

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**COMPETIZIONE E INTERAZIONI ALLELOPATICHE TRA
OSTREOPSIS OVATA E ALTRE MICROALGHE**

Tesi di laurea in Biologia Marina

Relatore
Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da
Loretta Antoni

Correlatore: Dott.ssa Franca Guerrini

III sessione

Anno Accademico 2010/2011

Ad Augusta, Elsa e Tatiana

Ai cari compagni di viaggio che hanno compiuto il loro cammino

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
1.1 FIORITURE ALGALI	2
1.1.1 Caratteristiche generali di una fioritura	2
1.1.2 Fioriture algali dannose	5
1.1.3 Le tossine algali	7
1.2 ALLELOPATIA	14
1.2.1 I composti allelopatici	17
1.2.2 Effetti allelopatici	19
1.3 GENERALITA' SU DINOFLAGELLATA	21
1.3.1 OSTREOPSIS OVATA	24
1.3.1.1 Una microalga nella cronaca	24
1.3.1.2 Morfologia di <i>Ostreopsis ovata</i>	26
1.3.1.3 Parametri ambientali	27
1.3.1.4 Tossicità di <i>Ostreopsis</i> e gestione del rischio	28
1.3.2 PROROCENTRUM LIMA	34
1.3.2.1 Inquadramento tassonomico	35
1.3.2.2. Tossicità e allelopatia di <i>P. lima</i>	36
2. SCOPO DELLA TESI	39
3 MATERIALI E METODI	41
3.1 CEPPI UTILIZZATI	41
3.2 PREPARAZIONE DELL'ACQUA DI MARE	41
3.3 PREPARAZIONE DEL TERRENO DI COLTURA	42

3.4 PRIMO CICLO DI ACCLIMATAZIONE	43
3.5 SECONDO CICLO DI ACCLIMATAZIONE	45
3.6 INOCULI	46
3.7 RACCOLTA DELLE MICROALGHE	48
3.8 ESTRAZIONE DELLE TOSSINE	49
3.9 ANALISI DEI NUTRIENTI	50
3.9.1 Determinazione dei nitrati	50
3.9.2 Determinazione del fosforo reattivo	54
3.10 Fluorimetria ad ampiezza di impulsi modulata.....	56
3.11 CONTEGGI E MISURE.....	61
3.11.1 Conteggi.....	61
3.11.2 Calcolo del tasso di crescita	61
3.11.3 Calcolo dei biovolumi	62
4 RISULTATI E DISCUSSIONE	64
4.1 Osservazioni al microscopio ottico – forma e dimensioni.....	64
4.2 Curve e tassi di crescita.....	72
4.3 Utilizzo dei nutrienti.....	76
4.4 Risposte alla luce.....	78
4.5 Risposte alla variazione di temperatura.....	82
4.6 Tossicità e allelopatia.....	85
5 CONCLUSIONI	88
6 BIBLIOGRAFIA	90
RINGRAZIAMENTI.....	104

1. INTRODUZIONE

Il fitoplancton costituisce la componente autotrofa fotosintetica degli organismi che galleggiano liberamente e passivamente in acque dolci e marine. L'insieme di queste specie microscopiche, con dimensioni comprese tra 0,2 μm e 2000 μm , assume un ruolo fondamentale nel trasferimento di energia ai livelli trofici superiori, facendosi carico della maggior parte della produzione primaria in ambiente marino, e svolgendo un importante ruolo nei cicli del carbonio, dell'azoto, del fosforo, dell'ossigeno con ripercussioni sugli ecosistemi locali e su tutto il pianeta, in modo analogo al lavoro compiuto in terra ferma da parte della vegetazione terrestre.

Al fitoplancton appartengono organismi procarioti, quali i cianobatteri, ed eucarioti di molti gruppi tassonomici, quali Bacillariophyceae, Dinophyceae, Chlorophyceae, Xanthophyceae, Cryptophyceae, Chrysophyceae, Aptophyceae, Euglenophyceae, Prasinophyceae. Sono comprese specie unicellulari, pluricellulari, coloniali di varia dimensione, morfologia ed ecologia, suddivisi anche evolutivamente in base alla struttura dei cloroplasti, raggiunta a seguito di processi d'endosimbiosi primaria e secondaria e in base alla presenza di particolari pigmenti fotosintetici. Certi gruppi, come Diatomee, Dinoflagellate e altri, in particolari periodi dell'anno e in determinate condizioni legate a vari fattori quali luce, temperatura, condizioni meteorologiche e moto ondoso, concentrazione di nutrienti, presenza/assenza di predatori e/o competitori, attivazione di forme quiescenti, possono raggiungere un numero molto elevato di cellule per litro, fenomeno che già di per sé può provocare effetti negativi, quali alterazioni nel colore delle acque, odori sgradevoli, fino a morte di fauna acquatica specialmente per anossia. In aggiunta, durante questi fenomeni di fioriture algali, o *blooms*, alcune specie producono e immettono nelle acque sostanze tossiche, prodotte anche quando la concentrazione di cellule per litro non è elevatissima. Queste tossine, rilasciate nelle acque, possono accumularsi nei tessuti degli organismi filtratori, amplificandosi lungo la catena trofica, fino ad arrecare danni all'uomo, quale consumatore finale (Fiocca e Vadrucchi, 2009). Un ruolo importante nella struttura e nella successione delle popolazioni di fitoplancton è attribuito anche a interazioni allelopatiche che avvengono tra specie di microalghe marine (Arzul e Gentien, 2006), tramite emissione di agenti chimici spesso diversi dalle tossine.

La sensazione che i *blooms* siano aumentati in frequenza ed estensione geografica in risposta ad attività antropiche ha aumentato l'interesse sulla loro ecologia nell'ultimo decennio, coinvolgendo non solo la comunità scientifica, ma anche l'opinione pubblica e le autorità (Granéli e Turner, 2006). I fenomeni HAB's (*Harmfu Algal Blooms*) sono segnalati sempre in maggior numero (Smayda, 1990) e viene attribuita molta responsabilità alle cause antropiche, quali la crescente eutrofizzazione con l'incremento dell'input di nutrienti quali N e P, spesso associato a una diminuzione di silicio a scapito delle diatomee; attività di acquacoltura e maricoltura hanno un ruolo potenziale nello sviluppo di HAB causa produzione di feci e prodotti di escrezione ricchi in azoto e fosforo (Sellner *et al.*, 2003). Analoga responsabilità nella formazione dei *bloom* deve però essere attribuita agli eventi naturali. Movimenti delle acque dovuti a tempeste, aumento degli scarichi fluviali causa le piogge, miscelazione degli strati profondi ricchi in nitrati verso le acque superficiali a causa del vento, il quale induce anche l'*upwelling* costiero, formazione e mantenimento di stratificazioni, trasporto di popolazioni fitoplanctoniche attraverso i grandi sistemi di correnti nella circolazione dei bacini oceanici, sono esempi di cause indipendenti da azioni dell'uomo (Sellner *et al.*, 2003). Anche eventi meteorologici su larga scala, quali El Niño, possono portare alla formazione di fioriture (Franks, 1997b).

1.1 FIORITURE ALGALI

1.1.1 Caratteristiche generali di una fioritura

Quando una popolazione di microalghe trova condizioni idonee alla sua crescita, può aumentare enormemente e in breve tempo la sua densità cellulare, determinando quello che viene chiamato un *bloom*. Nell'aspetto fisico direttamente visibile, una fioritura può manifestarsi con colorazione delle acque rossa, da cui il nome tradizionale di "maree rosse", oppure bruna, verde o altro a seconda della specie che l'ha prodotta e della sua fase di crescita, mentre si possono notare filamenti, fronti mucilluginosi o masse più disperse (Fukuyo, 2006; Corsini *et al.*, 2008) (Fig. 1). Si tratta di un fenomeno descritto da tempo: già Darwin durante il viaggio del Beagle aveva osservato una verosimile fioritura di dinoflagellate in Cile (Granéli e Turner, 2006).

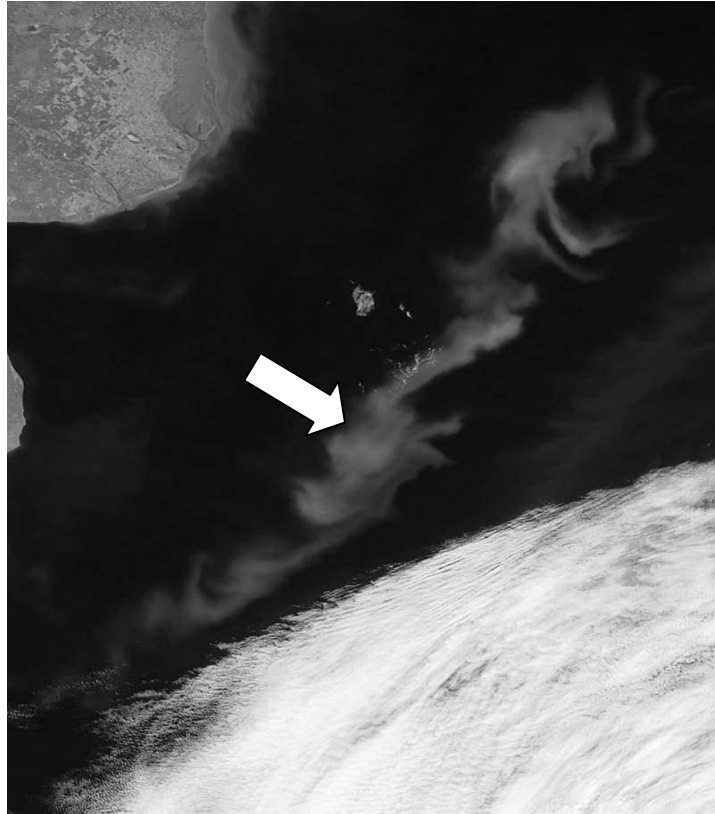


Fig. 1. *Bloom* algale al largo delle coste argentine (da Tredici, 2006, modificata)
(<http://oceancolor.gsfc.nasa.gov/SeaWiFS/>).

Le fioriture possono coprire un'area di 0,0005-1,36 chilometri quadrati e permanere pochi giorni o anche mesi. Se ne osservano circa 200 all'anno. Nell'acqua di una fioritura si ritrova una sola specie, della quale si possono contare anche decine di migliaia di cellule per millilitro (Fukuyo, 2006).

Una fioritura passa sempre attraverso una fase d'inizio, quindi di crescita e mantenimento e infine di dispersione (Steidinger e Garcés, 2006). L'inizio di una fioritura può dipendere da una complessità di fattori, che comprendono la natura della specie interessata, la sua biologia, il suo ciclo vitale, le interazioni con le altre specie, le variazioni di temperatura e salinità, del clima, la disponibilità di nutrienti. Il fenomeno è influenzato anche dalle attività antropiche, dall'eccessiva urbanizzazione, dal sovrasfruttamento delle risorse ittiche, dal trasferimento di specie da una zona all'altra. Spesso non ci sono dati sulle condizioni che precedono il *bloom* e lo sviluppo di modelli per prevederli includendovi parametri quali la cinetica nell'uptake dei nutrienti, il tasso di predazione, il tasso di crescita della specie (Cembella, 1998), non ha ancora raggiunto una buona attendibilità. Come per i modelli meteorologici, la cui capacità di previsione non va oltre un breve periodo, soprattutto a causa degli effetti di processi irrisolti nella condizione iniziale, così l'abilità

predittiva di un modello che accoppia parametri biologici e fisici non può che essere limitata, anche in considerazione del fatto che molte fioriture sono fortemente influenzate dalle condizioni meteorologiche stesse (vento, soleggiamento) (Franks, 1997a). Per quanto riguarda il ruolo delle sostanze allelopatiche nella dinamica di formazione delle fioriture, studi di allelopatia in meta analisi hanno indicato che, a parte qualche eccezione, gli effetti allelopatici sono significativi solo in condizioni di alta densità cellulare, ma non alle densità che precedono il *bloom*, sollevando dubbi sul ruolo dell'allelopatia come meccanismo d'inizio delle fioriture stesse (Jonsson *et al.*, 2009). Suikkanen *et al.* (2004), in uno studio sul ruolo ecologico delle sostanze allelochimiche in cianobatteri del Mar Baltico, suggeriscono che la loro funzione è quella di mantenere la dominanza delle popolazioni nella comunità, solo dopo però che si è venuta a formare in precedenza una certa concentrazione di cellule a causa di fattori ambientali.

Meglio conosciuti sono i fattori che influenzano le fasi di mantenimento della fioritura e quelli che portano alla sua senescenza e alla dissipazione. La dissipazione del *bloom* può avvenire per auto-ombreggiamento e competizione intraspecifica per i nutrienti, dispersione tramite trasporto causa le correnti, predazione, malattie passaggio a forme di vita quiescente, quali le cisti (Burkholder *et al.*, 2006).

I processi allelopatici sembrano invece avere influenza sulla successione delle specie fitoplanctoniche e sul mantenimento delle fioriture algali (Pratt, 1966; Rengefors e Legrand, 2001; Wolfe, 2000), essi sono probabilmente implicati nella quasi monospecificità dei *blooms* (Arzul e Gentien, 2006). Per chiarire questo concetto, si citano alcuni esempi. Nel 1987, lungo la costa atlantica francese, dove precedenti osservazioni avevano mostrato una predominanza della diatomea *Chaetoceros* sp., un massiccio sviluppo di *Karenia mikimotoi* (alias *Gyrodinium* cf. *aureolum*), che si è esteso rapidamente uccidendo molta della fauna marina, in due giorni ha raggiunto il 95% della popolazione algale, dominandola, con una densità di oltre 300.000 cellule per litro (Gentien e Arzul, 1990). Analisi di laboratorio hanno poi rivelato la presenza di sostanze allelochimiche inibitrici della crescita della diatomea. In Cile, una fioritura di *Gymnodinium* sp., associata a moria di fauna marina, mostrava nelle aree di maggiore concentrazione una dominanza del 99,9% e una densità di 4-8 milioni di cellule per litro. Le zone di fioritura più intensa si sono poi estese e spostate a causa delle correnti. La fioritura è collassata nel periodo delle maree primaverili, quando si è mescolata con masse d'acqua a bassa

salinità, contenenti alte concentrazioni di diatomee (Clément *et al.*, 2001). Maestrini e Granéli (1991) hanno descritto le condizioni ambientali e i meccanismi ecologici e fisiologici che nel 1988 hanno portato a un *bloom* di *Chrysochromulina polylepis*, che si è esteso fino alle coste norvegesi, arrecando danni d'importanza economica rilevante. Le fioriture primaverili delle diatomee ebbero luogo fino ad aprile, producendo un decremento nella concentrazione dei silicati. Queste condizioni nutrizionali, associate all'assenza di turbolenza e stratificazione, risultarono favorevoli a specie non silicee e *C. polylepis* divenne il produttore primario dominante, con una densità di 10^7 - 10^8 cellule per litro. A questa alta predominanza ha probabilmente contribuito l'effetto repellente delle tossine algali verso i predatori, e non solo verso i competitori, riducendo la pressione di *grazing* e producendo effetti deleteri lungo la catena alimentare.

Le conoscenze circa il controllo ambientale e genetico della produzione delle tossine sono invece ancora scarse (Burkholder *et al.*, 2006).

1.1.2 Fioriture algali dannose

L'esplosione di una grande biomassa di determinati organismi fitoplanctonici produce ripercussioni sull'ecologia dell'ecosistema. In pochi giorni gli individui si riproducono e diventano l'elemento dominante della comunità ecologica, raggiungendo numeri dell'ordine di grandezza anche di decine di migliaia di cellule per litro, provocando danni alla fauna acquatica a causa della formazione di ambienti anossici e impattando sulle attività ricreative costiere con discolorazioni dell'acqua, produzione di schiume, muco e cattivi odori (Granéli e Turner, 2006; Corsini *et al.*, 2008).

Il *bloom* può essere formato da specie che, unitamente ad un'eccessiva produzione di biomassa, emettono tossine capaci di causare problemi all'uomo, direttamente o tramite la catena trofica. (Granéli e Turner, 2006; Corsini *et al.*, 2008). Ciò può avvenire anche quando la densità cellulare non è abbastanza elevata da colorare l'acqua (Burkholder *et al.*, 2006; Poletti, 2007) e il fatto che eventi tossici possano essere prodotti da una bassa concentrazione degli organismi che ne sono causa, implica una difficoltà nei programmi di monitoraggio della salute umana (Masò e Garcés, 2006).

Dalla prima Conferenza Internazionale sulla fioritura di Dinoflagellate tossiche svoltasi a Boston nel 1974 la dicitura tradizionale di "*red tide*" è stata

sostituita dal termine *Harmful Algal Blooms* (HAB's) (LoCicero, 1975). In termini di effetti dannosi, si considerano due principali tipologie di organismi responsabili: i produttori di tossine e i produttori di elevata biomassa (Masò e Garcés, 2006). Andersen (1996) definisce *harmful algal blooms* come gli eventi in cui le concentrazioni di una o più alghe tossiche raggiungono livelli tali da arrecare danno ad altri organismi marini, causando la morte di pesci e molluschi, oppure accumulandosi lungo la catena trofica fino all'uomo come consumatore finale. Hallegraeff (1993) distingue quattro tipi di fioriture nocive:

1) fioriture che producono variazioni di per sé non nocive del colore dell'acqua, arrecando danno alle attività ricreative ma che, in determinate condizioni climatiche e in baie protette, possono portare a morte pesci e invertebrati bentonici a causa della carenza di ossigeno; esempi di organismi responsabili sono la dinoflagellata *Noctiluca scintillans* e la diatomea *Skeletonema costatum*.

2) fioriture di specie che producono tossine in grado di accumularsi nella catena alimentare e causare patologie gastrointestinali e neurologiche nell'uomo e in animali superiori. Queste patologie sono: PSP - *Paralytic shellfish poisoning* (esempio di specie responsabile: *Alexandrium tamarense*); DSP - *Diarrhetic shellfish poisoning* (es.: *Dinophysis acuminata*), ASP - *Amnesic shellfish poisoning* (es.: *Pseudo-nitzschia multiseries*); CFP - *Ciguatera fish poisoning* (es.: *Gambierdiscus toxicus*); NSP *Neurotoxic shellfish poisoning* (es.: *Gymnodinium breve*); *Cyanobacterial toxin poisoning* (esempi: *Anabaena flos-aquae*, *Nodularia spumigena*).

3) Fioriture di specie che in molti casi non sono tossiche per l'uomo, ma dannose a pesci e invertebrati, soprattutto in acquacoltura intensiva (es.: *Alexandrium tamarense*, *Prymnesium parvum*, *Phiesteria piscimortuis*, *Nodularia spumigena*).

4) Fioriture di specie che producono sostanze tossiche per l'uomo e che sono trasportate tramite aerosol dalla zona di fioritura alla costa (es.: *Gymnodinium breve*, *Phiesteria piscimortuis*).

Relativamente alla diversità degli effetti negativi, si possono riconoscere rischi per la salute umana, impatti sugli organismi marini, impatti sul turismo e sull'uso ricreazionale delle aree costiere, danni all'ecosistema marino (Zingone e Oksfeldt Enevoldsen, 2000).

Le specie dannose appartengono non solo alle dinoflagellate e diatomee, ma anche ad altre categorie tassonomiche, quali cianoficee, aptoficee, rafidoficee, pelagoficee (Sellner *et al.*, 2003), comprendendo circa 80 specie tossiche (Fukuyo, 2006) e 200 specie nocive su un totale di circa 4000 alghe marine planctoniche finora descritte e il loro numero è in aumento (Zingone e Oksfeldt Enevoldsen, 2000).

1.1.3 Le tossine algali

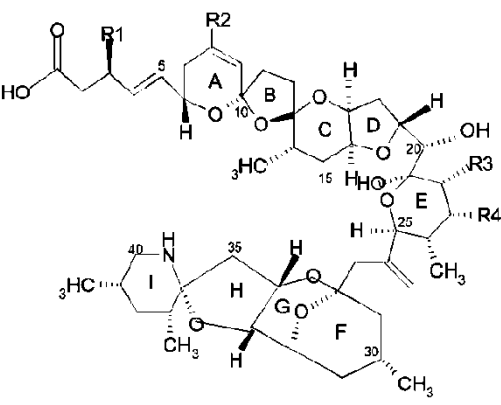
Le tossine prodotte da organismi formatori di HABs comprendono un ampio spettro di composti chimici, da idrosolubili a liposolubili, con molecole delle dimensioni da alcune centinaia fino a oltre 2000 Dalton (Sellner *et al.*, 2003). Giungono all'uomo attraverso il sistema gastrointestinale (consumo di prodotti ittici crudi, cotti o lavorati), il sistema respiratorio (aerosol marino, spray) e la cute (attività di balneazione) (Poletti, 2011). Gli organismi filtratori quali molluschi e tunicati eliminano parte delle tossine assunte assieme all'acqua tramite il loro apparato escretore, ma una certa quantità permane nel loro corpo, soprattutto se l'accumulo è rapido e i produttori di tossine sono abbondanti. Il loro consumo può causare sintomi di avvelenamento più o meno gravi in relazione al tipo di tossina. La più pericolosa è la tipologia di tossine che causano *paralytic shellfish poisoning*, circa 1000 volte più potente del cianuro di potassio. Le tossine prodotte da microalghe sono insapori e inodori, stabili al calore e al trattamento con acidi, non è possibile riconoscere la loro presenza in fase di cottura e finora non esistono antidoti (Fukuyo, 2006).

Storicamente le tossine marine sono classificate sulla base dei sintomi clinici causati. PSP (*paralytic shellfish poisoning*) è la sindrome più diffusa a livello mondiale, seguita da DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*). ASP (*amnesic shellfish poisoning*) e NSP (*Neurotoxic shellfish poisoning*) hanno una diffusione geografica più limitata, mentre CFP (*Ciguatera fish poisoning*) è localizzata solo in zone tropicali (Andersen, 1996). I sintomi variano per gravità e organi colpiti. Fondamentalmente si distinguono in diarroici (nausea, diarrea, vomito, dolori addominali) e neurotossici (stato di confusione, allucinazioni, perdita della memoria a breve termine, parestesie, paralisi muscolare, paralisi respiratoria).

La consultazione congiunta di esperti FAO/WHO/IOC sulle biotossine in molluschi bivalvi, riunitasi a Dublino nel marzo del 2004, ha proposto di classificare le tossine in otto gruppi, sulla base della loro struttura chimica (Toyofuku, 2006):

- Gruppo degli azaspiracidi (AZAs)
- Gruppo della brevetossina
- Gruppo delle imine cicliche (gimnodimina, spirolide, pinnatossina, procontrolide, spirocentrimina)
- Gruppo dell'acido domoico (DA)
- Gruppo dell'acido okadaico (OA, DTX1, DTX2, DTX3)
- Gruppo delle pectenotossine (PTXs)
- Gruppo della saxitossina (STX)
- Gruppo della yessotossina (YTX)

Gruppo degli azaspiracidi (AZAs)

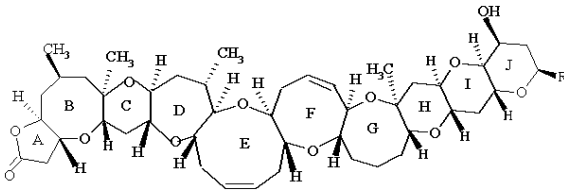


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
azaspiracid (AZA)	H	H	CH ₃	H
azaspiracid-2 (AZA2)	H	CH ₃	CH ₃	H
azaspiracid-3 (AZA3)	H	H	H	H
azaspiracid-4 (AZA4)	OH	H	H	H
azaspiracid-5 (AZA5)	H	H	H	OH

(FAO, 2004)
(polietere ciclico)

L'assunzione di mitili contaminati con azaspiracido sviluppa nell'uomo una patologia simile al *diarrhetic shellfish poisoning* (DSP) provocato da acido okadaico (OA) e dinofisitossine (DTXs), non letale, caratterizzata da cefalea e severi disturbi gastrointestinali. La tossina è stata identificata alla fine degli anni '90 (Satake *et al.*, 1998), dopo una intossicazione DSP-simile avvenuta in Irlanda, a seguito della ingestione di mitili ove le concentrazioni di OA e DTXs erano molto basse. Finora è stata rilevata solo in Europa (Toyofuku, 2006). Per gli azaspiracidi, il Reg. 853/CE/2004 nel capitololo V: "Norme sanitarie per i molluschi bivalvi vivi", intendendo per molluschi bivalvi i molluschi lamellibranchi filtratori, indica che essi non devono contenere biotossine marine in quantità totali (misurate nel corpo intero o nelle parti consumabili separatamente) superiori ai 160 µg di equivalente azaspiracido /kg di parte edibile (Reg. 853/CE/2004). L'organismo produttore è la dinoflagellata *Azadinium spinosum*.

Gruppo della brevetossina

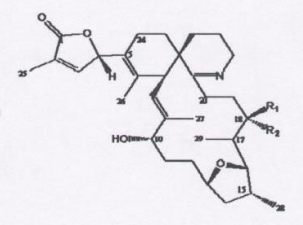


Brevetossina tipo 1 (A) PbTx-1 R = CH₂C(=CH₂)CHO

(Hua *et al.*, 1996)
(Polietere ciclico transfuso)

Le brevetossine producono nell'uomo sintomi gastrointestinali e neurologici che si manifestano a seguito dell'ingestione di molluschi contaminati (sindrome NSP *Neurotoxic shellfish poisoning*). Si legano alla sub-unità alfa del canale del sodio voltaggio-dipendente incrementando l'afflusso di sodio e depolarizzando le membrane neurali (Cembella *et al.*, 1995). Ne sono state isolate 10, oltre a 4 analoghi, BTX-B1, BTX-B2, BTX-B3, BTX-B4, apparentemente metaboliti prodotti dai molluschi, in quanto non presenti nelle colture di dinoflagellate (Ishida *et al.*, 1995; Morohashi *et al.*, 1995, 1999; Murata *et al.*, 1998). Principale organismo responsabile è il dinoflagellato *Karenia brevis*. Non sono riportati decessi nell'uomo, ma solo in pesci e mammiferi marini.

Gruppo delle imine cicliche



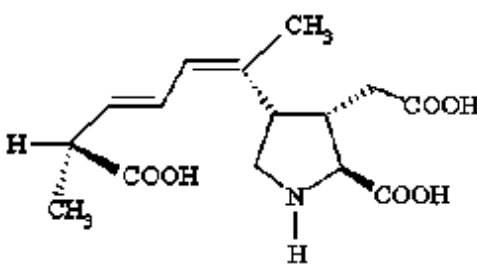
Gymnodimine (GYM)	R ₁	R ₂	MW
GYM A	H	- ^(a)	507
GYM B	H	OH	523
GYM C	OH	H	523

(a): Double bond between C17-C18; MW: molecular weight

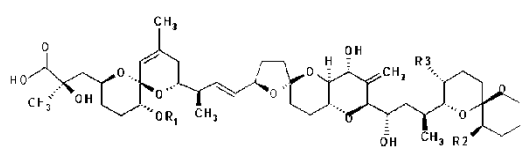
Gymnodimine
(EFSA, 2010b)
Imine cicliche

Il gruppo delle imine cicliche include gimnodimine (GYMs), spiroolidi (SPXs), pinnatossine (PnTXs), prorocentrolide e spirocentrimine. Non sono riportati effetti avversi sull'uomo. Causano tossicità acuta in animali da esperimento se iniettate, ma il loro potenziale tossico è molto più basso se somministrate per via orale (Toyofuku, 2006). Le GYMs non sono state segnalate in molluschi e crostacei prodotti in Europa, ma sono state trovate in prodotti importati da paesi terzi. Le PnTXs sono state segnalate in Norvegia (EFSA, 2010b).

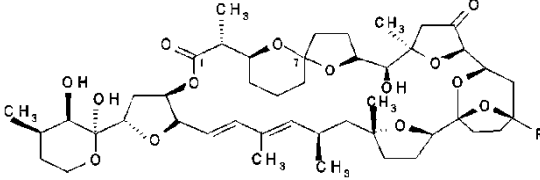
Gruppo dell'acido domoico (DA)

 <p>Acido domoico (FAO, 2004) (aminoacido simile)</p>	<p>L'acido domoico è una neurotossina responsabile di disturbi del tratto gastrointestinale e del sistema nervoso, fino a perdita della memoria, da cui il nome di sindrome ASP <i>Amnesic shellfish poisoning</i>, legata alla presenza della diatomea <i>Pseudo-nitzschia multiseries</i>. La presenza di acido domoico in molluschi e crostacei è riportata in tutto il mondo. Nel 1987, in Canada, furono colpite oltre 100 persone, tutte riportando disturbi gastrointestinali, ma solo alcune manifestarono sintomi neurologici e ospedalizzazione e ciò è stato messo in rapporto alla quantità ingerita (Perl <i>et al.</i>, 1990). L'aminoacido DA agisce come neurotrasmettitore di tipo eccitativo. Non è provata la tossicità cronica e sub-cronica. Sono indicati limiti di legge in molti stati. Il Reg. 853/CE/2004 indica un limite di 20 mg di acido domoico/kg di parte edibile assunta.</p>
--	---

Gruppo dell'acido okadaico (OA, DTX1, DTX2, DTX3)

 <table data-bbox="143 1523 558 1680"> <thead> <tr> <th></th> <th>R1</th> <th>R2</th> <th>R3</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>okadaic acid (OA)</td> <td>H</td> <td>H</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>dinophysistoxin-1 (DTX1)</td> <td>H</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>dinophysistoxin-2 (DTX2)</td> <td>H</td> <td>CH₃</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>dinophysistoxin-3 (DTX3)</td> <td>acyl</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> </tr> </tbody> </table> <p>(Yasumoto <i>et al.</i>, 2001)</p>		R1	R2	R3	okadaic acid (OA)	H	H	CH ₃	dinophysistoxin-1 (DTX1)	H	CH ₃	CH ₃	dinophysistoxin-2 (DTX2)	H	CH ₃	H	dinophysistoxin-3 (DTX3)	acyl	CH ₃	CH ₃	<p>Acido okadaico e dinophysistossine (come pure yessotossine e pectenotossine) sono tossine diarroiche responsabili di sindrome DSP <i>Diarrhetic shellfish poisoning</i> e sono rilevate in microalghe e molluschi bivalvi in tutto il mondo. Le analisi per la loro rivelazione, punto chiave di molti programmi di monitoraggio, richiedono test di conferma, in quanto altre tossine lipofile possono dare falsi positivi. I sintomi sono prevalentemente gastrointestinali e regrediscono in alcuni giorni. OA, DTX1 e DTX2 sono potenti inibitori delle proteine serina/treonina fosfatasi PP1 e PP2A. OA e DTX1 sono potenziali promotori tumorali. OA ha mostrato genotossicità su cellule <i>in vitro</i> (Toyofuku, 2006). <i>Prorocentrum lima</i> e il genere <i>Dinophysis</i> ne sono fonte principale. Il Reg. 853/CE/2004 indica un limite di 160 µg di equivalente acido okadaico per kg di parte edibile assunta (Reg. 853/CE/2004; Poletti, 2007).</p>
	R1	R2	R3																		
okadaic acid (OA)	H	H	CH ₃																		
dinophysistoxin-1 (DTX1)	H	CH ₃	CH ₃																		
dinophysistoxin-2 (DTX2)	H	CH ₃	H																		
dinophysistoxin-3 (DTX3)	acyl	CH ₃	CH ₃																		

Gruppo delle pectenotossine (PTXs)

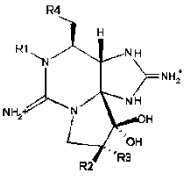


		R	C-7
pectenotoxin-1	(PTX1)	CH ₂ OH	R
pectenotoxin-2	(PTX2)	CH ₃	R
pectenotoxin-3	(PTX3)	CHO	R
pectenotoxin-4	(PTX4)	CH ₂ OH	S
pectenotoxin-6	(PTX6)	COOH	R
pectenotoxin-7	(PTX7)	COOH	S

(Yasumoto *et al.*, 2001)

Le pectenotossine giungono esclusivamente da *Dinophysis* spp., sempre accompagnate da tossine del gruppo OA. I metodi analitici devono essere in grado di distinguerle perché potrebbero essere regolamentate separatamente. Non c'è evidenza di effetti avversi sull'uomo. Provocano tossicità acuta nel topo dopo iniezione di estratti lipofili. Sono meno potenti per via orale e non inducono diarrea. Il Reg. 853/CE/2004 indica un limite di 160 µg di equivalente acido okadaico/kg di parte edibile assunta.

