

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**INDIVIDUAZIONE DEI VALORI OTTIMALI DI CRESCITA
DI DINOFLAGELLATE BENTONICHE, VALUTAZIONE
DELLA TOSSICITA' E DI INTERAZIONI ALLELOPATICHE**

Relatore:
Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da:
Flavio Guidi

Correlatore:
Dott.ssa Laura Pezzolesi

(III sessione)

Anno Accademico 2009/2010

Al mio papà e alla mia mamma
Spero che un giorno possano essere orgogliosi di me
come io lo sono di loro...

A tutti coloro che, come me,
hanno dedicato la loro vita al mare...

L'acqua è cedevole perché è incompressibile. Scivola sotto lo sforzo.
Compressa da un lato sfugge dall'altro. E' così che diventa flutto.
L'onda è la sua libertà.

Victor Hugo

INDICE

INTRODUZIONE	7
1. BIOINTOSSICAZIONI IN AMBIENTE MARINO	9
1.1 <i>GLI “HABs”</i>	9
1.2 <i>TOSSINE ED EFFETTI</i>	10
1.2.1 <i>PARALYTIC SHELLFISH POISONING (PSP)</i>	12
1.2.2 <i>AMNESIC SHELLFISH POISONING (ASP)</i>	15
1.2.3 <i>NEUROTOXIC SHELLFISH POISONING (NSP)</i>	16
1.2.4 <i>DIARRHETIC SHELLFISH POISONING (DSP)</i>	17
1.2.4.1 Acido okadaico e dinophysitossine.....	18
1.2.4.2 Pectenotossine.....	19
1.2.4.3 Yessotossine.....	20
1.2.5 <i>CIGUATERA FISH POISONING (CFP)</i>	21
2. SPECIE OGGETTO DELLA RICERCA	23
2.1 <i>CARATTERISTICHE GENERALI DEI DINOFLAGELLATI</i>	23
2.2 <i>LA FAMIGLIA OSTREOPSIDACEAE</i>	25
2.2.1 <i>Ostreopsis ovata (Fukuyo, 1981)</i>	25
2.2.2 <i>Coolia monotis (Meunier, 1919)</i>	29
2.3 <i>DISTRIBUZIONE LUNGO LE COSTE ITALIANE</i>	31
2.4 <i>FATTORI CHE INFLUENZANO UN BLOOM</i>	32
2.4.1 <i>PARAMETRI AMBIENTALI</i>	32
2.4.1.1. Idrodinamismo.....	32
2.4.1.2. Substrato.....	32
2.4.1.3. Profondità.....	32
2.4.1.4. Salinità.....	33
2.4.1.5. Nutrienti.....	34
2.4.1.6. Temperatura.....	35
2.4.2 <i>FATTORI BIOLOGICI</i>	36

3. LA PALITOSSINA.....	37
3.1 TOSSICITA' DI <i>O. ovata</i>	38
3.2 METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA PLTX.....	39
3.2.1 <u>METODICHE ANALITICHE: LC-MS</u>	39
3.3 FATTORI CHE INFLUENZANO LA TOSSICITA'.....	41
3.3.1 <u>PARAMETRI AMBIENTALI</u>	41
3.3.1.1. Nutrienti.....	42
3.3.1.2. Temperatura.....	42
3.3.2 <u>FATTORI BIOLOGICI</u>	43
4. ALLELOPATIA.....	44
4.1 DEFINIZIONE.....	44
4.2 ALLELOPATIA IN AMBIENTE ACQUATICO.....	44
4.3 TIPOLOGIA DEI COMPOSTI ALLELOCHEMICI.....	45
4.4 FATTORI CHE INFLUENZANO LA PRODUZIONE DI COMPOSTI ALLELOCHEMICI.....	48
4.4.1 <u>PARAMETRI AMBIENTALI</u>	48
4.4.1.1 Luce.....	48
4.4.1.2 Temperatura.....	48
4.4.1.3 pH.....	48
4.4.1.4 Nutrienti.....	49
4.4.2 <u>FATTORI BIOLOGICI</u>	50
4.4.2.1. Organismi coinvolti.....	50
4.4.2.2. Effetti della fase di crescita.....	50
4.4.2.3. Influenza dei batteri.....	50
4.5 IMPLICAZIONI ECOLOGICHE.....	51
4.6 ALLELOPATIA NELLE OSTREOPSIDACEAE.....	51
5. INFLUENZA DEI BATTERI SU TOSSICITA' E ALLELOPATIA.....	53
SCOPO DELLA TESI.....	55
MATERIALI E METODI.....	59
6. COLTURE ALGALI BATCH.....	61
6.1 ISOLAMENTO DELLE CELLULE.....	62
6.2 PREPARAZIONE DEL MEDIUM E INOCULO.....	62

6.3	<i>DESCRIZIONE E ALLESTIMENTO DEGLI ESPERIMENTI</i>	65
6.3.1	<i>ESPERIMENTO 1</i>	65
6.3.2	<i>ESPERIMENTO 2</i>	67
6.3.3	<i>ESPERIMENTO 3</i>	67
6.3.4	<i>ESPERIMENTO 4</i>	67
7.	VALUTAZIONE DELLA CRESCITA	71
7.1	<i>CONTEGGIO</i>	71
7.1.1	<i>CURVA DI CRESCITA</i>	72
7.2	<i>MISURA DELL'ATTIVITA' FOTOSINTETICA TRAMITE FLUORIMETRO PAM</i>	73
8.	ANALISI DEI NUTRIENTI	77
8.1	<i>ANALISI DEI FOSFATI</i>	77
8.2	<i>ANALISI DEI NITRATI</i>	77
9.	DETERMINAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DELLE TOSSINE	81
	RISULTATI	83
10.	CRESCITA DI <i>Coolia monotis</i> A DIVERSE TEMPERATURE	85
10.1	<i>CURVE DI CRESCITA DI C. monotis</i>	85
10.2	<i>EFFETTO DELLA TEMPERATURA SULL'EFFICIENZA FOTOSINTETICA DI C. monotis</i>	87
10.3	<i>CONSUMO DEI NUTRIENTI DURANTE LA CRESCITA DI C. monotis</i>	90
11.	CRESCITA DI <i>O. ovata</i> A DIVERSE TEMPERATURE	95
11.1	<i>CURVE DI CRESCITA O. ovata</i>	95
11.2	<i>EFFETTO DELLA TEMPERATURA SULL'EFFICIENZA FOTOSINTETICA DI O. ovata</i>	98
11.3	<i>CONSUMO DEI NUTRIENTI DURANTE LA CRESCITA DI O.ovata</i>	100
12.	CRESCITA DI <i>O. ovata</i> E <i>C. monotis</i> IN COLTURE MISTE A DIVERSE TEMPERATURE	105
12.1	<i>CURVE DI CRESCITA O. ovata E C. monotis</i>	105

12.2	<i>EFFETTO DELLA TEMPERATURA SULL'EFFICIENZA FOTOSINTETICA DELLE COLTURE MISTE DI O. ovata E C. monotis</i>	109
12.3	<i>CONSUMO DEI NUTRIENTI DURANTE LA CRESCITA IN COLTURE MISTE DI O. ovata E C. monotis</i>	112
13.	INTERAZIONI ALLELOPATICHE TRA <i>O.ovata</i> E <i>C. monotis</i>	116
13.1.	<i>CURVE DI CRESCITA <i>C. monotis</i> IN PRESENZA DI FILTRATO DI <i>O. ovata</i></i>	116
13.2.	<i>EFFICIENZA FOTOSINTETICA DI <i>C. monotis</i></i>	118
14.	PRODUZIONE DI TOSSINE DA PARTE DI <i>O. ovata</i>	122
14.1.	<i>CONSIDERAZIONI SU CRESCITA, TOSSICITA' ED EFFETTO ALLELOPATICO DI <i>O.ovata</i> E <i>C. monotis</i></i>	125
	CONCLUSIONI	129
	BIBLIOGRAFIA	133
	RINGRAZIAMENTI	155

INTRODUZIONE

1. BIOINTOSSICAZIONI IN AMBIENTE MARINO

In mare le alghe rappresentano la componente vegetale più abbondante, seguite dalle fanerogame marine (*Posidonia oceanica*, *Cymodocea nodosa* e *Zoostera* sp.). In genere il termine “alga” non ha una definizione tassonomica, ma racchiude un gruppo di organismi molto diversificati che come caratteristiche comuni possiedono la presenza di clorofilla *a* come pigmento fotosintetico primario, l’autotrofia e il fatto di vivere in ambiente acquatico. Le alghe svolgono un ruolo essenziale, in quanto sono produttori di sostanza organica e ossigeno. Assumono quindi una posizione fondamentale nel sistema marino, in quanto sono il primo anello della catena alimentare. Sono il cibo di molti organismi come invertebrati e pesci, tra cui molte specie di importanza commerciale. Alcune microalghe però producono delle sostanze tossiche, che possono minare la salute umana attraverso l’ingestione di pesce o frutti di mare contaminati, quindi lo studio di questi organismi risulta essere molto importante.

1.1. GLI “HABs”

La proliferazione di specie algali tossiche spesso in passato veniva indicata con il termine di “marea rossa”. Questo termine per indicare il fenomeno in realtà non è corretto, in quanto attualmente sono noti episodi di proliferazione di specie algali non tossiche, a livello di milioni di cellule litro, che determinano maree colorate mentre, al contrario, si verificano eventi tossici causati da alghe presenti in mare solamente a livello di qualche centinaio di cellule per litro, che non determinano il fenomeno di discolorazione delle acque. La comunità scientifica preferisce attualmente usare il termine di “Harmful Algal Bloom” (HAB), cioè fioritura algale dannosa, per definire tutti quei fenomeni associati alla presenza di alghe tossiche e/o dannose (Poletti, 2007).

Le fioriture di alghe dannose, a seconda degli effetti da esse prodotti, possono essere classificate nel seguente modo (Andersen, 1996):

- fioriture di specie che provocano soltanto una colorazione dell’acqua, con diminuzione della visibilità e della qualità estetica ed eventuale moria di pesci e invertebrati acquatici, a causa

delle conseguenti condizioni di ipossia. A questo gruppo appartengono specie di dinoflagellate (es. *Noctiluca scintillans*) e di diatomee (es. *Skeletonema costatum*);

- fioriture di specie che producono potenti tossine, che si accumulano lungo la catena alimentare e che possono causare effetti vari nei consumatori secondari (uomo e animali superiori). Di questo gruppo fanno parte diversi generi di dinoflagellati (*Alexandrium*, *Gymnodinium*, *Dinophysis*, *Prorocentrum*) e diatomee del genere *Pseudo-nitzschia*;

- fioriture di specie che nella maggior parte dei casi non sono tossiche per l'uomo, ma risultano dannose in vario modo per pesci e invertebrati (es. *Chattonella antiqua*, *Chaetoceros convolutus*);

- fioriture di specie produttrici di tossine che vengono trasportate nell'aerosol dall'area di fioritura fino alla costa (es. *Karenia brevis*).

1.2. TOSSINE ED EFFETTI

Le biotossine marine sono rappresentate da un gruppo eterogeneo di composti chimici che determinano nell'uomo, in seguito al consumo di prodotti ittici, una serie di quadri clinici patologici noti con il termine di biointossicazioni; tali molecole vengono prodotte principalmente da organismi fitoplanctonici e fitobentonici ma anche da batteri, che attualmente rappresentano uno degli aspetti più importanti e discussi sull'origine di queste molecole. Esse manifestano il loro effetto come tali o attraverso le trasformazioni metaboliche che si possono verificare nei vari passaggi della catena alimentare. Le tossine prodotte dalle dinoflagellate marine sono i più potenti veleni non proteici conosciuti (Anderson and Lobel., 1987; Steidinger, 1983; Steidinger and Baden, 1984). Alla metà degli anni '80, erano ventidue le specie di dinoflagellate in cui era stata riscontrata la produzione di tossine (Steidinger and Baden, 1984; Tosteson, et al., 1986). Per quanto riguarda le diatomee, attualmente solamente il genere *Pseudo-nitzschia* è noto per la sintesi di biotossine (Poletti, 2007). Non si conosce l'importanza e il ruolo delle tossine nel metabolismo delle alghe e non si capisce il perché vengano prodotte, ma è comune credere che siano dei metaboliti secondari.

Diversi studi hanno evidenziato l'importanza dei processi di biotrasformazione delle tossine algali da parte dei molluschi e dei pesci. Infatti è stato dimostrato che il metabolismo di questi

animali può modificare la struttura chimica della tossina, determinando un cambiamento dell'effetto tossico, fino a renderla 40 volte più potente (Ade et al., 2003).

Le biotossine marine, pur essendo un gruppo di composti strutturalmente diversi fra di loro, hanno alcune caratteristiche comuni, in genere sono stabili al calore e in ambiente acido. Questo comporta che la cottura dei frutti di mare o del pesce non elimina il rischio di intossicazione e che i succhi gastrici dello stomaco non modificano e non eliminano la tossina, che viene in genere assorbita a livello intestinale. Una prima suddivisione di questi composti può essere effettuata in base alla loro solubilità in biotossine idrosolubili e biotossine liposolubili (Poletti et al., 2003). Attualmente la classificazione di queste molecole è piuttosto discussa. Dapprima le tossine sono state raggruppate in base al tipo di biointossicazione determinata: sindrome paralitica (PSP, paralytic shellfish poisoning), sindrome amnesica (ASP, amnesic shellfish poisoning), sindrome diarroica (DSP, diarrhetic shellfish poisoning), sindrome neurotossica (NSP, neurotoxic shellfish poisoning) e ciguatera (CFP, ciguatera fish poisoning). Tuttavia tale classificazione è piuttosto discussa, in quanto alcuni composti sono stati erroneamente inseriti in un gruppo solo per la loro presenza in concomitanza di altre tossine note, anche se i sintomi e la chimica delle molecole sono differenti. Nel 2006 è stato proposto di raggruppare le molecole in base alle loro caratteristiche chimiche, in:

- gruppo dell' azaspiracido (AZA)
- gruppo delle brevetossine (BTX)
- gruppo delle imine cicliche
- gruppo dell'acido domoico (DA)
- gruppo dell'acido okadaico (OA)
- gruppo delle saxitossine (STX)
- gruppo delle yessotossine (YTX)

(Toyofuku, 2006; Tubaro et al., 2007).

Da tutto ciò risulta evidente come siano necessarie delle normative per regolare la vendita dei molluschi e del pesce pescati a livello globale. Infatti il commercio dei frutti di mare è diffuso in tutto il mondo e soltanto in Europa risultano essere consumati circa 12 miliardi di pesce all'anno, che comprende il pescato europeo e le importazioni (Whittle et al., 2000). Le istituzioni, con l'essenziale collaborazione del mondo scientifico, devono emanare dei regolamenti per stabilire i livelli massimi di tossina nei molluschi e indicare i metodi di analisi dei diversi gruppi di tossine. Inoltre è essenziale stabilire dei metodi di monitoraggio

internazionali e formare personale competente che sappia identificare le specie algali tossiche (Toyofuku, 2006).

Sia a livello nazionale che a livello di comunità europea, esiste quindi una legislazione che definisce i limiti di presenza delle biotossine marine nei vari prodotti ittici commercializzati.

Tali limiti sono stati sviluppati sulla base dei seguenti indici tossicologici:

- LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level): è la più piccola dose di una sostanza che provoca un effetto dannoso alla salute della persona o di un animale;
- NOAEL (No Observed Adverse Effect Level): è la dose più elevata di una sostanza che non produce un effetto dannoso alla salute della persona o di un animale;
- acute RfD (acute reference dose): la dose acuta di riferimento è una stima dell'ammontare di una sostanza, o tossina, nel cibo, normalmente espressa in peso corporeo, che può essere ingerita in 24 ore, o in minor tempo, senza un effetto apprezzabile nel consumatore. Per il calcolo di questi valori si considera un individuo di 60 kg;
- fattore di sicurezza: è un valore di sicurezza che viene usato come divisore del LOAEL e del NOAEL per calcolare l'acute RfD;
- il limite guida in relazione alla parte edibile assunta è la quantità di tossina massima che può essere presente nella parte edibile del mollusco.

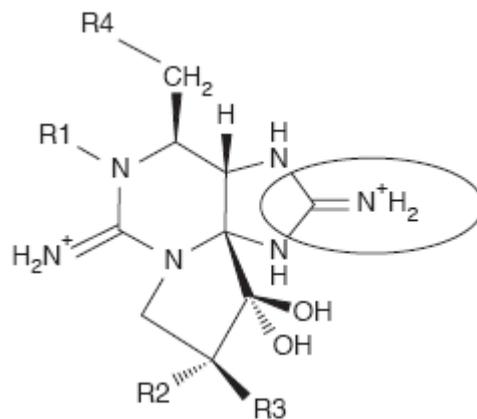
I saggi tossicologici permettono di indicare le concentrazioni di tossine alle quali si può manifestare un effetto, distinguendo fra breve e lungo termine. Per le tossine marine, di cui si sa ancora poco, i limiti di legge attuali sono stati determinati principalmente con il test biologico sul topo, ritenuto tuttora il test ufficiale. Recentemente per alcune tossine è stata introdotta come metodica ufficiale la caratterizzazione chimica tramite HPLC e attraverso LC-MS. Dove possibile, i risultati dei test sono stati integrati con i dati bibliografici riguardanti i casi di intossicazione (Toyofuku, 2006; Tubaro et al., 2007).

1.2.1. PARALYTIC SHELLFISH POISONING (PSP)

La sindrome paralitica da molluschi bivalvi (PSP) è una delle sindromi più studiate e conosciute per le gravi conseguenze che produce nei consumatori di molluschi bivalvi. La tossina fu isolata per la prima volta negli anni '50 in Alaska da *Saxidomus giganteus*, ma la sua caratterizzazione chimica risale al 1975. Questa tossina fu chiamata saxitossina (STX), nome derivato dalla specie del mollusco bivalve dal quale era stata estratta (Poletti et al., 2003). I primi casi di intossicazione da sindrome paralitica in Europa risalgono agli anni '60,

con casi in Portogallo, Spagna, Inghilterra, Norvegia e isole Faroer. A metà degli anni '70, l'epidemia da PSP fu registrata anche in Francia, Italia, Svizzera e Germania, causata da mitili contaminati provenienti dalla costa atlantica della Spagna. Nei successivi due decenni gli episodi di PSP sono andati aumentando in tutto il mondo, sia nelle zone temperate che nelle zone tropicali. Nei mari tropicali il dinoflagellato *Pyrodinium bahamense* var. *compressa* è stato identificato come responsabile della sintesi di queste tossine, mentre negli altri mari l'origine biogenetica di tali composti è da attribuire a diverse specie appartenenti al genere *Alexandrium*: *A. tamarense*, *A. catenella*, *A. fundyense*, *A. minutum*.

Nel mare Adriatico nel 1994, in seguito all'isolamento di tossine PSP in mitili provenienti da allevamenti della costa dell'Emilia Romagna, fu osservata la simultanea presenza di *A. minutum*. Nel Mediterraneo sono state identificate *A. lusitanicum* e *A. fundyense* nel Golfo di Trieste e *A. balechi* è stato ritrovato nel Golfo di Napoli e di Salerno. Altra origine di tossine PSP è *Gymnodinium catenatum*, che è stato segnalato nel Tirreno, in Adriatico e nel Mar Egeo (Ade et al., 2003). Oltre alla saxitossina le sostanze responsabili della PSP sono costituite da una famiglia di 20 composti. Questa famiglia di tossine è idrosolubile, resistente al calore, stabile in ambiente acido. La struttura di base è una tetraidropurina con due gruppi guanidinici. Presenta quattro siti di sostituzione, con differenti combinazioni di ossidrilici e solfato, ma il sito di sostituzione R4 risulta essere il più importante, condizionando i livelli di tossicità. Le STX sono divise in carbamate, solfocarbamate e decarbamate. L'azione di queste tossine consiste nel legame e blocco, attraverso uno dei due gruppi guanidinici presente sulla molecola, dei canali voltaggio-dipendenti del sodio, in cellule eccitabili come quelle del muscolo scheletrico e del muscolo cardiaco. Le tossine solfocarbamate risultano essere meno tossiche rispetto a quelle carbamate, per la minor affinità per il sito di legame. In questo modo viene bloccata la trasmissione dell'impulso nervoso nei nervi periferici e nei muscoli scheletrici (Tubaro et al., 2007) (Fig. 1).



R1	R2	R3	Carbamate Toxins	Sulfamate Toxins	Decarbamoyl Toxins
H	H	H	STX	B1	dc - STX
OH	H	H	NEO	B2	dc - NEO
OH	H	OSO ₃ ⁻	GTX I	C3	dc - GTX I
H	H	OSO ₃ ⁻	GTX II	C1	dc - GTX II
H	OSO ₃ ⁻	H	GTX III	C2	dc - GTX III
OH	OSO ₃ ⁻	H	GTX IV	C4	dc - GTX IV

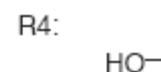
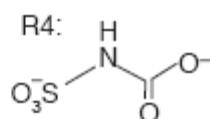
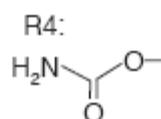


Fig. 1. Saxitossina e analoghi.

L'insorgenza dei sintomi si ha nei 30 minuti che seguono l'ingestione di molluschi bivalvi con parestesie alla bocca, labbra, lingua, all'estremità degli arti, profonda astenia muscolare, impossibilità a mantenere la posizione eretta. Nei casi fatali la morte avviene dopo 3-12 ore per paralisi respiratoria. I pazienti che superano le prime 12 ore, indipendentemente dalla quantità di tossina ingerita, di solito si riprendono rapidamente senza effetti secondari (Toyofuku, 2006).

La gravità dei sintomi dipende dalla quantità di tossina che è stata ingerita. I sintomi vengono classificati in moderati, severamente moderati e severamente estremi. Per il moderato la quantità di saxitossina varia da 2 a 30 µg/kg, mentre negli altri casi la quantità varia da 10 a 300 mg/kg. (Tubaro et al., 2007).

1.2.2 AMNESIC SHELLFISH POISONING (ASP)

La sindrome amnesica da molluschi bivalvi viene determinata dall'acido domoico (DA), un aminoacido neurotossico relativamente raro, il cui effetto maggiore è a livello del sistema nervoso centrale, principalmente nella regione dell'ippocampo. Fu isolato per la prima volta negli anni '50 da una macroalga rossa, *Chondria armata*. Le microalghe coinvolte nella biosintesi di questa tossina sono le diatomee che appartengono al genere *Pseudo-nitzschia* (Whittle et al., 2000).

Il primo caso di intossicazione documentato è avvenuto a Prince Edward Island in Canada, nel 1987, dove 153 persone ricorsero a cure mediche mostrando disturbi di tipo gastrointestinale (nausea, vomito, diarrea) e disturbi neurologici (principalmente perdita della memoria e confusione). Tre pazienti anziani (età oltre 60 anni) morirono. La causa venne attribuita alla ingestione di *Mytilus edulis* contaminati durante una fioritura della diatomea *Pseudo-nitzschia multiseriis*. Altra intossicazione rilevante avvenne lungo le coste della California a inizio anni '90, dove un'altra diatomea, *Pseudo-nitzschia australis*, fu indicata come origine dell'acido domoico. In questo caso la tossina venne ritrovata non solo nei mitili, ma anche nei pesci, principalmente acciughe. A partire dagli anni '90 varie specie del genere *Pseudo-nitzschia* sono state ritrovate in alto e medio Adriatico, anche se le concentrazioni di acido domoico ritrovate nei mitili sono risultate fino ad ora inferiori ai limiti di legge (Ade et al., 2003).

L'acido domoico è un aminoacido tricarbossilico, idrosolubile, stabile al calore e in ambiente acido. È un analogo dell'acido glutammico e dell'acido kainico, che sono i principali neurotrasmettitori del sistema nervoso centrale, e ha una forte affinità per la sottoclasse dei recettori del kainato, abbondanti nel cervello dei mammiferi (Fig. 2). La tossina causa una continua stimolazione dei neuroni, con conseguente aumento del calcio nella cellula e infine morte cellulare. Dalle autopsie si è osservata necrosi neuronale e astrocitosi, principalmente nella zona dell'ippocampo e del nucleo dell'amigdala, che spiegano i disturbi neurologici (Tubaro et al., 2007).

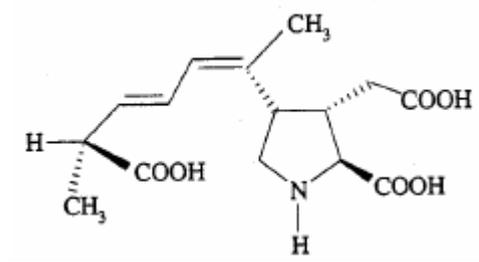


Fig. 2. Acido domoico.

La dose assorbita dall'organismo varia dal 5 al 10% di quella ingerita. La massima penetrazione di acido domoico è nel sangue. Non sembra essere metabolizzato e viene eliminato con facilità attraverso le urine. Inoltre ha una scarsa permeabilità alla barriera emato-encefalica e non sono messi in evidenza dei trasportatori specifici, anche se il cervello risulta essere l'organo bersaglio. La tossicità nell'uomo varia in base all'età, ma i sintomi sono nausea (77%), vomito (76%), crampi addominali (50%), diarrea (42%), mal di testa (43%), perdita di memoria (25%); nei casi più gravi si può avere confusione e disorientamento (100%), mutismo (92%) e coma (75%). Il limite guida nei molluschi è di 20 mg/kg di parte edibile. (Tubaro et al.,2007).

1.2.3. NEUROTOXIC SHELLFISH POISONING (NSP)

L'intossicazione da NSP è causata dalle brevetossine, ad azione neurotossica, prodotte principalmente dalle dinoflagellate del genere *Karenia*. Il rischio per l'uomo deriva dall'ingestione di molluschi contaminati e dall'inalazione di aerosol contenente cellule algali o le stesse tossine (Whittle et al., 2000). La specie coinvolta è *Karenia brevis*. Questa dinoflagellata causa frequenti maree rosse nel Golfo del Messico, lungo le coste della Florida e in Carolina del Nord (USA), cui sono associate morie di pesci e altri organismi marini, mentre nell'uomo provoca disagi gastrointestinali e sintomi neurologici e/o problemi respiratori. Fioriture di *K. brevis* sono state registrate anche in Spagna settentrionale, in Giappone e lungo la costa orientale del Mediterraneo, ma non sono state associate morie di pesci o intossicazione all'uomo. Le brevetossine sono composti polieteri ciclici, liposolubili e termostabili (Fig. 3). Vengono rapidamente assorbite e distribuite in tutto l'organismo, principalmente nel fegato, dove vengono metabolizzate.

Queste tossine hanno elevata affinità per il sito 5 della subunità dei canali del sodio voltaggio dipendenti della membrana cellulare dei neuroni. Quando si legano al canale, determinano un influsso elevato di sodio con conseguente depolarizzazione e alterazione dell'impulso. Diversi esperimenti hanno messo in evidenza che l'attività di queste neurotossine è possibile per la presenza di due strutture: il lattone nell'anello A (testa della molecola) e l'anello terminale (Toyofuku, 2006).

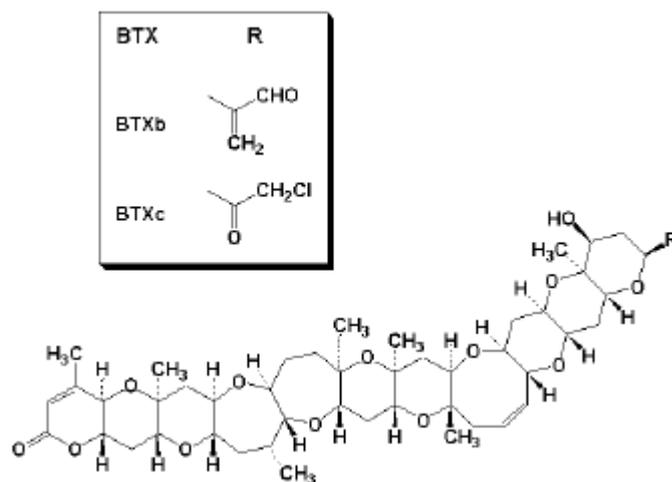


Fig. 3. Brevetossine.

Se vengono ingeriti dei molluschi contaminati, i principali sintomi sono sensazione di paralisi alla bocca e alle dita, rallentamento del battito, sensazione di caldo e freddo, midriasi e lieve diarrea. La guarigione avviene in pochi giorni. Non sono stati riportati casi letali. La quantità limite di brevetossina che i molluschi bivalvi possono contenere è di 80 µg/100g di parte edibile.

Se viene inalato dell'aerosol tossico, si possono determinare forti irritazioni della congiuntiva e delle mucose (soprattutto nasali) seguite da tosse secca e rinorrea. Anche in questo caso la tossina agisce sui canali di membrana del sodio, rilasciando acetilcolina che causa contrazione della muscolatura liscia tracheale (Tubaro et al., 2007). La brevetossina, oltre che sull'uomo, ha effetti su pesci, uccelli e mammiferi marini. Per quanto riguarda i pesci, la tossina viene assorbita attraverso le branchie o per ingestione e la sintomatologia che determina è ben documentata; il nuoto diventa sempre più irregolare con violenti scatti e torsioni, si manifestano fenomeni di defecazione, rigurgito, paralisi delle pinne pettorali, curvatura della pinna caudale, perdita dell'equilibrio, torpore, vasodilatazione, convulsioni, emolisi. La morte sopraggiunge per insufficienza respiratoria, con concentrazioni cellulari anche sole di 250 cellule/ml (Tubaro et al., 2007).

1.2.4. DIARRHETIC SHELLFISH POISONING (DSP)

La sindrome diarroica da molluschi bivalvi è provocata da diverse specie di dinoflagellate.

	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. 4. Acido okadaico e derivati.

Queste tossine sono dei potenti inibitori delle proteino-fosfatasi 1 e 2A, due enzimi che defosforilano i residui serina e treonina delle proteine. L'inibizione di questi enzimi determina un rapido aumento di proteine fosforilate all'interno delle cellule, le quali controllano la secrezione di ioni e la regolazione della permeabilità ai soluti delle cellule intestinali. La risultante è la perdita passiva di fluidi. Inoltre c'è una stimolazione diretta della muscolatura liscia dell'intestino. Gli studi chimici hanno messo in evidenza l'importanza del gruppo carbossilico libero, definito essenziale per l'inibizione delle fosfatasi. L'intossicazione può essere evitata eliminando la ghiandola digestiva dei molluschi (mitili, vongole, capesante). Il limite guida per i molluschi risulta essere 160 µg/kg di parte edibile (Tubaro et al., 2007).

1.2.4.2. Pectenotossine

Le PTX sono polieteri ciclici (Fig. 5) prodotti da diverse specie di *Dinophysis*. Solamente per *D. fortii* è confermata la produzione di PTX-2, che risulta essere il precursore di tutti gli analoghi. I processi di biotrasformazione avvengono ad opera dei molluschi bivalvi. Non sono stati registrati casi di intossicazione umana dovuti a queste tossine.

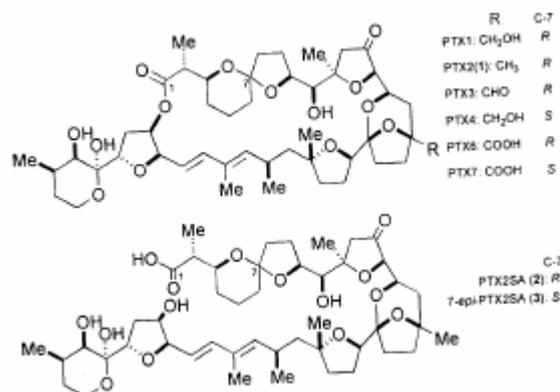


Fig. 5. Pectenotossine e analoghi.

Si sa poco di queste molecole. Le conoscenze attuali derivano da studi condotti su topo per mezzo di estratti di molluschi contaminati. Gli esperimenti evidenziano tossicità a livello del fegato, dello stomaco e dell'intestino. In vitro è stato messo in evidenza come le PTX inducano apoptosi in linee cellulari cancerose. È ancora discussa la dose acuta di riferimento per la mancanza di dati. Il limite guida per i molluschi è posto a 160 µg/kg di parte edibile (Toyofuku, 2006).

1.2.4.3. Yessotossine

Le YTX, come le pectenotossine, sono poco conosciute e mancano di studi approfonditi. Sono state isolate dal mollusco bivalve *Patinopecten yessoensis*, successivamente sono state ricondotte a due generi di dinoflagellate: *Protoceratium* e *Gonyaulax* (Camacho, 2007). Non determinano diarrea, ma un insieme di effetti, identificati dopo studi condotti su cavie. Infatti non sono note intossicazioni umane, anche se le microalghe che producono queste tossine sono diffuse in Australia, Nuova Zelanda, Giappone, Italia, Norvegia, Regno Unito e Canada. Esistono diversi analoghi di YTX. Le caratteristiche che le accomunano sono una catena insatura terminale di nove atomi di carbonio e al lato opposto degli alcoli solfati. Questi ultimi gruppi determinano un basso livello di assorbimento intestinale. Inoltre si è osservata una diversa tossicologia fra yessotossina e yessotossina desulfatata (Fig. 6): la prima agisce sul miocardio, determinando insufficienza cardiaca; la seconda ha come organi bersaglio il fegato e il pancreas (Poletti et al., 2003).

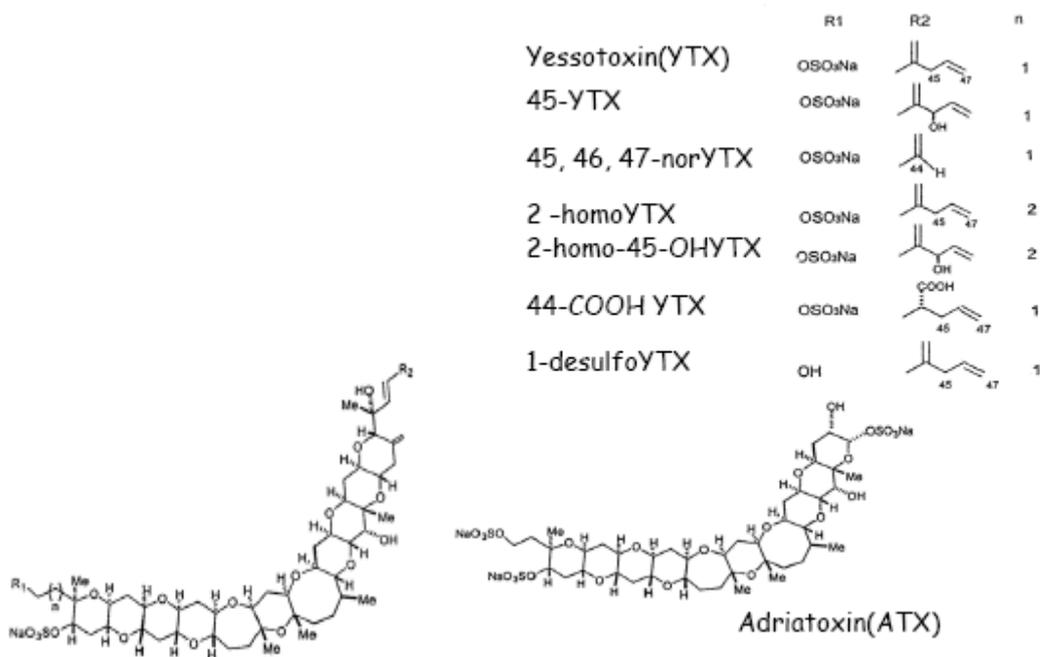


Fig. 6. Yessotossine e suoi analoghi.

Il limite nei molluschi è 1 mg/kg di parte edibile (Tubaro et al., 2007).

1.2.5. CIGUATERA FISH POISONING (CFP)

Lo studio delle microalghe dinoflagellate epifitiche e bentoniche si è sviluppato principalmente nei mari tropicali e subtropicali, dove i generi *Gambierdiscus*, *Coolia*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum*, *Amphidinium* (Whittle et al., 2000) ecc., presenti sulle macroalghe delle barriere coralline, possono produrre polieterei idrosolubili (maitotossina) e liposolubili (ciguatossine) accumulabili nella catena alimentare. La ciguatera fish poisoning (CFP) è la più frequente intossicazione alimentare delle zone circumtropicali (Legrand, 1998), prodotta dall'ingestione di pesci che hanno concentrato ciguatossine nelle loro carni. Le zone endemiche sono localizzate tra le latitudini 35°N e 34°S, si stima che ogni anno circa 25000 persone vengano colpite da questa biointossicazione (Whittle et al., 2000; Lewis, 2001). Le concentrazioni maggiori di CTX sono state ritrovate nei barracuda, che sono i predatori principali nelle acque tropicali (Lewis, 2001). I sintomi della CFP possono essere confusi con quelli della sindrome diarroica, in quanto provoca disagi gastrointestinali, che subentrano dopo 2-12 ore dall'ingestione di pesce contaminato. I sintomi neurologici si manifestano dopo 24 ore e dipendono dalle caratteristiche del paziente, in quanto è stata osservata una diversa sintomatologia in individui che avevano ingerito la stessa quantità e gli stessi pesci. Il sintomo tipico dell'intossicazione è l' "inversione di temperatura", cioè la sensazione di calore al contatto con oggetti freddi (Tubaro et al., 2007). Le ciguatossine sono polieterei ciclici, liposolubili, termostabili (Fig. 7). Si suppone che siano dei prodotti ossidati della tossina precursore, meno tossica, detta gambiertossina, che viene metabolizzata dal fegato dei pesci, determinando la formazione di diversi analoghi.

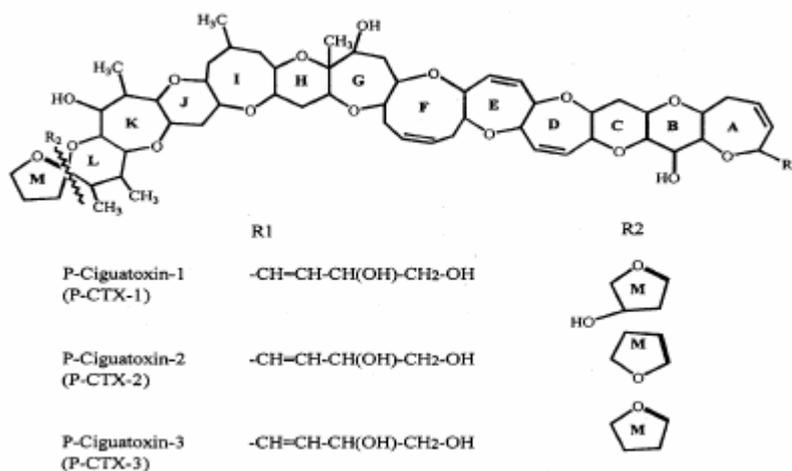


Fig. 7. Ciguatossine e analoghi.

Si sa poco del meccanismo d'azione di queste tossine. Le poche conoscenze sono derivate da studi tossicologici sul topo e dalle conoscenze della struttura chimica. La penetrazione nell'organismo potrebbe avvenire per le proprietà lipofile della molecola, che determinano una maggiore permeabilità delle membrane dei villi intestinali. Infatti nel topo si è notato un uguale assorbimento con somministrazione orale e con iniezione intraperitoneale. Studi recenti hanno messo in evidenza il passaggio della tossina da madre a figlio attraverso l'allattamento. Inoltre sono stati registrati casi di aborto e/o sviluppo prematuro del feto in donne che avevano consumato pesci contaminati per un periodo prolungato. Il meccanismo d'azione delle CTX sembra essere il legame ai canali voltaggio dipendenti delle giunzioni neuromuscolari, che determina un aumento della permeabilità del sodio. Ne consegue eccitazione delle membrane, mobilitazione del calcio intracellulare e infine lisi cellulare. Nei casi fatali di CFP, l'autopsia ha evidenziato lesioni al fegato e modificazione degli assoni dei neuroni (compressione e degenerazione mielinica) (Tubaro et al., 2007). È stato possibile isolare due analoghi: P-CTX (Oceano Pacifico) e C-CTX (Caraibi). Le maitotossine sono dei polietere ciclici, idrosolubili. Sono state ritrovate in ceppi diversi di *G. toxicus*. Attualmente ci sono ancora pochi studi che riguardano questa tossina e non è ancora ben chiaro quale sia il suo ruolo nella sindrome della ciguatera. Si suppone permetta un influsso di calcio attraverso canali non selettivi di una grande varietà di cellule, alterando un ampio spettro di processi calcio dipendenti determinando alla fine la morte cellulare. Gli esperimenti sul topo hanno evidenziato una LD50 di 500 ng/kg per iniezione intraperitoneale (Tubaro et al., 2007).

2. SPECIE OGGETTO DELLA RICERCA

2.1. CARATTERISTICHE GENERALI DEI DINOFLAGELLATI

In mare le dinoflagellate fotosintetiche hanno un ruolo fondamentale, assieme alle cianofitiche e alle diatomee, perché sono i maggiori produttori di ossigeno (circa il 70% dell'ossigeno atmosferico è prodotto dagli oceani) e di sostanza organica, che li pone alla base della catena alimentare.

Assumono un ruolo molto importante, considerando che un vario numero di specie può produrre tossine, pericolose anche per l'uomo, causare colorazione delle acque (rosso, giallo, bruno) e mucillagini, determinando gravi problemi agli organismi marini. La cellula tipica delle dinoflagellate (Fig. 8) è caratterizzata dalla presenza di una membrana esterna al di sotto della quale si osserva uno strato di vescicole appiattite (amphiesma), che possono contenere placche di cellulosa nelle dinoflagellate tectate o sono vuote nelle dinoflagellate nude. La presenza/assenza, il numero, la disposizione e la morfologia delle placche sono un carattere molto importante per la classificazione (Boni et al., 2005).

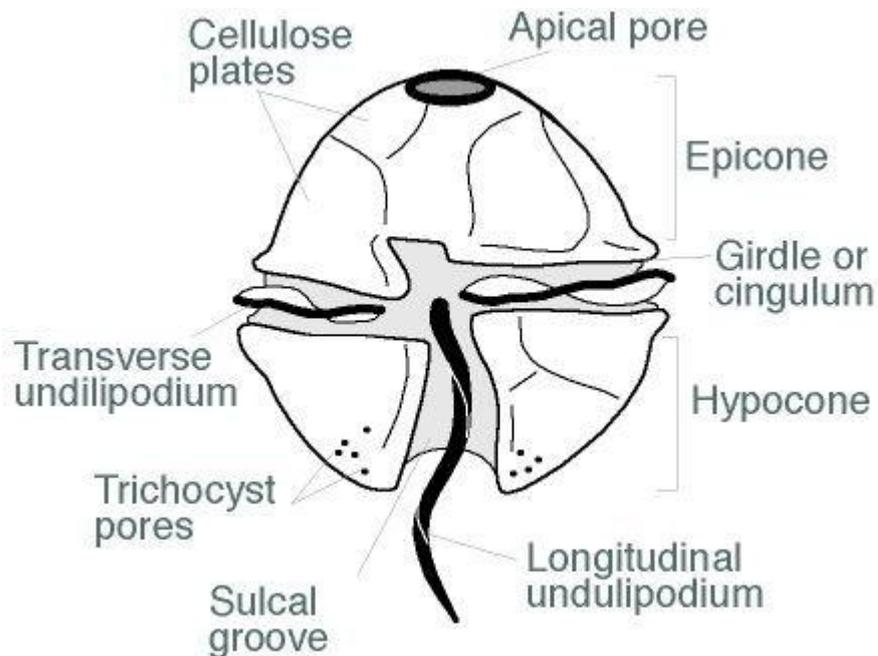


Fig.8. Schematizzazione di una cellula di dinoflagellata tectata.

Il pattern tecale divide la cellula in due parti ben distinte: l'epicono o epiteca è la parte superiore, che in alcune specie può essere molto ridotto; l'ipocono o ipoteca è la parte inferiore. Queste due parti sono divise da un setto trasversale detto cingolo. Nella parte ventrale della cellula è presente un setto longitudinale, detto solco, che ha inizio dal cingolo. Alcune specie presentano delle espansioni, simili a delle vele, che hanno origine dai due setti, probabilmente per favorire il galleggiamento. Sono presenti due flagelli che hanno origine da un poro flagellare, che si trova nel punto in cui convergono il cingolo e il solco. Un flagello decorre lungo il cingolo e ha il compito di determinare la direzione del movimento; l'altro sporge dal solco e consente la propulsione.

Vicino ai flagelli sono presenti dei vacuoli contrattili (pusule), con funzione osmoregolatrice. Inoltre all'interno della teca sono distribuite le tricocisti, degli organelli estroflessibili, che hanno una funzione di autodifesa. Il cloroplasto è delimitato da tre membrane, la più esterna deriva dal reticolo endoplasmatico. La clorofilla *a* è il pigmento fotosintetico principale, ma è presente anche clorofilla *c₂* e abbondanti carotenoidi (peridina e neoperidina). All'interno del cloroplasto è presente il pirenoide. I granuli di amido rappresentano la sostanza di riserva e si trovano nel citoplasma.

Oltre alle specie autotrofe, esistono altre dinoflagellate eterotrofi (parassiti, saprofiti o predatori). Altre ancora sono mixotrofe, cioè hanno un comportamento sia autotrofo che eterotrofo. La mixotrofia è piuttosto diffusa, perché questi organismi non sono in grado di sintetizzare alcuni nutrienti (es. le vitamine). Il ciclo vitale delle dinoflagellate presenta sia riproduzione asessuale che sessuale. La riproduzione sessuale è stata provata solo per alcune specie ma si ritiene che sia diffusa. Lo zigote è riconoscibile per le dimensioni maggiori e per la presenza di quattro flagelli, derivanti dall'unione dei gameti. La riproduzione sessuale ha la primaria importanza di dare origine a variabilità genetica, ma lo zigote può formare anche una struttura duratura e resistente all'ambiente esterno: la cisti. Questa è molto diversa, sia per morfologia che fisiologia, dalla cellula da cui ha avuto origine. La cisti è lo stadio dormiente di tali organismi. In genere si forma per superare un momento sfavorevole, come la carenza di nutrienti, specialmente azoto e fosforo, oppure variazioni di temperatura e/o salinità non ottimali. Inoltre è un ottimo meccanismo di diffusione della specie. Quando le condizioni ambientali ritornano favorevoli, la dinoflagellata si escisterà e inizierà la riproduzione vegetativa (Spector, 1984).

2.2. LA FAMIGLIA OSTREOPSIDACEAE

Le dinoflagellate bentoniche appartenenti alla famiglia Ostreopsidaceae fanno spesso parte delle comunità microalgali bentoniche sia in aree temperate che tropicali (Faust et al., 1996). Mentre il genere *Ostreopsis* è rappresentato da nove specie, distribuite principalmente nelle aree tropicali, spesso in associazione con *Gambierdiscus toxicus*, nel mar Mediterraneo solo due specie, *Ostreopsis siamensis* e *Ostreopsis ovata* sono state identificate negli anni '70 e '90, rispettivamente (Taylor, 1979; Tognetto et al., 1995). L'assenza di un regolare programma di monitoraggio delle comunità microfitobentoniche lungo le coste del Mediterraneo non consente di stabilire se e quando queste specie vi siano state introdotte (e.g. con acque di zavorra) o se erano già presenti a basse densità. Comunque sia è evidente che nell'ultima decade le fioriture di *Ostreopsis* sono divenute più frequenti, intense e largamente distribuite in molte aree del Mediterraneo (Vila et al., 2001; Aligizaki and Nikolaidis, 2006) facendo scaturire l'interesse della comunità scientifica e delle autorità gestionali. Di conseguenza studi tassonomici, genetici, ecologici e tossicologici su *Ostreopsis spp.* si sono intensificati durante questo periodo (Vila et al., 2001; Penna et al., 2005; Turki, 2005; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Ciminiello et al., 2006, 2008; Riobò et al., 2006; Aligizaki et al., 2008; Guerrini et al., 2009; Ledreux et al., 2009).

