nei nostri mari la cui diffusione è aumentata nel corso degli anni (fig. 14). Questo fatto può essere determinato dalla complessa interazione di fattori chimici, fisici e biologici: particolari condizioni climatiche e meteomarine, eutrofizzazione costiera e maggiore disponibilità di aree con ridotto scambio idrico (dovute alla costruzione e ampliamento di moli e porti turistici) potrebbero aver giocato un ruolo significativo nello sviluppo e nell'amplificazione del fenomeno.

Ultimamente, in alcune aree costiere del Tirreno (Liguria, Toscana, Lazio, Sicilia) e dell'Adriatico (Marche, Puglia), sono stati riscontrati una serie di sintomi (come rinorrea, tosse, febbre, broncocostrizione, dermatiti) manifestati da bagnanti o da individui esposti all'aerosol marino che sono stati associati alla presenza di una notevole densità di specie microalgali bentoniche riconducibili principalmente al genere *Ostreopsis* (Dinophyceae) e, in particolare, alla specie *Ostreopsis ovata* (Congestri et al., 2006).

Nel 2006, elevate densità di *Ostreopsis* sono state segnalate in quasi tutto il litorale italiano, anche se non sempre legate ad eventi dannosi di tipo sanitario od ecologico.

Una delle prime segnalazioni in Italia si è avuta nel 1998 nel litorale apuano con la presenza di eventi tossici significativi sia per la salute umana che per l'ecosistema marino (Sansoni et al, 2002). In Sicilia, nelle estati 2005 e 2006, è stata segnalata un'analogia sintomatologia lungo la costa palermitana. In particolare, il fenomeno è stato più intenso ed esteso nei mesi di luglio ed agosto 2006, causando ingenti danni economici al settore turistico. Episodi di malessere sono stati registrati lungo il litorale palermitano e trapanese. In seguito a questi

avvenimenti, sono state condotte analisi che hanno rilevato un'elevata presenza di *O. ovata* sia sulle macroalghe sia nella colonna d'acqua. Precedenti segnalazioni della presenza di specie del genere *Ostreopsis* risalgono al 2001 (*Ostreopsis siamensis*) lungo la costa nord orientale (Vila et al., 2001) ed al 2003 (*Ostreopsis* sp.) nel litorale occidentale in occasione di alcuni studi sulla dinamica stagionale della rodofita *Asparagopsis taxiformis* (Barone, 2004).

Per quanto riguarda l'Adriatico, le fioriture significative di *O.ovata* sono piuttosto recenti: le prime segnalazioni si sono avute nel 2003 presso le coste baresi (Casavola et al, 2005). Dal 2006 altre segnalazioni sono avvenute lungo le coste marchigiane (ARPAM, 2008) e friulane.



Fig. 14: Segnalazioni *O.Ovata* in italia

3.6. INTOSSICAZIONI DA *OSTREOPSIS* SP.

Perché le fioriture algali del genere *Ostreopsis* hanno causato e causano così tanti problemi?

Le analisi tossicologiche delle due specie identificate nel mar Mediterraneo (*Ostreopsis ovata*, *Ostreopsis* cf. *siamensis*), hanno mostrato la presenza di palitossine (Penna *et al.*, 2005).

Casi di bioaccumulo di palitossina sono avvenuti nelle aree tropicali dando origine a fenomeni di clupeotossismo, ovvero un'intossicazione umana associata al consumo di pesci clupeidi contaminati (Onuma *et al.*, 1999; Lenoir *et al.*, 2004). In seguito ad analisi congiunte delle acque e delle branchie ed esofago dei pesci contaminati, è stato possibile ricondurre la produzione della palitossina alle flagellate del genere *Ostreopsis*. Nell'area mediterranea però, i fenomeni di intossicazione umana sono stati ben diversi: non più per consumo di organismi contaminati ma per casi di aerosol marina contenente cellule tossiche che causano svariati sintomi (ad esempio il caso di Genova).

Per quanto riguarda invece l'impatto sull'ecosistema marino la situazione non cambia affatto tra le zone tropicali e quelle temperate. Le fioriture di *Ostreopsis* sono particolarmente dannose per gli altri organismi marini soprattutto bentonici. Si può prendere come esempio il caso di Massa Carrara (Sansoni *et al.*, 2002) dove la fauna delle zone meso-infralitorale ha subito un drastico ridimensionamento: si sono riscontrati infatti cali nelle popolazioni di patelle (sono stati ritrovati in gran numero gusci vuoti ai piedi degli scogli), l'assenza di specie caratteristiche come il pomodoro di mare, l'alta mortalità di mitili. In questa occasione, un elemento interessante, era l'aspetto degli scogli sommersi, in gran parte spogli dall'abituale copertura di fitobenthos e zoobenthos e ricoperti

invece da un biofilm mucillaginoso contenente un elevato numero di cellule di *O. ovata* che, oltre ad avere causato il danno, impedivano anche la ricolonizzazione da parte di altri organismi.

In seguito ad ulteriori analisi su sedimenti defaunati, sono state anche trovate molte aree affette da anaerobiosi causata proprio dalla fioritura di *O.ovata*.

3.7. PALITOSSINA E ANALOGHI

Tossina marina di origine non proteica, la palitossina (PTX) è una delle più potenti e pericolose tossine conosciute. Deve il suo nome al fatto che fu isolata per la prima volta dal corallo molle *Palythoa toxica*, ma è stata trovata anche in altre specie del genere *Palythoa* e *Zoanthus* (Bignami, 1993).

È un polietere policiclico molto grande costituito da una lunga catena di atomi di carbonio (fig.15) che la porta ad essere una delle molecole più grandi presenti in natura (Moore and Bartolini, 1981)

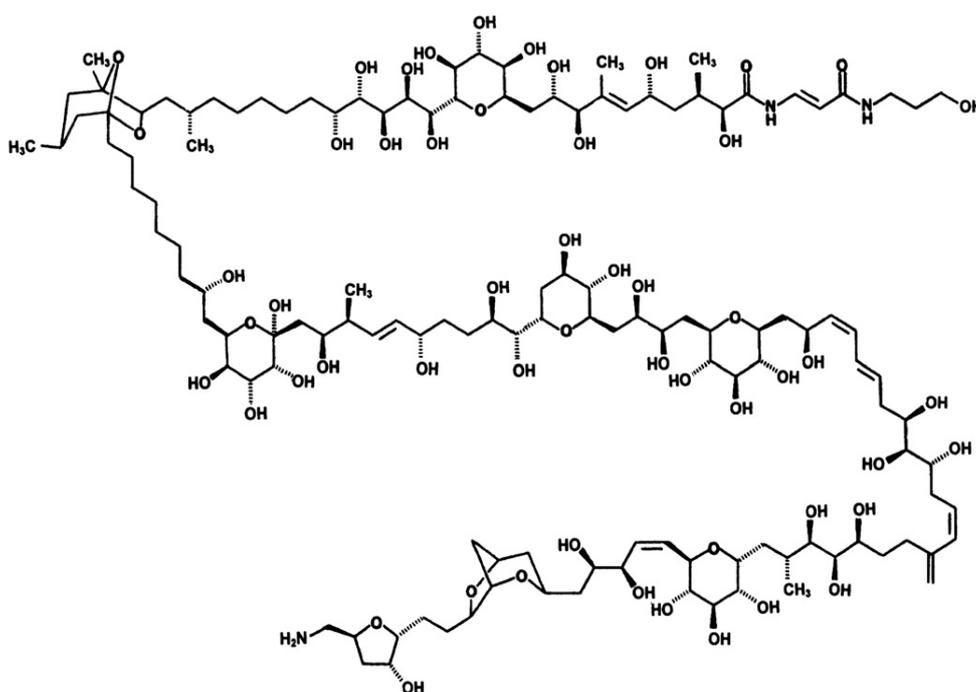


Fig. 15: Palitossina

La palitossina è una tossina molto pericolosa in quanto responsabile di emolisi. Questo è possibile in quanto la palitossina si attacca alla pompa sodio potassio alterandone le funzioni: la pompa, infatti, è responsabile del mantenimento del gradiente ionico all'interno della cellula; in presenza di palitossina perde la sua selettività alterando così il gradiente e provocando la lisi delle cellule con una precedente perdita di gran quantità di potassio (*Artigas and Gadsby, 2003; Hilgemann, 2003*).

L'azione della palitossina può essere inibita dall'ouabaina: questa molecola, infatti, si lega in corrispondenza della pompa Na,K-ATPasi e, per competizione, esclude di conseguenza la tossina (Habermann et al, 1989).

La palitossina però non è l'unica molecola tossica prodotta dal *Ostreopsis ovata*: già nota è la presenza dell'ovatossina-a (OVTX-a) e della palitossina putativa pPLTX (*Ciminiello et al. 2008*) come componente principale del profilo tossico dell'*O. ovata* insieme a piccole quantità di palitossina.

Grazie a studi successivi è stato possibile ampliare il profilo tossicologico della microalga evidenziando la presenza di quattro nuove tossine: ovatossina-b, -c, -d, ed -e (OVTX- b, OVTX-c, OVTX-d, OVTX-e) (*Ciminiello et al, 2010; Rossi et al, 2010*).

Le formule molecolari assegnate a tali ovatossine (fig. 16) mostrano stretta analogia con quella della palitossina, inoltre è stato possibile ottenere alcune informazioni sulle modifiche strutturali. Uno studio quantitativo ha indicato che l'ovatossina-a rappresenta il 54% del contenuto tossico totale e che il restante 46% è costituito dalla somma degli altri analoghi ovatossina-b, -c, -d, ed -e .

La scoperta di queste nuove ovatossine contribuisce ad ampliare il panorama delle

tossine da monitorare sia in campioni di plankton che di alimenti marini nell'ambito di programmi di tutela della salute pubblica.

	Formula Chimica [M+H]⁺
PTX	$C_{129}H_{224}N_3O_{54}$
pPLTX	$C_{129}H_{224}N_3O_{54}$
OVTX-a	$C_{129}H_{224}N_3O_{52}$
OVTX-b	$C_{131}H_{228}N_3O_{53}$
OVTX-c	$C_{131}H_{228}N_3O_{54}$
OVTX-d	$C_{129}H_{224}N_3O_{53}$
OVTX-e	$C_{129}H_{224}N_3O_{53}$

Fig. 16: Tossine prodotte da *Ostreopsis*

3.8. FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA DI *OSTREOPSIS OVATA*

Nonostante le continue segnalazioni di fioriture di *O. ovata* in Mediterraneo, ancora non si comprendono bene le condizioni che favoriscono lo sviluppo di queste dinoflagellate.

Vari studi sono stati indirizzati a comprendere come la crescita di *O. ovata* venga influenzata da fattori ambientali come ad esempio la temperatura, l'idrodinamismo, la salinità e i nutrienti; questi fattori negli ultimi anni sono stati studiati anche per capire come possano influenzare non solo la crescita delle microalghe ma anche la loro produzione di tossine.

3.8.1. EFFETTO DELLA TEMPERATURA

Molti studi, hanno riportato l'importanza della temperatura nello sviluppo di bloom di varie dinoflagellate (*Ballantine et al., 1988; Hallegraeff et al., 1995; Morton et al., 1992*): i dati ambientali mostrano una correlazione tra la temperatura e gli episodi di fioriture di *O.ovata* (*Pistocchi et al, 2011*).

Nel 1994, una fioritura abbondante di *O.ovata* nelle coste laziali è coincisa con una temperatura dell'acqua tra 28-29°C (*Tognetto et al,1995*). Nelle stesse zone, negli anni successivi, sono state osservate altre fioriture ma a temperature ben più basse: 24 °C (*Bianco et al, 2006*).

Nelle coste toscane ci sono state fioriture a 22°C (*Simoni et al, 2006*) mentre nella costa ligure, durante il caso di Genova, la temperatura raggiungeva i 25°C (*Ciminiello et al, 2006*).

Anche in Adriatico ci sono state fioriture a differenti temperature. Presso le coste baresi e abruzzesi sono avvenute fioriture ad alte temperature (tra i 26-28°C; *Ingarao et al, 2009; Ungaro et al, 2005*) ma presso le coste marchigiane sono avvenute a temperature decisamente inferiori. Infatti si è registrata la massima proliferazione durante il mese di Ottobre, con un range di temperatura compreso tra i 16.8°C e i 21°C (*Totti et al, 2010*). Nella zona di Trieste, altre fioriture sono avvenute a temperature di 20°C e 22°C (*Monti et al, 2007*).

Da questi dati, si osserva subito l'ampio range di temperatura a cui sono stati associati episodi di fioriture: non abbiamo una temperatura "precisa" che innesca un "algal bloom" e quindi è molto difficile trovare un'interazione precisa tra la crescita delle microalghe e la temperatura.

La temperatura sembra influenzare la produzione delle tossine: studi su *O.ovata* isolata dalla zona ligure hanno dimostrato che la tossicità delle cellule aumenta a temperature più alte (*Graneli et al, 2008; Manganelli et al, 2007*).

Tuttavia, altri studi incentrati su ceppi diversi come quello isolato dell'Adriatico (*Pezzolesi et al, in via di pubblicazione*), hanno mostrato come la produzione di tossine sia più alta alla temperatura di 20°C rispetto a stesse colture poste a 25 e 30°C.

3.8.2. EFFETTO DEI NUTRIENTI

Come accennato in precedenza, la concentrazione di nutrienti è da considerarsi come un importante elemento per il controllo e lo sviluppo dei bloom di dinoflagellate. E' noto come gli ecosistemi costieri siano sempre più soggetti all'arricchimento di nutrienti a causa dell'attività umana portando così all'eutrofizzazione delle zone costiere. Tutto ciò causa fenomeni di fioriture algali anche in zone generalmente oligotrofiche (*Anderson et al., 2002; Hallegraeff, 1993; Hallegraeff, 2003; Heisler et., 2008*).

Per quanto riguarda *O. ovata*, si hanno poche informazioni sulla relazione tra le concentrazioni di nutrienti in ambiente marino e la sua abbondanza in quanto i pochi dati disponibili derivano da studi relativi alle specie di *Ostreopsis* coinvolte in biointossicazioni di ciguatera in zone tropicali.

In tali aree, quando presenti, le specie di *Ostreopsis* mostravano alti livelli di abbondanza correlati ad alte concentrazioni di nitrati (e nitriti), fosfati e silicati mentre altri studi riportano che altre specie prediligono condizioni oligotrofiche (*Pistocchi et al., 2001*).