Gruppo della saxitossina (STX)

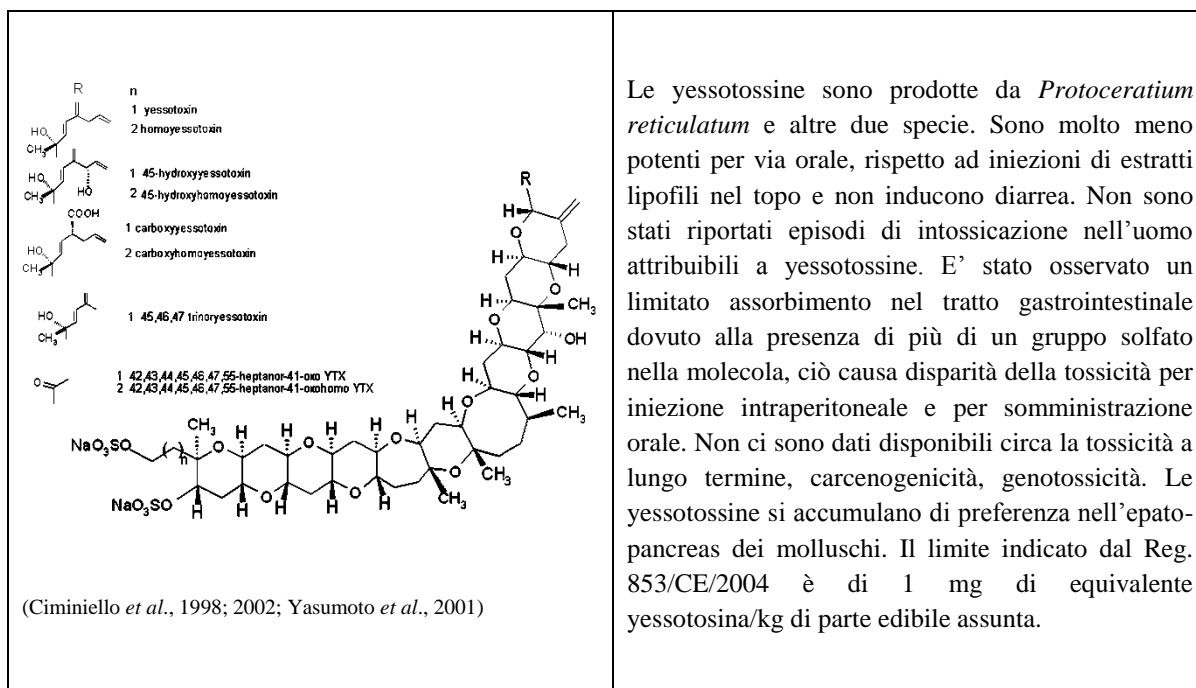


R ₁	R ₂	R ₃	R ₄ =	R ₄ =	R ₄ =	R ₄ =
H	H	H	carbonate ester	N-allyl-carbamoyl ester	decarbonoyl ester	deoxy-decarbonyl ester
H	H	OSO ₃	STX	GNTX5(S1)	dcSTX	dcSTX
H	H	OSO ₃	GNTX2	C1	dcGNTX2	
H	OSO ₃	H	GNTX3	C2	dcGNTX3	
OH	H	H	neoSTX	GNTX6(B2)	dcneoSTX	dcneoSTX
OH	H	OSO ₃	GNTX1	C3	dcGNTX1	dcGNTX1
OH	OSO ₃	H	GNTX4	C4	dcGNTX4	

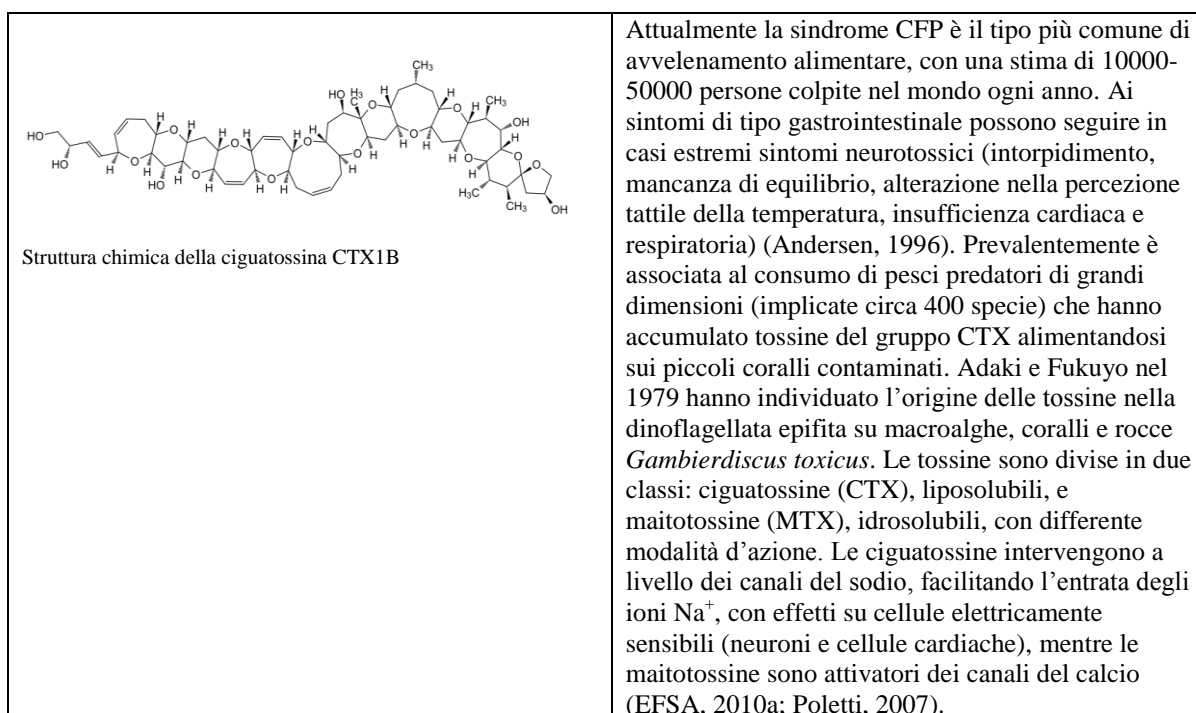
(Mons *et al.*, 1998; Quilliam *et al.*, 2001)

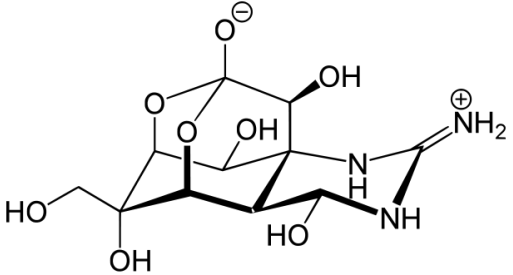
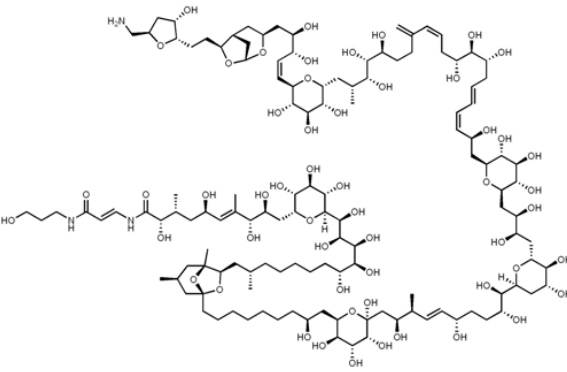
Le saxitossine si ritrovano in tutto il mondo. Sono prodotte da *Alexandrium* spp. e da altri due generi e creano problemi in un'ampia varietà di molluschi e crostacei. Sono responsabili di sindrome PSP *Paralytic shellfish poisoning*, causa di decessi (oltre 2000 casi l'anno (Tredici, 2006). La morte avviene per paralisi respiratoria entro 2-12 ore; i primi sintomi sono torpore alle labbra, lingua, bocca, parestesia agli arti. La sopravvivenza per 24 ore dà ottime possibilità di un completo recupero. Le saxitossine si legano selettivamente ai recettori dei canali del sodio voltaggio-dipendenti, bloccandoli. Il Reg. 853/CE indica un limite di 800 µg per kg di parte edibile assunta. Lo stesso limite è assunto in molti altri paesi (Toyofuku, 2006). Durante una fioritura di alghe tossiche, un mitile può accumulare 9000 µg di saxitossina (Poletti, 2007).

Gruppo della yessotossina (YTX)



Altre tossine, prodotte da cianobatteri e microalghe, sono responsabili di danni già registrati o potenziali sull'uomo o sull'ambiente.



 <p>Tetrodotossina</p>	<p>La tetrodotossina (TTX) provoca la sindrome neurotossica da pesce palla. Tra gli organismi responsabili sono indicati i generi <i>Vibrio</i>, <i>Bacillus</i>, <i>Moraxella</i> (Poletti, 2007). Isolata da gonadi e tessuti di alcune specie di pesci, tra cui il pesce istrice e il pesce palla (Tetrodontidi), e presente anche nella pelle di certi Salamandridi. E' uno tra i più potenti veleni conosciuti ed esplica la sua azione tossica bloccando il trasporto del sodio attraverso le membrane delle cellule nervose e muscolari, provocando paralisi muscolare e nervosa. Il suo meccanismo d'azione, simile a quello delle saxitossine, ha permesso di approfondire le conoscenze sulla fisiologia del sistema nervoso (http://www.sapere.it/).</p>
 <p>Palitossina (PLTX)</p>	<p>Le tossine del gruppo della palitossina (PLTX) sono state individuate soprattutto in coralli molli del genere <i>Palythoa</i> nelle zone tropicali e subtropicali e in microalghe, tra cui le dinoflagellate del genere <i>Ostreopsis</i>, ora diffuse anche in Mediterraneo (EFSA, 2009). Possono essere accumulate in crostacei e pesci. Sono noti diversi analoghi, per alcuni dei quali non è ancora stata caratterizzata la struttura chimica. PLTX putativa (C₁₂₉ H₂₂₃ N₃ O₅₄) assieme a ovatossina-a (OVTX-a = C₁₂₉ H₂₂₃ N₃ O₅₂, due atomi di ossigeno in meno) sono state rivelate in campioni di plancton durante una esplosione dell'alga <i>Ostreopsis ovata</i> lungo le coste liguri, associata a disturbi respiratori delle persone che frequentavano le spiagge (Poletti, 2007; Ciminiello <i>et al.</i>, 2010). Ora se ne conoscono altre cinque.</p>

Anche i cianobatteri producono una vasta gamma di sostanze, tra cui le anatoxine, responsabili di intossicazioni e morie di bestiame e fauna selvatica, la β-metilamino-L-alanina di cui si sospetta un possibile coinvolgimento in malattie neurodegenerative, quali la SLA e il morbo di Alzheimer, microcistine, nodularine e cilindrospermopsina, sostanze ad effetto epatotossico e probabili promotori tumorali, lingbiatossina, aplisiatossina, debromoaplisiatossina responsabili di dermatiti da contatto in subacquei (Tredici, 2006). Prevalentemente, i cianobatteri sono organismi d'acqua dolce, ma possono creare problemi in acque costiere estuarine a bassa salinità (Zingone e Oksfeldt Enevoldsen, 2000).

Imine cicliche e palitossina sono state segnalate recentemente in Adriatico (Poletti, 2007).

1.2 ALLELOPATIA

Il fenomeno dell'allelopatia (dal greco “allélon” e “pàthos” = nuocere a un proprio simile), definito comunemente antagonismo radicale, per il quale una pianta rilascia nel terreno metaboliti secondari che inibiscono la crescita e lo sviluppo di altra vegetazione, è da tempo conosciuto e sfruttato dagli agronomi nella coltivazione delle piante terrestri. Il termine che identifica la disciplina è stato coniato da Molisch nel 1937 (Rizvi *et al.*, 1992, citato da Fistarol, 2004), comprendendo tutte le interazioni biochimiche sia dannose che benefiche che si verificano tra tutte le classi di piante, direttamente o con mediazione di microrganismi, anche se il suffisso “-patìa” richiama una condizione pregiudizievole al benessere di un organismo. Esistono altre definizioni del termine. Rice (1984) definisce allelopatia come “ogni effetto diretto o indiretto, nocivo o benefico, di una pianta su un'altra attraverso la produzione di composti chimici rilasciati nell'ambiente”. Secondo La International Allelopathy Society, il termine si riferisce a qualsiasi processo che coinvolge metaboliti secondari prodotti da piante, alghe, batteri e funghi e che influenzano lo sviluppo di sistemi naturali e agricoli. Questa definizione comprende sia effetti stimolanti che inibitori, e sia interazioni dirette che indirette (Legrand *et al.*, 2003). Foy e Inderjit (2001), invece, considerano l'allelopatia come le interazioni chimiche che avvengono tra piante e non comprendono gli effetti positivi, così come in molte pubblicazioni scientifiche gli effetti stimolanti sono esclusi dalla definizione di allelopatia.

Solitamente parlando di allelopatia ci si riferisce alla competizione interspecifica e non all'effetto deterrente verso i predatori. Le tossine sono spesso veicolate attraverso la rete trofica e colpiscono indiscriminatamente molta fauna predatrice ma anche non predatrice, mentre gli allelochimici agiscono direttamente a bersaglio (Burkholder *et al.*, 2006).

Il termine “allelopatia” è stato usato in riferimento agli ambienti acquatici sono in tempi relativamente recenti. Nel 1931, Akehurst sviluppò una serie di ipotesi per spiegare la successione di specie algali in stagni d'acqua dolce, suggerendo che organismi quali dinoflagellate e diatomee producono sostanze che favoriscono membri delle clorofite, e viceversa. A metà degli anni trenta, fu suggerito che sostanze rilasciate dal fitoplancton possono influenzare specie zooplanctoniche. Nel 1947 Reich e Aschner trovarono che *Prymnesium parvum* cresciuto ad alte densità, è inibito dai propri stessi metaboliti. Nel

1954 Theodore Rice studiò le interazioni tra la diatomea *Nitzschia frustulum* e l'alga verde *Chlorella vulgaris*, coltivandole su agar. Le due specie mostrarono reciproci effetti negativi, che sembravano dovuti al rilascio di sostanze inibitorie che potevano essere neutralizzate col carbone o col calore. Anche acqua stagnante che aveva sostenuto un *bloom* di *Pandorina* mostrò effetti inibitori sulla crescita sia di *Nitzschia* che di *Chlorella* (Willis, 2007).

Oggi sappiamo che nelle specie fitoplanctoniche è molto comune la produzione di sostanze bioattive: allelochimici che influenzano la competizione intraspecifica e sostanze allelopatiche verso i predatori (Burkholder *et al.*, 2006), anche se molti composti isolati o sospettati di possedere effetti allelopatici devono ancora essere caratterizzati (Granéli *et al.*, 2008).

L'organismo che produce queste sostanze allelopatiche è chiamato "donatore" e l'organismo impattato è chiamato "recettore" o *target*. Deve avvenire il rilascio extracellulare di sostanze chimiche biologicamente attive da parte del donatore, metaboliti secondari che non giocano un ruolo evidente nell'attività energetica dell'organismo e la cui attività dipende dal bilancio tra tassi di produzione e di decadimento (Arzul e Gentien, 2006). In ambiente terrestre le sostanze allelochimiche possono saturare il terreno, mentre si assume che in ambiente acquatico esse abbiano una emivita breve e che, come avviene per molte tossine, vengano inattivate dalla luce, siano sensibili alla temperatura, o subiscano degradazione da parte di batteri (Arzul e Gentien, 2006, Fistarol, 2004). I gruppi tassonomici di cui si conosce la produzione di sostanze allelopatiche verso altre alghe, batteri e predatori comprendono sia specie marine che d'acqua dolce, quali cianobatteri, diatomee, dinoflagellate, primnesiofite e rafidofite (Granéli e Hansen, 2006; Tillmann *et al.*, 2008). Un elenco esaustivo di alghe marine e d'acqua dolce sospettate di produrre sostanze allelopatiche è riportato da Legrand *et al.* (2003).

Per l'ambiente acquatico, gli studi di interazioni allelopatiche tra organismi fitoplanctonici hanno spesso come oggetto principale l'organismo donatore, ma lo studio della risposta dell'organismo recettore può aiutare a comprendere il ruolo dell'allelopatia nella competizione tra fitoplancton, soprattutto in ambienti naturali. La vicinanza tra donatore e bersaglio assicura il trasferimento delle specie chimiche da uno all'altro, ma in ambiente acquatico le sostanze rilasciate sono costantemente diluite e al vantaggio del donatore per la ridotta competizione e l'aumento della disponibilità di risorse

si sovrappone la capacità del recettore di resistere o meno all'agente chimico incontrato, di coesistere col donatore e magari di trarre beneficio dagli allelochimici (Legrand *et al.*, 2003).

L'abbondanza cellulare relativa e assoluta di ciascuna specie, unitamente al tempo di esposizione, tenendo conto che i processi allelopatici avvengono su una scala temporale breve, influenzano l'entità dell'evento allelopatico, come osservato da Tang e Gobler (2010) in uno studio su allelopatia esibita da ceppi di dinoflagellata tossica *Cochlodinium polykrikoides* verso microalghe bersaglio, mentre il contatto diretto con le cellule target non è necessario.

In un ambiente naturale, gli agenti causa di stress influenzano sia il donatore che il recettore: il primo reagisce aumentando la produzione di sostanze allelochimiche e il secondo diviene più sensibile a tali sostanze. Per verificare che la limitazione delle sostanze nutritive è una condizione che concerne sia il donatore che il bersaglio, Fistarol *et al.* (2005) hanno aggiunto un filtrato cellulare di *Prymnesium parvum*, cresciuto senza limitazione di nutrienti, ad una coltura di *Thalassiosira weissflogii*, trattata con diverse limitazioni di azoto e fosforo, osservando che le condizioni stressanti dovute alla limitazione di nutrienti rendevano il recettore più sensibile ai composti allelopatici rilasciati dal donatore. Alcune microalghe, però, causano allelopatia anche in condizioni di nutrienti non limitanti, indicando che l'allelopatia non è solo una strategia usata in condizioni di stress (Fistarol *et al.*, 2005). D'altra parte le specie produttrici di allelochimici sono più allelopatiche durante la fase di crescita esponenziale, piuttosto che nella fase stazionaria, segnalando l'importanza ecologica di questi composti nella competizione per interferenza (Schmid e Hansen, 2001; Suikkanen *et al.*, 2004). Anche l'eutrofizzazione, alterando il rapporto tra azoto e fosforo, sbilancia la disponibilità di nutrienti e può stimolare alcune specie algali a produrre più allelochimici, incluse le tossine (Granéli *et al.*, 2008).

Oltre alla competizione per interferenza, i composti allelochimici mostrano di agire su diverse funzioni ecologiche, colpendo più di un livello della comunità planctonica e alterando la struttura della comunità stessa. Fistarol *et al.* (2004) hanno osservato che l'intensità degli effetti di *Alexandrium tamarense* (specie PSP) su fitoplancton proveniente da una comunità naturale variava in funzione delle specie bersaglio: sulla dinoflagellata *Scrippsiella trochoidea* e su nanoflagellate si riscontravano effetti fortemente negativi come diminuzione della biomassa; sulla diatomea *Leptocylindrus* spp. si avevano

effetti inibitori risultanti in un tasso di crescita inferiore a quello degli organismi di controllo; mentre su piccole dinoflagellate si manifestavano effetti positivi con tasso di crescita superiore ai controlli. Non vi era evidente correlazione di questi effetti allelopatici con la produzione di tossine PSP, ciò che è suggerito anche da altri autori (Arzul *et al.*, 1999; Tillmann e John, 2002). Spesso le allelopatie provocate da specie HABs sono causate da sostanze chimiche diverse dalle tossine responsabili nell'uomo di avvelenamenti da ingestione di molluschi e crostacei contaminati (Granéli e Hansen, 2006; Prince *et al.*, 2008; Tillmann *et al.*, 2008), anche se queste ultime sono più note e studiate.

1.2.1 I composti allelochimici

Nelle piante superiori, solitamente gli allelochimici prodotti derivano dal metabolismo dei carboidrati (es. sesquiterpeni, lattoni, acidi grassi a catena lunga, acidi organici) oppure dal metabolismo degli aminoacidi (es. polipeptidi, alcaloidi, purine, tannini). Rispetto alle piante superiori, si ha una piccola conoscenza dei composti prodotti da microalghe, ma quelli che sono stati identificati mostrano maggiore varietà strutturale (Legrand *et al.*, 2003). Chimicamente si possono distinguere: acidi grassi polinsaturi, aminoacidi, carboidrati (Arzul e Gentien, 2006).

Le aponine (APONIN, APparent Oceanic Naturally OccurrING cytotoxins) prodotte da alcuni microrganismi, quali il cianobatterio *Gomphosphaeria aponina* e clorofite del genere *Nannochloropsis*, hanno mostrato effetti dannosi su fitoplancton e funghi (Moon e Martin, 1981). A bassissime concentrazioni le aponine stimolano la crescita, tanto da essere usate in acquacoltura (Ben-Amotz, 1984). I glicolipidi mostrano effetti allelopatici quando gli acidi grassi che fanno parte della molecola sono polinsaturi (PUFAs), come l'emolisina di *Karenia mikimotoi* (Fig. 2). Sono sufficientemente idrosolubili da rendere l'acqua tossica attorno agli organismi. Nelle specie algali ittiotossiche, glicolipidi contenenti PUFAs sono considerati le molecole responsabili degli effetti allelopatici e ittiotossici su organismi marini (Yasumoto *et al.*, 1990).

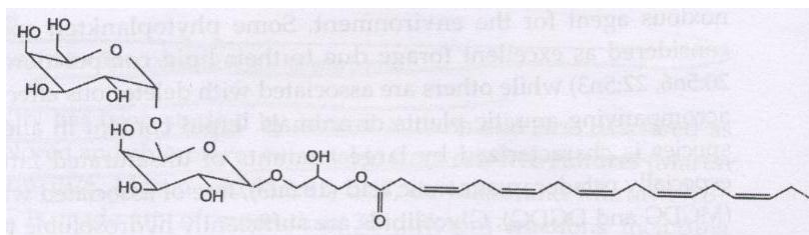


Fig. 2. Struttura generale dell'emolisina di *Karenia mikimotoi*.

Allelochimici contenenti aminoacidi sono stati rivelati principalmente in cianobatteri. Si tratta di peptidi con attività antibiotica e citotossica ad effetto deterrente sui predatori sia diretto che indiretto, a seguito della trasformazione da parte dei consumatori in prodotti tossici o sgradevoli, come avviene per i metaboliti secondari prodotti dal cianobatterio *Microcoleus lyngbyaceus* nei confronti del mollusco nudibranco *Stylocheilus longicauda* (Pennings *et al.*, 1996). Tra i peptidi ciclici, la Fischerellina A, prodotta dal cianobatterio *Fischerella muscicola*, è un forte inibitore di crescita per cianobatteri e altri organismi fotosintetici in quanto agisce sul fotosistema II (Srivastava *et al.* 1998). La nodularina, prodotta da *Nodularia spumigena* è una potente epatotossina, e promotore tumorale con possibili effetti cancerogeni sui mammiferi; la sua struttura e la sua tossicità sono simili alle microcistine (Fig. 3) prodotte da *Microcystis aeruginosa* in acque dolci (Stolte *et al.* 2002).

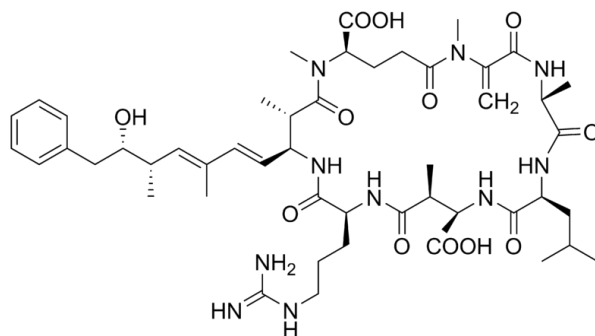


Fig. 3. Microcistina.

Alcani, alcheni e terpenoidi ciclici polinsaturi sono prodotti, essudati o escreti da molti organismi e alcuni possiedono effetto biologico verso gli organismi circostanti. Sesquiterpenoidi essudati da *Gymnodinium nagasakiense* hanno mostrato di causare negli organismi bersaglio lisi cellulare, preceduta dalla formazione di vescicole (Kajiwara *et al.*, 1992). Tramite l'emissione di carboidrati alogenati, quali dibromometano, clorodibromometano e

soprattutto bromoformio (CHBr_3), organismi quali l'alga rossa *Corallina piluifera*, mostrano di poter eliminare specie epifite, come le diatomee, dalla loro superficie (Ohsawa *et al.*, 2001).

1.2.2 Effetti allelopatici

Le conseguenze di interazioni allelopatiche possono essere di varia natura ed entità, comprendendo perdita della motilità, deformazione delle cellule, mortalità (Fig. 4). Ceppi provenienti dal *bloom* di *Cochlodinium polykrikoides*, una dinoflagellata che forma HABs nei sistemi costieri di molte parti del mondo, hanno mostrato allelopatia nei confronti di comunità fitoplanctoniche naturali e coltivate, causando una mortalità cellulare del 60-100% in pochi minuti fino a 24 ore. Saggi su larve di pesci e molluschi hanno mostrato che tossicità nei loro confronti e allelopatia provocata sulle alghe erano causati dagli stessi agenti, cioè da specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali ad esempio O_2^- , OH^\cdot , HO_2 , ROO^- (Tang e Gobler, 2010).

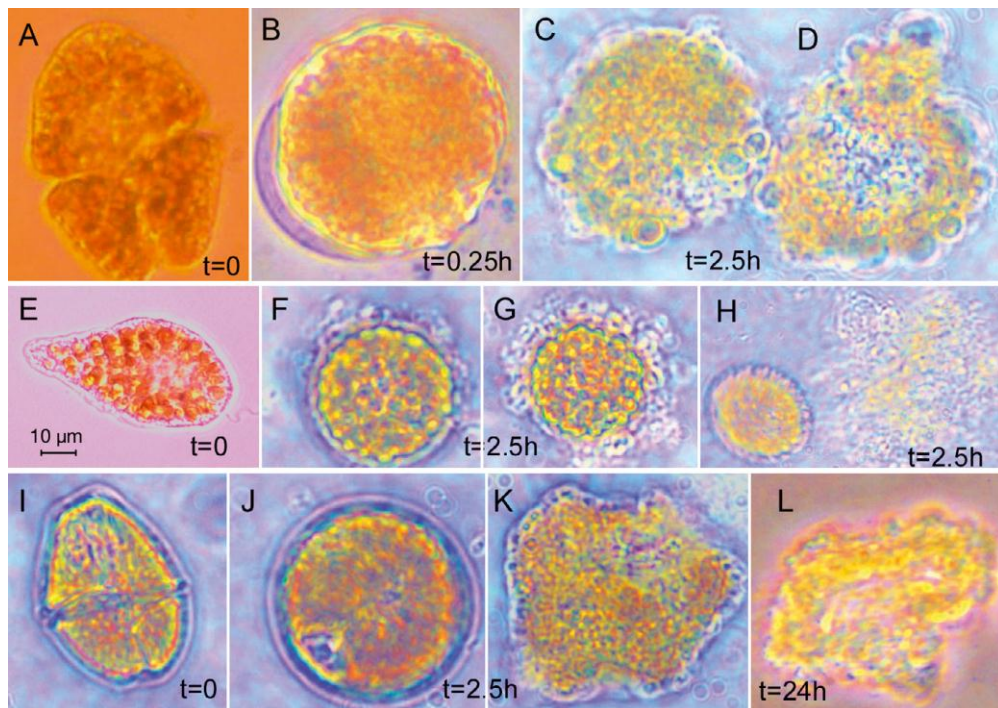


Fig. 4. Morfologia di microalghe bersaglio durante l'esposizione a *Cochlodinium polykrikoides*, ceppo CP1: A→D: *Akashiwo sanguinea*; E→H: *Chattonella marina*; I→L: *Gymnodinium instriatum*. (A,E,I) cellule normali; (B,F,J) cellule che hanno perso flagelli e motilità e in generale hanno cambiato la forma; (C,G,K) cellule sostanzialmente deformate; (D,H,L) cellule lisate. (t) = tempo di esposizione (da Tang e Gobler, 2010).

Anche Fistarol (2004) riporta perdita della pigmentazione, citoplasma aggregato in vacuoli, formazione di vescicole, fino alla lisi cellulare della diatomea *Thalassiosira weissflogii* e di criptoficee *Rhodomonas* sp. dopo averle esposte a filtrato di *Prymnesium parvum*, verificando che gli effetti letali implicano solitamente la lisi dell'organismo recettore.

La capacità emolitica delle sostanze prodotte da determinate specie di microalghe, oltre a colpire altre microalghe, può causare morte di organismi a un più alto livello nella catena trofica, quali i pesci, le cui delicate branchie possono essere offese dai composti emolitici durante i *blooms* (Edwardsen e Paasche, 1998).

Molti composti allelopatici prodotti da alghe non sono così dannosi e possono inibire alcune funzioni del target senza causarne la morte. Sono state osservate, ad esempio, inibizione della fotosintesi, riduzione del tasso di crescita, inibizione del *grazing* (Legrand *et al.*, 2003; Granéli *et al.*, 2008).

Le strategie messe in atto dagli organismi fitoplanctonici e le loro interazioni con l'ambiente circostante mostrano una complessità che non ci si aspetterebbe da organismi unicellulari (Zingone e Oksfeldt Enevoldsen, 2000).

1.3 GENERALITA' SU DINOFLAGELLATA

Gli organismi appartenenti alla classe Dinophyceae possiedono caratteristiche sia vegetali che animali. Presentano parete cellulare e plastidi, ma anche fotorecettori. Sono autotrofi, ma anche eterotrofi e mixotrofi. Caratteristica comune è la presenza di un nucleo ben visibile al microscopio ottico, il *dynocaron*, con cromosomi condensati in tutte le fasi del ciclo cellulare. Nelle specie autotrofe, i plastidi sono rivestiti nella maggior parte da tre membrane. I pigmenti sono clorofille a e c₂, β-carotene e xantofille: (peridinina, dinoxantina, diadinoxantina). Nel citoplasma di alcune specie sono presenti tricocisti, con funzione di difesa. Le dinoflagellate si distinguono in “tecate”, e “non tecate” per la presenza o meno di una teca costituita da placche di cellulosa, anche se la distinzione non è netta, in quanto sottili placche di cellulosa sono presenti anche nelle forme nude (Cognetti *et al.*, 2004; Zingone e Percopo, 2006). La forma e la disposizione delle placche della teca è utilizzata come carattere tassonomico nella tabulazione *Kofoidiana* (Fig. 5).

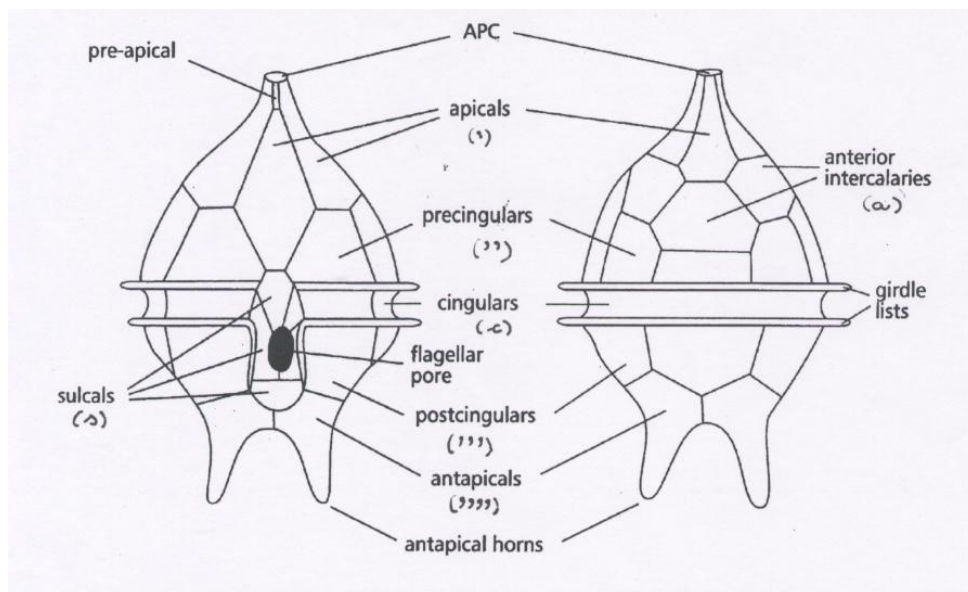


Fig. 5. Tabulazione Kofoidiana (IOC- UNESCO, modificata).