2.2.1. *Ostreopsis ovata* (Fukuyo, 1981)

Phylum Dinoflagellata

Classe Dinophyceae

Ordine Gonyaulacales (Saldarriaga et al. 2004) o Peridimiales

(GenBank-Taxonomy)

Famiglia Ostreopsidaceae

Genere *Ostreopsis*

Specie *O. ovata*

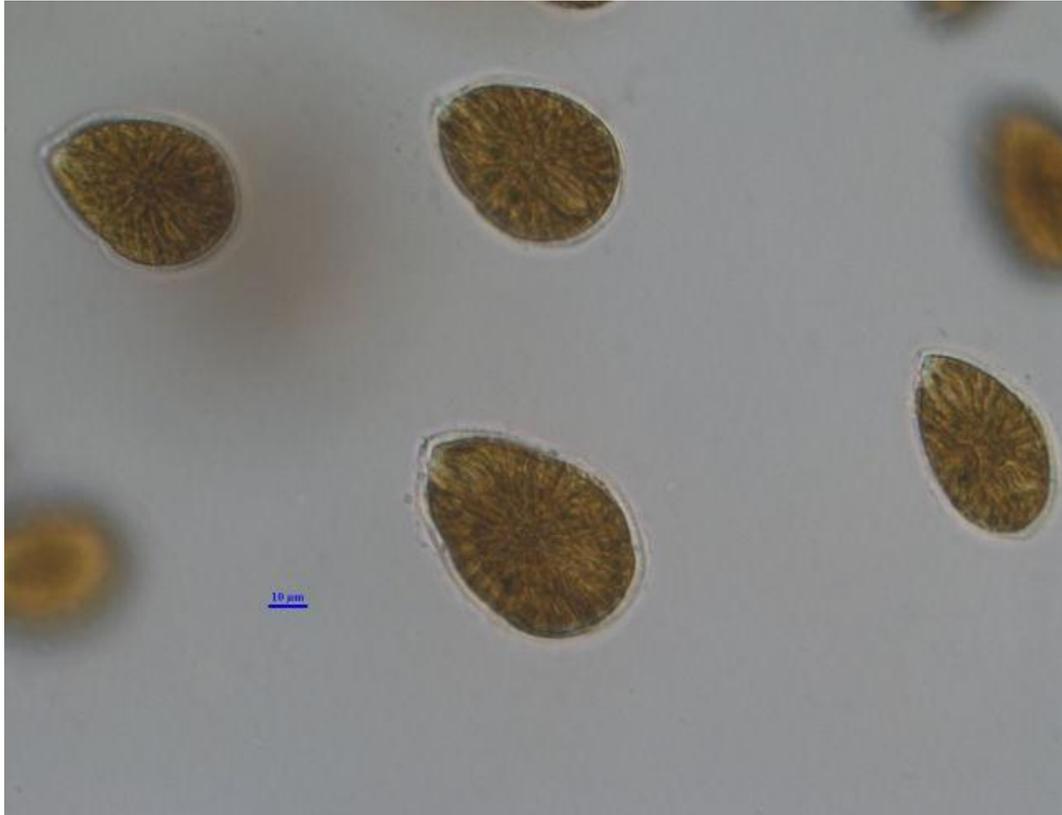


Fig. 9. Cellule di *O. ovata* osservate al microscopio rovesciato, ingrandimento 320x.

Le caratteristiche delle cellule sono le seguenti:

- forma ovoidale, appuntita verso il solco
- cingolo equatoriale, diritto e profondo; solco molto corto
- il Po è allungato (ca. 8 μm) ed eccentrico

Descrizione tassonomica: Le cellule hanno una forma simile ad una goccia, ovali e assottigliate nella parte ventrale. La teca è liscia e sulla sua superficie sono presenti uniformemente dei pori di 0,07 μm di diametro. *O. ovata* differisce dalle altre specie del genere *Ostreopsis*, perché le cellule sono più piccole, la teca è molto delicata e la placca del poro apicale è dritta e corta (Faust al., 1996). *O. ovata* è appiattita in maniera antero-posteriore. L'epiteca e l'ipoteca sono uguali in grandezza e la disposizione e la forma delle placche sono fondamentali nel riconoscimento. L'arrangiamento della teca è:

Po, 3', 7'', 6c, 6s, 5''', 1p, 2''''

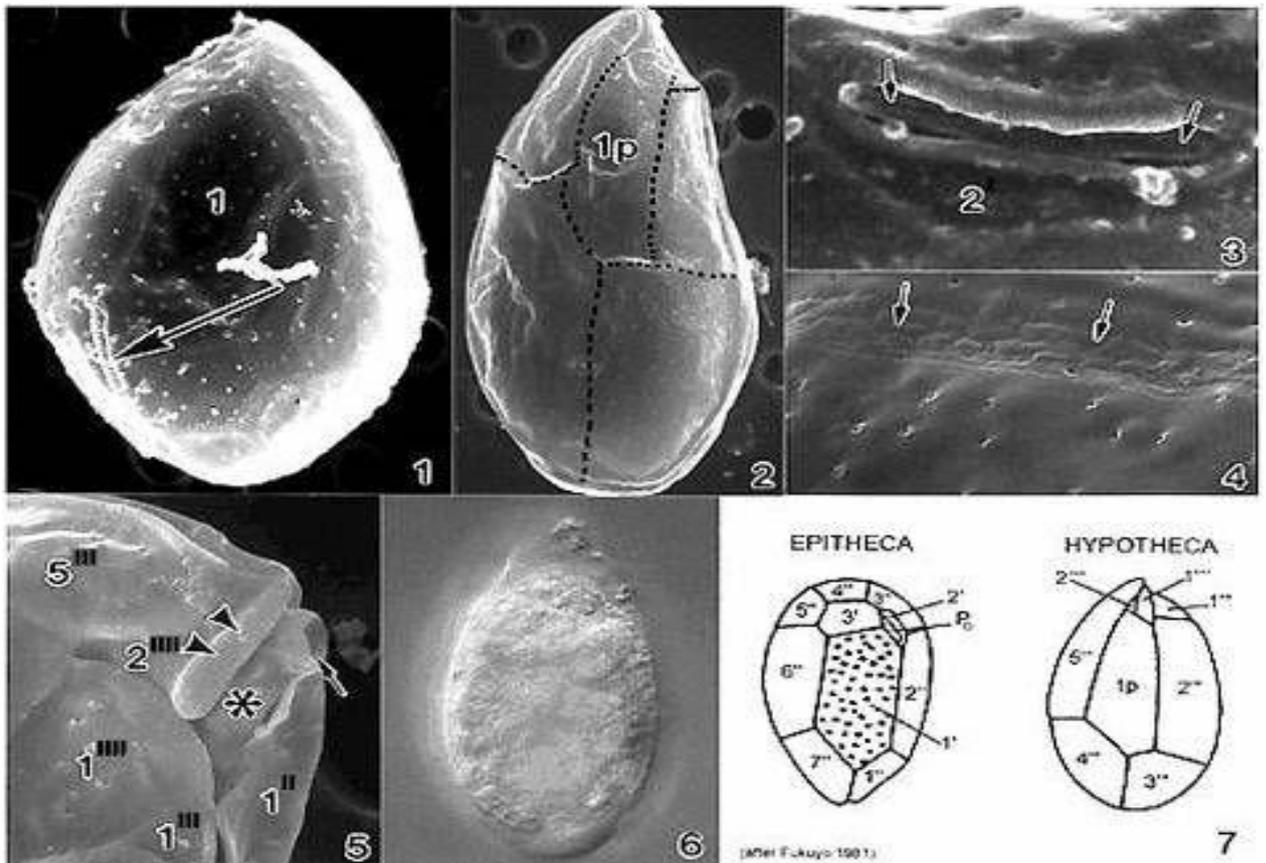


Fig. 9a. Arrangiamento tecale di *O. ovata* osservata a microscopio elettronico.

In particolare *Ostreopsis ovata*:

- È la più piccola delle specie
- Ha la teca molto sottile e delicata, facile alla degradazione
- La prima placca apicale è lunga ed esagonale

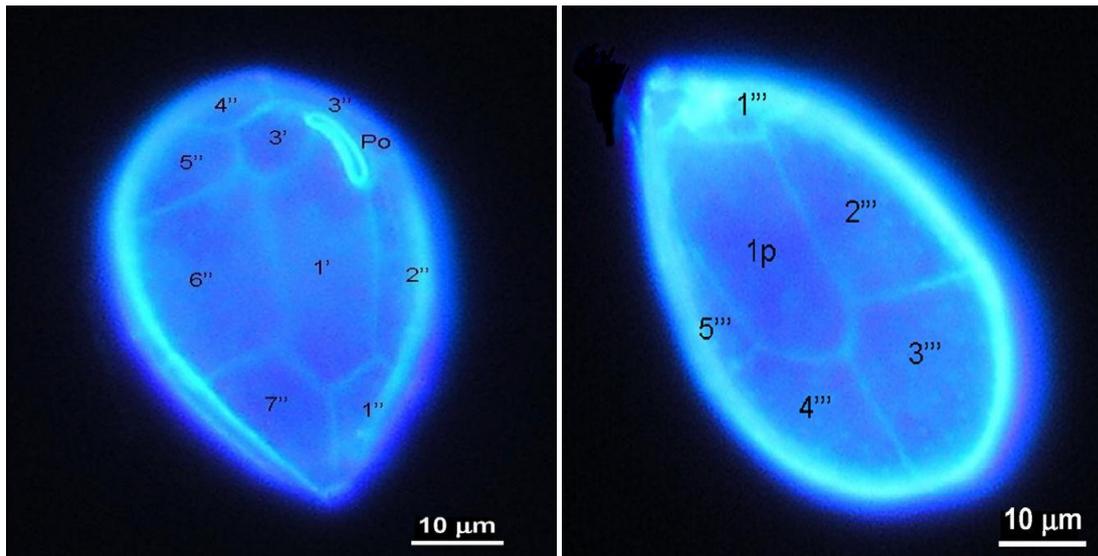


Fig. 10. Arrangiamento tecale dell'epiteca e dell'ipoteca di *O. ovata* osservata in fluorescenza.

Ecologia: *O. ovata* è una dinoflagellata mixotrofa in quanto presenta sia nutrizione autotrofa che eterotrofa (Faust et al., 1998): a bassa turbolenza libera sostanze esopolimeriche dal poro ventrale formando cordoni mucillaginosi (reticoli) che servono come la tela di ragno, formando un biofilm che imprigiona piccoli invertebrati (Barone and Prisinzano, 2006). Si nutre di altre microalghe, cianobatteri e ciliati attraverso il poro ventrale che può allargarsi e contrarsi. Grazie all'elevata elasticità della teca, *O. ovata* può aumentare il suo volume cellulare del 50-70% dopo l'ingestione. Degli organismi del genere *Ostreopsis* alcuni sono planctonici, ma la maggior parte è bentonica ed epifita di fanerogame marine (e.g. *Posidonia oceanica*, *Thalassia testudinum*), di talli di macroalghe rosse e brune, soprattutto *Feoficee* e *Rodoficee*, in misura minore di *Cloroficee*, inoltre di conchiglie di mitili e di invertebrati bentonici (Guerrini et al., 2009), anche se è possibile trovarle su substrati rocciosi, sabbie e pozze di marea (Monti et al., 2007). Predilige acque poco profonde, con basso idrodinamismo (Faust et al., 1995). *O. ovata* vive in biocenosi principalmente con altre dinoflagellate quali *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima*, *Gambierdiscus toxicus*, *Amphidinium* sp. e con la diatomea centrica *Coscinodiscus* sp.

2.2.2 *Coolia monotis* (Meunier, 1919)

Phylum **Dinoflagellata**

Classe **Dinophyceae**

Ordine **Gonyaulacales** (Saldarriaga et al. 2004) o **Peridinales**
(GenBank-Taxonomy)

Famiglia **Ostreopsidaceae**

Genere ***Coolia***

Specie ***C.monotis***

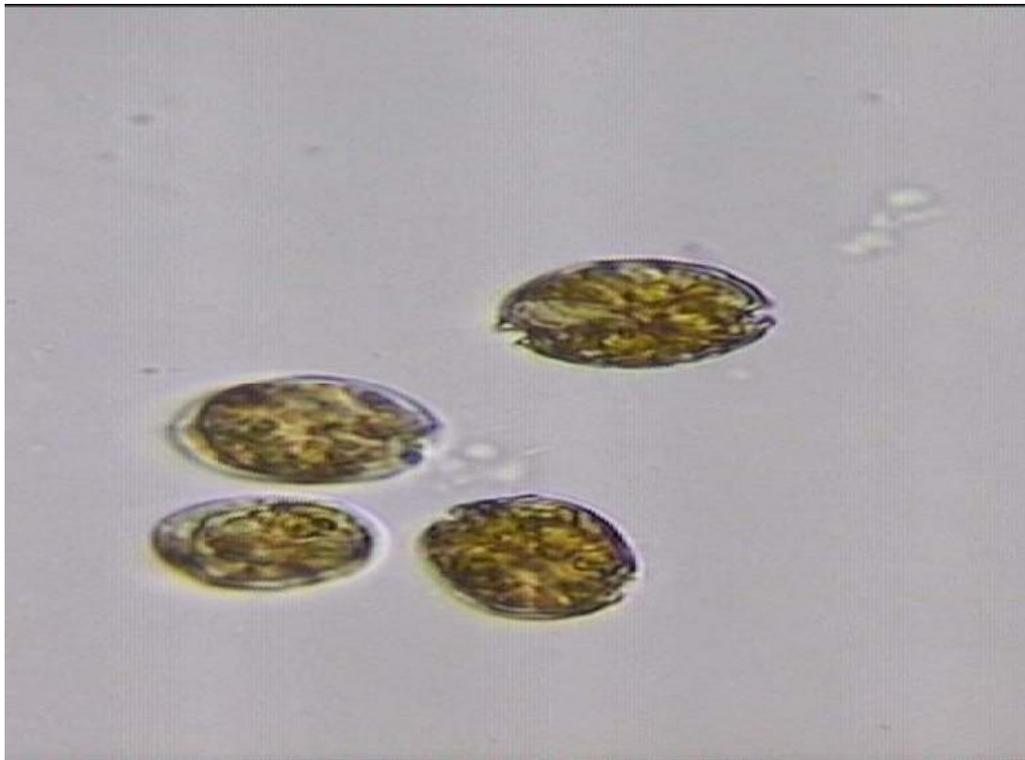


Fig. 11. Cellule di *C.monotis* osservate al microscopio rovesciato, ingrandimento 320x.

Descrizione tassonomica: le specie appartenenti a questo genere sono compresse antero-posteriormente. Un carattere distintivo è la forma e dimensione della placca apicale, su cui è presente il poro (Po) (Faust 1992). Le cellule di *Coolia monotis* sono compresse, tondeggianti e di forma lenticolare, l'asse è obliquo. L'epiteca è leggermente più piccola dell'ipoteca. La superficie tecale è costituita di placche ben definite delineate da una rete di bande, si presenta liscia e costellata da larghi pori lisci con margini uniformi. La dimensione delle cellule varia da 25 a 45 μm in diametro e da 30 a 50 μm in lunghezza (Fukuyo 1981; Dodge 1982;

Tolomio & Cavolo 1985b; Faust 1992). I pori marginali sono presenti su entrambi i lati del cingolo orlato (Faust 1992). L'arrangiamento della teca è:

Po, 3', 7'', 6c, 6s, 5''', 2''''

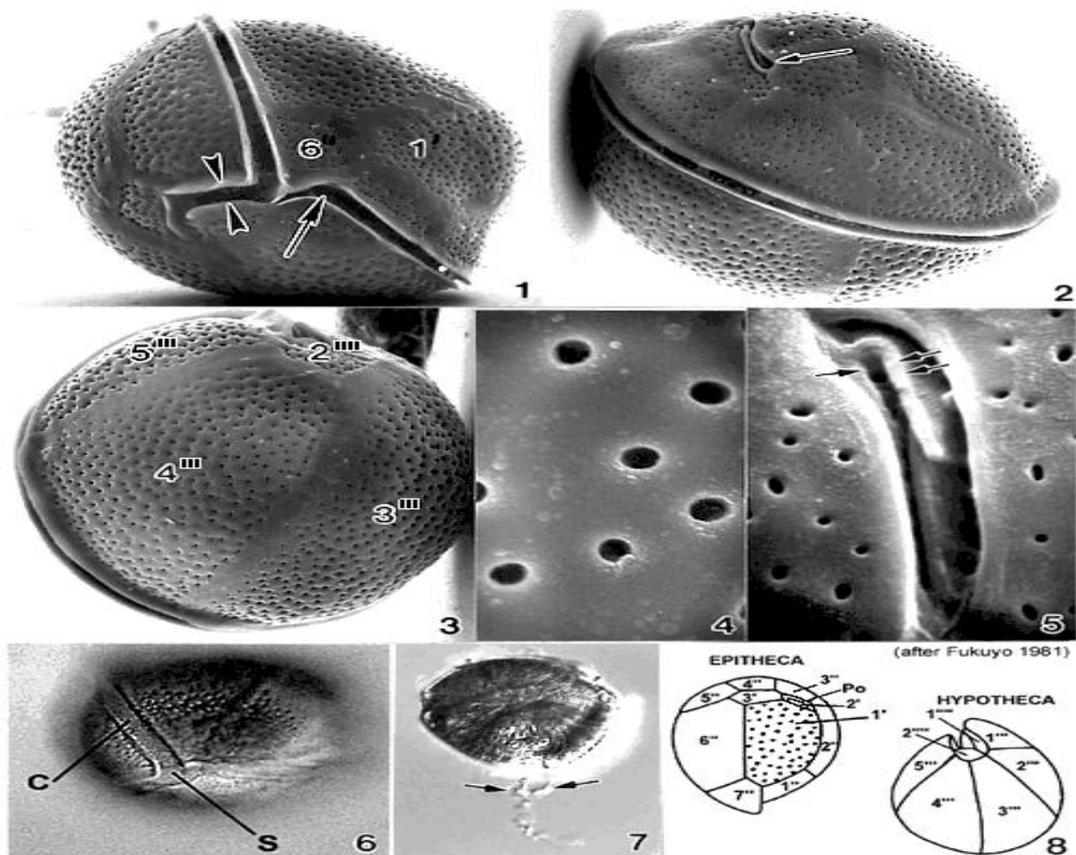


Fig. 12. Arrangiamento tecale di *C. monotis* osservata al microscopio elettronico.

Caratteristiche di questa specie sono:

- **Cellula piccola (lunghezza 23-40µm) di forma lenticolare, con asselungitudinale obliquo. Epiteca più piccola dell'ipoteca.**
- **Cingolo equatoriale, diritto e profondo**
- **Solco corto, diritto e scavato**
- **Apice spostato dorsalmente**
- **Antapice spostato ventralmente**
- **Po eccentrico nella parte dorsale sinistra**

- **Cloroplasti giallo-bruni**

Ecologia: *C. monotis* è una specie neritica diffusa in tutto il globo, in acque temperate e tropicali (Steidinger and Tangen, 1997); è stata osservata in campioni di plankton, in habitat salmastri, pozze di marea e persino foreste di mangrovie, ma è più comune nelle acque calde e poco profonde dell'oceano Pacifico, del mar Mediterraneo e del mar dei Caraibi (Faust, 1992; Rhodes and Thomas, 1997). Anch'essa come *Ostreopsis* è associata a fenomeni di irritazione della pelle (Sansoni et al., 2003) nonché ad intossicazioni alimentari, tra cui la ciguatera, in seguito alla produzione di tossine che arrivano all'uomo trasmettendosi lungo la catena trofica (Adachi and Fukuyo, 1979; Yasumoto and Satake, 1998). Si riproduce asessualmente per fissione binaria. La riproduzione sessuale è stata documentata per questa specie: i gameti si fondono e formano un planozigote (Faust 1992).

Tossicità: Questa specie è considerata tossica (Nakajima et al. 1981); produce cooliatossina, un composto neurotossico analogo della yessotossina (Holmes et al. 1995, Rhodes & Thomas 1997). **c** E' stata inoltre identificata come responsabile di tossicità (sintomi neurotossici) nelle ostriche (*Crassostrea gigas*) in Rangauna Harbour, Northland, New Zealand (Rhodes & Thomas 1997).

2.3. DISTRIBUZIONE LUNGO LE COSTE ITALIANE

Lungo le coste italiane, alte densità di *O. ovata*, spesso veri e propri blooms sono stati riportati nel mar Ligure (Abbate et al., 2007; Mangialajo et al., 2008), mar di Sardegna (Lugliè, pers. comm.), Sicilia (Barone, 2007), mar Tirreno (Sansoni et al., 2003; Simoni et al., 2004; Barone and Prisinzano, 2006; Congestri et al., 2006; Bianco et al., 2007; Zingone, pers. comm.) mar Ionio (Caroppo et al., 2009, Giacobbe, pers. comm.) e Sud Adriatico (Bottalico et al., 2002; Di Turi et al., 2003; Ungaro et al., 2005). Solo dal 2006 *Ostreopsis ovata* è stata individuata anche lungo le coste rocciose del nord Adriatico (Monti et al., 2007; Totti et al., 2007a). Inoltre è stato osservato in diverse aree del Mediterraneo (Tognetto et al., 1995; Vila et al., 2001; Simoni et al., 2004; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Congestri et al., 2006; Monti et al., 2007) che *O. ovata* compare in associazione con altre dinoflagellate bentoniche come *Coolia monotis* e *Prorocentrum lima*, il chè è confermato anche da uno studio nel nord

Adriatico, vicino ad Ancona, dove durante tutto il periodo di campionamento e in tutti i campioni prelevati, *C. monotis* and *P. lima* sono stati riscontrati con abbondanze di tre ordini di grandezza inferiori a *O. ovata* (Totti et al., 2010) indicando differenti pattern temporali. In particolare *Ostreopsis spp.* predilige il periodo che va dalla metà dell'estate al tardo autunno, mentre *C. monotis* si ritrova anche nei mesi invernali e primaverili (Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Simoni et al., 2004).

2.4. FATTORI CHE INFLUENZANO UN BLOOM

2.4.1 PARAMETRI AMBIENTALI

2.4.1.1. Idrodinamismo

L'idrodinamismo è un parametro ambientale molto importante nel regolare l'abbondanza e la distribuzione di *O. ovata* e *C. monotis*, nonché nel determinare la fine di un bloom algale. Totti et al. (2010) hanno rilevato nella zona del monte Conero, che in media le abbondanze di *O. ovata* sono significativamente superiori in litorali riparati dal moto ondoso piuttosto che in siti esposti, indipendentemente dal tipo di substrato, ipotesi confermata anche da Mangialajo et al. (2008) nello specchio di mare prospiciente Genova. Anche *C. monotis* sembra prediligere condizioni di basso idrodinamismo, come riportato da Rhodes and Thomas (1997), Aligizaki and Nikolaidis (2006) e Armi et al. (2010).

2.4.1.2. Substrato

Oltre alle macroalghe, che sono il substrato più comunemente investigato, *Ostreopsis spp.* e *C. monotis* possono crescere su una varietà di substrati bentonici, incluse le angiosperme marine (Turki, 2005; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Turki et al., 2006; Battocchi et al., 2008), invertebrati (Bianco et al., 2007; Totti et al., 2007a), rocce (Bottalico et al., 2002; Totti et al., 2007a) e sedimenti molli (Vila et al., 2001).

2.4.1.3. Profondità

Studi precedenti indicano che la maggior parte delle dinoflagellate bentoniche epifitiche si trovino ad una profondità compresa tra i 0.5 e i 3 metri, probabilmente in conseguenza alla

radiazione luminosa che penetra (Bomber, 1985; Carlson and Tyndall, 1985; Taylor, 1985; Mitchell, 1985; Bomber et al., 1988). Uno studio di Morton et al., (1992) effettuato su campioni prelevati nelle isole Keys e fatti crescere in colture controllate, ha riportato che *O. siamensis* e *O. heptagona* hanno un optimum ad un'irradianza pari a 4000 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ (il 10% circa dell'energia disponibile a livello della superficie marina in un giornata perfettamente soleggiata), mentre per *C. monotis* è leggermente superiore (5300 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$). Esistono pochi studi in letteratura che correlano la profondità con la crescita di *Ostreopsis ovata*; tuttavia lungo la costa marchigiana è stata riscontrata una maggior densità di cellule ad una profondità inferiore ai 3 metri piuttosto che ad una maggiore (Totti et al., 2010).

2.4.1.4. Salinità

Diversi studi descrivono l'effetto della salinità sulla crescita e tossicità delle dinoflagellate planctoniche (Gedaria et al., 2007; Guerrini et al., 2007; Lekan and Tomas, 2010; Lim and Ogata, 2005; Maier Brown et al., 2006; Paz et al., 2006). Per quanto riguarda le dinoflagellate bentoniche tale rapporto è stato osservato in vari studi sul campo effettuati su bloom in aree tropicali. Basse abbondanze di dinoflagellate tossiche dei generi *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum* e *Coolia* sono state riscontrate alla foce di un fiume cubano, suggerendo una correlazione positiva tra crescita e diminuzione della salinità (Delgado et al., 2006). Al contrario, nelle Isole Vergini, i massimi di popolazione bentonica erano correlati con il periodo di maggiori precipitazioni. In uno studio di laboratorio *O. heptagona* e *O. siamensis* isolate dalla Florida hanno mostrato una crescita ottimale ad una salinità di 33, un valore più basso di quello tipicamente riscontrato nelle acque oceaniche (36); caratteristica condivisa da molte delle specie dinoflagellate bentoniche coesistenti, tra cui *C. monotis* (Morton et al., 1992) anche se quest'ultima si è dimostrata essere una specie eurialina, visto che nella zona del golfo di Tunisi ha generato recentemente bloom in condizioni di salinità elevata (Armi et al., 2010). La salinità misurata nel nord-ovest Mediterraneo durante le fioriture di *Ostreopsis* spp. riportavano valori alti, attorno a 37-38 (Vila et al., 2001; Mangialajo et al., 2008), simili a quelli misurati nel nord Adriatico, (Monti et al., 2007; Pistocchi, misurazioni personali) in accordo con il fatto che tuttora non vi sia stata riscontrata la sua presenza vicino al delta del Po (Pistocchi et al., 2010).

Tuttavia altri studi (Gedaria et al., 2007; Lim and Ogata, 2005; Maier Brown et al., 2006) hanno ottenuto risultati non uniformi, portando alla conclusione che la salinità ricopre un ruolo di secondaria importanza nell'influenzare la crescita ed il contenuto di tossine. Un ceppo adriatico di *O. ovata* è stato coltivato a salinità variabili da 26 a 40 (Pezzolesi et al., in preparazione). I risultati preliminari sostengono che la crescita è influenzata solo lievemente

dalla salinità, seppur tassi più alti si sono avuti in corrispondenza di valori di salinità più alti (36-40).

2.4.1.5. Nutrienti

E' risaputo che la disponibilità di nutrienti è un importante fattore ambientale nel controllare lo sviluppo e l'inizio, nonché l'intensità, di un bloom di alghe dinoflagellate bentoniche. Diversi studi hanno suggerito un collegamento tra aumento dei nutrienti e microalghe planctoniche tossiche (e.g. Anderson et al., 2002; Collos et al., 2004; Parsons et al. 2002), mentre i rapporti tra dinoflagellate bentoniche/epifitiche potenzialmente tossiche e nutrienti sono meno chiari. Per quanto riguarda *O. ovata* e più generalmente le Ostreopsidaceae, le ricerche si sono focalizzate sulla loro tossicità, area, e potenziali rischi sulla salute umana (e.g. Aligizaki et al., 2008; Guerrini et al., 2010; Ciminiello et al., 2008; Lenoir et al., 2004), mentre il ruolo dei nutrienti o del loro sbilanciamento sulla crescita e tossicità di *Ostreopsis* spp. è quasi sconosciuto. Uno dei primi studi in Mediterraneo è stato condotto nell'ultimo decennio da Vila et al., (2001); essi scoprirono che la popolazione epifitica di dinoflagellate associate alle macroalghe era dominata da *Ostreopsis* spp., accompagnata da *C. monotis* e *P. lima*. Le dinoflagellate seguivano un chiaro andamento stagionale, tuttavia non furono rilevate connessioni significative tra organismi epifitici e nutrienti. Pertanto, il ruolo dei nutrienti nel sostenere elevate biomasse di dinoflagellate è ancora incerto. Comunque altri autori puntano l'attenzione sull'importanza dell'input di nutrienti (se precedentemente limitanti) nell'intensificare la crescita delle microalghe; in altre parole, l'aumento del carico di nutrienti (e/o una diminuzione della pressione erbivora) può aumentare il substrato disponibile per le dinoflagellate tossiche, incrementando i loro impatti.

Infatti, nell'area marina costiera del golfo di Tunisi (sudovest Mediterraneo), caratterizzata da un'alta concentrazione di nitrati in tutto il corso dell'anno, Armi et al. (2010) hanno osservato che la crescita di *C. monotis*, stimata in concentrazione di cellule nella colonna d'acqua, è strettamente correlata con la concentrazione di ammonio e di nitrati.

Recentemente, un lavoro sugli effetti di differenti condizioni di nutrienti su un ceppo adriatico di *O. ovata* (Vanucci et al., in preparazione), ha messo in evidenza che condizioni non bilanciate interessano il tasso di crescita, il volume cellulare, il rendimento fotosintetico e la produzione di tossine. In particolare il contenuto di tossine decresce significativamente in N e P limitazione. Gli effetti maggiori sono stati registrati in N limitazione. Tale andamento risulta differente da quello di *P. lima*. Questi risultati indicano chiaramente che, anche se *O. ovata* e *P. lima* sono spesso trovati in associazione nelle comunità bentoniche, possono

differire per quanto riguarda il fabbisogno di nutrienti ottimale per una fioritura o per la tossicità.

2.4.1.6. Temperatura

Diversi studi hanno preso in considerazione l'importanza della temperatura dell'acqua, che è generalmente considerata uno dei principali fattori che regolano lo sviluppo di un bloom algale (Tognetto et al., 1995; Di Turi et al., 2003; Sansoni et al., 2003; Simoni et al.; 2003, 2004; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Congestri et al., 2006; Abbate et al., 2007; Granéli et al., 2008; Mangialajo et al., 2008). Questi autori hanno suggerito che alte temperature (generalmente tra i 24 e i 26°C) associate a basso idroinamismo e alta pressione atmosferica, possano favorire la proliferazione di *O. ovata*. Da uno studio di Morton et al. (1992) su colture di 8 specie di dinoflagellate associate con ciguatera nelle isole Keys, in Florida, risulta che *O. siamensis* e *O. heptagona* mostravano una crescita migliore ad una temperatura di 25°C, mentre *C. monotis* ha un optimum a 29°C. Tuttavia i risultati di Totti et al. (2010) per l'alto Adriatico indicano che l'aumento di temperatura non giochi un ruolo così fondamentale, poiché il bloom del 2007 lungo la riviera del Conero si era sviluppato quando le temperature erano in calo (tra 21.8 e 16.8°C), così come riportato per il golfo di Trieste (Monti et al., 2007) e anche da Vila et al.(2001), che non ha osservato nessuna chiara correlazione tra le dinoflagellate epifittiche e la temperatura dell'acqua lungo la costa catalana.

Questi dati suggeriscono che i ceppi di *Ostreopsis ovata* di diverse aree possono esibire diverse caratteristiche ecofisiologiche, come recentemente suggerito da Guerrini et al., (2010). Infatti il ceppo di Ancona oggetto dello studio ha mostrato una miglior crescita ad una temperatura più bassa (20°C), il ceppo di Latina non ha segnalato differenze tra i 20 e 25°C, mentre il ceppo di Bari predilige una temperatura di 25°C piuttosto che 20°C.

Da uno studio di Graneli et al. (2010) su un ceppo tirrenico di *O.ovata* prelevato nella zona del monte Argentario (Toscana) e coltivato in laboratorio, emerge che la crescita migliore si ha a temperature più alte (26-30°C) sia per quanto riguarda il tasso di crescita che il numero massimo di cellule.

Simoni et al. (2004) sottolineano in un monitoraggio sul litorale toscano, la capacità di *O. ovata* e *C. monotis* (Faust, 1992) di produrre cisti di resistenza (forme immobili avvolte da una membrana ispessita), quando la temperatura diminuisce, difficilmente rilevabili nell'ambiente naturale, che poi schiudendosi in condizioni favorevoli causano improvvisi innalzamenti nel numero di dinoflagellate o veri e propri bloom; comportamento confermato anche in laboratorio, in cui in seguito ad abbassamento di temperatura ed invecchiamento

della coltura in vitro si può avere la produzione di forme sferiche avvolte da un involucro gelatinoso identiche a quelle osservate in *O. siamensis* (Pearce et al. 2001; Simoni et al., 2003).

2.4.2 FATTORI BIOLOGICI

E' importante sottolineare, che ceppi differenti di dinoflagellate della stessa specie, provenienti da zone diverse, possano differire nelle caratteristiche ecofisiologiche, come già accennato nei paragrafi precedenti. Uno studio di Guerrini et al. (2010) che pone a confronto colture del ceppo adriatico (zona di Numana, ceppo OOAN0601) con quelle del ceppo tirrenico (Lazio, Porto Romano, ceppo OOTL0602), mette in luce che i due ceppi mostrano una velocità di crescita bassa, 0.37 e 0.32 day⁻¹, rispettivamente, (anche se misurazioni successive riportano valori più alti per il ceppo adriatico, Pezolesi et al., in preparazione), presentano un andamento simile, con una durata della fase esponenziale di circa 10 giorni, seguita da una fase stazionaria che si protrae fino a 28-30 giorni; il ceppo adriatico raggiunge un numero massimo di cellule in fase stazionaria più elevato rispetto al tirrenico (10,000 cell/ml contro 8,000). Inoltre i due ceppi differiscono per forma e anche biovolume, con il ceppo adriatico (avente misure simili a quelli di altri ceppi adriatici, e.g. golfo di Trieste e costa dell'Istria, Monti et al., 2007) largo quasi due volte quello tirrenico; nonostante questo essi appaiono geneticamente piuttosto uniformi.

Altri fattori fondamentali nel determinare le fioriture algali sono i fenomeni di interazione con i batteri e quelli di competizione/allelopatia che si instaurano tra le diverse specie fitoplanctoniche (vedi cap. 4 e 5).

3. LA PALITOSSINA

Questa molecola non proteica è una delle più potenti tossine naturali conosciute di origine marina. La PLTX è stata 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).

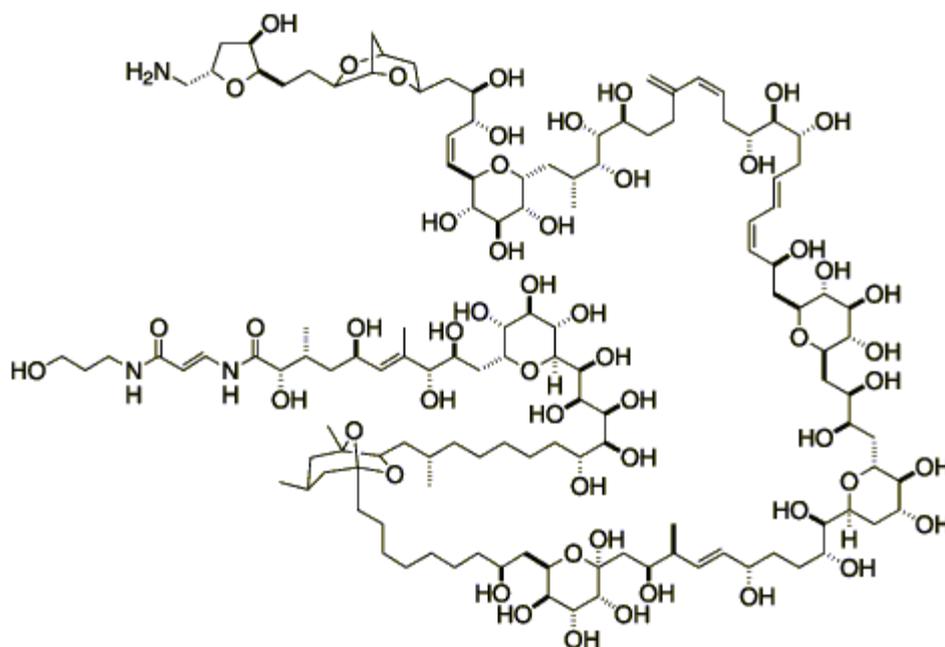


Fig. 13. Palitossina.

La palitossina è un polietere policiclico (Fig. 13). La sua grandezza e la sua complessità la rende la più lunga catena di atomi di carbonio conosciuta, che esiste in natura. La caratteristica principale della PLTX è l'attività di emolisi ritardata. Questa si può mettere in evidenza con eritrociti di mammifero, è causata anche da piccole dosi di PLTX, ma si manifesta solo dopo 4 ore di incubazione a 37°C. Un altro aspetto specifico è che l'emolisi può essere neutralizzata dalla ouabaina (Riobò et al., 2006). Studi recenti di citotossicità hanno messo in evidenza che la palitossina ha come sito di azione la pompa Na,K-ATPasi. Da questi esperimenti è emerso che l'ouabaina, in dovuta concentrazione, si lega alla subunità catalitica della pompa Na,K-ATPasi, determinando l'inibizione dell'attività della PTX. Si suppone però che il sito di azione della PLTX non sia la subunità catalitica della pompa, ma sia nei suoi pressi, quindi l'inibizione è dovuta a ingombro sterico. Inoltre si ipotizza che l'azione della palitossina, nei confronti della pompa, avvenga all'interno della membrana

plasmatica, dato che la molecola della tossina possiede regioni lipofile e idrofile (Vale-Gonzales et al., 2007).

3.1. TOSSICITA' DI *O. ovata*

Lungo il litorale genovese, nell'estate del 2005 una fioritura estesa determinò in circa 200 persone sintomi come rinorrea, tosse, febbre, broncocostrizione con dispnea (Ciminiello et al., 2006), potenzialmente riconducibili a una palitossina putativa estratta da campioni di *O. ovata*. Nel 2008, Ciminiello et al hanno appurato che *O. ovata* produce palitossina putativa, oltre ad elevati quantitativi di ovatossina-a; i blooms algali sono stati in diversi casi associati con effetti nocivi alla salute umana, come difficoltà respiratorie, congiuntiviti e irritazioni della pelle (Gallitelli et al., 2005; Vivaldi et al., 2007) e anche con la mortalità di organismi bentonici (Di Turi et al., 2003; Simoni et al., 2003; Shears and Ross 2009). I saggi di tossicità condotti con *Artemia salina* hanno evidenziato una correlazione significativa tra il numero di cellule di *O. ovata* contate sulle macroalghe e il numero di crostacei morti in 24h, mentre le correlazioni tra mortalità e concentrazioni di *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima* e *Amphidinium sp* non sono risultate significative (Simoni et al., 2004). Questo è stato confermato anche da altri studi su *C. monotis* in Mediterraneo (Riobò et al., 2004; Penna et al., 2005), mentre non è così per ceppi di altre aree, ad esempio quella asiatica (Nakajima et al., 1981; Yasumoto et al., 1987; Holmes e al., 1985; Usami et al., 1995; Rhodes and Thomas, 1997; Rhodes et al., 2000; Tamiyana et al., 2003; Lenoir et al., 2004). L'incremento della positività del Cigua-Check (test immunologico ELISA, metodo colorimetrico), eseguito sulla carne dei molluschi e dei pesci durante le fioriture dei dinoflagellati potenzialmente tossici, non è significativo. Questi risultati mostrano che i molluschi bivalvi e i pesci concentrano poco i composti ciguasimili (Simoni et al., 2004). Le stesse concentrazioni, riscontrate anche precedentemente, non hanno dimostrato tossicità sul topo nei test eseguiti dal Centro di Ricerche marine di Cesenatico, centro di Riferimento Nazionale per le tossine algali (Simoni et al., 2002).

3.2. METODI PER LA DETERMINAZIONE DELLA PLTX

L'individuazione e la determinazione della palitossina in campioni biologici può essere effettuata sia con metodiche analitiche che con saggi biologici (Tan and Lau, 2000); comunque è spesso necessario utilizzare una combinazione di metodi per confermare la presenza della tossina.

Il metodo più semplice è il saggio biologico sugli animali, che consiste nell'iniettare un campione contaminato nel peritoneo di un topo, misurandone poi il tempo di morte. La potenza letale è espressa in mouse units (MU), dove 1 MU è il quantitativo di tossina necessario per uccidere un topo di 20g in 4 ore. In base al valore di LD₅₀ riportato per la palitossina di 450 ng/kg, 1 MU è stimata essere 9 ng di palitossina (Onuma et al., 1999). Anche se i topi reagiscono all'iniezione esibendo diversi sintomi caratteristici prima della morte, il saggio sul topo non è in grado di individuare inequivocabilmente l'agente causativo. Saggi alternativi si basano su proprietà funzionali della palitossina e comprendono test di citotossicità in vitro (Yasumoto et al., 1995), emolisi ritardata (Habermann et al., 1981), e anticorpi che neutralizzano l'emolisi (Bignami, 1993). Tutti questi test sono molto sensibili, ma solitamente risultati positivi necessitano ulteriori conferme da metodi analitici.

3.2.1. METODICHE ANALITICHE: LC-MS



Fig. 14. Esempio di strumento per analisi LC-MS.

Un metodo per la determinazione del quantitativo di palitossina, basato sulla combinazione di cromatografia liquida e spettrometria di massa (LC-MS), è stato sviluppato da Ciminiello e colleghi (Ciminiello et al., 2006, 2008) per analizzare il profilo tossico di *O.ovata*.

La cromatografia liquida con ionizzazione ad elettrospray, in tandem con la spettrometria di massa (LC-ESI-MS/MS) ha un grande potenziale per analisi rapide, sensibile e univoche sull'identificazione di palitossina in materiali contaminati. Infatti la capacità dell' ESI di produrre sottomolecole cariche in condizioni blande ha consentito la discriminazione di un composto ad alto peso molecolare come la palitossina, estendendo le limitatezze tipiche dello spettrometro di massa per m/z. I campioni di plancton raccolti lungo le coste genovesi durante i bloom del 2005 e 2006 così come colture in laboratorio di *O. ovata* sono state analizzate con questo procedimento e tutti manifestavano la presenza di 2 tossine: palitossina putativa (pPLTX) e ovatossina-a (OVTX-a) (fig. 15), un composto palitossina-simile mai riportato prima. OVTX-a (MW = 2647.5; C₁₂₉ H₂₂₃ N₃ O₅₂) presenta due atomi di ossigeno in meno di PLTX (MW = 2679.5; C₁₂₉ H₂₂₃ N₃ O₅₄) e lo stesso gruppo responsabile della tossicità. Sia nei campioni naturali che nelle colture la tossina di gran lunga più sintetizzata era OVTX-a, come confermato anche da Guerrini et al. (2010) sul ceppo tirrenico e adriatico; inoltre, sorprendentemente, i due composti venivano prodotti dalle colture nello stesso rapporto che nei campioni naturali, con un contenuto di pPLTX e OVTX-a di 0.55 e 3.85 pg/cell, rispettivamente (Ciminiello et al., 2006, 2008). Nessun'altra tra le ficotossine più comuni in Mediterraneo, come acido okadaico, spirolidi, azaspiracidi, yessotossine, tossine PSP e acido domoico (Ciminiello et al., 2004, 2006), e nemmeno degli altri analoghi della palitossina prodotte da altre specie di *Ostreopsis*, come ostreocina-D (Usami et al., 1995; Ukena et al., 2002) e mascarenotossine (Lenoir et al., 2004) sono state riscontrate in *O. ovata*.

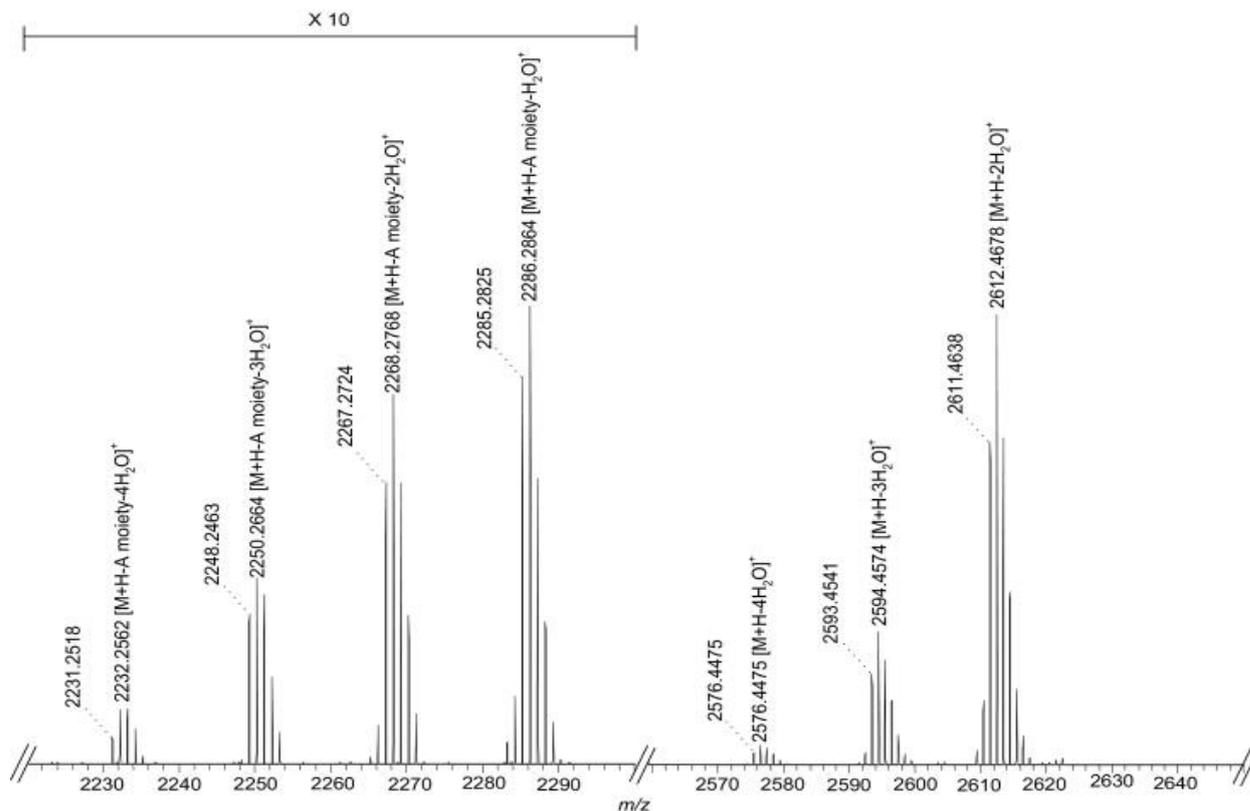


Fig 15. Mass scale expansions of the m/z 2220–2300 and m/z 2560–2650 regions of the HR product ion spectrum of ovatoxin-a acquired on the linear ion trap hybrid FTMS instrument. Dotted lines indicate the mono-isotopic ion peaks.

Recentemente la presenza di pPLTX e OVTX-a è stata confermata, inoltre tramite LC_MS ad alta risoluzione (HR) si sono ritrovati negli estratti di colture di *O. ovata* quattro nuovi composti palitossina-simili: OVTX-b, -c, -d, -e, che insieme rappresentano circa il 46% del contenuto totale di tossine (Ciminiello et al., 2010) (Fig. 15).

3.3. FATTORI CHE INFLUENZANO LA TOSSICITA'

3.3.1 PARAMETRI AMBIENTALI

In generale variazioni nel contenuto di tossine sono associate a stress causato da fattori di disturbo fisiologici (Johansson and Granéli, 1999; Granéli and Flynn 2006), come pH (Hwang and Lu, 2000), temperatura (Ogata et al., 1989; Ashton et al., 2003), salinità (Parkhill and

Cembella, 1999; Maier Brown et al., 2006; Gedaria et al., 2007), luce (Greene et al., 2000; Hwang and Lu, 2000) e carenza di nutrienti (Graneli and Johansson, 2003b).

3.3.1.1. Nutrienti

Al contrario di *Karenia brevis*, in cui in N- e P- limitazione la tossicità delle cellule all'incirca triplica (Greene et al., 2000), per *Ostreopsis* sia N- che P-limitazione portano ad un calo nella tossicità delle cellule. Tale risultato è prevedibile per le colture cresciute in N-limitazione, visto che gli analoghi della palitossina sono molecole contenenti azoto, mentre il comportamento ottenuto sotto P-limitazione è differente da quello generalmente osservato per le tossine contenenti azoto, che solitamente mostrano un incremento al diminuire della concentrazione del fosforo (Graneli e Flynn, 2006). Le vie metaboliche coinvolte nella sintesi della palitossina sono ancora sconosciute, comunque è possibile ipotizzare che bassi livelli di fosforo possano impattare l'energia o gli intermedi necessari per la sintesi di queste grandi molecole (Pistocchi et al., 2010).