4. *COOLIA MONOTIS*

4.1. CLASSIFICAZIONE

Phylum Dinozoa

Classe Dinophyceae

Ordine Peridiniales

Famiglia Ostreopsidaceae

Genere *Coolia*

Specie *C. monotis* (Meunier, 1919)



Fig. 17: *Coolia monotis*

4.2. *COOLIA MONOTIS* E POTENZIALI EFFETTI TOSSICI

Coolia monotis è una microalga bentonica ed epifitica molto diffusa: è presente in molti ambienti marini, principalmente nei mari dei Caraibi, nell'oceano Pacifico e nel Mediterraneo e molto spesso si trova in associazione con altre microalghe tra cui *O.ovata*.

Le cellule (fig. 18), compresse antero-posteriormente, hanno come elemento caratterizzante la dimensione e la forma del poro apicale: questo infatti si presenta come una spaccatura lunga e curva sulla teca.

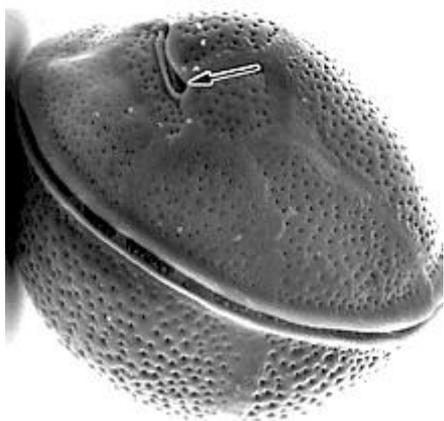


Fig. 18: poro apicale;

L'epiteca è leggermente più piccola dell'ipoteca e le varie placche sono ben delineate tra di loro. Sulla superficie sono ben evidenti dei pori con forma molto regolare. La cellula presenta inoltre un cingolo equatoriale e un poro ventrale da cui secerne sostanze mucillaginose (*Besada et al. 1982*).

C. monotis è stata riportata essere tossica (*Nakajima et al., 1981*) e produrre una tossina chiamata cooliatossina (*Holmes et al., 1995*), il cui peso molecolare corrisponde a quello della yessotossina mono-solfato: questo ci suggerisce che la

cooliatossina possa essere un analogo della yessotossina ma la molecola non è stata ancora caratterizzata.

La cooliatossina è stata isolata nel 1995 dal dinoflagellato *Coolia monotis* presente in Australia. Seppure *C. monotis* sia stata ritrovata nelle zone colpite da ciguatera in associazione con *Ostreopsis* sp. (Besada et al. 1982), la cooliatossina tende a non bioaccumularsi nei pesci, e se iniettata al topo per via intraperitoneale non produce la sintomatologia caratteristica dell'avvelenamento da ciguatera.

Inoltre, i sintomi clinici che questa tossina induce nel topo risultano analoghi a quelli prodotti dalla yessotossina, ovvero dopo un primo periodo in cui non vi sono sintomi evidenti di intossicazione, insorgono ipotermia e difficoltà respiratorie.

SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo della tesi è quello di caratterizzare alcuni aspetti relativi alla tossicità di due microalghe presenti nei nostri mari e che molto spesso sono state trovate in associazione tra loro: *Coolia monotis* e *Ostreopsis ovata*.

Si tratta di due dinoflagellate bentoniche tra cui, *O. ovata* determina fioriture con conseguenze sulla salute umana e sull'ecosistema, mentre *C. monotis* è sempre co-presente nelle fioriture di *O. ovata* ma con numeri di cellule molto bassi.

I ceppi di *O. ovata* del Mediterraneo sono stati analizzati precedentemente e sono risultati produrre analoghi della palitossina, denominati ovatossine, che sembrano responsabili dei sintomi di tossicità verso l'uomo e gli animali. Le informazioni relative alla tossicità di *C. monotis* sono invece ancora molto scarse; alcuni ceppi sono risultati produrre analoghi della yessotossina denominati cooliatossine, ma la presenza di tali tossine non è stata sempre confermata.

Avendo poche informazione e dati sui ceppi di *Coolia monotis* del Mediterraneo, si è preferito cominciare con studi tossicologici preliminari per valutare l'eventuale presenza di tossine in diversi ceppi isolati in anni e in località diverse. I risultati sono stati messi a confronto con quelli ottenuti utilizzando *O. ovata* ed inoltre sono stati effettuati test con la presenza contemporanea delle due specie per poter così valutarne il ruolo e il peso della tossicità di ciascuna in concomitanza con le fioriture.

Per quanto riguarda *O. ovata*, sono stati condotti esperimenti per comprendere le caratteristiche della crescita e della tossicità in relazione alla carenza di nutrienti particolarmente importanti per la fisiologia della microalga.

In primo luogo sono state allestite delle colture a diverse condizioni di nutrienti dalle quali è stato possibile valutarne la crescita e misurare il biovolume. La ricerca è poi continuata studiando il consumo dei nutrienti delle colture e la

produzione delle tossine mediante l'analisi chimica effettuata presso il Dipartimento di Chimica delle sostanze naturali dell'Università Federico II di Napoli.

Una volta ottenuti e comparati i vari risultati, sarà possibile valutare come i nutrienti possano influenzare la crescita e la produzione di tossine di *O. ovata*.

MATERIALI E METODI

5. COLTURE ALGALI

5.1. PREPARAZIONE DEL MEDIUM E INOCULO DELLE MICROALGHE

Il mezzo di coltura utilizzato per la crescita delle alghe è costituito da acqua di mare, che viene opportunamente filtrata con un sistema di filtrazione a vuoto e utilizzando filtri in fibra di vetro (WHATMAN GF/C).

Per mezzo di un rifrattometro, viene misurata la salinità: questa deve essere portata al valore di 35 che, da dati ambientali e da studi precedenti, corrisponde al valore idoneo per la crescita e lo sviluppo di *O. ovata*. La formula che viene utilizzata per effettuare la correzione della salinità è la seguente:

$$V_i (\text{Acqua di mare}) * S_i = V_f (\text{Terreno di coltura}) * S_f.$$

Dove V_i è il volume di acqua di mare da cui partire, V_f è il volume finale di terreno da ottenere, S_i è la salinità iniziale e S_f è la salinità finale.

La quantità di acqua di mare viene quindi portata a volume di due litri con acqua deionizzata. L'acqua così preparata deve essere sterilizzata in autoclave con un ciclo a 120°C, per 20 minuti, a 1 atm.

A questo punto, per preparare i mezzi di coltura occorre aggiungere all'acqua sterilizzata i nutrienti necessari, in piccoli volumi, prelevandoli da soluzioni stock sterili; tutte le operazioni vengono condotte sotto cappa sterile. Dovendo verificare la crescita di *O. ovata* in diverse condizioni, si sono preparati tre tipi (tab. 2, 3, 4) di terreno a partire dal classico terreno f/2 (*Guillard e Ryther, 1962*): uno di controllo con nutrienti bilanciati (N/10, P/10), uno in carenza di azoto (N/50, P/10) e uno in carenza di fosforo (N/10, P/50).

Concentrazione finale (M)

	N/10, P/10	N/10, P/50	N/50, P/10
NaNO ₃	176,4*10 ⁻⁶	176,4*10 ⁻⁶	35,28*10 ⁻⁶
NaH ₂ PO ₄	7,24*10 ⁻⁶	1,45*10 ⁻⁶	7,24*10 ⁻⁶
HEPES	-	-	-
Vitamine	-	-	-
Micronutrienti	-	-	-

Tab. 2: concentrazioni di NaNO₃ NaH₂PO₄

Micronutrienti	concentrazione finale(M)
FeCl ₃ 6H ₂ O	1,17 * 10 ⁻⁵
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	1,17 * 10 ⁻⁵
MnCl ₂ 4H ₂ O	9,10 * 10 ⁻⁷
ZnSO ₄ 7H ₂ O	7,65 * 10 ⁻⁸
CoCl ₂ 6H ₂ O	4,20 * 10 ⁻⁸
CuSO ₄ 5H ₂ O	3,93 * 10 ⁻⁸
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	2,6 * 10 ⁻⁸

Tab. 3: composizione e concentrazione dei micronutrienti

Vitamine	Concentrazione finale (M)
Tiamina	2,96 * 10 ⁻⁷
Biotina	2,05 * 10 ⁻⁹
B12	13,69 * 10 ⁻¹⁰

Tab. 4: composizione e concentrazione delle vitamine

Il mezzo di coltura viene diviso in aliquote differenti, in base alla necessità, nelle beute opportunamente sterilizzate. A questo punto viene fatto l'inoculo delle cellule algali in modo tale che la quantità iniziale di cellule nella coltura sia all'incirca di 300 cell/mL. Dopo una settimana di adattamento, si procede ad un nuovo inoculo in stessi tipi di terreni, quindi si parte con l'esperimento definitivo. Per ogni tipo di terreno, sono state allestite 4 beute in maniera tale da poter avere dati di campionamento numerosi e omogenei per definire la crescita di *O. ovata*

in diverse condizioni di nutrienti, per le misurazioni dei biovolumi, per il saggio di tossicità con *Artemia* sp., per le analisi dei nutrienti e per le analisi chimiche delle tossine.

Per quanto riguarda *C. monotis*, le colture dei vari ceppi sono state preparate utilizzando il terreno f/2 e 300 ml di colture precedenti per l'inoculo; durante questa fase non è stata registrata la concentrazione cellulare in quanto non sono stati svolti studi sulla crescita.

5.2. CONTEGGIO

La conta delle microalghe viene effettuata prelevando 1 ml di coltura algale, che viene posto in una camera di sedimentazione a cui si aggiunge una goccia di soluzione Lugol acida, per fissare le alghe. Il conteggio verrà effettuato dopo un tempo di attesa variabile, per consentire la sedimentazione delle cellule.

Per poter osservare, distinguere e contare il campione, viene utilizzato il microscopio rovesciato Zeiss Axiovert con ingrandimento 320x.

Nel metodo di conteggio "per strisciata" si contano le cellule algali sedimentate che si trovano comprese in un rettangolo che ha come dimensioni il lato del reticolo posto nell'oculare e il diametro della camera di sedimentazione. E' buona norma contare lungo diversi diametri per diminuire l'errore di conteggio.

Si procede calcolando la media delle alghe contate nei diversi diametri e si moltiplica per un fattore (F), del valore di 30,4, ottenendo così il numero di cellule algali presenti in un millilitro di coltura. Il fattore F è calcolato in base al rapporto tra l'area della camera di sedimentazione e l'area del rettangolo e varia a seconda del microscopio usato per il conteggio.

5.3. CURVA DI CRESCITA

I prelievi dei campioni dalle colture allestite vengono effettuati ogni 2-3 giorni, in modo tale da poter seguire la crescita dei ceppi in esame di *O. ovata*. I dati saranno elaborati con excel per ottenere la curva di crescita e il tasso di crescita.

Per avere un conteggio più rappresentativo, sono state usate colture differenti di uguale condizione e vengono prelevati più campioni dalla stessa beuta.

La curva di crescita delle microalghe è rappresentabile come una curva sigmoide, in cui è possibile riconoscere quattro fasi (Fig. 19):

- 1. fase lag:** corrisponde all'adattamento dell'alga al terreno di coltura subito dopo l'inoculo;
- 2. fase esponenziale:** nella quale si ha una rapida crescita cellulare con andamento logaritmico. E' rappresentata dal tratto di curva con pendenza maggiore;
- 3. fase stazionaria:** nella quale diminuisce il tasso di crescita della coltura, in conseguenza all'esaurimento dei nutrienti. Il numero di cellule rimane pressoché costante e la fase può durare diverse settimane;
- 4. fase di declino:** quando i nutrienti si esauriscono e la coltura muore.

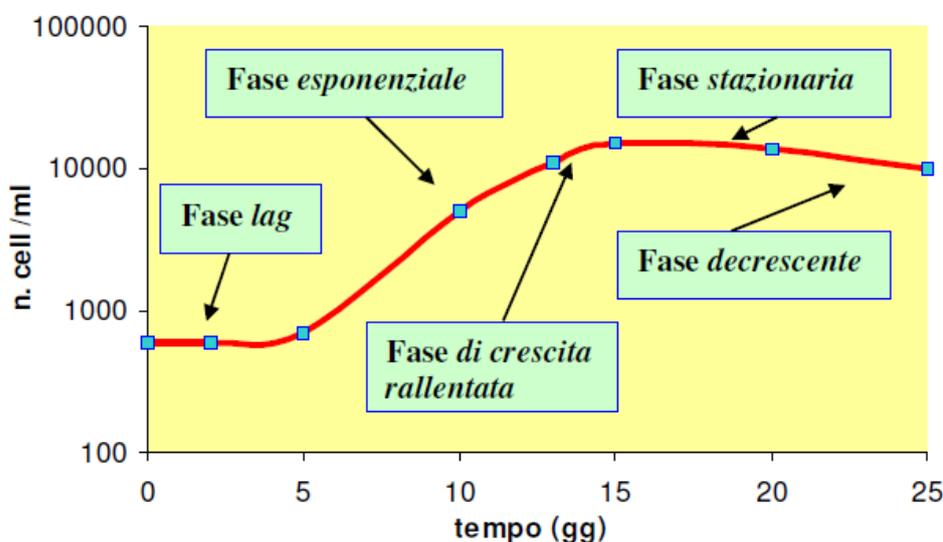


Fig. 19: curva di crescita generale

5.4. TASSO DI CRESCITA

Il tasso di crescita delle colture, indicato convenzionalmente con la lettera μ , è stato calcolato secondo la formula seguente:

$$\mu = (\ln N_1 - \ln N_0) / (t_1 - t_0),$$

dove:

N_1 = numero di alghe presenti nella coltura alla fine della fase esponenziale;

N_0 = numero di alghe presenti nella coltura all'inizio della fase esponenziale;

$t_1 - t_0$ = giorni che impiega la coltura per passare da N_0 ad N_1 .

5.5. BIOVOLUME

Il calcolo del volume cellulare è importante per comprendere le variabilità dimensionali nelle diverse fasi di crescita dell'organismo.

La cellula di *O. ovata* viene approssimata ad un ellissoide, come descritto da Sun et al.(2003) . Vengono considerate tre misure: il diametro dorsoventrale (a), la larghezza (b) e la profondità o spessore (diametro anteroposteriore) (c).