Il cingolo è una scanalatura più o meno mediana che circonda il corpo cellulare, suddividendolo in epicono e ipocono, ovvero epiteca e ipoteca per i tecati. Può essere spostato verso l'apice anteriore o posteriore (antapice) della cellula, in modo che epicono ed ipocono possono assumere proporzioni diverse. Il solco è una scanalatura longitudinale perpendicolare al cingolo

nell'ipococono (Zingone e Percopo, 2006). All'apice della cellula è presente una perforazione della placca definita poro apicale, la cui forma e dimensione ha valore diagnostico.

Il prefisso dino- (dal greco "ruotare") descrive il particolare movimento del nuoto di queste cellule, generato da una coppia di flagelli eteromorfi, uno trasversale ancorato al cingolo e l'altro longitudinale collocato nel solco, che forniscono dinamiche di propulsione, rotazione e mantenimento della direzione (Barone e Prisinzano, 2006; Zingone e Percopo, 2006).

Le dinoflagellate si riproducono per divisione semplice con due modalità. Nella desmoschisi, ogni cellula figlia mantiene metà del vecchio corpo cellulare, analogamente alle diatomee, ma a differenza di queste le valve nuove non si formano all'interno della vecchia parete cellulare e quindi non si verifica la caratteristica graduale diminuzione di grandezza. Nella eleuteroschisi le cellule figlie si formano all'interno della cellula progenitrice, che poi le libera, aprendosi. Diverse specie sono capaci di produrre cisti, forme di resistenza dotate di spessa parete cellulare costituita da una sostanza simile alla sporopollenina. Le cisti non hanno flagelli e sedimentano sul fondo ove rimangono in stato di quiescenza per lunghi periodi, a volte per anni (Cognetti *et al.*, 2004; Zingone e Percopo, 2006). Nelle specie dotate di una fase riproduttiva sessuale, si ha formazione di una cisti zigotica (Fig. 6).

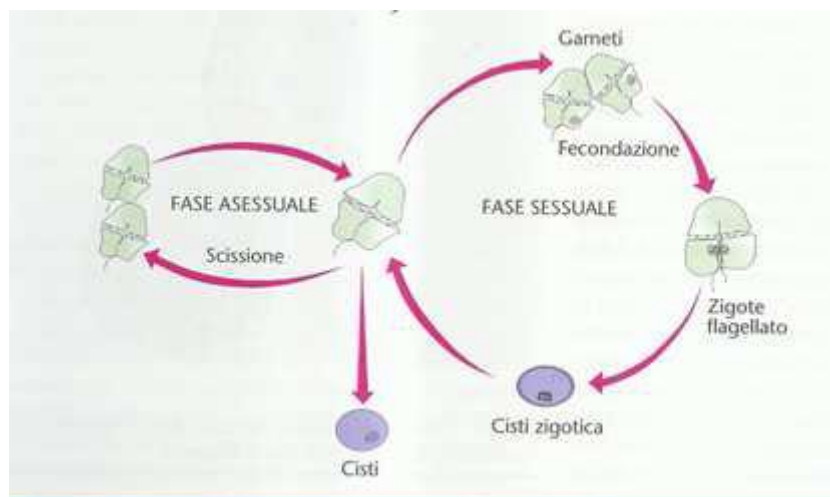


Fig. 6. Ciclo biologico di Dinoflagellata.

I cicli vitali di specie che possono produrre uno stato di quiescenza costituiscono un vantaggio competitivo nei confronti delle popolazioni che non riescono a sopravvivere in condizioni ambientali avverse (Sellner *et al.*, 2003). Le fasi di escistamento sono importanti nella cronologia delle fioriture.

Nelle dinoflagellate tossiche si riscontra grande variabilità intraspecifica, che si manifesta nella life-history, nel comportamento, nella crescita, nella nutrizione, nelle fioriture e nella genetica. Tendono ad essere più grandi rispetto all'altro fitoplancton, con un asse cellulare maggiore delle dimensioni di circa 45 μm e, a causa del rapporto superficie/volume sfavorevole, hanno meno affinità per i nutrienti dissolti rispetto ai taxa più piccoli ma nonostante ciò molte specie sono capaci di crescita rapida. Le specie fotosintetiche presentano auxotrofia, necessitando di vitamine prodotte da altri organismi. In coltura, mostrano di tollerare un'ampia gamma di salinità e si adattano alla luce fluttuante, aumentando la misura o il numero delle unità fotosintetiche se poste a bassa irradianza (Burkholder *et al.*, 2006).

1.3.1 OSTREOPSIS OVATA

1.3.1.1 Una microalga nella cronaca

Alla fine degli anni novanta, in una zona del lericino (Golfo di La Spezia) fu notato un fenomeno di fioritura, attribuibile alla presenza di una nuova alga nei nostri mari. Fu riconosciuta una specie di microalga appartenente al genere *Ostreopsis*, fino a quel momento distribuita essenzialmente in acque tropicali e sub-tropicali. I primi problemi di tipo sanitario passarono come una banale influenza, fino ad arrivare ai 225 ricoveri di Genova nell'estate del 2005 per disturbi alle vie respiratorie e stati febbrili (Tab. 1).

Tab. 1 – Caso di Genova 2005 aspetti epidemiologici su 225 pazienti (Icardi e Marensi, 2005)

Sintomi	%	Frequenza dei quadri clinici	%
Febbre	64%	<u>109 Casi con 3 sintomi</u>	
Faringodinia	50%	- Febbre con tosse e faringodinia	36%
Tosse	40%	- Febbre con tosse e dispnea	34%
Dispnea	39%	- Tosse con faringodinia e dispnea	28%
Cefalea	32%		
Nausea	24%	<u>69 casi con 4 sintomi</u>	
Rinorrea	21%	- Febbre con tosse, faringodinia e dispnea	36%
Congiuntivite	16%	- Febbre con tosse, faringodinia e rinorrea	25%
Vomito	10%	- Febbre con tosse, dispnea e rinorrea	23%
Dermatite	5%		

Gli ospedali genovesi segnalano la possibilità che ci si trovasse di fronte a un fenomeno legato alla presenza di tossine algali, ciò che venne poi confermato (ISPRA, intervista al Prof. Franco Palmieri, Direttore Dip. Provinciale ARPAL La Spezia; <http://archiviostorico.corriere.it>, 2005; Brescianini *et al.*, 2006; Ciminiello *et al.*, 2006).

Ostreopsis ovata, l'organismo riconosciuto responsabile di queste fioriture nocive, è segnalato ormai da diversi anni lungo le coste di diverse regioni italiane, sia dal lato tirrenico che da quello adriatico (Tognetto *et al.*, 1995; Sansoni *et al.*, 2003; Di Turi *et al.*, 2003; Casavola *et al.*, 2005; Grillo e Melchiorre, 2005; Sangiorgi e Bianco, 2005; Ungaro, 2005; Monti *et al.*, 2007; Poletti, 2007), e in altri paesi del Mediterraneo (Vila *et al.*, 2001; Aligizaki *et al.*, 2005; Masò *et al.*, 2005; Aligizaki e Nikolaidis, 2006); (Figg.7 e 8).



Figg. 7 e 8. Recenti osservazioni di *O. ovata* lungo le coste italiane e mediterranee.

I numerosi avvistamenti, assieme ai problemi di salute pubblica che a volte li accompagnavano, hanno portato l'alga nella cronaca (Sansoni *et al.*, 2000; Gallitelli *et al.*, 2005; Icardi e Mareschi, 2005; www.lagazzettadelmezzogiorno.it, 2001; <http://archiviostorico.corriere.it>, 2006a, 2006b; <http://corriereedelmezzogiorno.corriere.it>, 2011).

Un seminario internazionale tenutosi a Genova nel 2005, mettendo a confronto ricercatori provenienti da Francia, Spagna, Grecia, Giappone e Italia, ha fatto emergere la necessità di approfondire gli studi sul fenomeno associato alla presenza di *O. ovata*. A livello italiano, il Ministero della Salute e dell'Ambiente, in concerto con l'Istituto Superiore di Sanità, il centro ricerche marine di Cesenatico e il sistema delle Agenzie, si sono attivati per redigere delle linee guida al fine di uniformare le modalità di monitoraggio e campionamento del fenomeno e acquisire dati confrontabili e fruibili per la ricerca. L'APAT ha organizzato un team nazionale di lavoro, insieme alle agenzie regionali e province autonome al fine di dare vita ad attività di formazione specificatamente mirate allo studio dell'ecologia della microalga e all'apprendimento delle tecniche di monitoraggio e campionamento per la gestione del rischio associato al fenomeno (Ministero della Salute, 2007; Abbate *et al.*, 2010).

1.3.1.2 Morfologia di *Ostreopsis ovata*

Ostreopsis ovata (Dinophyceae, Gonyaulacales, Ostreopsidaceae) è una microalga epifita presente nelle acque tropicali e sub-tropicali di tutto il mondo, e anche in certe zone temperate come il bacino del Mediterraneo. Attraverso un filamento mucoso, si àncora a substrati rocciosi o a macroalghe, sulle quali può arrivare a formare un velo mucillaginoso in caso di fioriture intense. Con una lunghezza di circa 50 micron e una larghezza di circa 30 micron è la più piccola del suo genere, anche se viene osservata grande variabilità morfometrica sia nelle cellule in coltura, che nei campioni ambientali (Accoroni *et al.*, 2010; Penna *et al.*, 2005).

Il nome *Ostreopsis* significa “dall’aspetto di ostrica” e il termine *ovata* descrive la morfologia a forma di goccia di *O. ovata*, che risulta compressa antero-posteriormente. *O. ovata* è provvista di teca. Epiteca ed ipoteca non differiscono molto nella forma. Le placche tecali sono molto sottili e delicate e la loro configurazione è Po, 3', 7'', 5''', 2''''', 1p (Fig. 9a). Nell’epiteca, la placca 1' è lunga ed esagonale e occupa la parte centrale sinistra della cellula (Fig. 9b). La placca del poro apicale (Po) porta un poro allungato ed è associata ad una placca apicale 2' stretta. Nell’ipoteca la placca intercalare posteriore (1p) è lunga e stretta. Il cingolo è equatoriale (Faust *et al.*, 1996; Penna, 2005). Nella teca vi sono numerosi pori a tricocisti l’estrusione delle quali determina un repentino allontanamento della cellula dalla fonte di disturbo (Barone e Prisinzano, 2006). Il nucleo ha forma ovale e si osserva in posizione posteriore. I cloroplasti sono piccoli e numerosi, e solitamente appaiono di colore bruno-dorato (Fig. 9c).

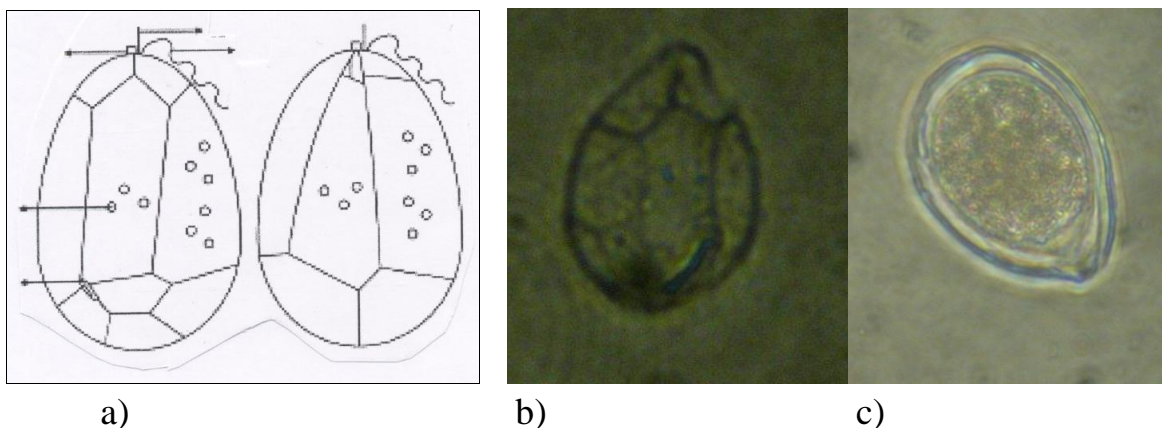


Fig. 9. a) Epiteca e ipoteca di *Ostreopsis* (da Barone e Prisinzano, 2006, modificata); b e c) Frammento di teca e cellula di *Ostreopsis ovata*, Fukuyo 1981 (rif. OOAN0816), 400x.

1.3.1.3 Parametri ambientali

Gli episodi di fioriture osservati nel comune genovese si sono verificati tra luglio e agosto e hanno interessato tratti di litorale nel quale opere di difesa dall'erosione e pennelli rocciosi naturali delimitano uno specchio marino a debole ricambio idrico dove le acque raggiungono temperature elevate. Queste condizioni ambientali sembrano le più favorevoli allo sviluppo di *O. ovata*. In generale, le grandi abbondanze di *Ostreopsis* spp si registrano durante i periodi più caldi, caratterizzati da alta temperatura, elevata salinità e stabilità della colonna d'acqua (Pistocchi *et al.*, 2011). I *blooms* possono essere più intensi in aree protette, dopo periodi di mare calmo, condizioni che portano a stratificazione ed eccessivo riscaldamento delle acque superficiali (Shears e Ross, 2009). Lungo la riviera del Conero, nel nord Adriatico, durante l'estate del 2007, ad esempio, si è riscontrata una concentrazione significativamente maggiore di cellule in siti protetti, piuttosto che in zone più esposte. In questi siti, *O. ovata* era più abbondante su substrati inorganici rocciosi rispetto a substrati di macroalghe, prediligendo per queste ultime quelle a tallo ramificato rispetto a quelle non ramificate. La densità di *O. ovata* diminuiva fortemente in funzione della profondità, mostrando valori significativamente bassi al di sotto dei tre metri (Totti *et al.*, 2010).

Numerose osservazioni in campo hanno testimoniato come l'idrodinamismo sia uno tra i principali fattori a determinare la proliferazione di questa specie e la facilità con cui le cellule possono essere risospese nella colonna d'acqua gioca un ruolo nello sviluppo e nel declino delle fioriture. (Pistocchi *et al.*, 2011).

Anche se l'espansione geografica di *Ostreopsis* spp. da regioni tropicali e subtropicali a regioni temperate sembra legata all'aumento della temperatura superficiale marina, dovuto ai cambiamenti climatici globali (Louzao *et al.*, 2010; Granéli *et al.*, 2011), oltre che alla diffusione tramite le acque di zavorra delle navi (Shears e Ross, 2009), la temperatura dell'acqua non sembra il parametro decisivo per i ceppi che fioriscono lungo le coste italiane e i massimi di abbondanza registrati sembrano piuttosto luogo- e anno-specifici. Nel Mediterraneo nord occidentale le più alte abbondanze cellulari si registrano verso la fine di luglio, a metà dell'estate, mentre nel nord Adriatico si riscontra una maggiore densità a fine settembre (Mangialajo *et al.*, 2011) e il picco di fioritura avviene quando la temperatura dell'acqua marina è in diminuzione (Totti *et al.*, 2010; Accoroni *et al.*, 2011). Nei

confronti della temperatura, cellule provenienti da zone diverse, messe in coltura mostrano *optima* differenti, in accordo con le osservazioni dei *blooms* registrate nell'ambiente naturale (Pezzolesi *et al.*, 2012; Pistocchi *et al.*, 2011). Cellule di *O. ovata* isolate dal Mar Tirreno e incubate a diverse temperature (tra 16°C e 30°C), hanno mostrato maggior aumento del tasso di crescita e accumulo di biomassa alle temperature più alte (26°C-30°C), mentre la più alta produzione di tossine è avvenuta a temperature inferiori (20°C-22°C). Temperatura ottimale di crescita e tossicità sarebbero quindi inversamente correlate (Granéli *et al.*, 2011). Cellule di *O. ovata* isolate dal Mare Adriatico hanno mostrato i più alti tassi di crescita alla temperatura di 20°C e a una salinità compresa tra 36 e 40 psu, mostrando crescita cellulare correlata positivamente con l'aumento della salinità, e tossicità correlata negativamente, risultando quest'ultima più bassa al valore di salinità maggiore (es. 40 psu) (Pezzolesi *et al.*, 2012; Pistocchi *et al.*, 2011).

Le concentrazioni dei nutrienti non sembrano avere effetto sulla dinamica delle fioriture. Per alcuni ceppi di *O. ovata*, non si è osservata una chiara relazione tra concentrazione dei nutrienti e andamento della fioritura (Accoroni *et al.*, 2011). Limitazioni di azoto e fosforo sembrano determinare una diminuzione della tossicità cellulare, comportamento diverso rispetto a molte altre dinoflagellate tossiche (Pistocchi *et al.*, 2011). In colture di *O. cf. ovata*, la limitazione da nutrienti ha colpito maggiormente la crescita cellulare in condizioni di carenza di azoto piuttosto che in carenza di fosforo, mentre il contenuto cellulare di tossine è diminuito del 53% e del 40% in limitazione di azoto e di fosforo rispettivamente (Vanucci *et al.*, 2012).

Studi di laboratorio sugli effetti dei parametri ambientali su crescita e tossicità di *O. ovata* non sono comunque molto numerosi (Pistocchi *et al.*, 2011).

1.3.1.4 Tossicità di *Ostreopsis* e gestione del rischio

Le fioriture di *Ostreopsis* spp. a volte si accompagnano a sofferenze della comunità bentonica (Faimali *et al.*, 2011) e sporadiche patologie nell'uomo per inalazione e irritazione da contatto (Durando *et al.*, 2007). Le tossine prodotte da *O. ovata* sono composti simili alla palitossina, un veleno molto potente.

La palitossina fu scoperta casualmente mentre si ricercavano gli agenti responsabili di ciguatera (Hashimoto *et al.*, 1969, citato da Wu, 2009).

Inizialmente è stata isolata da esacoralli zoantari del genere *Palythoa* ma è stata segnalata in molti organismi marini: pesci, crostacei, molluschi, echinodermi (Wu, 2009; Aligizaki *et al.*, 2011). E' un composto polietereo di grandi dimensioni. La sua struttura è tra le più complesse tra i prodotti naturali noti, e il suo peso molecolare di 2677 Da ($C_{129}H_{223}O_{54}N_3$) la colloca tra i più grandi prodotti naturali non polimerici finora conosciuti (Grauso, 2008; Wu, 2009; Louzao *et al.*, 2010).

La palitossina è dotata di potente attività neurotossica. Topi intossicati sperimentalmente per via orale hanno esibito: grattamento, balzi, sindrome da distress respiratorio, paralisi. Gli esami istologici e di microscopia elettronica eseguiti sugli animali che erano sopravvissuti oltre 24 ore, hanno evidenziato infiammazione acuta del prestomaco, alterazioni in fegato e pancreas, modifiche ultrastrutturali delle cellule cardiache e dei muscoli scheletrici. Cuore e muscolo sarebbero quindi organi bersaglio per la tossina, in accordo con i sintomi osservati nell'uomo (Sosa *et al.*, 2009). La pompa sodio/potassio ATP-dipendente (Na^+/K^+ ATPasi), presente sulla membrana plasmatica, controlla il volume cellulare e conferisce la proprietà di eccitarsi a cellule nervose e muscolari. Nel suo meccanismo d'azione, la palitossina agisce sulla pompa Na^+/K^+ ATPasi, convertendola in un canale ionico, ciò che provoca la fuoriuscita del potassio intracellulare e l'ingresso di sodio extracellulare, con depolarizzazione della membrana plasmatica (Wu, 2009; Munday, 2011). Anche se la permeabilità della pompa è aumentata per il sodio e potassio, ma non per il calcio (Habermann, 1989), la tossina darebbe il via ad una morte cellulare a cascata tipica del sovraccarico di Ca^{2+} (Schilling *et al.*, 2006). Pur non essendo considerata una emolisina, la palitossina causa lisi osmotica degli eritrociti, con distruzione della membrana cellulare e rilascio di emoglobina (Habermann *et al.*, 1981; Malagoli, 2007).

Nel profilo tossicologico di *O. ovata* è stata dapprima identificata una piccola quantità di palitossina putativa (PLTX) assieme a una quantità maggiore di un composto palitossina-simile, chiamato ovatossina-a (OVTX-a) (Ciminiello *et al.*, 2008; Guerrini *et al.*, 2010). Ulteriori indagini effettuate tramite una nuova metodica che utilizza la cromatografia liquida ad alta risoluzione associata a spettrometria di massa ((HR)LC/MS) e spettrometria di massa (MS^2) in tandem (LC/MS/MS), oltre a confermare la presenza di piccole quantità PLTX putativa e OVTX-a come maggiore componente, hanno rivelato la presenza di quattro nuovi composti palitossina-simili: ovatossina-b (OVTX-b), ovatossina-c (OVTX-c), ovatossina-d (OVTX-d) ed ovatossina-e

(OVTX-e). Comparando le formule molecolari, si è visto che OVTX-a possiede due atomi di ossigeno in meno rispetto a PLTX, come già precedentemente verificato. Rispetto ad OVTX-a, le nuove quattro molecole identificate possiedono rispettivamente:

OVTX-b → due atomi di carbonio, quattro atomi di idrogeno e un atomo di ossigeno in più;

OVTX-c → due atomi di carbonio, quattro atomi di idrogeno e due atomi di ossigeno in più;

OVTX-d e OVTX-e → un atomo di ossigeno in più.

In uno spettrometro di massa il campione è prima ionizzato in sorgente e gli ioni risultanti sono poi separati nell'analizzatore, in funzione del loro rapporto massa/carica (m/z) (Grauso, 2008). Nella molecola di palitossina, la rottura del legame tra il carbonio C8 e il carbonio C9 è favorita, quindi durante l'analisi alla spettrometria di massa (MS) in quel punto la molecola si divide in due frammenti (A e B) (Fig. 10). Gli ioni corrispondenti ai frammenti A e B della molecola sono visibili sia in una prima analisi HRMS sia in una seconda analisi MS² accoppiata alla prima, quale che fosse lo ione molecolare (mono, bi, o trivalente) formato durante la prima analisi MS. Questo comportamento spettroscopico esibito dalla palitossina si manifesta anche in molti composti palitossina-simili, quali ostreocina-d, mascarenotossine, 42-OH-palitossina e ovatossina-a (Ciminiello *et al.*, 2010).

Le indagini sull'architettura di questa complessa tossina non proteica, iniziate circa quarant'anni fa e tuttora in corso, sono rese difficoltose anche dalla scarsa disponibilità di composti puri; le tossine si ritrovano in organismi marini in piccole quantità e spesso assieme a miscele di analoghi ed è inevitabile che la loro purificazione porti a grandi perdite di materiale. Ciononostante, chiarire la loro struttura è un importante punto di inizio per studiare la loro attività biologica e per valutare il rischio reale sulla salute dell'uomo (Ciminiello *et al.*, 2011).

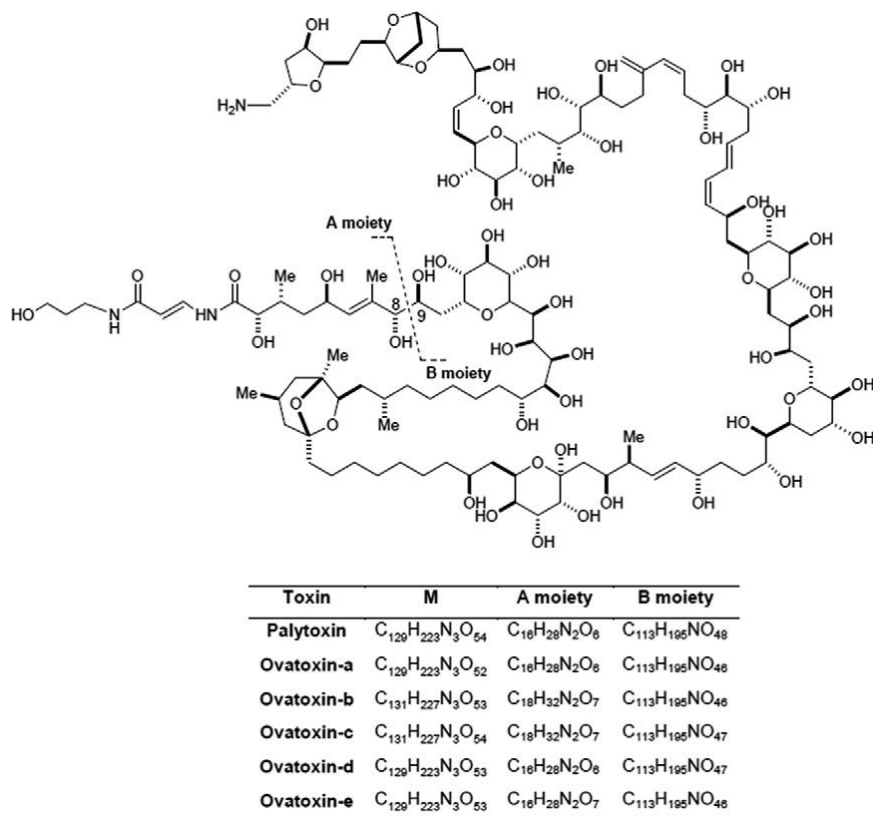


Fig. 10. Struttura della palitossina, formule molecolari delle ovatossine (M) e composizione elementare dei frammenti A e B, come dedotto da esperimenti HR LC-MS e MS² (da Ciminiello *et al.*, 2008; 2010).

Uno studio quantitativo ottenuto dallo spettro HR LC/MS di estratti di colture di *O. ovata* ha indicato le percentuali dei vari composti sul contenuto totale di tossine. Ovatossina-a si è confermato il composto più abbondante (circa il 54%), seguito da ovatossina-b (circa il 27%), ovatossine d+e (circa il 12%), ovatossina-c (circa il 6%) e infine palitossina putativa (circa lo 0,6%). Le nuove ovatossine rappresentano quindi quasi il 46% del contenuto di tossine totale e ciò va tenuto in conto nel momento in cui si vanno ad eseguire programmi di monitoraggio sul plancton o su prodotti ittici contaminati tramite LC/MS (Ciminiello *et al.*, 2010).

Saggi emolitici eseguiti su sangue di pecora mostrano che *O. ovata* produce emolisi degli eritrociti. Questo tipo di saggio potrebbe essere uno strumento utile per una prima quantificazione dell'insieme dei composti palitossina-simili presenti negli estratti algali (Pezzolesi *et al.*, 2012). *O. ovata* ha effetto letale su nauplii di *Artemia* sp. e su forme giovanili di spigola *Dicentrarchus labrax*. Il saggio su *Artemia* non è però in grado di individuare differenze molto piccole tra i campioni, quindi non può essere usato per indagini di tipo

quantitativo (Pezzolesi *et al.*, 2012). Prove di tossicità eseguite esponendo il polichete *Dinophilus gyrociliatus* a campioni di acqua marina prelevati a metà dell'estate, quando *O. ovata* fiorisce, e a fine estate, quando la densità della dinoflagellata è in declino, hanno mostrato una mortalità più alta dei policheti esposti a campioni prelevati a metà dell'estate, mentre la mortalità esibita dai gruppi trattati con acqua marina prelevata in estate inoltrata è risultata trascurabile rispetto ai gruppi di controllo, dove tutti i vermi sono sopravvissuti. L'alta tossicità per cellula esibita da *O. ovata* a metà estate si è ipotizzata essere una risposta di tipo allelopatico. Tests come questo possono rappresentare un utile strumento per la determinazione del rischio ecologico associato alle fioriture di dinoflagellate tossiche (Simonini *et al.*, 2011).

Episodi di mortalità in megafauna bentonica durante fioriture di lunga durata, suggeriscono che *Ostreopsis* spp. può nuocere alle comunità che vivono nelle aree costiere temperate (Simonini *et al.*, 2011). Contrariamente a quanto avviene per tossine presenti più comunemente nelle coste europee, quali acido okadaico (OA) e azaspiracido (AZA-1), le quali non riducono la vitalità delle cellule dei molluschi, pur accumulandovisi, la palitossina colpisce l'integrità di molluschi bivalvi, quali *Mytilus galloprovincialis* Lmk. che non sono adattati alla sua presenza, risultando altamente citotossica su cellule del mantello e dell'epatopancreas (Louzao *et al.*, 2010).

Relativamente al rischio per l'uomo dato dall'ingestione di prodotti ittici contaminati da palitossine, bisogna distinguere le specie che portano la tossina nel loro apparato digerente senza averla assorbita da quelle che la assorbono e la incorporano nei vari tessuti. In quest'ultimo caso, le tossine possono essere metabolizzate, accumulate, escrete, si possono rinvenire in più di un tessuto, possono essere più persistenti e possono raggiungere elevate quantità causa il bioaccumulo. Inoltre si può rinvenire grande numero di derivati metabolici, magari con potenziali tossici differenti.

LC/MS, saggi sul topo, saggi emolitici rappresentano le metodiche più utilizzate per la ricerca delle palitossine nei prodotti ittici. La presenza di palitossine è stata segnalata nei pesci, nei molluschi, nei crostacei e negli echinodermi, anche se non è semplice riassumerne l'incidenza a livello mondiale, data la mancanza di una metodica ufficiale. Le metodiche utilizzate sono poco confrontabili in quanto differiscono per sensibilità, per le variabili misurate (tossine, tossicità), per i composti cercati (i vari analoghi). Tutto ciò,

assieme alla scarsa disponibilità di standards per PLTXs, impedisce l'armonizzazione per analisi quantitative (Aligizaki *et al.*, 2011).

Studi più recenti hanno permesso di isolare e determinare la struttura del maggior composto tossico contenuto in estratti di *O. ovata*, la ovatossina-a (Fig. 11). Fino ad ora non è stato possibile effettuare alcun accertamento del rischio né stabilire limiti di tolleranza circa il consumo di prodotti ittici, causa la mancanza di tossine pure. La disponibilità di ovatossina-a pura potrà consentire di studiarne appieno la tossicità e preparare standard di riferimento da utilizzare in analisi di LC/MS quantitativa, oltre a chiarire le basi molecolari della bioattività di questa classe di composti tossici (Ciminiello *et al.*, 2012).

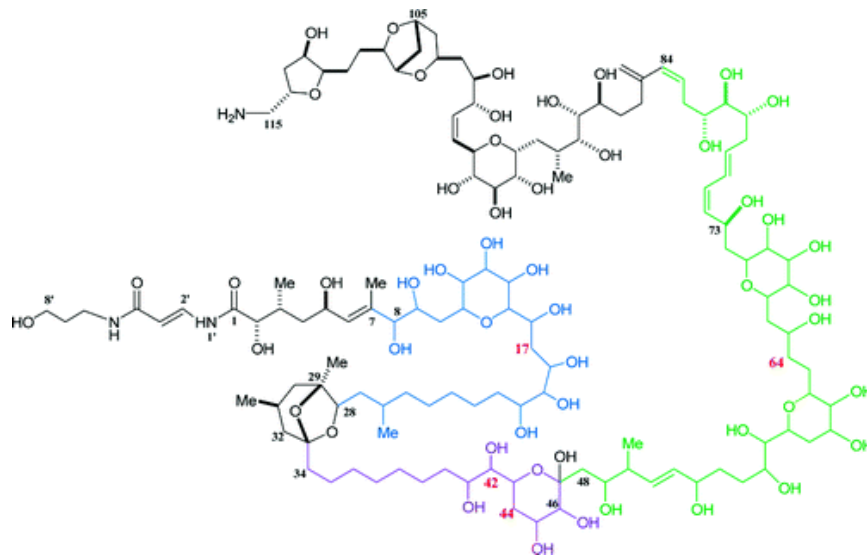


Fig. 11. Struttura chimica della ovatossina-a (da Ciminiello *et al.*, 2012)

Una particolare strategia osservata in *O. ovata* potrebbe avere un ruolo nel comportamento invasivo della specie. In condizioni di bassa turbolenza, gli individui liberano sostanze esopolimeriche dal poro ventrale, formando cordoni mucillaginosi che realizzano una sorta di rete galleggiante, nella quale restano impigliati potenziali predatori, quali copepodi e nematodi. Verosimilmente, la produzione di esotossine da parte delle microalghe, stordisce ed eventualmente uccide gli organismi intrappolati. Questi aggregati mucillaginosi sono poi colonizzati da batteri e funghi, che contribuiscono alla formazione di un biofilm complesso (Barone e Prisinzano, 2006).