3.3.1.2. Temperatura

Ashton et al. (2003), evidenziavano una maggiore crescita e tossicità per *Ostreopsis lenticularis* a 29,5°C piuttosto che a 25°C, un comportamento simile a quello di *A. minutum* e *A. tamiyavanichii* (Lim et al., 2006). Una correlazione inversa tra temperatura e concentrazione di tossine è stata invece osservata per *A. catenella* (Navarro et al., 2006), oltre che per *A. cohorticula* (Ogata et al., 1989), *P. bahamense* var. *compressum* (Gedaria et al., 2007) e *Heterosigma akashiwo* (Ono et al., 2000). Queste differenze testimoniano come i fattori stimolanti la produzione di tossine possano avere differenti impatti anche in specie o gruppi algali simili (Graneli and Flynn, 2006).

In ogni caso, nonostante una precisa caratterizzazione della tossicità in funzione della temperatura sia stata sviluppata solo per il ceppo di Ancona (Pezzolesi et al., in preparazione), si è visto che, esprimendo le tossine per litro di coltura, questo ceppo presenta una maggior tossicità a 20°C piuttosto che a 25 e a 30, tuttavia le tossine per cellula sono maggiori a 25°C, ovvero ad una temperatura non ottimale per la crescita; una situazione simile è riportata nel lavoro di Graneli et al. (2010) precedentemente citato, nel quale viene osservato che, nonostante un optimum di temperatura del ceppo tirrenico vicino ai 30°C, la tossicità massima si ha per temperature comprese tra i 20 e i 22°C, confermando quanto visto per altre specie tossiche in cui la tossicità aumenta a temperature sub-ottimali per la crescita (e.g. Graneli and Flynn, 2006).

3.3.2 FATTORI BIOLOGICI

Per quanto riguarda *O. ovata* le tossine sono più abbondanti alla fine della fase stazionaria (Tosteson et al., 1989; Guerrini et al., 2009; Totti et al., 2010; Graneli et al., 2010), con un maggior quantitativo nel ceppo adriatico che in quello tirrenico se si considera la tossicità per cellula o per litro di coltura, mentre a parità di biovolume il ceppo tirrenico sembra contenere una maggiore quantità di OVTX-a del ceppo adriatico; tuttavia i 2 ceppi studiati denotano una tossicità significativamente maggiore rispetto al ceppo ligure. Infine, sia per *O. ovata* del Tirreno che per quella dell'Adriatico, il quantitativo di tossine accumulato nelle cellule è nettamente maggiore di quello rilasciato nel mezzo (Guerrini et al., 2010), come si riscontra anche per *Karenia brevis* sia in coltura (Roth et al., 2007) che in situ (Pierce et al., 2001; Tester et al., 2008).

4. ALLELOPATIA

4.1 DEFINIZIONE

Effetti dannosi di piante nei confronti di altre piante su cui si ha notizia risalgono a 2 millenni, mentre i primi lavori sperimentali sull'allelotropia sono del 18° secolo (Willis, 1985). L'allelotropia nel fitoplancton fu osservata probabilmente per la prima volta nel 1917 da Harder (Inderjit and Dakshini, 1994), che riportò l'autoinibizione del cianobatterio di acqua dolce *Nostoc punctiforme*. Nel 1937 il termine fu coniato da Molisch (Rizvi et al., 1992), per descrivere le interazioni biochimiche benefiche in tutte le classi di piante (inclusi i microorganismi). Attualmente, Graneli et al. (2008) propongono una definizione di allelopatia basata sul concetto di Rice (Rice, 1984), leggermente rivisto: "Qualsiasi effetto diretto o indiretto, dannoso o benefico, da parte di un organismo (piante, protisti, batteri o virus) su altri attraverso la produzione di composti chimici rilasciati nell'ambiente". Keating (1999) ha suggerito di utilizzare il termine allelochimica, probabilmente più appropriato, visto che allelopatia evoca solamente effetti nocivi. Per quanto riguarda la botanica marina applicata, allelopatia o allelochimica vengono utilizzati nel contesto di effetti positivi o negativi di composti prodotti da alcune alghe nei confronti di altri gruppi o specie algali; pertanto non riguarda la predazione o la deterrenza verso il grazing.

4.2 ALLELOPATIA IN AMBIENTE ACQUATICO

Anche se l'allelotropia nel fitoplancton è stata osservata per la prima volta quasi un secolo fa (Inderjit and Dakshini, 1994), solamente negli ultimi anni questo tema ha catturato l'interesse della comunità scientifica (Fistarol et al., 2003; Graneli and Johansson, 2003; Gross, 2003; Legrand, 2003; Skoovgard et al., 2003; Fistarol et al., 2004a, 2004b; Suikkanen et al., 2004; Kubanek et al., 2005; Granéli and Pavia, 2006; Granéli and Hansen, 2006; Tillman et al., 2007; Granéli and Weberg, 2008), dovuto al fatto che molte delle specie di fitoplancton che producono allelochimici sono pericolose per l'ecosistema. I blooms algali tossici sono infatti notevolmente incrementati come numero e diffusione, coinvolgendo sia le acque dolci che

quelle oceaniche (Anderson, 1989; Smayda, 1990; Hallegraeff, 1993; Van Dolah, 2000) e provocando impatti enormi negli ecosistemi acquatici interessati (Maestrini and Granéli, 1981; Granéli and Hansen, 2006). Le morie di pesci sono il primo effetto visibile, ma gli effetti più deleteri hanno luogo quando il fenomeno affligge interi ecosistemi, causando la morte di fitoplancton, zooplancton, macroalghe e molluschi. Le tossine prodotte durante queste fioriture sono metaboliti secondari rilasciati in acqua con la capacità di perforare le membrane cellulare degli organismi bersaglio. Anche le fioriture causate da forti scarichi di azoto e fosforo nelle aree costiere, caratterizzate da elevate biomasse algali, causano ingenti danni una volta in decomposizione, poiché sottraggono gran parte dell'ossigeno disciolto in acqua (Allen 2006), anche se in questo caso le morie non sono causate dal rilascio di tossine, ma da un ambiente anossico. Sembrerebbe logico supporre che i danni sull'ecosistema siano effetti secondari, mentre il fine principale di questi composti tossici sia quello di uccidere o inibire le altre specie di fitoplancton in competizione, oltre che ridurre il grazing da parte dello zooplancton.

4.3 TIPOLOGIA DEI COMPOSTI ALLELOCHEMICI

Gli allelochimici sono, per la gran parte delle specie algali, composti sconosciuti e solo pochi sono stati identificati (tabella 1, Granéli et al., 2008).

Species	Allelochemicals ^a	Effects ^b	Reference
Cyanophyceae			
<i>Anabaena</i> sp.	U	GI, GS	Suikkanen et al. (2005)
<i>A. cylindrica</i>	EP	GI	Legrand et al. (2003)
<i>A. flos-aquae</i>	HX, A, M, U	GI, IS, D	Murphy et al. (1976), Kearns and Hunter (2000), Kearns and Hunter (2001), Legrand et al. (2003)
<i>A. lemmermannii</i>	U	GI	Suikkanen et al. (2004)
<i>Aphanizomenon</i> sp.	U	GS	Suikkanen et al. (2005)
<i>A. flos-aquae</i>	U	GI	de Figueiredo et al. (2004); Suikkanen et al. (2004), Suikkanen et al. (2006)
<i>A. gracile</i>	U	GI, D	Legrand et al. (2003)
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	U	PI	Figueredo et al. (2007)
<i>Gomphosphaeria</i>	U	GI	Legrand et al. (2003)

Species	Allelochemicals ^a	Effects ^b	Reference
<i>aponina</i>			
<i>Hapalosiphon fontinalis</i>	Hapalindole A	D	Moore et al. (1984)
<i>Fischerella</i> sp.	U	GI, PI	Bagchi and Marwah (1994)
<i>Fischerella muscicola</i>	Fischerellin	PI, GI, D	Gross et al. (1991), Legrand et al. (2003)
<i>Microcystis</i> sp.	U, Microcystin	GI, PI, D	Sukenik et al. (2002), Vardi et al. (2002)
<i>Nodularia spumigena</i>	U	GI, GS	(Suikkanen et al., 2004) and (Suikkanen et al., 2005), Suikkanen et al. (2006)
<i>Nostoc</i> sp.	U	GI, D	Schagerl et al. (2002), Legrand et al. (2003)
<i>Nostoc spongiaeforme</i>	Nostocine A	GI	Hirata et al. (1996), Hirata et al. (2003)
<i>Oscillatoria</i> sp.	FA	PI	Chauhan et al. (1992)
<i>Oscillatoria</i> spp.	U	GI, PI, D	Legrand et al. (2003)
<i>Oscillatoria laetevirens</i>	U	GI	Ray and Bagchi (2001)
Bacillariophyceae			
<i>Pseudo-nitzschia pungens</i>	U	GI	Legrand et al. (2003)
<i>Skeletonema costatum</i>	U	GI	Yamasaki et al. (2007)
Coscinodiscophyceae			
<i>Rhizosolenia alata</i>	U	GI	Legrand et al. (2003)
Dinophyceae			
<i>Alexandrium catenella</i>	U	GI, D	Arzul et al. (1999)
<i>A. minutum</i>	U	GI, D	Arzul et al. (1999), Fistarol et al. (2004a)
<i>A. ostenfeldii</i>	U	IM, CP	Tillmann et al. (2007)
<i>A. tamarense</i>	U	GI, GS, CP, D	Arzul et al. (1999), Fistarol et al. (2004b), Fistarol et al. (2004a), Wang et al. (2006)
<i>Amphidinium klebsii</i>	U	GI	Sugg and VanDolah (1999)
<i>Ceratium</i> sp.	U	GI	Legrand et al. (2003)
<i>Coolia monotis</i>	U	GI	Sugg and VanDolah (1999). Legrand et al. (2003)
<i>Gambierdiscus toxicus</i>	U	GI, D	Sugg and VanDolah (1999)
<i>Karenia brevis</i> (<i>Gymnodinium breve</i>)	U	GI, GS	Kubanek et al. (2005)
<i>K. mikimotoi</i> (<i>Gymnodinium mikimotoi</i>)	U	GI, CP, D	Uchida et al. (1999), Fistarol et al. (2004b)
<i>Ostreopsis lenticularis</i>	U	GI, D	Sugg and VanDolah (1999)
<i>Peridinium aciculiferum</i>	U	GI, D	Rengefors and Legrand (2001)
<i>Prorocentrum lima</i>	U	GI, D	Sugg and VanDolah (1999)

Species	Allelochemicals ^a	Effects ^b	Reference
Haptophyceae			
<i>Chrysochromulina polylepis</i>	U	GI, CP, D	Myklestad et al. (1995), Schmidt and Hansen, 2001, Schmidt and Hansen (2001), Fistarol et al. (2004b)
<i>Phaeocystis pouchetii</i>	U, PUA	GI, D, H	Hansen et al. (2004), Hansen and Eilertsen (2007), van Rijssel et al. (2007)
<i>Prymnesium parvum</i>	U, Prymnesin	D, RG	Igarashi et al. (1998), Fistarol et al. (2003), Granéli and Johansson (2003), Barreiro et al. (2005), Fistarol et al. (2005)
Raphidophyceae			
<i>Chattonella antiqua</i>	U	GI	Matsuyama et al. (2000) cited in Gross (2003)
<i>Heterosigma akashiwo</i>	U	GI, GS	Matsuyama et al. (2000) cited in Gross (2003); Pratt (1966); Yamasaki et al. (2007)

^a A, anatoxin; EP, extracellular peptides; F, fatty acids; HX, hydroxamate chelators; M, microcystin; OA, okadaic acid; PUA, polyunsaturated aldehyde; U, unknown.

^b CP, cyst promotion; D, death; GI, growth inhibition; GS, growth stimulation; H, haemolysis; IM, immobilisation; IS, induced settling; PI, photosynthesis inhibition. RG, reduced grazing.

Tab. 1. Specie algali allelopatiche, loro allelochimici ed effetti allelopatici.

I più potenti hanno capacità emolitiche, perforando le membrane cellulari di altre specie, come nel caso di quelli prodotti da *C. polylepis* e *P. parvum* (Johansson and Granéli, 1999a,b; Schmidt and Hansen, 2001; Fistarol et al., 2003; Fistarol et al., 2004a) specie in grado di causare morie di pesci per danni alle branchie (Igarashi et al., 1995, 1998). Comunque la maggioranza degli allelochimici ha una modalità d'azione blanda, e.g. l'inibizione della fotosintesi o della crescita (Legrand et al., 2003).

Gli studi volti a valutare se alcune tossine algali conosciute (e.g. acido okadaico, PSPs, nodularina) avessero effetti allelopatici, hanno riportato risultati negativi (Sugg and Van Dolah, 1999; Tillmann and John, 2002; Fistarol et al., 2003; Suikkanen et al., 2004, 2006).

4.4 FATTORI CHE INFLUENZANO LA PRODUZIONE DI COMPOSTIALLELOCHEMICI

4.4.1 PARAMETRI AMBIENTALI

4.4.1.1 Luce

I composti allelopatici rilasciati da alcune specie di fitoplancton sembrano essere efficaci solo in un breve intervallo di tempo. Filtrati di *Prymnesium parvum* aggiunti a colture di *Thalassiosira weissflogii*, *Rhodomonas cf. baltica* e *Prorocentrum minimum* avevano inizialmente un forte impatto negativo sul numero delle cellule, ma nel giro di pochi giorni le specie esposte iniziavano a recuperare mentre, se il filtrato veniva aggiunto ripetutamente, la ripresa non era possibile (Granéli and Johansson, 2003; Suikkanen et al., 2004; Fistarol et al., 2005). Risultati simili sono stati osservati per la dinoflagellata *Scripsiella trochoidea* coltivata in presenza di essudati di *Alexandrium ostenfeldii* (Tillmann et al., 2007). Queste osservazioni lasciano presupporre che uno o più meccanismi riducano l'effetto allelopatico. L'esposizione a luce UV a 255 nm e luce visibile di lunghezza d'onda compresa tra i 400 e 520 nm inattiva completamente le tossine extracellulari ittiotossiche nel giro di 90 min (Parnas et al., 1962). Un'altra primnesiofita, *Phaeocystis pouchetii*, al contrario, incrementa la sua attività emolitica se incubato ad elevate intensità luminose (van Rijssel et al., 2007).

4.4.1.2 Temperatura

Non si sa molto di come le variazioni di temperatura agiscano sull'effetto allelopatico del fitoplancton. Un esempio è che l'attività emolitica di *Phaeocystis pouchetii* aumenta passando da una temperatura di 4°C a 15°C (van Rijssel et al., 2007). D'altra parte, un aumento delle temperatura da 14°C a 20°C non ha rilevato differenze nell'effetto allelopatico di *Alexandrium tamarense* su *Scripsiella trochoidea* o *Heterocapsa triquetra* (Fistarol et al., 2004a).

4.4.1.3 pH

Le acque costiere superficiali possono raggiungere alti livelli di pH (Pegler and Kempe, 1988; Emery, 1969 cited in Hinga, 1992; Hansen, 2002) e un elevato pH può essere confuso con interazioni allelopatiche. Ad esempio, un elevato pH riduce la mobilità della dinoflagellata *H. triquetra*, quando essa si trova in presenza di basse densità di *C. polylepis*.

Un aumento del pH da 8 a 9 si riflette in più del doppio di cellule di *H. triquetra* non mobili. La tossicità di culture ad alta densità di *C. polylepis* aumentava da un pH di 6,5 fino ad un pH di 8, rendendo non mobili fino al 90% di cellule di *H. triquetra*. (Schmidt and Hansen, 2001). Risultati simili si sono riscontrati anche per il cianobatterio di acqua dolce *Oscillatoria laetevirens*, e.g. una produzione di algicidi di quasi quattro volte superiore incrementando il pH da 8 a 9, mentre a valori neutri acidi l'algicida è stato rilevato in concentrazioni basse (Ray and Bagschi, 2001).

4.4.1.4 Nutrienti

Solitamente la tossicità del fitoplancton aumenta in condizioni di limitazione di nutrienti (Edwardsen et al., 1990; Reguera and Oshima, 1990; Granéli and Johansson, 2003; Granéli and Flynn, 2006). Se le alghe contengono azoto nelle loro tossine (come ad esempio saxitossine, nodularina e acido domoico), questo accade solo in limitazione da fosforo (eccesso di azoto nel mezzo). Per le alghe che non necessitano né di fosforo né di azoto per la biosintesi delle tossine, la tossicità aumenta sia in limitazione da fosforo che da azoto (Johansson and Granéli, 1999a, 1999b; Granéli and Flynn, 2006). Questo indica che la ragione dietro all'incremento della tossicità sia lo stress, causato in questo caso dalla carenza di un nutriente per la divisione cellulare (Granéli et al., 2008). Vi sono pochi studi in ambiente acquatico che mettano in relazione l'allelopatia con la carenza di nutrienti. Granéli and Johansson (2003) hanno notato che *Prymnesium parvum* in N o P limitazione incrementavano notevolmente la sintesi di composti allelochimici, mentre in condizioni bilanciate la produzione era quasi nulla. Questi risultati supportano l'assunzione che la produzione di composti allelochimici da parte delle alghe è simile alla loro produzione di tossine.

Anche la risposta delle specie bersaglio agli allelochimici è diversa a seconda dello stato di nutrizione. *Thalassiosira weissflogii* cresciuta in N o P limitazione era molto più sensibile agli allelochimici rilasciati da *Prymnesium parvum* di quando cresciuta in condizioni bilanciate, questo perché le cellule bersaglio risentono anch'esse delle condizioni di stress ambientali (Fistarol et al., 2005). Pertanto in condizioni di stress l'effetto allelopatico risulta maggiore, favorendo la competizione da parte delle alghe produttrici di tali composti.

4.4.2 FATTORI BIOLOGICI

4.4.2.1. Organismi coinvolti

Il principale fattore che influenza le interazioni allelopatiche sono gli organismi coinvolti. Gli effetti allelopatici dipendono sia dalla specie agente che dalla specie bersaglio. Solitamente le specie allelopatiche affliggono molte, ma non tutte le specie bersaglio, così come le specie bersaglio sono sensibili a molti, ma non a tutti gli allelochimici (Fistarol et al., 2003; Fistarol et al., 2004; Suikkanen et al., 2004; Fistarol et al., 2005). Per esempio, Fistarol et al., (2003 e 2004a) hanno scoperto che le diatomee possono essere fortemente inibite da *P. parvum*, mentre sono solo moderatamente inibite da *A. tamarense*, che a sua volta ha un effetto deleterio sulle nanoflagellate. Inoltre, l'effetto allelopatico dipende anche dalle concentrazioni della specie agente e delle specie bersaglio (Schmidt and Hansen, 2001; Tillmann and John, 2002; Tillmann, 2003).

Infatti, poiché l'allelopatia è mediata da composti chimici rilasciati nel mezzo, il suo effetto dipende dal numero di cellule dell'organismo allelopatico, come dimostrato per alcuni gruppi fitoplanctonici, e.g. primnesiofite e dinoflagellate (Schmidt and Hansen, 2001; Tillmann and John, 2002; Tillmann, 2003). Quest'ultimo ha anche dimostrato che un incremento nella concentrazione di cellule dell'organismo bersaglio diminuisce l'effetto (in questo caso la morte di *Oxyrrhis marina*). Poiché la morte è causata per lisi, l'autore suggerisce che i composti tossici vengano rimossi dal sistema quando si legano alla membrana cellulare del bersaglio.

4.4.2.2. Effetti della fase di crescita

L'intensità degli effetti allelopatici dipendono dalla fase di crescita della specie allelopatica. Schmidt and Hansen (2001) e Suikkanen et al. (2004) ha dimostrato che l'effetto allelopatico è causato da cellule che stanno crescendo esponenzialmente, decresce in fase stazionaria ed è pressochè nullo per cellule senescenti. Poiché l'allelopatia è una forma di interferenza competitiva, ha senso che le specie agenti siano più allelopatiche in fase di crescita esponenziale, quando le cellule possono beneficiare maggiormente degli effetti, indicando che questi composti sono importanti per la loro ecologia.

4.4.2.3. Influenza dei batteri

Anche se molti esperimenti sull'allelopatia delle specie fitoplanctoniche sono stati condotti su culture non asettiche, è stato dimostrato che i batteri presenti probabilmente non sono

responsabili degli effetti allelopatici osservati (Suikkanen et al., 2004; Tillmann and John, 2002). Tillmann e John (2002) hanno rimosso i batteri da culture di *Alexandrium* spp. attraverso filtri a membrana da 0.2 µm. Essi hanno osservato che l'effetto allelopatico di *Alexandrium* spp. non veniva alterato.

Suikkanen et al. (2004) hanno testato se i batteri da soli presenti in culture di *Nodularia spumigena*, *Anabaena lemmermannii* e *flos-aquae* causassero effetti allelopatici, ottenendo risultati negativi. Pertanto si può supporre che siano le specie fitoplanctoniche stesse e non i batteri ad esso associati a causare effetti allelopatici.

4.5 IMPLICAZIONI ECOLOGICHE

La comunità scientifica ritiene che gli allelochimici siano importanti nei processi di competizione, successione, formazione e mantenimento dei bloom algali (Pratt, 1966; Keating, 1977; Rice, 1984; Lewis, 1986; Wolfe and Rice, 1979; Rengefors and Legrand, 2001; Vardi et al., 2002; Legrand et al., 2003; Fistarol et al., 2003, 2004; Suikkanen et al., 2005). E' stato proposto che cambiamenti nella struttura delle comunità planctoniche sia causato dal differente effetto degli allelochimici su differenti bersagli (Mulderij et al., 2003). Gli organismi bersaglio possono essere completamente eliminati, inibiti, resistenti agli allelochimici, o addirittura essere stimolati (Fistarol et al., 2003, 2004a; Suikkanen et al., 2004). L'inibizione o promozione selettiva della crescita influenza la successione e la competizione in ambiente acquatico.

Inoltre gli allelochimici possono offrire ulteriori vantaggi alle specie mixotrofe, come ad esempio *Prymnesium parvum* (Skovgaard and Hansen, 2003; Skovgaard et al., 2003; Tillmann, 2003) che li possono utilizzare per immobilizzare e attaccare la preda, o lidenne le membrane con conseguente rilascio di materiale organico.

4.6 ALLELOPATIA NELLE OSTREOPSIDACEAE

Diversi autori hanno osservato che le specie appartenenti al genere *Ostreopsis* sono in grado di produrre e rilasciare composti emolitici e polisaccaridi (mucillagine) in acqua (Yasumoto et al., 1987; Vila et al., 2001; Ashton et al., 2003; Taniyama et al., 2003; Lenoir et al., 2004).

Durante alcune fioriture in Brasile (1998/99 e 2001/2002) indagini microscopiche hanno rivelato che tutte le praterie algali (molte delle quali calcaree, e.g. *Jania* sp.), erano ricoperte da uno strato gelatinoso di 0.5 cm di spessore costituito esclusivamente da cellule di *O.ovata* (Graneli et al., 2002; Graneli, oss. pers.) Ciò potrebbe indicare che i polisaccaridi o i composti emolitici di *O. ovata* agiscano da allelochimici. Tuttavia non sono stati condotti studi di laboratorio a sostegno di quest'ipotesi.

5. INFLUENZA DEI BATTERI SU TOSSICITA' E ALLELOPATIA

Sta divenendo sempre più chiaro che la complessa comunità microbica interagente con i fenomeni di fioriture algali tossiche abbia effetti significativi nel loro sviluppo e terminazione (Fukami et al., 1991; Doucette, 1995; Doucette et al., 1998; Skerratt et al., 2002), nonché nella produzione di tossine; è stato infatti suggerito che la palitossina, una delle più potenti tossine marine, potrebbe essere prodotta da un *Vibrio*, ovvero un batterio simbiote dello zooantide *Palythoa* sp., reputato in passato di essere l'unica sorgente di questa tossina (Moore, 1982; Moore et al., 1982).

L'interazione alghe-batteri nella produzione di tossine è stata proposta per diverse microalghe con risultati non sempre chiari. Cresciuto in una coltura anossica, *Ptychodiscus brevis* ha mostrato un incremento della tossicità, mentre *Gymnodinium veneficum* un calo (Ray and Wilson, 1957; Abbott and Ballantine, 1957). La tossicità di *Prorocentrum minimum* e *Protogonyaulax tamarensis* è stata proposta essere dovuta alla presenza di batteri presenti sia nel mezzo che in endosimbiosi con le dinoflagellate (Silva and Sousa, 1981).

Da uno studio di Tosteson et al. (1989) su *O. ovata* si può verificare che, mentre il rapporto totale batteri/dinoflagellate rimane invariato durante l'intero intervallo di tempo della coltura, il numero di batteri effettivamente associati alle dinoflagellate decresce bruscamente nei primi 7 giorni, per poi rialzarsi di colpo tra il 21° e il 35° giorno. La tossicità massima delle cellule si registra proprio nel momento in cui il numero di batteri associati è minore, probabilmente in seguito al rilascio di agenti allelopatici da parte delle microalghe (Chrost, 1975), mentre un aumento delle densità microbiche si registra in fase di declino, come anche riportato in diversi siti per i bloom algali (Chrost, 1975; VanWambeke and Bianchi, 1985).

Le comunità batteriche associate con i bloom algali non sono semplicemente assemblaggi di specie casuali, ma hanno un profilo caratteristico, comunemente dominato dagli alpha-Proteobatteri, in particolare da quelli appartenenti alla divisione dei *Roseobatteri*, alcuni dei quali sono considerati promotori della crescita delle microalghe (Jasti et al., 2005). Un'altra categoria, i gamma-Proteobatteri, è invece associata alla stimolazione della crescita e al declino dei bloom algali, in situazioni distinte (Kodama et al., 2006). I beta-Proteobatteri al contrario si incontrano meno frequentemente, ma dominano ad esempio la flora intracellulare di *Gymnodinium instriatum* (Alverca et al., 2002). Un quarto gruppo, i *Citophaga-*

Flavobacterium (CFB), è anch'esso frequente all'interno della comunità microbica associata con le microalghe. Molti taxa di CFB sono presenti in associazione con del particolato nell'ambiente marino e sono attivi nei processi di rimineralizzazione di materiale organico disciolto ad alto peso molecolare (Kirchman, 2001). Al contrario, alcune specie di CFB sono incluse nelle circa 60 con effetti algicidi dimostrati (Fukuyo et al., 2002; Mayali and Azam, 2004). Inoltre è stato documentato che le popolazioni batteriche naturali producono agenti chelanti del ferro, noti come siderofori, in grado di rendere disponibili al plancton i metalli presenti in tracce, spesso limitanti (Soria-Dengg et al., 2001).

Uno studio di Van Dolah et al. (2009) sulla dinoflagellata tossica *Karenia brevis*, condotto con l'ausilio di sonde che si ibridano con sequenze sul 16s rRNA microbico, mostra una chiara dominanza di alfa-Proteobatteri durante i bloom dell'alga, e una forte presenza di Bacteroidetes, tra cui principalmente *Citophaga* (nomenclatura sotto revisione) e *Flavobacterium* che hanno un forte effetto algicida su *Karenia*, la cui lisi porta ad un rilascio di più del 60% delle brevitossine cellulari in acqua; tuttavia la maggioranza del composto emesso presenta delle modificazioni ad opera dei batteri nelle strutture molecolari che ne diminuiscono la tossicità di 100 volte rispetto alla molecola di partenza (Roth et al., 2007). Anche Christoffersen et al. (2002) e Hagstrom et al. (2007) sostengono che diverse tossine possono essere degradate dai batteri (e.g. microcistina).

SCOPO DELLA TESI

Il fitoplancton rappresenta la base della catena trofica in ambiente marino, nonché oltre la metà della produzione primaria a livello mondiale. Le dinoflagellate assieme alle diatomee costituiscono la maggior parte del fitoplancton, comprendendo numerose e diversificate specie di microalghe dalla differente distribuzione, ecologia e fisiologia.

Alcune specie appartenenti a tale gruppo sono in grado di dare luogo, in determinate condizioni, a estesi fenomeni di fioriture algali, che diventano particolarmente impattanti se le specie coinvolte sono responsabili della produzione di biotossine, che possono direttamente uccidere altri organismi o accumularsi nei loro tessuti.

Gli effetti nocivi di questi fenomeni si ripercuotono pesantemente sull'ecosistema marino, con ingenti morie di organismi acquatici (da pesci a molluschi, dal bentos al necton) e profonde alterazioni nelle comunità specifiche. Un forte coinvolgimento si ha di conseguenza anche per le attività umane, in seguito a forti ripercussioni negative su pesca, turismo, attività ricreative, o spesso con rischi direttamente correlati alla salute umana, dovuti per lo più ad ingestione di organismi contaminati o all'inalazione di tossine per via aerea.

Negli ultimi anni le fioriture algali tossiche si sono fortemente intensificate in distribuzione, estensione e frequenza, attirando l'interesse globale della comunità scientifica.

Diversi studi condotti in questo senso hanno portato all'identificazione di numerose specie di dinoflagellate tossiche e all'isolamento di una lunga serie di composti chimici con effetti dannosi da esse sintetizzate. Tuttavia si conosce ancora ben poco sull'ecologia di queste specie, in particolare quali siano i fattori che possano indurre o regolare la proliferazione e lo sviluppo di un bloom algale. Inoltre per una serie di mutamenti e concausalità che non si conoscono, si verifica che organismi già rinomati da tempo in determinate aree compaiano in nuovi habitat, dando origine a nuovi casi di intossicazione.

Questo studio si è focalizzato su due specie di dinoflagellate bentoniche tossiche, *Ostreopsis ovata* e *Coolia monotis*, entrambi appartenenti alla famiglie *Ostreopsidaceae*, note già da tempo nei paesi tropicali poiché associate alla sindrome da ciguatera (vedi 1.2.4.). Negli ultimi anni, *Ostreopsis ovata* è stata oggetto di numerose ricerche in Europa, poiché ha dato luogo a fenomeni di bloom collegati con danni respiratori all'uomo anche lungo i litorali italiani; durante i vari monitoraggi e campionamenti delle acque, è stata sempre riscontrata la co-presenza di *Coolia monotis* (e *Prorocentrum lima*), di cui invece si conosce ben poco, visto che la sua tossicità in Mediterraneo non è ancora stata dimostrata.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare, attraverso l'utilizzo di colture di laboratorio, l'esistenza di fenomeni di competizione e/o di allelopatia tra *O. ovata* e *C. monotis*.

Lo studio della competizione è stato focalizzato sulla valutazione dell'importanza della temperatura e del consumo di nutrienti nella crescita di *O. ovata* e *C. monotis* (singolarmente e in associazione) provenienti dalla zona del monte Conero (Ancona, Marche). Esistono già studi di questo tipo su un ceppo diverso di *O. ovata*, ed è sembrato il caso di effettuare un esperimento di confronto su un ceppo diverso; per *C. monotis* invece non sono state pubblicate altre ricerche in letteratura sulle risposte di crescita a parametri ambientali.

La valutazione della crescita è stata effettuata attraverso conteggio delle cellule, misura dell'efficienza fotosintetica e consumo dei macronutrienti (vedi cap. 8 e 9).

Quindi, visto che le due specie vivono in associazione nell'ambiente marino ma solo *O. ovata* è in grado di determinare bloom, si è cercato di evidenziare l'instaurarsi di eventuali fenomeni di allelopatia valutando il ruolo delle tossine di *O. ovata* attraverso la realizzazione degli esperimenti che verranno descritti al capitolo successivo.

MATERIALI E METODI

6. COLTURE ALGALI BATCH

La coltura viene preparata inoculando piccole quantità dell'alga in beute contenenti il terreno di coltura adatto per la specie scelta. Nelle colture "batch" si segue l'andamento della crescita dell'alga dal giorno dell'inoculo (giorno zero) fino al loro esaurimento, senza aggiunta di nutrienti e di alghe. Queste colture sono semplici da allestire ed inoltre danno la possibilità di studiare simultaneamente gli effetti delle diverse condizioni di crescita su varie popolazioni di cellule algali, che derivano dalla stessa coltura e presentano quindi le stesse condizioni fisiologiche iniziali (fig. 16).

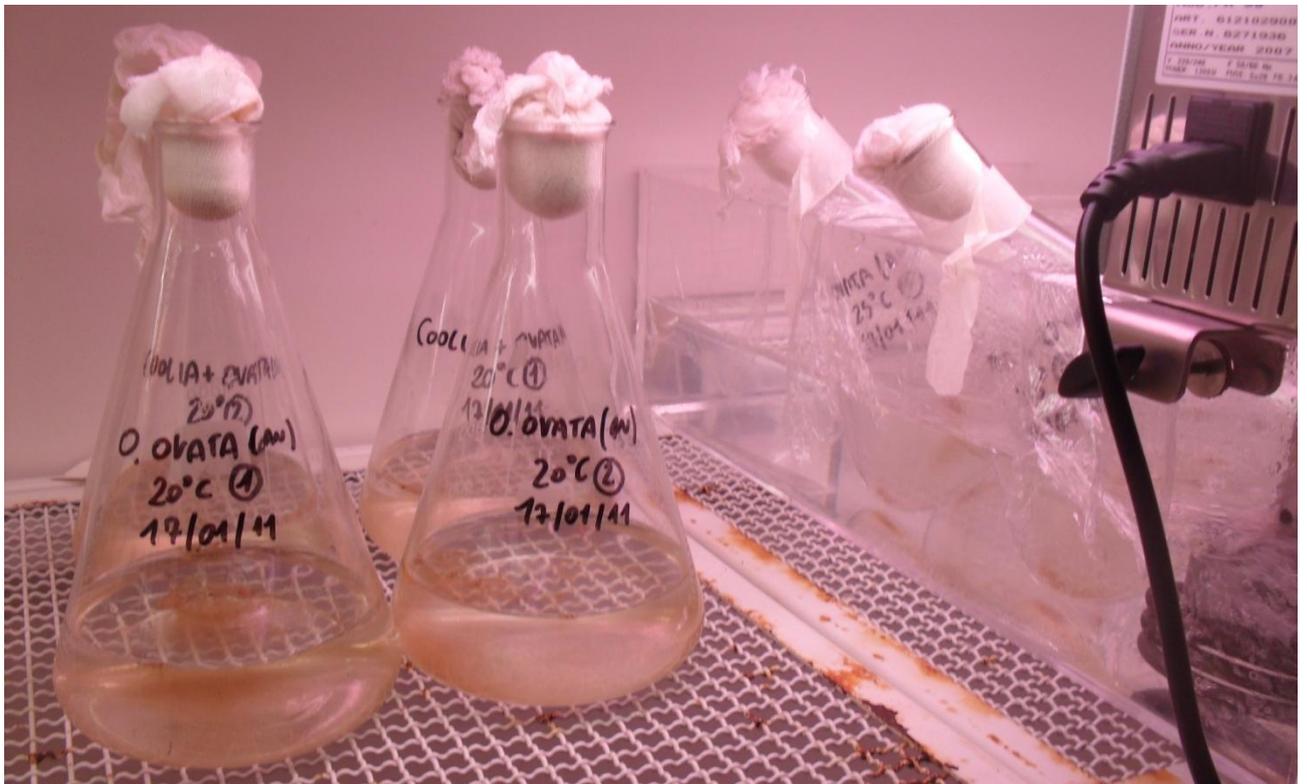


Fig. 16. Esempio di colture algali batch.

6.1. ISOLAMENTO DELLE CELLULE

Gli esperimenti condotti nel corso dello studio sono stati effettuati su un ceppo di *Ostreopsis ovata* (codice OOAN0816) e su uno di *Coolia monotis* (CMAN0701), entrambi provenienti dalla zona di Numana (Ancona, Italia).

Le cellule sono state isolate con il metodo della micropipetta (Hoshaw and Rosowski, 1973). Il campione viene posto in una piastra Petri e osservato al microscopio rovesciato. Una volta identificata, la cellula algale viene prelevata con una pipetta pasteur in vetro, con punta assottigliata per mezzo di una fiamma e trasferita all'interno di un pozzetto di una piastra multiwell sterile contenente acqua di mare sterile filtrata con filtri 0,22 μm , arricchita con il terreno di coltura diluito.

La piastra viene messa in camera di coltura con temperatura costante a $20\pm 2^\circ\text{C}$ e con ciclo luce:buio 16:8 ore (circa $100 \mu\text{mol fotoni m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Quando l'alga si è divisa, viene trasferita in contenitori più grandi, con aggiunta del mezzo di coltura e posta nelle medesime condizioni.

6.2. PREPARAZIONE DEL MEDIUM E INOCULO

Il mezzo di coltura si prepara partendo da acqua di mare oligotrofica prelevata in superficie 10 miglia marine al largo di Cesenatico (Forlì-Cesena, Italia), gentilmente fornita dal Centro Ricerche Marine di Cesenatico. L'acqua in questione viene opportunamente filtrata con un sistema di filtrazione (fig. 17) a vuoto, utilizzando filtri in microfibra di vetro GF/C WHATMAN (diametro pori 1,2 μm). Per mezzo di un rifrattometro (marca ATAGO, mod. S-10) viene misurata la salinità, che deve essere portata al valore di 35 psu, ovvero il valore misurato in mare al momento del prelievo dei campioni naturali da cui sono state isolate le cellule algali.



Fig. 17. Apparato di filtrazione a vuoto.

La formula 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 di partenza
- **V_f** è il volume finale di terreno da ottenere
- **S_i** è la salinità iniziale
- **S_f** è la salinità finale.

Considerando ad esempio un volume finale di 2 litri e una salinità iniziale di 39 psu abbiamo:

$$V_i * 39 = 2000 \text{ ml} * 35 \quad \rightarrow \quad V_i = (2000 * 35) / 39 = 1795 \text{ ml}.$$

Questa quantità di acqua di mare verrà quindi portata ad un volume di 2 litri con acqua distillata. L'acqua così preparata dovrà essere sterilizzata in autoclave con un ciclo a 120°C, per 20 minuti, alla pressione di 1 atm.

A questo punto, per preparare il mezzo di coltura, vengono aggiunti all'acqua sterilizzata i nutrienti in determinati quantitativi prelevandoli da soluzioni stock sterili; tutte le operazioni vengono condotte sotto cappa sterile (marca POLARIS STERIL, mod. Polaris 72, fig. 18).

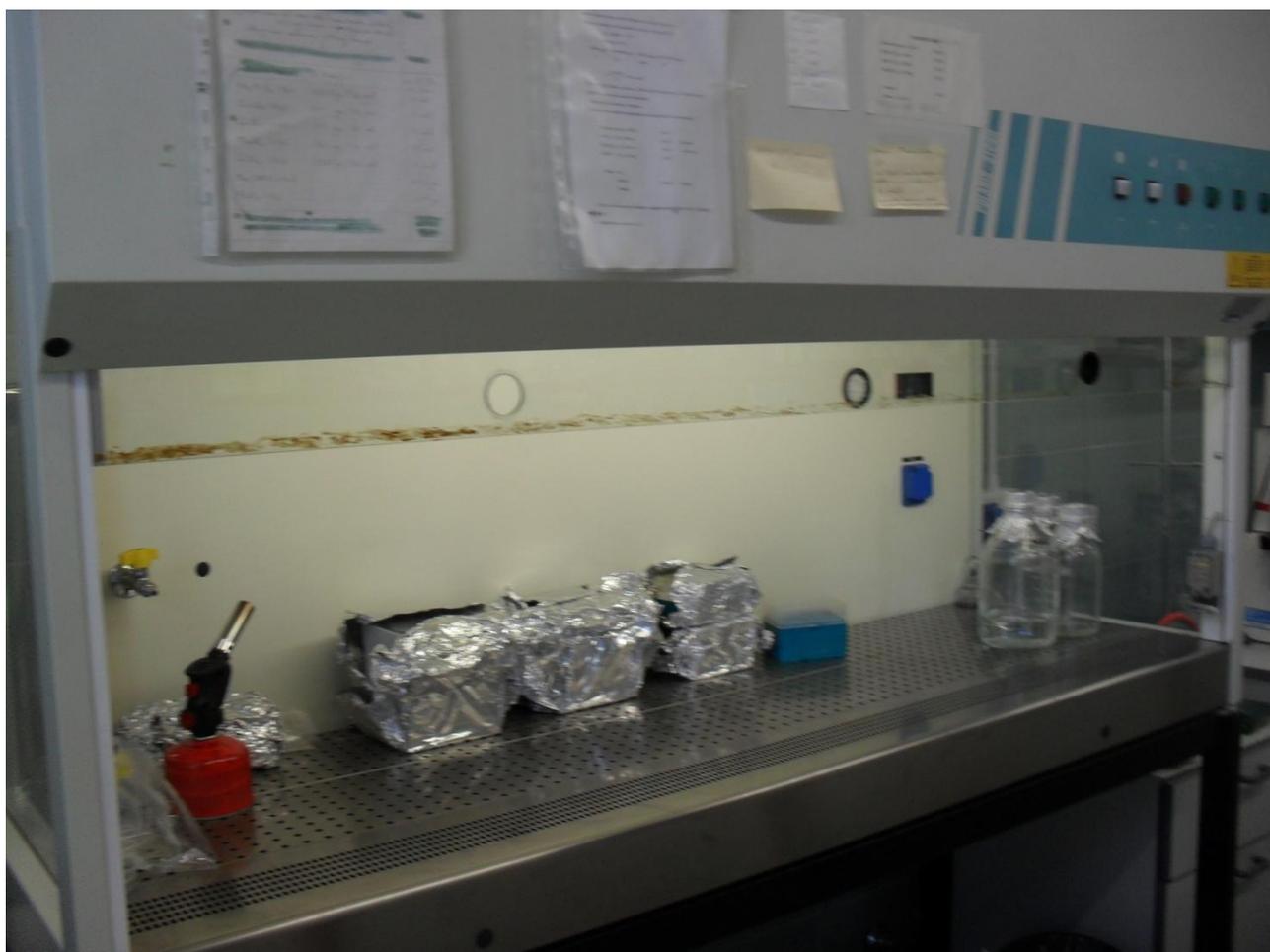


Fig. 18. Cappa sterile.

Di seguito sono riportate le concentrazioni di nutrienti impiegate per la preparazione di un terreno f/2 (Guillard and Ryther, 1962) (Tab.2, 3, 4):

	Soluzioni Madri (g L ⁻¹)	Aggiunta (ml L ⁻¹)	Concentrazione finale (M)
NaNO₃	75	1	8,82 x 10 ⁻⁴
NaH₂PO₄H₂O	5	1	3,62 x 10 ⁻⁵
Micronutrienti	Vedi sol. Stock 1	1	-
Vitamine	Vedi sol. Stock 2	1	-
Hepes pH 7,1-7,3	230	1	-

Tab. 2. Nutrienti per il mezzo di coltura f/2 (Guillard and Ryther, 1962)

Micronutrienti	Soluzioni Madri (g L-1)	Aggiunta in 1 L	Concentrazione finale (M)
FeCl₃6H₂O		3,15 g	1,17 x 10 ⁻⁵
Na₂ EDTA 2H₂O		4,36 g	1,17 x 10 ⁻⁵
MnCl₂4H₂O	180,0	1 ml	9,10 x 10 ⁻⁷
ZnSO₄7H₂O	22,0	1 ml	7,65 x 10 ⁻⁸
CoCl₂6H₂O	10,0	1 ml	4,20 x 10 ⁻⁸
CuSO₄5H₂O	9,8	1 ml	3,93 x 10 ⁻⁸
Na₂MoO₄2H₂O	6,3	1 ml	2,6 x 10 ⁻⁸

Tab. 3. Soluzione stock 1 di metalli in traccia per il terreno f/2.

Vitamine	Soluzioni Madri (g L-1)	Aggiunta in 1 L	Concentrazione finale (M)
Tiamina	-	200 mg	2,96 x 10 ⁻⁷
Biotina	1,0	1 ml	2,05 x 10 ⁻⁹
B12	1,0	1 ml	3,69 x 10 ⁻¹⁰

Tab. 4. Soluzione stock 2 di vitamine per il terreno f/2.

Il terreno solitamente utilizzato per la crescita e il mantenimento in cultura di *O. ovata* e *C. monotis* è denominato f(N/10, P/10)+Se, che si ottiene diluendo di 5 volte i quantitativi di nitrati e fosfati del terreno f/2 e aggiungendo selenio ([Se] = 1*10⁻⁸ M).

A questo punto il terreno viene suddiviso all'interno di beute in differenti aliquote a seconda del caso, infine si procede effettuando l'inoculo di cellule algali.

6.3. DESCRIZIONE E ALLESTIMENTO DEGLI ESPERIMENTI

6.3.1. ESPERIMENTO 1

Lo scopo di questo esperimento è valutare un eventuale effetto allelopatico delle tossine prodotte da *Ostreopsis ovata* sulla crescita in coltura di *Coolia monotis*.

Una coltura di *Ostreopsis ovata* (OOAN0816) al 25° giorno di crescita (fase stazionaria, maggiore tossicità), è stata filtrata sotto cappa sterile, con filtri GF/F WHATMAN per rimuovere completamente le cellule algali. Quindi sono stati misurati nitrati, fosfati ed ammonio presenti nel terreno con un apposito kit colorimetrico e sono stati aggiunti ulteriori macronutrienti fino a portarlo ai valori di un terreno f(N/10, P/10)+Se. Poiché N e P erano praticamente assenti nel filtrato, dato l'avanzato stadio della coltura, è stato aggiunto l'intero quantitativo necessario. Anche per quanto riguarda i micronutrienti (compreso il selenio) è stato addizionato il quantitativo intero, infatti, anche se la loro concentrazione nel filtrato non è stata misurata, un esperimento preliminare ha consentito di verificare che un'aggiunta di micronutrienti al filtrato, sia nel valore di 1/5 della concentrazione totale presente in un f(N/10, P/10)+Se, che nel valore intero, non abbia effetti significativi sulla crescita di cellule di *C. monotis* cresciute in seguito; tale risultato induce a pensare che un quantitativo di micronutrienti eventualmente superiore a quello standard presente in un f(N/10, P/10)+Se non dia origine a fenomeni di tossicità rilevanti. Infine è stato misurato il pH del filtrato, che già era compatibile con quello di un f(N/10, P/10)+Se.

A questo punto l'esperimento è proseguito allestendo 8 beute da 500ml come segue:

1F: inoculo di 25 ml (500 cellule ca.) di coltura di *C. monotis* (CMAN0701) + 375 ml di filtrato arricchito in nutrienti, per un totale di 400ml finali;

2F: replica di 1F;

1F no batt: inoculo di 25 ml (500 cellule ca.) coltura di *C. monotis* + 375 ml di filtrato arricchito in nutrienti. Questa volta però il filtrato è stato ulteriormente filtrato sotto cappa sterile con filtri autoclavati da 0,22 µm per rimuovere la popolazione batterica, prima dell'aggiunta dei nutrienti; ciò per verificare che non siano i batteri che tendono a svilupparsi nelle colture di *O. ovata* in fase stazionaria (vedi cap. 5) a determinare una minor crescita di *Coolia* anziché le tossine rilasciate da *O. ovata*;

2F no batt: replica di 1F no batt;

1F no batt + toss: come 1F e 2F no batt, in più viene aggiunto un estratto di palitossina (1 ml), ottenuto partendo da un pellet concentrato di una coltura di *O. ovata* (ceppo di bari a 20°C), risospeso in 3 ml di metanolo ed evaporato in rotavapor per eliminare il più possibile il metanolo usato per l'estrazione, che risulta esso stesso tossico per le colture algali. Il quantitativo di tossine aggiunte in questo modo risulta essere all'incirca di 50 - 60 µg/l, un

valore all' incirca doppio, in alcuni casi triplo di quello normalmente rilasciato nel mezzo da una coltura di *O. ovata* (vedi cap. 13).

2F no batt + toss: replica di 1F no batt + toss

CONTROLLI:

1M: inoculo di 25 ml (500 cellule ca.) di coltura di *C. monotis* + 375 ml di F(N10, P10) 35‰ (compreso il quantitativo standard di micronutrienti).

2M: replica di 1M

No batt + metanolo: come 1F e 2F no batt + 250 µl di metanolo, per verificare l'incidenza di questo composto tossico sulla coltura di *Coolia monotis*.

6.3.2. ESPERIMENTO 2

Per verificare l'incidenza della temperatura sulla crescita, *C. monotis* è stata fatta a crescere a tre diverse temperature: 20, 25 e 30°C. Poiché la coltura di partenza per gli inoculi si trovava ad una temperatura di 20°C, prima di iniziare l'esperimento vero e proprio sono stati effettuati 2 cicli di acclimatazione per *C. monotis* sia a 25 che a 30°C. Per ogni temperatura quindi sono state effettuate 2 repliche in beute dal volume di 1l:

COOLIA 20°C 1: inoculo di 50 ml (800 cell ca.) di coltura di *C. monotis* acclimatata a 20°C, + 750ml di terreno di coltura f(N/10,P/10) +Se per arrivare a 800 ml finali;

COOLIA 20°C 2: replica di COOLIA 20°C 1

COOLIA 25°C 1: inoculo di 50 ml (800 cell ca.) di coltura di *C. monotis* acclimatata a 25°C, + 750ml di terreno di coltura;

COOLIA 25°C 2: replica di COOLIA 25°C 1;

COOLIA 30°C 1: inoculo di 50 ml (800 cell ca.) di coltura di *C. monotis* acclimatata a 30°C + 750ml di terreno di coltura;

COOLIA 30°C 2: replica di COOLIA 30°C 1.