Queste misure sono state effettuate per mezzo di un programma di lettura di immagine, con fotocamera integrata al microscopio rovesciato. Per la preparazione del campione, il procedimento è lo stesso effettuato per il conteggio.

La formula per il calcolo del biovolume è:

$$V = (\pi / 6) * a * b * c.$$

6. ANALISI DEI NUTRIENTI

6.1. ANALISI DELL'AZOTO NITRICO

Il nitrato viene ridotto a nitrito in modo pressoché quantitativo (90-95%) facendo percolare l'acqua da analizzare attraverso una colonna di cadmio metallico ramato (fig. 20) a un pH iniziale di circa 5,5.

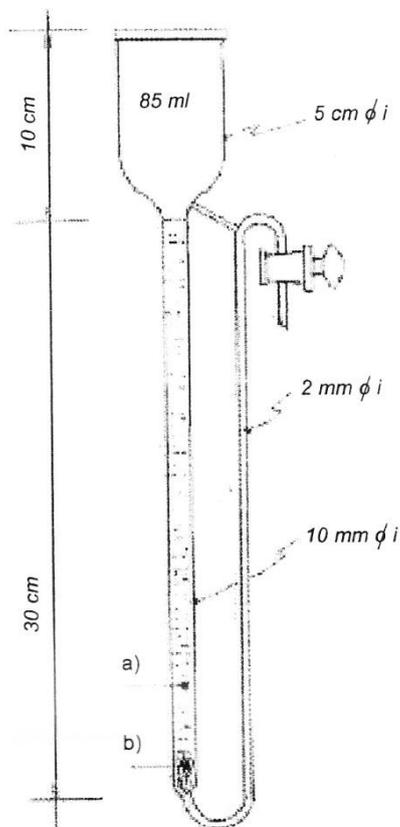


Fig. 20: colonna in vetro per la riduzione del nitrato. a = cadmio ramato; b = fili di rame o lana di vetro

Successivamente si misura per via spettrofotometrica (a 543 nm) l'assorbanza del prodotto colorato che si ottiene a pH 1,5-2 dalla diazotazione con solfanilammide (SA) dell'acido nitroso formatosi e della successiva reazione con naftiletildiammina (NEDA).

Il dosaggio fornisce la concentrazione del nitrato ridotto più quello del nitrito eventualmente già presente; per ottenere quindi la concentrazione del solo “azoto nitrico” occorre sottrarre la concentrazione “dell’azoto nitroso” ricavando quest’ultimo da un campione di acqua non sottoposto al processo di riduzione.

Per ogni condizione vengono prelevati 100 mL di campione e filtrati con filtro di cellulosa da 0,45 µm (Millipore) per eliminare le cellule. Il filtrato viene fatto passare per la colonna: i primi 45 mL vengono scartati poiché potrebbero essere contaminati da precedenti operazioni di lavaggio e utilizzo della colonna, i successivi 50 mL vengono raccolti.

A questi vanno aggiunti e miscelati 1 mL di soluzione di sulfanilammide (SA) all’1% m/V e, dopo 3 minuti, 1 mL di soluzione di naftiletildiammina (NEDA) allo 0,1% m/V. Dopo 15 minuti è possibile misurare l’assorbanza dei campioni con lunghezza d’onda (λ) 543 nm utilizzando celle con cammino ottico di 1 cm.

L’assorbanza di acqua sottoposta all’intero procedimento precedentemente descritto e usata per le soluzioni, costituisce lo standard la cui curva è già memorizzata nel programma di lettura.

Alla fine di questo processo è importante verificarne l’efficienza mediante dei calcoli. Dalla concentrazione C in mg/L della soluzione percolata e dall’assorbanza corretta del valore dello standard dei reagenti (A_c), per 1 cm di cammino ottico si ricava un fattore F dalla reazione

$$F = \text{—}$$

Il fattore F dovrebbe avere un valore attorno a 0,31 per un'efficienza del 100%; se si ottengono valori attorno a 0,37, l'efficienza sarà del 84% circa ma potrà comunque essere considerata adeguata.

6.2. ANALISI DEL FOSFORO

A 50 mL di acqua precedentemente filtrata, bisogna aggiungere 5 mL di reattivo misto , una soluzione composta da molibdato ammonico (15 g in 500 mL), acido solforico (5 N), acido ascorbico (27 g in 500 mL) e tartrato di potassio e antimonile (27 g in 250 mL). Questi componenti vanno miscelati tra loro rispettivamente in proporzione 20:50:20:10.

Dopo 10 minuti, osservando una colorazione blu, è possibile passare alla lettura tramite spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 885 nm.

7. TEST DI TOSSICITA' SU ARTEMIA SP.

Sono stati condotti esperimenti per valutare e confrontare la tossicità su organismi vivi di *O.avata* e *C.monotis* . Tali procedure sono state condotte su *Artemia* sp. utilizzando sia cellule vive che sonicate delle microalghe sopracitate.

7.1. BIOLOGIA DI ARTEMIA SP

Artemia sp. è un piccolo crostaceo marino anostraco di 2-3 cm, in cui è possibile riconoscere, dal punto di vista morfologico, tre parti: un capo con due antenne e tre occhi di cui uno mediano, un torace con due paia di arti forniti di appendici

lamellari e un addome, in cui nell'utero della femmina si accumulano uova sferoidali di colore bruno. Nella larva, il nauplius, sono riconoscibili soltanto due parti: il capo, con un unico occhio mediano, due paia di antenne e due paia di appendici che diverranno le mandibole e una parte senza appendici e non segmentata.

Le uova, o cisti, utilizzate nel presente metodo, sono prodotte dalle femmine per partenogenesi, che originano soltanto individui femmine.

Le cisti prodotte possono essere conservate a secco per periodi molto lunghi di tempo. Immergendole in acqua di mare in condizioni di illuminazione e di temperatura adatte, in 24 ore si sviluppano larve allo stadio I liberamente natanti. Nei successivi stadi II e III si assiste ad uno sviluppo degli arti motori e dell'addome. Le larve a questo stadio possono essere utilizzate per il test di tossicità.

7.2. SVOLGIMENTO DEL TEST

Per il test vengono utilizzate micropiastre a 24 pozzetti. Nei pozzetti della prima colonna viene aggiunto 1ml di soluzione controllo e in quelli successivi 1ml di campione con il relativo numero di cellule.

Il saggio è stato utilizzato per testare l'effetto delle cellule algali e del medium in seguito alla sonicazione delle stesse concentrazioni di cellule.

Inizialmente sono stati condotti esperimenti per confrontare direttamente la tossicità di *O.ovata* e *C. monotis*; successivamente sono stati effettuati test per valutare la tossicità tra sette diversi ceppi di *Coolia* presenti nei mari italiani.

8. ANALISI CHIMICHE DELLA TOSSICITA'

Per questi esperimenti sono state allestite dodici colture, quattro per ogni condizione di nutrienti. Di quest'ultime, due per condizione sono state raccolte in momenti diversi: in fase esponenziale e in fase stazionaria.

Inizialmente le colture sono state raccolte per mezzo di filtrazione a gravità (per non danneggiare le cellule) su filtri che ha permesso di separare le cellule algali dal medium; i pellet algali e il medium sono stati congelati a -20°C e in seguito mandati presso il Dipartimento di Chimica delle sostanze naturali dell'Università Federico II di Napoli. Qui, tramite cromatografia liquida assieme alla spettrometri di massa (LC-MS), è stato possibile effettuare un'analisi qualitativa e quantitativa delle tossine contenute sia nelle cellule raccolte nei pellet che in quelle contenute nel medium di coltura.

RISULTATI E DISCUSSIONE

9. TEST DI TOSSICITA' CON ARTEMIE

9.1. VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA' DI VARI CEPPI DI *COOLIA MONOTIS* TRAMITE TEST CON ARTEMIE

Il test di tossicità con *Artemia* è stato eseguito con sette ceppi di *C. monotis* isolati da diverse zone costiere italiane da campioni prelevati nel corso di fioriture di *O. ovata*. e nominati in base all'area geografica di provenienza e al periodo di prelievo (tab 5).

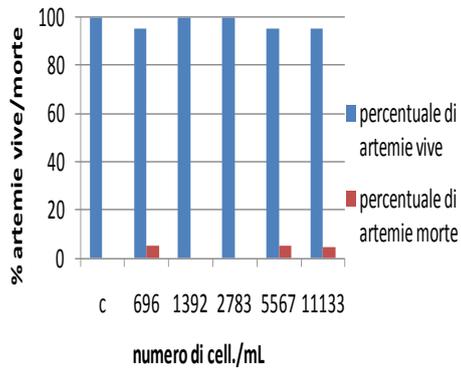
Cepi <i>Coolia</i>	Provenienza	Mese	Anno
<i>Coolia</i> Cesenatico '99	Cesenatico		1999
<i>Coolia</i> Cesenatico 2002	Cesenatico		2002
<i>Coolia</i> Latina 06-01	San Felice Circeo- Latina	Gennaio	2006
<i>Coolia</i> Latina 06-02	San Felice Circeo- Latina	Febbraio	2006
<i>Coolia</i> Ancona 07-01	Numana- Ancona	Gennaio	2007
<i>Coolia</i> Bari 08-01	Mola- Bari	Gennaio	2008
<i>Coolia</i> Bari 08-02	Mola-Bari	Febbraio	2008

Tab. 5: ceppi di *Coolia* analizzati

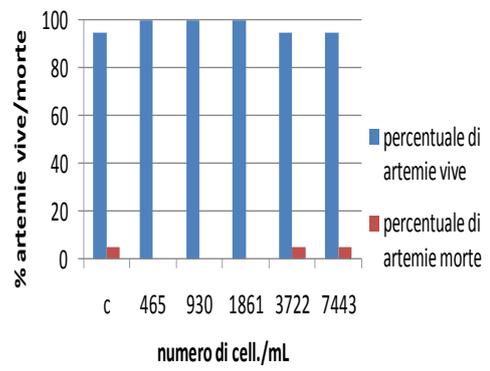
Il test è stato effettuato sia con cellule vive che con cellule sottoposte a sonicazione per favorire il rilascio di eventuali tossine.

I risultati sono riportati nei grafici seguenti (fig. 21).

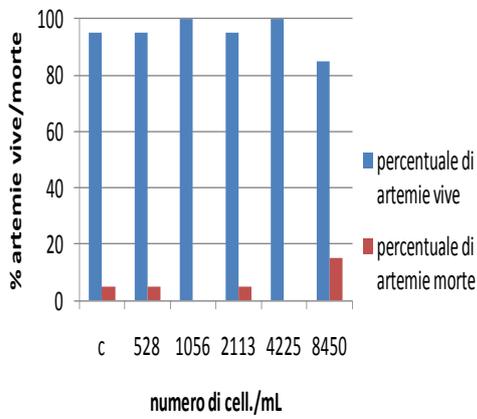
Test con cellule di *Coolia* "Cesenatico 99" vive



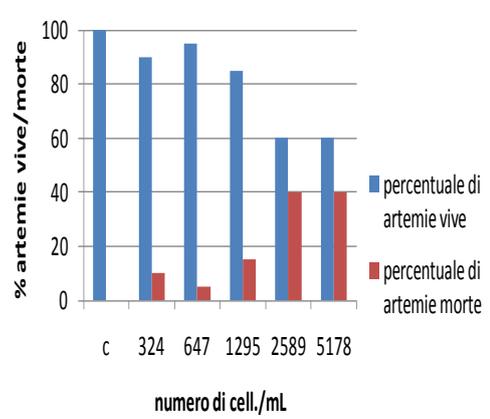
Test con cellule di *Coolia* "Cesenatico 99" sonicate



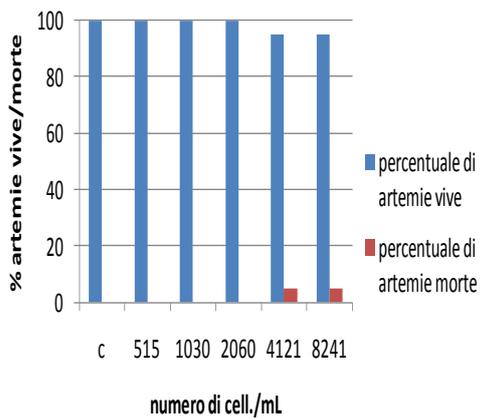
Test con cellule di *Coolia* "Cesenatico 2002" vive



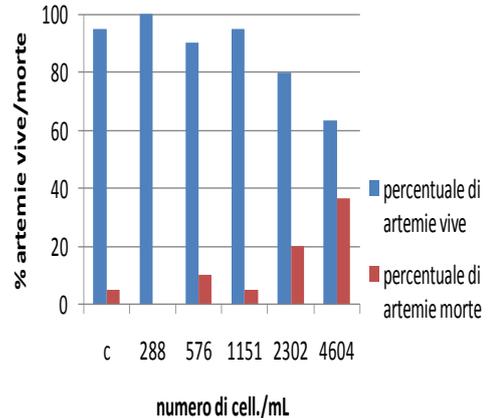
Test con cellule di *Coolia* "Cesenatico 2002" sonicate



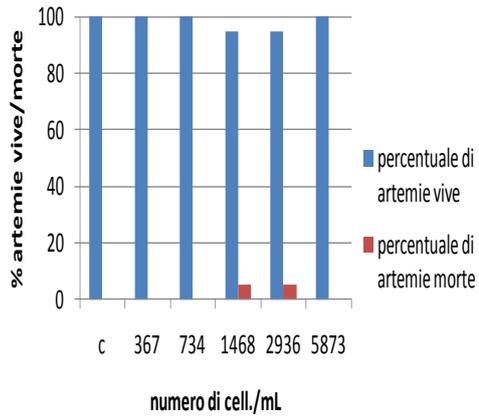
Test con cellule di *Coolia* "Latina 06-01" vive



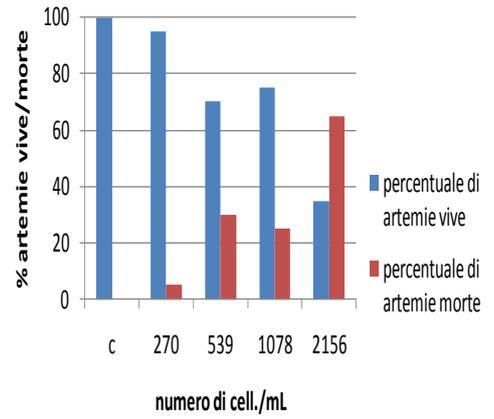
Test con cellule di *Coolia* "Latina 06-01" sonicate