1.3.2 *PROROCENTRUM LIMA*

Prorocentrum lima (Dinophyceae, Prorocentrales) è una specie neritica ed estuarina, bentonica ed epifita e può essere ticoplanctonica. E' distribuita in tutto il mondo, sia in acque temperate che tropicali. Recentemente è stata segnalata anche nel Mar Adriatico, dove è stata registrata la comparsa lungo le coste abruzzesi nel giugno del 2007 (Ingarao *et al.*, 2007). Si può trovare nella sabbia, adesa alla superficie di alghe e frammenti bentonici, associata alle barriere coralline o su detriti flutuanti in habitat di mangrovie (Faust e Gullendge, 2002). In coltura è frequente osservare che le cellule non nuotano liberamente ma aderiscono alle pareti tramite filamenti mucosi originando ammassi cellulari.

Di dimensioni medio-piccole, presenta una forma allargata posteriormente. Non ci sono piastre ma la teca si compone di due valve suture in senso longitudinale, su ciascuna delle quali sono presenti numerosi piccoli pori marginali, utili per la distinzione tra specie. Sulla valva destra, nella zona periflagellare, è presente una depressione a forma di V. E' una specie fotosintetica, dotata di due cloroplasti, un pirenoide centrale e un grande nucleo nella parte posteriore (Fig. 12) (Pompei e Cangini, 2006).

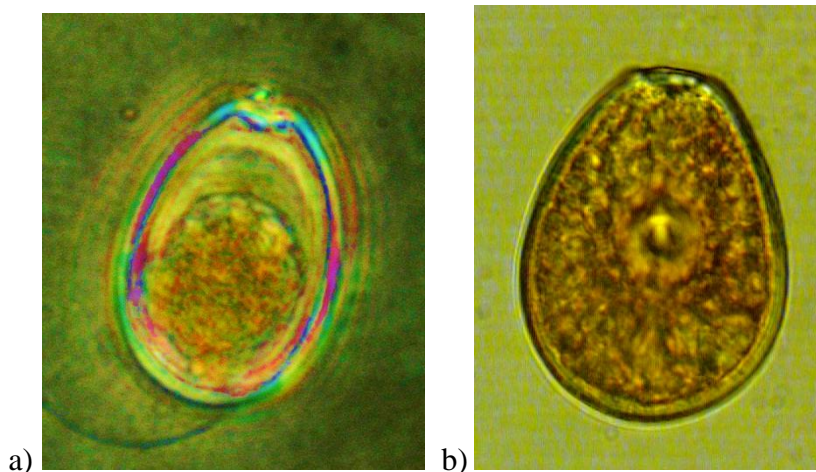


Fig 12. a) *Prorocentrum lima*, Ehrenberg, Stein 1878 (rif. PLAN0701) 400x; b) Pirenoide centrale e depressione a forma di V sulla valva destra.

Solitamente la riproduzione è asessuale, e avviene per scissione binaria, ma cellule coltivate in laboratorio hanno esibito una peculiare forma di divisione vegetativa multipla, che avviene in un involucro ialino, il quale può contenere

una catena formata da 4 a 32 cellule (Faust, 1993a). Questa riproduzione asessuale alternativa non è stata osservata nelle popolazioni naturali. *P. lima* mostra anche riproduzione sessuale, descritta sia in popolazioni naturali che in laboratorio. Dopo la coniugazione degli isogameti, si forma una grande cisti ipnozigotica di colore pallido, del diametro di 70-75 micron, con parete tristratificata (Faust, 1993b).

1.3.2.1 Inquadramento tassonomico

L'inquadramento tassonomico di *P. lima* non è ben definito, e il numero di sinonimi con cui è stata citata suggerisce la variabilità morfologica della specie: *Dinopyxis laevis* F. Stein 1883, *Exuviaella marina* Cienkowski, Klebs 1884, *Exuviaella lima* (Ehrenberg) Bütschli 1885, *Exuviaella lima* (Ehrenberg) Schütt 1896, *Exuviaella lima* (Ehrenberg) Bütschli, Paulsen 1908, *Exuviaella marina* Cienkowski, Lebour 1925, *Exuviaella marina* Cienkowski, Schiller 1933, *Exuviaella marina* var. *lima* Schiller 1933, *Exuviaella marina* Cienkowski, Carter 1938, *Exuviaella marina* Cienkowski, Dodge 1965, *Prorocentrum marinum* (Cienkowski) Dodge e Bibby 1973, *Exuviaella lima* (Ehrenberg) Bütschli, McLahlan *et al.* 1997, *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) Dodge 1975, *Prorocentrum arenarium* Faust 1994, *Prorocentrum lima* (Ehrenberg) F. Stein 1878, revisionato da Nagahama, Murray, Tomaru e Fukuyo 2011 (Nagahama *et al.*, 2011).

La tassonomia di *Prorocentrum*, incluso *P. lima*, è stata ampiamente rivisitata da Dodge (1975) tramite l'utilizzo di parametri morfologici quali forma e ornamento delle valve, presenza/assenza di pori valvari, presenza/assenza di una spina anteriore, dimensioni della spina anteriore, rapporto lunghezza/larghezza della cellula, riducendo il numero delle specie da 64 a 21. Grzebyk *et al.* (1998) sulla base di indagini morfologiche e filogenetiche effettuate tramite sequenze di DNA ribosomiale hanno suggerito che *Prorocentrum arenarium*, descritto da Faust (1994) come una nuova specie, può essere considerato un grande morfotipo rotondo di *P. lima*. Nagahama *et al.* (2011) hanno studiato esemplari naturali e coltivati di *P. lima* (Ehrenberg) F. Stein provenienti da 26 aree di 13 paesi al fine di definire i confini di specie di questo *taxon*. Come caratteristiche morfologiche hanno utilizzato forma, dimensione e ornamento delle valve, numero e forma dei pori valvari, dei pori marginali e delle placchette periflagellari. Inoltre hanno analizzato due regioni del genoma. Tutte le colture identificate sulla base di questi

caratteri formano un gruppo monofiletico, che comprende *P. arenarium* all'interno del range delle variazioni morfologiche di *P. lima*, per cui i due *taxa* sono stati considerati sinonimi. All'interno di questo gruppo monofiletico, sono stati individuati sottogruppi in cui la variabilità intraspecifica è ampiamente correlata all'origine geografica (in particolare Oceano Pacifico, Oceano Atlantico, Mar dei Caraibi e Mar dei Sargassi), ipotizzando che possa essere in atto un evento di speciazione allopatrica.

P. lima (Ehrenberg) F. Stein 1878, nella descrizione revisionata da Nagahama, Murray, Tomaru e Fukuyo 2011, possiede le seguenti caratteristiche: la forma della cellula è ampia nella regione centrale, rastremata verso il margine anteriore e rotonda nel margine posteriore; la cellula è composta da due valve e da un piccolo insieme di placchette periflagellari ed è compressa lateralmente; la valva destra ha una intaccatura dov'è inserita l'area periflagellare; le valve sono dotate di pori tranne che nell'area centrale, dove è presente un largo pirenoide; una fila di pori marginali è presente alla periferia delle valve; la superficie valvare è liscia; l'area periflagellare è composta di otto placchette a,b,c,d,e,f,g,h (Fig. 13); il nucleo è collocato nella regione posteriore; la lunghezza della cellula varia tra 35 e 57 μm ; la larghezza varia tra 21 e 46 μm (Nagahama *et al.*, 2011).

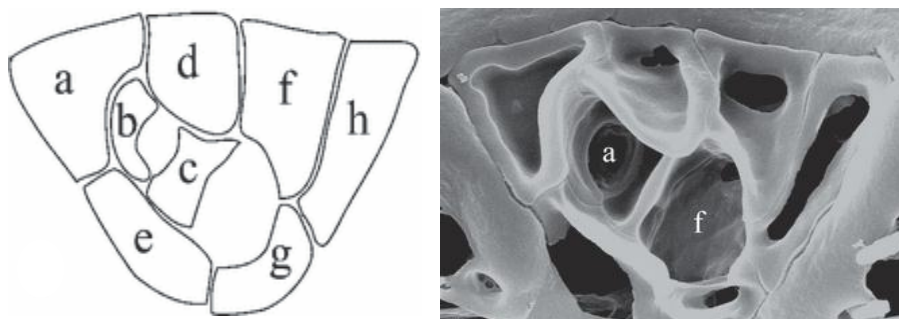


Fig. 13. Regione periflagellare composta da otto placchette (da Nagahama *et al.*, 2011).

1.3.2.2 Tossicità e allelopatia di *P. lima*

Come altre specie del genere *Prorocentrum*, *P. lima* produce tossine DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*). Queste tossine costituiscono un gruppo di composti polieterei liposolubili che inibiscono le fosfatasi PP1 e PP2A. Le proteine serina/treonina fosfatasi sono implicate in molti processi cellulari degli organismi eucarioti, incluso il trasporto ionico, la trasduzione del segnale, la regolazione del ciclo cellulare e la sintesi proteica. L'azione

tossica che le coinvolge provoca potenti effetti sugli organismi marini, arrecando danni all'industria di prodotti ittici quali molluschi e crostacei in tutto il mondo. Nel gruppo DSP sono inclusi l'acido okadaico (Murakami *et al.*, 1982) e i derivati dinofisistossina-1 (DTX-1) (Marr *et al.*, 1992), dinofisistossina-2 (DTX-2) (Hu *et al.*, 1992). Hu *et al.* (1995) hanno riportato la struttura di una tossina DSP idrosolubile, DTX-4 ottenuta da un ceppo di *P. lima* proveniente dalla Nuova Scozia, ipotizzando che il derivato idrosolubile possa essere un mezzo di escrezione dei composti DSP liposolubili dalla cellula verso l'ambiente acquoso. Inoltre da ceppi di *P. lima* è stato segnalato un composto, il procontrolide (Fig. 14) che sviluppa una azione tossica molto rapida nel saggio sui topi, uccidendo gli animali nel giro di minuti, diversamente dalle altre tossine DSP, che di solito impiegano ore (Torigoe *et al.*, 1988). Un'altra FAT (Fast Acting Toxin) idrosolubile, con effetto "tutto-o-niente", è stata isolata da estratti di colture di *P. lima* proveniente da regioni endemiche per la ciguatera. Topi inoculati con la minima dose letale (LD50) morivano in 32-34 minuti oppure si ristabilivano completamente (Tindall *et al.*, 1989).

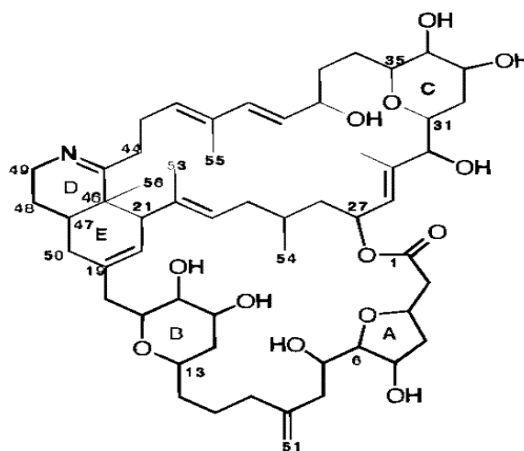


Fig. 14. Procontrolide (da Hu *et al.*, 1996)

Gli effetti tossicologici e farmacologici di queste tossine ad azione rapida non sono ancora compresi appieno, né si può speculare in quali condizioni ambientali essi siano prodotti o meno dai vari ceppi di microalghe. Si è visto però che, diversamente dai loro co-metaboliti, le tossine DSP, questi composti non sono inibitori delle fosfatasi (Hu *et al.*, 1996).

Sebbene l'acido okadaico prodotto da *P. lima* inibisca l'attività proteino-fosfatasica di dinoflagellate che vi si trovano assieme, avendo quindi il potenziale di inibirne la crescita, gli effetti allelopatici di *P. lima* non

sarebbero interamente attribuiti al solo acido okadaico. Sugg e VanDolah (1999) hanno studiato un gruppo di dinoflagellate bentoniche associate alla ciguatera, cercando di verificare se le tossine prodotte dalle microalghe conferiscono un vantaggio competitivo nei confronti di specie coesistenti, inibendone la crescita. Colture incrociate di *Gambierdiscus toxicus*, *Coolia monotis*, *Amphidinium klebsii*, *Ostreopsis lenticularis*, e *P. lima* hanno mostrato che terreni preconditionati di ciascuna specie erano in grado di inibire la crescita di almeno un'altra specie. Tutte le microalghe hanno subito una qualche forma di inibizione, tranne *Amphidinium klebsii*, mentre *P. lima* è entrata in fase stazionaria solo un poco prima rispetto ai controlli. I terreni preconditionati con *P. lima* hanno mostrato gli effetti più potenti sulle altre specie; inoltre hanno avuto effetti maggiori rispetto a quelli ottenuti con acido okadaico purificato. I terreni condizionati da *P. lima* sono quindi dotati di un potenziale inibitorio aggiuntivo sulle proteine fosfatasi delle microalghe rispetto a quello causato dall'acido okadaico, il quale da solo non è in grado di giustificare l'effetto allelopatico, che quindi è verosimilmente dovuto alla presenza di un'altra sostanza. L'acido okadaico puro non ha mostrato effetto inibitorio sulla proteina fosfatasi di *P. lima*, che è risultata refrattaria.

2. SCOPO DELLA TESI

Le fioriture algali rappresentano un problema emergente che colpisce le attività ricreative costiere negli ultimi decenni e molta responsabilità è attribuita alla pressione antropica sulle coste, anche se fondamentalmente i fenomeni di fioriture dannose rimangono imprevedibili. Un tempo confinate in aree tropicali e sub-tropicali, nuove alghe tossiche produttrici di composti palitossina-simili, quali *Ostreopsis* spp., si sono diffuse anche in regioni temperate, come il Mediterraneo. Le tossine liberate nelle acque possono creare problemi di salute pubblica se inalate come aerosol o se assunte attraverso il consumo di prodotti ittici contaminati. Nel nostro Paese vengono svolte diverse attività di controllo per il riconoscimento di specie microalgali quali il monitoraggio messo in atto dal Ministero della Salute attraverso le Regioni, in adempimento del Regolamento CE 853/2004 nelle aree di produzione dei molluschi bivalvi, i piani di sorveglianza sulle fioriture in riferimento all'attività di balneazione e i programmi di monitoraggio sull'ambiente marino-costiero svolti dal Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare, in adempimento alla Legge 979/82, "Disposizione per la difesa del mare". In tale ambito viene effettuato il rilevamento quali-quantitativo delle microlaghe pelagiche, mentre non viene esplicitamente richiesta la sorveglianza di microalghe bentoniche come le dinoflagellate tipicamente presenti nel nostro territorio, le quali, oltre a *Ostreopsis* spp., comprendono almeno altre due specie potenzialmente tossiche: *Prorocentrum lima*, noto per la produzione di acido okadaico che, veicolato generalmente da mitili, provoca la sindrome diarroica (DSP), e *Coolia monotis*, che produce un composto neutrotossico (cooliatossina, analogo YTX).

Per valutare il rischio reale sulla salute dell'uomo, vi è necessità di conoscere i parametri ambientali ottimali alla proliferazione delle specie, in termini di temperatura, intensità luminosa e disponibilità di nutrienti, così come di chiarire la struttura delle tossine e le condizioni che possono favorire la loro produzione. La temperatura dell'acqua, ad esempio, rappresenta una condizione fondamentale nel determinare gli andamenti stagionali e le abbondanze delle dinoflagellate tossiche bentoniche, oltre ad avere influenza sulla tossicità delle cellule. Vi è uno scarso numero di studi di laboratorio relativi agli effetti dei parametri ambientali sulla crescita e sulla tossicità di *Ostreopsis ovata*, sia per ceppi tropicali che per ceppi provenienti dal Mediterraneo.

Il presente studio si colloca in un più ampio programma di rilevanza nazionale, espresso anche in tesi parallele, che riguarda indagini sulle condizioni ambientali che portano ad una proliferazione di microalghe tossiche o potenzialmente tali o ad una maggiore espressione della loro tossicità. Colture di un ceppo di *Ostreopsis ovata*, specie produttrice di fioriture tossiche, isolato da una popolazione proveniente dal Mare Adriatico, sono state fatte crescere a diverse condizioni di temperatura, con un *range* di acclimatazione da 20°C a 30°C, al fine di esaminare variazioni nei tassi di crescita, nell'utilizzo dei nutrienti, nella resa fotosintetica e nel contenuto di tossine in funzione delle varie temperature. E' stato utilizzato il metodo di coltivazione in "batch", che prevede l'inoculo delle cellule algali in una determinata quantità di terreno di coltura, senza più aggiungere nutrienti. Il controllo delle varie fasi di crescita viene effettuato tramite prelievi periodici ed esecuzione di prove volte a verificare lo stato di benessere della coltura, il raggiungimento di una fase stazionaria di crescita, il consumo di nutrienti, e infine il contenuto cellulare di tossine. Le colture sono state portate avanti per un periodo della durata di circa tre settimane.

Parallelamente, con le stesse condizioni di trattamento, si sono allestite colture di un'altra dinoflagellata bentonica, *Prorocentrum lima*, che in natura non presenta grandi esplosioni di biomassa, studiandone il comportamento durante tutto il periodo di coltivazione e cercando di individuarne le esigenze ambientali e nutrizionali. Anche il ceppo di questa dinoflagellata proviene dal Mare Adriatico.

Infine sono state allestite colture miste, sottoposte ai medesimi protocolli, allo scopo di studiare la competizione tra le due specie ed evidenziare la presenza di eventuali interazioni allelopatiche, tenendo per confronto i comportamenti esibiti nelle colture monospecifiche, e ciò al fine di contribuire alla comprensione della monospecificità dei *blooms*.

Il calcolo dei biovolumi, rapportati alle abbondanze cellulari nelle varie fasi delle colture ha permesso di effettuare una stima della biomassa prodotta.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Ceppi utilizzati

E' stato utilizzato un ceppo di *Ostreopsis ovata*, Fukuyo 1981 (rif. OOAN0816), di seguito citato come *O. ovata*, appartenente alla collezione dell'Università di Bologna, Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali, Ravenna, raccolto in Mare Adriatico nei pressi di Ancona e isolato da Guerrini F. nel 2008.

E' stato altresì utilizzato un ceppo di *Prorocentrum lima*, Ehrenberg, Stein 1878 (rif. PLAN0701), di seguito citato come *P. lima*, appartenente alla collezione dell'Università di Bologna, Centro Interdipartimentale di Ricerca per le Scienze Ambientali, Ravenna, raccolto in Mare Adriatico nei pressi di Numana e isolato da Guerrini F. nel 2007.

3.2 Preparazione dell'acqua di mare

L'acqua marina per uso di laboratorio è prelevata in zone oligotrofiche dal personale della motonave Daphne; presso il laboratorio le taniche sono conservate in ambiente buio per circa un mese. Al momento dell'utilizzo, l'acqua è filtrata in beuta da vuoto con filtri in fibra di vetro GF/C del diametro di 90 millimetri e porosità di 1,2 μm , quindi ne viene misurata la salinità. La *Practical Salinity Scale* (PSS78), introdotta nel 1978, reca una serie di misure che legano salinità e conducibilità elettrica di un campione di acqua di mare (Cognetti *et al.*, 2004); il rapporto tra la conducibilità del campione e quella di una soluzione standard di KCl corrisponde a un numero adimensionale indicato come **psu** (*Practical Salinity Units*): ad esempio, 35 psu equivalgono a 35 grammi di sale per litro di soluzione (Unesco, 1985). La misura è stata fatta utilizzando un rifrattometro portatile (determinazione diretta dell'indice di rifrazione), azzerato con una goccia d'acqua distillata e puntato verso una sorgente luminosa, risultando del 33‰, ovvero 3,3 grammi di sali in 100 grammi di soluzione. Desiderando lavorare con una salinità inferiore, si può aggiungere all'acqua marina un'idonea quantità di acqua distillata, individuabile su apposite tabelle basate sulla proporzione tra i volumi e le concentrazioni iniziali e finali e verificando poi col rifrattometro l'ottenimento della salinità desiderata; desiderando invece una salinità maggiore, occorre operare procedure di evaporazione per aumentare la concentrazione.

Necessitando per le fitocolture di una salinità di circa 35‰, non si è proceduto ad alcuna operazione di concentrazione, in quanto la successiva procedura di sterilizzazione in autoclave a 121°C per 20 minuti, tende a far salire la salinità. Una volta raffreddata, l'acqua marina sterile è conservata in frigorifero.

3.3 Preparazione del terreno di coltura

Per i ceppi algali prescelti sono state allestite colture “batch”, che prevedono l'inoculo degli organismi in un terreno di coltura di specifica formulazione, senza più fare aggiunte di nutrienti per tutta la durata dell'esperimento.

Il terreno di coltura utilizzato, F(N/10,P/10) 35‰ più selenio, rappresenta una variante del terreno F2, comunemente usato per le colture di microalghe. Il terreno F2 ha un rapporto N:P di 24:1 (Guillard e Ryther, 1962; Guillard, 1975).

I terreni si ottengono aggiungendo all'acqua marina (35‰) delle soluzioni preparate, autoclavate e conservate in frigorifero, oppure semplicemente filtrate (causa la termolabilità) e conservate in congelatore. Per questa fase occorre lavorare in sterilità ed è quindi necessario l'uso della cappa a flusso laminare. Si riporta il confronto tra le concentrazioni dei componenti nel terreno F2 e nel terreno F(N/10; P/10) (Tab. 2).

COMPONENTI	Conservazione	Terreno F2	Terreno F(N/10, P/10)+Se
NaNO ₃ (soluzione di 15 g in 200 mL)	Autoclavata e refrigerata	1 mL/litro	200 µL/litro
NaH ₂ PO ₄ (soluzione di 1 g in 200 mL)	Autoclavata e refrigerata	1 mL/litro	200 µL/litro
HEPES (soluzione di 23 g in 100 mL)	Autoclavata e refrigerata	1 mL/litro	1 mL/litro
Elementi in traccia + EDTA	Autoclavata e refrigerata	1 mL/litro	1 mL/litro
Vitamine (B12, Biotina, Tiamina)	Filtrata e congelata	0,5 mL/litro	0,5 mL/litro
Selenio	Autoclavata e refrigerata	--	80 µL/litro

Tab. 2. Composizione dei terreni di coltura F2 e F (N/10, P/10)+Se.

Come si nota, la concentrazione di nitrati e fosfati nel terreno F(N/10, P/10) è cinque volte inferiore rispetto a quella presente nel terreno F2.

Al terreno F(N/10, P/10) è stato addizionato selenio, come da Guerrini *et al.*, 2010.

L'HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico) funge da tampone per mantenere il pH a 7,2-7,3. Il valore del pH tenderebbe ad alterarsi durante la coltivazione a seguito del consumo di CO₂ e della produzione di metaboliti da parte delle cellule.

Gli elementi in traccia, o micronutrienti, comprendono sali di ferro, manganese, zinco, cobalto, rame, molibdeno. L'aggiunta di EDTA quale complessante, fa sì che i metalli vengano rilasciati gradualmente, mitigando così il loro effetto tossico.

Con la formulazione F(N/10, P/10) e selenio sono stati preparati alcuni litri di terreno per la crescita delle microalghe.

3.4 Primo ciclo di acclimatazione

In tre beute graduate sterili sono stati collocati 125 mL ciascuna di una coltura madre di *Prorocentrum lima* mantenuta in agitazione al fine di ottenere un prelievo uniforme. L'osservazione al microscopio di una piccola aliquota

della coltura madre ha mostrato cellule mobili e vitali. In ogni beuta è stato quindi aggiunto terreno F(N/10, P/10) con selenio fino ad un volume totale di 400 mL (Fig. 15).

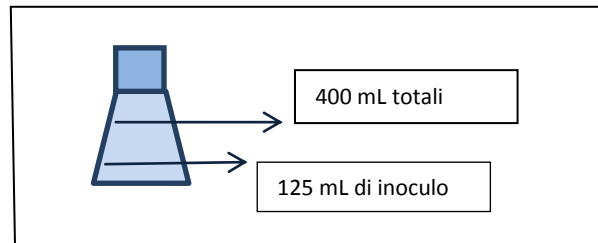


Fig. 15. Inoculo per il primo ciclo di acclimatazione

Le beute sono state chiuse semplicemente con un tappo di garza e ovatta. Su ogni beuta sono stati indicati il ceppo, la data e la diversa temperatura di incubazione, di 20°C, 25°C e 30°C.

Analogamente, in altre tre beute graduate sterili sono stati collocati 125 mL di inoculo proveniente da una coltura madre di *Ostreopsis ovata*, procedendo con le medesime modalità.

Le sei beute sono state sistemate in camera luminosa. La camera è illuminata 16 ore al giorno grazie a una batteria di lampade al neon in grado di fornire uno spettro luminoso adatto alle esigenze fotosintetiche delle alghe, ed è programmata per mantenere al suo interno una temperatura costante di circa 20°C. Le colture destinate a crescere a tale temperatura sono state semplicemente poste su un ripiano. Per ottenere la crescita a 25°C e a 30°C ci si è serviti di due bagnomaria termostatici, ciascuno costituito da una vasca trasparente piena di acqua demineralizzata in cui è inserita un'unità di riscaldamento e di agitazione programmabile.

I tre sistemi a 20°C, a 25°C e a 30°C sono stati posizionati l'uno accanto all'altro (Fig. 16), verificando che ricevessero tutti all'incirca lo stesso irraggiamento luminoso, il quale è risultato mediamente pari a 125 μ E (micro Einstein).

Questa prima fase di acclimatazione ha avuto la durata di una settimana.

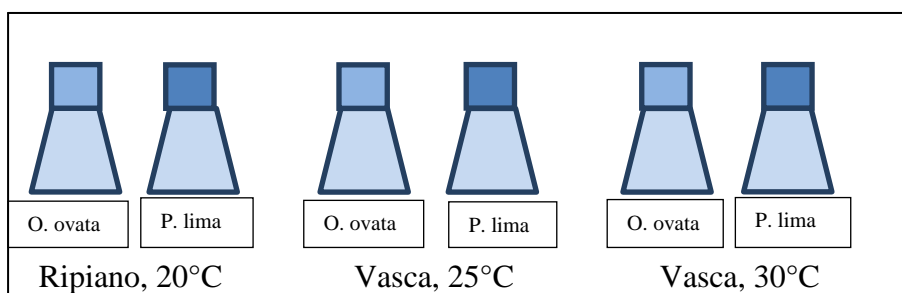


Fig. 16. Prima fase di acclimatazione.

3.5 Secondo ciclo di acclimatazione

Passata una settimana, dalle tre beute contenenti *P. lima* è stata prelevata una piccola aliquota per i conteggi, che sono stati effettuati previa aggiunta di alcune gocce di Lugol per la fissazione.

Anche dalle tre beute contenenti *O. ovata* è stato fatto il prelievo per i conteggi; in questo caso, per la fissazione è stato aggiunto HCl 1M (8 $\mu\text{L}/\text{mL}$), allo scopo di cercare di sciogliere gli aggregati che l'alga ha formato e che rendono la conta difficoltosa.

Quindi da ciascuna delle sei beute è stata prelevata un'aliquota di 150 mL, collocata in una nuova beuta e portata al volume di 600 mL con terreno F(N/10, P/10) e selenio (Fig. 17).

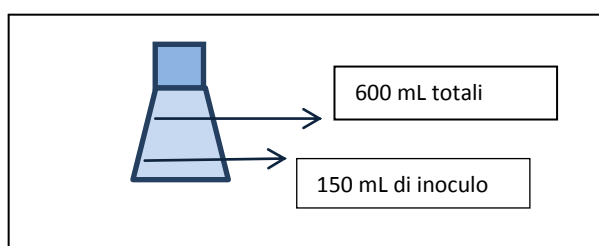


Fig. 17. Inoculo per il secondo ciclo di acclimatazione.

Anche il nuovo gruppo di sei beute è rimasto ad incubare in camera alle tre diverse temperature per una settimana.

3.6 Inoculi

Dopo la seconda settimana, da ciascuna beuta di *P. lima* sono stati prelevati alcuni mL da fissare col Lugol per le conte.

Da ciascuna beuta di *O. ovata* sono stati prelevati 50 mL, acidificati con 400 μ L di HCl 1M (8 μ L per mL) per le conte.

I conteggi sono stati effettuati al microscopio rovesciato secondo la metodica di Utermöhl (UNI EN 15204, 2006). In questa fase dell'esperimento, i conteggi hanno lo scopo di quantificare la quantità da inoculare. Infatti si desidera partire con una densità di 300 cellule per mL in beute del volume finale di 800 mL, per un totale di 240.000 cellule per beuta. Sulla base delle densità osservate nei conteggi, fatte le dovute proporzioni, è stato quantificato il volume di coltura necessario per costituire l'inoculo. Gli inoculi sono stati composti come da Tab. 3.

Trattamento	Conteggi	Inoculi (arrotondam.)
<i>P. lima</i> 20°C	1642 cell/mL	150 mL su 800 mL
<i>P. lima</i> 25°C	5046 cell/mL	50 mL “
<i>P. lima</i> 30°C	3526 cell/mL	70 mL “
<i>O. ovata</i> 20°C	4803 cell/mL	50 mL “
<i>O. ovata</i> 25°C	8558 cell/mL	28 mL “
<i>O. ovata</i> 30°C	2842 cell/mL	85 mL “

Tab. 3. Inoculi monospecie.

Dovendo valutare anche la competizione e le interazioni allelopatiche tra le due specie algali, si è proceduto a formare popolazioni miste tramite i seguenti inoculi (Tab. 4).

Trattamento	Inoculi
20°C	75 mL di <i>P. lima</i> + 25 mL di <i>O. ovata</i> /800 mL
25°C	25 mL di <i>P. lima</i> + 14 mL di <i>O. ovata</i> /800 mL
30°C	35 mL di <i>P. lima</i> + 42 mL di <i>O. ovata</i> /800 mL

Tab. 4. Inoculi bispecie.

Per ogni trattamento sono state preparate due repliche, per un totale di 18 beute da incubare alle tre temperature (Fig. 18).

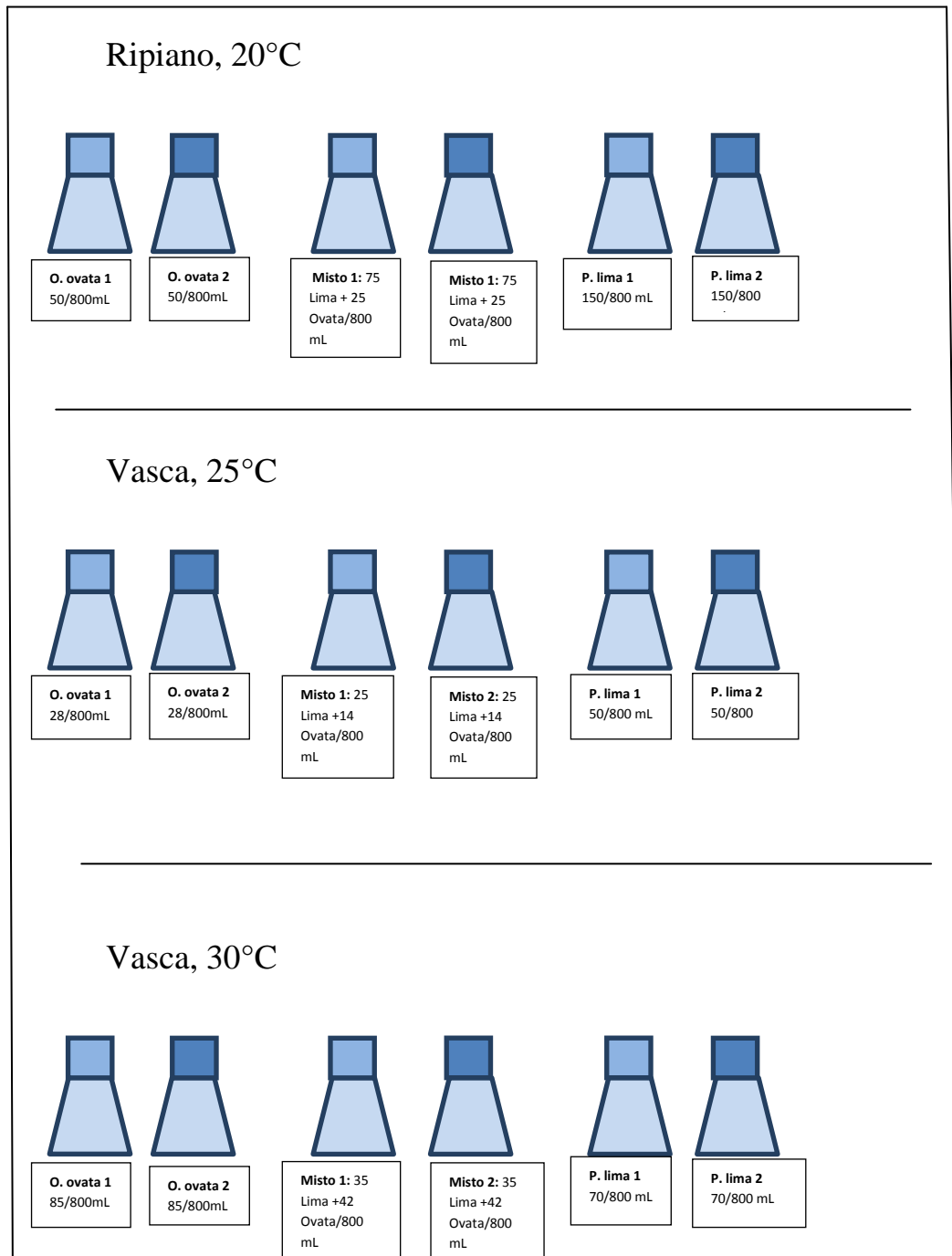


Fig. 18. Le 18 colture che hanno costituito l'esperimento.