6.3.3. ESPERIMENTO 3

Per verificare l'incidenza della temperatura sulla crescita, *O. ovata* è stata fatta a crescere a tre diverse temperature: 20, 25 e 30°C. Poiché le coltura di partenza per gli inoculi si trovava ad una temperatura di 20°C, prima di iniziare l'esperimento vero e proprio sono stati effettuati 2 cicli di acclimatazione per *O. ovata* sia a 25 che a 30°C (come in esp. 2). Per ogni temperatura quindi sono state effettuate 2 repliche in beute dal volume di 1l:

OVATA 20°C 1: inoculo di 38 ml (300 cell ca.) di coltura di *O. ovata* acclimatata a 20°C, + 762 ml di terreno di coltura f(N/10,P/10) +Se per arrivare a 800 ml finali;

OVATA 20°C 2: replica di OVATA 20°C 1;

OVATA 25°C 1: inoculo di 45 ml (300 cell ca.) di coltura di *O. ovata* acclimatata a 25°C, + 755 ml di terreno di coltura;

OVATA 25°C 2: replica di OVATA 25°C 1;

OVATA 30°C 1: inoculo di 92 ml (300 cell circa) di coltura di *O. ovata* acclimatata a 30°C + 708 ml di terreno di coltura;

OVATA 30°C 2: replica di COOLIA 30°C 1.

6.3.4. ESPERIMENTO 4

Per studiare eventuali fenomeni di competizione e allelopatia (vedi cap. 2, 4), *O. ovata* e *C. monotis* sono state fatte crescere simultaneamente alle tre diverse temperature già viste sopra, anche in questo caso previa acclimatazione (vedi esp. 2, 3). Per ogni temperatura quindi sono state effettuate 2 repliche in beute dal volume di 1l:

C + O 20°C 1: inoculi di 19 ml (150 cell ca.) di coltura di *O. ovata* e 12 ml (150 cell ca.) di coltura di *C. monotis* acclimate a 20°C, + 769 ml di terreno di coltura f(N/10,P/10) +Se per arrivare a 800 ml finali;

C + O 20°C 2: replica di C + O 20°C 1;

C + O 25°C 1: inoculi di 27,5 ml (150 cell ca.) di coltura di *O. ovata* e 12 ml (150 cell ca.) di coltura di *C. monotis* acclimatate a 25°C, + 759,5 ml di terreno di coltura;

C + O 25°C 2: replica di C + O 25°C 1;

C + O 30°C 1: inoculi di 46 ml (150 cell circa) di coltura di *O. ovata* e 15 ml (150 cell ca.) di coltura di *C. monotis* acclimatate a 30°C + 739 ml di terreno di coltura;

C + O 30°C 2: replica di C + O 30°C 1.

Sia in fase di acclimatazione che nel corso degli esperimenti, tutte le beute sono state mantenute all'interno di una camera di coltura termostata a $20\pm 2^\circ\text{C}$ (marca Angelantoni scientifica), con ciclo luce:buio 16:8 ore; la luce generata dai neon all'interno della camera è stata misurata con una sonda, ed è risultata intorno ai $115 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Periodicamente, le beute venivano spostate secondo uno schema randomizzato. Le colture a 25° e 30°C sono state mantenute all'interno di bagni in plexiglass (dimensioni 52*31*16, fig. 19) termostatati e agitati, anch'essi posti all'interno della camera.

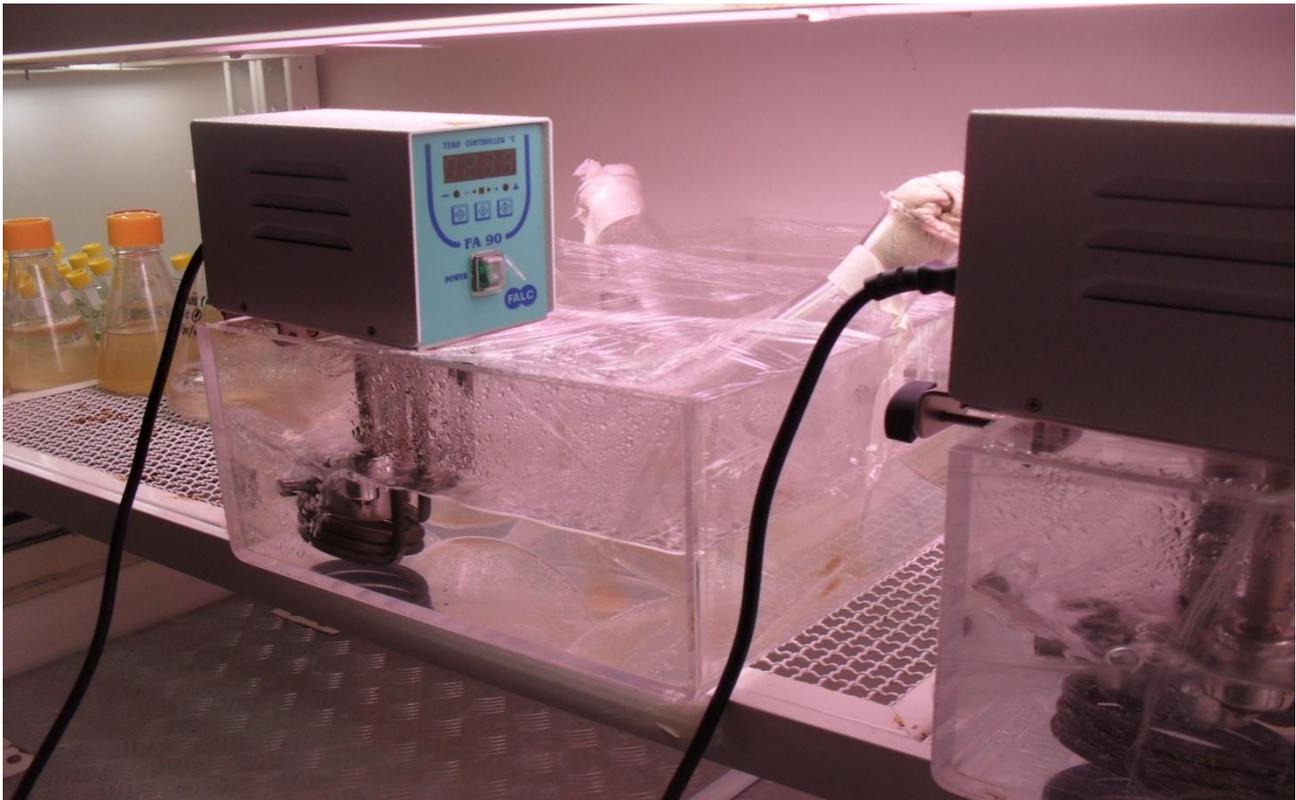


Fig. 19. Bagni termostatati.

La valutazione della crescita (vedi par. successivo) è stata effettuata tramite conteggio (tranne esp. 1) e fluorimetro PAM (cap. 7.2). Per gli esp. 2, 3 e 4 sono state effettuate anche analisi dei nutrienti (vedi cap. 8) e analisi delle tossine (vedi cap. 9).

7. VALUTAZIONE DELLA CRESCITA

7.1. CONTEGGIO

Un'aliquota variabile tra i 10 e i 50 ml è stata prelevata da ogni beuta ogni giorno durante la fase iniziale dell'esperimento, ogni 2-3 giorni nella fase terminale; per gli esperimenti 2 e 3 il prelievo è stato quindi acidificato con HCl ad una concentrazione finale di 4 mM, per poter dissolvere gli aggregati tipici di *O. ovata* e consentire un campionamento corretto per il conteggio.

La conta delle microalghe è stata effettuata prelevando 1 ml della coltura algale appena descritta, che è stato posto in una camera di sedimentazione a cui si aggiunge una goccia di soluzione Lugol acida, per fissare le alghe. Il conteggio è stato effettuato dopo un tempo di attesa, variabile fra i 30 ed i 60 minuti, per consentire la sedimentazione delle cellule, così come stabilito dal metodo di Utermöhl, attualmente l'unico metodo per il quale esiste un protocollo completo ufficiale (UNI EN 15204 Water quality. Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopes. Utermöhl technique). Per poter osservare, distinguere e contare il campione, è stato adoperato il microscopio rovesciato (mod. Axiovert 100 ZEISS) con ingrandimento 320x (fig. 20).

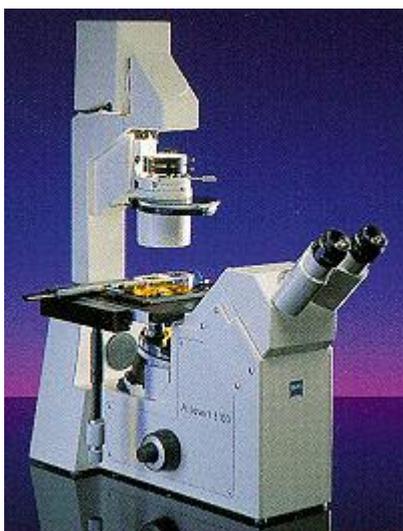


Fig. 20. Microscopio rovesciato.

Nel conteggio per strisciata si contano le cellule algali sedimentate che si trovano comprese in un rettangolo che ha come dimensioni (a) il diametro del campo inquadrato dall'oculare e (b)

il diametro della camera di sedimentazione. E' buona norma contare lungo diversi diametri per diminuire l'errore di conteggio. Nei nostri esperimenti abbiamo contato le cellule algali almeno lungo quattro diametri della camera di sedimentazione. 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 (a x b) nel seguente modo:

il diametro della camera di sedimentazione misura 24 mm, quindi l'area di tale camera misura $452,16 \text{ mm}^2$; utilizzando l'ingrandimento 320x il rettangolo ha le seguenti dimensioni: lato b = diametro della camera (24 mm); lato a = $620 \mu\text{m}$, di conseguenza l'area è di $14,88 \text{ mm}^2$. Il fattore di moltiplicazione $F = 452,16/14,88 = 30,4$.

7.1.1. CURVA DI CRESCITA

La crescita delle cellule algali in colture con volume limitato e nutrienti necessari, cresciute in adatte condizioni di luce, temperatura ed areazione presenta un andamento tipico sigmoidale, che consta di quattro fasi (fig. 21):

- 1) **Fase lag** durante la quale l'alga si adatta al nuovo ambiente che la circonda, per cui non vi è aumento del numero di cellule. La sua durata è variabile, a seconda delle dimensioni dell'inoculo, delle condizioni fisiologiche della cellula algale e delle condizioni di coltura.
- 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 o di morte della coltura**. In questa fase i nutrienti si esauriscono sempre di più, e le cellule cominciano a morire, si lisano ed il loro numero totale diminuisce progressivamente.

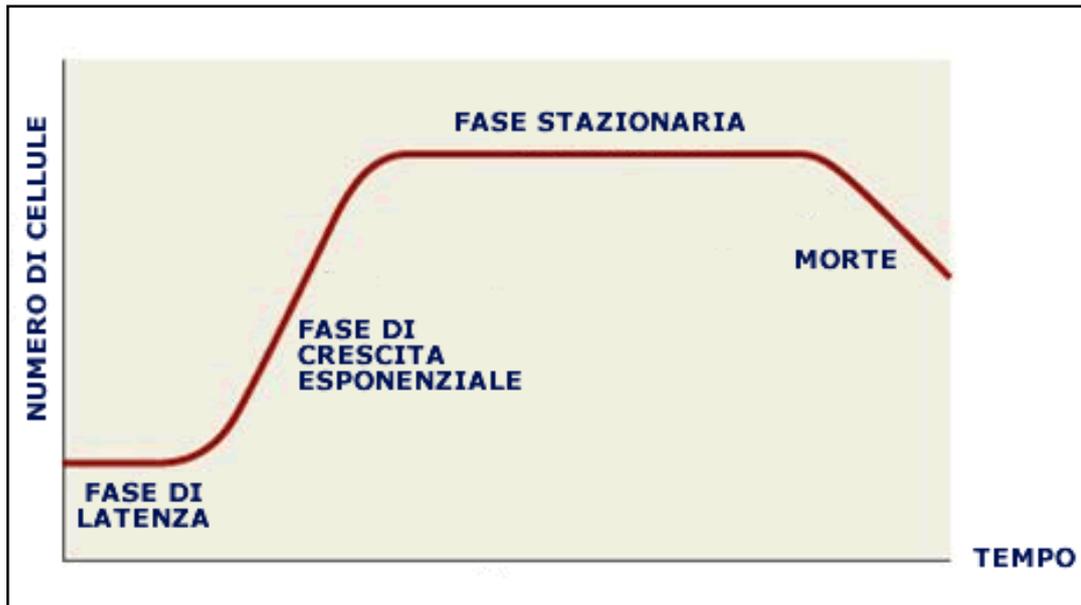


Fig. 21. Esempio di curva di crescita

E' possibile calcolare la velocità di crescita specifica prendendo due punti della curva di crescita durante la fase esponenziale, quando la curva mostra la massima pendenza. I due valori di N scelti, N_1 e N_2 , corrispondono sull'asse delle ascisse al tempo misurato in giorni, rispettivamente t_1 e t_2 , e sull'asse delle ordinate al numero di cellule su millilitri di coltura filtrati. Il tasso di crescita, μ , può essere misurato applicando la seguente formula:

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{N_2}{N_1}\right)}{t_2 - t_1}$$

7.2. MISURA DELL'ATTIVITA' FOTOSINTETICA TRAMITE FLUORIMETRO PAM

L'energia assorbita dalla clorofilla va incontro a tre diversi destini: può essere utilizzata per la fotosintesi (fotochimica), dissipata come calore o riemessa come fluorescenza, ovvero come fotoni con una lunghezza d'onda maggiore. Attraverso il fluorimetro PAM (marca WALZ,

mod. ED-101US/M, fig. 22), in grado di misurare la fluorescenza, possiamo stimare l'efficienza fotosintetica delle cellule.

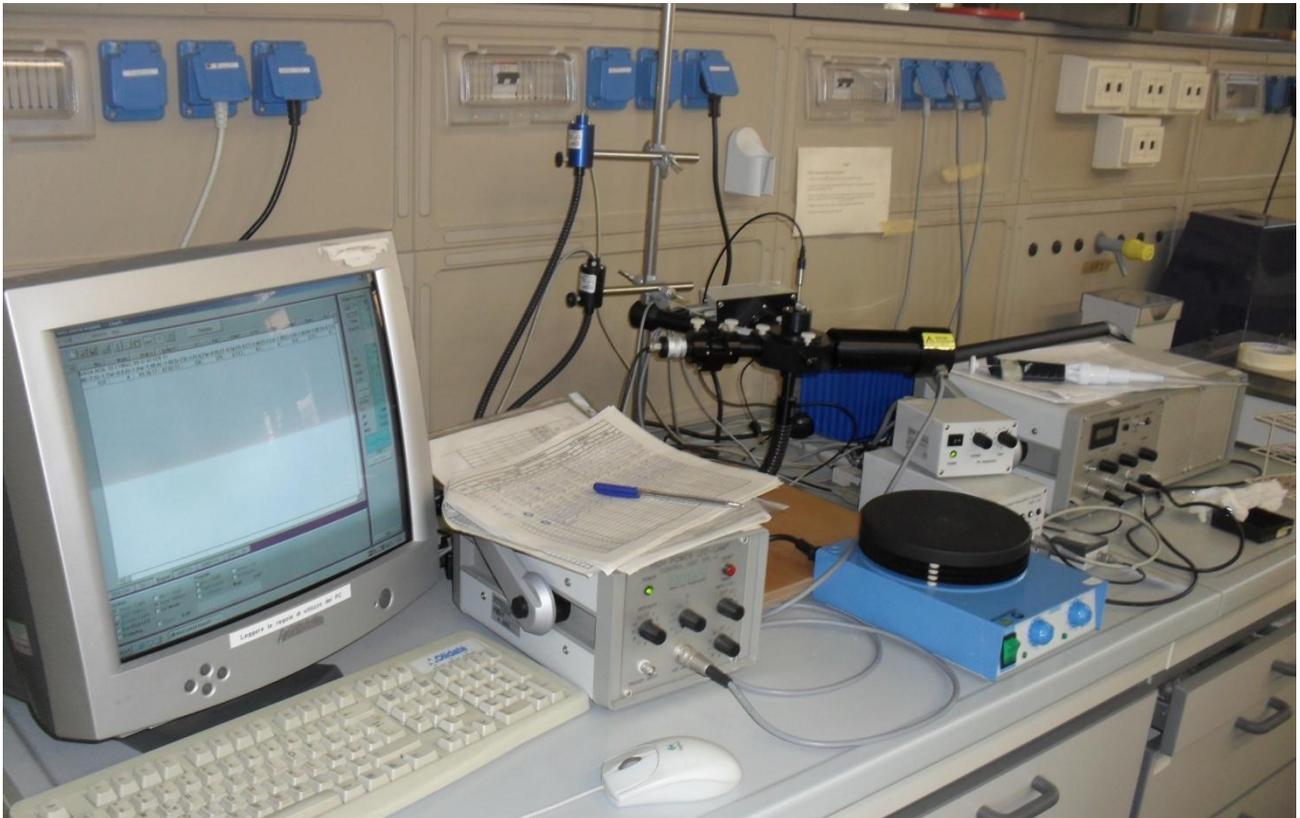


Fig. 22. Fluorimetro PAM.

Kautsky nel 1930 ha osservato come le alghe in seguito ad una leggera illuminazione, che non stimoli la fotosintesi, mostrino un aumento di fluorescenza da zero a un livello basso costante detto F_0 . F_0 cresce fino al livello massimo F_m se l'illuminazione è abbastanza forte. La differenza fra F_m e F_0 è detta fluorescenza variabile F_v (Kautsky and Hirsch, 1931).

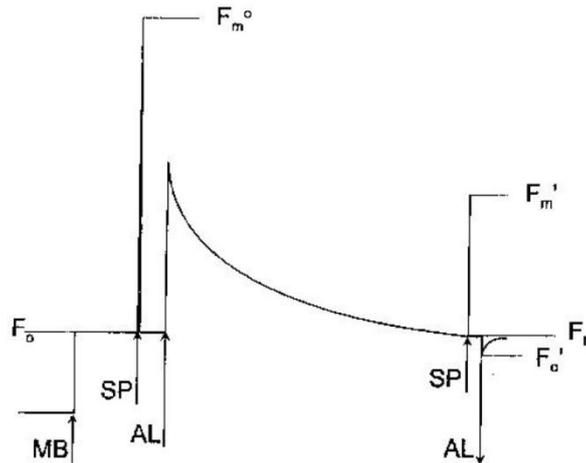


Fig. 23. Fluorescenza emessa dalle alghe in seguito ai diversi impulsi luminosi somministrati.

Per l'analisi al PAM vengono prelevati 5 ml di coltura che vengono adattati al buio per 20 minuti, quindi la sospensione viene posizionata in una cuvetta all'interno dello strumento e illuminata da un raggio di luce MB sufficiente a stimolare la fluorescenza ma non la fotosintesi; il valore che si registra rappresenta il livello minimo di fluorescenza F_0 (quando tutti i centri di reazione aperti e disponibili per la fotosintesi). Successivamente si invia un lampo di luce saturante SP (luce ad alta intensità di circa $3000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) che riduce gli accettori del fotosistema II; in questo modo si ottiene F_m , ovvero il massimo valore di fluorescenza. Da queste misure si può ricavare il rendimento quantico massimo:

$$\frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_0)}{F_m}$$

Fig. 24. rendimento quantico massimo

A questo punto viene fornita una luce attinica (AL) tale da consentire la fotosintesi; si può osservare un aumento transitorio di fluorescenza dovuto alla riduzione dei chinoni e all'intervallo di tempo necessario per far iniziare l'organizzazione del carbonio (in quanto gli enzimi deputati alla fissazione necessitano di essere attivati dalla luce). Fornendo una luce continua la fluorescenza diminuisce in quanto inizia la fotosintesi (quenching fotochimico) fino a raggiungere un valore costante F_t . Se dopo un certo intervallo di tempo (in genere 5 min) viene fornito un altro impulso luminoso di luce saturante SP si ottiene il valore della

fluorescenza massima del campione alla luce F_m' , in genere più basso di quello del campione adattato al buio (F_m).

$$\frac{(F_m' - F_t)}{F_m'}$$

Fig. 25 rendimento quantico effettivo

Lo strumento fornisce il rendimento quantico effettivo del processo di trasferimento di elettroni a livello del fotosistema II, in altre parole determina in quale proporzione la luce assorbita dalla clorofilla viene utilizzata per la fotosintesi (efficienza dei centri di reazione del PSII alla luce). Tale valore riferito alle $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ di luce assorbite, serve ad individuare la capacità fotosintetica in vivo (è un indice dello stato di salute delle cellule, durante le fasi di crescita della coltura).

La differenza tra F_m e F_m' invece è indicativa dell'energia dissipata come calore.

Inoltre è possibile ottenere i valori rappresentativi del quenching fotochimico $(F_m' - F_t)/(F_m' - F_0')$, che riflette lo stato redox dell'accettore primario del PSII (il QA); e del quenching non fotochimico $(F_m - F_m')/(F_m - F_0)$, cioè l'energia dissipata come calore, legata all'energizzazione della membrana dei tilacoidi (ciclo delle xantofille).

8. ANALISI DEI NUTRIENTI

I nutrienti analizzati costituiscono un'importante parte dell'esperimento volto ad osservare la crescita delle microalghe in coltura. Le analisi dei nutrienti (fosfati e nitrati) vengono effettuate sull'acqua di coltura filtrata con filtri GF/C WHATMAN, e raccolta in bottiglie di plastica con capacità di 250 ml, precedentemente lavate con acido cloridrico.

8.1. ANALISI DEI FOSFATI

50 ml di acqua distillata (bianco), e 50 ml di acqua di coltura per ogni beuta (precedentemente filtrata) vengono versati in cilindri graduati della capacità di 50 ml, dotati di tappo in plastica. Viene preparato un reattivo misto, contenente una soluzione di molibdato ammonico (15 g in 500 ml di acqua distillata), una soluzione di acido solforico (28 ml di acido solforico al 96 % in 180 ml di a.d.), una soluzione di acido ascorbico (27 g in 500 ml di a.d.) e una di tartrato di potassio e antimonile (0,34 g in 250 ml di a.d.), aggiunte nella proporzione 2:5:2:1. I campioni vengono fatti reagire con il reattivo misto, aggiungendo 5 ml di quest'ultimo in ogni cilindro, che viene infine sigillato con parafilm e agitato vigorosamente. Dopo 10 minuti la reazione tra l'acqua e il reattivo misto fa sì che il campione assuma una colorazione blu (fig. 30), la cui intensità varia in maniera direttamente proporzionale alla concentrazione di fosfati presenti. Si procede con l'analisi utilizzando uno spettrofotometro (UV/VIS Jasco 7800), ad una lunghezza d'onda di 885 nm. Si riempiono entrambe le cuvette con il campione contenente acqua distillata e si effettua l'autozero. Si procede poi alla lettura dei campioni riempiendo la cuvetta anteriore con l'acqua di coltura ed effettuando la lettura a 885 nm a cui viene sottratto il valore del bianco.

8.2. ANALISI DEI NITRATI

Per l'analisi dei nitrati, i campione prelevati e filtrati vengono diluiti con acqua di mare sintetica fino ad un volume di 100 ml. Oltre ai campioni si prepara anche un bianco costituito esclusivamente da acqua di mare sintetica e uno standard, costituito da 100µl di soluzione

standard di nitrato portato a un volume di 100 ml con acqua di mare sintetica. Ai campioni, allo standard e al bianco così preparati sono aggiunti 2 ml di cloruro di ammonio concentrato (NH_4Cl) al 25%. Successivamente i campioni vengono fatti passare in una colonna (fig. 26) contenente cadmio ramato per la riduzione dei nitrati a nitriti.



Fig. 26. Colonnine di riduzione.

Nel passaggio attraverso la colonna di riduzione i primi 45 ml vengono scartati, mentre 50 ml vengono raccolti in matracci di vetro da 50 ml di capacità.

A questi ultimi vengono aggiunti 2 ml di soluzione di SA (solfanilammide all'1%) e dopo 3 minuti, 1 ml di soluzione di NEDA (naftiletildiammina allo 0,1%); si attende che avvenga la reazione colorimetrica per 15 minuti (fig. 29), dopo di che si misura allo spettrofotometro l'assorbanza della soluzione a 543 nm contro acqua distillata, usando una cuvetta con cammino ottico da 1 cm. Per la determinazione dei nitrati, occorre sottrarre ai valori di assorbanza ottenuti per i campioni il rispettivo valore del bianco e procedere alla determinazione del fattore F.

$$F = \frac{[N]di NO_3(0,14 ppm)}{abs(st) - abs(bianco)}$$

Fig. 27. Calcolo del fattore F per la determinazione dell'efficienza della colonnina (può disattivarsi man a mano che la si usa o se resta inoperosa per molto tempo).

Quando si impiega uno spettrofotometro F dovrebbe avere un valore compreso tra 0,31 per un'efficienza del 100%, e 0,37, per un'efficienza dell'84%. Dopo il calcolo del fattore F la concentrazione dei nitrati si ottiene nel seguente modo:

$$mg/l(Ndi NO_3) = \frac{F \cdot [abs(c) - abs(bianco)] \cdot 100}{V}$$

Fig. 28. Concentrazione dei nitrati; F = fattore, abs (c) = assorbanza del campione corretta per i valori del bianco e per l'assorbanza dei nitriti, V = è il volume in ml di acqua in esame prelevata per l'analisi.



Fig. 29. Reazione colorimetrica per l'analisi dei nitrati.



Fig. 30. Reazione colorimetrica per l'analisi dei fosfati.

9. DETERMINAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DELLE TOSSINE

500 ml di ogni coltura impiegata negli esperimenti 3 e 4 è stato raccolto al giorno 22 (fase stazionaria), dopo aver unito le repliche di ogni condizione (altrimenti il materiale di coltura sarebbe risultato scarso per questo tipo di analisi); la raccolta è stata effettuata per mezzo di una filtrazione gravitativa su filtri GF/F (WHATMAN), che ha permesso di separare le cellule algali dal medium. I filtri, dopo essere stati conservati almeno qualche ora ad una temperatura di -80°C, sono stati posti all'interno di un tubo da centrifuga, cui sono stati aggiunti 12 ml di una soluzione metanolo:acqua 1:1. Il tutto è stato sonicato per 3 min (sonicatore marca Sonicator, modello XL), dopodichè centrifugato a 12000 rpm per 15 min a 4°C (marca Beckman, modello J2-HS); il sopranatante è stato quindi raccolto in un vial di vetro. La procedura descritta è stata ripetuta altre due volte aggiungendo ad ogni ciclo 8 ml della soluzione metanolo:acqua, infine il sovranatante viene portato con la stessa soluzione ad un volume finale di 30 ml e conservato a -20°C.

Al medium, raccolto in bottiglie di plastica da 1000 ml precedentemente lavate con acido cloridrico, sono stati aggiunti 300 ml di butanolo, poi conservato a temperatura ambiente. Prima di effettuare la filtrazione sono state contate le cellule presenti nelle colture con il metodo dell'acidificazione (cap. 7.1), in modo da poter rapportare la quantità di tossina rilevata al numero cellulare. La determinazione quali-quantitativa delle tossine degli estratti algali e del mezzo di coltura è stata eseguita presso il Dipartimento di Chimica delle sostanze naturali dell'Università Federico II di Napoli tramite la cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa (LC-MS) (Ciminiello et al. 2007). La determinazione quantitativa delle tossine nei campioni è stata ottenuta in maniera indiretta, utilizzando come standard la palitossina; il limite di rilevabilità dello strumento per lo standard di palitossina è di 17 ng/ml.

RISULTATI

10. CRESCITA DI *Coolia monotis* A DIVERSE TEMPERATURE

10.1. CURVE DI CRESCITA DI *C. monotis*

La crescita di *Coolia monotis* è stata valutata alla temperatura di 20, 25 e 30°C, effettuando conteggi delle cellule al microscopio per un periodo di crescita di 14 giorni; tali conteggi sono stati rappresentati in una curva semi-logaritmica, in cui sull'asse delle ascisse è riportato il tempo, in giorni, e nell'asse delle ordinate il logaritmo del numero di cellule per millilitro di coltura (fig. 31).

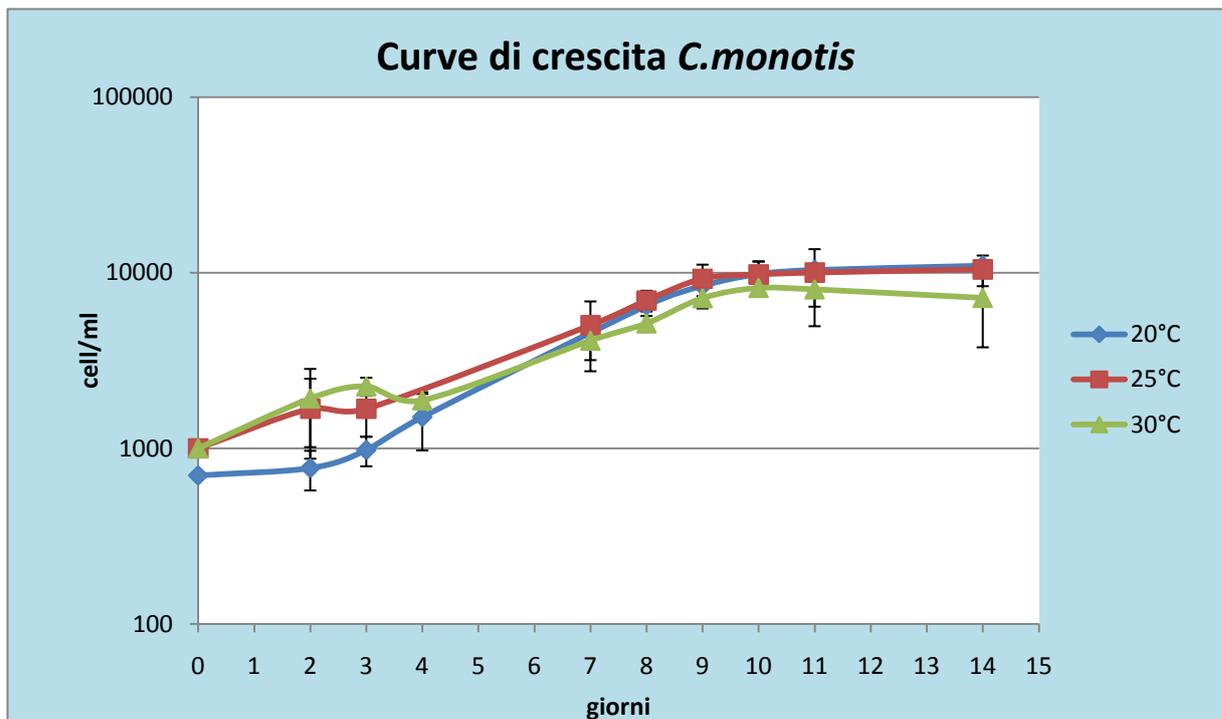


Fig. 31. Curve di crescita di *C. monotis* alle tre temperature.

Nelle curve sopra riportate è possibile osservare le tre tipiche fasi della crescita, generalmente riportate per le colture di microalghe (cap. 7.1.1, fig. 21). I primi 2-3 giorni rappresentano il periodo di adattamento delle cellule al nuovo mezzo di coltura (fase lag); nei successivi sei giorni le cellule si trovano in fase esponenziale, per poi entrare in fase stazionaria.

Utilizzando la formula descritta nel cap. 7.1.1, è stato calcolato il tasso di crescita (μ) per *C. monotis* alle tre diverse temperature durante la fase esponenziale (tab. 5):

Temperatura (°C)	Tasso di crescita μ (day ⁻¹)	n° cell max	day
20	0,37	10983	14
25	0,30	10453	14
30	0,28	8210	10

Tab. 5. Tasso di crescita e numero massimo di cellule raggiunto con il relativo giorno di crescita alle tre temperature.

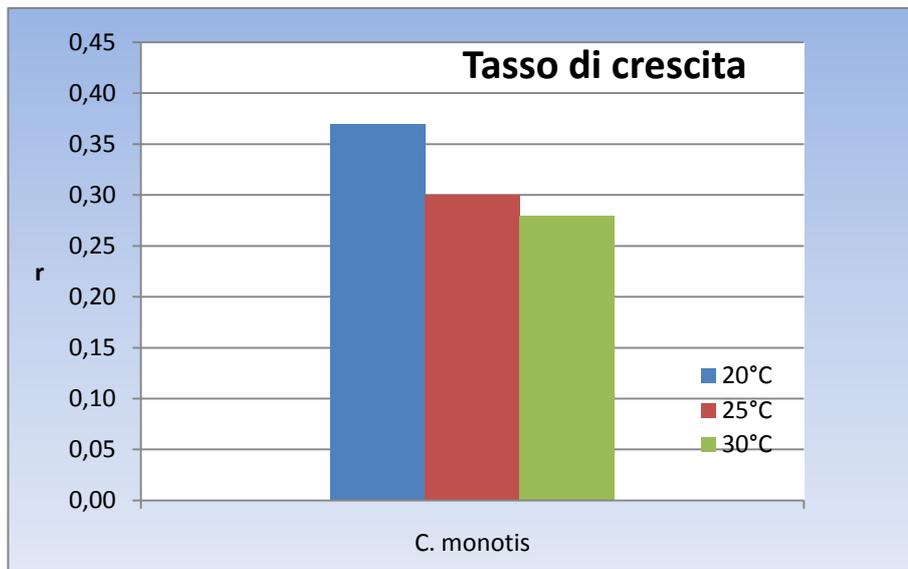


Fig. 32. Tasso di crescita alle tre temperature.

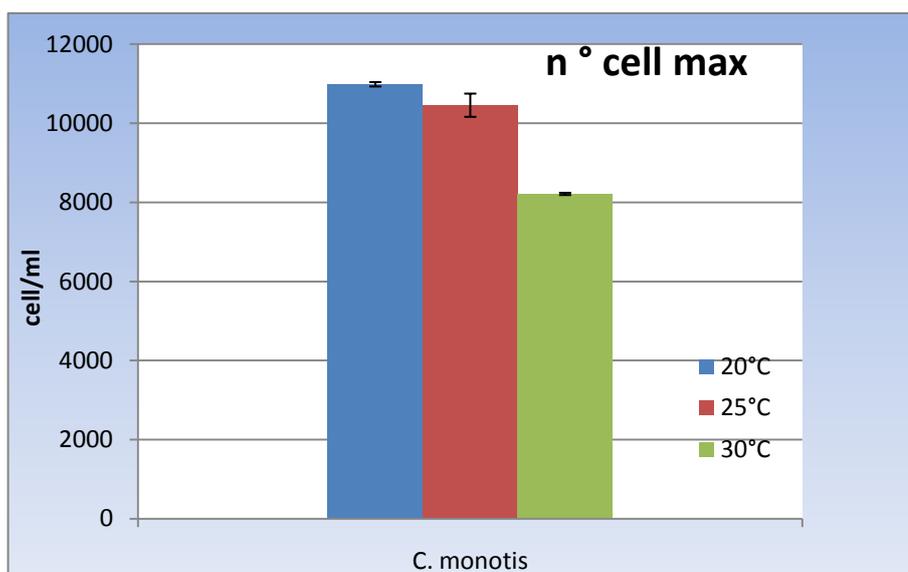


Fig. 33. Numero di cellule massimo raggiunto alle tre temperature.

Dalla tab. 5 e dalle fig. 32 e 33, si osserva che il ceppo di *C. monotis* utilizzato per lo studio predilige la temperatura di 20°C per la crescita, dove mostra sia un tasso di crescita maggiore che un numero di cellule più elevato.

Alla temperatura più alta, l'alga in questione manifesta lo stress più elevato, con un μ e un numero massimo di cellule più basso. Inoltre, in quest'ultimo caso, già al 14° giorno la coltura mostra un calo del numero di cellule rispetto al giorno 10, segno dell'inizio della fase di declino.

Questi risultati sono opposti a quelli riportati da Morton et al. (1992) su un ceppo di *C. monotis* delle isole Keys (Florida, USA), che manifestava un optimum di crescita a 29°C (vedi 2.4.1.6).

Questo confronto sottolinea l'ipotesi che ceppi differenti di dinoflagellate della stessa specie, provenienti da zone diverse, possano differire nelle caratteristiche eco-fisiologiche (cap. 2.4.2), come già osservato per *O. ovata* (Guerrini et al., 2010).

10.2. EFFETTO DELLA TEMPERATURA SULL'EFFICIENZA FOTOSINTETICA DI *C. monotis*

Di seguito sono riportati i grafici relativi al rendimento quantico massimo (fig. 34), misurato dopo adattamento delle alghe al buio, e al rendimento quantico effettivo (fig. 35), misurato dopo esposizione alla luce.

Queste misure sono state effettuate sulle stesse colture di *C. monotis* su cui è stata valutata la crescita.

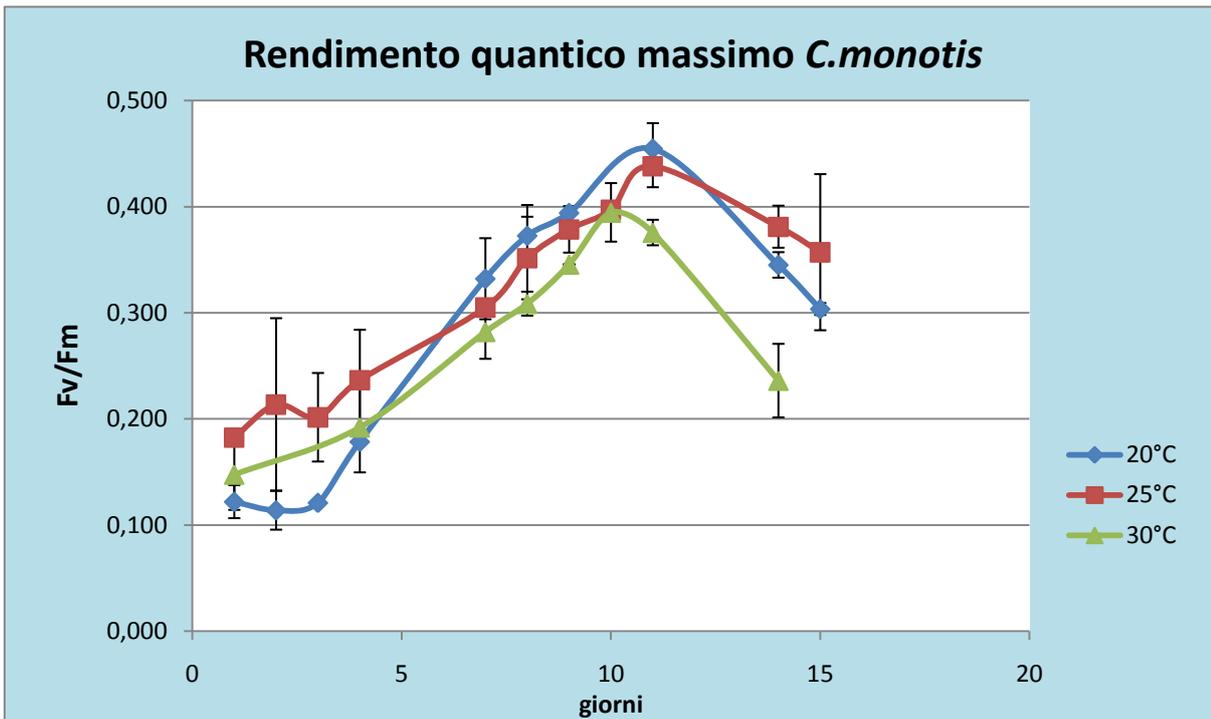


Fig. 34. Rendimento quantico massimo alle tre temperature.

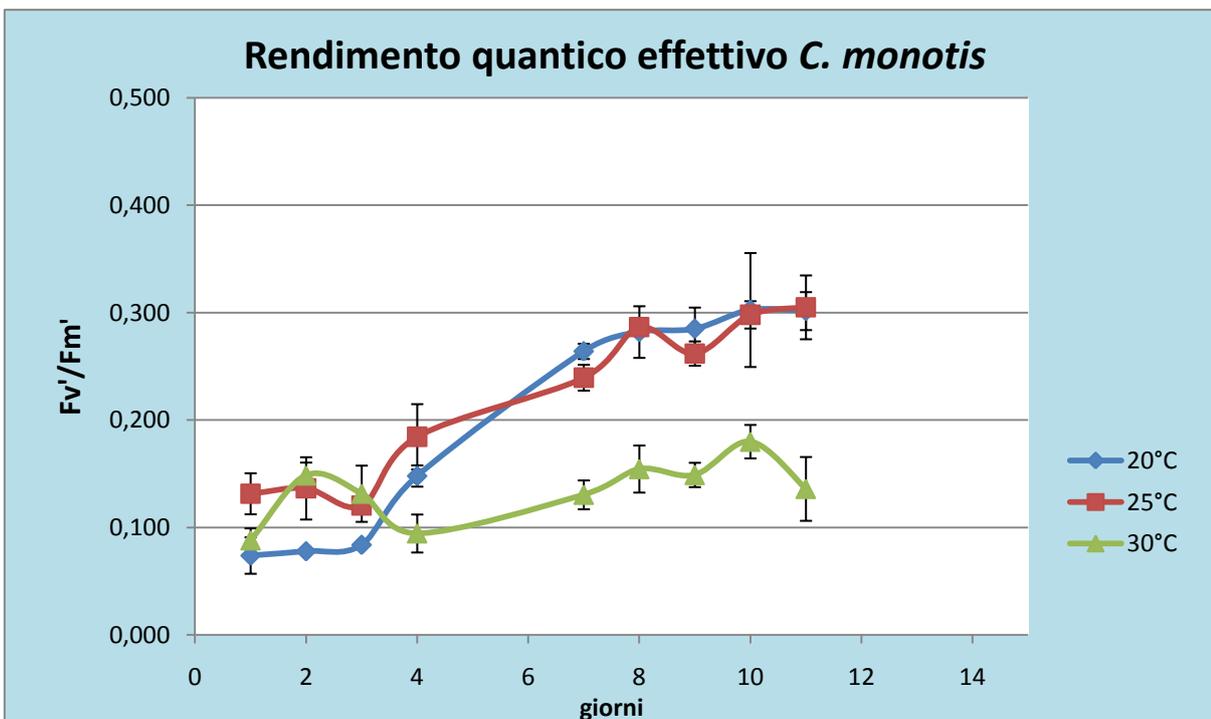


Fig. 35. Rendimento quantico effettivo alle tre temperature.

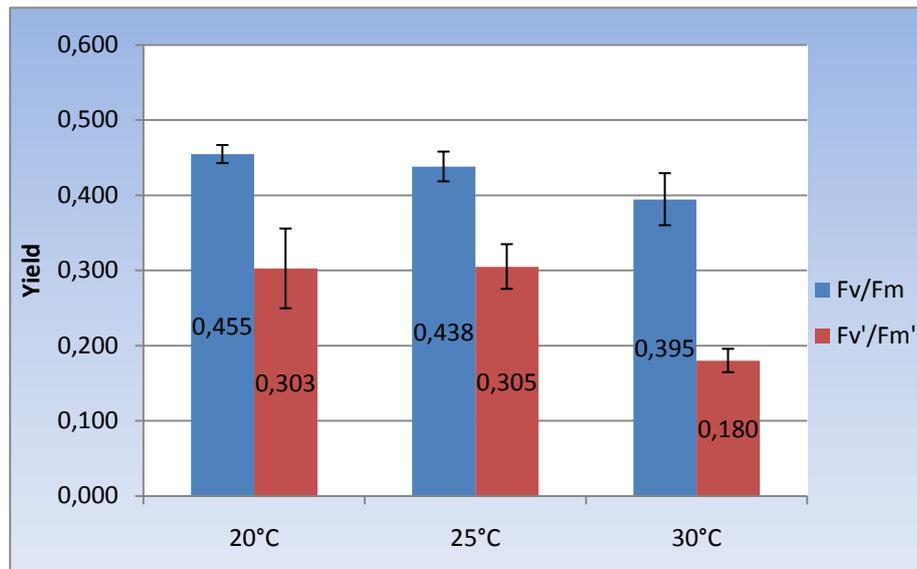


Fig 36. Rendimento quantico massimo ed effettivo più alto alle tre temperature.

I dati riportati nelle fig. 34, 35 e 36 supportano chiaramente quanto osservato nelle curve di crescita di *C. monotis* alle tre temperature; la coltura posta a 20°C mostra un rendimento quantico fotosintetico al buio più elevato delle altre, anche se di poco maggiore della coltura a 25°C, che invece ha raggiunto un rendimento effettivo leggermente più alto.

La coltura a 30°C invece si configura ancora una volta come quella soggetta a maggior stress, con lo yield massimo più basso, ma in particolare con uno yield effettivo, probabilmente miglior indicatore dello stato di salute delle cellule, particolarmente scarso durante tutta la crescita.

Le fluttuazioni osservabili in fig. 34 e 35 per le curve a 25 e 30°C sono probabilmente riconducibili ad alcune problematiche insorte in situazioni isolate al fine di mantenere costanti le temperature dei bagni, oltre a difficoltà nell'effettuare opportune diluizioni su prelievi di *C. monotis* contenenti elevati numeri di cellule.

Comparando le curve di crescita con quelle del rendimento quantico, è interessante notare come queste ultime rispettino fedelmente le fasi di crescita ottenute con il conteggio (per tutti gli esperimenti dello studio), in particolare l'andamento del rendimento quantico effettivo sembra precedere di uno, a volte due giorni un eventuale aumento o diminuzione nel numero di cellule, dimostrando l'efficacia di affiancare uno strumento come il fluorimetro PAM nello studio della crescita microalgale.

Infine da una attenta analisi delle curve sia di crescita che di efficienza fotosintetica, emerge che nei primi 3 o 4 giorni le cellule a temperatura più alta (25 e 30°C) crescono meglio di

quelle a 20°C, che però ben presto invertono questa tendenza. Questo punto verrà discusso più ampiamente nel paragrafo successivo.

10.3. CONSUMO DEI NUTRIENTI DURANTE LA CRESCITA DI *C. monotis*

Di seguito sono riportati i grafici relativi al consumo di nitrati e fosfati individualmente (fig. 37) e in relazione con le curve di crescita alle tre temperature (fig. 38). I nutrienti sono stati misurati come descritto al cap. 8, effettuando prelievi sulla stessa coltura di cui è stata precedentemente riportata la crescita e il rendimento quantico fotosintetico.

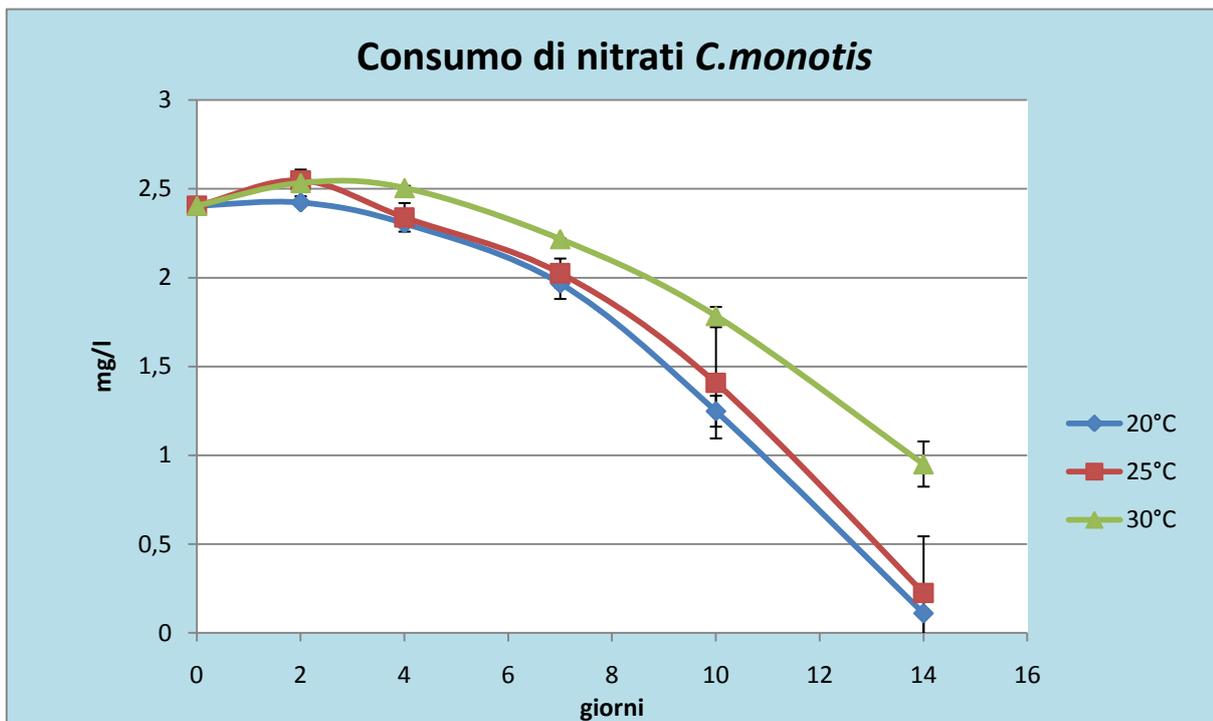


Fig. 37. Consumo di nitrati alle tre temperature.