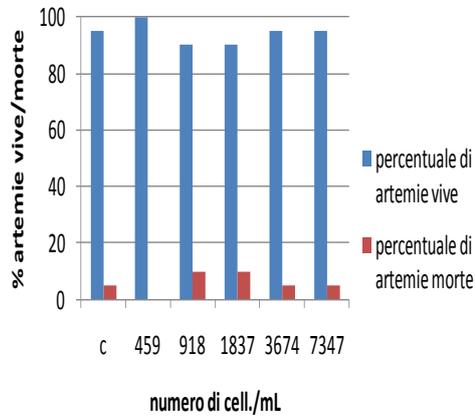
Test con cellule di *Coolia* "Latina 06-02" vive



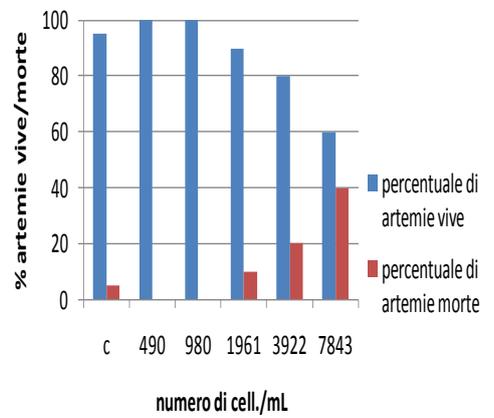
Test con cellule di *Coolia* "Latina 06-02" sonicate



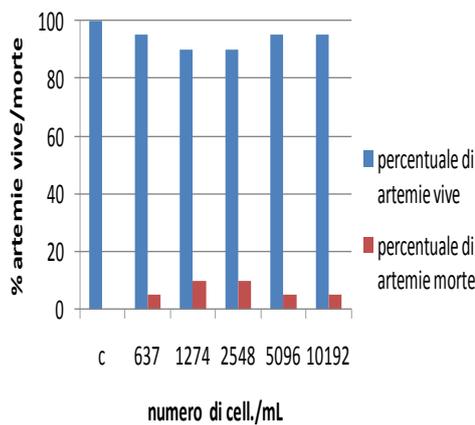
Test con cellule di *Coolia* "Ancona 07-01" vive



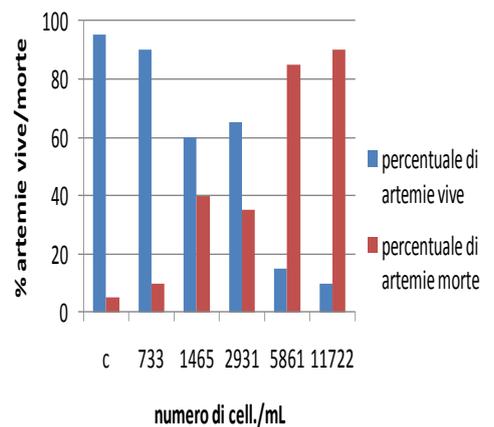
Test con cellule di *Coolia* "Ancona 07-01" sonicate



Test con cellule di *Coolia* "Bari 08-01"



Test con cellule di *Coolia* "Bari 08-01" sonicate



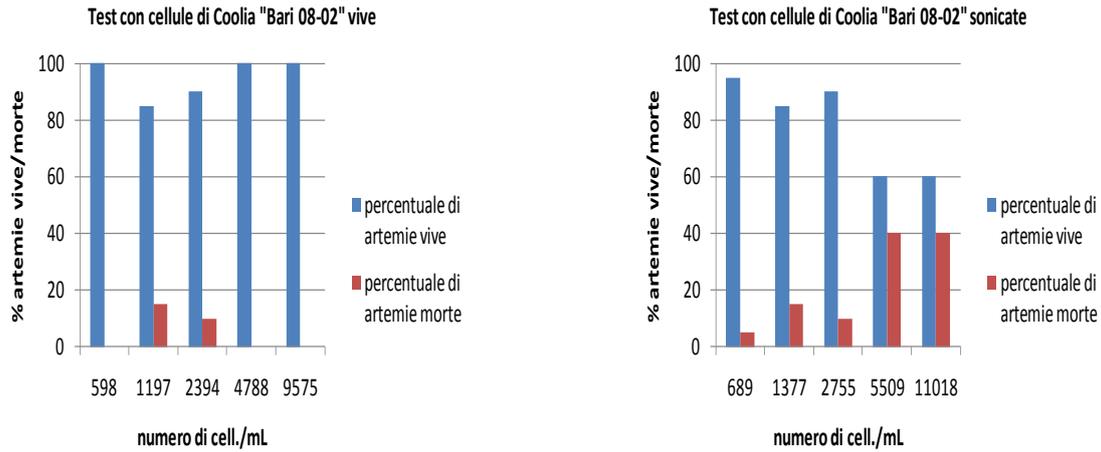


Fig. 21: risultati dei test di tossicità su artemie effettuati con vari ceppi di *C. monotis*

Tutti i test effettuati con cellule vive dei diversi ceppi mostrano uno scarso effetto di mortalità nei confronti delle artemie (inferiore al 20%) anche con concentrazioni molto alte di cellule.

Si nota invece una differenza tra i test effettuati con cellule vive e quelli con cellule lisate: le artemie morte aumentano in presenza di cellule sonicate e in alcuni casi (*C. monotis* "Bari 08-01", "Latina 06-01") si hanno valori di mortalità del 60-80%. Molto probabilmente, questo è dovuto al fatto che le cellule sonicate liberano maggiori quantità di tossine

9.2. CONFRONTO E INTERAZIONE TRA LA TOSSICITA' DI *O. OVATA* E QUELLA DI *C. MONOTIS*

Il test successivo è stato fatto per confrontare gli effetti tossici delle due specie *O. ovata* e *C. monotis*. Il test è stato effettuato sia con le singole specie che in combinazione di queste mantenendo per ciascuna specie le stesse quantità usate nei due test con singole specie.

Di seguito sono riportati i grafici dei risultati (fig. 22).

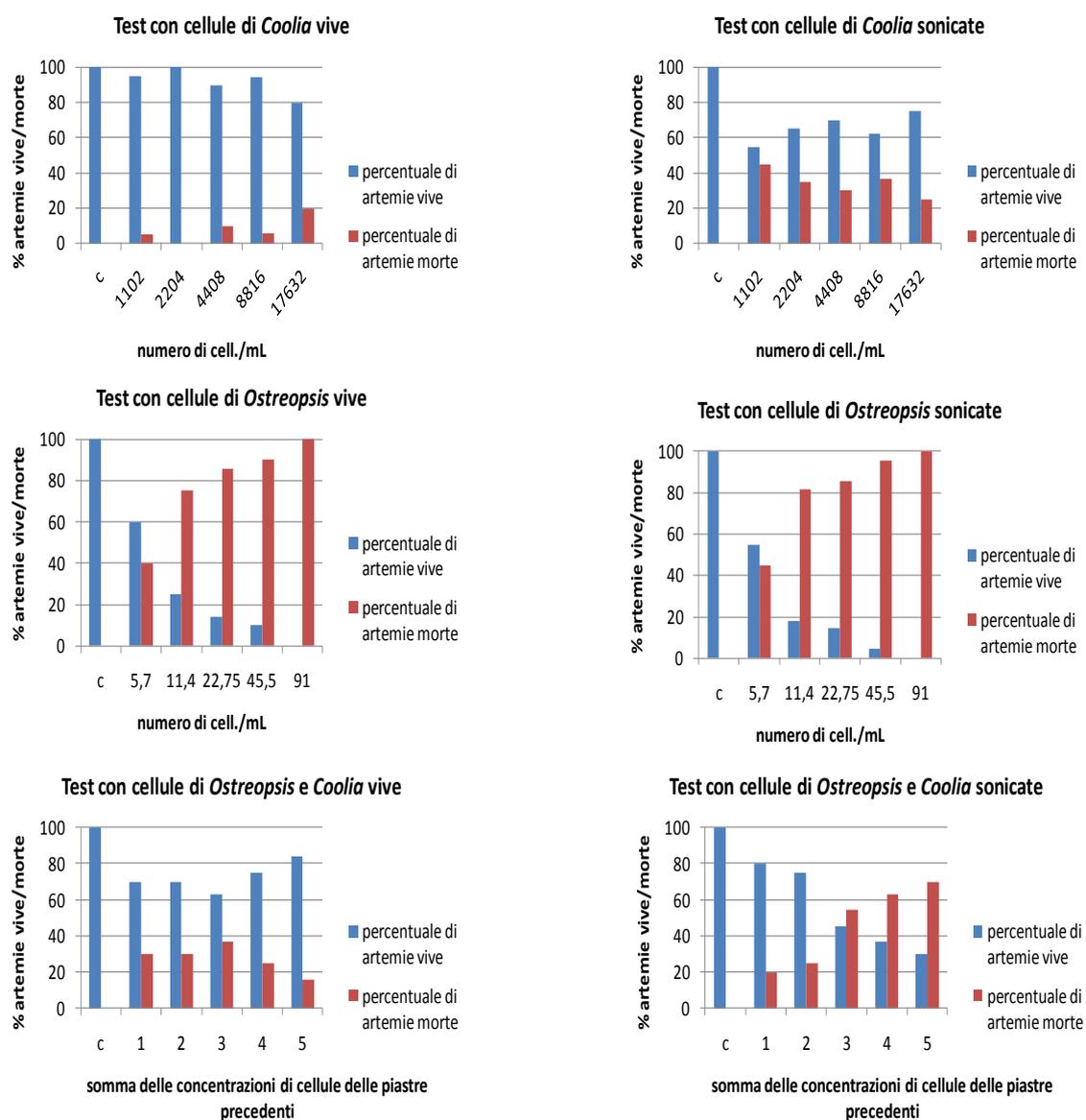


Fig. 22: risultati e confronto del test tra *O.ovata* e *C.monotis*

C. monotis risulta essere poco tossica nonostante le percentuali di artemie morte si aggirino tra il 25-45%: bisogna considerare infatti l'elevata concentrazione di cellule rispetto al test con *O. ovata*. Usando le stesse concentrazioni di cellule sonicate il risultato cambia: si abbassa notevolmente la percentuale di artemie morte che non supera il 20% nella concentrazione più alta.

O. ovata si dimostra molto più tossica rispetto a *C. monotis*: nel test effettuato con cellule vive, la percentuale di artemie morte è già elevata in presenza della densità cellulare minima (40% con 5,7 cell/mL) per poi incrementare con l'aumento della concentrazione di cellule; alla concentrazione più alta (91 cell/mL) si ha il 100% di organismi morti. Con l'utilizzo di cellule sonicate l'esito non è particolarmente diverso.

Il test successivo è stato effettuato per valutare se, esponendo i crostacei contemporaneamente a cellule di *C. monotis* e di *O. ovata*, poteva aumentare il rischio di tossicità. I risultati del test effettuato esponendo *Artemia* a cellule vive, hanno mostrato che la percentuale massima di morte è del 36,8% e che, aumentando le densità cellulari, la mortalità cala fino al 15,8%. Questo dato potrebbe essere dovuto al fatto che le artemie nutrendosi di microalghe, potrebbero aver trovato più appetibili le cellule del genere *Coolia* rispetto a quelle di *Ostreopsis*, più tossiche; in quest'ottica bisogna anche tener conto del fatto che il numero delle cellule di *C. monotis* è nettamente superiore a quello di *O. ovata*.

Nel test effettuato con cellule sonicate il risultato cambia: la mortalità aumenta all'aumentare della concentrazione dei due estratti. Questo può essere spiegato con il fatto che le tossine di *O. ovata*, più potenti, vengono liberate nel medium, e provocano maggiori effetti sulle artemie.

10. CRESCITA DI *O. OVATA* IN DIVERSE CONDIZIONI NUTRIZIONALI

Gli esperimenti successivi sono stati svolti per valutare l'influenza di diverse condizioni nutrizionali sulla crescita e sulla tossicità di *O. ovata*.

10.1. ESPERIMENTO PRELIMINARE CON LIMITAZIONE DA AZOTO E FOSFORO

Inizialmente è stato effettuato un esperimento preliminare esponendo *O. ovata* a diverse condizioni di carenza di azoto e fosforo, ottenute aggiungendo 1/3 e 1/5 delle concentrazioni di ciascun nutriente rispetto a quelle usate nella condizione di controllo (fig.23).

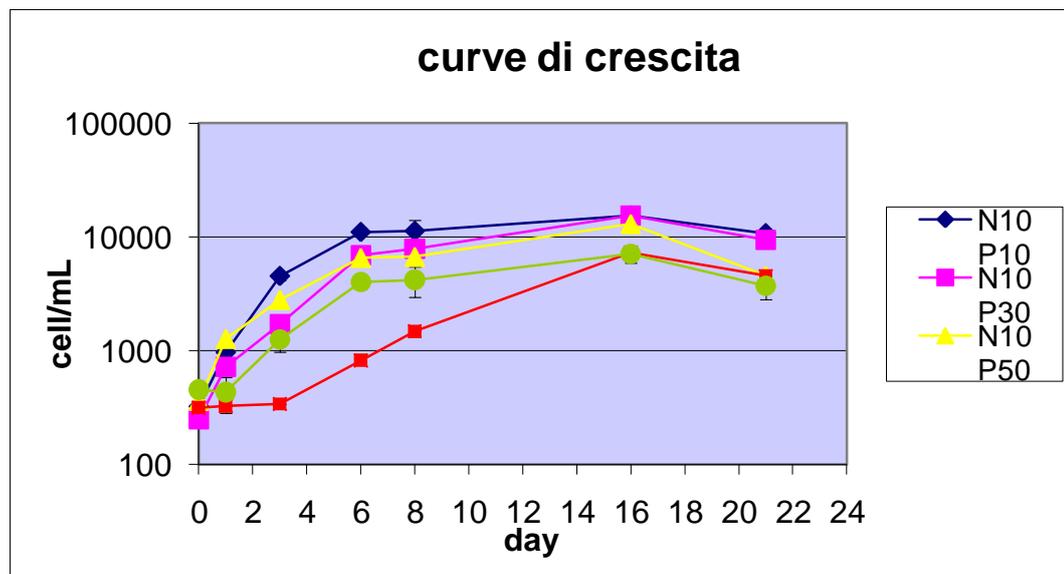


Fig. 23: curva di crescita di colture di *O. ovata* a diverse condizioni.