Prima di collocare le 18 beute in camera di incubazione, sono state prelevate da ciascuna le seguenti aliquote:

- 10 mL da fissare per le conte. La fissazione è avvenuta con una goccia di Lugol per *P. lima* e con 80 µL di HCl 1M per *O. ovata* e per le popolazioni miste.
- 30 mL da filtrare e congelare in attesa della determinazione dei nutrienti.

Tutte le operazioni di prelievo ed inoculo sono state eseguite in sterilità.

3.7 Raccolta delle alghe

Le 18 beute sono rimaste ad incubare 22-24 giorni, durante i quali sono stati effettuati prelievi periodici per i conteggi e il PAM e per i nutrienti. I campioni destinati alla determinazione dei nitrati e fosfati sono stati prelevati il giorno zero (giorno di partenza dell'esperimento), il terzo giorno, il settimo, il decimo, il sedicesimo e il giorno della raccolta, che ha rappresentato la fine dell'esperimento di coltivazione. La raccolta è avvenuta nella ventiduesima giornata per *O. ovata*, nella ventitreesima per la popolazione mista e nella ventiquattresima per *P. lima*. I campioni per i nutrienti sono stati filtrati a 1,2 µm con beuta da vuoto, allo scopo di eliminare le cellule, le quali, degradandosi, avrebbero riversato nuovi nutrienti rivelabili poi dalle metodiche; quindi sono stati etichettati e posti in congelatore a -20°C in attesa dell'esecuzione delle analisi.

Ai fini di raccogliere un quantitativo di cellule sufficiente ai successivi procedimenti di analisi, il contenuto di ogni coppia di beute recanti lo stesso trattamento è stato riunito in un unico cilindro, annotando il volume dopo l'esecuzione degli ultimi prelievi. La rimanenza è stata poi filtrata per caduta su filtri GF/F in microfibra di vetro del diametro di 90 mm atti a trattenere particelle della dimensione di 0,7 µm. Il vuoto non è stato utilizzato se non nella fase finale, con estrema parsimonia, per non causare la rottura delle cellule. Terminata la filtrazione, i nove filtri ottenuti sono stati ripiegati su se stessi, avvolti in un foglio di alluminio e congelati a -80°C, mentre il terreno di coltura filtrato è stato conservato in bottiglie di plastica a -20°C, in attesa di essere inviato al Dipartimento di Chimica delle Sostanze dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" per l'identificazione delle tossine eventualmente rilasciate nel mezzo.

3.8 Estrazione delle tossine

Per l'estrazione di tossine eventualmente prodotte da *O. ovata* e *P. lima* è stato usato metanolo all'80%, mantenuto refrigerato fino al momento dell'uso.

I filtri, prelevati dal congelatore a -80°C, sono stati spezzettati e i frammenti raccolti in provette da centrifuga. In ciascuna provetta sono stati aggiunti 8 mL di metanolo all'80% e si è stemperato il miscuglio con un puntale. Ogni provetta è stata posta in un becker pieno di ghiaccio e sonicata per 10 minuti.

Concluso il primo ciclo di sonicazione, le provette sono state collocate in ultracentrifuga Beckman, con rotore JS-13-1, alla velocità di 13000 rpm e alla temperatura di 4°C per 15 minuti. Si è provveduto poi alla raccolta del surnatante, che mostrava un colore da arancio a rosso vivo.

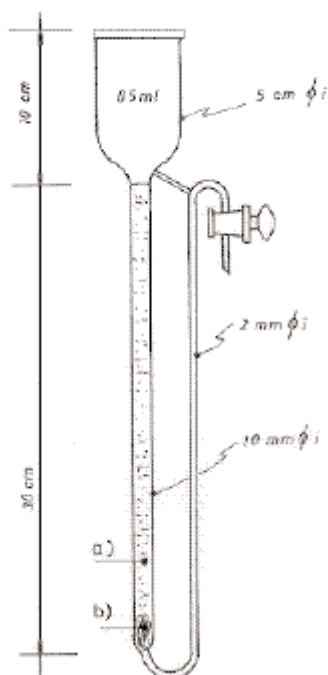
Per il secondo e il terzo ciclo di estrazione sono stati aggiunti 5 mL di solvente invece di 8 mL, in quanto oramai i filtri erano ben impregnati; per il resto si è proceduto come descritto.

Completati i tre cicli di estrazione, i campioni sono stati posti in congelatore a -20°C. Al momento della spedizione si è aggiunto altro solvente fino ad un volume finale di 20 mL. Di questi, 15 mL sono stati inviati presso il Dipartimento di Chimica delle Sostanze dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II" per l'identificazione delle tossine presenti nelle cellule, mentre 5 mL sono rimasti a disposizione del laboratorio per l'esecuzione di eventuali prove di tossicità in utilizzi futuri.

3.9 Analisi dei nutrienti

3.9.1 Determinazione dei nitrati

Prima di procedere all'analisi dei nitrati, si è reso necessario riattivare le colonnine di cadmio in cui avviene la riduzione dei nitrati a nitriti, i quali si determinano poi usando una metodica colorimetrica. Sono state preparate due colonne, anche se nella pratica se ne è poi utilizzata una soltanto (Fig. 19).



Sotto cappa chimica, il cadmio granulare è stato lavato con una soluzione di HCl 2M, poi con acqua distillata. Il cadmio è stato quindi trattato con una soluzione al 2% di $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, mescolando fino a quando il solfato di rame ha cambiato la colorazione da azzurra a marrone, data dalla precipitazione di rame colloidale. Il precipitato è stato asportato dai granuli ramati tramite una ventina di risciacqui con acqua distillata, fino a che questa non è risultata limpida. Si è poi verificato che il pH fosse maggiore di 5. Con una soluzione di cloruro d'ammonio diluita allo 0,625% si è coperto il cadmio e si sono lavate le colonne.

Fig. 19. Colonna di riduzione.

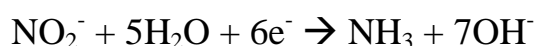
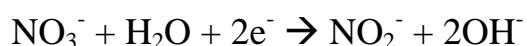
Infine le colonne sono state riempite immettendo il cadmio ramato poco per volta (a), dopo avere inserito sul fondo un batuffolo di lana di vetro (b).

Il cadmio granulare è economico ed ha un eccellente rapporto superficie/volume, ma la sua progressiva dissoluzione elimina nel tempo i granuli di dimensione minore, quindi la gamma di misura dei granuli deve essere minima: devono passare attraverso un setaccio con maglie da 2 mm e devono essere trattenuti da maglie di 0,5 mm.

Le ossidazioni che avvengono lungo la colonna riguardano il cadmio ($\text{Cd} \rightarrow \text{Cd}^{2+} + 2\text{e}^-$) ed il rame ($\text{Cu} \rightarrow \text{Cu}^{2+} + 2\text{e}^-$) per un potenziale riducente totale di -0,740 V. L'ossidazione del cadmio e del rame potrebbe avvenire non tanto a seguito della riduzione dell'azoto, che è presente a basse concentrazioni, ma a

seguito della riduzione dell'ossigeno disciolto, presente in quantità ben più elevate, favorendo la formazione e la precipitazione di idrossido di cadmio. Ecco perché si utilizza il cloruro d'ammonio, che complessa il cadmio e sposta l'equilibrio dal punto in cui avverrebbe la precipitazione.

Le riduzioni che si verificano in ambiente basico e su cui si basa la procedura analitica sono:



Il tempo di contatto tra cadmio, nitrato e nitrito è importante, in quanto un contatto eccessivamente lungo favorisce la riduzione del nitrito ad ammoniaca; la lunghezza della colonna va quindi ottimizzata in modo da ottenere una totale riduzione del nitrato e una minima riduzione del nitrito.

Una volta preparate le colonne, se ne è verificata l'efficienza. Dapprima sono stati effettuati due lavaggi, facendo percolare 200 mL di soluzione di cloruro d'ammonio diluita allo 0,625% e 100 mL di acqua distillata. Quindi si è preparata una soluzione concentrata di nitrato di potassio, KNO_3 anidro ed essiccato (1,011 g/L = concentrazione di N- NO_3 pari a 140 mg/L) e la si è diluita in acqua di mare sintetica (preparata come al punto 3.2) fino ad ottenere uno standard con un tenore di N- NO_3 pari a 0,14 mg/L. Si sono aggiunti 2 mL di soluzione concentrata al 25% di cloruro d'ammonio a 100 mL di acqua di mare sintetica (bianco) e la si è fatta passare attraverso la colonna, scartando i primi 45 mL che fuoriescono e raccogliendo i successivi 50 mL in un cilindro graduato. Analogamente si sono aggiunti 2 mL di cloruro d'ammonio concentrato a 100 mL di soluzione standard, in due repliche, e le si è fatte passare, esaurendo prima il residuo rimasto nell'imbutto della colonna, scartando i primi 45 mL di ogni standard e raccogliendo i 50 mL successivi.

Il bianco e gli standard raccolti sono stati colorati con 2 mL di solfanilammide all'1% (SA), preparata in una soluzione acqua/HCl, e si è atteso 3 minuti. La solfanilammide in ambiente acido viene diazotata dallo ione nitrito (Fig. 20), prodotto nella colonna e/o presente nei campioni (per gli schemi delle reazioni: <http://www.federica.unina.it/agraria/chimica-analitica/analisi-semiquantitativa/>).

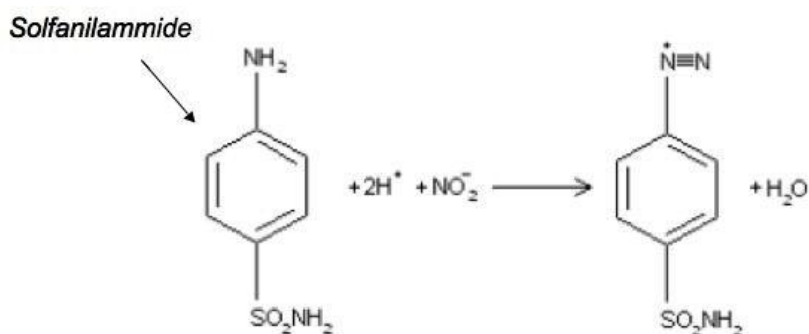


Fig. 20. La sulfanilammide viene diazotata dallo ione nitrito.

Quindi ad ogni cilindro si è aggiunto 1 mL di soluzione 0,1% di N-(1-naftil)-etilendiammina (NEDA) e si è atteso per 10 minuti. Il diazocomposto che si è formato nella prima reazione viene copulato con la N-(1-naftil)-etilendiammina, formando una molecola fortemente coniugata (Fig. 21), che conferisce alla soluzione una colorazione rosa fucsia più o meno intenso.

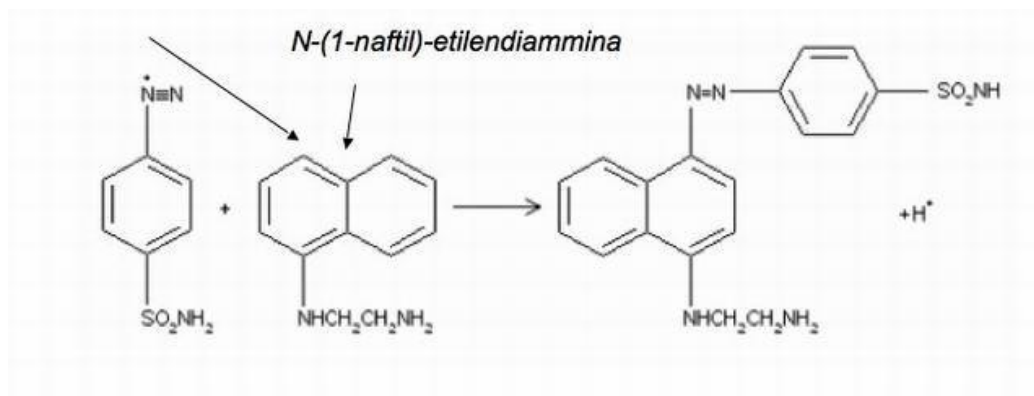


Fig. 21. Seconda reazione nella determinazione dei nitriti.

L'assorbimento delle soluzioni è stato letto allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 543 nm. Operando con celle con cammino ottico **b** da 1 cm, l'azocomposto colorato segue la legge di Lambert-Beer ($A = a \cdot b \cdot c$) fino a 0,6 mg/L di ione nitroso. Sulla base della concentrazione **c** di 0,14 mg/L e dell'assorbanza media degli standards **A** letta allo spettrofotometro e corretta del valore del bianco (A_c), si è calcolato il fattore di efficienza della colonna di riduzione **F** secondo la formula: $F = c/A_c$.

Un valore di **F** vicino a 0,31 corrisponde a un'efficienza del 100%; un'efficienza dell'84% circa è ritenuta ancora adeguata, e corrisponde a un fattore di 0,37. Al di sotto dell'80% la colonna va reimballata. L'efficienza delle colonne di riduzione tende a diminuire nel tempo, soprattutto se le colonne sono sovrautilizzate o se restano a lungo inattive; quindi la sequenza

di procedure per la verifica dell'efficienza va ripetuta almeno all'inizio e alla fine di ogni giornata di analisi. Ogni operazione con le colonne si conclude sempre col lavaggio con soluzione di cloruro d'ammonio diluita, lasciando pieno l'imbuto, che va chiuso con parafilm, e ricoprendo tutta la struttura con fogli di alluminio, a protezione dalla luce.

I campioni raccolti durante le colture batch e che erano conservati a -20°C, non potendo eseguire tutte le analisi immediatamente dopo il prelievo, sono stati rapidamente scongelati di volta in volta, ponendoli in un bagnomaria a 35°C. Considerando che il terreno F(N/10, P/10) contiene circa 2,47 mg/L di azoto e che per restare nella linearità della metodica conviene non discostarsi da una concentrazione di 0,14 mg/L, tenuto conto che almeno nelle prime giornate della coltura batch, le alghe non hanno ancora consumato i nutrienti, si è calcolato l'ammontare di ogni campione da prelevare, per portarlo poi al volume totale di 100 mL. Si è così partiti con un volume di 6 mL portato a 100 mL con acqua marina sintetica per i campioni del giorno zero e del giorno tre; 15 mL per i campioni del giorno sette e del giorno dieci; 20 mL per i campioni del giorno sedici e per quelli delle giornate di raccolta.

A tutti i campioni sono stati aggiunti 2 mL di cloruro d'ammonio concentrato, poi i campioni sono stati fatti passare nella colonna di riduzione, con le modalità già specificate, quindi colorati con SA + NEDA e dosati allo spettrofotometro a 543 nm, annotando, per ogni sessione di lavoro, la loro assorbanza, quella del bianco, quella degli standards corrispondenti e la rispettiva efficienza.

I risultati sono stati espressi in mg/L di azoto nitrico+nitroso secondo la formula:

$$\text{mg/L N-NO}_3 + \text{N-NO}_2 = \frac{(\text{Assorbanza del campione} - \text{Assorbanza del bianco}) \cdot F}{\text{Volume del campione utilizzato}} \times 100$$

(ICRAM, 2001; APAT, 2003).

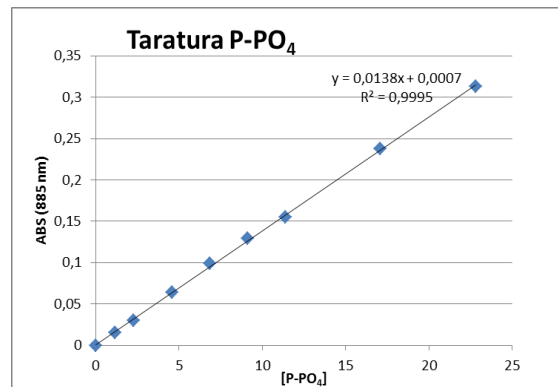
3.9.2 Determinazione del fosforo reattivo

Il fosforo ortofosfato solubile è stato determinato tramite metodo spettrofotometrico al molibdato di ammonio.

In ambiente acido, gli ioni ortofosfato (HPO_4^{2-}) presenti nel campione, reagiscono con lo ione molibdato (MoO_4^{2-}) del molibdato d'ammonio e col tartrato di ossido di antimonio e potassio ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_6$), formando fosfomolibdato di ammonio, un complesso fosfomolibdico eteropoliacido di colore giallo. L'uso di un sale di antimonio trivalente, che entra nell'eteropoliacido in un rapporto di circa 1:1 con il fosforo, induce uno spostamento del massimo di assorbanza verso l'infrarosso e incrementa la velocità di formazione, fungendo da catalizzatore. La presenza nella miscela di reazione di una sostanza riducente fa poi passare il molibdato dal numero di ossidazione 6 al numero di ossidazione 5, formando un complesso fosfomolibdico (blu di molibdeno) di colore blu il cui picco di assorbanza varia a seconda del tipo di riducente adoperato. Avendo effettuato la riduzione a blu di molibdeno con acido ascorbico, l'assorbanza della soluzione acquosa di questo composto è stata misurata alla lunghezza d'onda di 885 nm.

Sono state quindi preparate quattro soluzioni: soluzione 1) 15 g di molibdato d'ammonio $(\text{NH}_4)_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in 500 mL di acqua distillata come reagente; soluzione 2) soluzione acida di acido solforico H_2SO_4 5N; soluzione 3) 27 g di acido ascorbico $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ in 500 mL di acqua distillata come riducente; soluzione 4) 0,34 g di tartrato di potassio e antimonile $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_6$ in 250 mL di acqua distillata come catalizzatore. Poco prima dell'uso, le quattro soluzioni, nell'ordine, sono state mescolate nel rapporto volumetrico di 2:5:2:1 rispettivamente per formare un reattivo misto con cui colorare i campioni per la lettura allo spettrofotometro.

Prima della lettura dei campioni, è stata ricavata la retta di taratura (Fig. 22b), preparando una serie di soluzioni standard di KH_2PO_4 essiccato preventivamente in stufa. Le soluzioni sono state diluite con acqua marina oligotrofica, e non con acqua marina sintetica in quanto tracce di fosforo contenute nei reagenti occorrenti per preparare quest'ultima avrebbero falsato le analisi. Si sono così ottenute concentrazioni comprese tra zero e 22,80 μg di P- PO_4 in 50 mL di acqua di mare oligotrofica, a meno del contenuto in ortofosfati di quest'ultima, che di solito è infinitesimo. Ogni standard da 50 mL è stato colorato con 5 mL di reattivo misto (Fig. 22a) e l'assorbanza è stata letta a 885 nm dopo un'attesa di 10 minuti.



a)

b)

Fig. 22. Soluzioni standard e curva di taratura per la determinazione degli ortofosfati.

Ponendo le concentrazioni in ascissa e le assorbanze in ordinata, tramite calcolo della regressione lineare, si è ottenuta l'equazione della retta di taratura $y = 0,0135x + 0,004$.

Quindi è stata misurata l'assorbanza dei campioni dopo opportune diluizioni con acqua marina oligotrofica (da 20/50mL fino a 50/50 mL, ovvero nessuna diluizione). Il risultato è stato espresso in mg/L di P-PO₄ calcolandolo sulla base dell'equazione ottenuta e tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata. (ICRAM, 2001; APAT, 2003).

3.10 Fluorimetria ad ampiezza di impulsi modulata

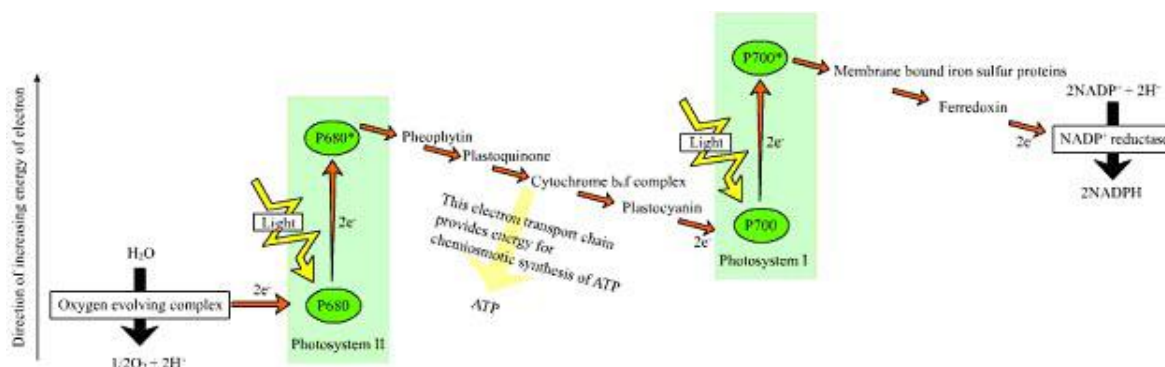


Fig. 23. Schema della fotosintesi.

Presso i laboratori di Ravenna sono state effettuate misure dell'attività fotosintetica tramite fluorimetro ad impulsi modulati (Pulse Amplitude Modulation, PAM) (101 con PDA-100, Walz), che consente di discriminare tra emissioni minime e massime di fluorescenza e stimare indirettamente l'efficienza fotosintetica di un organismo fotoautotrofo (Nardello *et al.*, 2003).

La fotosintesi converte energia luminosa in molecole organiche che vanno a costituire biomassa. Ogni quanto di luce assorbito da una molecola di clorofilla porta un elettrone dallo stato fondamentale a uno stato eccitato (Fig. 23) e il ritorno allo stato fondamentale può avvenire attraverso tre percorsi alternativi in competizione tra loro: la generazione di reazioni fotochimiche, la dissipazione sotto forma di calore o la riemissione a lunghezze d'onda maggiori di quelle dell'energia luminosa assorbita, ovvero la fluorescenza. L'aumento della resa di uno dei tre processi comporta un decremento degli altri due, da qui la base per le analisi in fluorescenza, cioè la misura della resa di questo parametro può fornire informazioni sulle variazioni dell'efficienza fotosintetica. La maggior parte dell'emissione in fluorescenza proviene dalla clorofilla a del fotosistema II (PSII), presente in tutti i fotoautotrofi capaci di fotosintesi ossigenica, mentre la fluorescenza del fotosistema I (PSI) risulta trascurabile. La quantità di energia dissipata come fluorescenza rappresenta solo una piccola percentuale (3-5% in vivo) dell'energia di eccitazione, ma i suoi cambiamenti riflettono comunque variazioni di efficienza nella dissipazione fotochimica e termica, descrivendo l'utilizzo dell'energia da

parte del PSII e degli altri complessi della membrana del tilacoide (Masi; Walker, 1987).

Nel 1931 Kautsky e Hirsh osservarono che, trasferendo organismi fotosintetici dal buio alla luce, l'emissione in fluorescenza mostrava un picco, raggiungendo un massimo in pochi secondi, seguito da una lenta discesa ad uno stato stazionario. Questa fluorescenza transiente, o fluorescenza variabile (F_v), intesa come differenza tra fluorescenza massima del picco (F_m) e fluorescenza iniziale (F_0) è nota come "effetto Kautsky" (Govindjee, 2004) e può essere impiegata per ricavare una stima della produzione primaria. Il picco nell'effetto Kautsky è attribuito alla riduzione dei primi accettori di elettroni del PSII, in particolare del plastochinone Q_A , il quale, a seguito della fotoeccitazione dei centri di reazione del PSII, non può accettare altri elettroni finché non ha trasferito il primo al successivo trasportatore. In questa condizione, il centro di reazione si definisce "chiuso". Quando la maggioranza dei centri di reazione del PSII sono chiusi, l'efficienza fotochimica diminuisce e aumenta la resa in fluorescenza; viceversa, un'alta percentuale di centri di reazione "aperti" implica che il percorso principale di diseccitazione della clorofilla avviene attraverso il trasporto degli elettroni. La fase di lenta decrescita nell'effetto Kautsky viene attribuita a due fattori: una ripresa nel trasporto degli elettroni (*quenching* fotochimico) e un aumento della dissipazione dell'energia in calore (*quenching* non fotochimico). La metodica analitica è di utilità quando è in grado di distinguere questi due fenomeni.

In una tipica misura, 3 mL di coltura algale vengono messi nella cuvetta del fluorimetro, dopo aver atteso in oscurità almeno 20 minuti. Un primo impulso consente di determinare l'intensità di fluorescenza con i centri di reazione aperti (F_0), quindi lo strumento fornisce un flash di luce saturante facendo salire la fluorescenza da F_0 a F_m , condizione in cui Q_A , il primo accettore di elettroni del PSII, è completamente ridotto. La differenza tra F_m e F_0 fornisce la fluorescenza variabile F_v ; il rapporto F_v/F_m stima l'efficienza massima della fotochimica primaria del PSII. Un valore basso di questo parametro indica fotoinibizione, ovvero una parte dei centri di reazione del PSII è danneggiata da condizioni di stress.

Applicando poi una illuminazione costante, si ottiene un aumento transitorio della resa della fluorescenza, dovuto a una fase di latenza prima dell'inizio della fissazione del carbonio, quando una frazione sostanziale di accettori Q_A

risulta ridotta durante i primi secondi di illuminazione. In seguito la resa di fluorescenza diminuisce a causa dei processi di dissipazione termica e fotochimica, raggiungendo un valore di stato stazionario (F_t). Quando si applica un secondo flash di luce saturante, in presenza di luce attinica, che fornisce cioè uno spettro di lunghezze d'onda utilizzabili dagli organismi fotosintetici, si ottiene un massimo di fluorescenza F_m' più basso del F_m osservato al buio. Siccome in F_m' Q_A è di nuovo completamente ridotto, la differenza ($F_m' - F_t$) riflette la parte fotochimica del *quenching* di fluorescenza, mentre ($F_m - F_m'$) riflette la parte non fotochimica, dovuta a dissipazioni termiche. Partendo da questi dati, si possono ottenere numerosi parametri:

- *quenching* fotochimico $qP = (F_m' - F_t) / (F_m' - F_0)$, che riflette lo stato redox di Q_A ;
- *quenching* non fotochimico $qN = (F_m - F_m') / (F_m - F_0)$, o anche NPQ = $(F_m - F_m') / F_m'$, che riflette l'energia dissipata come calore;
- efficienza del fotosistema II $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_t) / F_m'$; questo rendimento quantico effettivo del PSII diminuisce proporzionalmente alla saturazione progressiva della fotosintesi sotto l'effetto dell'aumento di luminosità.
- efficienza massima potenziale dei centri di reazione aperti $(F_m - F_0) / F_m$, Yield massimo o massima resa quantica del fotosistema II, cioè rapporto di fluorescenza variabile su fluorescenza massima; la coltura è in buone condizioni se mostra un valore attorno a 0,7 per questo parametro, con variazioni da 0,4 a 0,8 nelle varie classi di fitoplancton.

Per riassumere, dopo l'accensione della luce di misurazione dello strumento, che consente di misurare il livello minimo di fluorescenza in stato di adattamento al buio, viene applicato un lampo di luce saturante che consente la misura della fluorescenza massima nello stato di adattamento al buio. Quindi viene accesa la luce attinica e si fornisce una serie altri impulsi di luce saturante ad intervalli regolari, da ognuno dei quali può essere misurato un valore di fluorescenza massima nello stato di adattamento alla luce. Immediatamente prima di ogni flash si può misurare la fluorescenza costante (F_t) (Fig. 24). Spegnendo la luce attinica subito dopo un flash e fornendo contemporaneamente una luce nel rosso lontano

($\lambda > 690$ nm), si può ottenere la misurazione del livello minimo di fluorescenza nello stato di adattamento alla luce.

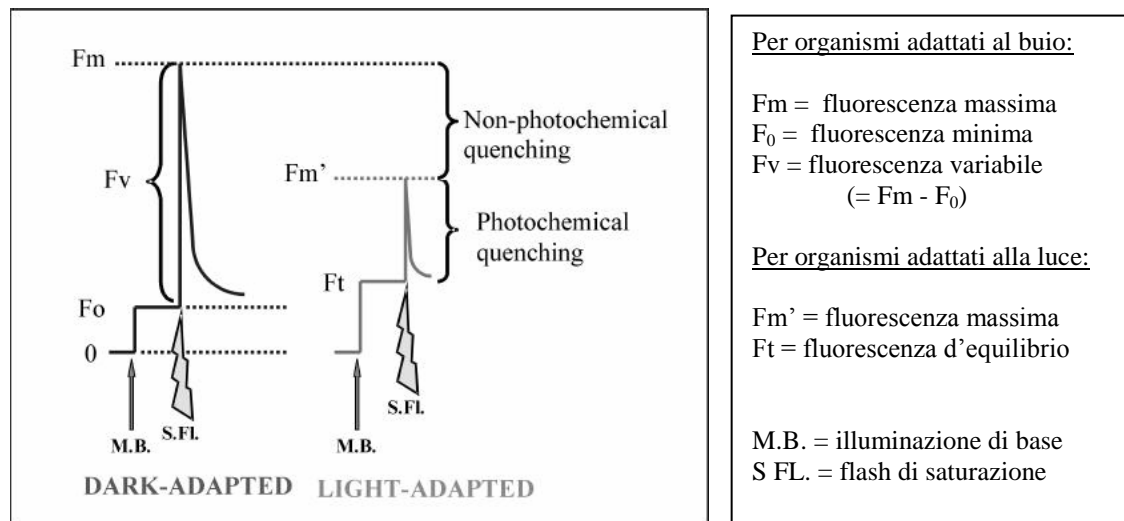


Fig. 24. Parametri di fluorescenza ottenuti col metodo degli impulsi di saturazione (da Woch, 2006, modificata).

L'emissione di fluorescenza della clorofilla a è acquisita tramite una camera CCD (Charge Coupled Device), un particolare sensore che cattura le immagini di fluorescenza, che vengono poi digitalizzate e trasferite al computer. L'utilizzo di un apposito software (WinControl) consente il settaggio dei parametri e la registrazione ed elaborazione dei dati.

Sono state utilizzate due procedure analitiche: la prima, detta *light curve* (LC), consiste nell'aumentare progressivamente la luce attinica a cui le alghe sono esposte ed emettere un impulso saturante ogni minuto per 9 volte: i valori della fluorescenza variabile determinati in ogni ciclo di misurazione consentono di ottenere parametri fotosintetici delle curve P-E; la seconda, detta *induction curve* (IC), effettua una misura preventiva del rendimento in assenza di luce attinica, che in seguito è mantenuta costante a $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mentre viene emesso un flash saturante ($3000 \mu\text{mol di fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ogni minuto per 14 volte. Durante questo periodo, la coltura dovrebbe raggiungere un valore di rendimento in fluorescenza costante, proporzionale all'efficienza di fissazione fotosintetica del carbonio.