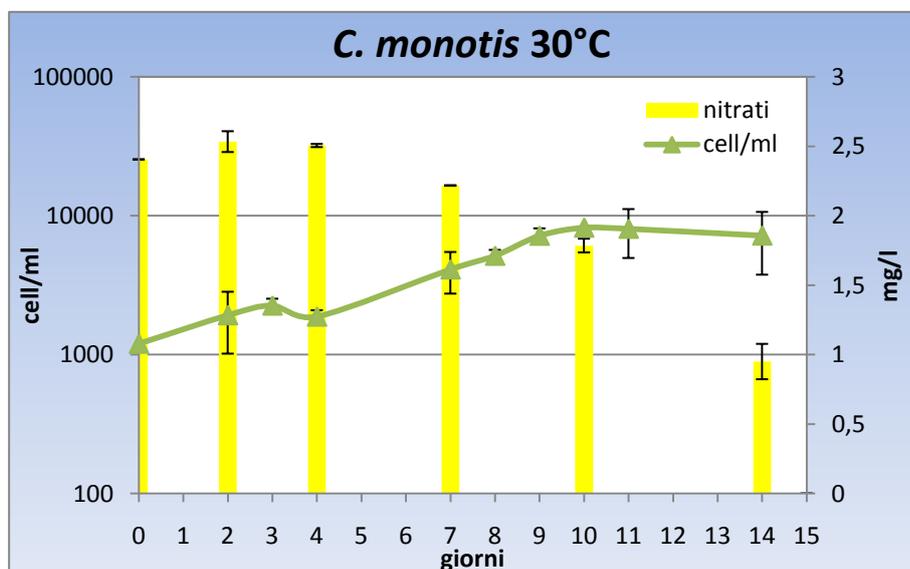
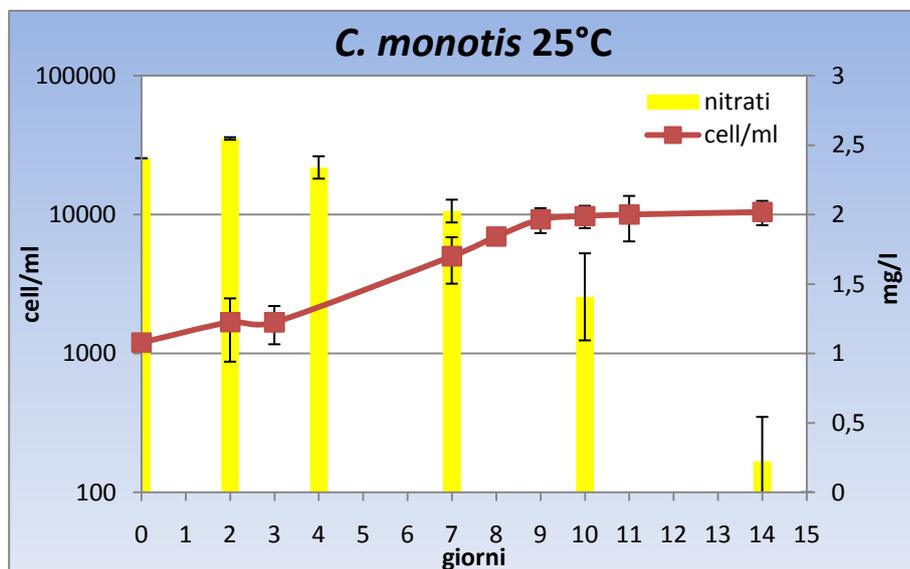
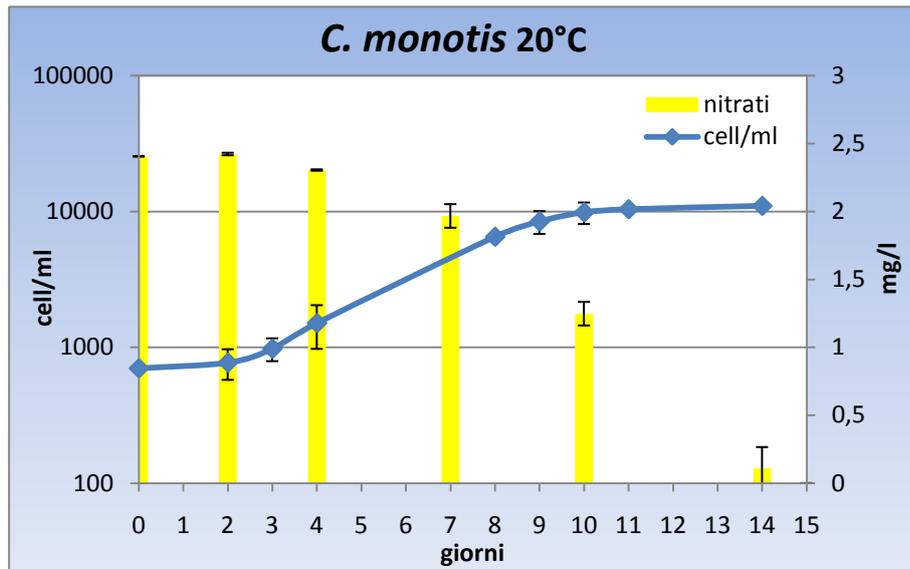


Fig. 38. Consumo di nitrati in relazione con le curve di crescita alle tre temperature.

L'andamento parabolico delle curve riportate in fig. 37, tipico delle colture batch, rappresenta il costante assorbimento di nitrati da parte delle colture, che utilizzano queste sostanze per la crescita.

Il giorno 2 ha un valore maggiore del giorno 0 poiché la concentrazione di nitrati in quest'ultimo è stata misurata sul terreno prima dell'inoculo, il quale apporta al medium un ulteriore quantitativo di macronutrienti.

Osservando la fig. 38, si nota che mentre le colture a 20 e 25°C, che in fase stazionaria raggiungono circa lo stesso numero cellule, al 14° giorno hanno quasi terminato il quantitativo di nitrati a disposizione, la coltura a 30°C presenta ancora una quantità elevata di nitrati pur essendo già entrata in fase di declino.

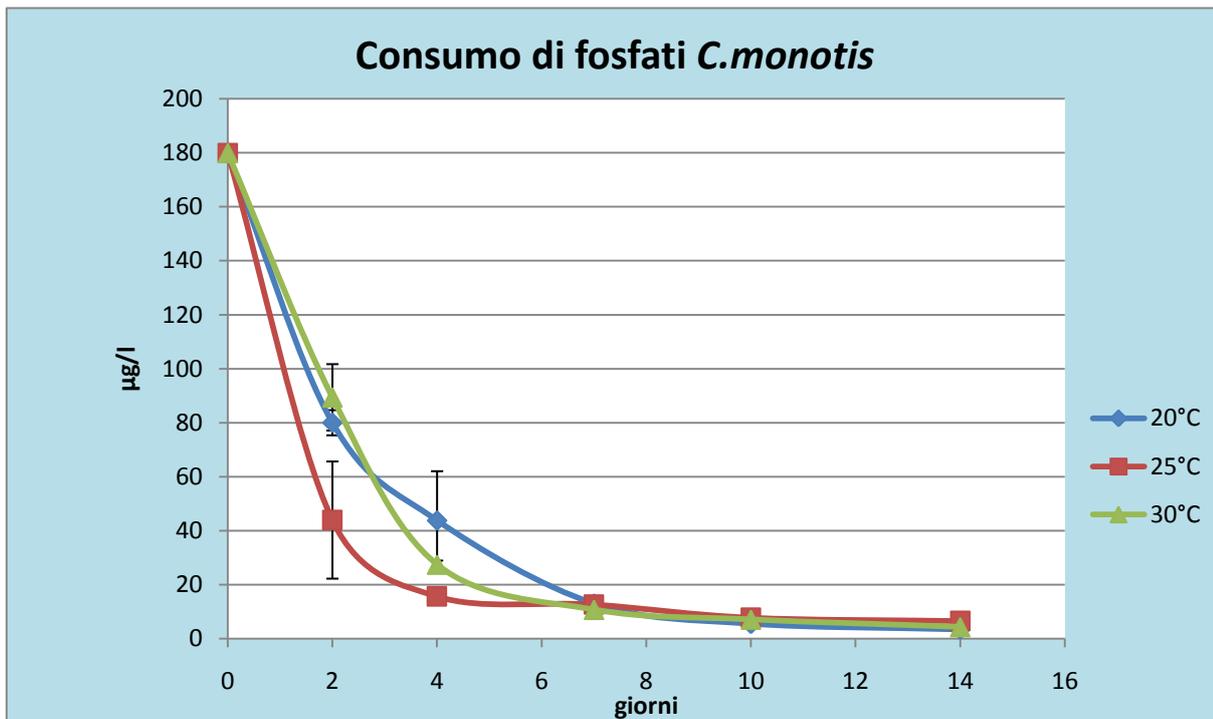


Fig. 39. Consumo di fosfati alle tre temperature.

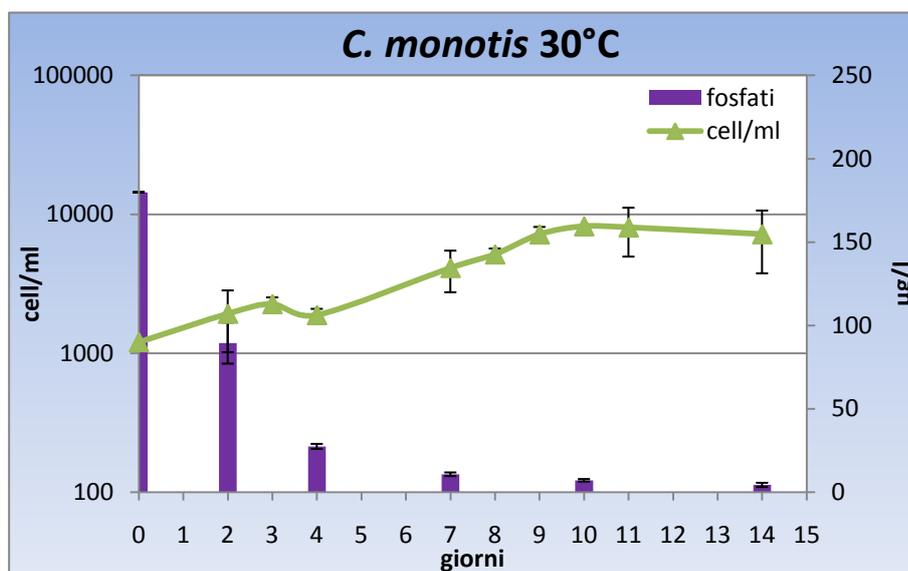
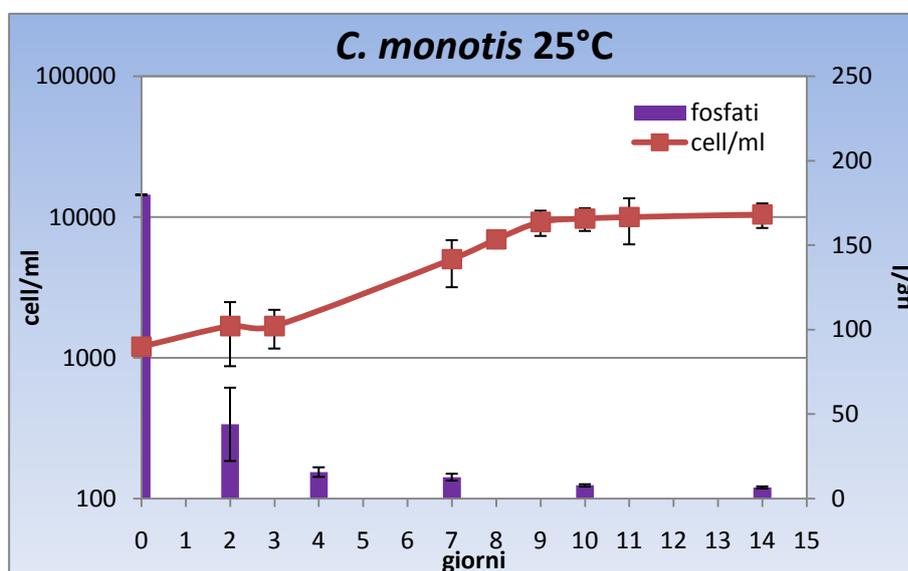
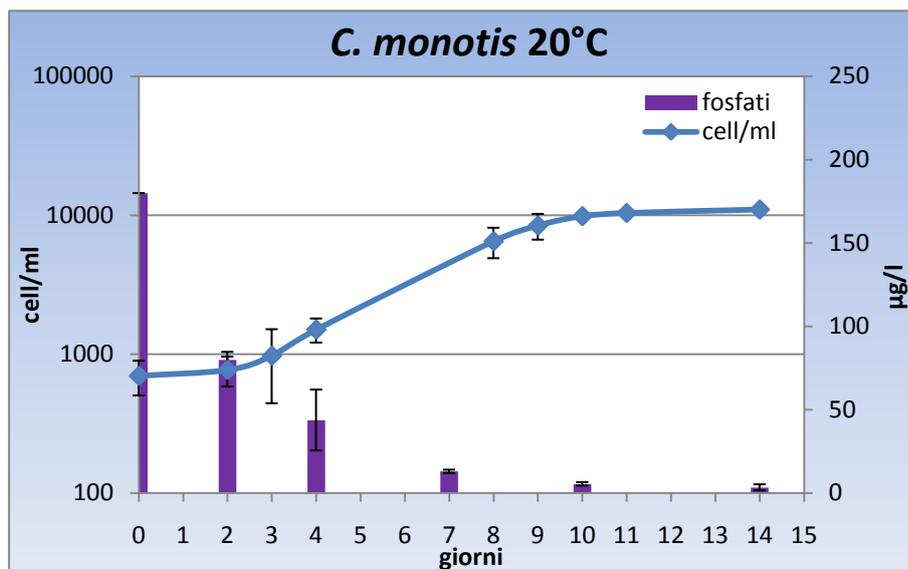


Fig. 40. Consumo di fosfati in relazione con le curve di crescita alle tre temperature.

L'andamento del consumo dei fosfati per *C. monotis* presenta un pattern ben diverso da quello osservato per i nitrati; le curve sono iperboliche, caratterizzate da un veloce utilizzo nei primi giorni, per poi rallentare dal giorno 7 in avanti, dopo aver raggiunto valori prossimi allo zero. Al contrario di quanto osservato per i nitrati, in questo caso le colture alle temperature più alte (25 e 30°C) denotano un consumo iniziale di fosfati maggiore rispetto alla coltura a 20°C, che tuttavia dal giorno 7 raggiunge valori simili alle altre.

Da quest'analisi è possibile ipotizzare che i fosfati siano i macronutrienti limitanti per le colture, e che quindi le colture a 25 e 30°C abbiano una crescita inferiore non soltanto a causa di uno stress fisiologico dovuto alla temperatura, ma anche ad una carenza di nutrienti che subentra prima a temperature elevate; un assorbimento iniziale più rapido, dovuto probabilmente ad una cinetica enzimatica positivamente correlata con la temperatura, porta ad un prematuro esaurimento dei fosfati; inoltre si potrebbe anche supporre che lo stress fisiologico, riducendo l'efficienza dei fotosistemi (come confermato dalle curve di rendimento fotosintetico, fig. 34, 35) e quindi la produzione di ATP, induca l'attivazione dei carrier proteici presenti sulla membrana cellulare per un maggior assorbimento di nutrienti.

11. CRESCITA DI *O. ovata* A DIVERSE TEMPERATURE

11.1. CURVE DI CRESCITA *O. ovata*

In generale non è facile effettuare un prelievo omogeneo dalle colture di questa specie (il che si riflette in un andamento fluttuante delle curve, caratterizzato da ampi errori standard specie in fase stazionaria e in differenze tra gli inoculi di partenza), in quanto *O. ovata*, come *C. monotis*, è nota per la caratteristica formazione di microfilm o patine mucillaginose che ricoprono le superfici vegetali, animali o minerali. Gli stessi microfilm si formano inizialmente sulle pareti delle beute, per poi espandersi in sospensione nel mezzo. Questo si verifica in maniera più marcata nel periodo di fase stazionaria, quando l'esaurimento dei nutrienti porta le cellule a produrre e rilasciare una maggiore quantità di materiale polisaccaridico. Detto fenomeno è ampiamente conosciuto per varie specie fitoplanctoniche ed è stato verificato anche per altri dinoflagellati bentonici (Heil et al., 1993) tra le quali *P. lima* (Pistocchi et al., 2006).

E' pertanto molto difficile prelevare un campione omogeneo e rappresentativo dalle beute in cui sono presenti zone con addensamenti di cellule e zone più fluide (fig. 41).



Fig. 41. Aggregati mucilluginosi di *O. ovata* al microscopio.

Per ovviare a questo inconveniente, sui prelievi per il conteggio delle colture di *O. ovata* e di quelle miste è stata effettuata un'acidificazione blanda dei campioni con aggiunta di HCl a

una concentrazione finale di 4 mM, metodo già sperimentato con colture di diatomee (Pistocchi et al., 1997), in grado di allentare i legami tra i polisaccaridi e quindi a facilitare il successivo conteggio delle cellule.

Allo stesso modo di *C. monotis*, la crescita di *O. ovata* è stata valutata alla temperatura di 20, 25 e 30°C, effettuando conteggi delle cellule al microscopio per un periodo di crescita di 22 giorni (fig. 42).

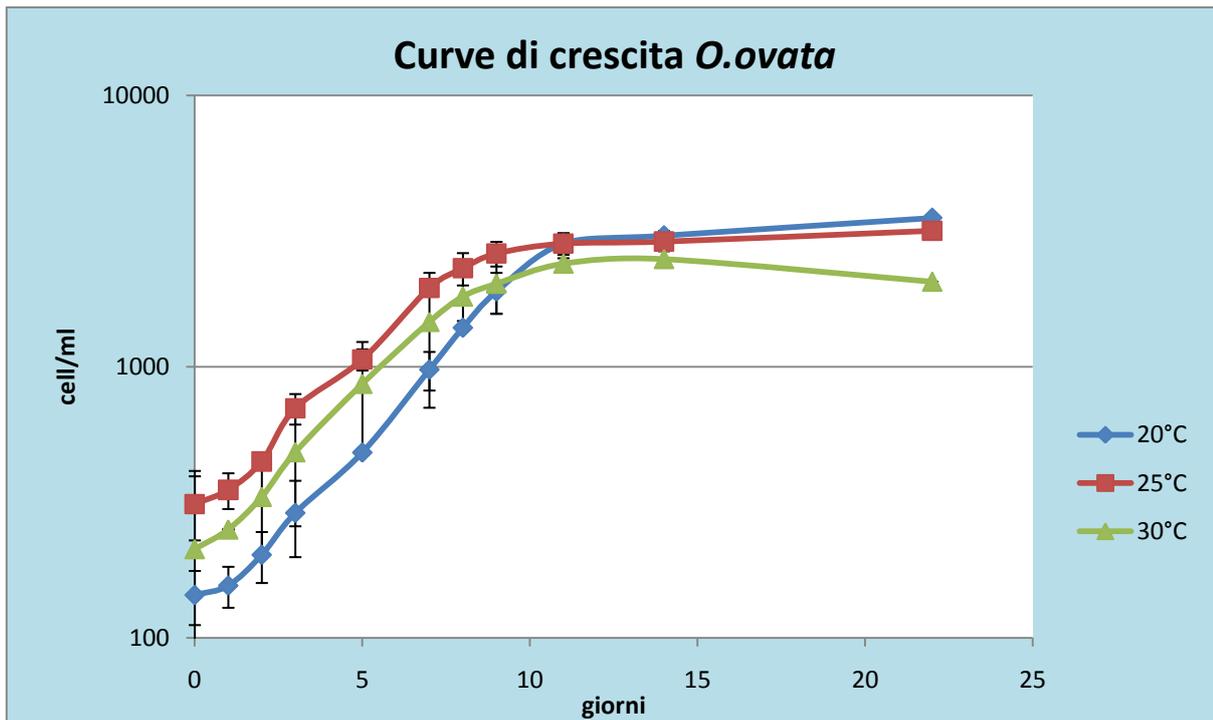


Fig. 42. Curve di crescita di *O.ovata* alle tre temperature.

Temperatura (°C)	Tasso di crescita μ (day ⁻¹)	n° cell max	day
20	0,33	3536	22
25	0,26	3172	22
30	0,25	2493	14

Tab. 6. Tasso di crescita e numero massimo di cellule raggiunto con il relativo giorno di crescita alle tre temperature.

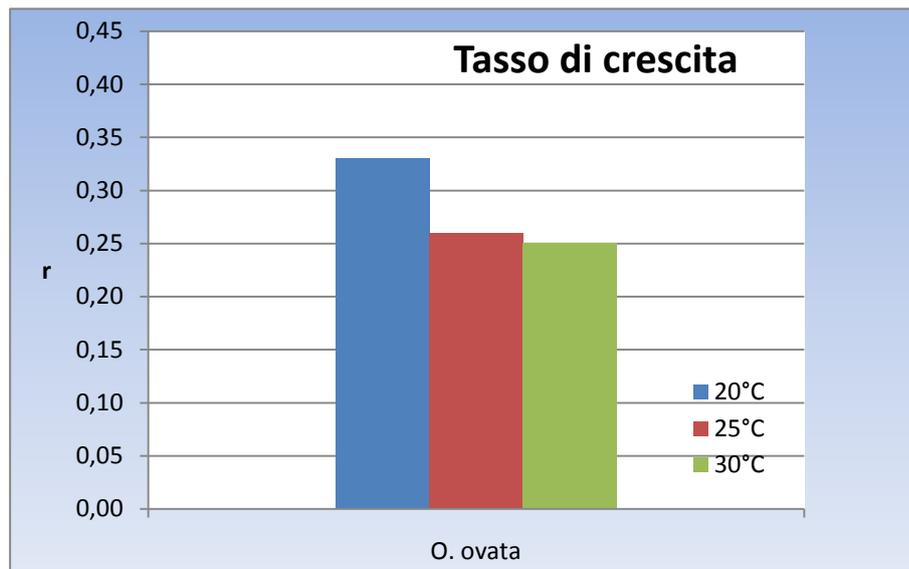


Fig. 43. Tasso di crescita alle tre temperature.

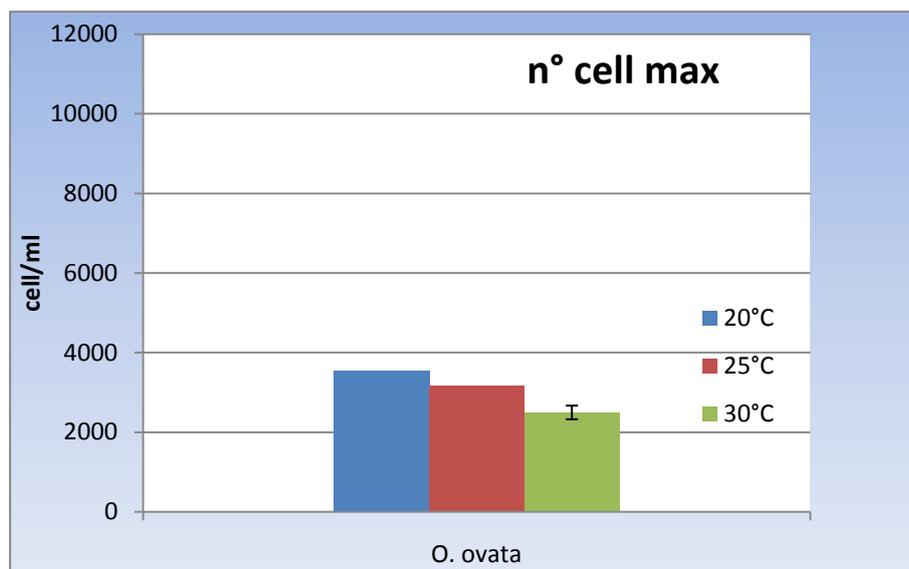


Fig. 44. Numero di cellule massimo raggiunto alle tre temperature.

Dalla fig. 42, si osserva che tutte le colture entrano in fase esponenziale al 3° giorno, come osservato per *C. monotis* fase che si protrae fino al giorno 9 per le colture a 25 e 30°C e fino al giorno 11 per quella a 20°C. Quest'ultima condizione, come per *C. monotis*, dimostra di essere quella ottimale, con un tasso di crescita di $0,37 \text{ day}^{-1}$, compatibile con quello riportato da Feller (2007) e Guerrini et al. (2010) su un altro ceppo dell'Adriatico. Il numero massimo di cellule registrato per la coltura a 20°C risulta invece essere il più alto tra le colture dello studio, compatibile con quello riportato da Gangemi et al. (2006) su un ceppo di Messina e con quelli ottenuti da altre colture recentemente predisposte nel nostro laboratorio, ma inferiore di un terzo rispetto a quello riportato da Feller (2007) e Guerrini et al. (2010) su un

ceppo Adriatico. Ciò potrebbe essere riconducibile al tempo passato in coltura, poiché la resa dei ceppi diminuisce con il passare del tempo (Guerrini e Pezzolesi, oss. pers.).

11.2. EFFETTO DELLA TEMPERATURA SULL'EFFICIENZA FOTOSINTETICA DI *O. ovata*

Le fig. 45 e 46 mostrano rispettivamente il rendimento quantico massimo il rendimento quantico effettivo per le colture appena descritte di *O. ovata*.

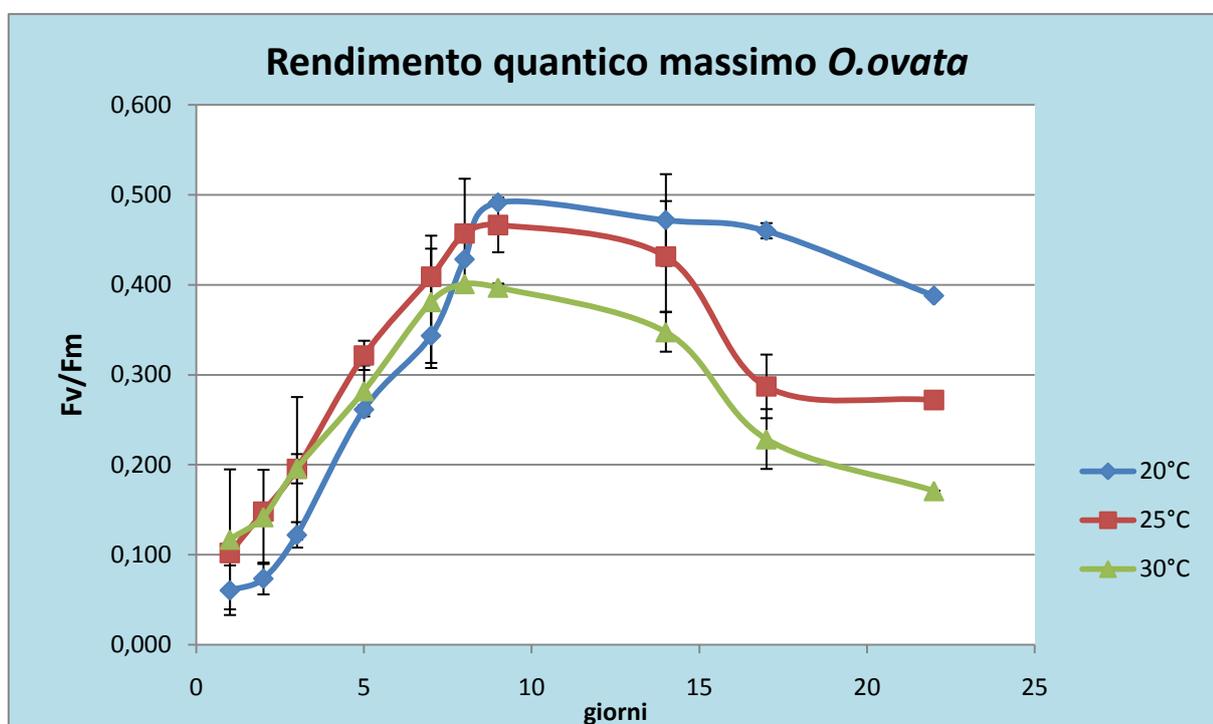


Fig. 45. Rendimento quantico massimo alle tre temperature.

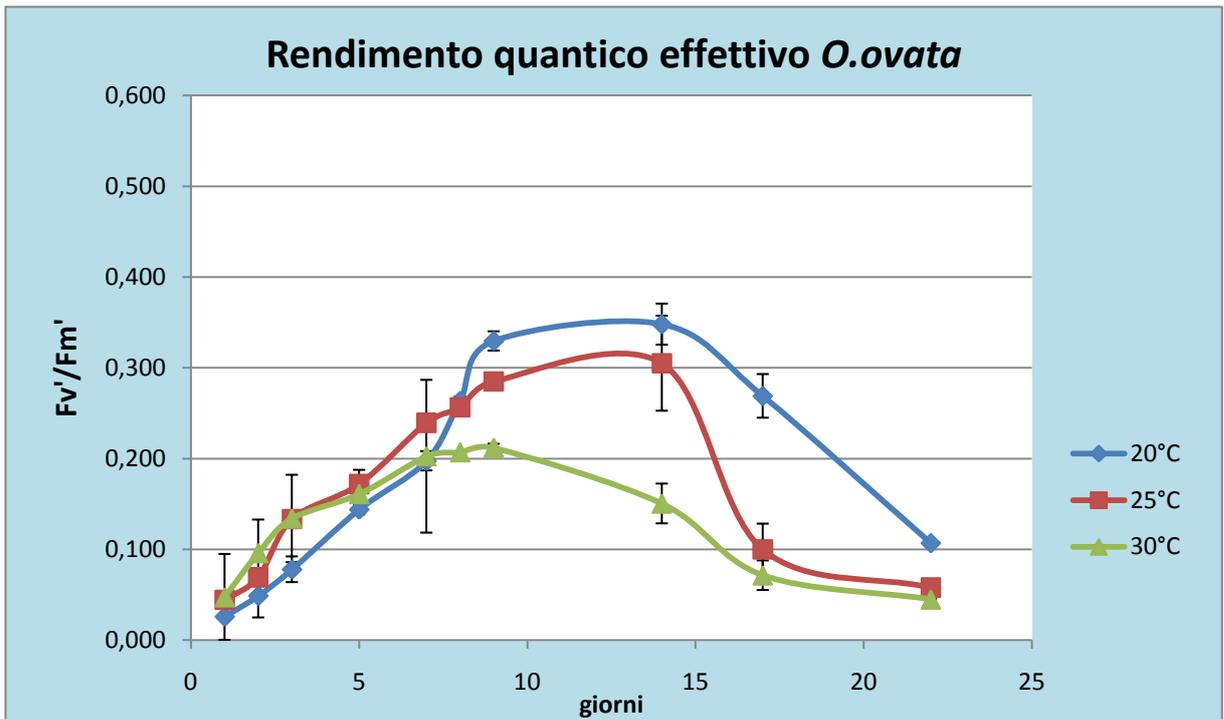


Fig. 46. Rendimento quantico effettivo alle tre temperature.

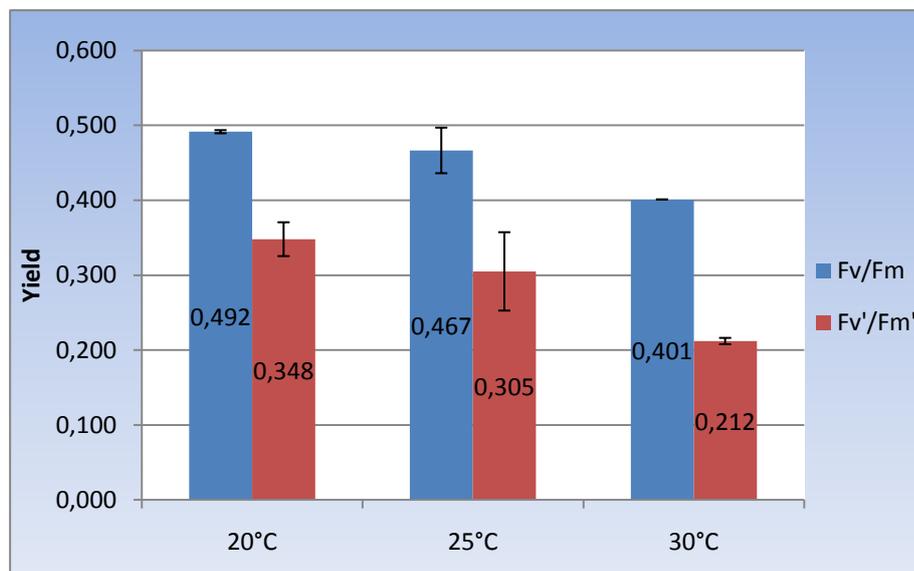


Fig. 47. Rendimento quantico massimo ed effettivo più alti alle tre temperature.

I grafici rappresentati nelle fig. 45, 46, 47 confermano quanto visto nelle curve di crescita (cap 11.1) alle tre temperature; il comportamento del ceppo di Ancona di *O. ovata* al fluorimetro PAM è del tutto simile a quello già visto per *C. monotis*; la coltura a più bassa temperatura registra il rendimento quantico fotosintetico più elevato, sia massimo che effettivo, non eccessivamente maggiore della coltura a temperatura intermedia. La coltura a 30°C risulta essere la meno produttiva.

Le curve di rendimento di *O. ovata* paiono essere più lineari se paragonate a quelle di *C. monotis*, forse in relazione al minor numero di cellule raggiunto da *O. ovata* per cui non si è riscontrata la necessità di effettuare diluizioni.

Come per *C. monotis*, si ottengono anche in questo caso valori più alti per il rendimento fotosintetico nelle cellule a temperatura più alta (25 e 30°C) nei primi giorni di crescita, addirittura fino al giorno 7, dopodiché la coltura a 20°C segnala una ripresa con valori che restano più alti fino alla fine dell'esperimento.

11.3. CONSUMO DEI NUTRIENTI DURANTE LA CRESCITA DI *O.ovata*

Le prossime figure (48,49,50,51) illustrano l'andamento del consumo di nutrienti per le stesse colture di *O. ovata* di cui sono stati riportati la crescita e il rendimento fotosintetico.

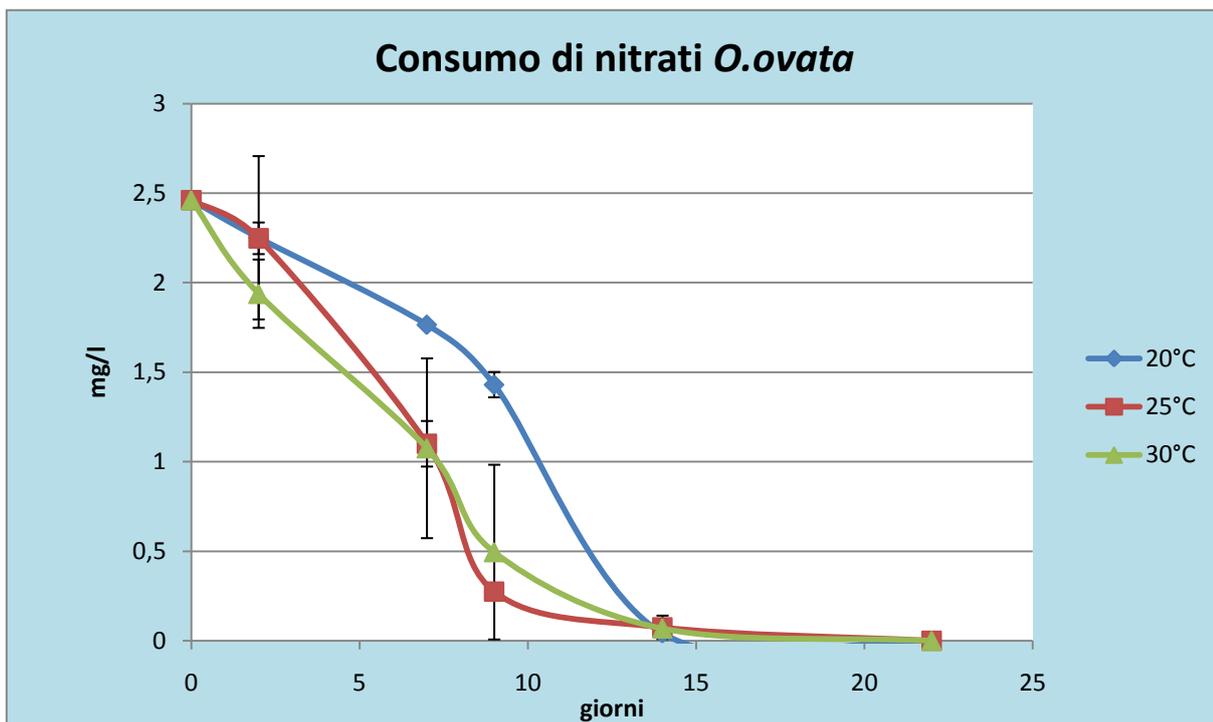


Fig. 48. Consumo di nitrati alle tre temperature.

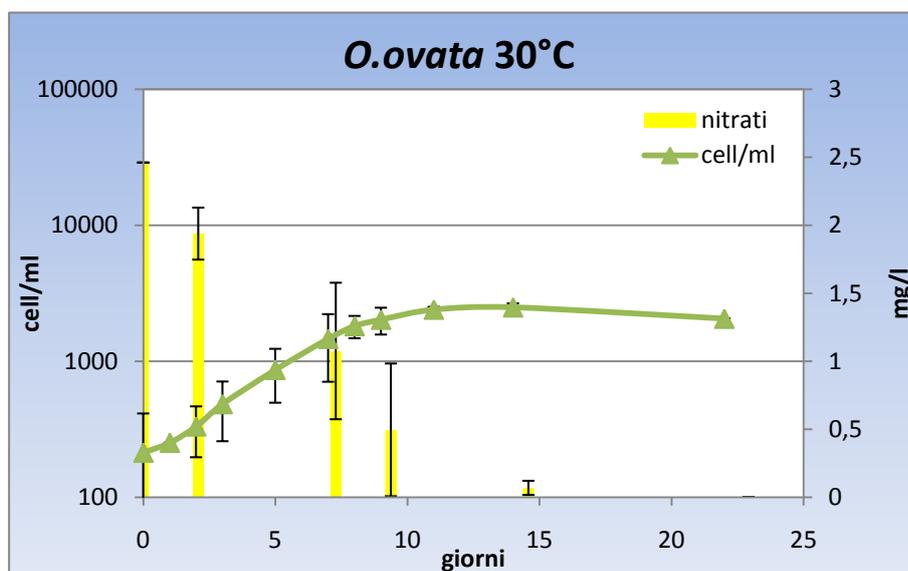
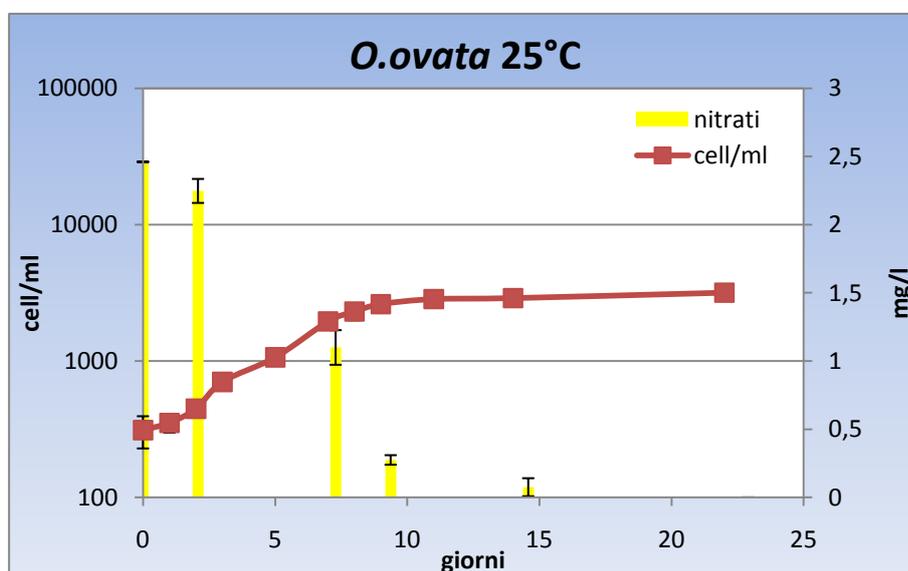
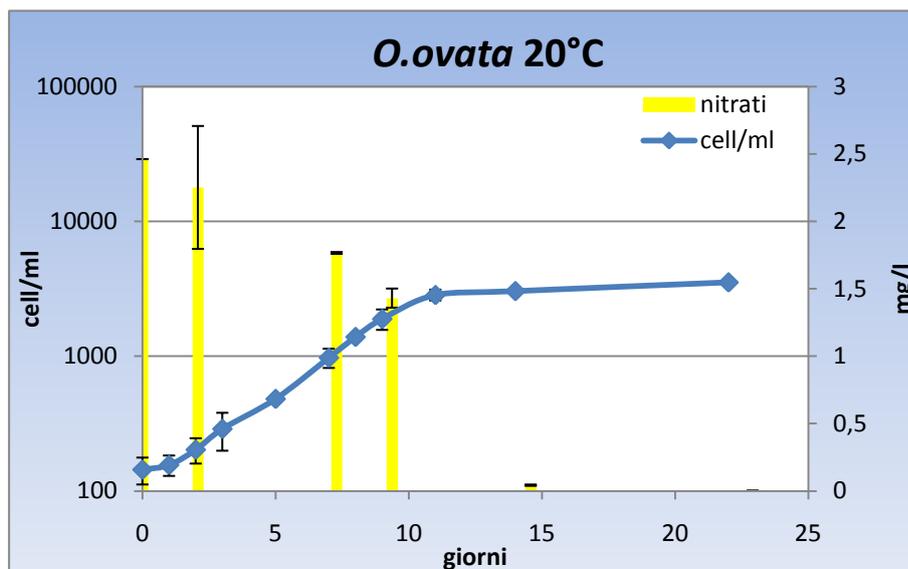


Fig. 49. Consumo di nitrati in relazione con le curve di crescita alle tre temperature.

Il tracciato delle curve di consumo dei nitrati (fig. 48) ha un andamento sigmoidale, e presenta sostanziale differenze da quanto osservato per *C. monotis*.

Innanzitutto l'assorbimento avviene più velocemente nei primi giorni, nonostante siano stati fatti inoculi di partenza più bassi; è possibile che *O. ovata*, che rispetto a *C. monotis* predilige acque oligotrofiche per la crescita, abbia proteine per il trasporto dei macronutrienti all'interno della membrana con una maggiore affinità per il nitrato (K_m più bassa); inoltre la velocità di consumo in *O.ovata* è maggiore alle temperature più elevate, mentre per *C. monotis* si assisteva all'opposto.

Le curve a 25 e 30°C sono caratterizzate da una velocità di consumo elevata, che perdura sino al giorno 9 (inizio fase stazionaria) e porta quasi all'esaurimento del nutriente; il consumo quindi rallenta e si mantiene costante fino all'esaurimento dei nitrati (giorno 22).

Per la coltura a 20°C, il primo ed unico punto di flesso è leggermente posticipato, così come l'inizio della fase stazionaria, dopodiché si osserva un rapido consumo fino all'esaurimento dei nitrati, che avviene all'incirca al 14° giorno.

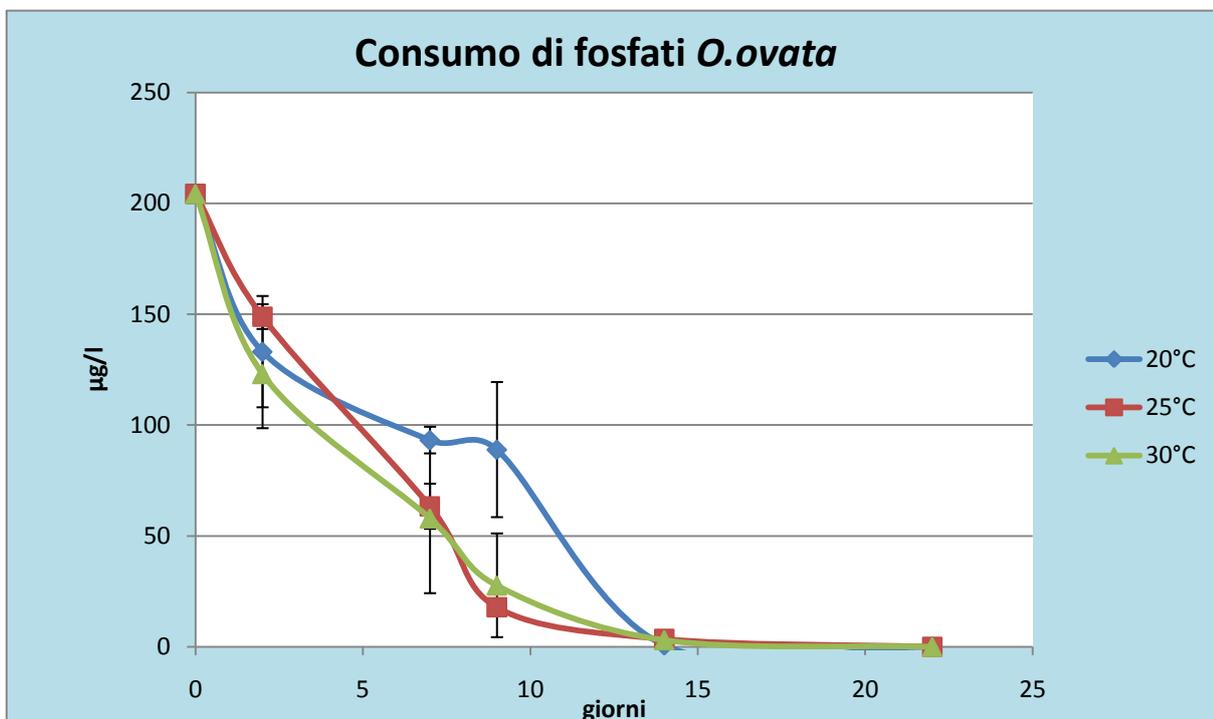


Fig. 50. Consumo di nitrati alle tre temperature.