Come si può vedere nella figura 23 tutte le colture in carenza di nutrienti crescono meno rispetto al controllo tuttavia l'aumento della carenza di P, da 1/3 (N/10, P/30) a 1/5 (N10 P50), non determina un maggiore calo nel numero di cellule; nel caso della carenza di azoto, il terreno con la minore concentrazione di

nutriente (N/50, P/10) determina un numero maggiore di cellule rispetto al terreno N30 P10 per quasi tutta la crescita.

10.2. EFFETTO DELLA LIMITAZIONE DI AZOTO E FOSFORO SULLA CRESCITA DI *O. OVATA*

In seguito è stato effettuato un esperimento esponendo la microalga alle carenze di nutrienti più elevate, tra quelle utilizzate precedentemente, ovvero 1/5 di N (N/50 P/10) e 1/5 di P (P/50 N10). L'esperimento era volto a valutare l'effetto della limitazione da nutrienti sul biovolume cellulare, sulla velocità di consumo dei nutrienti stessi e sulla quantità di tossine prodotte.

In seguito all'inoculo iniziale (giorno 0), dove la concentrazione delle cellule si aggirava attorno alle 300 unità per mL, sono stati fatti campionamenti e conteggi periodici. La stima della crescita è stata complicata dalla presenza di aggregati mucillaginosi, tipici delle colture di *O. ovata*, che non permettono di effettuare campionamenti omogenei e che rendono difficile il conteggio. Questo problema è stato in parte risolto applicando una lieve acidificazione che ha determinato il dissolvimento degli aggregati. Come già detto nella sezione Materiali e Metodi, ai fini dell'esperimento è stato necessario preparare quattro colture per condizione, ragione per cui i dati utilizzati per costruire le curve di crescita (fig. 24) risultano dalla media dei conteggi ottenuti dalle varie colture.

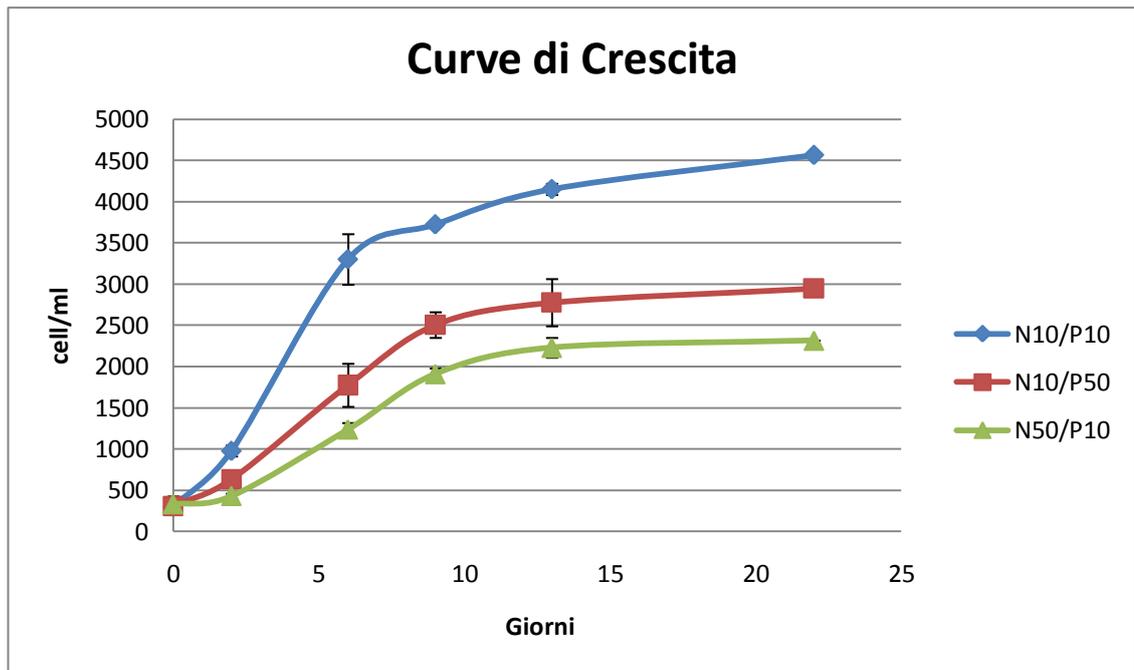


Fig. 24: curve di crescita alle condizioni N/10,P/10- N/10,P/50- N/50,P/10

Dal grafico risultano facilmente identificabili alcune fasi della crescita: la fase esponenziale (fino al giorno 9), la fase di crescita rallentata (fino al giorno 13) e la fase stazionaria (fino al giorno 22) .

Altrettanto chiara, è la differenza tra la crescita delle colture a diverse condizioni: le colture a condizione N/10, P/10 (controllo) presentano una crescita “standard” dove la popolazione cellulare cresce velocemente e raggiunge alte densità. Nei terreni con carenza di nutrienti la crescita è più lenta e si mantiene su livelli decisamente più bassi rispetto a quella del controllo. La microalga *O. ovata* risente soprattutto della carenza di azoto che determina il raggiungimento di un numero di cellule più basso rispetto alle altre due condizioni.

11. EFFETTO DELLA CARENZA DI NUTRIENTI SUL VOLUME CELLULARE

Per poter valutare meglio le risposte di *O. ovata* alla carenza di nutrienti, durante la crescita è stato misurato anche il volume cellulare, in particolare per il fatto che la coltura presentava cellule di dimensioni diverse. Pertanto le misure sono state fatte contando e valutando separatamente le cellule grandi e piccole.

Nelle tabelle (6, 7, 8) sono riportati i valori ottenuti separatamente e anche il valore medio delle diverse colture.

N/10,P/10					
Cellule grandi		Cellule piccole			
tempo	Biovolume μm^3	N° cell/mL	Biovolume μm^3	N° cell/mL	Biovolume medio
0	28100	239,5	4753,5	69	22878
2	18831	670,5	6142	227,5	15616
6	27167	2059,5	5153	1145,5	19299
9	21994	2222	5292	1308	15805
13	27949	2429	6228	1580	19388
22	32319	2896,5	8829	1515,5	24250

Tab. 6: Biovolume e corrispondente numero di cellule valutato nella condizione N/10, P/10 in diversi giorni di crescita.

N/10,P/50					
Cellule grandi		Cellule piccole			
tempo	Biovolume μm^3	N° cell/mL	Biovolume μm^3	N° cell/mL	Biovolume medio
0	26862	134	8892	202,5	16048
2	19780	491,5	5428	207	15527
6	22531	1275,5	6202	373,5	18832
9	20253	1712		1108,5	12293
13	21348	1799	8295	958,5	16811
22	25971	1986	9993	942	20831

Tab. 7: Biovolume e corrispondente numero di cellule valutato nella condizione N/10, P/50 in diversi giorni di crescita.

N/50,P/10					
Cellule grandi			Cellule piccole		
tempo	Biovolume μm^3	N° cell/mL	Biovolume μm^3	N° cell/mL	Biovolume medio
0	22657	133,5	4623,9	168,5	12595
2	19850	280	4306	238,5	12700
6		747		625,5	0
9	19770	1023,5	6722,9	885,5	13718
13	18226	1267	5584	979	12716
22	27549	1170	6666	1145,5	17218

Tab. 8: Biovolume e corrispondente numero di cellule valutato nella condizione N/50,P/10 in diversi giorni di crescita.

Poiché l'analisi del biovolume ha evidenziato differenze dovute alle diverse condizioni nutrizionali, sono state disegnate delle curve di crescita in cui si evidenzia separatamente l'andamento dei due tipi di cellule (fig. 25, 26, 27)

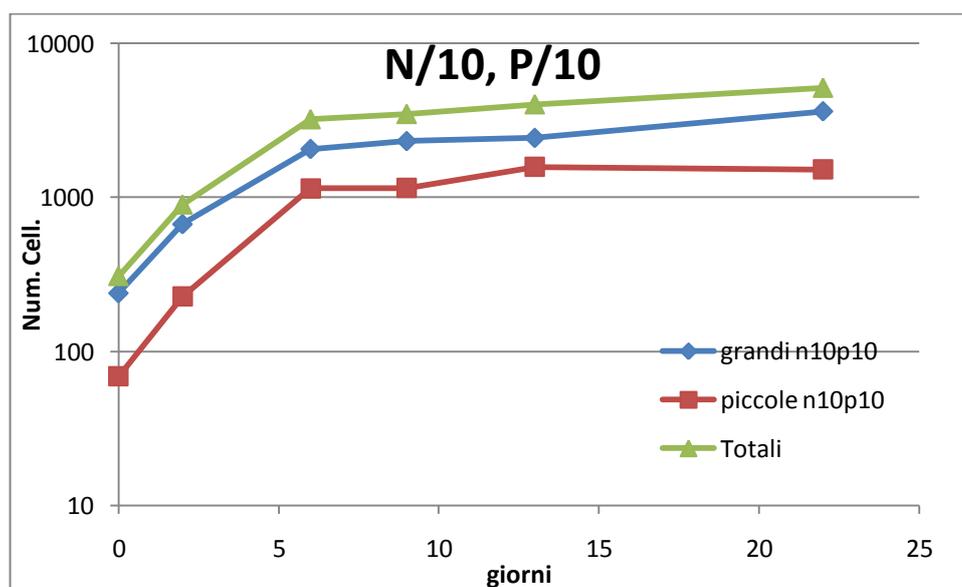


Fig. 25: curva di crescita della coltura N/10, P/10 effettuata separatamente per le cellule grandi e piccole

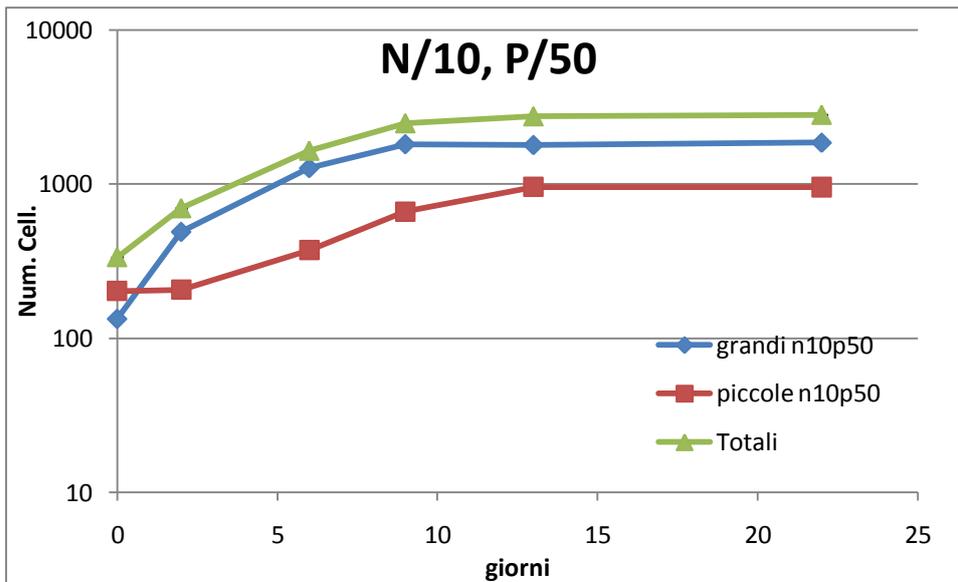


Fig. 26: curva di crescita della coltura N/10, P/50 effettuata separatamente per le cellule grandi e piccole

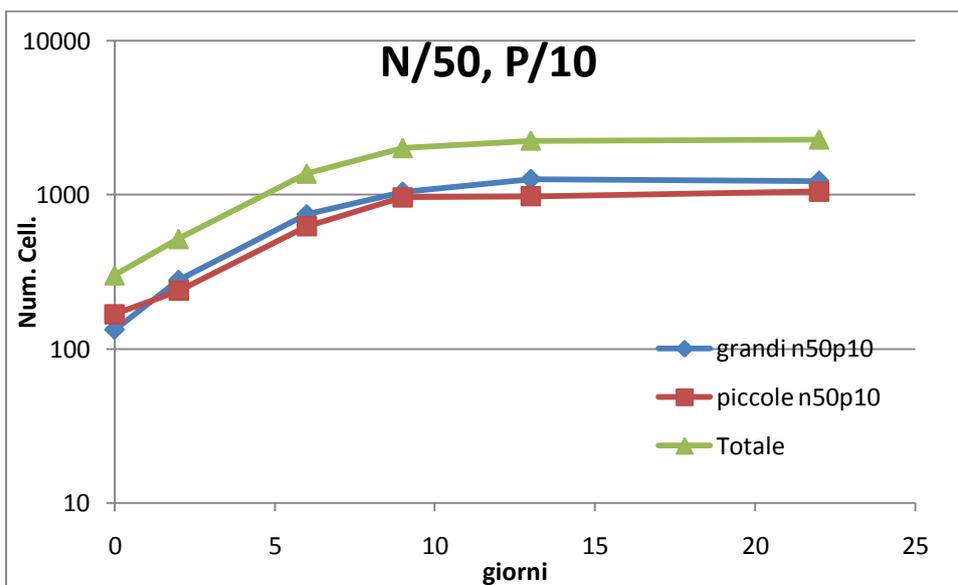


Fig. 27: curva di crescita della coltura N/50, P/10 effettuata separatamente per le cellule grandi e piccole

Il dato più interessante lo si può sicuramente vedere nella condizione a carenza di azoto: infatti, mentre nelle altre condizioni la differenza di crescita tra cellule grandi e cellule piccole è ben marcata, nella coltura N/50, P/10 la crescita dei due tipi di cellule è molto simile sia nell'andamento che nei numeri (a tal punto che

nel giorno sei non si è riuscito a fare una distinzione tra le cellule causa le loro dimensioni simili).