Lo strumento, tramite i report del programma WinControl, restituisce valori di Ft, Fm', F₀' qP, qN, NPQ, dei rendimenti effettivi del PSII (Y, yield), delle radiazioni disponibili per effettuare la fotosintesi applicate o

PAR ($\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e dei tassi di trasporto elettronico relativo o ETR ($\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$), da cui si può individuare il massimo tasso fotosintetico (ETR_{max} o P_{max}).

In una *light curve* lo strumento visualizza le curve P-E (chiamate anche P-I) mettendo in relazione il tasso fotosintetico P (ETR) con l'intensità luminosa E (PAR), assieme all'andamento decrescente dello yield (Fig. 25).

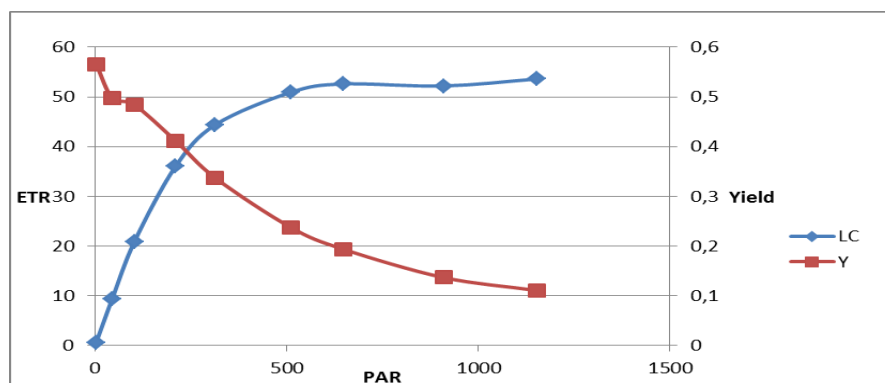


Fig. 25. Esempio di una *light curve* eseguita con fluorimetro PAM.

Una successiva elaborazione tramite il programma Excel consente di disegnare le curve in modo permanente e di calcolare parametri quali la pendenza della curva (α) nella sua parte lineare, data al rapporto tra tasso di fotosintesi, inteso come tasso di trasporto elettronico, e la radiazione disponibile per la fotosintesi, secondo l'equazione $\alpha = \text{ETR} / \text{PAR}$, e l'intensità luminosa a cui avviene la saturazione (E_k), mediante il rapporto tra il massimo tasso fotosintetico (P_{max}) e la pendenza della curva (α), secondo la formula $\text{E}_k = \text{P}_{\text{max}} / \alpha$. Quest'ultimo valore rappresenta l'irradianza ottimale, ovvero l'intensità luminosa a cui avviene la saturazione.

Sono state elaborate le letture al fluorimetro PAM di campioni di colture di *O. ovata* e *P. lima* nella fase esponenziale e nel giorno della raccolta.

3.11 Conteggi e misure

3.11.1 Conteggi

I conteggi sono stati effettuati al microscopio rovesciato secondo la metodica di Utermöhl (UNI EN 15204, 2006). In breve, i campioni vengono agitati delicatamente per ottenere una densità il più possibile omogenea; nel pozzetto di sedimentazione se ne colloca una quantità pari a 1 mL e si attende un tempo opportuno affinché le cellule si depositino sul fondo del pozzetto. Dopo una prima osservazione a basso ingrandimento per controllare la distribuzione delle cellule e l'eventuale presenza di aggregati, si passa all'ingrandimento maggiore (320x e 400x) e si contano le cellule che compaiono in un certo numero di transetti di lunghezza pari al diametro della camera di sedimentazione e di larghezza pari al diametro del campo visivo. Ogni transetto passa per il centro del pozzetto di sedimentazione. La densità cellulare viene espressa in cellule/litro o cellule per mL (Fiocca e Vadrucci, 2009) secondo la formula:

$$\text{Densità cellulare (cell/litro)} = (\text{Numero totale delle cellule lette} * \pi * \text{raggio della camera di sedimentazione in mm} * 1000) / (2 * \text{diametro del campo visivo in mm} * \text{volume del campione in mL} * \text{numero dei transetti})$$

In pratica si moltiplica la media delle letture dei transetti per un fattore di conversione che dipende dalle caratteristiche del microscopio.

Prima della lettura al microscopio, i campioni provenienti da colture di *O. ovata* e da colture miste sono stati fissati con 8 µL di HCl 1M per ogni mL di campione allo scopo di eliminare gli aggregati (Guerrini *et al.*, 2010), mentre i campioni provenienti da colture di *P. lima* sono stati fissati con una soluzione di Lugol all'1% (Thronsen, 1978). Le osservazioni sono state effettuate tramite microscopio rovesciato Zeiss Axiovert 100 a 320 ingrandimenti (Sede di Ravenna) e microscopio rovesciato Nikon Eclipse TS 100 a 400 ingrandimenti (sede di Ozzano dell'Emilia).

3.11.2 Calcolo del tasso di crescita

I conteggi cellulari di *O. ovata* sono stati eseguiti per i giorni di coltura 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 16 e 21.

I conteggi cellulari di *P. lima* sono stati eseguiti per i giorni di coltura 0, 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11, 16 e 23.

I conteggi cellulari della coltura bispecie sono stati eseguiti per i giorni di coltura 0, 2, 3, 7, 9, 16 e 22.

Inoltre, per le colture miste, sono state effettuate osservazioni e conteggi proporzionali per le giornate di coltura 8, 14 e 16.

Sulla base delle curve di densità cellulare derivate dai conteggi, individuando due punti nella fase esponenziale, si è calcolato il tasso di crescita μ in giorni⁻¹ secondo l'equazione:

$$\mu = \ln N_1 \text{ (densità al tempo } t_1) - \ln N_0 \text{ (densità al tempo } t_0) / t_1 - t_0$$

3.11.3 Calcolo dei biovolumi

Le misure per il calcolo dei volumi cellulari sono state eseguite nella settima giornata di coltura e nel giorno della raccolta, tramite software per analisi d'immagine (Nis Elements BR 2.20) e fotocamera digitale collegata al microscopio rovesciato. La forma delle cellule è stata approssimata a quella di un ellissoide (Sun and Liu, 2003), solido geometrico caratterizzato da tre assi di diversa lunghezza, il cui volume si calcola secondo la formula:

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

Sono quindi state registrate serie di misure del diametro dorso-ventrale (a), della larghezza (b) e del diametro antero-posteriore (c) (Fig. 26), quando possibile, e per ogni parametro si è calcolata media e deviazione standard. *O. ovata*, in particolare, ha mostrato molta variabilità nella forma e soprattutto nelle dimensioni, così le cellule sono state classificate in due classi di taglia, cellule grandi e cellule piccole, considerando un diametro dorso-ventrale di circa 40 μm come confine tra le due taglie.

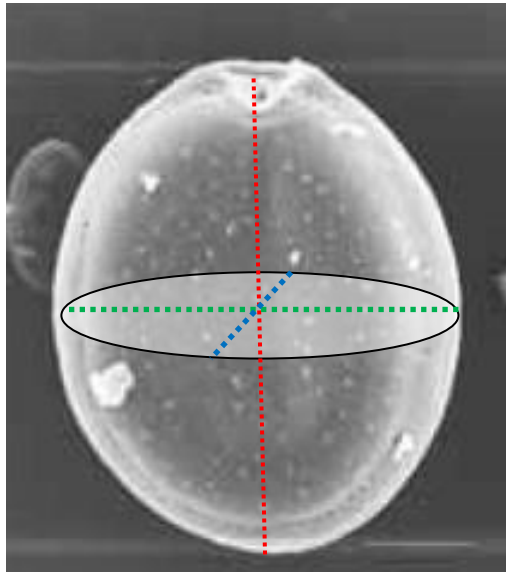


Fig. 26. I tre assi dell'ellissoide cui si approssima la forma di una microalga del tipo di *O. ovata* o *P. lima* per il calcolo del biovolume. Linea rossa = diametro dorso-ventrale; linea verde = larghezza; linea blu = diametro antero-posteriore.

Le medie delle misure per ogni trattamento e per ogni tipo di cellule e classe di taglia, prese nella settima giornata di coltura e nel giorno della raccolta, hanno permesso di calcolare biovolumi medi, che sono stati rapportati alle abbondanze cellulari nelle due fasi della coltura, consentendo di esprimere la misura della biomassa come biovolume per litro.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Osservazioni al microscopio ottico – Forma e dimensione

Durante le osservazioni al microscopio ottico delle monoculture e delle colture miste, si è visto che, mentre *P. lima* mostra forme e dimensioni sempre piuttosto costanti, *O. ovata* esibisce un'ampia gamma di morfologie e morfometrie. In particolare si riscontra sempre una certa percentuale di cellule molto piccole, e per questo motivo le cellule sono state suddivise in due classi, considerando piccole le cellule con diametro dorso-ventrale inferiore a 40 μm e classificando le altre in un'unica categoria, che ha incluso anche cellule “giganti” in quanto, dopo i 40 μm non si è potuta delineare una soluzione di continuità tra la gamma di misure. Si sono osservate anche forme rotonde o frastagliate (Fig. 27).



Fig. 27. Alcune osservazioni di *O. ovata* e *P. lima* (400x).

La percentuale di forme di *O. ovata* con DV inferiore a 40 μm sul numero totale di cellule ha mostrato, sia nelle monoculture che nelle colture miste, il valore minimo nel trattamento a 20°C, dove la presenza di cellule piccole è

risultata inferiore al 20% sia nella fase esponenziale, rappresentata dalla settima giornata di coltura, che nella fase stazionaria, rappresentata dal giorno della raccolta. La massima presenza di forme piccole si è osservata nel trattamento a 25°C del settimo giorno di coltura, sia per le colture monospecie che per le colture miste, dove la percentuale di cellule piccole ha raggiunto e superato il 30%. Negli altri casi la percentuale di cellule piccole ha costituito il 20-23% della popolazione, tranne che nella coltura mista a 30°C del settimo giorno, dove si è osservato il rapporto classico di 70:30 riportato in letteratura (Vanucci *et al.*, 2012) (Fig. 28).

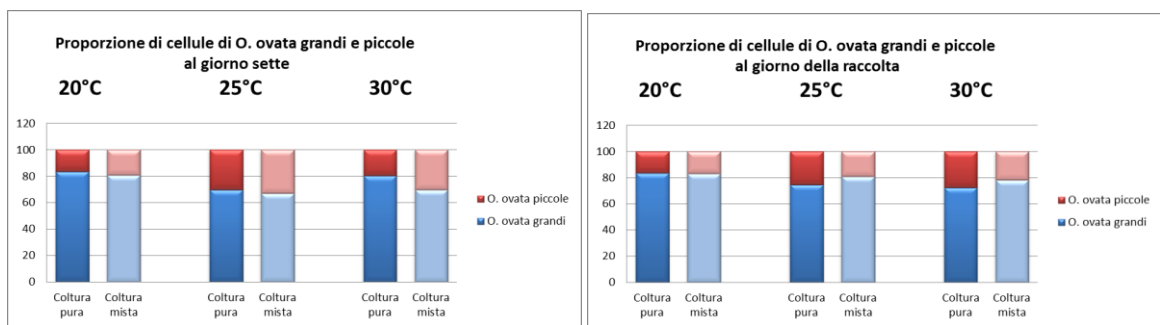


Fig. 28. Percentuali delle forme piccole e grandi di *O. ovata* nelle colture pure e nelle colture miste nei tre trattamenti.

La comparsa di forme di *O. ovata* di piccole dimensioni è un fenomeno frequentemente riscontrato sia nelle colture che in ambienti naturali. In questi ultimi, cellule più piccole si ritrovano in siti protetti, piuttosto che in siti ad alto regime idrodinamico e si osservano quando molte cellule si trovano nella fase di crescita esponenziale (Accoroni *et al.*, 2010). Dimensioni cellulari più piccole possono facilitare l'assorbimento dei nutrienti e sembrano legate a condizioni che permettono una proliferazione intensa. Potrebbe altresì trattarsi di una forma particolare del ciclo vitale, ma le conoscenze attuali non permettono ancora di fornire delle risposte.

L'intervallo di dimensioni sia del diametro dorso-ventrale (DV) che della larghezza (W) rilevato nelle osservazioni di *O. ovata* mostra un'ampia variabilità a tutte le temperature di coltivazione e in tutte le fasi della curva di crescita, in accordo con osservazioni precedenti (Accoroni *et al.*, 2010; Vanucci *et al.*, 2012), mentre le dimensioni delle cellule di *P. lima* si discostano poco tra loro, come illustrato nelle rappresentazioni grafiche di

misure del diametro dorso-ventrale di cellule in coltura pura e in coltura mista nel giorno della raccolta (Figg. 29 e 30).

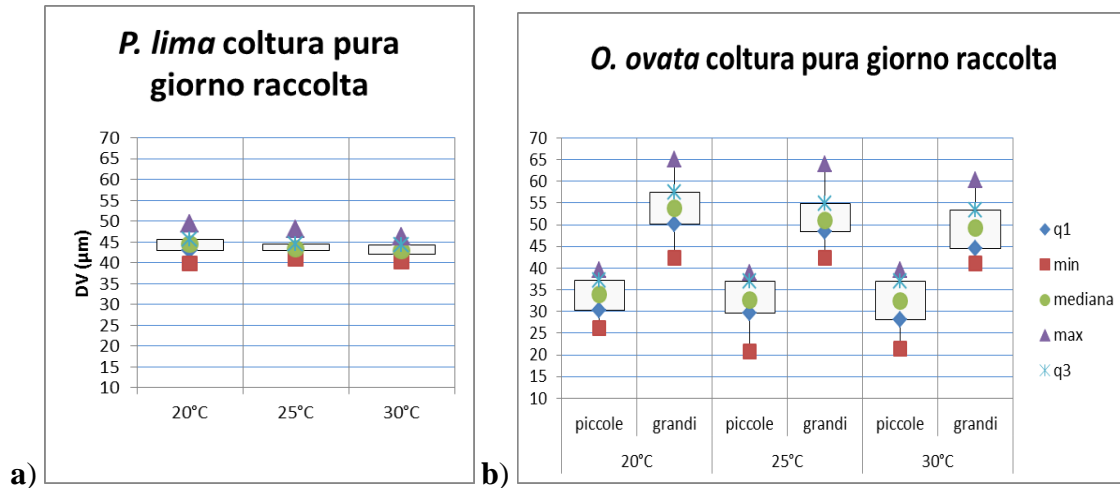


Fig. 29. Rappresentazioni grafiche di misure del diametro dorso-ventrale (DV, µm) di cellule di *P. lima* (a; n. oss. = 88) e di *O. ovata* (b; n. oss. = 187) delle colture pure nel giorno della raccolta.

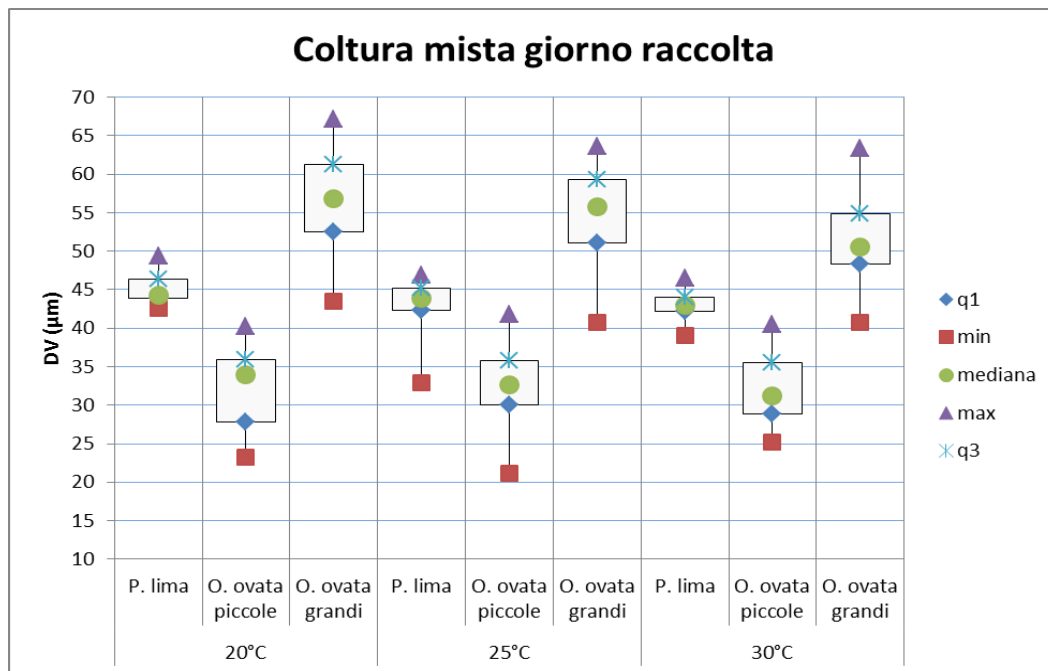


Fig. 30. Rappresentazioni grafiche di misure del diametro dorso-ventrale (DV, µm) di cellule di *P. lima* e di *O. ovata* delle colture miste nel giorno della raccolta (n. oss. = 298).

Osservando le medie delle misure dei diametri dorso-ventrali delle cellule in tutti i trattamenti e nelle fasi esponenziale e stazionaria, come riportato in

Tab. 5 assieme ai rispettivi intervalli di confidenza, si nota una generale tendenza alla diminuzione delle dimensioni cellulari all'aumentare della temperatura.

<i>P. lima</i> diametri DV medi (μm)		20°C	25°C	30°C
Giorno sette	In coltura pura	41,30 \pm 0,60*	41,09 \pm 0,69	40,87 \pm 1,38
	In coltura mista	41,62 \pm 0,55	41,54 \pm 1,02	40,44 \pm 0,87
Giorno raccolta	In coltura pura	44,38 \pm 1,16	43,83 \pm 0,87	43,08 \pm 0,58
	In coltura mista	44,89 \pm 0,90	43,31 \pm 1,85	42,94 \pm 0,92

<i>O. ovata piccole</i> diametri DV medi (μm)		20°C	25°C	30°C
Giorno sette	In coltura pura	33,15 \pm 3,66	30,64 \pm 5,15	31,59 \pm 4,25
	In coltura mista	32,94 \pm 2,58	31,45 \pm 2,46	32,00 \pm 1,94
Giorno raccolta	In coltura pura	33,74 \pm 2,00	32,48 \pm 2,12	32,33 \pm 2,59
	In coltura mista	32,33 \pm 2,39	32,05 \pm 2,15	31,83 \pm 1,76

<i>O. ovata grandi</i> diametri DV medi (μm)		20°C	25°C	30°C
Giorno sette	In coltura pura	48,25 \pm 1,92	45,63 \pm 2,94	46,28 \pm 2,66
	In coltura mista	49,94 \pm 2,18	50,94 \pm 2,25	49,52 \pm 2,54
Giorno raccolta	In coltura pura	54,16 \pm 2,47	51,45 \pm 2,02	48,91 \pm 2,48
	In coltura mista	56,25 \pm 2,61	54,82 \pm 2,05	51,38 \pm 2,19

Tab. 5. Medie e limiti fiduciali (alla probabilità del 99%) di misure del diametro dorso-ventrale (DV, μm) in colture pure e miste nel giorno sette e nel giorno della raccolta alle diverse temperature (n. tot. oss. = 877).

Nelle cellule di *P. lima*, tale tendenza porta a una differenza nelle dimensioni non statisticamente significativa tra i 20°C ed i 25°C di ogni trattamento e in ogni fase di crescita, mentre risulta significativa ($0,01 < p < 0,05$) o altamente significativa ($p < 0,01$) tra i 20°C e i 30°C, soprattutto nelle cellule in coltura mista. La differenza tra le dimensioni del giorno sette e quelle del giorno della raccolta risulta sempre significativa o altamente significativa, con dimensioni minori nel primo e maggiori nell'ultimo, ciò che potrebbe essere in accordo con la minore capacità di divisione delle cellule. Per le cellule di *P. lima* non emergono differenze significative fra le medie delle misure riscontrate in trattamenti analoghi nelle colture pure e nelle colture miste. Anche nelle

cellule piccole di *O. ovata*, non si osservano differenze significative tra colture pure e colture miste, e nemmeno tra le diverse temperature e tra le due fasi del ciclo di crescita. La tendenza alla riduzione del diametro-dorso-ventrale con l'aumento della temperatura si osserva anche nelle cellule grandi di *O. ovata*, con differenze significative tra i 25°C e i 30°C. Anche in questo caso si osservano cellule di dimensioni maggiori nella fase stazionaria rispetto a quella esponenziale. Inoltre si osservano cellule di dimensioni maggiori nelle colture miste, rispetto agli analoghi trattamenti nelle colture pure, con differenze che diventano anche altamente significative ($p < 0,01$) soprattutto alla temperatura di 25°C.

Relativamente alle altre due dimensioni delle cellule, quindi alla larghezza (W) e al diametro antero-posteriore (AP), *P. lima* ha presentato un rapporto tra la larghezza e il diametro dorso-ventrale (W/DV) sempre piuttosto costante in tutti i trattamenti e in tutte le fasi dell'esperimento e corrispondente a 0,72-0,73. Per *O. ovata* si è riscontrata una variabilità di questo rapporto, con differenze tra le cellule grandi e le cellule piccole e con valori di W/DV compresi tra 0,69 e 0,75. Il diametro antero-posteriore (AP) è una misura più difficile da reperire, in quanto le cellule, sedimentando, tendono a posarsi sulla parte più larga, piuttosto che di taglio. Solitamente, come terza dimensione per i calcoli dei biovolumi viene utilizzata la media della serie di misure dei diametri antero-posteriori che si riescono a reperire, applicandola poi ad ogni cellula, indipendentemente dal suo diametro dorso-ventrale e dalla sua larghezza (Guerrini *et al.*, 2010; Pezsolesi *et al.*, 2012; Vanucci *et al.*, 2012). In questo studio viene proposto di utilizzare, al posto di tale media di misure singole, una media di rapporti AP/DV, ottenuti registrando anche il diametro dorso-ventrale delle cellule di cui si può reperire la dimensione antero-posteriore. In questo modo si può ottenere un indice da applicare ad ogni diametro dorso-ventrale misurato, contestualmente ad ogni specie e ad ogni trattamento, riducendo l'errore di stima. Sono stati applicati rapporti AP/DV di $0,40 \pm 0,03$ per *O. ovata* e $0,37 \pm 0,03$ per *P. lima* per il calcolo dei biovolumi medi. I risultati sono illustrati nelle Figg. 31, 32 e 33.

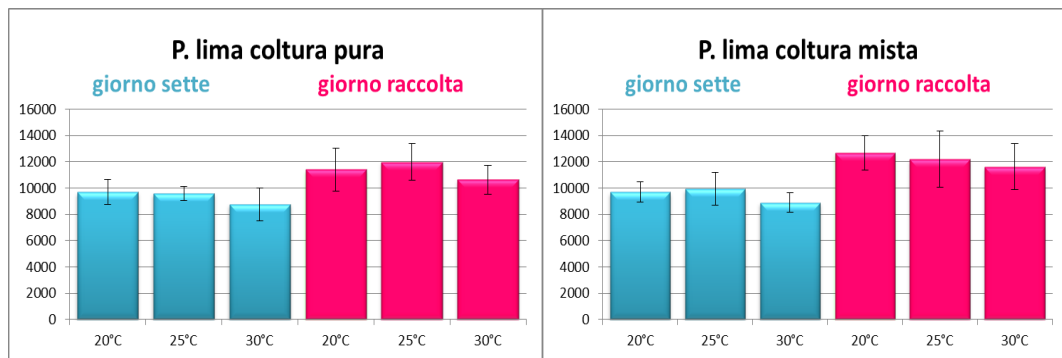


Fig. 31. Biovolumi medi (μm^3) di cellule di *P. lima* nelle colture pure e miste nel settimo giorno e nel giorno della raccolta.

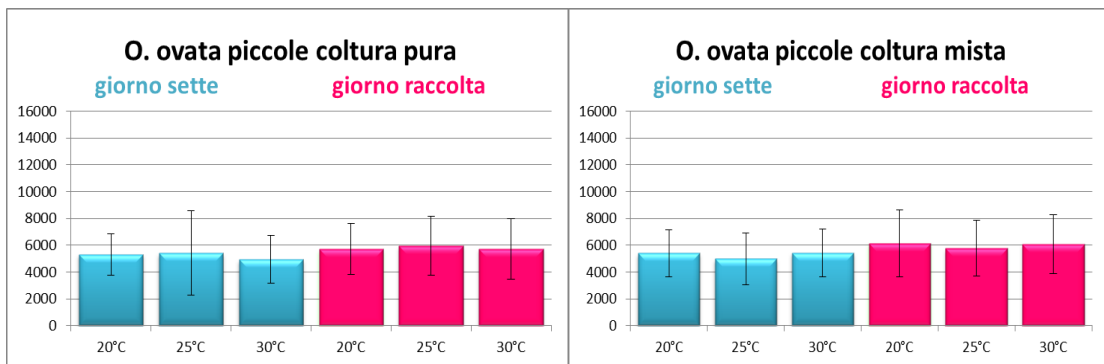


Fig. 32. Biovolumi medi (μm^3) delle cellule piccole di *O. ovata* ($DV < 40 \mu\text{m}$) nelle colture pure e miste nel settimo giorno e nel giorno della raccolta.

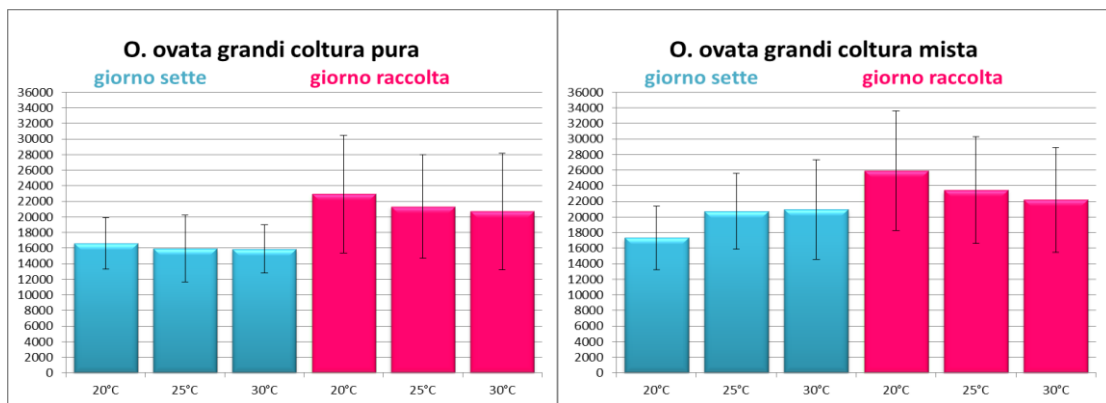


Fig. 33. Biovolumi medi (μm^3) delle cellule grandi di *O. ovata* ($DV > 40 \mu\text{m}$) nelle colture pure e miste nel settimo giorno e nel giorno della raccolta.

Anche per i biovolumi, le differenze fra trattamenti, fra colture pure e miste e tra fasi di crescita richiamano gli andamenti mostrati nei diametri dorso-

ventrali, con dimensioni significativamente più grandi nell'ultimo stadio di crescita rispetto alla fase esponenziale, e con una tendenza alla diminuzione del volume all'aumento della temperatura.

La stima del biovolume delle alghe può fornire molte informazioni. In ambiente naturale, il volume delle cellule algali può variare secondo le stagioni, la latitudine o il tipo di ambiente. Non è detto che densità e biovolume corrispondano una all'altra, potendosi avere cellule molto piccole a densità elevata e cellule grandi a densità scarsa. Le due grandezze forniscono informazioni complementari e associandole si può tentare una stima della biomassa. Utilizzando il numero totale delle cellule registrato il giorno della raccolta e trasformando il biovolume medio (V ; μm^3) dell'ultimo giorno di coltura in peso (nanogrammi) secondo l'equazione (Fiocca e Vadrucci, 2009):

$$\text{Peso (ng)} = (V * 1,03)/1000$$

si è stimata la biomassa (ng/cm^3) finale prodotta da ogni classe di cellule dopo ogni trattamento. I risultati sono riportati in Tab. 6.

	Media cell/mL	Dev. St.	Errore relativo	Biovolume medio (μm^3)	Dev. St.	Trasf. In ng	Delta X	Errore relativo	Biomassa ng/cm ³	Errore relativo associato
Colture pure										
<i>O. ovata grandi</i>										
20°C	5655	549	0,097	22934	7549	23,622	7,775	0,329	133582,523	0,426
25°C	6338	626	0,099	21342	6637	21,982	6,836	0,311	139323,564	0,410
30°C	3255	606	0,186	20704	7437	21,325	7,660	0,359	69413,266	0,545
<i>O. ovata piccole</i>										
20°C	1101	148	0,134	5707	1896	5,878	1,953	0,332	6471,909	0,467
25°C	2143	512	0,239	5948	2212	6,126	2,278	0,372	13128,961	0,611
30°C	1236	431	0,349	5722	2234	5,894	2,301	0,390	7284,564	0,739
<i>P. Lima</i>										
20°C	6262	612	0,098	11411	1628	11,753	1,677	0,143	73599,352	0,240
25°C	5319	501	0,054	11978	1411	12,337	1,453	0,118	65622,311	0,212
30°C	5252	478	0,091	10627	1098	10,946	1,131	0,103	57487,394	0,194
Colture miste										
<i>O. ovata grandi</i>										
20°C	4914	1210	0,246	25950	7660	26,729	7,890	0,295	131343,849	0,541
25°C	5284	900	0,170	23433	6825	24,136	7,030	0,291	127534,571	0,462
30°C	3219	599	0,186	22182	6694	22,847	6,895	0,302	73545,974	0,488
<i>O. ovata piccole</i>										
20°C	998	228	0,228	6145	2480	6,329	2,554	0,404	6316,691	0,632
25°C	1240	239	0,193	5755	2081	5,928	2,143	0,362	7350,286	0,554
30°C	903	170	0,188	6078	2219	6,260	2,286	0,365	5653,087	0,553
<i>P. Lima</i>										
20°C	1617	218	0,135	12676	1313	13,056	1,352	0,104	21112,005	0,238
25°C	1301	156	0,120	12177	2137	12,542	2,201	0,175	16317,545	0,295
30°C	791	204	0,258	11601	1754	11,949	1,807	0,151	9451,683	0,409

Tab. 6. Riepilogo dei dati relativi al numero finale di cellule (cell/mL), al biovolume medio (μm^3) e alla stima della biomassa finale (ng/cm³) prodotta da ogni classe di cellule dopo ogni trattamento, ed errore relativo associato.

La biomassa di *P. lima* nelle colture miste è molto inferiore a quella delle colture pure, soprattutto a 30°C. Tranne che nella coltura a 30°C, la biomassa complessiva delle forme grandi e piccole di *O. ovata* nelle colture miste produce una biomassa leggermente inferiore rispetto a quella prodotta nelle pure. Rispetto a *P. lima*, *O. ovata* si dimostra miglior produttrice di biomassa.

4.2 Curve e tassi di crescita

L'andamento della densità cellulare in funzione del tempo segue una curva tipica, nella quale si distinguono quattro fasi: fase di latenza (*lag*), fase esponenziale (*log*), fase stazionaria e fase di declino. Nel modello di crescita di una popolazione con dinamica continua il parametro malthusiano r , o tasso di crescita istantaneo, è proporzionale alla variazione della numerosità degli individui nel tempo, secondo l'equazione differenziale $dN/dt = rN$. La crescita però non può avvenire indefinitamente, in quanto la popolazione va incontro a limitazione delle risorse, sia in natura sia in una coltura batch, dove non vengono più aggiunti nutrienti dopo l'inoculo. Per tener conto di ciò, nel modello di crescita logistica il secondo membro dell'equazione viene corretto moltiplicandolo per un fattore che considera la capacità portante dell'ambiente K , parametro delle stesse dimensioni di N (nel nostro caso cellule/mL), ottenendo:

$$dN/dt = r \frac{(K-N)}{K} N$$

Integrando questa equazione e tracciando il grafico di N in funzione del tempo, si ottiene una sigmoide, detta curva logistica di crescita, ove il livello di crescita ottimale si trova a $\frac{1}{2} K$ e dove nel punto $N = K$ non si osserva più alcuna crescita della dimensione della popolazione.