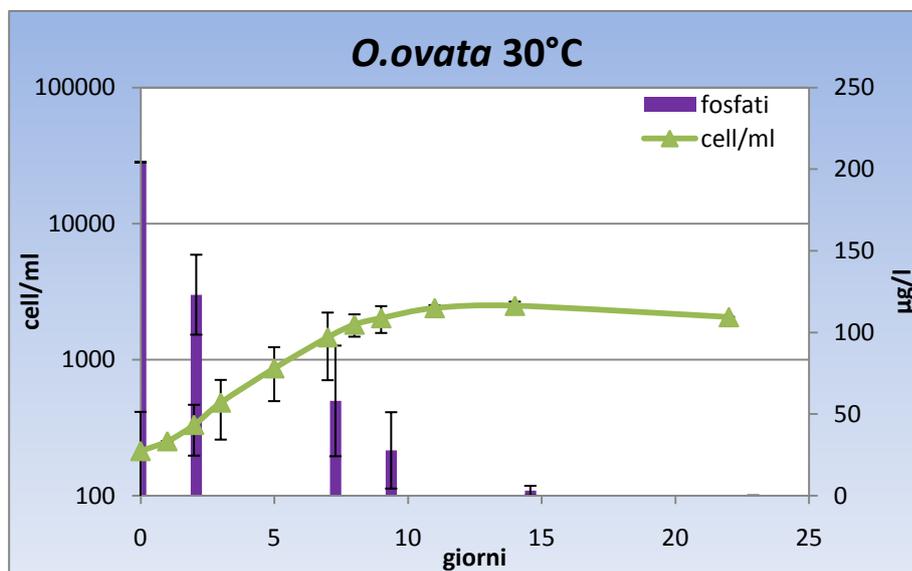
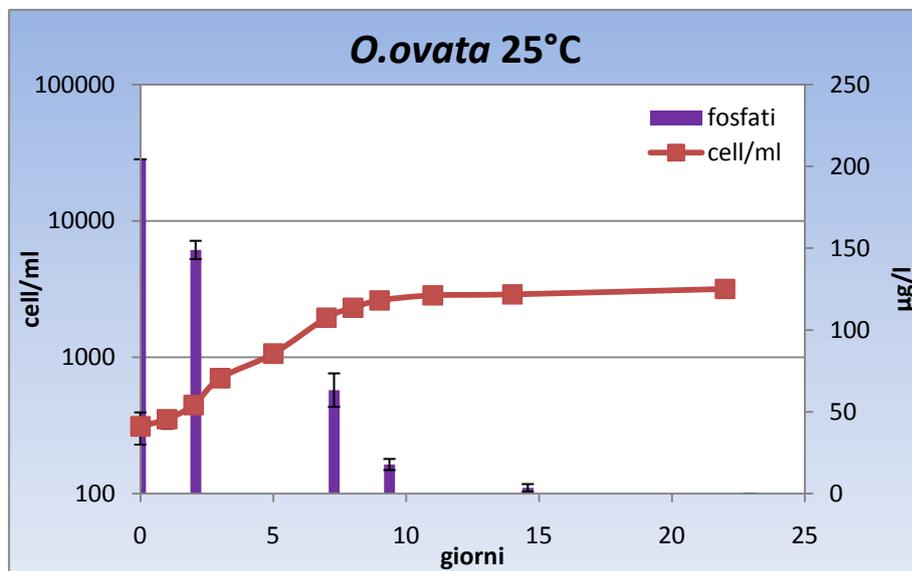
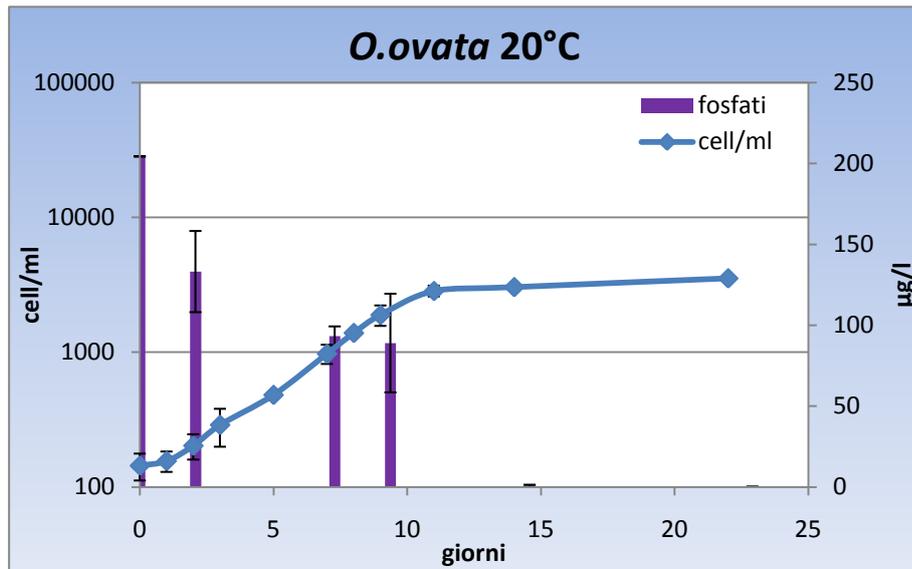


Fig. 51. Consumo di fosfati in relazione con le curve di crescita alle tre temperature.

Il consumo di fosfati in *O. ovata* si verifica più lentamente nei primi giorni rispetto a *C. monotis*, con un trend abbastanza simile a quello appena descritto per i nitrati, con la presenza di due punti di flesso (seppur meno pronunciati) al giorno 7 e 9 per le colture a 25 e 30°C, e un unico punto di flesso al giorno 9 per la coltura a 20°C.

L'esaurimento dei fosfati ha luogo negli stessi giorni visti per i nitrati.

12. CRESCITA DI *O. ovata* E *C. monotis* IN COLTURE MISTE A DIVERSE TEMPERATURE

12.1. CURVE DI CRESCITA *O. ovata* E *C. monotis*

Dopo aver analizzato curva di crescita, rendimento quantico fotosintetico e consumo di nutrienti per *O. ovata* e *C. monotis* in monoculture, si prosegue esponendo i risultati relativi agli stessi tre aspetti ma per colture in cui le due alghe sono co-presenti, sempre alle stesse tre temperature.

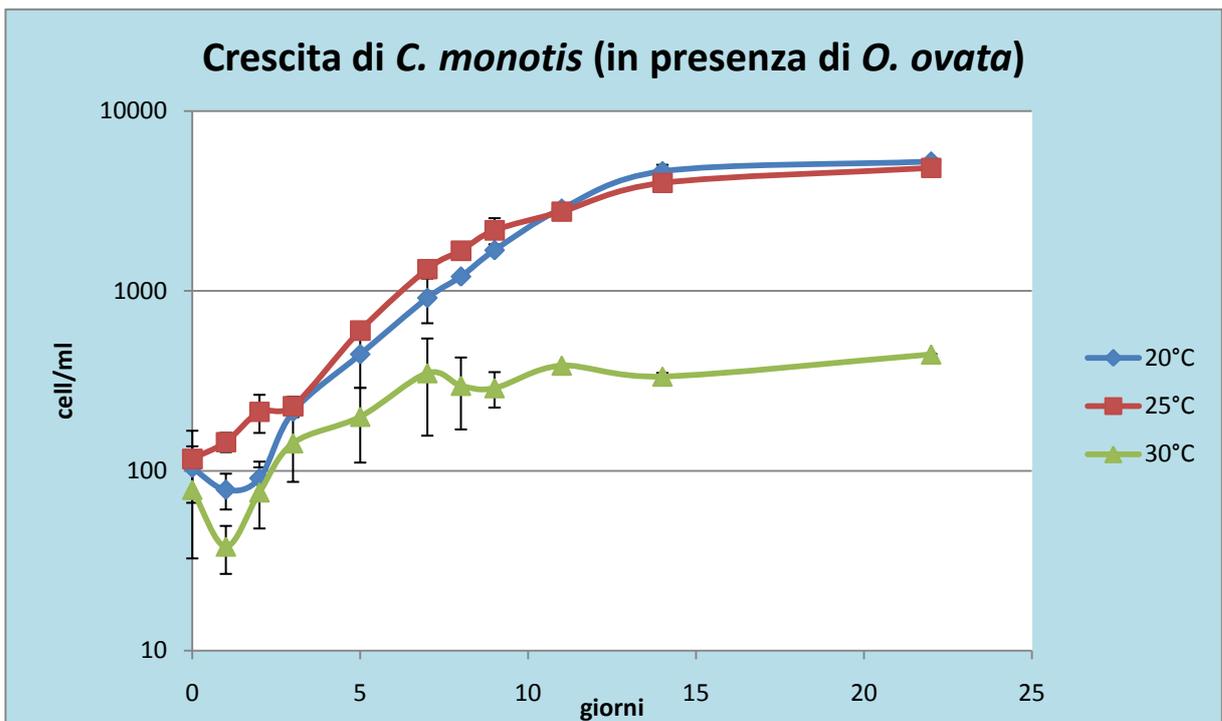


Fig. 52. Curve di crescita di *C. monotis* in presenza di *O. ovata* alle tre temperature.

Temperatura (°C)	Tasso di crescita μ (day ⁻¹)	n° cell max	day
20	0,33	5232	22
25	0,37	4820	22
30	0,22	444	22

Tab. 7. Tasso di crescita e numero massimo di cellule raggiunto con il relativo giorno di crescita alle tre temperature.

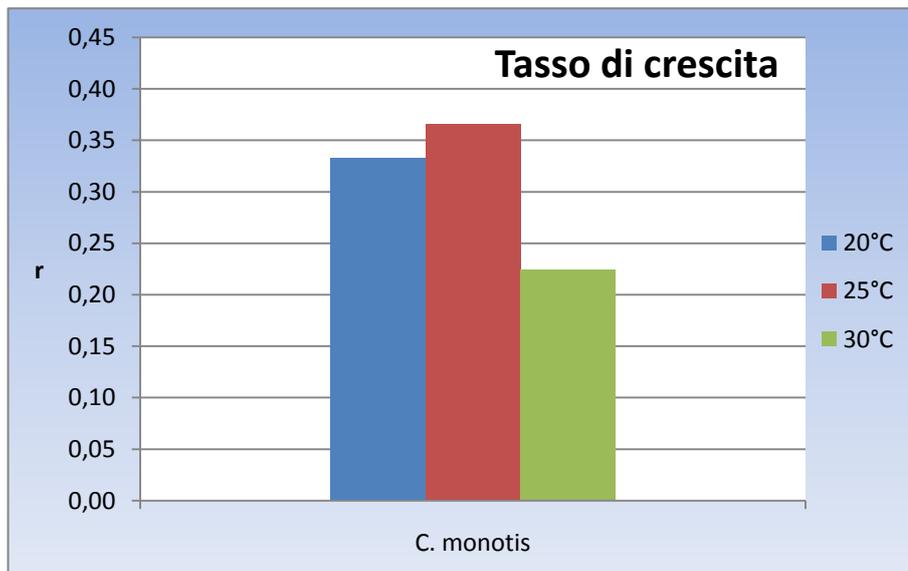


Fig. 53. Tasso di crescita alle tre temperature.

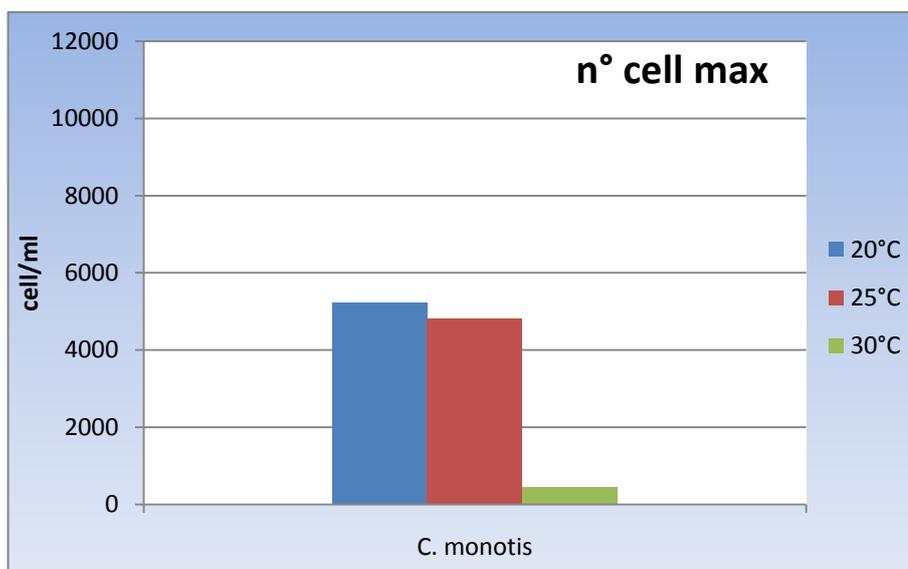


Fig. 54. Numero di cellule massimo raggiunto alle tre temperature.

L'andamento delle curve di crescita di *C. monotis* in associazione con *O. ovata*, non si discosta eccessivamente da quello riscontrato nella monocoltura di *C. monotis*. L'alga predilige le temperature più basse, raggiunge il numero massimo di cellule a 20°C (anche se in questo caso è circa la metà di quello toccato nella monocoltura), tuttavia il tasso di crescita risulta essere più alto per la coltura a 25°C, anziché a 20°C (monocoltura), sempre con un valore di 0,37 day⁻¹.

La coltura a 30°C è anche in questo caso quella più stressata, con effetti ancora più evidenti che nella monocoltura: oltre ad un tasso di crescita particolarmente basso, il numero massimo di cellule è quasi un ventesimo di quello raggiunto nella monocoltura.

Osservando le curve di crescita di fig. 52 e comparandole con quelle di fig. 31 (10.1), si può verificare che la fase esponenziale di *C. monotis* inizia sia per la monocoltura che per la coltura mista all'incirca al giorno 3, ma si protrae più a lungo nella coltura mista, fatto probabilmente imputabile ad inoculi di cellule più bassi in quest'ultima. In ogni caso la coltura a 20°C entra in fase stazionaria qualche giorno dopo rispetto alle culture a più alta temperatura.

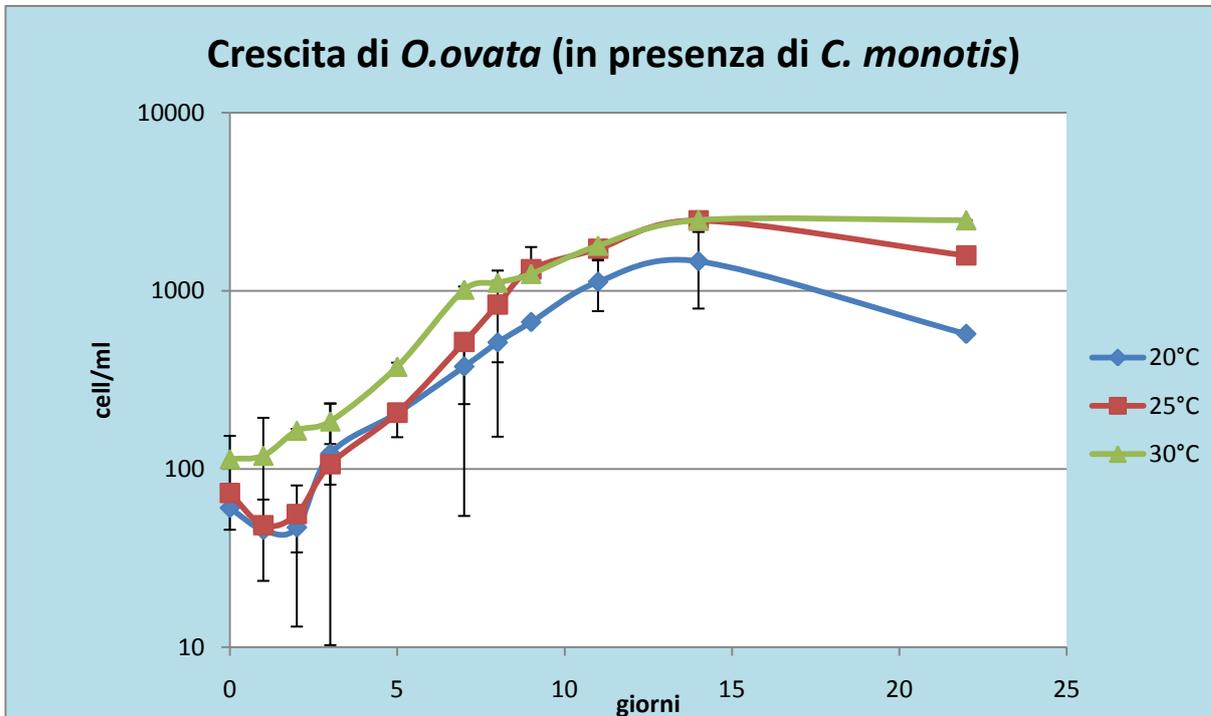


Fig. 55. Curve di crescita di *C. monotis* in presenza di *O.ovata* alle tre temperature.

Temperatura (°C)	Tasso di crescita μ (day ⁻¹)	n° cell max	day
20	0,27	1469	14
25	0,41	2488	14
30	0,36	2498	14

Tab. 8. Tasso di crescita e numero massimo di cellule raggiunto con il relativo giorno di crescita alle tre temperature.

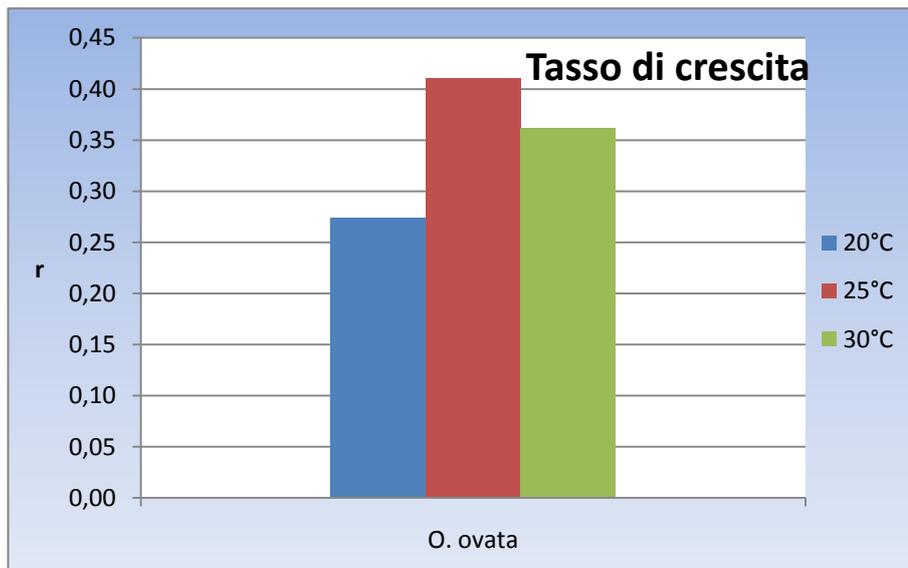


Fig. 56. Tasso di crescita alle tre temperature.

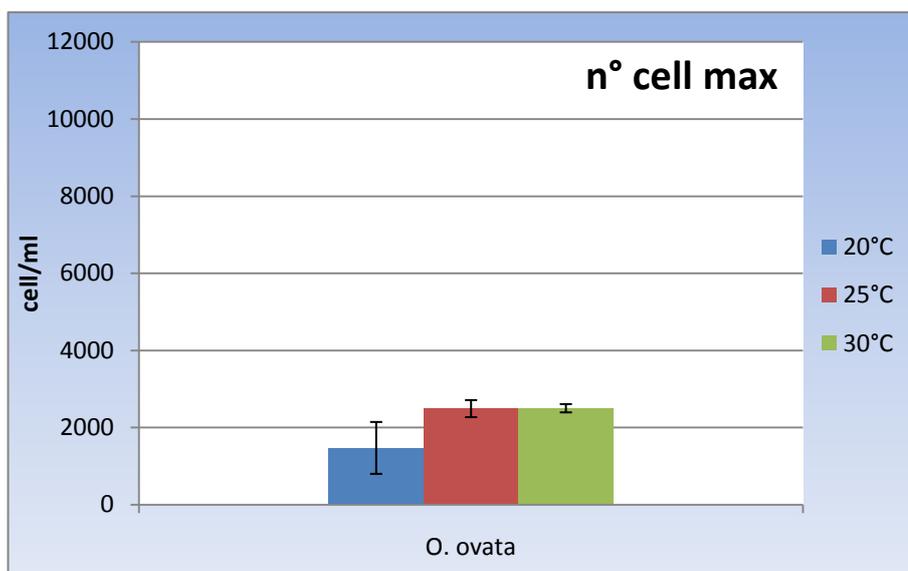


Fig. 57. Numero di cellule massimo raggiunto alle tre temperature.

Le curve di crescita di *O. ovata* in associazione con *C. monotis* (fig. 55) sono ampiamente differenti da quelle ottenute per la monocultura di *O. ovata* (fig. 42, 11.1). La coltura a 20°C segnala il tasso di crescita più basso e il numero di cellule inferiore, situazione opposta a quella vista per la monocultura, inoltre già al 14° giorno si ha l'inizio della fase di declino. Il tasso di crescita più alto si ha per la coltura a 25°C, con un valore di 0,41, il valore più alto registrato in assoluto in tutte le colture allestite nel corso dello studio; tuttavia il numero di cellule massimo raggiunto a questa temperatura, seppure paragonabile a quello della coltura mista a 30°C, è di circa un terzo inferiore a quello raggiunto dalla monocultura. Anche quest'ultima coltura inizia a declinare dal 14° giorno in poi.

Risultati sorprendenti si hanno per la coltura mista a 30°C, in cui *O. ovata* raggiunge la stessa densità rilevata nella monocultura, ma con un tasso di crescita sensibilmente superiore (0,36 contro 0,25 day⁻¹), inoltre nella coltura mista, *O. ovata* alla temperatura di 30°C rimane in fase stazionaria fino al giorno 22, senza presentare diminuzione del numero di cellule.

12.2. EFFETTO DELLA TEMPERATURA SULL'EFFICIENZA FOTOSINTETICA DELLE COLTURE MISTE DI *O. ovata* E *C. monotis*

Le colture multispecie appena descritte sono state quindi oggetto di analisi al fluorimetro PAM.

In questo tipo di analisi non è possibile discriminare quale sia il contributo di ogni specie nella determinazione del rendimento quantico totale della coltura, tuttavia confrontando i risultati riportati di seguito con le curve di crescita è possibile formulare interessanti considerazioni.

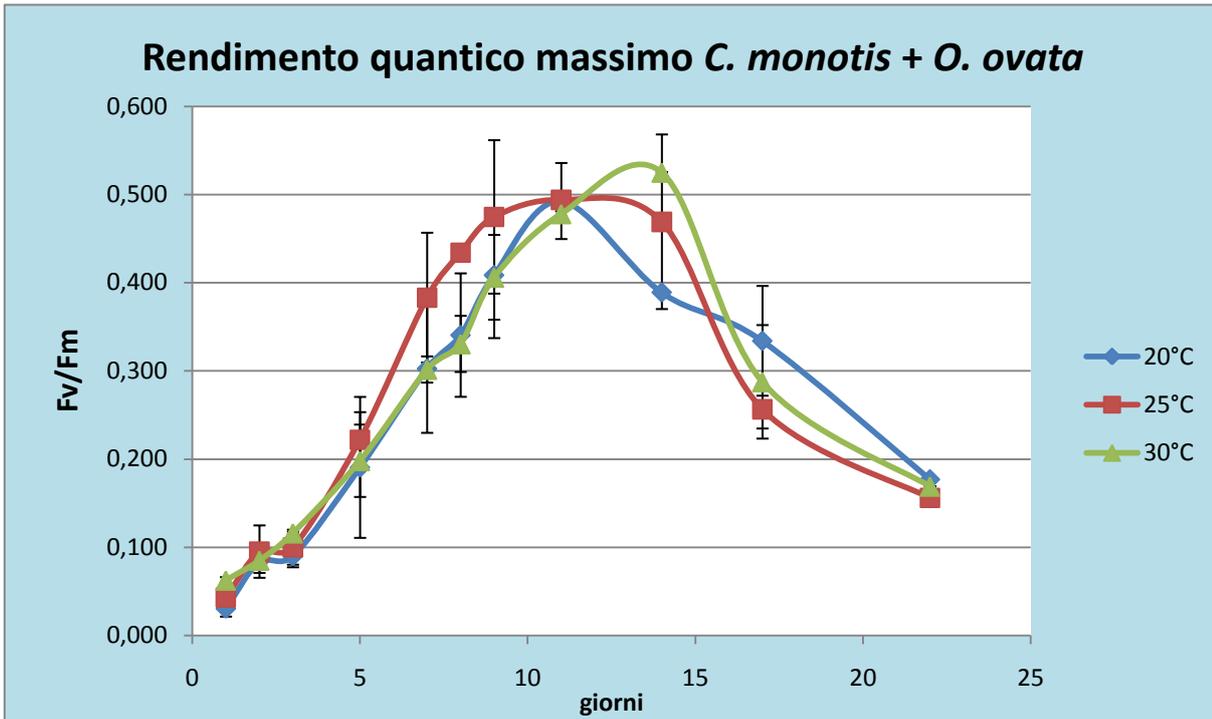


Fig. 58. Rendimento quantico massimo alle tre temperature.

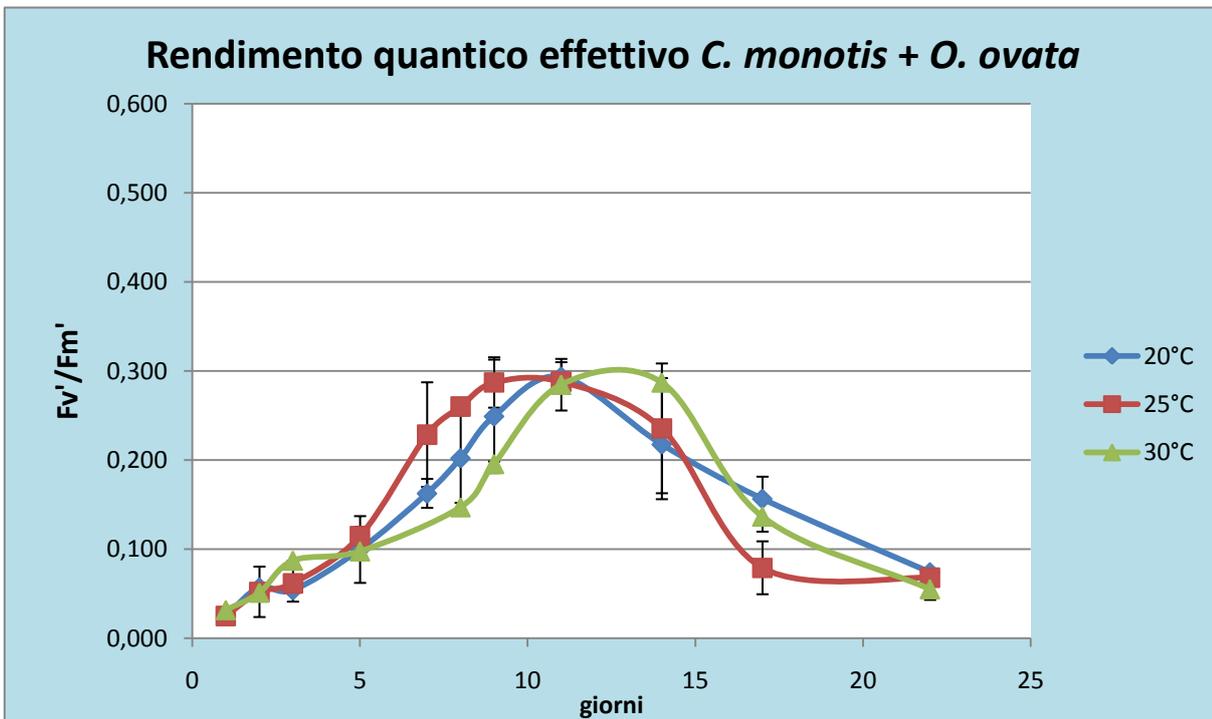


Fig. 59. Rendimento quantico effettivo alle tre temperature.

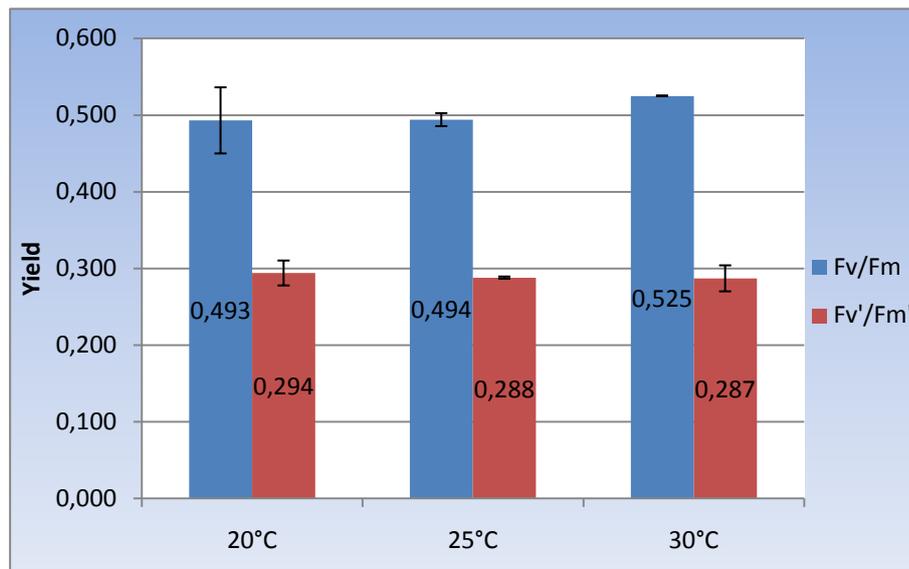


Fig. 60. Rendimento quantico massimo ed effettivo più alti alle tre temperature.

Se si osserva il rendimento quantico della monocoltura di *C. monotis* (fig. 34,35; 10.2), si può constatare che le curve salgono rapidamente raggiungendo un massimo, dopodiché riscendono bruscamente, disegnando una sorta di cuspide in corrispondenza dei giorni 10-11. Le curve della monocoltura di *O. ovata* (fig. 45,46; 11.2) invece salgono comunque rapidamente, poi incontrano una sorta di fase di plateau tra i giorni 8 e 14, quindi scendono in maniera più graduale.

Le colture miste fanno registrare un andamento intermedio tra i due: la coltura a 20°C e quella a 30°C hanno un picco distinto rispettivamente ai giorni 11 e 14, mentre la coltura a 25°C è caratterizzata da un esteso plateau tra i giorni 9 e 14.

Si può notare come in questo caso tutte e tre le colture raggiungano, sebbene con un certo sfasamento temporale (per prima la coltura a 25°C, poi quella a 20°C, infine quella a 30°C), valori massimi simili (ed equiparabili a quelli delle monocolture) sia di rendimento quantico massimo che effettivo.

Affiancando quest'ultima considerazione a quelle viste per le curve di crescita, si potrebbe sostenere che per la temperatura più bassa, il contributo maggiore nel rendimento quantico è dato da *C. monotis*, alla temperatura più alta da *O. ovata*, alla temperatura intermedia da entrambe.

12.3. CONSUMO DEI NUTRIENTI DURANTE LA CRESCITA IN COLTURE MISTE DI *O. ovata* E *C. monotis*

Anche per le colture associate vengono postati in successione i grafici relativi al consumo di macronutrienti alle tre temperature.

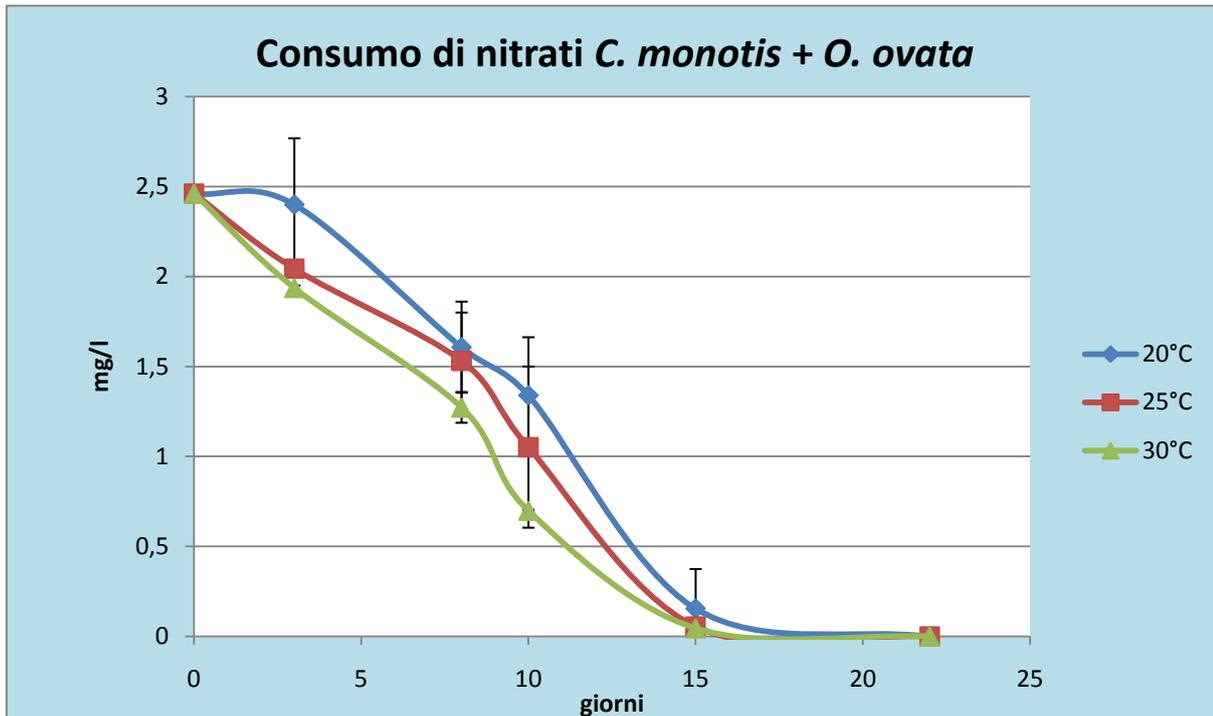
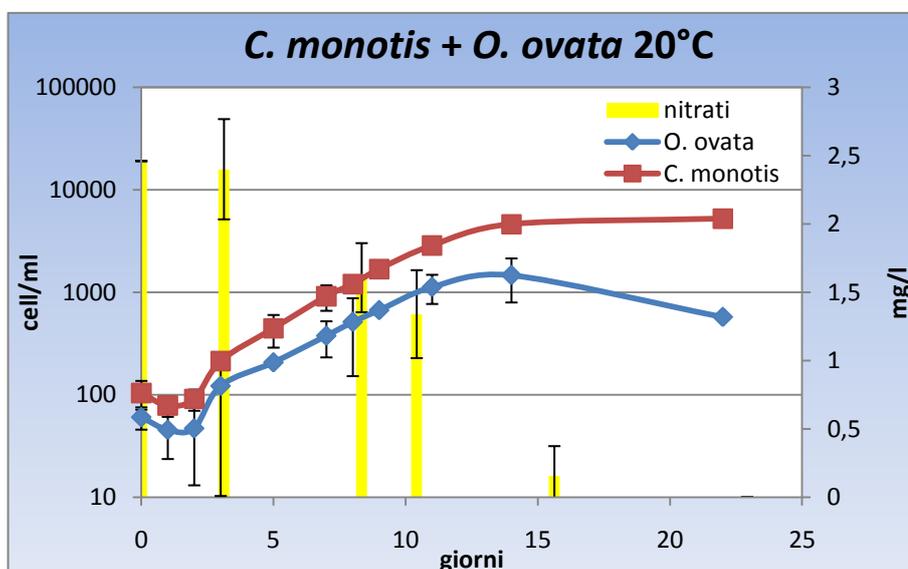


Fig. 61. Consumo di nitrati alle tre temperature.



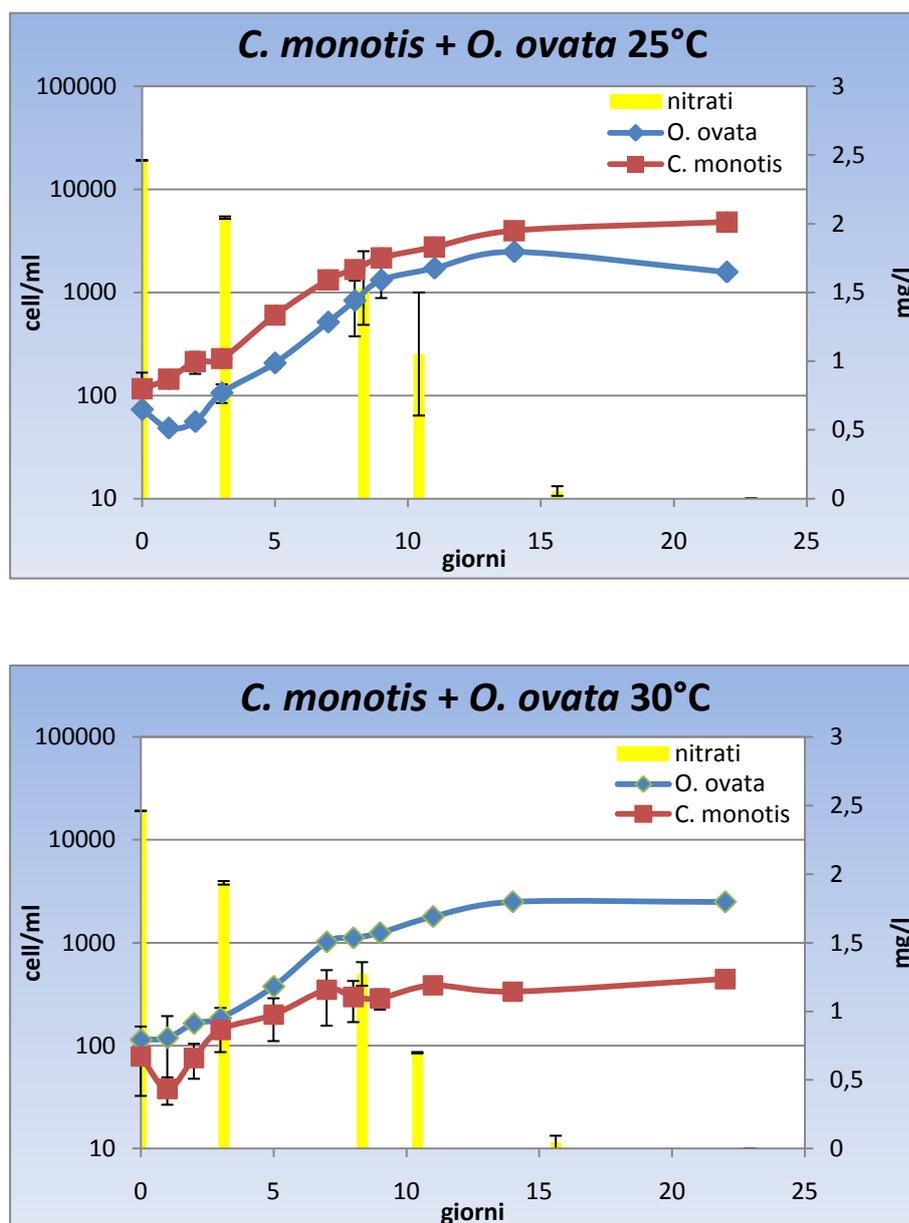


Fig. 62. Consumo di nitrati in relazione con le curve di crescita alle tre temperature.

Il consumo di nitrati alle tre temperature per la coltura mista si risolve in un andamento intermedio a quello osservato per le singole monoculture. Infatti, come per *O. ovata* (fig. 48, 11.3) si ha la presenza di punti di flesso nella curva tra i giorni 8 e 10 e al giorno 15, tuttavia essi sono molto meno marcati che in fig. 61, pertanto l'andamento globale delle curve sino al giorno 15 può essere più semplicemente ricondotto a quello di una parabola, come osservato per la monocultura di *C. monotis* (fig. 37, 10.3).

Va sottolineato inoltre che non compaiono particolari differenze tra le curve alle diverse temperature, sia per quanto riguarda l'andamento che la velocità di esaurimento.

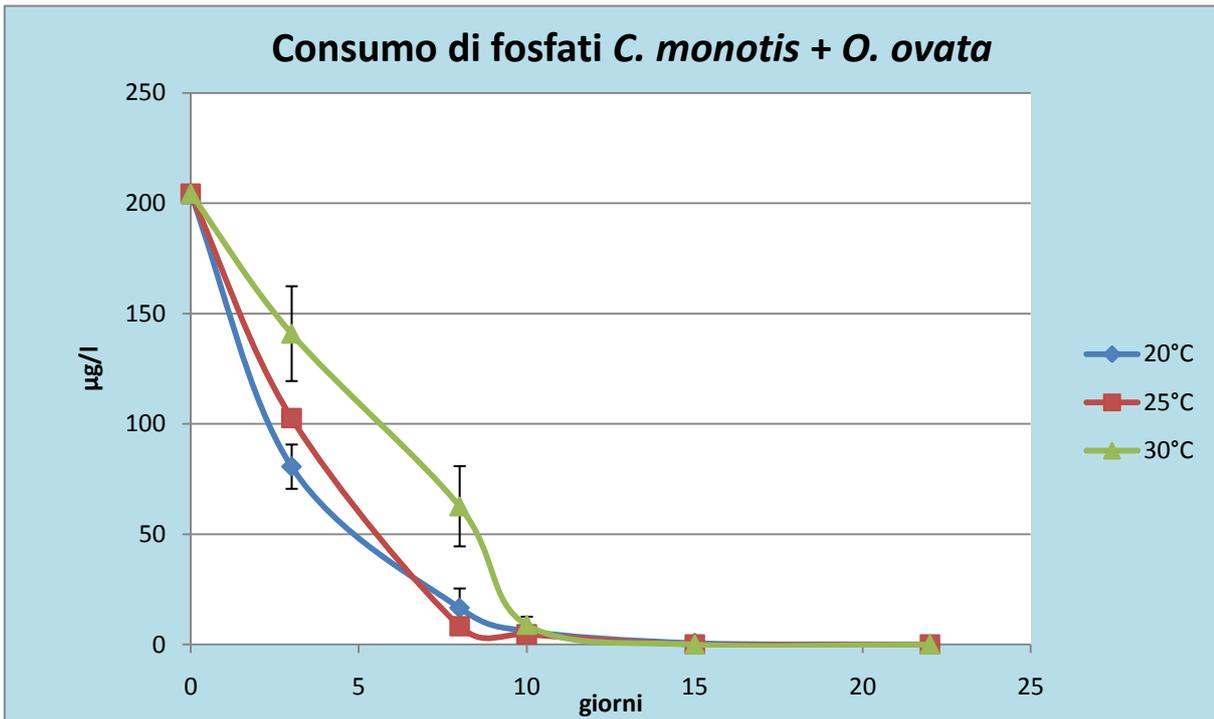
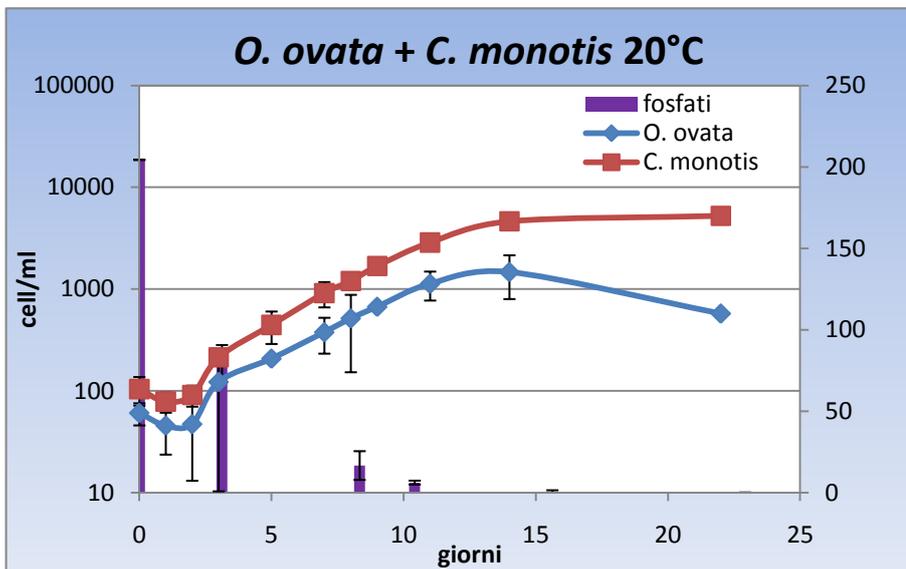


Fig. 63. Consumo di fosfati alle tre temperature.



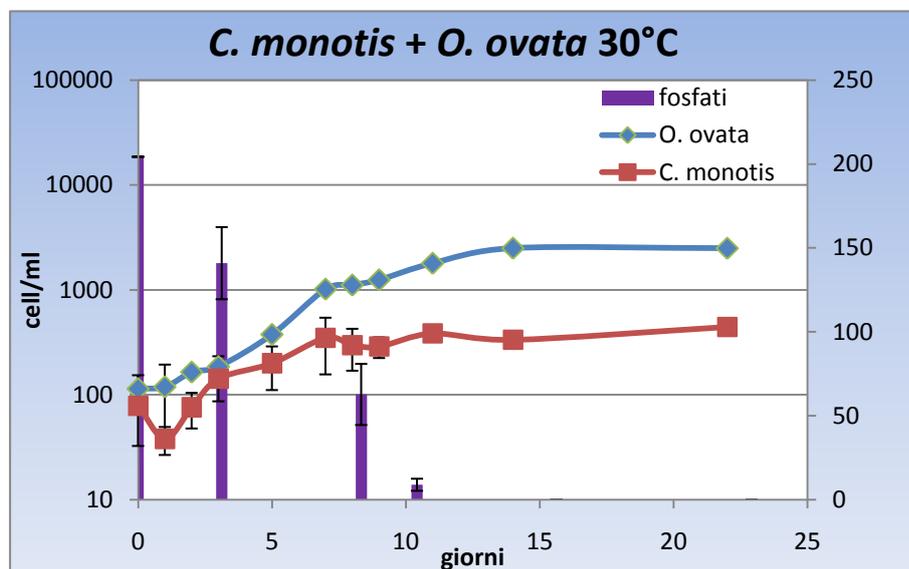
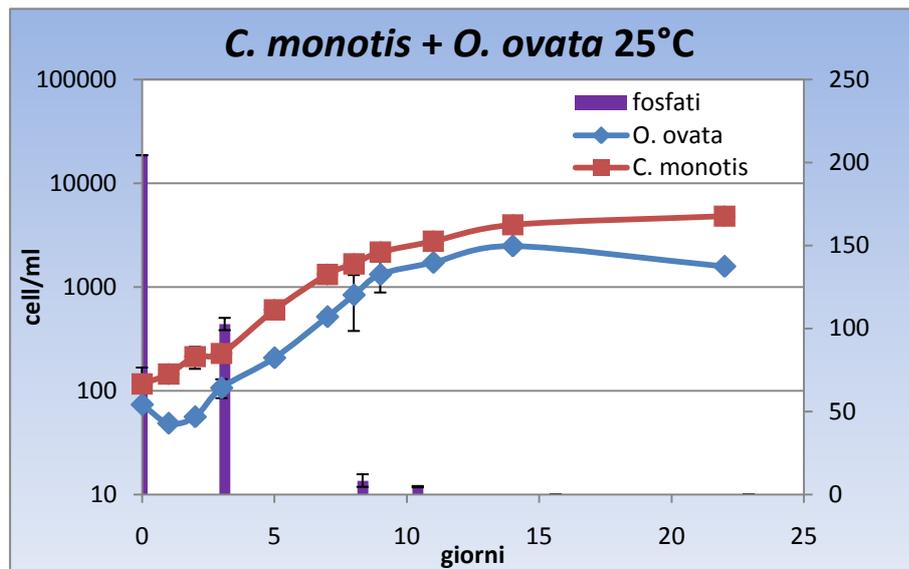


Fig. 64. Consumo di fosfati in relazione con le curve di crescita alle tre temperature.

Il consumo di fosfati da parte della coltura mista avviene velocemente (fig. 63), portando la concentrazione del nutriente a valori prossimi allo 0 intorno al decimo giorno; questo andamento rappresenta una situazione intermedia tra quanto osservato per *C. monotis* (fig. 39 consumo più rapido) e *O. ovata* (fig. 50, consumo più lento) nelle monoculture; tuttavia, mentre per entrambe le colture individuali il consumo iniziale sembra essere più rapido alle temperature maggiori, in questo caso è più rapido a 20 e 25°C che a 30°C.