Nel grafico sottostante, sono riportati i confronti tra le diverse condizioni, in fase esponenziale e stazionaria (fig. 28)

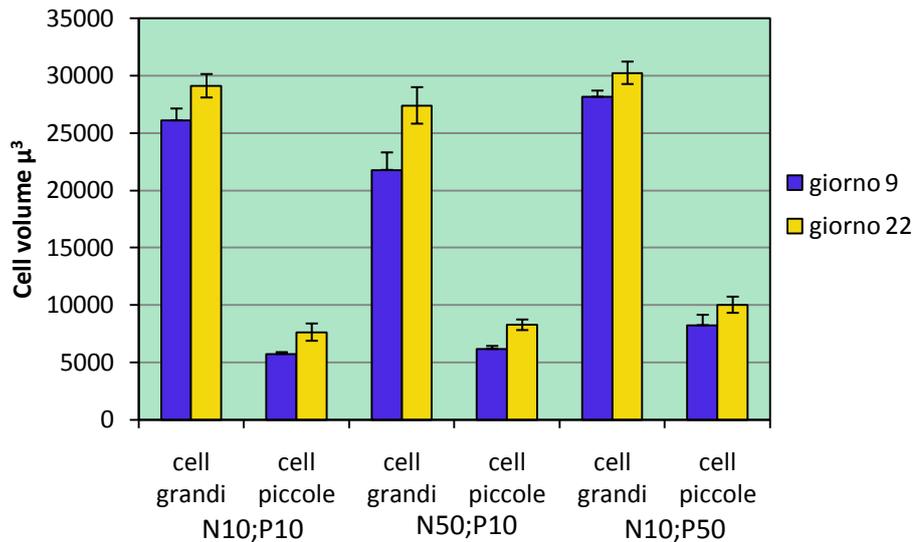


Fig. 28: confronto tra il biovolume delle cellule piccole e grandi misurato in due momenti di crescita

Si vede come le cellule che raggiungono i biovolumi più grandi siano quelle della condizione in carenza di P: questo può essere spiegato dal fatto che tale carenza può influire negativamente sulla scissione cellulare di *O. ovata* facendo aumentare così il numero delle cellule grandi.

La coltura che presenta invece i biovolumi più piccoli è quella sottoposta alla carenza di azoto: le cellule, sia in fase esponenziale che stazionaria, presentano dei biovolumi minori rispetto a quelli delle altre condizioni a dimostrazione di come l'azoto sia importante per la crescita delle cellule. Durante le misurazioni, è stato anche possibile notare molte cellule che assumevano una forma a "rosa" dovuta alla condizione di carenza.

12. ANALISI DEI NUTRIENTI

12.1 ANALISI DEI NITRATI

Nel grafico seguente (fig. 29) sono riportati i risultati dell'analisi dei nitrati eseguite, nel corso della crescita, nel terreno delle colture di *O. ovata* esposte alle tre diverse condizioni nutrizionali.

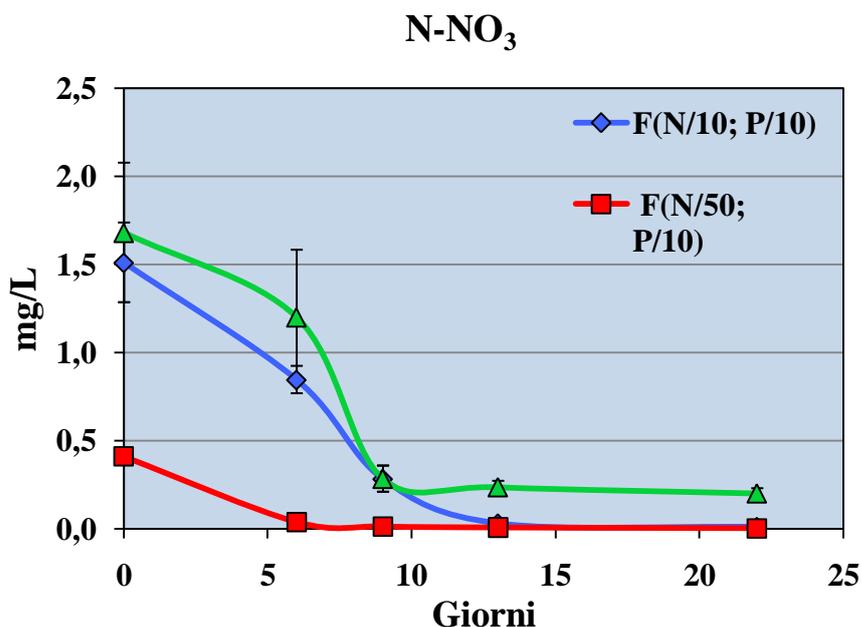


Fig. 29: consumo di N-NO₃

Dal grafico si può notare come l'andamento del consumo di N sia pressoché simile per le colture cresciute nel terreno N/10,P/10 e in quello N/10,P/50 (carenza di fosforo). Fino al giorno 9 infatti l'andamento delle due curve è quasi parallelo; nei giorni successivi invece la coltura di controllo consuma tutto il nutriente mentre nella coltura con carenza di P l'azoto non viene esaurito e il consumo si stabilizza.

Questo è riconducibile al fatto che la coltura nella condizione di controllo continua a crescere per più tempo rispetto a quella N/10,P/50 la cui crescita si

ferma e, quindi, il consumo di azoto tende a diminuire a causa della carenza di fosforo.

Nella condizione N/50, P/10 infine, si ha un consumo di azoto abbastanza netto solamente nei primi giorni: essendo questa una condizione già povera di N, le quantità di quest'ultimo vengono esaurite velocemente e dopo il sesto giorno il nutriente non è più presente nel terreno; questo si riflette sulla crescita della coltura che si ferma subito dopo.

12.2. ANALISI DEI FOSFATI

Anche per l'analisi dei fosfati le misure colorimetriche effettuate sul terreno delle colture di *O. ovata* sono riportate nel grafico seguente (fig. 30).

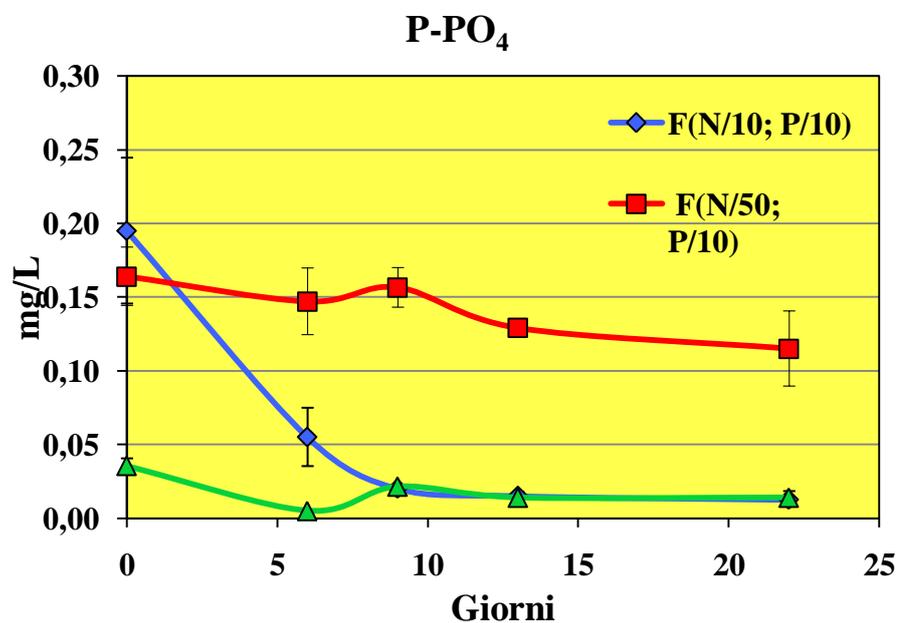


Fig. 30: consumo di P-PO₄

La condizione di controllo N/10, P/10 presenta una curva decrescente a dimostrazione di un consumo proporzionato alla crescita della popolazione di *O. ovata*.

Nella condizione in carenza di N si riscontra un consumo modesto di P anche se questo nutriente è presente in quantità sufficienti; questo può essere spiegato con la crescita modesta della popolazione e alla conseguente scarsità dei consumi.

Per quanto riguarda la coltura N/10, P/50 le scarse quantità di nutriente presente vengono consumate velocemente ma anche in questo caso non si arriva alla deplezione totale.

Visti nell'insieme questi risultati indicano che in condizioni normali, per *O. ovata* si ha un consumo elevato di entrambi i nutrienti nei primi 9 giorni di crescita, periodo che corrisponde all'incirca alla fase esponenziale.

Sia nel controllo che nelle colture in carenza si può evidenziare che la limitazione di N è la condizione che limita maggiormente la crescita, tanto che il fosforo non viene consumato anche se continua ad essere presente.

13. ANALISI DELLE TOSSINE

Le analisi chimiche per la determinazione quali-quantitativa delle tossine sono state effettuate nelle colture cresciute nelle tre condizioni nutrizionali, raccogliendo le cellule sia in fase esponenziale (giorno 9) che in fase stazionaria (giorno 22). I risultati sono riferiti sia al numero di cellule di *O. ovata*, che al biovolume e a litro di coltura.

13.1. CONTENUTO DI TOSSINE PER CELLULA

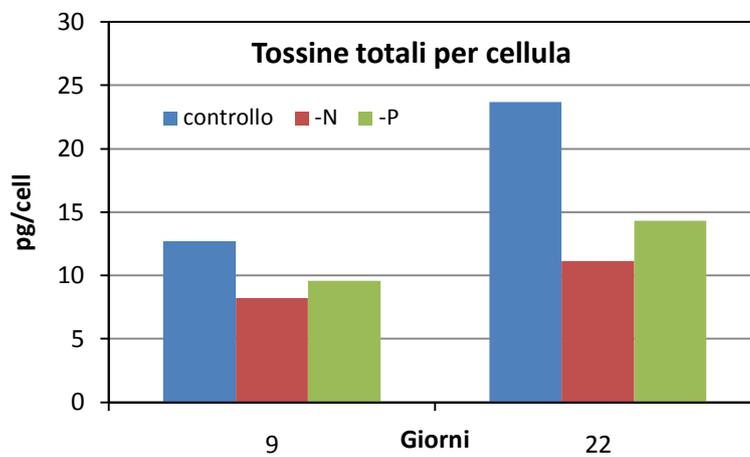


Fig. 31: totale tossine per cellula

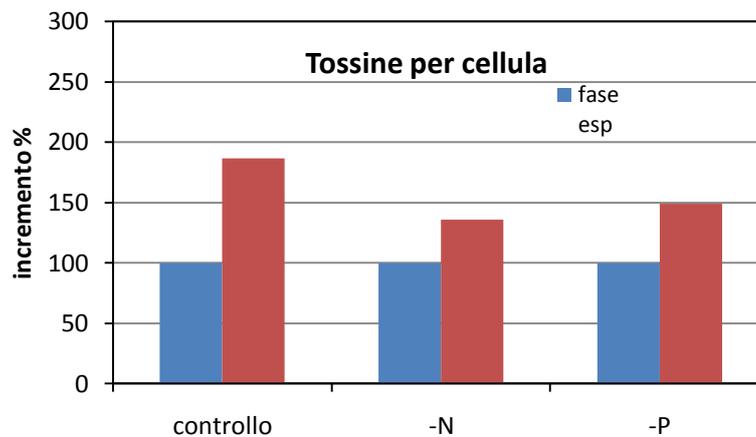


Fig.32: incremento percentuale delle tossine per cellula

13.2.ANALISI DEL CONTENUTO DI TOSSINE PER BIOVOLUME

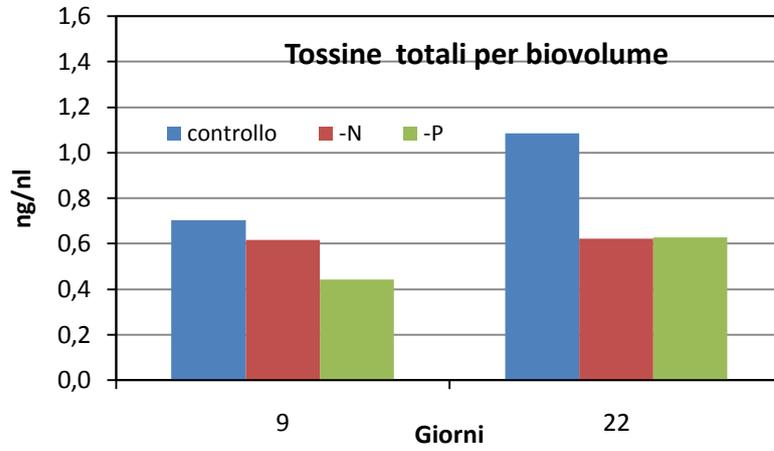


Fig. 33: totale tossine per biovolume

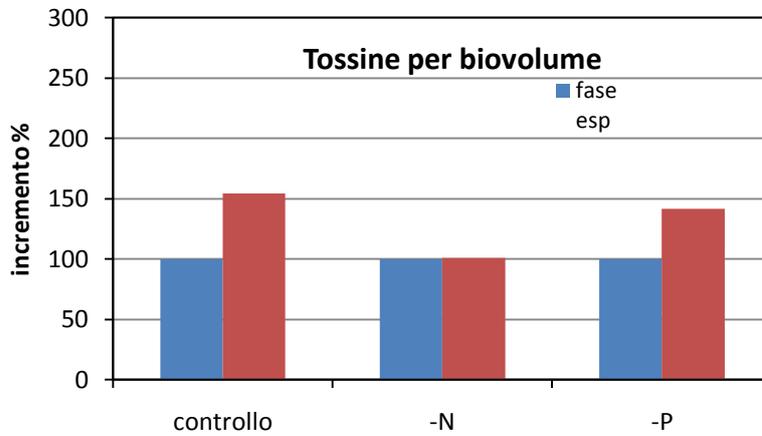


Fig. 34: incremento percentuale delle tossine per biovolume

13.3. ANALISI DEL CONTENUTO DI TOSSINE PER LITRO DI COLTURA

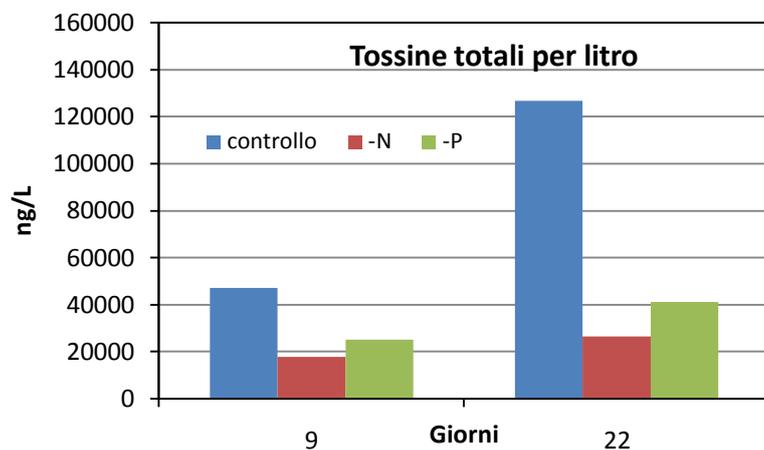


Fig. 35: totale tossine per litro di coltura

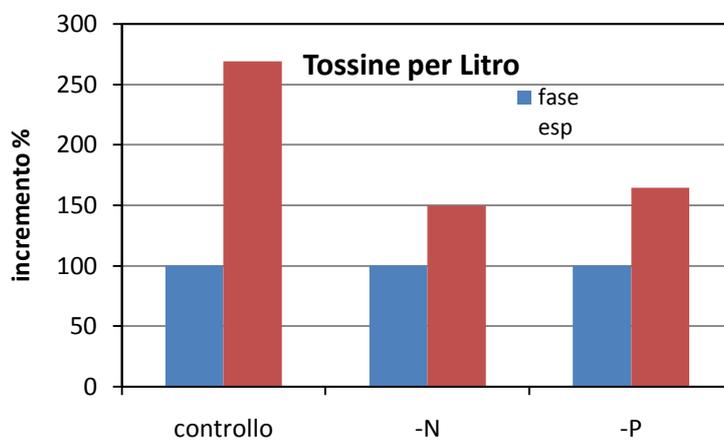


Fig. 36: incremento percentuale delle tossine per litro di coltura

Sebbene i grafici evidenzino la produzione di tossine in relazione a diversi parametri (fig. 31, 33, 35), dimostrano 2 effetti comuni per tutte le condizioni: l'aumento nella produzione di tossine nella fase stazionaria (fig. 32, 34, 36, 37, 38) e come nelle condizioni a carenza di azoto la produzione di tossine sia minore rispetto alle altre condizioni.