Sono state effettuate misure della densità cellulare delle colture nel tempo, tramite conteggi al microscopio eseguiti "a doppio cieco" da più operatori e utilizzando i valori medi si sono costruite le seguenti curve di crescita delle monoculture e delle colture miste (Fig. 34 e 35). I prelievi sono stati più frequenti nella fase esponenziale e si sono diradati nella fase stazionaria, dove i cambiamenti di densità sono minori.

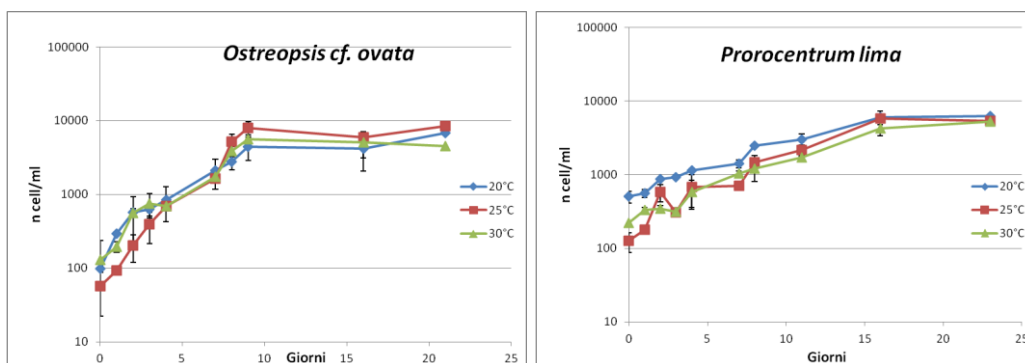


Fig. 34. Curve di crescita di *O. ovata* e *P. lima* a 20°C, 25°C e 30°C nelle monoculture.

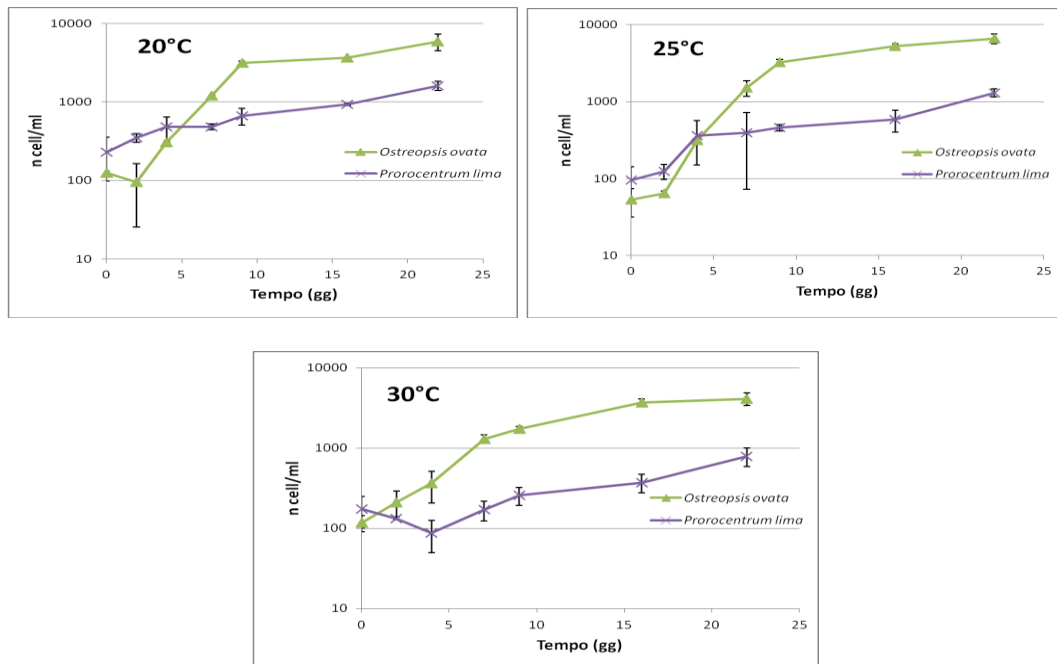


Fig. 35. Curve di crescita di *O. ovata* e *P. lima* a 20°C, 25°C e 30°C nelle colture miste.

O. ovata mostra una *log* fase più veloce e una crescita maggiore rispetto a *P. lima*, però raggiunge la fase stazionaria più rapidamente. La fase esponenziale di *P. lima* non può dirsi completamente esaurita in nessuno dei trattamenti. La coltura pura di *O. ovata* a 25°C, pur essendo partita con una densità di cellule inferiore, ha raggiunto e superato le densità delle colture esposte alle altre temperature.

Nella fase esponenziale non agisce ancora la limitazione di nutrienti, quindi si può calcolare la velocità di crescita istantanea tramite il modello malthusiano per popolazioni a dinamica riproduttiva continua $dN/dt = rN$, dal quale, integrando ($N_t = N_0 \cdot e^{rt}$) e passando ai logaritmi naturali si ricava r come coefficiente angolare dell'equazione lineare: $\ln N_t = rt + \ln N_0$.

In coltura, quando le perdite sono minime, al posto del tasso specifico di crescita (r), si usa la velocità di riproduzione (μ).

Tramite l'equazione:
$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / t - t_0$$

prendendo un intervallo temporale nelle fasi esponenziali delle curve di crescita, sono stati calcolati i seguenti tassi di crescita (Tab. 7).

Tassi di crescita

MONOCOLTURE		COLTURE MISTE	
<i>O. ovata</i>		<i>O. ovata</i>	
20°C	0,33	20°C	0,49
25°C	0,47	25°C	0,56
30°C	0,36	30°C	0,34
<i>P. lima</i>		<i>P. lima</i>	
20°C	0,21	20°C	0,19
25°C	0,30	25°C	0,23
30°C	0,22	30°C	0,10

Tab. 7. Tassi di crescita calcolati sulla base delle curve di crescita generate dai conteggi.

I valori sono nel *range* già riportato per *O. ovata* (Pistocchi *et al.*, 2011; Pezzolesi *et al.*, 2012; Vanucci *et al.*, 2012) e non si riscontrano differenze sostanziali tra i valori ottenuti per le monoculture e quelli delle colture miste. *P. lima* presenta tassi di crescita inferiori nelle colture miste rispetto alle monoculture.

La crescita delle cellule è l'unità base della crescita della popolazione e, nel complesso, della comunità. Essa è controllata sia da fattori genetici che ambientali, in particolare dall'irradianza e dal livello di nutrienti. L'espansione della popolazione è dovuta certamente alla divisione delle singole cellule, ma anche a una bassa pressione di *grazing* e/o ad accumulo fisico, in quanto comunemente si assume che le specie che causano fioriture dannose abbiano una crescita relativamente lenta, e ciò viene attribuito a una minore capacità fotosintetica per unità di biomassa (Tang, 1995). La letteratura classica riporta, per le dinoflagellate, una velocità di crescita di circa 0,21 d⁻¹, che corrisponde a 0,3 divisioni al giorno ($k = r/\ln 2$ d⁻¹) e quindi a un tempo di duplicazione di circa 3 giorni (1/k). Altri esperimenti riportano che alcune dinoflagellate sono capaci di uno sviluppo molto più veloce e che le loro fioriture tossiche occorrono in seguito a un periodo di rapida crescita cellulare, indipendentemente dall'accumulo fisico o dal controllo da parte di predatori (Smayda, 1997).

I diagrammi di Fig. 36 rappresentano la composizione delle popolazioni miste nel settimo giorno di coltura e nel giorno della raccolta, alle tre temperature applicate.

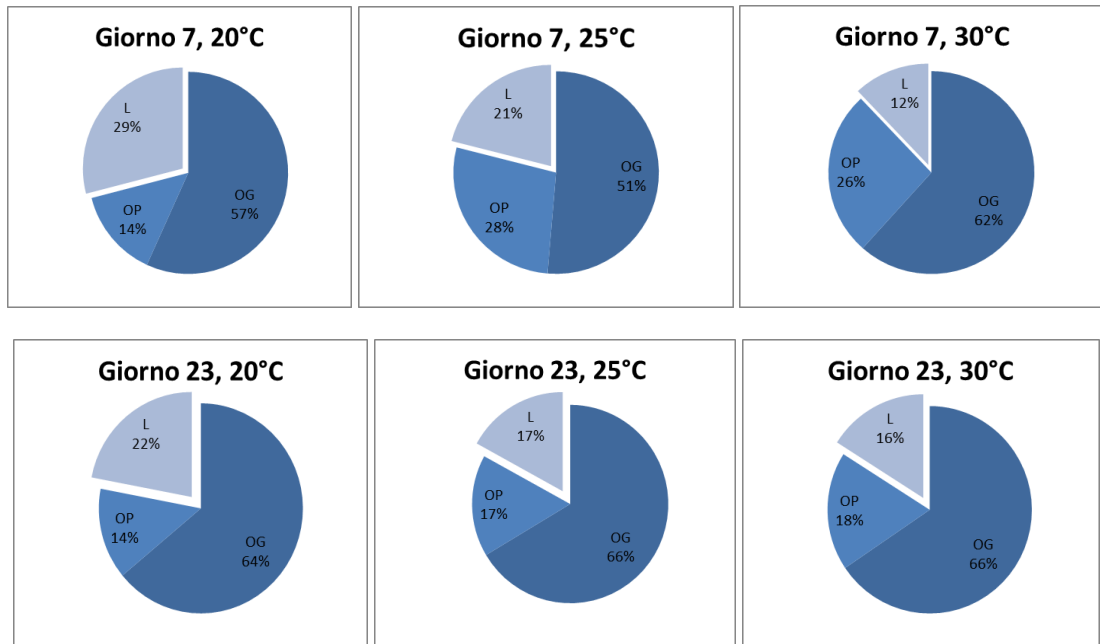


Fig. 36. Composizione delle popolazioni miste nel settimo giorno di coltura e nel giorno della raccolta (OP = *O. ovata*, forme piccole; OG = *O. ovata*, forme grandi; L = *P. lima*).

La preponderanza di cellule di *O. ovata* su *P. lima* è evidente in tutti e tre i trattamenti, ma soprattutto a 30°C e la componente più abbondante di forme piccole si trova nella fase esponenziale del trattamento a 25°C. Nei grafici successivi, dove le forme grandi e piccole di *O. ovata* sono state rappresentate assieme, si evidenzia un rapido incremento della densità cellulare di questa microalga, soprattutto tra la quarta e la settima giornata di coltura, mentre nelle ultime giornate dell'esperimento la densità percentuale mostra una piccola flessione, associata ad un lieve recupero nella densità di cellule di *P. lima* (Fig. 37).

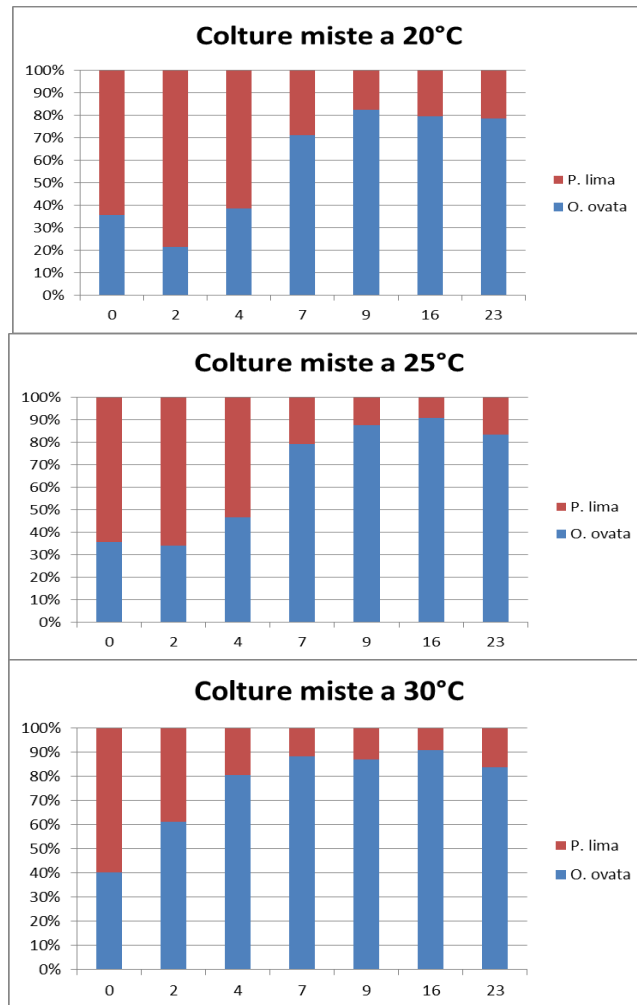


Fig. 37. Proporzioe *O. ovata*/*P. lima* nelle colture miste

4.3 Utilizzo dei nutrienti

Le fioriture si manifestano ad entrambi gli estremi del gradiente di nutrienti, quindi sia in ambienti oligotrofici che in ambienti arricchiti. La disponibilità di nutrienti influenza il loro *uptake* e stabilisce la capacità portante in termini di biomassa. A livello cellulare, il tasso di assorbimento di nutrienti (V) è descritto empiricamente dall'equazione di Monod secondo la cinetica di Michaelis-Menten: $V = (V_{\max} [S] / (K_s + [S]))$, dove V_{\max} è il massimo tasso di *uptake*, $[S]$ è la concentrazione di substrato e K_s è la costante di affinità o tasso di semi-saturazione. In uno stato stazionario, l'assorbimento di nutrienti dipende dalle concentrazioni esterne di substrato ed è controllato dai due parametri cinetici V_{\max} e K_s , che sono considerati caratteristiche costanti di una popolazione. V_{\max} è correlato al numero totale di siti di assorbimento della cellula e K_s è correlato alla capacità di un organismo di assorbire il

nutriente S quando questo è a bassa concentrazione. Questo parametro è quindi considerato indice della potenziale abilità competitiva di una specie in condizioni di limitazione da nutrienti. Specie con alte costanti di affinità risulterebbero dominanti in ambienti con alto regime di nutrienti, mentre di solito si ritiene che le dinoflagellate presentino K_s bassi per nutrienti quali NH_4 , NO_3 e PO_4 .

Anche la velocità di consumo dei nutrienti durante la crescita di una coltura può dare indicazioni sulla capacità di utilizzo dei diversi elementi da parte delle microalghe e permette di individuare il nutriente maggiormente in grado di influenzare la crescita. I grafici seguenti illustrano la riduzione progressiva dei nitrati e dei fosfati nel terreno delle colture batch a seguito del consumo da parte delle microalghe (Fig. 38).

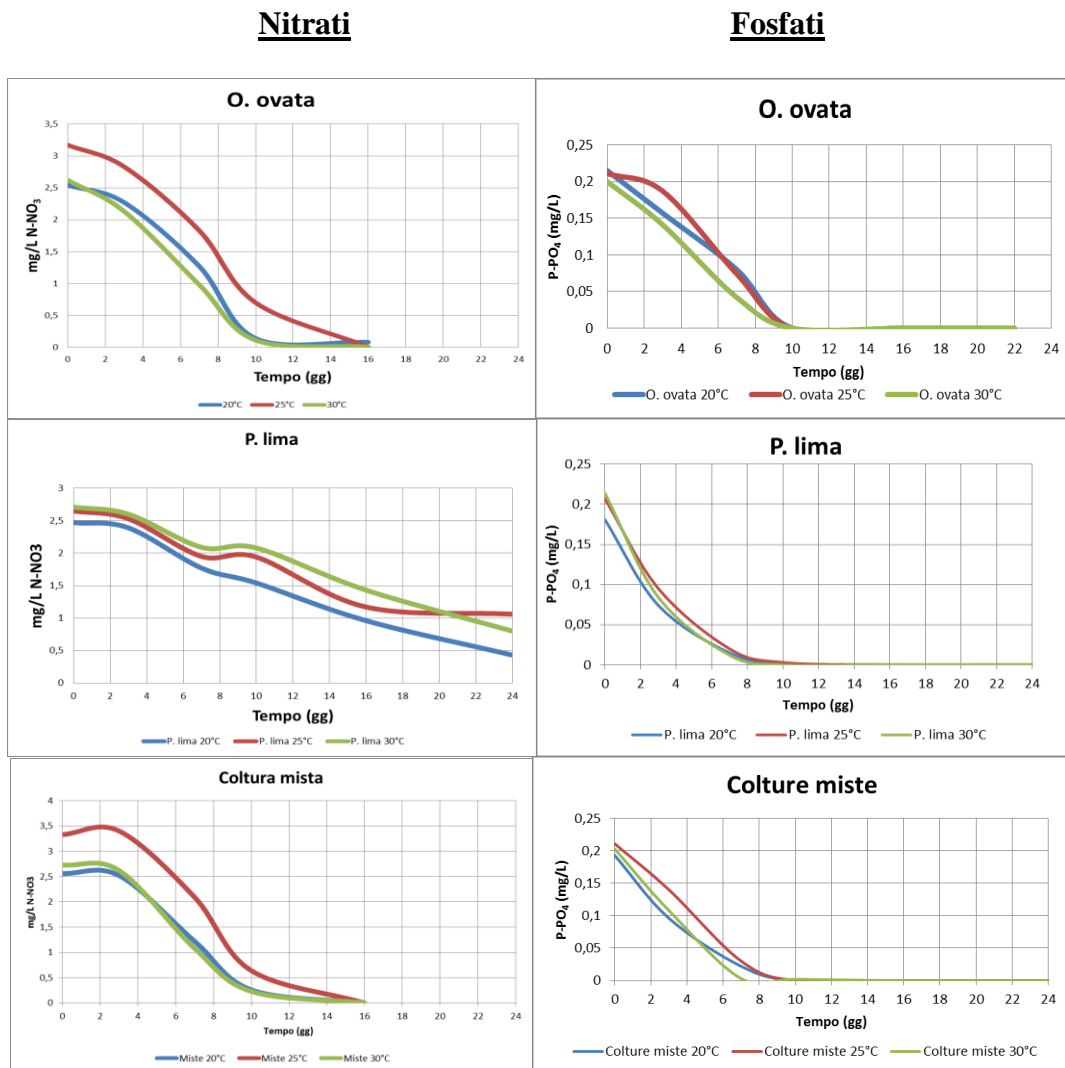


Fig. 38. Utilizzo dei nutrienti in *O. ovata*, *P. lima* e nelle colture miste.

Ogni microalga manifesta una propria peculiarità nell'*uptake* dei nutrienti, arrivando quasi sempre al loro esaurimento prima della fine dell'esperimento.

La concentrazione di nitrati e fosfati nel terreno F(N/10, P/10) utilizzato è cinque volte inferiore rispetto a quella presente nei comuni terreni di coltura utilizzati per le microalghe marine. Ci si aspetta quindi che nelle ultime giornate di coltura le cellule si trovino in uno stato di stress dovuto alla carenza di nutrienti.

Fra la sesta e la settima giornata di coltura, *O. ovata* consuma la metà dei nitrati presenti nel terreno al giorno di inoculo, mentre *P. lima* dimezza la quantità iniziale attorno alla quattordicesima giornata di coltura. Inoltre, mentre *O. ovata* esaurisce i nitrati già al decimo giorno, con l'eccezione della coltura a 25°C, *P. lima* non li ha ancora esauriti alla fine dell'esperimento. In compenso, *P. lima* è più veloce nell'*uptake* nei fosfati, che utilizza con un caratteristico andamento esponenziale negativo, sottraendoli ad *O. ovata* nella coltura mista. Come già visto in precedenza (Vanucci *et al.*, 2012), le cellule di *O. ovata* sono più grandi in carenza di fosforo ed infatti ciò si verifica nelle colture miste. La carenza di azoto, invece, ha come effetto una riduzione nella dimensione delle cellule.

La lentezza con cui *P. lima* incamera i nitrati, unitamente al basso tasso di crescita ricavato dalle curve logistiche non identifica quest'alga come una potenziale produttrice di fioriture caratterizzate da grandi quantità di biomassa. *O. ovata*, al contrario, mostra di possedere un maggiore potenziale riproduttivo, rendendosi artefice di attive divisioni cellulari, che si sono osservate sia tra le forme grandi che tra le forme piccole. Sembra però più sensibile alla limitazione da nutrienti, tanto da consentire a *P. lima* di aumentare un poco la sua densità percentuale all'interno della popolazione mista quando *O. ovata* ha terminato di crescere. *P. lima*, nonostante il rapido utilizzo dei fosfati, sarebbe stata in grado di proseguire ancora nella coltura batch.

4.4 Risposte alla luce

L'efficienza con cui un organismo autotrofo è in grado di svolgere la fotosintesi dipende dal suo corredo di pigmenti atti a catturare l'energia luminosa e dalla velocità con cui il flusso di elettroni transita dal fotosistema

II (PSII) al fotosistema I (PSI). Vi è probabilmente più variabilità interspecifica nei processi che riguardano l'attività di trasporto degli elettroni rispetto alla fotochimica primaria e vi sono grandi variazioni tra le specie nella dissipazione non fotochimica dell'energia. Ugualmente è molto diversa tra specie la quantità di energia luminosa richiesta per saturare la fotosintesi, e questa differenza è attribuita a variazioni nelle dimensioni dei complessi antenna associati al PSII (Juneau e Harrison, 2005). Quando il fitoplancton è fatto crescere in condizioni ambientali diverse per luce, temperatura o concentrazione di nutrienti, si osserva modificazione dell'attività fotosintetica a causa di processi di adattamento o acclimatazione.

Lo studio della fluorescenza emessa dal PSII e misurata tramite fluorimetro PAM è in grado di fornire informazioni sull'efficienza fotosintetica e quindi sullo stato di salute della coltura algale. I parametri ottenibili permettono di avere informazioni non solo sulle risposte delle alghe alla luce ma anche a quelle determinate dalla temperatura.

Le curve di risposta alla luce, *light curves* o curve P-E, mettono in relazione la resa quantica della fotosintesi e la quantità di radiazione fotosinteticamente attiva e rappresentano le variazioni dei valori fotosintetici in funzione di intensità luminose crescenti. Si parte da condizioni di buio, in cui la fotosintesi non avviene, quindi si applicano aumenti successivi dell'irradianza: i primi fotoni assorbiti saranno usati con grande efficienza, fino al punto in cui l'aumento di luce porterà solo a piccoli aumenti o a nessun aumento della fotosintesi. La velocità di trasporto elettronico dapprima cresce rapidamente, quindi poco a poco si stabilizza fino a quando nella curva si raggiunge un *plateau*. Da queste curve si può ricavare l'efficienza quantica (pendenza iniziale *alfa*) e la misura indiretta della massima capacità fotosintetica ETR_{max} , il valore di ETR che si raggiunge nella fase di *plateau*. Dal rapporto fra questi due parametri si può individuare il livello di irraggiamento ottimale (E_k). La pendenza iniziale *alfa* è considerata proporzionale alla dimensione del complesso antenna del PSII, ed è correlata con l'energia luminosa che occorre per la saturazione. Specie con bassi valori del parametro *alfa* richiedono un'energia radiante elevata per saturare la fotosintesi (Juneau e Harrison, 2005). Si riportano le *light curves* di *O. ovata* e *P. lima* nella fase centrale della coltura (Fig. 39) e nel giorno della raccolta (Fig. 40) alle tre temperature, ed i valori di ETR_{max} (Fig. 41) e di E_k (Fig. 42).

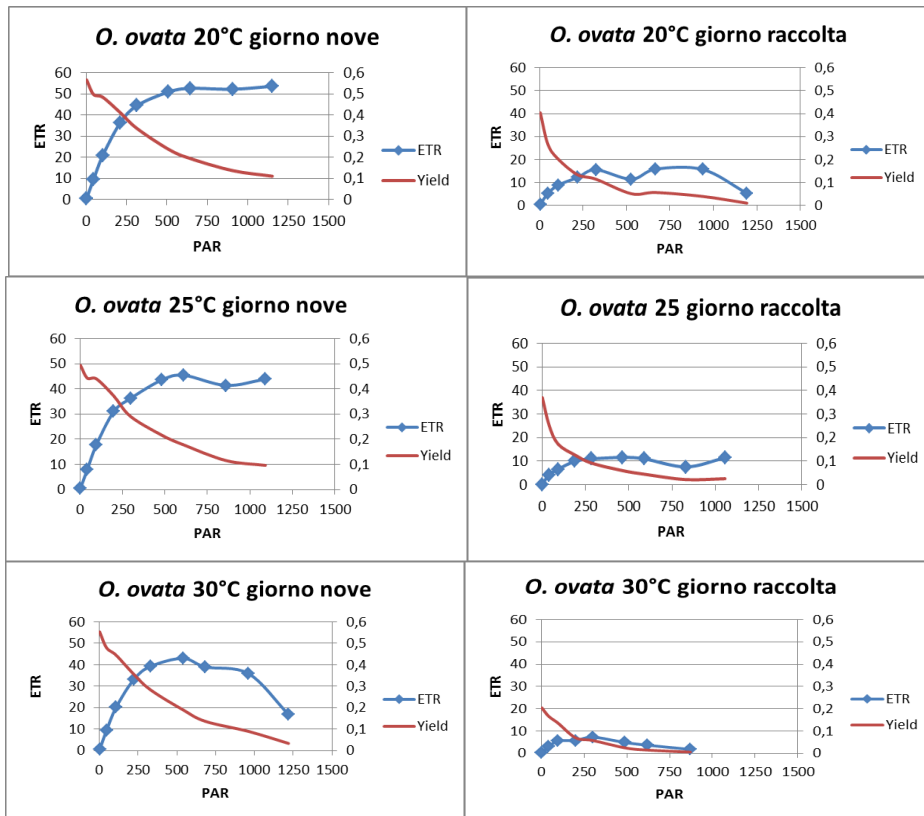


Fig. 39. Light curves di *O. ovata* nel giorno nove e nel giorno della raccolta.

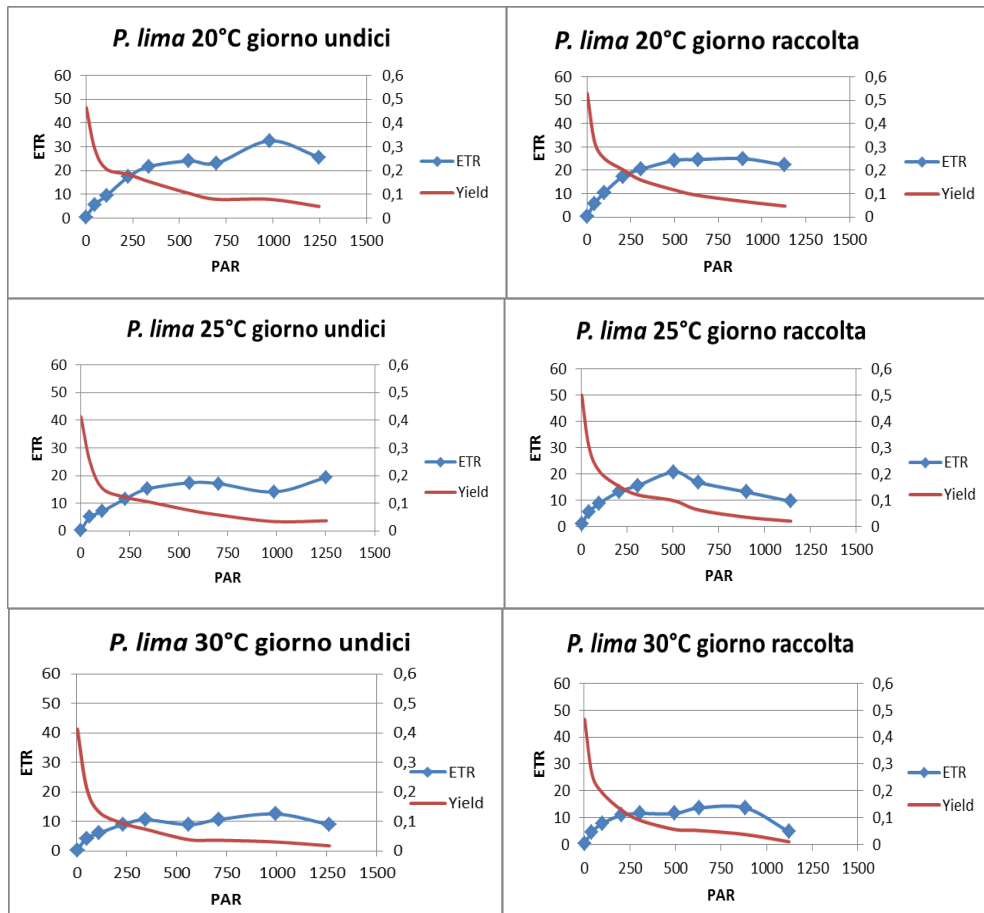


Fig. 40. Light curves di *P. lima* nel giorno undici e nel giorno della raccolta.

Le linee blu delle curve indicano il tasso di trasporto elettronico (ETR), indicazione indiretta della velocità della fotosintesi. *O. ovata* mostra valori di ETR più elevati rispetto a *P. lima* nelle curve del giorno nove; non così nel giorno della raccolta, dove il parametro ETR è sempre molto basso, unitamente al rendimento (*yield*). Inoltre, osservando la curva del giorno nove della coltura di *O. ovata* cresciuta a 30°C, si può evidenziare che, dopo il raggiungimento del *plateau*, l'ETR decresce bruscamente in corrispondenza di una intensità luminosa pari a circa 1000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, e questo è sintomo di fotoinibizione. Anche alcune curve di *P. lima* presentano flessione del valore di ETR, anche prima dei 1000 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, come nel caso della coltura a 30°C.

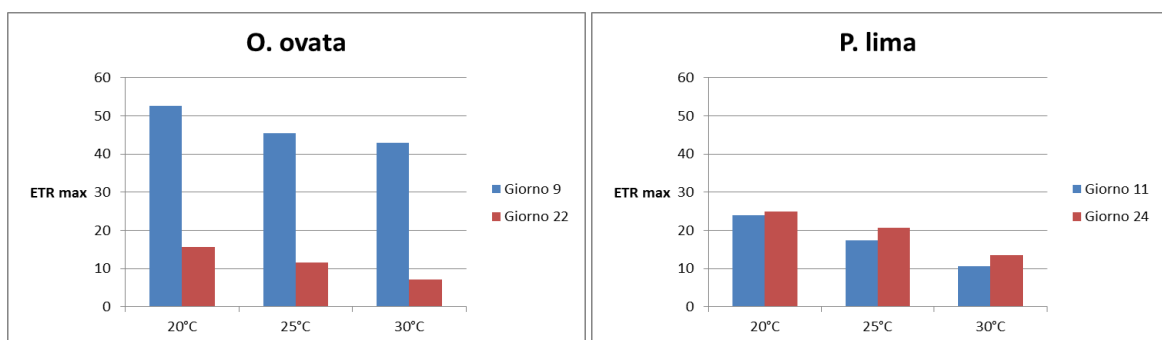


Fig. 41. Valori di ETR_{max} ricavati dalle *light curves* di *O. ovata* e *P. lima*.

Si nota che, per entrambe le microalghe, i valori di ETR_{max} sono correlati negativamente all'aumento della temperatura. A circa metà dell'esperimento di coltura (giorno 9 per *O. ovata* e giorno 11 per *P. lima*), gli ETR_{max} più elevati sono stati registrati nelle colture pure di *O. ovata*, con valori che vanno da 52,6 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (20°C) a 43 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (30°C). Rispetto ai valori presentati nello stesso periodo da *P. lima*, che vanno dai 24 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ per la coltura a 20°C a 10,6 $\mu\text{mol e}^- \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ per la coltura a 30°C, si evidenzia per *O. ovata* una capacità fotosintetica maggiore. Alla fine dell'esperimento, però, i valori di ETR_{max} registrati per *O. ovata* diminuiscono del 70-80% rispetto a quelli della nona giornata, mentre *P. lima* non mostra sostanziali differenze nella velocità massima del trasporto elettronico tra le due fasi del ciclo di crescita.

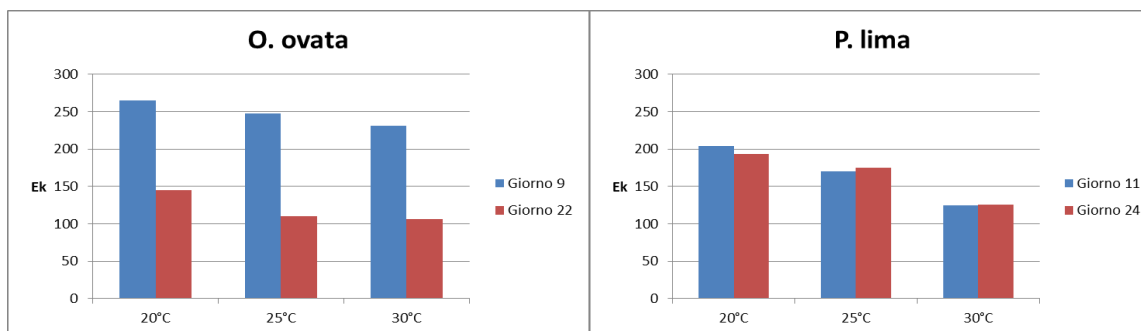


Fig. 42. Valori di E_k ricavati dalle *light curves* di *O. ovata* e *P. lima*.