13. INTERAZIONI ALLELOPATICHE TRA *O.ovata* E *C. monotis*

13.1. CURVE DI CRESCITA *C. monotis* IN PRESENZA DI FILTRATO DI *O. ovata*

Per mettere in luce altre possibili strategie competitive o interazioni allelopatiche dovute alle tossine prodotte da *O. ovata*, *C. monotis* è stata fatta crescere in un filtrato di coltura di *O. ovata*, in un filtrato di *O. ovata* previa rimozione di batteri e in un filtrato di *O. ovata* con aggiunta di palitossina (vedi 6.3.1). Sono anche state allestite colture di controllo, ovvero facendo cresce *C. monotis* in un terreno standard e in un terreno senza batteri con aggiunta di metanolo, solvente usato per l'estrazione delle tossine da *O. ovata* (vedi 6.3.4). Le colture sono state poste alla temperatura di 20°C (condizione migliore, vedi 10.1) e la crescita è stata valutata tramite conteggio e fluorimetro PAM. Di seguito i risultati ottenuti:

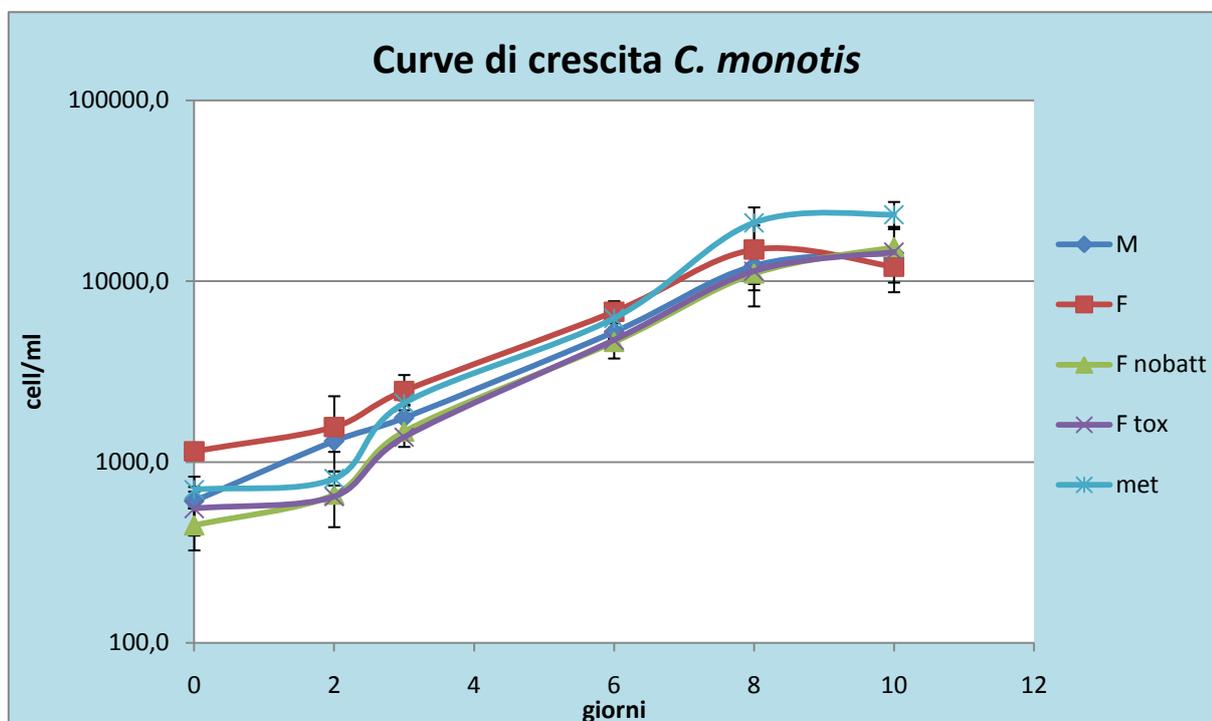


Fig. 65. Curve di crescita di *C. monotis* alla temperatura di 20°C. **M** = medium, **F** = filtrato di *O.ovata*, **F nobatt** = filtrato di *O.ovata* senza batteri, **F tox** = filtrato di *O.ovata* senza batteri con aggiunta di tossina, **met** = filtrato di *O.ovata* senza batteri con aggiunta di metanolo.

Condizione	Tasso di crescita μ (day ⁻¹)	n° cell max	day
M	0,36	14288	10
F	0,34	14964	8
F nobatt	0,38	15443	10
F tox	0,41	14491	10
met	0,36	23348	10

Tab. 9. Tasso di crescita e numero massimo di cellule raggiunto con il relativo giorno di crescita alle varie condizioni.

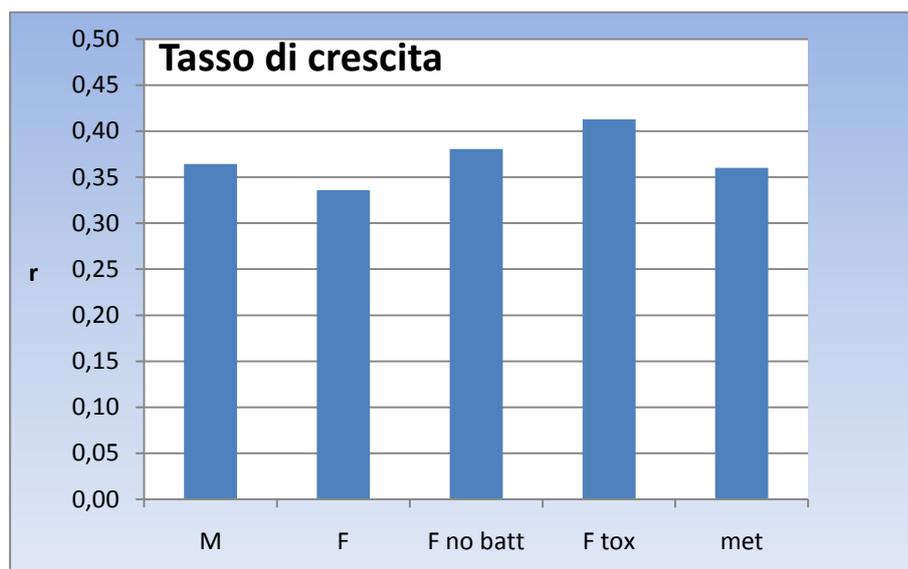


Fig. 66. Tasso di crescita alle varie condizioni.

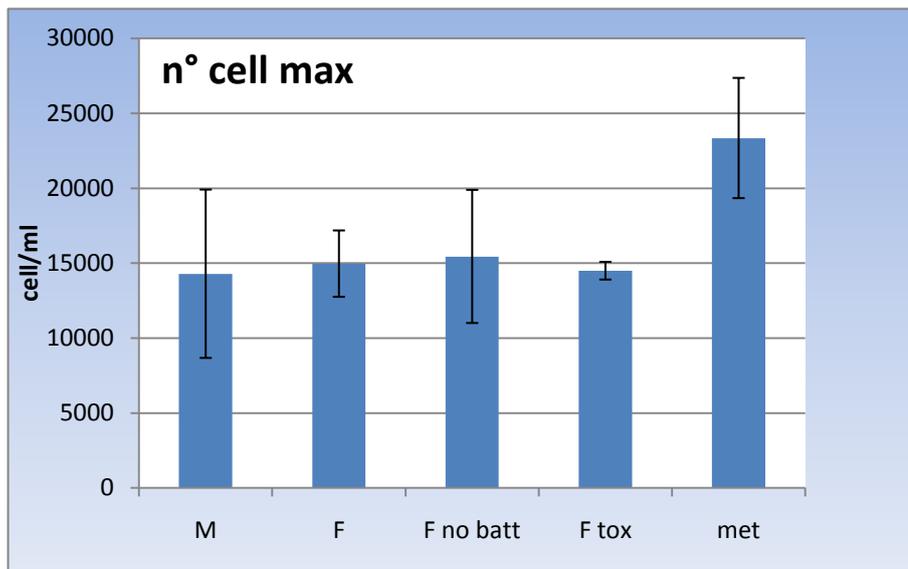


Fig. 67. Numero di cellule massimo raggiunto alle varie condizioni.

Da quanto riportato nelle fig. 65, 66 e 67, non emergono differenze sostanziali tra le varie condizioni. I numeri massimi di cellule raggiunti sono abbastanza simili, tranne per la coltura con aggiunta di metanolo, che tocca un valore piuttosto elevato, forse non troppo veritiero. Infatti questa condizione è l'unica a non essere stata svolta in doppia replica, per cui non è stato possibile avere un altro riferimento. Anche le altre colture tuttavia presentano numeri massimi di cellule più alti di quelli visti per *C. monotis* a 20°C nell'esp. 1 (vedi 10.1); ciò potrebbe essere causato da una sovrastima nel conteggio dovuta al fatto di non aver utilizzato il metodo di acidificazione sui prelievi (par.11.1) che, come si può notare, determina elevate discrepanze tra le repliche (alte deviazioni standard nei grafici). Il fatto che le colture abbiano raggiunto densità più elevate potrebbe essere spiegato anche tenendo in considerazione che quest'ultimo esperimento è stato condotto in beute di vetro più piccole di quelle utilizzate per gli studi alle differenti temperature le quali, grazie ad una migliore esposizione luminosa, consentono il raggiungimento di densità cellulari superiori (Guerrini e Pezzolesi, oss. pers.). Anche i tassi di crescita non si discostano particolarmente e, dati gli elevati errori nei conteggi, è difficile dire se le piccole differenze che si osservano siano di fatto da attribuire alle tossine presenti nel filtrato o all'assenza di batteri nei filtrati sterili.

13.2. EFFICIENZA FOTOSINTETICA DI *C. monotis*

In quest'ultimo esperimento l'utilizzo del fluorimetro PAM risulta essere di basilare importanza visti i risultati di difficile interpretazione prodotti dal conteggio.

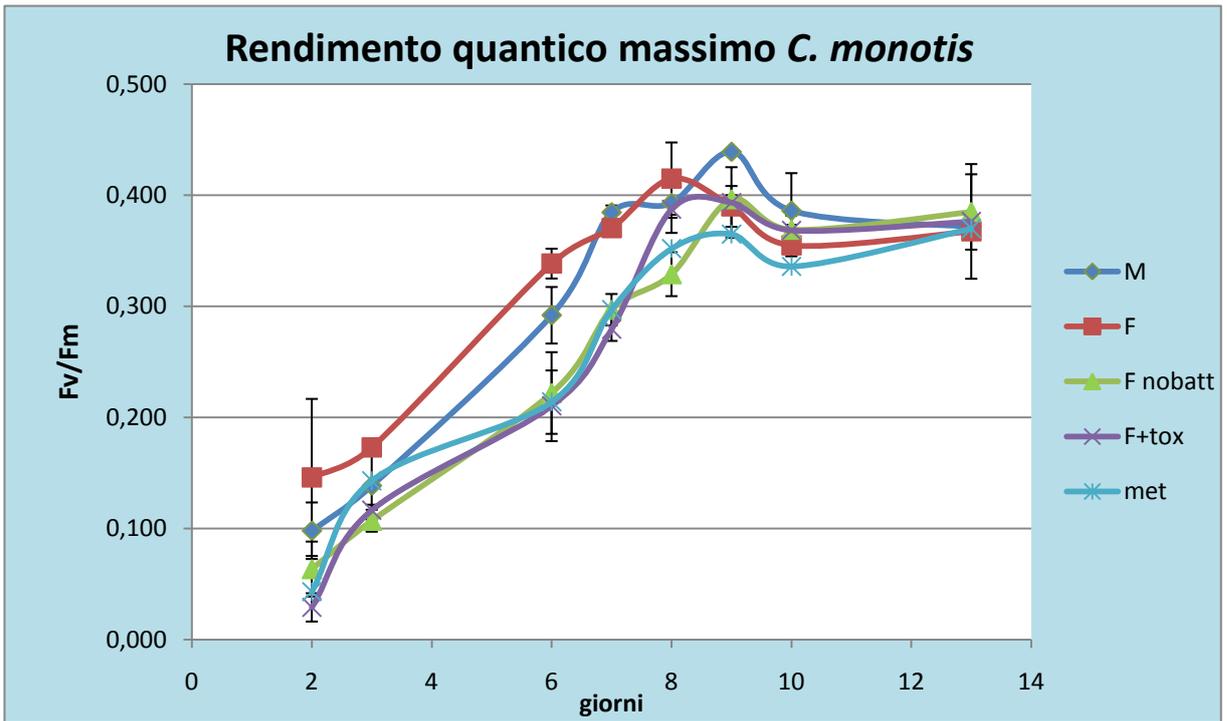


Fig. 67. Rendimento quantico massimo alle tre temperature.

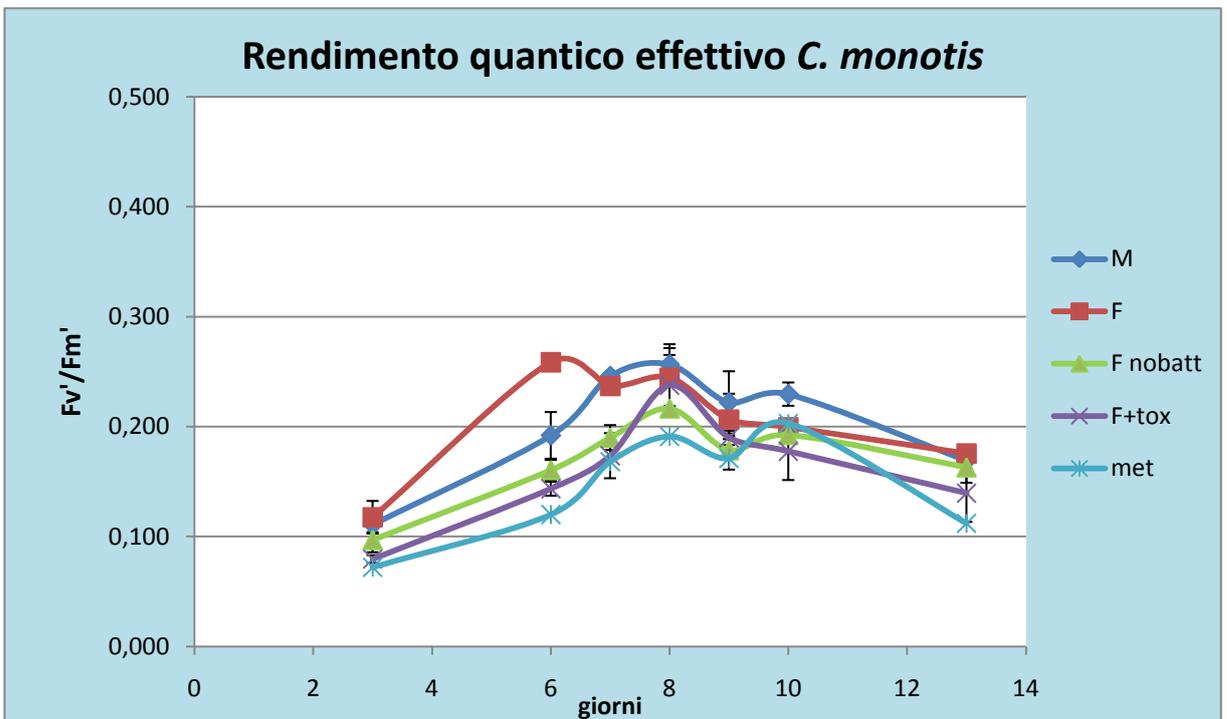


Fig. 68. Rendimento quantico effettivo alle tre temperature.

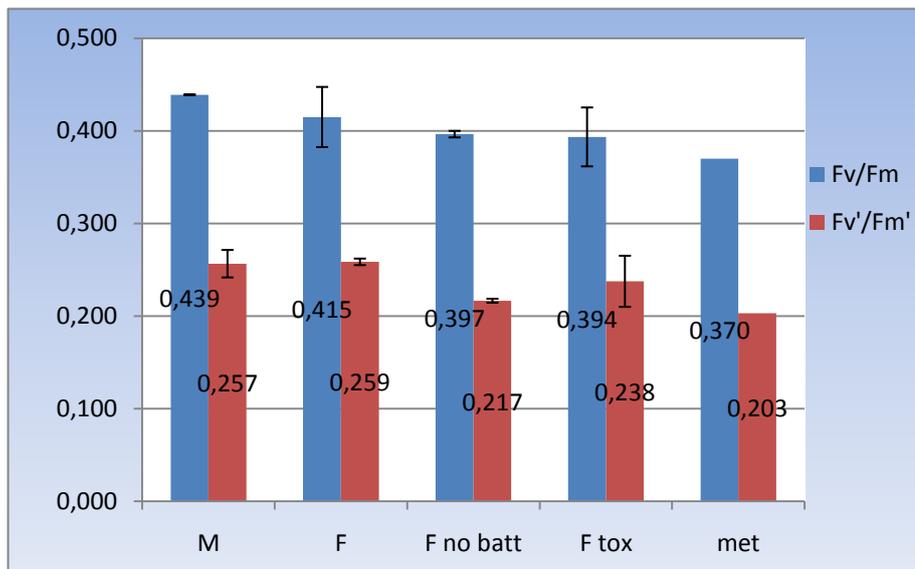


Fig. 69. Rendimento quantico massimo ed effettivo più alti alle tre temperature.

Esaminando i grafici del rendimento quantico fotosintetico (fig. 67, 68), si può constatare che le curve alle varie condizioni abbiano un andamento piuttosto simile, con un picco al giorno 8 o 9, e raggiungano all'ultimo giorno (13) valori abbastanza simili sia di rendimento massimo che minimo. Tuttavia nei giorni da 3 a 9 (fase esponenziale), si ha un rendimento sia massimo che effettivo maggiore, per la coltura di *C. monotis* cresciuta in un medium standard e la coltura cresciuta nel filtrato di *O. ovata*, rispetto alla coltura cresciuta nel filtrato di *O. ovata* in assenza di batteri, quella cresciuta nel filtrato con aggiunta di tossina, e quella cresciuta nel filtrato sterile con aggiunta di metanolo. Numerosi studi su microalghe hanno già indicato l'azione inibente del metanolo sull'efficienza fotosintetica (e.g. Paroni, 2010). Le due culture allestite entrambe partendo da un filtrato sterile di *O. ovata* (F no batt ed F tox), mostrano un rendimento quantico molto simile tra loro, ma inferiore a quelle in presenza del filtrato di *O. ovata* con batteri (F).

Si potrebbe quindi ipotizzare che non sia tanto l'aggiunta di tossina, quanto l'assenza di batteri a determinare una maggior condizione di stress nelle colture. E' stato infatti già accennato che i batteri possano favorire la crescita di microalghe, poiché in grado di rendere biodisponibili nutrienti attraverso processi di rimineralizzazione (cap. 5), inoltre la presenza di batteri potrebbe ridurre presenza di tossine nel filtrato (cap. 5, Sengco et al., 2005).

In un esperimento preliminare che era stato condotto solo con una coltura in condizioni standard e una cresciuta nel filtrato, risultava una differenza nei rendimenti quantici misurati in fase esponenziale, più nel dettaglio la coltura standard raggiungeva valori più alti dell'altra; questa situazione non si è verificata però nel corso di questo studio, per cui in definitiva con questo esperimento è difficile affermare se le tossine rilasciate da *O. ovata* abbiano un effetto

evidente su *C. monotis*. Va inoltre ricordato che le colture appena descritte sono state fatte crescere dall'inizio alla fine dell'esperimento nello stesso filtrato (le cui tossine all'interno si possono facilmente degradare in poco tempo in seguito a vari fattori, ad esempio l'esposizione luminosa, vedi 4.4.1 e van Rijssel et al., 2007), dando così la possibilità alle cellule di recuperare in poco tempo dallo stress (vedi 4.4.4.1.). Sarebbe interessante ripetere l'esperimento effettuando periodiche aggiunte di filtrato, come suggerito da Fistarol et al., (2003, 2004a) tuttavia l'analisi delle tossine, effettuata sulle colture miste di *O. ovata* e *C. monotis* precedentemente descritte, e che sarà riportata nel prossimo paragrafo rende possibile la formulazione di alcune ipotesi.

Nelle co-culture il problema dell'aggiunta di filtrato non si pone, vista la presenza della specie rilasciante tossine, inoltre in questo modo sia detta specie che l'alga bersaglio, si trovano soggette alle stesse condizioni di stress (e.g. carenza di nutrienti, elevata temperatura) (Fistarol et al., 2003, 2004).

14. PRODUZIONE DI TOSSINE DA PARTE DI *O. ovata*

Grazie alle analisi condotte dall'Università Federico II di Napoli (cap. 9), è stato possibile determinare il quantitativo di tossine per cellula e quello rilasciato nel mezzo da *O. ovata*, al fine di studiare eventuali differenze di tossicità nelle varie condizioni di coltura.

Di seguito vengono riportati i grafici relativi al quantitativo totale di tossine alle tre temperature, sia per le monoculture di *O. ovata* che per le colture miste. Le tossine intracellulari sono espresse in pg/cell, mentre le tossine rilasciate nel mezzo sia in pg/cell che in µg/l di coltura.

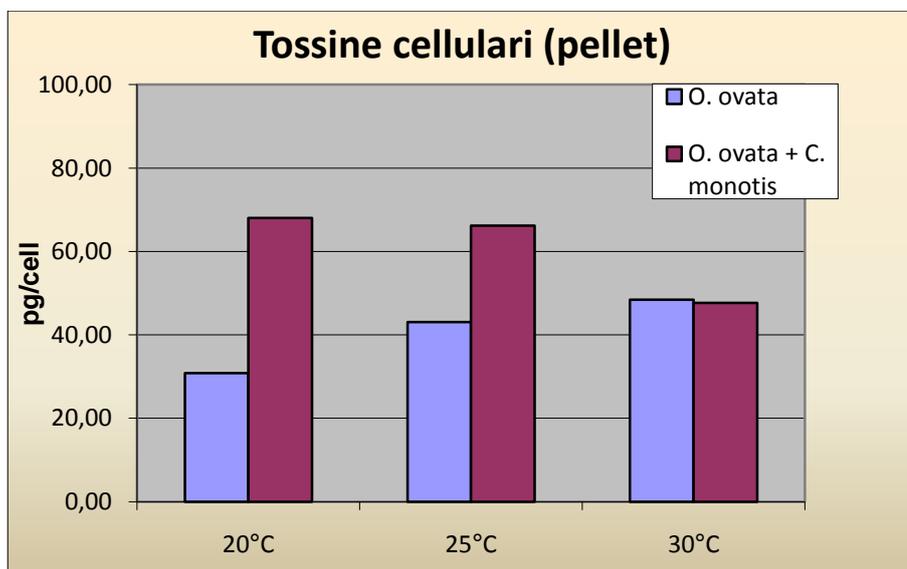


Fig. 70. Contenuto cellulare di tossine alle tre temperature, in monocultura e coltura mista in pg/cell.

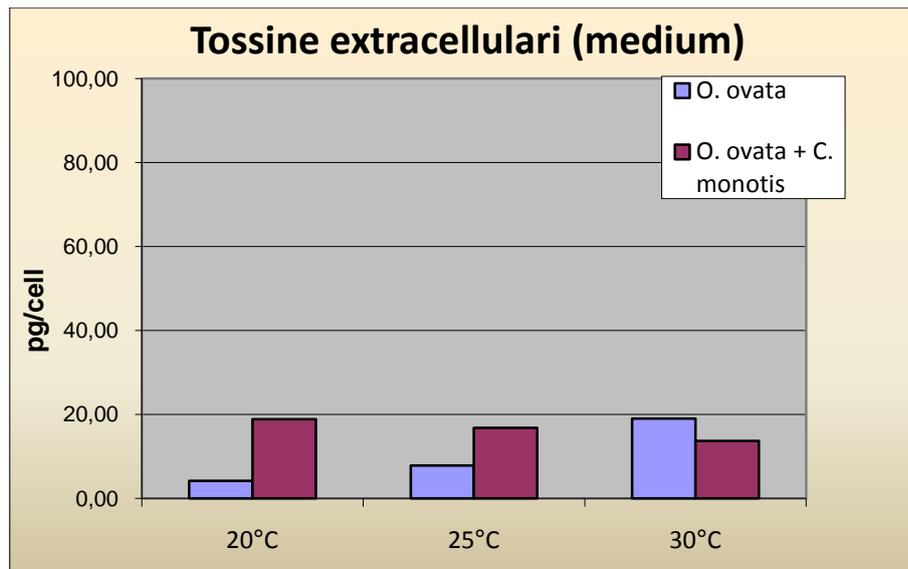


Fig. 71. Rilascio di tossine alle tre temperature, in monocultura e coltura mista in pg/cell.

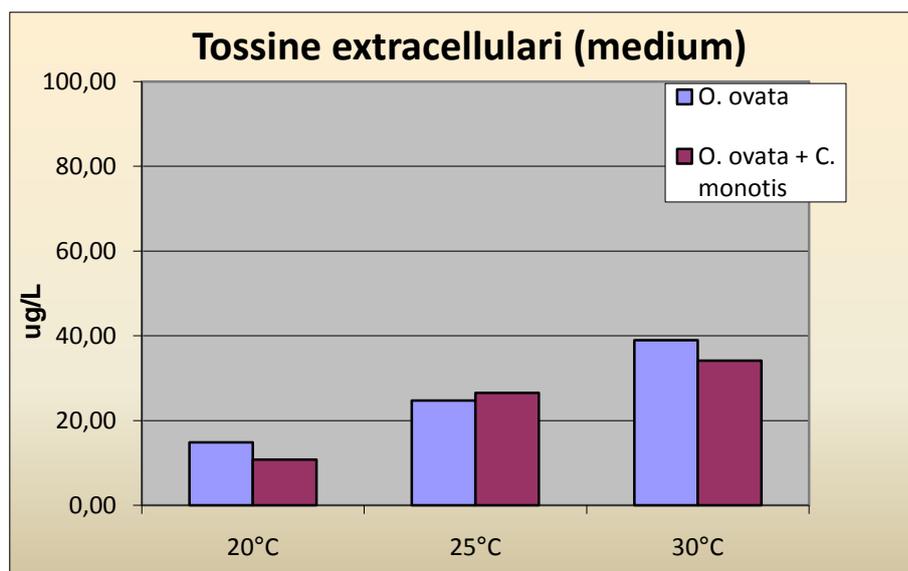


Fig. 72. Rilascio di tossine alle tre temperature, in monocultura e coltura mista in ug/l.

Osservando la fig. 70, si può notare che il quantitativo di tossine per cellula di *O. ovata* nella monocultura, è in correlazione diretta con la temperatura, come osservato da van Rijssel et al. (2007) su *Phaeocystis pouchetii*; anche la dose rilasciata nel mezzo è maggiore, probabilmente in seguito ad una maggior lisi cellulare conseguenza di un maggiore stress termico.

Nella coltura mista invece la relazione con la temperatura è inversa. Questa situazione è probabilmente riconducibile al livello di stress cui l'alga è sottoposta dal fattore fisico, come già evidenziato negli esperimenti precedenti (vedi 3.3.1.2). Infatti, *O. ovata* singolarmente

sembra crescere meglio a 20°C, piuttosto che a 25°C e 30°C (cap. 12); mentre in associazione con *C. monotis*, raggiunge numeri più alti a 30°C.

La produzione di tossine alla temperatura più alta è identica sia in monocultura che in coltura mista, in questa situazione infatti *O. ovata* raggiunge gli stessi numeri di cellule in entrambe le colture; la scarsa presenza di *C. monotis* non sembra interessare né la crescita di *O. ovata* né la produzione di tossine, mentre potrebbe essere vero che le tossine rilasciate a 30°C nel mezzo (fig. 71) limitino ulteriormente la crescita di *C. monotis* (cap. 12), che già si trova comunque in una situazione di forte stress a causa dell'elevata temperatura (cap. 10). Al contrario a 20°C la produzione di tossine per cellula da parte di *O. ovata* è molto maggiore quando si trova in presenza di *C. monotis* segno, come già accennato, di una risposta da parte di *O. ovata* che, forse, sintetizza più tossina come forma di difesa (o di attacco a scopo di mixotrofia, vedi 2.2.1 e) e ogni cellula ne rilascia una dose maggiore nel mezzo (fig. 72). Tuttavia il quantitativo totale di tossine presente nel mezzo è in realtà più alto sia 20°C che a 30°C nella coltura singola rispetto alla mista, dato che la densità cellulare di *O. ovata* è inferiore in quest'ultima (cap. 12).

Nella maggior parte degli studi sull'allelotopia nel fitoplancton si assume che le tossine vengano rilasciate nel mezzo e che quindi vengano in contatto con le membrane cellulari degli organismi bersaglio; questo è probabilmente il modo più comune in cui i composti allelopatici agiscono (Granéli e Hansen, 2006), tuttavia non è sempre così. Uchida et al. (1995, 1999, entrambi citati in Uchida 2001) hanno scoperto che la dinoflagellata *Heterocapsa circularisquama* uccide altre alghe attraverso il contatto, mentre Kamiyama (1997) e Kamiyama e Arima (1997) confermano la tesi, aggiungendo anche che i filtrati non sono tossici. Purtroppo non si sa nulla al riguardo su *O. ovata*, a cominciare dalla possibile produzione di altre sostanze con effetto allelopatico oltre alle tossine già note, come indicato da Sugg and Van Dolah (1999), Tillmann and John (2002), Fistarol et al. (2003) Suikkanen et al. (2004, 2006) (vedi 4.3) in studi su altre tossine e specie algali (e.g. PSP in *Alexandrium tamarense*).

Le singole tossine sono invece presenti in percentuali piuttosto costanti nelle varie colture; piccole differenze sembrano apprezzabili tra mezzi di coltura e cellule, in particolare si ha un valore % maggiore di palitossina putativa a scapito dell'ovatossina a nel medium (fig. 73).

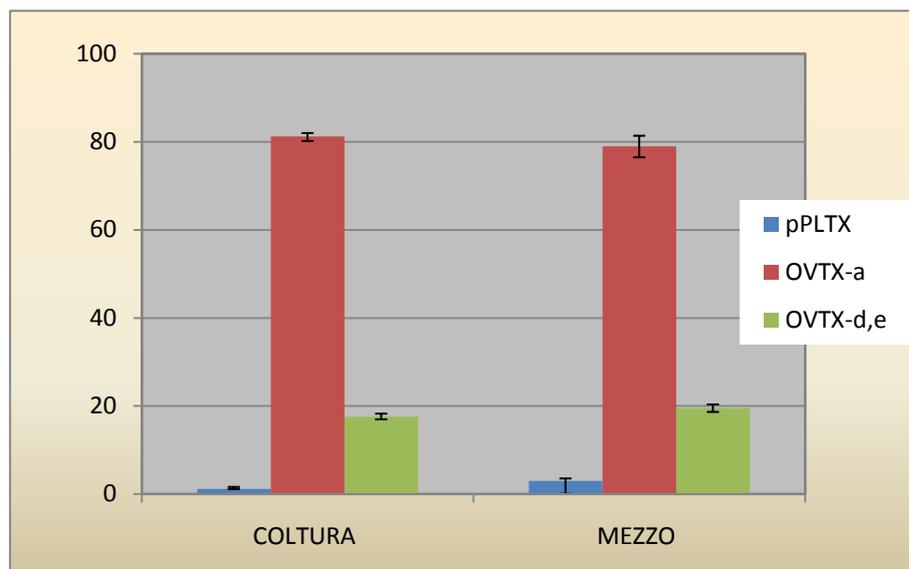


Fig. 73. Percentuale delle singole tossine sul totale.

pPLTX = palitossina putativa, OVTX-a = ovatossina a, OVTX-d,e = ovatossine d ed e.

Dalla fig. 73, emerge come OVTX-a sia la tossina prodotta in maggior quantità da *O. ovata* (cap. 3). E' interessante notare nel grafico l'assenza delle ovatossine b e c; il ceppo di *O. ovata* oggetto dello studio infatti (OOAN0816) è l'unico isolato finora con la peculiarità di non sintetizzare questi composti. OVTX-d,e, pur essendo composti distinti, sono stati raggruppati in un unico valore poiché la differenza strutturale tra loro è talmente minima che lo strumento utilizzato per le analisi cromatografiche le registra entrambe sotto forma di un unico picco.

14.1. CONSIDERAZIONI SU CRESCITA, TOSSICITA' ED EFFETTO ALLELOPATICO DI *O.ovata* E *C. monotis*

Alla luce di quanto emerso dalle analisi sulla tossicità appena illustrate, e dei risultati ottenuti nell'esperimento eseguito facendo crescere *C. monotis* nel filtrato di *O. ovata* (vedi 6.3.2 e cap. 13), pare che le tossine di *O. ovata* non abbiano un effetto particolarmente evidente, o comunque univocamente riconducibile ad esse, sulla crescita di *C. monotis* (che invece alle basse temperature sembra esercitare un chiaro effetto negativo su *O. ovata*). E' possibile che *C. monotis* non sia particolarmente sensibile alle tossine di *O. ovata*. Come affermano Figueredo et al. (2007) e Fistarol et al. (2003), infatti, non tutte le specie bersaglio mostrano

gli effetti ad un determinato composto allelopatico; le dinoflagellate, in particolare, sono solitamente meno suscettibili a tali sostanze rispetto a diatomee e ciliati (Fistarol et al., 2003). In ogni caso, alla temperatura più bassa, entrambe le alghe raggiungono numeri di cellule inferiori rispetto alle monoculture, tuttavia *O. ovata* sembra soffrire maggiormente della presenza di *C. monotis* e non viceversa. Al contrario, alla temperatura più alta *O. ovata* raggiunge livelli di crescita uguali a quelli ottenuti in assenza di *Coolia*, la quale invece mostra evidenti segni di sofferenza. Si può ipotizzare che un eventuale effetto allelopatico a 20°C da parte di *O. ovata* su *C. monotis* sia ridotto dall'elevato numero delle cellule bersaglio, come sostiene Tillmann (2003) in esperimenti che utilizzavano come alga target *Oxyrrhis marina* (vedi 4.4.2.1), mentre a 30°C l'effetto si amplificherebbe, vista la scarsa densità di *C. monotis* a fronte di una quantità 6 volte maggiore di *O. ovata*.

Inoltre bisogna considerare che test in laboratorio sulla tossicità di 7 ceppi mediterranei di *C. monotis* condotti sul crostaceo *Artemia salina* (Canonico, 2011), hanno evidenziato una certa tossicità da parte dell'alga, pertanto non si può escludere completamente che anch'essa abbia un effetto allelopatico su *O. ovata*. In ogni caso il ceppo più tossico di *C. monotis* ha fatto registrare il 90% di mortalità su *Artemia* dopo sonicazione (le cellule vive solamente il 18%) e con densità di 11.700 cell/ml; valori nettamente inferiori a quelli di *O. ovata* di un ceppo del Conero, che ha raggiunto il 90% di mortalità su *Artemia salina* con concentrazioni di 45 cell/ml. Questi test hanno messo in luce l'azione delle tossine sui crostacei, ma gli stessi composti potrebbero esercitare effetti totalmente dissimili sulle microalghe.

Tuttavia, comparando i dati di crescita delle monoculture (cap. 11 e 12) con quelli associati alle colture miste (cap. 13) non si può non supporre l'esistenza di fenomeni di competizione che modificano profondamente l'andamento della crescita delle singole alghe.

La spiegazione più plausibile sembra essere connessa alle velocità di consumo di nutrienti delle singole alghe. In ambiente marino, infatti, le popolazioni algali si alternano in numero e distribuzione a seconda di una grande serie di variabili. Ogni specie algale ed ogni ceppo all'interno della stessa specie predilige condizioni leggermente diverse (concetto di nicchia ecologica) in base alla sua fisiologia, pertanto in determinati momenti vince la competizione con altre alghe, in altri la subisce. Tindall e Morton (1998) affermano, a proposito dei nutrienti, che le dinoflagellate bentoniche/epifitiche differiscono per quanto riguarda il fabbisogno dei due maggiori nutrienti limitanti.

Di seguito riportiamo la velocità di consumo di azoto e fosforo per le monoculture e per la coltura mista.

CONSUMO DI N ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$)											
<i>C. monotis</i>				<i>O. ovata</i>				<i>C + O</i>			
giorni	20°C	25°C	30°C	giorni	20°C	25°C	30°C	giorni	20°C	25°C	30°C
0 - 2	0	0	0	0 - 2	7,50	7,61	18,7	0 - 3	1,43	9,93	12,5
2 - 7	6,51	7,46	4,51	2 - 7	6,94	16,4	12,3	3 - 8	11,3	7,31	9,49
7 - 10	17,1	14,7	10,3	7 - 9	12,0	29,5	20,7	8 - 10	9,54	17,1	20,5
10-14	20,3	21,1	14,9	9-14	19,8	2,86	6,09	10-15	16,9	14,2	9,34

Tab. 10. Velocità di consumo di azoto (N di NO_3^-) nei rispettivi intervalli di tempo.

CONSUMO DI P ($\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$)											
<i>C. monotis</i>				<i>O. ovata</i>				<i>C + O</i>			
giorni	20°C	25°C	30°C	giorni	20°C	25°C	30°C	giorni	20°C	25°C	30°C
0 - 2	1,61	2,19	1,46	0 - 2	1,15	0,89	1,31	0 - 3	1,33	1,09	0,68
2 - 7	0,43	0,20	0,51	2 - 7	0,26	0,55	0,42	3 - 8	0,41	0,61	0,50
7 - 10	0,08	0,05	0,04	7 - 9	0,07	0,73	0,49	8 - 10	0,17	0,06	0,87
10-14	0,02	0,01	0,02	9-14	0,57	0,09	0,16	10-15	0,04	0,03	0,06

Tab. 11. Velocità di consumo di fosforo (P di PO_4^{3-}) nei rispettivi intervalli di tempo.

Come già accennato, alla temperatura inferiore, entrambe le alghe raggiungono numeri di cellule inferiori rispetto alle monoculture, tuttavia *O. ovata* sembra risentire in misura più consistente della co-presenza di *C. monotis*. D'altra parte, a 30°C *O. ovata* cresce indisturbata, mentre *C. monotis* stenta a proliferare.

Se osserviamo le tab. 10 e 11, vediamo che *C. monotis* consuma i fosfati più avidamente nei primi giorni di crescita rispetto a *O. ovata*; il divario è più marcato a 20°C, mentre si riduce all'aumentare della temperatura. E' quindi possibile che alla temperatura inferiore *O. ovata* si trovi ben presto in carenza di fosfati. D'altro canto, *O. ovata* sembra consumare i nitrati più velocemente di *C. monotis* nei primi giorni di crescita; la differenza è maggiore a 30°C e cala in funzione della diminuzione di temperatura.

E' pertanto possibile che in questa situazione *C. monotis*, già fortemente stressata dalla temperatura (cap. 10) e forse dal maggior rilascio di tossine da parte di *O. ovata* (cap. 14), si trovi anche ad affrontare un problema di carenza di nitrati, che indebolisce ulteriormente

l'alga e la rende più suscettibile ad un eventuale pressione allelopatica, come sostenuto da Granéli e Johansson (2003) e Fistarol (2005) in seguito a studi su *Prymnesium parvum* in associazione con *Phaeocystis pouchetii*.

Queste ipotesi sono ulteriormente supportate dal fatto che le colture miste mostrano un pattern di consumo di nutrienti che, per ciascuna temperatura, riflette quello mostrato dall'alga dominante, quando cresciuta in monocultura (cap. 10, 11, 12 e tab. 10, 11).

CONCLUSIONI

Il ceppo di *Ostreopsis ovata* utilizzato per lo studio (OOAN0816), ha mostrato una crescita migliore alla temperatura di 20°C, piuttosto che a 25 e 30°C, in accordo con lo studio condotto da Pezolesi et al. (in preparazione) su un altro ceppo del nord Adriatico, anche se con il raggiungimento di numeri di cellule inferiori. Lo stesso comportamento è stato registrato per *C. monotis* (CMAN0701) proveniente dalla medesima località geografica (monte Conero, Ancona), a sostegno dell'ipotesi dell'esistenza di differenti ceppi con diverse caratteristiche negli aspetti ecofisiologici che regolano l'adattamento all'ambiente in cui vivono (Guerrini et al., 2010).

Le analisi tossicologiche condotte per le colture di *O. ovata*, hanno riportato valori di tossine (in pg/cell), sia nel pellet che nel mezzo, simili a quelli riportati da Feller (2007) e Battaglia (2009) per ceppi adriatici di *O. ovata* coltivati a 20°C (e superiori al ceppo ligure riportato da Ciminiello et al. 2008, e a quello tirrenico studiato da Feller, 2007), mentre le tossine in µg/l di coltura sono inferiori, a causa dei minori numeri di cellule raggiunti in questo studio.

Alla temperatura di 25 e 30°C, il quantitativo di tossine sia intra- che extracellulare aumenta, come osservato anche da Pezolesi et al. (in preparazione) su un altro ceppo del Conero, portando a pensare ad una maggiore produzione di tossine all'aumentare dello stress fisiologico dell'alga arrecato in questo caso da una temperatura sub-ottimale per la crescita (confermando quanto visto per altre specie tossiche da Granéli and Flynn, 2006).

L'allestimento di co-colture di *O. ovata* e *C. monotis* a 20, 25 e 30°C ha dato risultati interessanti, mettendo in luce l'importanza della competizione in ambiente fitoplanctonico.

Alla temperatura inferiore, si è verificata una forte inibizione nella crescita di *O. ovata* (se confrontata con la monocultura), riconducibile ad una limitazione da fosfati provocata dal loro rapido assorbimento da parte di *C. monotis*. Alla temperatura maggiore, invece, *C. monotis* ha manifestato un notevole stress, imputabile ad una maggior velocità nell'assorbimento di nitrati da parte di *O. ovata*. Un'ulteriore conferma di come anche specie che vivono in stretta associazione in ambiente marino, differiscano sensibilmente nelle esigenze nutritive (Tindall e Morton, 1998).

La produzione di un quantitativo di tossine per cellula 5 volte superiore nella coltura mista a 20°C, rispetto alla monocultura da parte di *O. ovata*, nonché il bassissimo numero di cellule raggiunto da *C. monotis* nella coltura mista, hanno lasciato pensare ad un possibile effetto allelopatico dei composti sintetizzati da *O. ovata* (aspetto su cui non esistono studi di laboratorio) che abbia agito in sinergia con la carenza di nutrienti osservata.

Tuttavia, in seguito ad un esperimento condotto facendo crescere *C. monotis* a 20°C in un filtrato di *O. ovata* e in un filtrato con ulteriore aggiunta di tossine (proprio al fine di

evidenziare eventuali fenomeni di allelopatia), non è stato possibile mettere in luce chiari effetti; si deve considerare che in quel caso le tossine aggiunte erano in quantità superiore a quella rilasciata nel medium da *O. ovata* in coltura mista.

E' possibile che *C. monotis* non sia particolarmente sensibile alle tossine prodotte da *O. ovata* (vedi 14.1), o che risenta dell'effetto solo se già stressata, ad esempio alla temperatura di 30°C, (Granéli e Johansson, 2003; Fistarol, 2005) o che le tossine presenti nel filtrato vengano rapidamente degradate da fattori esterni (e.g. Suikkanen et al., 2004; Fistarol et al., 2005).

Alcune indicazioni in merito a quest'ultimo studio sono emerse riguardo ai batteri; le colture di *C. monotis* coltivate in filtrati di *O. ovata* sterili hanno mostrato una crescita minore rispetto a quelle cresciute in presenza di batteri. E' difficile comunque dire se questo riscontro negativo sia dovuto ad una mancata attività di rimineralizzazione batterica (Soria-Dengg et al., 2001) oppure ad un'assenza di intervento dei microorganismi nella riduzione della tossicità (Christoffersen et al., 2002; Sengco et al., 2005; Roth et al., 2007; Hagstrom et al., 2007).

Possiamo affermare che la presenza di una bassa concentrazione di cellule di *C. monotis* nei bloom di *O. ovata* non sia attribuibile ad un effetto di inibizione di tipo allelopatico da parte delle palitossine ma ad un diverso uso di risorse da parte delle due specie. In particolare, i bloom di *O. ovata* non sono stati associati finora a elevate concentrazioni di nutrienti ed è da ritenere che questa specie possa crescere anche in condizioni oligotrofiche mentre per *C. monotis* sembrano essere necessarie concentrazioni di nutrienti, soprattutto di fosforo, più elevate.

BIBLIOGRAFIA

- Abbate, M., Bordone, A., Cerrati, G., Lisca, A., Peirano, A., 2007. Variabilità della distribuzione e densità di *Ostreopsis ovata* nel golfo della Spezia. *Biol. Mar. Mediterr.* 14 (2), 286-287.
- Abbott, B.C., Ballantine, D., 1957. The toxin from *Gymnodinium veneficum* Ballantine. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 36:169-189.
- Ade P., Funari E., Poletti R., 2003. Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 39(1): 53-68.
- Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. *Harmful Algae* 5, 717-730.
- Aligizaki, K., Katikou P., Nikolaidis, G., Panou A., 2008. First episode of shellfish contamination by palitoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). *Toxicon* 51, 418-427.
- Allen, J.I., Anderson, D., Burford, M., Dyhrman, S., Flynn, K., Glibert, P.M., Granéli, E., Heil, C., Sellner, K., Smayda, T., Zhou, M., 2006. Global ecology and oceanography of harmful algal blooms in eutrophic systems. P. Glibert Ed., GEOHAB report 4, IOC and SCOR, Paris and Baltimore, pp.74.
- Alverca, E., Biegala, I.C., Kennaway, G.M., Lewis J., Franca, S., 2002. In situ identification and localization of bacteria associated with *Gymnodinium instriatum* (Gymnodiniales, Dinophyceae) by electron and confocal microscopy. *Eur. J. Phycol.* 37, 523-530.
- Andersen, P., 1996. Design and implementation of some harmful algae monitoring systems. *IOC Techn Ser UNESCO* 1996; 44:102.
- Anderson, D.M., Lobel, P.S., 1987. The continuing enigma of ciguatera. *Biol. Bull.* 172:89-107.
- Anderson, D.M., 1989. Toxic algal blooms and red tides: a global perspective. In: Okaichi, Anderson, D.M., Nemoto, T. (Eds.), *Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier. pp. 11-16.
- Anderson, D., Glibert, P., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and eutrophication: nutrient sources, composition and consequences. *Estuaries* 25, 562-584.
- Armi, Z., Turki, S., Trabelsi, E., Maiz, N.B., 2010. First recorded proliferation of *Coolia monotis* (Meunier, 1919) in the North Lake of Tunis (Tunisia); correlation with environmental factors. *Environ. Monit. Assess* 164, 423-433.
- Arzul et al., 1999 G. Arzul, M. Seguel, L. Guzman and E. Erard-Le Denn, Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232 (2) (1999), pp. 285–295.

- Ashton, M., Tosteson, T., Tosteson, C., 2003. The effect of elevated temperature on the toxicity of the laboratory cultured dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* (Dinophyceae). *Rev. Biol. Trop.* 51, 1-6.
- Bagchi and Marwah, 1994 S.N. Bagchi and J.B. Marwah, Production of an algicide from cyanobacterium *Fischerella* species which inhibits photosynthetic electron transport, *Microbios* 79 (320) (1994), pp. 187–193.
- Barone, R., Prisinzano A., 2006. Peculiarità comportamentale del dinoflagellato *Ostreopsis ovata* Fukuyo (Dinophyceae): la strategia del ragno. *Naturalista sicil.* 30, 401-418.
- Barone, R., 2007. Behavioural trait of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Mediterranean rock pools: the spider's strategy. *Harmful Algal News* 33, 1-3.
- Barreiro et al., 2005 A. Barreiro, C. Guisande, I. Maneiro, T.P. Lien, C. Legrand, T. Tamminen, S. Lehtinen, P. Uronen and E. Granéli, Relative importance of the different negative effects of the toxic haptophyte *Prymnesium parvum* on *Rhodomonas salina* and *Brachionus plicatilis*, *Aquat. Microb. Ecol.* 38 (3) (2005), pp. 259–267.
- Battocchi, C., Carubbi, M., Cappellacci, S., Totti, C., Penna, A., 2008. Applicazione di tecniche molecolari per l'identificazione di microalghe bentoniche tossiche (Ostreopsidaceae) in aree costiere dell'Adriatico settentrionale. *Biol. Mar. Mediterr.* 15 (1), 252-253.
- Battaglia, L., (2009). Fioriture di *Ostreopsis ovata* ed influenza di fattori ambientali su crescita e tossicità. Tesi di laurea specialistica in conservazione e gestione del patrimonio naturale, anno accademico 2008-2009, Università di Bologna.
- Bianco, I., Sangiorgi, V.C., Penna A., Guerrini, F., Pistocchi, R., Zaottini, E., Congestri, R., 2007. *Ostreopsis ovata* in benthic aggregates along the Latium coast. (middle Tyrrhenian sea). In: International Symposium on Algal Toxins, Trieste, May 27-29, 2007.
- Bignami, G.S., 1993. *Toxicon* 31, 817-820.
- Bomber, J.W., 1985. Ecological studies of benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida Keys. M. Sc. Thesis, Florida Institute of Technology, 104 pp.
- Bomber, J.W., Morton, S.L., Babinchak, J.A., Norris, D.R., Morton, J.G., 1988. Epiphytic dinoflagellate of drift algae – another toxigenic community in the ciguatera food chain. *Bull. Mar. Sci.*, Vol. 43 pp. 204-214.
- Boni L., Guerrini F., Pistocchi R., Cangini M., Pompei M., Cucchiari E., Romagnoli T., Totti C., 2005. Microalghe tossiche del Medio e Alto Adriatico. Guida per acquacoltori e operatori sanitari. Casa editrice Fernandel - Ravenna.
- Bottalico, A., Micella, P., Felicitì, G.P., 2002. Fioritura di *Ostreopsis* sp. (Dinophyta) nel porto di Otranto. In: Gruppo di Lavoro per l'Algologia – Società Botanica Italiana, Chioggia, 8–9 Novembre 2002.