Poiché le due carenze di nutrienti applicate determinano un effetto diverso sulla dimensione delle cellule, il dato più significativo è quello espresso sulla base del biovolume. In questo caso si osserva che, mentre nella fase esponenziale, la quantità di tossine prodotte è simile per le tre condizioni, durante la fase esponenziale la coltura in carenza di N è quella che ne produce meno seguita dalla coltura in carenza di P e quindi dal controllo.

Possiamo ipotizzare che nella coltura a carenza di azoto N/50, P/10 la produzione di tossine è inferiore in quanto le tossine di *O. ovata* sono prodotti a base azotata e, in condizioni di carenza del nutriente, la cellula probabilmente utilizza le scarse quantità che ha a disposizione per processi metabolici più importanti.

Questo aspetto è già stato evidenziato per altre tossine contenenti azoto (ad es. saxitossine); la differenza principale che si osserva rispetto ai dati in letteratura (*Granéli E., Flynn K., 2006*) è che in *O. ovata* non si ha un aumento di produzione di tossine in carenza di P.

13.4. COMPOSIZIONE DELLE TOSSINE

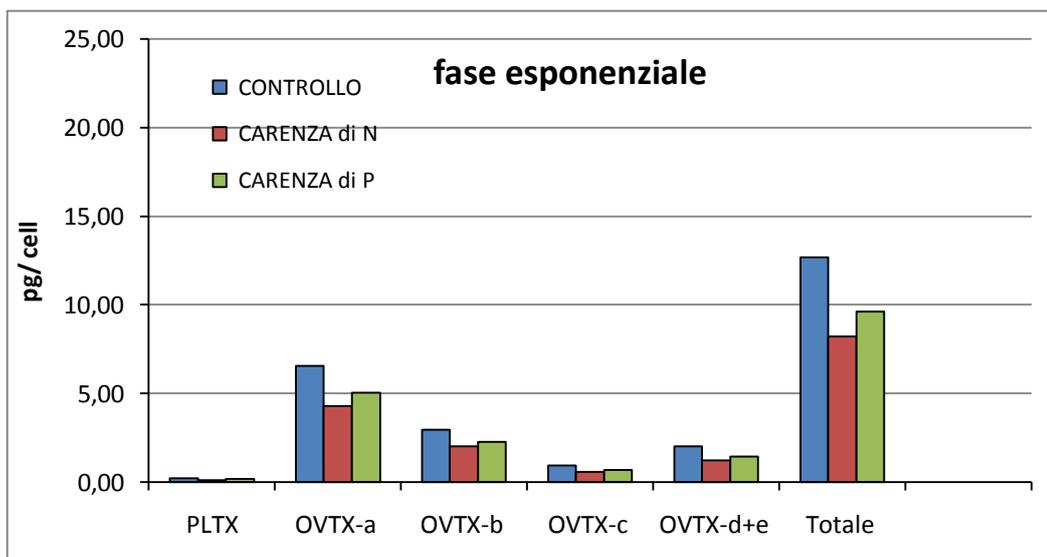


Fig.37: composizione delle tossine per cellula in fase esponenziale

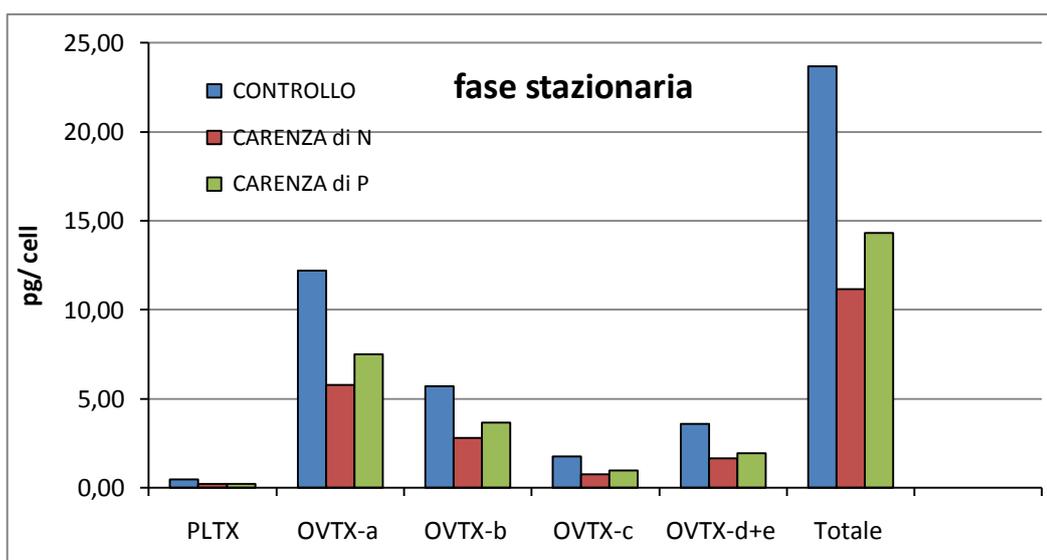


Fig. 38: composizione delle tossine per cellula in fase stazionaria

Si nota inoltre come nella composizione delle tossine prodotte da *Ostreopsis* (fig. 37, fig. 38) più del 50% della produzione totale sia composto da ovatossina-a mentre la palitossina rappresenta una quantità minima. L'andamento di ciascuna tossina in risposta alle variazioni dei nutrienti è analogo.

CONCLUSIONI

Visti i nuovi recenti episodi di intossicazione dovuti a dinoflagellate bentoniche è importante avere informazioni sui livelli di tossicità a cui possono essere esposti gli organismi animali o l'uomo.

Per i ceppi di *O. ovata* del Mediterraneo era già stata accertata la presenza di tossine del tipo delle palitossine, mentre per la specie *Coolia monotis*, solitamente co-presente nei bloom di *O. ovata*, non si può ancora affermare che la presenza di tossine sia un aspetto generalizzabile a tutti i ceppi.

Vista la scarsità di studi e dati relativi alle tossine di *Coolia monotis* e a causa della difficoltà di effettuare analisi volte all'identificazione di tossine di cui non sia nota la specie chimica, in via preliminare, si è preferito utilizzare un test semplice come quello sulle artemie per poter evidenziare la presenza di tossicità nei ceppi mediterranei di *C. monotis*. Il test è stato eseguito utilizzando ceppi isolati da campioni prelevati in diverse località costiere italiane e in diversi anni per potere evidenziare una eventuale variabilità.

I risultati hanno dimostrato che queste microalghe non sono particolarmente tossiche per i crostacei se ingerite; la tossicità però, aumenta quando le cellule si rompono evidenziando comunque la presenza di qualche composto tossico. Incrociando i risultati dei test effettuati con cellule vive e con cellule sonicate, è emerso che il ceppo più tossico è quello isolato a Bari nel 2008. L'identificazione di un ceppo più tossico di altri permetterà di poterlo coltivare in maggiori quantità andando così a facilitare i successivi studi chimici sulla tossicità di questa specie.

Molto più tossiche si sono dimostrate essere le microalghe del genere *Ostreopsis* i cui effetti sono risultati essere di molto superiori a quelli ottenuti con *C. monotis* (sia con cellule vive che con cellule sonicate) anche a concentrazioni molto minori di cellule.

La somministrazione contemporanea di cellule delle due specie ha mostrato che la presenza di *Coolia monotis* nei bloom di *O. ovata* non aumenta il rischio di intossicazione per gli organismi marini e che anzi, qualora fosse presente un numero di cellule elevato, queste potrebbero diluire gli effetti tossici dovuti alle tossine di *O. ovata*. Tuttavia questo è un aspetto che ancora non si è presentato in quanto nei bloom di *O. ovata* la concentrazione di cellule di *C. monotis*, così come quelle di *Prorocentrum lima* e *Amphidinium* sp. presenti, sono sempre in quantità molto scarse.

Sono stati molto utili invece, i risultati dell'esperimento effettuato con le colture di *O. ovata* in diverse condizioni di nutrienti.

Come ci si aspettava, la crescita delle colture è risultata minore in carenza di nutrienti ma, grazie anche alle altre analisi effettuate, si è riuscito a comprendere meglio il ruolo del fosforo e soprattutto dell'azoto nel loro metabolismo.

Nelle colture a carenza di P, si è registrata una crescita e una produzione di tossine minore rispetto a quella di controllo; i valori dei biovolumi invece risultano i più alti: come già detto, questo può dipendere dal fatto che in carenza di fosforo le cellule non riescono a compiere la scissione cellulare mantenendosi così su dimensioni molto grandi.

Le condizioni a carenze di azoto, invece, hanno evidenziato come questo elemento sia fondamentale per *O. ovata*; la crescita è ancora più ridotta e anche il volume cellulare ne risente registrando i valori più bassi tra le varie condizioni. Questi dati sono stati poi confermati anche dall'analisi del consumo dei nutrienti che evidenzia come, in caso di carenza di azoto, anche il fosforo non venga più consumato.

Sicuramente un ruolo molto importante dell'azoto lo ritroviamo nella produzione di tossine: quelle prodotte da *O. ovata* sono composti azotati e, di conseguenza, in mancanza di tale elemento la loro produzione è diminuita drasticamente, come già osservato per altre microalghe. Il dato più nuovo consiste nella minore tossicità di *O. ovata* anche in carenza di P dal momento che, per altre dinoflagellate tossiche, questa condizione spesso determina un aumento della tossicità (Graneli e Flynn, 2006). Questo fatto può creare conseguenze gravi per l'ambiente visto che generalmente i bloom algali determinano un consumo di nutrienti e pertanto, verso la fine del bloom quando i nutrienti sono stati consumati, le cellule presenti possono determinare un maggiore rischio di tossicità. Nei bloom di *O. ovata* questo aspetto non dovrebbe verificarsi e la maggiore o minore tossicità del fenomeno potrebbe essere legata solo al rilascio delle tossine nell'ambiente, rilascio che aumenta quando le cellule sono in fase stazionaria (Guerrini et al., 2010) e all'aumentare della temperatura (Pezzolesi et al., inviato per pubblicazione).

Questo studio è stato molto utile per comprendere meglio le dinamiche di tossicità di *C. monotis* e *O. ovata*. Nei casi di bloom, la contemporanea presenza di queste microalghe non tende ad aumentare il rischio di

tossicità e soprattutto si è potuto valutare come l'abbondanza o la scarsità dei nutrienti vada a influire sulla crescita e la produzione di tossine; questo può aiutare molto per lo studio, la prevenzione e la comprensione di fenomeni legati a fioriture algali di queste specie.

BIBLIOGRAFIA

- Alaman M, Trieff NM, Ray SM, Hudson JE. *Isolation and partial characterization of toxins from the dinoflagellate G. breve*. J Phramacol Sci; 64: 865-7. 1975.
- Anderson DM. *Le maree rosse*. Le Scienze 1994; 314 (10):74-81.
- Anderson, D., Glibert, P., Burkholder, J.M. *Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition and consequences*. Estuaries 25, 562– 584. 2002.
- ARPAM, Agenzia Regionale per la Protezione Ambientale delle Marche. *Presenza di ostreopsis ovata lungo le coste marchigiane*. 2008.
- Artigas, P., Gadsby, D.C. *Na⁺/K⁺-pump ligands gating of palytoxin induced ion channels*. Proc. Nati. Acad. Sci USA 100: 501-5. 2003.
- Ballantine D.L., Tosteson T.R. and Bardales A.T. *Population dynamics and toxicity of natural population of benthic dinoflagellates in southwestern Puerto Rico*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 119: 201-212. 1988.
- Barone R. *Asparagopsis taxiformis (Delile) Trevisan (Rhodophyta) e Trichodesmium erythraeum Ehrenberg (Cyanobacteria), due taxa algali tropicali identificati nelle acque costiere della Sicilia*.— Naturalista sicil., 28: 183-203. 2004.
- Barone R. *Behavioural trait of Ostreopsis ovata (Dinophyceae) in Mediterranean rock pools: the spider's strategy*. Harmful Algae News 33:1-3. 2007.
- Besada, E.G., L.A. Loeblich and A.R. Loeblich,. *Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas: Coolia,*

- Gambierdiscus, and Ostreopsis*. Bulletin of Marine Science 32:723-735. 1982.
- Bianco I., Congestri R., Sangiorgi V., Albertano P., Zaottini E. *Fioriture di microalghe potenzialmente tossiche lungo le coste laziali*. Biol. Mar. Medit. 13, 947-950. 2006.
 - Bignami G. S. *A rapid and sensitive haemolysis neutralization assay for*
 - Casavola N., Troncone A., Rizzi E., Favale M.G., Bello G. *Microalghe marine tossiche nella provincia di Bari: danni ambientali, ittiofaunistici, evidenze epidemiologiche*. In: Diffusione delle fioriture tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche. Istituto Nazionale di Sanità. p. 92-98. 2005.
 - Ciminiello P., Dell'Aversano C. *Putative palytoxin and its new analogue, ovatoxin-a in Ostreopsis ovata collected along the ligurian coasts during the 2006 toxic outbreak*. J. Am. Soc. Mass Spectrom. 19, 111-120. 2008.
 - Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Forino M., Grauso L., Tartaglione L., Guerrini F., Pistocchi R. *Complex palytoxin-like profile of Ostreopsis ovata. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 24: 2735-2744. 2010.
 - Congestri R., Penna A., Zingone A. *BENTOX-NET, a research and management initiative on Ostreopsis spp. and other benthic microalgal blooms on the Italian coast*.—Harmful Algal News, 32: 11-12. 2006.
 - Escobar LI, Salvador C, Martinez M, Vaca L. *Maitotoxin: a cation channel activator*. Neurobiology 6:59-74. 1998.