Camacho, G.F., Gallardo, R.J., Sanchez, M.A., Ceron, G.M.C., Belarbi, E.H., Chisti, Y., Molina, G.E., 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology advances*. 25: 176-194.

Canonico, L., 2010. Caratterizzazione della tossicità di Ostreopsidaceae nel Mediterraneo. Tesi di laurea magistrale in biologia marina, Università di Bologna.

Caroppo, C., Uva, J., Prato, E., Biandolino, F., 2009. Messa a punto di test biologici con crostacei per la valutazione della tossicità di *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae). *Biol. Mar. Mediterr.* 16 (1), 380-381.

Carson, R.D., Tindall, D.R., 1985. Distribution and periodicity of toxic dinoflagellates in the Virgin Islands. In: *Toxic dinoflagellates*, edited by Anderson, D.M. et al., Elsevier, New York, pp. 171-176.

Chauhan et al., 1992 V.S. Chauhan, J.B. Marwah and S.N. Bagchi, Effect of an antibiotic from *Oscillatoria* sp. on phytoplankters higher plants and mice, *New Phytol.* 120 (2) (1992), pp. 251–257.

Christoffersen, K., Lick, S., Winding, A., 2002. Microbial activity and bacterial community structure during degradation of microcystins. *Aquat. Microb. Ecol.* 27: 125-136.

Chrost, R.S., 1975. Inhibitors produced by algae as an ecological factor affecting bacteria in water ecosystem. I. Dependence between phytoplankton and bacterial development. *Acta Microbiol. Pol. Ser. B* 7:125-133.

Ciminiello, P., Fattorusso E., 2004. Shellfish toxins-Chemical studies on North Adriatic Mussels. *Eur. J. Org. Chem.* 12, 2533-2551.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino M., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2006. Putative Palytoxin and Its New Analogue, Ovatoxin-a, in *Ostreopsis ovata* Collected Along the Ligurian Coasts During the 2006 Toxic Outbreak. *American Society for Mass Spectrometry, Elsevier Inc.* doi: 10.1016/j.jasms.2007.11.001.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Forino M., Magno, G.S., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2006. The Genoa outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis Ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Anal. Chem.* 78, 6153-6159.

Ciminiello, P., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., Tartaglione, L., Grillo, C., Melchiorre, N., 2008. 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.

Collos, Y., Gagne, C., Laabir, M., Vaquer, A., Cecchi, P., Souchu, P., 2004. Nitrogenous nutrition of *Alexandrium catenella* (Dinophyceae) in cultures and in Thau lagoon, southern France. *J. Phycol.* 40, 96-103.

- Congestri, R., Bianco, I., Sangiorgi, V., Penna, A., Zaottini, E., Albertano, P., 2006. *Ostreopsis Ovata* in aggregati bentonici lungo il litorale pontino. In: 101° congresso della società botanica italiana, Caserta, 27-29 settembre 2006.
- Delgado, G., Lechuga-Deveze, C.H., Popowski, G., Troccoli, L., Salinas, C.A., 2006. Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba. *Rev. Biol. Trop* 54, 299-310.
- de Figueiredo et al., 2004 D.R. de Figueiredo, U.M. Azeiteiro, F. Goncalves and M.J. Pereira, *Aphanizomenon flos-aquae* grown under different nutrient concentrations and the effects of its exudates on growth of two green algae, *Fresen. Environ. Bull.* 13 (7) (2004), pp. 657–664.
- Di Turi, L., Lo Caputo, S., Marzano, M.C., Pastorelli, A.M., Pompei, M., Rositani, L., Ungano, N., 2003. Sulla presenza di *Ostreopsidaceae* (Dinophyceae) lungo il litorale barese. *Biol. Mar. Medit.* 10 (2), 675–678.
- Dodge, J.D. 1982. *Marine Dinoflagellates of the British Isles*. Her Majesty's Stationery Office, London. 303 pp.
- Doucette, G.J., 1995. Interactions between bacteria and harmful algae: a review. *Nat. tox.* 3, 65-74.
- Doucette, G.J., Kodama, M., Franca, S., Gallache, S., 1998. Bacterial interactions with harmful algal bloom species: bloom ecology, toxicogenic, and cytology. In: Anderson, D.M., Cembella, A.E., Hallegraeff, G.M. (Eds.). *Bloom Dynamics and Physiology of *Gymnodinium breve*, with Emphasis on the Gulf of Mexico*. The Physiological Ecology of Harmful Algal Blooms, NATO ASI series G, vol. 41. Springer, Berlin, pp. 619-648.
- Edvardsen, B., Moy, F., Paasche, E., 1990. Hemolytic activity in extracts of *Chrysocromulina polylepis* grown at different levels of selenite and phosphate. In: *Toxic marine phytoplankton*, E. Granéli, B. Sundstom, L. Edler, and D.M. Anderson, eds., Elsevier, New York, pp. 284-289.
- Faust, M.A., 1992. Observations on the morphology and sexual reproduction of *Coolia monotis* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 28, 94-104.
- Faust, M.A., Morton, S.L., Quod, J.P. 1996. Further SEM study of of marine dinoflagellates: the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae). *J. Phycol.* 32, 1053-1065.
- Faust, M. A., 1998. Mixotrophy in tropical benthic dinoflagellates. In *Harmful Algae*. (eds.) Reguera B., Blanco J., Fernandez M. L., Watt T. Xunta de Galicia and IOC Commission of UNESCO, Paris, France. 390-393.
- Feller, A., 2007. Crescita e tossicità di due ceppi di *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae). Tesi di laurea specialistica in biologia marina, anno accademico 2006-2007, Università di Pisa.

- Figueredo et al., 2007 C.C. Figueredo, A. Giani and D.F. Bird, Does allelopathy contribute to *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) bloom occurrence and geographic expansion?, *J. Phycol.* 43 (2) (2007), pp. 256–265.
- Fistarol, G.O., Legrand C., Granéli, E., 2003. Allelopathic effect of *Prymnesium parvum* on a natural plankton community. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 255: 115-125.
- Fistarol, G.O. Legrand C., Selander, E., Hummert, C., Stolte, W., Granéli, E., 2004a. Allelopathy in *Alexandrium spp*: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquat. Microb. Ecol.* 35: 45-56.
- Fistarol, G.O., Legrand C., Rengefors, K., Granéli, E., 2003. 2004b. Temporary cyst formation in phytoplankton: a response to allelopathic competitors? *Environ. Microbiol.* 6: 791-798.
- Fukami, K., Nishijima, T., Murata, H., Doi, S., Hata, Y., 1991. Distribution of bacterial influential on the development and the decay of *Gymnodinium nagasakiense* red tide and their effects on algal growth. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 2321-2326.
- Fukuyo, Y., 1981. Taxonomic study on benthic dinoflagellates collected in coral reef. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47: 967-978.
- Fukuyo, Y., Imai, I., Kodama, M., Tamai, K., 2002. Red tides and other harmful algal blooms in Japan. In: Taylor, F.J.R., Trainer, V.L. (Eds.), *Harmful Algal Blooms in the PICES Region of the North Pacific*. PICES Sci. Rep. No. 23, pp. 7-20.
- Gallitelli, M., Ungano, N., Addante, L.M., Gentiloni, N., Sabba` , C., 2005. Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *JAMA* 293 (21), 2599–2600.
- Gangemi E., Giacobbe M. G., Fraga S., 2006. Il complesso delle specie ciguateriche nelle lagune di Capo Peloro (Messina, Sicilia). *Biol. Mar. Medit.* 13(1): 979-983.
- Gedaria, A.I., Luckas, B., Reinhardt, K., Azanza, R.V., 2007. Growth response and toxin concentrations of cultured *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* to varying salinity and temperature conditions. *Toxicon* 50, 518-529.
- Graneli, E., Johansson, N., 2003. Increase in the production of allelopathic substances by *Primnesium parvum* cells grown under N- or P- deficiency conditions. *Harmful Algae* 2: 135-145.
- Graneli, E., Johansson, N., 2003b. Increase in the production of allelopathic substances by *Primnesium parvum* on the survival and feeding of a ciliate: the influence of different nutrient conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 254, 49-56.

Granéli, E., Flynn, K., 2006. Chemical and physical factors influencing toxin content. In: Granéli, E., Turner, J.T. (Eds.), *Ecological studies. Ecology of Harmful Algae*, vol.189. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp.229-241.

Granéli, E., Pavia, 2006. Allelopathy in marine ecosystems. In: Reigosa, M.J., Pedrol, N., Gonzalez, I. (Eds.) *Allelopathy: A Physiological Process with Ecological Implications*. Springer, The Netherlands, pp. 415-431.

Granéli, E., Hansen, P.J., 2006. Allelopathy in harmful algae: A mechanism to compete for resource? In: Granéli, E., Turner, J. (Eds.), *Ecology of harmful algae. Ecological Studies*, Springer, Heidelberg, 189: 229-241.

Granéli, E., Salomon, P.S., Fistarol, G. 2008. The Role of Allelopathy for Harmful Algae Bloom Formation. *NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology* 159-178, DOI: 10.1007/978-1-4020-8480-5_5.

Granéli, E., Weberg, M., 2008. Harmful algal blooms of allelopathic species: the role of eutrophication, *Harmful Algae*.

Granéli, E., Vidyarthna, N.K., Funari, E., Cumaratunga, R., 2008. Climate change and benthic Dinoflagellates- the *Ostreopsis ovata* case. In: *Proceedings of the 13th International Conference on Harmful Algae*, Hong Kong, 3-7 november 2008.

Granéli, E., Vidyarthna, N.K., Funari, E., Cumaratunga, R., Scenati, R., 2010. Can increase in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? *Harmful Algae* 2010, doi: 10.1016/j.hal.2010.09.002

Greene, R.M., Kurtz, J.C., Stanley, R.S., Chancy, C.A., Murrell, M.C., Genter, F.J., Rogers, J.E., Walker, C.C., 2000. Variable brevetoxin production in *Gymnodinium breve*, attributable to growth conditions and strain differences. In: *Symposium on Harmful Marine Algae in the U.S.* 4-9 december , 2000. Woods Hole, M.A. p. 35.

Gross et al., 1991 E.M. Gross, C.P. Wolk and F. Jüttner, Fischerellin, a new allelochemical from the fresh-water cyanobacterium *Fischerella muscicola*, *J. Phycol.* 27 (6) (1991), pp. 686–692.

Gross, E.M., 2003. Allelopathy of aquatic autotrophs. *Crit. Rev. Plant. Sci.* 22: 313-339.

Guerrini F., Ciminiello P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Fattorusso, E., Boni, L., Pistocchi, R., 2007. Influence of temperature, salinity, and nutrient limitation on yessotossin production and release by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in batch cultures. *Harmful algae* 6, 707-717.

Guerrini, F., Pezzolesi, L., Feller, A., Riccardi, M., Ciminiello P., Dell'Aversano, C., Tartaglione, L., Dello Iacovo, E., Fattorusso, E., Forino, M., Pistocchi, R., 2010. Comparative

growth of and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* 55 (2010), 211-220.

Habermann, E., Ahnert-Hilger, G., Chatwal, G.S., Beress, L., 1981. *Biochimic. Biophys. Acta* 649, 481-486.

Hagstrom, J.A., Granéli, E., Maneiro, I., Barreiro, A., Petermann, A., Svensen, C., 2007. Release and degradation of amnesic shellfish poison from decaying *Pseudo-nitzschia multiseries* in presence of bacteria and organic matter.

Hallegraeff, G., 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* 32, 79-99.

Hallegraeff, G.M., 2003. Harmful algal blooms: a global overview. In: Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M., Cembella, A.D. (Eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae. Monograph on Oceanographic Methodology*, vol. 11. UNESCO publishing, Paris; France, pp. 25-49.

Hansen, P.J., 2002. Effect of high pH on the growth and survival of marine phytoplankton: implications for species succession, *Aquat. Microb. Ecol.* 28:279-288.

Hansen et al., 2004 E. Hansen, A. Ernstsens and H.C. Eilertsen, Isolation and characterisation of a cytotoxic polyunsaturated aldehyde from the marine phytoplankter *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim, *Toxicology* 199 (2-3) (2004), pp. 207-217.

Hansen and Eilertsen, 2007 E. Hansen and H.C. Eilertsen, Do the polyunsaturated aldehydes produced by *Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim influence diatom growth during the spring bloom in Northern Norway?, *J. Plankton. Res.* 29 (1) (2007), pp. 87-96.

Heil C. A., Maranda L., Shimuzu Y., 1993. Mucus-associated dinoflagellates: large scale culturing and estimation of growth rate. *Toxic Phytoplankton Blooms in the Sea.* 501-506.

Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C., Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humpries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall, H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecker, D.K., Suddleson, M., 2008. Eutrophication and harmful algae blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8, 3-13.

Hinga, K.M., 1992. Co-occurrence of dinoflagellate blooms and high pH in marine enclosures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 86: 181-187.

Hirata et al., 1996 K. Hirata, J. Takashina, H. Nakagami, S. Ueyama, K. Murakami, T. Kanamori and K. Miyamoto, Growth inhibition of various organisms by a violet pigment, Nostocine A, produced by *Nostoc spongiaeforme*, *Biosci. Biotech. Bioch.* 60 (11) (1996), pp. 1905-1906.

- Hirata et al., 2003 K. Hirata, S. Yoshitomi, S. Dwi, O. Iwabe, A. Mahakhant, J. Polchai and K. Miyamoto, Bioactivities of Nostocine A produced by a freshwater cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* TISTR 8169, *J. Biosci. Bioeng.* 95 (5) (2003), pp. 512–517.
- Holmes, M.J., Lewis, R.J., Jones, A., Wong Hoy, A.W., 1995. Cooliatoxin, the first toxin from *Coolia monotis* (Dinophyceae). *Nat. Toxicol.* 3, 355-362.
- Hoshaw, R.W., Rosowski, J.R., 1973. Methods for microscopic algae. In: J.R. Stein (ed.) *Handbook of Phycological Methods. Culture methods and growth measurements.*
- Hwang, D.F., Lu, Y.H., 2000. Influence of environmental and nutritional factors on growth, toxicity and and toxin prole of dinoflagellate *Alexandrium minutum*. *Toxicon*, 38, 1491-1503.
- Igarashi, T., Oshima, Y., Murata, M., Yasumoto, T., 1995. Chemical studies on prymnesins isolated from *Prymnesium parvum*. In: P.Lassus, G.Arzul, E. Erard-Le Denn, P.Gentienand C. Marcaillou-Le Baut, eds., *Harmful marine algal blooms: proceedings of the sixth International Conference on Toxic Marine Phytoplankton, October 1993, Nantes, France.* Lavoisier Publishing, Paris, pp. 303-308.
- Igarashi, T., Aritake, S., Yasumoto, T., 1998. Biological activities of Prymnesin-2 isolated from a red tide alga *Prymnesium parvum*, *Nat. Toxins* 6: 35-41.
- Inderjit, S., Dakshini, K.M.M., 1994. Algal allelopathy. *The botanical rewiev* 60:182-196.
- Jasti, S.B., Sieracki, M.E., Poulton, N.J., Giewat, M., Rooney-Warga, J.N., 2005. Phylogenetic diversity and specificity of bacteria closely associated with *Alexandrium spp.* and other phytoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3483-3494.
- Johansson, N., Granéli, E., 1999a. Cell density, chemical composition and toxicity of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta) in relation to different N:P supply ratios. *Mar. Biol.* 135: 209-217.
- Johansson, N., Granéli, E., 1999b. Influence of different nutrient conditions on cell density , chemical composition and toxicity of *Primnesium parvum* (Haptophyta) in semi-continuous cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 239, 243-258.
- Kearns and Hunter, 2000 K.D. Kearns and M.D. Hunter, Green algal extracellular products regulate antialgal toxin production in a cyanobacterium, *Environ. Microbiol.* 2 (3) (2000), pp. 291–297.
- Keating, 1977 K.I. Keating, Allelopathic influence on blue-green bloom sequence in a eutrophic lake, *Science* 196 (4292) (1977), pp. 885–887.

Keating, K.I., 1999. Allelochemistry in plankton communities. In: Inderjit, K.M.M., Dakshini, Foy, C.L. (Eds.), Principles and Practices in plant ecology: allelochemicals interactions. CRC Press, London, pp. 165-178.

Kirchman, D.L., 2001. The ecology of *Citophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. FEMS Microbiol. Ecol. 39, 91-100.

Kodama, M., Doucette, G.J., Green, D.H., 2006. Relationships between bacteria and harmful algae. In: Granéli, E., Turner, J.T. (Eds.), Ecology of Harmful Algae, Ecological Studies, vol. 189. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany, pp.244-255.

Kubanek, J., Hicks, M.K., Naar, J., Villareal, T.A., 2005. Does the red tide dinoflagellate *Karenia brevis* use allelopathy to outcompete other phytoplankton? Limnol. Oceanogr. 50: 883-895.

Ledreux, A., Krys, S., Bernard, C., 2009. Suitability of the neuro-2a cell line for the detection of palytoxin and analogues (neurotoxin phycotoxins). Toxicon 53, 300-308.

Legrand, A-M., 1998. Ciguatera toxins: origin, transfer through the food chain and toxicity to humans. In Harmful Algae: Reguera B., Fernandez, M.L., and Wyatt, T. Xunta de Galicia and IOC of UNESCO 1998.

Legrand, C., Rengefors, K., Fistarol, G.O., Granéli, E., 2003. Allelopathy in phytoplankton – biochemical, ecological and evolutionary aspects. Phycologia 42: 406-419.

Lekan, D.K., Tomas, C.R., 2010. The brevetoxin and brevenal composition of three *Karenia brevis* clones at different salinities and nutrient condition. Harmful algae 9, 39-47.

Lenoir, S., Ten-Hage, L., Turquet, J., Quod, J.P., Bernard, C., Hennion, M.C., 2004. First evidence of palytoxin analogues from an *Ostreopsis mascarensis* (Dinophyceae) benthic bloom in in Southwestern Indian ocean. J.Phycol. 40, 1042-1051.

Lewis, R. J., 2001. The changing face of ciguatera. Toxicon. 39: 97-106.

Lim, P.T., Ogata T., 2005. Salinity effect on growth and toxin production of four tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). Toxicon 45, 699-710.

Lobel, P.S., Anderson D.M., Durant-Clement, M., 1988. Assessment of ciguatera dinoflagellate populations: sample variability and algal substrate selection. Biol. Bull. 175, 91-101.

Maestrini and Granéli, 1991 S.Y. Maestrini and E. Granéli, Environmental conditions and ecophysiological mechanisms which led to the 1988 *Chrysochromulina polylepis* bloom: an hypothesis, *Oceanol. Acta* 14 (4) (1991), pp. 397–413.

Maier Brown, A.F., Dortch, Q., Van Dolah, F.M., Leighfield, T.A., Morrison, W., Thessen, A.E., Steidinger, K.A., Richardson, W., Moncreiff, C.A., Pennock, J.R., 2006. Effect of salinity on distribution, growth, toxicity of *Karenia spp.* Harmful Algae 5, 199-212.

Mangialajo, L., Bertolotto, R., Cattaneo-Vietti, R., Chiantore, M., Grillo, C., Lemèe, R., Melchiorre, N., Moretto, P., Povero, P., Ruggieri, N., 2008. The toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis Ovata*: quantification of proliferation along the coastline of Genoa, Italy, Mar. Poll.Bull. 56, 1209-1214.

Masò, M., Vila, M., Alvare, P., 2005. *Ostreopsis* along the catalan coast (NE Spain): ecological aspects and epidemiologic study. – International seminar “ *Ostreopsis*: un problema per il Mediterraneo? “ Genova, 5 dicembre 2005.

Mayali, X., Azam, F., 2004. Algicidal bacteria in the sea and their impact on algal blooms. J. Eukaryot. Microbiol. 51, 139-144.

Myklestad et al., 1995 S.M. Myklestad, B. Ramlo and S. Hestmann, Demonstration of strong interaction between the flagellate *Chrysochromulina polylepis* (Prymnesiophyceae) and a marine diatom. In: P. Lassus, G. Arzul, E. Erard-Le Denn, P. Gentien and C. Marcaillou-Le Baut, Editors, *Harmful Marine Algal Blooms*, Lavoisier, Paris, France (1995), pp. 633–638.

Mitchell, 1985. Ecological studies of benthic dinoflagellates associated with ciguatera in the Florida Keys: the 0-38 micrometer size fraction. M. sc. Thesis, Florida Institute of Technology, Melbourne, Florida, 46 pp.

Monti, M., Minocci, M., Beran, A., Ives̃a, L., 2007. First record of *Ostreopsis* cfr. *Ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. Mar. Pollut. Bull. 54, 598–601.

Moore, R.E., 1982. Toxins, anticancer agents, and tumor promoters from marine prokariotes. Pure Appl. Chem. 54: 1919-1934.

Moore, R.E., Helfrich, P., Patterson, M.L., 1982. The deadly seaweed of Hana. Oceanus 25:54-63.

Moore et al., 1984 R.E. Moore, C. Cheuk and G.M.L. Patterson, Hapalindoies: new alkaloids from the blue-green alga *Hapalosiphon fontinalis*, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (21) (1984), pp. 6456–6457.

Morton, S.L., Norris, D.R., Bomber, J.W., 1992. 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.

Mulderij, G., Van Donk, E., Roelofs, G.M., 2003. Differential sensitivity of green algae to allelopathic substances from *Chara*. Hydrobiologia, 491: 261-271.

Murphy et al., 1976 T.P. Murphy, D.R.S. Lean and C. Nalewajko, Blue-green algae: their excretion of iron-selective chelators enables them to dominate other algae, *Science* 192 (4242) (1976), pp. 900–902

- Nakajima, T., Oshima, Y., Yasumoto, T., 1981. Toxicity of benthic dinoflagellate in Okinawa. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47, 1029-1033.
- Navarro, J.M., Munoz, M., Contreras, A.M., 2006. Temperature as a factor regulating growth and toxin content in the dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Harmful Algae* 5, 762-769.
- Nixon, S.W., 1995. Coastal marine eutrophication – a definition, social causes, and future concerns. *Ophelia* 41, 199-219.
- Ogata, T., Kodama, M., Ishimaru, M., 1989. Effect of water temperature and light intensity on growth rate and toxin production of toxic dinoflagellates. In: Okaichi, T., Anderson, D.M., Nemoto, T. (Eds.), *Red Tides Biology, Environmental Science and Toxicology*. Elsevier, NY, pp. 423-426.
- Okolodkov, Y., Campos-Bautista, G., Garate-Lizarraga, I., Gonzalez-Gonzalez, J.A.G., Hoppenrath, M., Arenas, V., 2007. Seasonal changes of benthic and epiphytic dinoflagellates in Veracruz reef zone, Gulf of Mexico. *Aquat. Microb. Ecol.* 47, 223-237.
- Ono, K., Khan S., Onoue, Y., 2000. Effects of temperature and light intensity on the growth and toxicity of *Heterosigma akashiwo*. (Raphydophyceae). *Aquacult. Res.* 31, 427-433.
- Onuma, Y., Satake, M., Ukena, T., Roux, J., Chanteau, S., Rasoloforinina, N., Ratsimaloto, M., Naoki, H., Yasumoto, T., Fukui, M., Sasaki, K., Sugiyama, K., 1995. *J. AOAC Int.* 78, 574-582.
- Parkhill, J.P., Cembella, A.D., 1999. Effects of salinity, light and temperature on the growth and toxigenicity of the marine dinoflagellates *Alexandrium tamarense*. *J. Plank. Res.* 21, 939-955.
- Parnas, I., Reich, K., Bergmann, F., 1962. Photoinactivation of ichtiotoxins from axenic cultures of *Prymnesium parvum* Carter. *Appl. Microb.* 10: 237-239.
- Paroni, M.S., 2010. Effetto di erbicidi su crescita ed efficienza fotosintetica della diatomea *Skeletonema marinoi*. Tesi di laurea magistrale in biologia marina, Università di Bologna.
- Parsons, M.L., Preskitt, L.B., 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai'i. *Harmful Algae* 6, 658-669.
- Parsons, M.L., Dortch, Q., Turner, R.E., 2002. Sedimentological evidence of an increase in *Pseudonitzschia* (Bacillariophyceae) abundance in response to coastal eutrophication. *Limnol. Oceanogr.* 47, 551-558.
- Paz, B., Vazquez, J.A., Riobò, P., Franco, J.M., 2006. Study of the effect of temperature, irradiance, and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate

Protoceratium reticulatum in culture by using a kinetic and factorial approach. Mar. Environ. Res. 62, 286-300.

Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G, Androni, F., Riobò, P., Vernesi, C., 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolated in in the western Mediterranean Sea based on morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8 rDNA sequences. J. Phycol. 41, 212-225.

Pearce, I., Marshall, J.A., Hallegraeff, G.M., 2001. Toxic epiphytic dinoflagellates from east coast Tasmania, Australia. In: International Conference on Harmful Algal Blooms. Tasmania 7-11 February 2000:54-57.

Pegler, K., Kempler, S., 1988. The carbonate system of the North Sea: determination of alkalinity and TCO₂ and calculation of PCO₂ and SI_{cal} (spring 1986). Mitt. Geol.-Paleont. Instit. Univ. Hamburg, 65: 35-87.

Pezzolesi et al. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis ovata* growth and toxicity, in preparation.

Pfiester, L.A., Anderson, D.M., 1987. Dinoflagellate reproduction. In: Taylor, F.J.R. (Ed.) , The Biology of Dinoflagellates. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 611-648.

Pierce, R., Henry, M., Blum, P., Payne, S., 2001. *Gymnodinium breve* toxins without cells: intra-cellular and extra-cellular toxins. In: Hallegraeff, G.M., Blackburn, S., Bolch, C.J., Lewis R.J. (Eds.), Harmful Algae Blooms 2000, Proceedings of the ninth International Conference on Harmful Algae Blooms. IOC UNESCO, Paris, pp.421-424.

Pin, L.C., Teen, L.P., Ahmad, A., Usup, G., 2001. Genetic diversity of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) from Malaysia. Mar. Biotechnol. 3, 246-255.

Pistocchi R., Guerrini F., Feller A., Milandri A., Ceredi A., Poletti R., 2006. Effetto della carenza di azoto e fosforo sulla produzione di tossine nella dinoflagellata *Prorocentrum lima*. Biol. Mar. Medit. 13(1): 1039-1041.

Pistocchi, R., Pezolesi, L., Guerrini, F., Vanucci, S., Dell'Aversano, C., Fattorusso, E., 2010. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. Toxicon (2010), doi: 10.1016/j.toxicon.2010.09.013.

Poletti R., Milandri A, Pompei M., 2003. Algal biotoxins of marine origin: new indication from the European Union. Veterinary research communication. 27, suppl 1: 173-182.

Poletti, R., 2007a. Lo stato delle conoscenze di alcune biotossine marine prodotte da microalghe bentoniche lungo le coste italiane. Corso ARPA-APAT sulle alghe tossiche, CRM, Cesenatico, 15-17/05/07.

Poletti, R., 2007b. Rischio associato alle alghe tossiche marine. Corso ARPAAPAT sulle alghe tossiche, CRM, Cesenatico, 15-17/05/07.

Pratt, 1966 D.M. Pratt, Competition between *Skeletonema costatum* and *Olisthodiscus luteus* in Narragansett Bay and in culture, *Limnol. Oceanogr.* 11 (4) (1966), pp. 447–455.

Ray, S.M., Wilson, W.B., 1957. Effect of unialgal and bacteria-free cultures of the *Gymnodinium breve* on fish. Fisheries, U.S. Fish and Wildlife Service special report 211. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington D.C.

Ray and Bagchi, 2001 S. Ray and S.N. Bagchi, Nutrients and pH regulate algicide accumulation in cultures of the cyanobacterium *Oscillatoria laetevirens*, *New Phytol.* 149 (3) (2001), pp. 455–460.

Reguera, B., Hoshima, Y. 1990. Responsis of *Gyrodinium catenatum* to increasing levels of nitrate: growth pattern and toxicity. In: E. Granéli, B. Sundstrom, L. Edler, and D.M. Anderson, eds., Toxic Marine Phytoplankton, Elsevier, New York, pp. 316-319.

Reguera, B., 2002. Small cells in *Dinophysis spp*: a life cicle strategy for phytoplankters with a holoplanktonic way of living? In: Garces, E., Zingone, A., Montresor, M., Reguera, B., Dale, B. (Eds.), LIFEHAB: Life Histories of Macroalgal Species Causing Harmful Blooms. European Commission, pp. 60-63.

Rengefors and Legrand, 2001 K. Rengefors and C. Legrand, Toxicity in *Peridinium aciculiferum*—an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton?, *Limnol. Oceanogr.* 46 (8) (2001), pp. 1990–1997.

Rice, E.L., 1984. Allelopathy, 2nd ed. Academic press, Orlando, Florida, pp.423.

Rhodes, L.L., Thomas, A.E., 1997. *Coolia monotis* (Dinophyceae): a toxic epiphytic algal species found in New Zealand (Note). *NZ J. Mar. Freshwat. Res.* 31, 139-141.

Rhodes, L., Adamson J., Suzuki, T., Briggs, L., Garthwaite, I., 2000. Toxic marine epiphytic dinoflagellates *Ostreopsis siamensis* and *Coolia monotis* (Dinophyceae), in New Zealand. *NZ J. Mar. Freshwat. Res.* 34, 371-383.

Riobò, P., Paz, B., Fernandez, M.L., Fraga, S., Franco, J.M., 2004. Lipophylic toxins of different strains of *Ostreopsidaceae* and *Gonyaulaceae*. In: Steidinger, K.A., Landsberg, J.H., Tomas, C.R., Vargo, G.A. (Eds.), Harmful Algae 2002. Florida Fish and Wildlife Conservation Commission, Florida Institute of Oceanography, and Intergovernmental Oceanography Commission of UNESCO. pp. 119-121.

Riobò, P., Paz, B., Franco, J.M., 2006. Analysis of palytoxin-like in *Ostreopsis* cultures by liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 66, 227-233.

- Rizvi, S.J.H., Haque, Singh, V.K., Rizvi, V., 1992. A discipline called allelopathy. In: Rizvi, S.J.H., Rizvi, V. (Eds.), *Allelopathy: basic and applied aspects*. Chapman and Hall, London, pp.1-19.
- Roeder, K., Erler, K., Kibler, S., Tester, P., Van The, H., Nguyen-Ngoc, L., Gerds, G., Luckas, B., 2009. *Toxicon*. Characteristic profiles of Ciguatera toxins in different strains of *Gambierdiscus* spp. doi:10.1016/J.toxicon.2009.07.039.
- Roth, P.B., Twiner, M.J., Wang, Z., Bottein Dechraoui, M., Doucette, G.J., 2007. Fate and distribution of brevetoxin (PbTx) following lysis of *Karenia brevis* by algicidal bacteria, including analysis of open A-ring derivatives. *Toxicon* 50, 1175-1191.
- Sansoni, G., Borghini, B., Camici, G., Casotti, M., Righini, P., Rustighi, C., 2003. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales, Dinophyceae): un problema emergente. *Biol.Amb.* 17 (1), 17-23.
- Schagerl et al., 2002 M. Schagerl, I. Unterrieder and D.G. Angeler, Allelopathy among cyanoprokaryota and other algae originating from Lake Neusiedlersee (Austria), *Int. Rev. Hydrobiol.* 87 (4) (2002), pp. 365–374.
- Schmidt, L.E., Hansen, P.J., 2001. Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysochromulina polylepis*: effect of cell concentration, growth phase and pH. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 216: 67-81.
- Shears, N.T., Ross, P.M., 2009. Blooms of benthic dinoflagellates of the genus *Ostreopsis*; an increasing and ecologically important phenomenon on temperate reefs in New Zealand and worldwide. *Harmful Algae* 8, 916-925.
- Silva E.S., Faust, M.A., 1995. Small cells in the life history of dinoflagellates (Dinophyceae): a review. *Phycologia* 34 (5), 396-408.
- Silva, E.S., Sousa, I., 1981. Experimental work on the dinoflagellate toxin production. *Arq. Inst. Nac. Saude* 6:381-387.
- Simoni, F., Di Paolo, C., Coli, A., Macchia, S., Gianfranchi, U., Pesce, D., Ricci, S., 2002. Microalghe planctoniche ed epifittiche potenzialmente tossiche: stato trofico delle acque litorali del Tirreno settentrionale. *Acqua&Aria*, maggio 2002: 95-102.
- Simoni, F., Gaddi A., Di Paolo, C., Lepri, L., 2003. Harmful epiphytic dinoflagellate on Thirrenian Sea reefs. *Harmful Algae News* 24, 13-14.
- Simoni, F., Di Paolo, C., Gori, L., Lepri, L., 2004. Further investigations on blooms of *Ostreopsis ovata*, *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima*, on the macroalgae of artificial and natural reefs in the Northern Tyrrhenian Sea. *Harmful Algae News* 26, 5-7.
- Skerratt, J.H., Bowman, J.P., Hallegraeff, G.M., James, S., Nichols, P.D., 2002. Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 244, 1-15.

- Skovgaard and Hansen, 2003 A. Skovgaard and P.J. Hansen, Food uptake in the harmful alga *Prymnesium parvum* mediated by excreted toxins, *Limnol. Oceanogr.* 48 (3) (2003), pp. 1161–1166
- Skovgaard, Legrand C., Hansen, P.J., Granéli E., 2003. Effects of nutrient limitation on food uptake in the toxic haptophyte *Prymnesium parvum*.
- Smayda, T.J., 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: evidence for a global epidemic. In: Granéli, E., Sundstrom, B., Edler, L., Anderson, D.M., (Eds.), Toxic marine phytoplankton, Elsevier, New York, pp. 29-40.
- Soria-Dengg, S., Reissbrodt, R., Horstmann, U., 2001. Siderophores on marine coastal waters and their relevance for iron uptake by phytoplankton: experiments with the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 220, 73-82.
- Spector, D.L. 1984. Dinoflagellates. Academic Press, Inc., New York. 545 pp.
- Steidinger, K. A., 1983. A re-evaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology, p. 147-188. In F.E. Round and D.J. Chapman (ed.), Progress in phycolological research, vol. 2. Elsevier Science Publishing, Inc., New York.
- Steidinger, K. A., and D. G. Baden, 1984. Toxic marine dinoflagellates. P. 201-261. In D.L. Spector (Ed.), Dinoflagellates. Academic Press, Inc., New York.
- Steidinger K.A., and Tangen, K., 1997. Dinoflagellates. In; Tomas C.R. (Ed.), Identifying marine phytoplankton (pp. 387-584). St. Petersburg, FL, USA: Academic.
- Sugg, L.M., Van Dolah, F.M., 1999. No evidence for an allelopathic role of okadaic acid among ciguatera associated dinoflagellates. *J. Phycol.* 35: 93-103.
- Suikkanen, S., Fistarol, G.O., Granéli E., 2004. Allelopathic effect of the baltic Cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemmermanni* on algal monocultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 308: 85-101.
- Suikkanen et al., 2005 S. Suikkanen, G.O. Fistarol and E. Granéli, Effects of cyanobacterial allelochemicals on a natural plankton community, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **287** (2005), pp. 1–9.
- Suikkanen, S., Engstro-Ost, J., Jokela, J., Sivonen, K., Vitasalo, M., 2006. Allelopathy of Baltic Sea cyanobacteria: no evidence for the role of Nodularin. *J. Plankton. Res.* 28: 543-550.
- Sukenik et al., 2002 A. Sukenik, R. Eshkol, A. Livne, O. Hadas, M. Rom, D. Tchernov, A. Vardi and A. Kaplan, Inhibition of growth and photosynthesis of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* by *Microcystis* sp. (cyanobacteria): a novel allelopathic mechanism, *Limnol. Oceanogr.* **47** (6) (2002), pp. 1656–1663.
- Tamiyana, S., Arakawa, O., Terada, M., Nishio, S., Takatani, T., Mahmud, Y., Noguchi T., 2003. *Ostreopsis* sp., a possible origin of palytoxin (PTX) in parrotfish *Scarus oviifrons*. *Toxicon* 42, 29-33.

- Tan, C.H., Lau, C.O., 2000. In Seafood and Freshwater toxins: Pharmacology, Fisiology and Detection. Botana, L.M. (Ed.), Marcel Dekker Inc.: New York, 2000; pp. 543-547.
- Taylor, F.J.R., 1979. A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatera, including observations on Hawaiian material. In: Taylor, D.L., Seliger, H.H. (Eds.), Toxic Dinoflagellate Blooms. Elsevier North Holland, New York, pp. 71-76.
- Taylor, F.J.R., 1985. The distribution of the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* in the Eastern Caribbean. Proc. 5th Int. Coral Reef Symp., No. 4, pp. 423-428.
- Tester, P.A., Shea, D., Kibler, S.R., Varnam, S.M., Black, M.D., Litaker, R.W., 2008. Relationship among water column toxins, cell abundance and chlorophyll concentrations during *Karenia brevis* blooms. Cont. Shelf Res. 28, 59-72.
- Tillmann, U., John, U., 2002. Toxic effects of *Alexandrium* spp. On heterotrophic dinoflagellates: an allelochemical defence mechanism independent of PSP-toxin content. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 230: 47-58.
- Tillmann, U., 2003. Kill and eat your predator: a winning strategy of the planktonic flagellate *Prymnesium parvum*, *Aquat. Microb. Ecol.* 32: 73-84.
- Tillmann, U., John, U., Cembella, A., 2007. On the allelochemical potency of the marine dinoflagellate *Alexandrium ostenfeldii* against heterotrophic and autotrophic protists. *J. Plankton. Res.* 29: 527-543.
- Tindall, D.R., Morton, S.L., 1998. Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In: Anderson, D., Cembella, A., Hallegraeff, G. (Eds.). Physiological ecology of Harmful Algal Blooms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.293-313.
- Tognetto, L., Bellato, S., Moro I., Andreoli, C., 1995. Occurrence of *Ostreopsis Ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. *Bot. Mar.* 38, 291-295.
- Tolomio, C. & F. Cavolo 1985b. Presenza di *Coolia monotis* Meunier (Dinophyceae, Perediniales) nelle acque della Laguna di Venezia. *Oebalia* 11: 849-852.
- Tosteson, T.R., Ballantine, D.L., Tosteson, C.G., Bardales, A.T., Durst, H.D., Higerd, T.B., 1986. Comparative toxicity of *Gambierdiscus toxicus*, *Ostreopsis* cf. *lenticularis* and associated microbial flora. *Mar. Fish. Rev.* 48: 57-59.
- Tosteson, T.R., Ballantine, D.L., Tosteson, C.G., Hensley, V., Bardales A.T., 1989. Associated bacterial flora, growth and toxicity of cultured benthic dinoflagellates *Ostreopsis lenticularis* and *Gambierdiscus toxicus*. *Appl. and Environ. Microb.* Vol. 55, No.1.
- Totti, C., Cucchiari, E., Romagnoli, T., Penna, A., 2007a. Bloom of *Ostreopsis ovata* in the Conero Riviera (NW Adriatic Sea). *Harmful Algae News* 33, 12-13.

- Totti, C., Accoroni S., Cerino F., Cucchiari E. Romagnoli T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae* 9 (2010), 233-239.
- Toyofuku, H., 2006. Joint FAO/WHO/IIOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bulletin*. 52: 1735-1745.
- Tubaro, A., Hungerford, J., 2007. Toxicology of marine toxins. *Veterinary Toxicology*. chap 60: 725-752.
- Turki, S., 2005. Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the gulf of Tunis. *Cah. Biol. Mar.* 46, 29-34.
- Turki, S., Harzallah, A., Sammari, C., 2006. Occurrence of harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems: the lke of Bizerte and the gulf of Gabès. *Cah. Biol. Mar.* 47, 253-259.
- Uchida et al., 1999. T. Uchida, S. Toda, Y. Matsuyama, M. Yamaguchi, Y. Kotani and T. Honjo, Interactions between the red tide dinoflagellates *Heterocapsa circularisquama* and *Gymnodinium mikimotoi* in laboratory culture, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 241 (2) (1999), pp. 285–299.
- Uchida, T., 2001. The role of cell contact in the life cycle of some dinoflagellate species. *J. Plankton Res* 23:889-891.
- Uemura, D., Hirata, Y., Iwashita, T., Naoki, H., 1985. Studies on Palytoxins. *Tetrahedron* 41, 1007-1017.
- Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Fujita, T., Naoki, H., Kan, Y., Yasumoto, T., 2001. Structure elucidation of Ostreocin-d, a Palytoxin Analog Isolated from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65, 2585-2588.
- Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Fujita, T., Naoki, H., Yasumoto, T., 2002. Structural Confirmation of Ostreocin-D by Application of Negative-Ion Fast-Atom Bombardment Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometric methods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 2387-2393.
- Ungaro, N., Marano, G., Pastorelli, A.M., Marzano, M.C., Pompei, M., 2005. Presenza di Ostreopsidaceae nel basso Adriatico. *Rapp. ISTISAN* 05/29.
- Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y., Yasumoto, T., 1995. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5389-5390.
- Van Dolah, F.M., 2000. Marine algal toxins: origins, health effects and their increased occurrence. *Environ. Health Persp.* 108: 133-141.

- Van Dolah, F.M., Lidie, K.B., Monroe, E.A., Bhattacharya, D., Campbell, L., Doucette, G.J., Kamykowski, D., 2009. The Florida red tide dinoflagellate *Karenia brevis*: New insights into cellular and molecular processes underlying bloom dynamics. *Harmful Algae* 8, 562-572.
- van Rijssel et al., 2007 M. van Rijssel, A.-C. Alderkamp, J.C. Nejstgaard, A.F. Sazhin and P.G. Verity, Haemolytic activity of live *Phaeocystis pouchetii* during mesocosm blooms, *Biogeochemistry* 83 (1–3) (2007), pp. 189–200.
- Van Rijssel, M., Alderkamp, A.C., Nejstgaard, J.C., Sazhin, A.F., Verity, P.G., 2007. Haemolytic activity of live *Phaeocystis pouchetii* during mesocosm blooms. *Biogeochemistry* 83: 189-200.
- Vanucci, S. et al. Changes of *Ostreopsis ovata* Palytoxin-like compounds under N- and P-limitations, in preparation.
- Vanucci, S., Guerrini, F., Milandri, A., Pistocchi, R., 2010. Effects of different level of N- and P- deficiency on cell yield, okadaic acid, DTX-1, protein and carbohydrate dynamics in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Harmful Algae* 9, 590-599.
- VanWambeke, F., Bianchi, A.M., 1985. Dynamics of bacterial communities and qualitative evolution of heterotrophic bacteria during the growth and decomposition process of phytoplankton in an experimental marine ecosystem. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 86:119-137.
- Vardi et al., 2002 A. Vardi, D. Schatz, K. Beeri, U. Motro, A. Sukenik, A. Levine and A. Kaplan, Dinoflagellate–cyanobacterium communication may determine the composition of phytoplankton assemblage in a mesotrophic lake, *Curr. Biol.* 12 (20) (2002), pp. 1767–1772
- Varkitzi, I., Pagou K., Granéli, E., Hatzianestis, I., Pyrgaki, C., Pavlidou, A., Montesanto, B., Economou-Amilli, A., 2010. Unbalanced N:P ratios and nutrient stress controlling growth and toxin production of the harmful dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Harmful Algae* 9, 304-311.
- Vila, M., Garcés, E., Masò, M., 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in NW Mediterranean. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 51-60.
- Vivaldi, B., Masiello, L., Ottonello, G., Bertolotto, R. M., Moretto P., Prearo M., Ferrari, A., 2007. Monitoring toxic products of *Ostreopsis ovata* in marine organisms In: International Symposium on Algal Toxins, Trieste, May 27-29, 2007.
- Von Stosch, H.A., 1973. Observations on the vegetative reproduction and sexual life cycles of two freshwater dinoflagellates, *Gymnodinium pseudo-palustre* Schiller and *Woloszynskia apiculata* sp. nov. *Brit. Phycol. J.*, 8, 105-134.
- Wang et al., 2006 Y. Wang, Z. Yu, X. Song and S. Zhang, Interactions between the bloom-forming dinoflagellates *Prorocentrum donghaiense* and *Alexandrium tamarense* in laboratory cultures, *J. Sea Res.* 56 (1) (2006), pp. 17–26.
- Whittle K., Gallacher S. (2000) – Marine toxins. *British Medical Bulletin.* 56(1): 236-253.

- Willis, R.J., 1985. The historical basis of the concept of allelopathy. *J. Hist. Biol.* 18:71-102.
- Wolfe and Rice, 1979 J.M. Wolfe and E.L. Rice, Allelopathic interactions among algae, *J. Chem. Ecol.* 5 (4) (1979), pp. 533–542
- Yamasaki et al., 2007 Y. Yamasaki, S. Nagasoe, T. Matsubara, T. Shikata, Y. Shimasaki, Y. Oshima and T. Honjo, Allelopathic interactions between the bacillariophyte *Skeletonema costatum* and the raphidophyte *Heterosigma akashiwo*, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 339 (2007), pp. 83–92.
- Yasumoto, T., Seino, N., Murakami, Y., Murata, M., 1987. Toxic produced by benthic dinoflagellates. *Biol. Bull.* 172, 128-131.
- Yasumoto, T., Fukui, M., Sasaki, K., Sugiyama, K., 1995. *K. J. AOAC*, 78, 574-582.
- Yasumoto, T., Satake, 1998. New toxins and their toxicological evaluation: Harmful Algae. In B. Reguera, J. Blanco, M.L. Fernandez and T.Wyatt (Eds.). Proceedings of the eight international conference on harmful algae (pp. 461-464). Xunta de Galicia and Inter-governmental Oceanographic Commission of UNESCO 1998, Spain.

RINGRAZIAMENTI

I miei più sentiti ringraziamenti vanno alla professoressa Rossella Pistocchi, per avermi coinvolto con il fantastico mondo delle microalghe, trasmesso con passione il suo grande sapere e per avermi seguito con presenza e disponibilità nel corso di questi mesi e durante gli esami passati.

Lo stesso vale per tutto il magnifico staff del laboratorio di algologia, a cominciare dal tecnico di laboratorio Franca, che mi ha trattato come un figlio, e dalla mia correlatrice Laura, un aiuto insostituibile che ha sempre chiarito i miei dubbi e risolto le mie difficoltà; proseguendo poi con Giulia ed Emanuela, persone speciali, che adoro frequentare dentro e al di fuori dell'ambiente universitario.

Ringrazio anche i colleghi dell'università Federico II di Napoli per le analisi gentilmente svolte, in particolare Laura Grauso, la cui solarità ha colorato e riscaldato le cupe giornate invernali.

Un grazie immenso, con tutto il cuore e tutta l'anima va ai miei genitori; a mia mamma, per aver sempre creduto in me, per avermi sempre aiutato nei momenti difficili, per avermi sempre appoggiato nei miei obiettivi, per avermi sempre voluto bene con tutta se stessa, e al mio babbo, che pur non essendo più fisicamente presente vicino a me, mi ha trasmesso l'amore profondo per il mare e la sete di conoscenza che guideranno per sempre il mio cammino.

Un abbraccio caldo e sincero va ai miei parenti tutti, per essere sempre stati presenti nei momenti felici e non, e per avermi fatto sentire una persona speciale; spero che leggendo queste pagine siate fieri di me e di voi stessi perché se ho potuto realizzare questo sogno è soprattutto merito vostro.

Un grazie speciale va a Federico ed Emanuele, amici di una vita, compagni di molte, forse troppe merende, con cui spero di condividere ancora tante, tantissime altre uscite in snowboard, viaggi, serate...

Come dimenticare Matilde, gentilissima compagna di studio, per tutti gli appunti passati e gli esami preparati insieme, e i compagni di biologia marina e scienze ambientali che fanno surf con me; grazie per le indimenticabili trasferte coast to coast, i viaggi semi-organizzati, le gelide uscite invernali tra una lezione e l'altra. Spero di farne tante altre insieme a voi, voi che come me conoscete l'indescrivibile sensazione di correre veloci sulle onde e farsi trasportare in silenzio dal respiro del mare.

E infine un ode alla natura tutta; all'oceano, padrone del vento e signore delle grandi onde, fonte di ispirazione per poeti e navigatori e surfisti. Possa sempre la loro energia e imponenza darmi la forza e la gioia di vivere ogni giorno come se fosse l'ultimo...