- Estacion M. *Ciguatera toxins: mechanism of action and pharmacology of maitotoxin*. In: *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection*, Botana L.M., (ed.). Marcel Dekker, New York, p. 473-503. 2000.
- Faust M, Gulledge R.A. *Identifying Harmful Marine Dinoflagellates. Smithsonian Contributions from the United States National Herbarium*—Department of Systematic Biology-Botany National Museum of Natural History, Smithsonian Institution, Washington, USA, p.144. 2002.
- Faust M, Morton S.L, Quod JP. *Further study of marine dinoflagellates: the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae)*. J. Phycol.. 32: 1053-1065. 1996.
- Faust M. Morton S.L. *Morphology and ecology of the marine dinoflagellate *Ostreopsis labens* sp. nov. (Dinophyceae)*. J. Phycol., 31: 456-463. 1995.
- Garcés E, Masò M, Camp J, *A recurrent and localized dinoflagellate bloom in Mediterranean beach*. Journal of Plankton Research 21:2373-91. 1999.
- Geraci JR, Anderson DM, Timperi RJ, Aubin DJS, Early GA, Prescott JH, Mayo Ca: *Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) fatally poisoned by dinoflagellate toxin*. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic science 46: 1895-8. 1989.
- Granéli E., Flynn K. *Chemical and physical factors influencing toxin content*. In: Granéli, E., Turner, J.T. (Eds.), *Ecological Studies, Vol. 189. Ecology of Harmful Algae*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 229–241. 2006.

- Habermann, E., Hudel, M., Dauzenroth, M.E. *Palytoxin promotes potassium outflow from erythrocytes, hela and bovine adrenomedullary cells through its interaction with Na⁺, K⁺ -ATPase*. *Toxicon* 27: 419-430. 1989.
- Hallegraeff GM. *Harmful algal blooms: a global overview*. In: Hallegraeff GM, Anderson DM, Cembella AD, editors *Manual on harmful marine microalgae vol. 33*. Paris: UNESCO, P. 1-22; 1995.
- Hallegraeff, G. *A review of harmful algal blooms and their apparent global increase*. *Phycologia* 32, p. 79–99. 1993.
- Hallegraeff, G.M., McCausland, M.A., Brown, R.K. *Early warning of toxic dinoflagellate blooms of Gymnodinium catenatum in southern Tasmanian waters*. *Journal of Plankton Research* 17: 1163-1176. 1995.
- Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecker, D.K., Suddleson, M. *Eutrophication and harmful algal blooms: A scientific consensus*. *Harmful Algae* 8, p. 3–13. 2008.
- Hilgemann, D.W. *From a pump to a pore: how palytoxin opens the gates*. *PNAS* 100: 386. 2003.
- Holmes, M.J., R.J. Lewis, A. Jones and A.W. Wong Hoy. *Cooliatoxin, the first toxin from Coolia monotis (Dinophyceae)*. *Natural Toxins* 3: 355-362. 1995.
- Icardi G., Marensi L. *Aspetti epidemiologici - Seminario internazionale "Ostreopsis, problemi per il Mediterraneo? "*. 2005.

- Ingarao C., Lanciani G., Teodori A., Pagliani T. *First presence of Ostreopsis cfr. ovata (Dinophyceae) along Abruzzo coasts (W Adriatic Sea)*. Biol. Mar. Mediterr. 16, 172-173. 2009.
- Isbister GK, Kiernan MC *Neurotoxic marine poisoning*. Lancet Neurol; 4:218-28. 2005.
- Ito E, Satake M, Ofuji k, Kurita N, McMahon T, James KJ. *Multiple organ damage caused by new toxin azaspiracid, isolated from mussels produced in Ireland*. Toxicon; 38: 917-30. 2000.
- Justic et al. *Changes in nutrient structure of river dominated coastal waters; stoichiometric nutrient balance and it's consequences*. Estuarine, Coastal and Shelf Science; 40: 339-356. 1995.
- Kao CY. *Pharmacology of tetrodotoxin and saxitoxin*. Fed Proc; 31:1117-23. 1972.
- Lenoir S., Ten-Hage L., Turquet J., Quod J.P., Berbard C., Hennion M.C. *First evidence of palytoxin analogues from an Ostreopsis mascaranensis (Dinophyceae) benthic bloom in Southwestern Indian Ocean*. J. Phycol., 40: 1042-1051. 2004.
- Lewis RJ, Molgo J, Adams DJ. *Ciguatera toxins: pharmacology of toxins involved in Ciguatera and related fish poisoning*. In: Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology and Detection, Botana L.M., (ed.). Marcel Dekker, New York, p. 418-19. 2000.
- Manganelli M., Bogialli S., Di Corcia A., Mattei D., Mattera F., Scardala S., Scenari R., Stefanelli M., Funari E. *Temperature effect on palytoxin production by cultures of Ostreopsis ovata*. In: Proceedings of the International symposium on algal toxins, Trieste, May 27–29, p. 48. 2007.

- Matthews S.G., Pitcher G.C., ***Most recorded marine mortality on the South African coast.*** In: Yasumoto T, Oshima Y, Fukuyo Y, editors. ***Harmful and toxic algal blooms.*** Sendai: UNESCO, Sendai Kyodo Printerp. 89-92. 1996.
- Meunier, A. ***Microplankton de la Mer Flamande.*** 1919.
- Monti M., Minocci M., Beran A., Ivesa L. ***First record of *Ostreopsis cfr. ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea.*** Mar. Poll. Bull. 54, 598–601. 2007.
- Moore R. E., Bartolini G. ***Structure of palytoxin.*** J. Am. Chem. Soc. 103: 2491-2494. 1981.
- Morales-Tialpan V, Vaca L, ***Modulation of the maitotoxin response by intracellular and extracellular cations.*** Toxicon 40:493-500. 2002.
- Morton S.L., Norris D.R., Bomber J.W. ***Effect of temperature, salinity and light-intensity on the growth and seasonality of toxic dinoflagellates associated with ciguatera.*** J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 157, 79–90. 1992.
- Murata T, Kumagai M, Lee JS, Yasumoto T. ***Isolation and structure of yessotoxin, a novel polyether compound implicated in diarrheic shellfish poisoning.*** Tetrahedron Lett; 28: 5369-872. 1987.
- Nakajima, I., Y. Oshima and T. Yasumoto. ***Toxicity of benthic dinoflagellates in Okinawa.*** Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 47: 1029-1033. 1981.
- Ofuji K, Satake M, McMahon T, Silke J, James KJ, Naoki H, Oshima Y, Yasumoto T. ***Two analoges of azaspiracid isolated from mussels involved in human intoxication in Ireland.*** Nat Toxins; 7: 99-102. 1999.

- Olivos A. *Nutrientes inorganicos disueltos en aguas litorales proximas del Mar Catalan*. PhD Marine Biology Department. Barcelona, Universitat de Barcelona, p.195. 2000.
- Onuma Y., Satake M., Ukena T., Roux J., Chanteaus S., Rasolofonirina N., Ratsimaloto M., Naoki H., Yasumoto T. *Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism*. — *Toxicon* 37: 55-65. 1999.
- Penna A., Vila M., Fraga S., Giacobbe M.G., Andreoni F., Riobò P. & Vernezi C. *Characterization of Ostreopsis and Coolia (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and Internal Transcribed Spacer 5.8S rDNA sequences*.— *J. Phycol.*, 41: 212-225. 2005.
- Pezzolesi L., Guerrini F., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Forino M., Tartaglione L., Pistocchi R., *Influence of temperature and salinity on Ostreopsis cf ovate growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological essays*. Inviato per pubblicazione.
- Pistocchi R., Pezzolesi L., Guerrini F., Vanucci S., Dell'Aversano C., Fattorusso E. *Effect of environmental conditions on growth and toxin production of Ostreopsis ovate*. 2010.
- Risk M, Lin YY, MacFarlane RD, Sadagopa-Ramanujam VM, Smith LL, Tieff NM. *Purification and chemical studies on a major toxin from Gymnodinium breve*. In: Taylor D.L., Seliger H.H., (Ed.) *Toxic Dinoflagellate blooms*. North Holland: Elsevier p. 335-44. 1979.
- Rossi R, Castellano V, Scalco E, Serpe L, Zingone A, Soprano V. *New palytoxin-like molecules in Mediterranean Ostreopsis cf. ovata*

- (dinoflagellates) and in Palythoa tuberculosa detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry.* 2010
- Sansoni G., Borghini B., Camici G., Casotti M., Righini P., Rustighi C. *Fioriture algali di Ostreopsis ovata (Gonyaulacales: Dinophyceae): un problema emergente.* —Biologia Ambientale, 17: 17-23. 2002.
 - Satake M, Ofuji K, Naoki H, Oshima Y, Yasumoto T. *Azaspiracid, a new marine toxin having unique spiro ring assemblies, isolated from irish mussels.* J. Am. Chem. Soc.; 120: 9967-8. 1998.
 - Shantz EJ, Mold JD, Stanger DW, Shavel J, Riel FJ, Bowden JP, Lynch JM, Wyler RS, Riegel BR, Sommer H. *Paralytic shellfish poisoning. VI. A procedure for the isolation and purification of the poison from toxic clams and mussel tissues.* J. Am. Chem. Soc. 72: 5230-35. 1957.
 - Simoni, F., Gori, L., Di Paolo, C., Lepri, L., Mancino A. *Fioriture d'Ostreopsis ovata, Coolia monotis, Prorocentrum lima nelle macroalghie del mar Tirreno settentrionale, Mediterraneo (seconda fase di studio).* Biol. Ital. 10, 68-73. 2004.
 - Smayda and Reynolds, *Strategies of marine dinoflagellate survival and some rule of assembly.* Journal of Sea Research 49, 95-106; 2003.
 - Smayda T. *What is a bloom? A commentary.* America Society of Limnology and Oceanography, Inc 42: 1132-36. 1997
 - Sugamuma M, Fujiki H, Suguri H, Yoshizawa S, Hirota M, Nakayasu M, Djika M, Wakamatsu K, Yamada K, Sugimura T. *Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradeca-noato-13-acetate-type tumor promoter.* Proc Natl Acad Sci; 85:1768-71. 1988.

- Taylor F.J.R. *A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. In: Taylor, D.L., Seliger, H.H. (Eds.), Toxic Dinoflagellate Blooms.* Elsevier/North-Holland, New York, pp. 71–76. 1979.
- Terao K, Ito E, Oarada M, Murata M, Yasumoto T. *Histopathological studies on experimental marine toxins poisoning. 5. The effects in mice of yessotoxins isolated from patinopecten yessoensis and of a desulfated derivative.* *Toxicon*; 28:1095-104. 1990.
- Tognetto L., Bellato S., Moro I, Andreoli C. *Occurrence of Ostreopsis ovata (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994.* *Bot. Mar.* 38, 291-295.1995.
- Totti C., Accoroni S., Cerino F., Cucchiari E., Romagnoli T. *Ostreopsis ovata bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic Sea): Relationships with environmental conditions and substrata.* *Harmful Algae* 9: 233–239. 2010.
- Ungaro N., Marano G., Pastorelli A.M., Marzano M.C., Pompei M. *Presenza di Ostreopsidiaceae nel basso Adriatico.* In: Mattei, D., Melchiorre, S., Messineo, V., Bruno, M. (Eds.), *Rapporti ISTISAN 05/29.* Istituto Superiore di Sanità, Roma, pp. 112-115. 2005.
- Vila M., Garce's E. & Masò M. *Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in the NW Mediterranean.—* *Aquat. Microb. Ecol.*, 26: 1-60. 2001.
- Wright JL, Bird CJ, de Freitas AS, Hampson D, McDonald J, Quilliam MA. *Chemistry, biology and toxicology of domoic acid and its isomers.* *Can Dis Wkly Rep* 16 (Suppl. 1E): 21-6. 1990.

- Yasumoto T, Nakajima I, Bagnis R, Adachi R. ***Finding a dinoflagellate as a likely culprit of Ciguatera.*** Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish; 43:1021-6 1997.
- Yasumoto T. ***The chemistry and biological functions of natural marine toxins.*** Chem. Rec. 1:228-42. 2001.
- Zhou J, Komiyama M, Terao K, Shimada Y. ***Effects of pectenotoxin-1 on liver cells in vitro.*** Natural Toxins; 2:132-5. 1994 .
- Zingone A., Enevoldsen H.O. ***The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management.*** Ocean and Coastal Management 43, 725-748; 2000.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine durante questo lavoro

di tesi. In particolar modo desidero ringraziare i miei genitori, per avermi dato la possibilità di intraprendere la carriera universitaria e per avermi appoggiato nelle mie scelte.

Un grandissimo ringraziamento va ad Anna, per essermi stata sempre vicina in questi anni, per aver sopportato i miei scleri anche nei momenti di gran difficoltà e per avermi sempre dato una parola d'incoraggiamento.

Desidero ringraziare anche la professoressa Pistocchi per avermi accolto come tesista e ringrazio Franca, Laura, Giulia e Manuela per il tempo e la pazienza dedicatomi e le risate fatte assieme nei laboratori.

Un saluto va anche ai miei amici, compagni di mille (dis)avventure, senza i quali arrivare a questo traguardo sarebbe stato di una noia mortale.