Il parametro E_k rappresenta l'illuminazione ottimale per non subire fenomeni di fotoinibizione. Nella prima parte della curva di crescita, *O. ovata* presenta valori che vanno da circa $265 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ a $231 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ nelle tre condizioni di temperatura crescente. Questi valori sono più alti rispetto a quelli registrati per *P. lima* nella stessa fase di crescita (da 204 a $125 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) confermando una migliore capacità di utilizzo della luce da parte di *O. ovata*. Però, mentre i valori di *P. lima* per questo parametro rimangono pressoché costanti in tutte le fasi dell'esperimento, nelle cellule di *O. ovata*, quando invecchiano, l'efficienza nell'utilizzo della luce diminuisce. Si ritiene che questo fenomeno sia legato soprattutto all'esaurimento dei nitrati. In limitazione di azoto l'efficienza del PSII decresce, soprattutto a causa della riduzione di pigmenti fotosintetici, che diminuiscono il tasso di fotosintesi, portando modificazioni significative di questi parametri fisiologici (White *et al.*, 2011).

4.5 Risposte alla variazione di temperatura

Dalle curve di induzione, o *induction curves*, si possono ricavare parametri utili a individuare l'efficienza del processo fotosintetico nel suo complesso, in quanto qualunque cambiamento nell'efficienza di una o più tappe della fotosintesi si riflette sui parametri ottenibili. Si ricavano anche informazioni circa l'efficienza del funzionamento del PSII e la sua eventuale disattivazione (fotoinibizione) da parte di specie ossidanti. Se il PSII resta funzionale anche in condizioni di stress, l'organismo fotosintetico sarà in grado di adattarsi alle condizioni stressanti ed evitare danni cellulari, diversamente se PSII è danneggiato l'adattamento sarà insufficiente. Si può valutare inoltre la capacità di utilizzare l'energia luminosa assorbita per la fotosintesi o quenching fotochimico (qP): questo parametro è in funzione della capacità di

acclimatazione ed è indice dell'adattabilità della specie mentre il quenching non fotochimico (NPQ) è il parametro che permette di valutare la capacità di dissipazione termica dell'energia di eccitazione in eccesso. Più l'organismo è in grado di attuare NPQ più si ridurrà la produzione di specie reattive dell'ossigeno e quindi si ridurranno i danni cellulari.

Come già osservato dalle analisi dei nutrienti e dall'andamento delle curve di crescita, anche nelle curve di induzione si è osservata una risposta alla temperatura. Dopo la permanenza al buio e subito dopo il primo flash di luce saturante è stata registrata la fluorescenza F_m e si è calcolata la differenza tra questa fluorescenza e l'intensità di fluorescenza che si registra dopo l'ultimo degli altri flash saturanti (F_m'). Tale differenza ($F_m - F_m'$) riflette la parte non fotochimica del quenching di fluorescenza, ovvero quella dovuta a dissipazioni termiche. Si riportano i valori di $F_m - F_m'$ e di NPQ raccolti in una giornata di presunta fase esponenziale durante un ciclo di induzione cui sono stati sottoposti i campioni delle due microalghe (Tab. 8).

	Fm	Fm'	NPQ		Fm	Fm'	NPQ
<i>O. ovata</i> 20°C	691	832	0	<i>P. lima</i> 20°C	617	307	1
<i>O. ovata</i> 25°C	761	788	0	<i>P. lima</i> 25°C	640	400	0,6
<i>O. ovata</i> 30°C	675	678	0,129	<i>P. lima</i> 30°C	681	381	0,787

Tab. 8. Valori di ($F_m - F_m'$) e NPQ registrati in colture batch di nove e undici giorni per le microalghe *O. ovata* e *P. lima* esposte alle tre diverse temperature.

O. ovata non mostra estinzione della fluorescenza dovuta a dissipazione termica, tranne un lieve aumento di NPQ a 30°C così come non vi è diminuzione del valore della fluorescenza osservato alla luce (F_m') rispetto a quello osservato al buio (F_m). *P. lima* mostra invece una diminuzione di F_m' rispetto a F_m a tutte le temperature, associata anche a valori di NPQ (che ha un valore massimo uguale a 1) sempre molto elevati, segno dell'entrata in funzione di pigmenti fotoprotettivi che dissipano l'energia in eccesso.

Esplicitando nei grafici alcuni parametri ricavati dalle *induction curves* (Fig. 43), si evidenzia che, per quanto riguarda l'ETR si ha una conferma dei dati già visti nelle curve P-E con valori più alti per *O. ovata*. Nelle curve P-E il valore in ascissa rappresenta l'irraggiamento mentre in questi grafici in ascissa si ha il tempo, ovvero i 14 minuti durante i quali la luce attinica resta costante e vengono emessi impulsi di luce saturante ogni minuto. Dai parametri di queste curve sono stati ricavati i valori dello *yield* massimo o

massimo rendimento nello stato di adattamento al buio (Fv/Fm) (il primo della serie di valori, che si registra quando tutti i centri di reazione sono aperti) e dello *yield* effettivo (F'v/F'm) o rendimento effettivo quando le cellule sono adattate alla luce (Tab. 9). Lo *yield* ha un andamento abbastanza costante per tutte le colture, inferiore per quanto riguarda *P. lima*, il quale presenta però quenching non fotochimico sempre molto elevato.

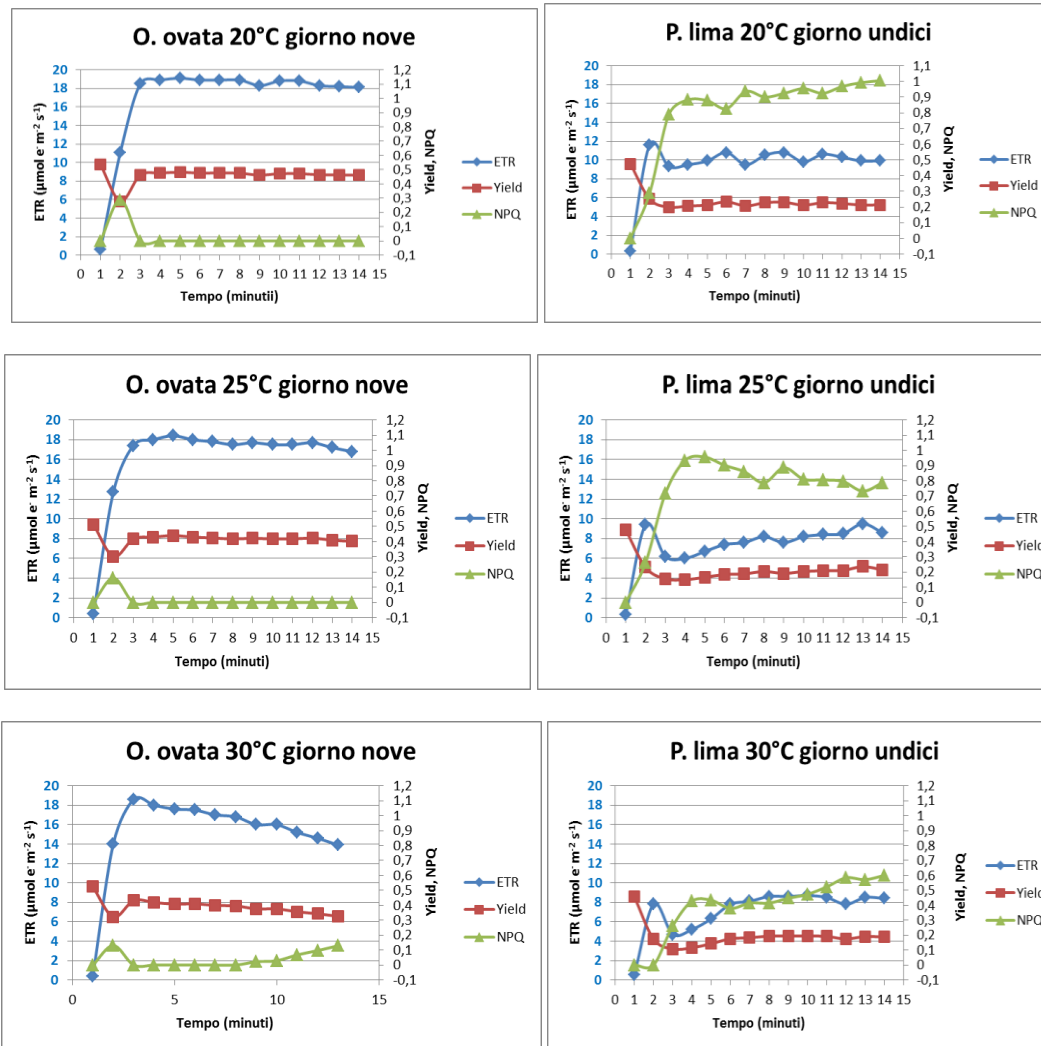


Fig. 43. Parametri ETR, Yield e NPQ, ricavati dalle *induction curves* di *O. ovata* e *P. lima* nella settima e nell'undicesima giornata di coltura.

	<i>Yield</i> al buio	<i>Yield</i> alla luce		<i>Yield</i> al buio	<i>Yield</i> alla luce
<i>O. ovata</i> 20°C	0,535	0,461	<i>P. lima</i> 20°C	0,475	0,214
<i>O. ovata</i> 25°C	0,613	0,402	<i>P. lima</i> 25°C	0,477	0,215
<i>O. ovata</i> 30°C	0,524	0,327	<i>P. lima</i> 30°C	0,459	0,187

Tab. 9. Rendimento nello stato di adattamento al buio (Fv/Fm) e alla luce (F'v/F'm).

Il massimo rendimento fotochimico (F_v/F_m) è un indice dello stato di salute delle cellule microalgali. Questo parametro, proporzionale alla massima efficienza fotosintetica, può variare tra 0,4 e 0,8 per le diverse classi di fitoplancton (Juneau e Harrison, 2005). Il valore diminuisce in condizioni di stress.

Nello stato di adattamento alla luce, lo *yield* di *O. ovata* diminuisce poco rispetto al valore registrato nello stato di adattamento al buio, e ciò è indice di buona efficienza fotosintetica, però nella coltura cresciuta a 30°C, lo *yield* alla luce si assesta su un valore che è circa del 30% inferiore rispetto a quello presentato dalla coltura cresciuta a 20°C. Le Ostreopsidaceae, fra tutte le altre dinoflagellate tropicali, appartengono al gruppo di quelle che crescono meglio a temperature più basse (Morton *et al.*, 1992). Per il ceppo oggetto di questo studio, una temperatura di 30°C risulta mal tollerata. In generale *P. lima* presenta efficienza fotosintetica inferiore, con valori di *yield* più bassi e una diminuzione elevata a tutte le temperature, ma a 30°C lo *yield* alla luce si assesta su un valore che è solo del 13% inferiore rispetto a quello presentato a 20°C. Rispetto ad *O. ovata*, *P. lima* risente meno dello stress da temperatura elevata.

4.6 Tossicità e allelopatia

Dai risultati delle analisi circa il contenuto di tossine cellulare, il ceppo di *O. ovata* utilizzato non si è mostrato in grado di produrre tutte le ovatossine finora conosciute, mancando di produrre ovatossina-b e ovatossina-c, come già confermato in prove precedenti (Ciminiello *et al.*, 2012). Tra le tossine prodotte, l'ovatossina-a è la componente maggiore, seguita dalle ovatossine d+e, presenti in quantità circa quattro volte inferiore rispetto alla ovatossina-a, e da un piccolo ammontare di palitossina putativa.

Nei grafici seguenti vengono illustrate le quantità delle tossine in rapporto alle cellule presenti in un litro di coltura e in rapporto al biovolume. L'asse secondario è riferito alla palitossina ed è stato dilatato di 20 volte, al fine di rendere apprezzabile la visualizzazione (Figg. 44 e 45).

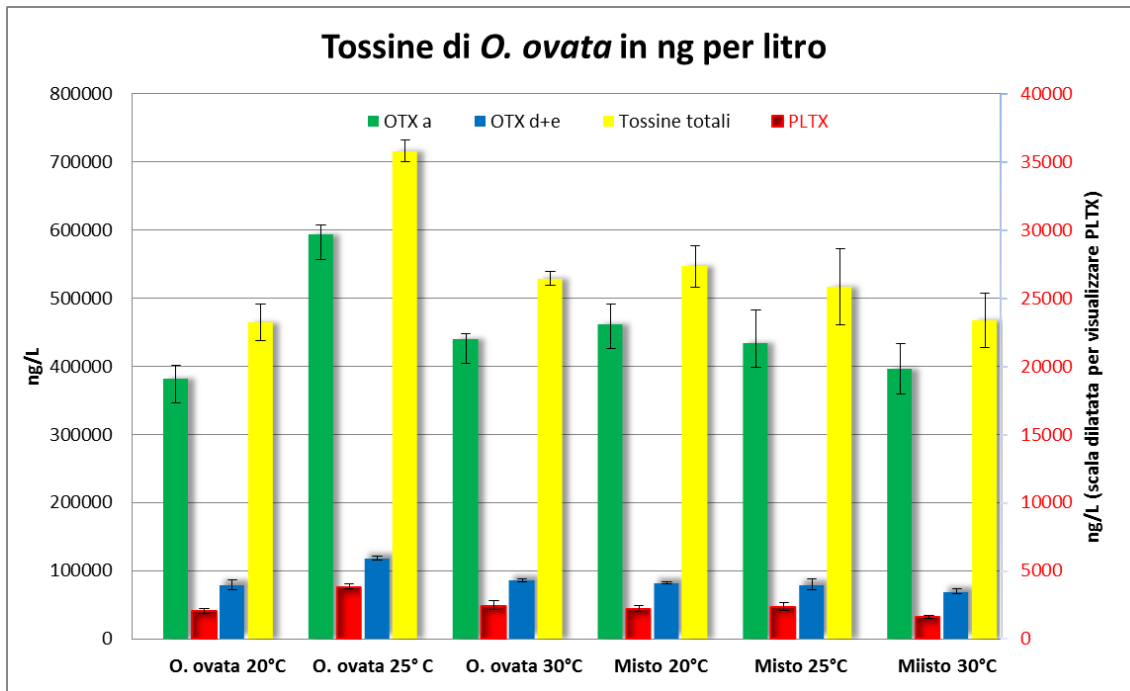


Fig. 44. Tossine contenute in cellule di *O. ovata*, espresse in nanogrammi per litro.

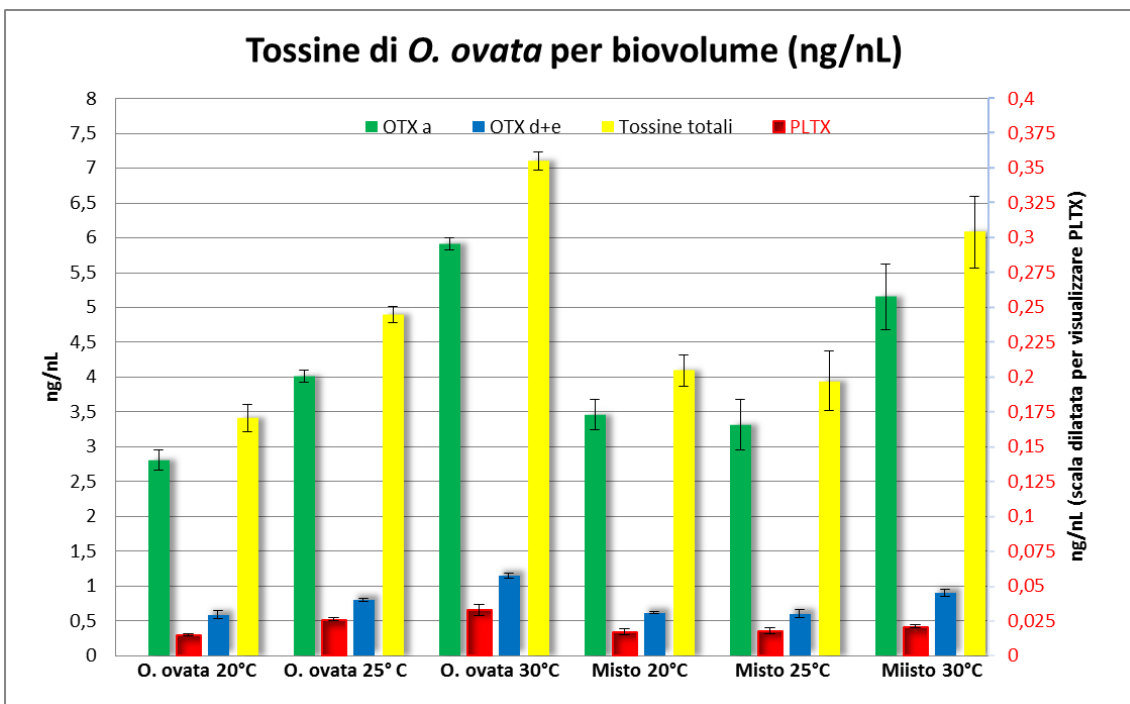


Fig. 45. Tossine contenute in cellule di *O. ovata*, espresse in unità di biovolume.

Nelle colture pure, la maggiore produzione di tossine per litro si osserva nella coltura cresciuta alla temperatura di 25°C, mentre nelle colture miste si nota una diminuzione della produzione di tossine con l'aumento della temperatura.

Quando le tossine vengono espresse su unità di biovolume (volume cellulare), si osserva una tendenza ad un maggior contenuto di tossine all'aumentare della temperatura. Nelle colture pure, questo aumento appare più marcato.

Oltre alle analisi del contenuto di tossine nelle cellule, sono in corso analisi circa la presenza di tossine eventualmente rilasciate nel mezzo di coltura, i cui risultati non sono ancora pervenuti. A studio completato, sarà possibile valutare se la presenza di una specie può influire in maniera negativa sull'altra. Dalle conoscenze attuali, non sembra che queste tossine vengano prodotte per inibire la crescita dell'altra alga. Saranno necessari ulteriori accertamenti.

Si riportano le quantità di acido okadaico prodotte dalla microalga *P. lima*, espresse rispetto al numero di cellule per litro e per unità di biovolume (Fig. 46).

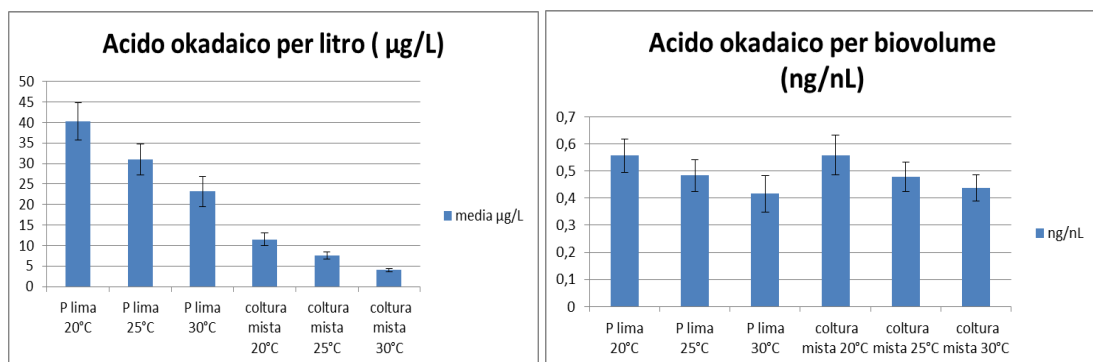


Fig. 46. Acido okadaico contenuto in cellule di *P. lima*, espresso in µg per litro e per unità di biovolume (ng/nL).

In cellule di *P. lima*, il contenuto di acido okadaico espresso per litro diminuisce progressivamente all'aumentare delle temperature, contrariamente all'andamento osservato in *O. ovata*. Nelle colture miste, il contenuto di acido okadaico per litro è sempre notevolmente inferiore a quello rivelato nelle colture pure, e ciò tiene conto del fatto che nelle colture miste il numero di cellule di *P. lima* rispetto a quelle di *O. ovata* è molto basso. Esprimendo il dato per unità di biovolume, si osserva sempre la diminuzione della quantità di tossina all'aumentare della temperatura, ma in questo caso i valori nelle colture pure e nelle colture miste sono di grandezza assolutamente paragonabile.

5. CONCLUSIONI

Le condizioni di sviluppo delle fioriture sono legate a fattori ambientali quali irraggiamento, temperatura, concentrazione di nutrienti, ma anche alle caratteristiche biologiche delle singole specie e alle loro associazioni. Le due microalghe oggetto dello studio, pur occupando in natura la stessa nicchia ecologica, hanno mostrato di avere preferenze specifiche per quanto riguarda i diversi parametri chimico-fisici.

Il ceppo di *O. ovata* ha esibito un'ampia gamma di morfologie e morfometrie, suggerendo grande variabilità intraspecifica per questa specie, anche in considerazione del fatto che non è stato in grado di produrre due delle cinque ovatossine finora conosciute, segno di geni mancanti o inespressi per la codifica di enzimi che contribuiscono alla formazione di queste grandi molecole tossiche. Il ceppo di *P. lima*, al contrario, ha mostrato una morfologia assai meno variabile, con rapporti nelle dimensioni cellulari ben precisi.

Tra le due microalghe, *O. ovata* ha presentato complessivamente tassi di crescita più elevati e migliore efficienza fotosintetica, mostrando però di prediligere temperature inferiori a 30°C: a questa temperatura infatti ha mostrato segni di sofferenza, presentando tassi di crescita inferiori e una maggiore produzione di tossine. L'aumento nella produzione delle tossine in cellule stressate dalla temperatura è già stato segnalato da Pezzolesi *et al.* (2012). *P. lima* ha presentato tassi di crescita complessivamente inferiori e minore efficienza fotosintetica già dopo i 20°C, accompagnata da grande dissipazione di energia sotto forma di calore.

Nella fase esponenziale, il parametro E_k , che rappresenta la quantità di irraggiamento ottimale, non ha mostrato valori troppo diversi tra le due microalghe. Quando però *O. ovata* entra in uno stadio in cui le cellule smettono di duplicarsi, questo parametro ed altri parametri della fotosintesi si abbassano, risentendo anche della carenza di nutrienti, soprattutto di azoto, che si viene a creare nella coltura batch con l'andare del tempo. Le curve di crescita di *P. lima*, invece, pure procedendo con bassa pendenza, mostrano che le cellule non smettono mai di dividersi, e in pratica la fase stazionaria non viene mai raggiunta. In queste condizioni, i valori di irraggiamento ottimale restano pressoché costanti e si rilevano minori differenze anche negli altri parametri fotosintetici.

Entrambe le microalghe hanno mostrato fenomeni di fotoinibizione, soprattutto alle temperature maggiori.

Nelle colture pure di *P. lima* il consumo dei nitrati non è stato completo, non raggiungendo mai uno stato di carenza, contrariamente al consumo i fosfati, che invece è avvenuto molto rapidamente. *O. ovata*, nelle sue colture pure, ha consumato con efficienza tutti i suoi nutrienti. Nelle colture miste, l'*uptake* più rapido di nitrati da parte di *O. ovata* ha fatto sì che la densità cellulare di *P. lima* fosse notevolmente inferiore rispetto a quella delle colture pure, mentre il rapido assorbimento dei fosfati da parte di *P. lima*, ha portato alla formazione di cellule di *O. ovata* di maggiori dimensioni.

Nonostante la sottrazione dei nitrati da parte di *O. ovata* nella coltura mista, la produzione di acido okadaico da parte di *P. lima* non si è modificata in presenza di *O. ovata*. Al riguardo va segnalato che, contrariamente alle ovatossine, l'acido okadaico non contiene azoto. Il ceppo di *O. ovata* utilizzato è stato in grado di produrre ovatossina-a, la tossina contenuta nelle cellule in maggiore quantità, e quantità circa quattro volte inferiori di ovatossine d+e, oltre a piccole quantità di palitossina putativa. La produzione di queste tossine ha dimostrato di essere correlata positivamente con l'aumento della temperatura quando espressa su unità di biovolume, ed è stata inferiore nelle colture miste rispetto alle colture pure.

Grazie alla maggiore capacità di crescita, al miglior utilizzo di nutrienti e alla migliore efficienza fotosintetica, *O. ovata* si dimostra in grado di dare origine a importanti eventi di fioritura, mentre per *P. lima* i parametri di crescita studiati non evidenziano questa capacità.

Le analisi in corso circa la quantità di tossine emesse nel mezzo di coltura permetteranno di completare il quadro delineato dal presente studio. Allo stato attuale, non si può concludere che esista attività allelopatica di una specie nei confronti dell'altra.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbate M., Bordone A., Cerrati G., Peirano A. 2010. Nuova metodica per il campionamento della microalga ticoplanctonica *Ostreopsis ovata* Fukuyo 1981. RT/2010/7/ENEA – Sezione Ambiente Marino Mediterraneo, Centro Ricerche Ambiente Marino S: Teresa, La Spezia.

Accoroni S., Colombo F., Romagnoli T., Totti C. 2010. Analisi morfometrica di cellule di *Ostreopsis ovata* in relazione alle fasi della fioritura (Riviera del Conero, N Adriatico, Estate 2009). SBI – Gruppo di Lavoro per l'Algologia, Riunione Scientifica Annuale, Abano Terme, 22-23 ottobre 2010.

Accoroni S., Romagnoli T., Colombo F., Pennesi C, Di Camillo C.G., Marini M., Battocchi C., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Tartaglione L., Penna A., Totti C. 2011. *Ostreopsis* cf. *ovata* bloom in the northern Adriatic Sea during summer 2009: Ecology, molecular characterization and toxin profile. *Marine Pollution Bulletin* **62**: 2512–2519.

Aligizaki K., Koukaras K., Nikolaidis G. 2005. The genus *Ostreopsis* in Greek coastal waters. Seminario Internazionale “*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.

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., Milandri A., Diogène J. 2011. Occurrence of palytoxin-group toxins in seafood and future strategies to complement the present state of the art. *Toxicon* **57**: 390–399.

Andersen P. 1996. Design and Implementation of some Harmful Algal Monitoring Systems. *IOC Technical Series* No. 44, UNESCO.

APAT Agenzia per la protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici. 2003. Metodi analitici per le acque. Vol. 2. Manuali e linee guida 29, pp. 528-536; 575-581.

Arzul G. Seguel M., Guzman L., Erard-Le Denn E. 1999. Comparison of allelopathic properties in three toxic *Alexandrium* species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **232**: 285–295.

Arzul G., Gentien P. 2006. Allelopathic interactions among marine microalgae. In: “Algal cultures, analogues of blooms and applications”. Subba Rao D.V. (Ed.), Vol. 1. Science Publishers, Enfield (NH), USA, Plymouth, UK. pp. 131-161.

- Barone R., Prisinzano A. 2006. Peculiarità comportamentale del dinoflagellato *Ostreopsis ovata* Fukuyo (Dinophyceae): la strategia del ragno. 2006. *Il Naturalista Siciliano*, S. IV, **XXX** (3-4): 401-418.
- Ben-Amotz A. 1984. Production of nutritional microphytoplankton for use as food in marine fish hatcheries. In: Rosenthal H., Sarig S. (Eds.). Spec. Pub. Eur. Maricult.
- Brescianini C., Grillo C., Melchiorre N., Bertolotto R., Ferrari A., Vivaldi B., Icardi G., Gramaccioni L., Funari E., Scardala S. 2006. *Ostreopsis ovata* algal blooms affecting human health in Genova, Italy, 2005 and 2006. *Eurosurveillance* 11(36): pii=3040. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/View/Article.aspx?ArticleId=3040>.
- Burkholder J.M., Avanza R.V., Sako Y. 2006. 5. The ecology of harmful dinoflagellates. In: Ecology of harmful algae. E. Granéli and J.T. Turner Eds. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 53-66.
- Casavola N., Troncone A., Rizzi E., Favale M.G., Bello G. 2005. Microalghe marine tossiche nella provincia di Bari: danni ambientali, ittiofaunistici, evidenze epidemiologiche. In: Mattei D., Melchiorre S., Messineo V., Bruno M. (Ed.) Diffusione delle fioriture algali tossiche nelle acque italiane: gestione del rischio ed evidenze epidemiologiche. *Rapporto Istisan* 05/29. pp. 92-97.
- Cembella A.D., Milenkovic L., Doucette G., Fernandez M. 1995. *In Vitro* biochemical and cellular assays. In: "Hallegraeff, G.M., Anderson, D.M. & A.D. Cembella, eds. *Manual on harmful marine microalgae*" IOC Manuals and Guides No. 33. UNESCO.
- Cembella A.D. 1998. Ecophysiology and metabolism of paralytic shellfish toxins in marine microalgae. In: "Anderson D.M., Cembella A.D., Hallegraeff G.M. (Eds.) Physiological ecology of harmful algal bloom". NATO ASI Series 41. Springer; Berlin Heidelberg New York, pp. 381-403.
- Ciminiello P., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti R., Viviani R. 1998. Isolation of Adriatoxin a new analogue of yessotoxin from mussels of the Adriatic Sea. *Tetrahedron Letters* **39**: 8897-8900.
- Ciminiello, P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno S., Poletti, R. 2002. The detection and identification of 42,43,44,45,46,47,55-Heptanor-41-oxoyessotoxin, a new marine toxin from Adriatic shellfish by liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* **15**: 979-984.
- Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Magno G.S., Tartaglione R., Grillo C., Melchiorre N. 2006. The Genoa 2005 outbreak. Determination of putative palytoxin in Mediterranean *Ostreopsis ovata* by a new liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *Analytical Chemistry* **78**(17): 6153-6159.
- Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., 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.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Forino M., Grauso L., Tartaglione L., Guerrini F., Pistocchi R. 2010. Complex palytoxin-like profile of *Ostreopsis ovata*. Identification of four new ovatoxins by high-resolution liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **24**: 2735-2744.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., Grauso L., Tartaglione L. 2011. A 4-decade-long (and still ongoing) hunt for palytoxins chemical architecture. *Toxicon* **57**: 362-367.

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Forino M., Grauso L., Tartaglione L., Guerrini F., Pezzolesi L., Pistocchi R., Vanucci S. 2012. Isolation and structure elucidation of ovatoxin-a, the major toxin produced by *Ostreopsis ovata*. *J. Am. Chem. Soc.* **134**(3): 1869–1875.

Clément A., Seguel M., Arzul G., Guzman L., Alarcon C. 2001. Widespread outbreak of a haemolytic, ichthyotoxic *Gymnodinium* sp. In Southern Chile. pp. 66-69. In:” G.M. Hallegraeff, S.I. Blackburn, C.J. Bolsch and R.J. Lewis (Eds), Harmful algal blooms 2000”. Intergovernmental of UNESCO.

Cognetti G., Sarà M., Magazzù G. (2004). *Biologia marina*. Calderini, Bologna, pp. 596.

Corsini S., Casazza G., Silvestri C. 2008. I nostri mari minacciati da fioriture di alghe tossiche. APAT: IdeAmbiente, anno 05, n° 38.

Di Turi L., Lo Caputo S., Marzano M.C., *et al.* 2003. Ostropsidiaceae (Dinophyceae) presence along the coastal area of Bari. *Biol. Mar. Medit.* **10**: 675-678.

Dodge J.D. 1975. The Prorocentrales (Dinophyceae). II Revision of the taxonomy within the genus *Prorocentrum*. *Bot. J. Linn. Soc.* **71**: 103-125.

Durando P., Ansaldi F., Oreste P., Moscatelli P., Marensi L., Grillo C., Gasparini R., Icardi G. 2007. *Ostreopsis ovata* and human health: epidemiological and clinical features of respiratory syndrome outbreaks from a two-year syndromic surveillance, 2005-06, in north-west Italy. *Euro Surveillance* **12**, E070607 1.

Edvardsen B, Paasche E (1998) Bloom dynamics and physiology of *Prymnesium* and *Chrysochromulina*. In: Anderson DM, Cembella AD, Hallegraeff GM (eds) Physiological ecology of harmful algal blooms. NATO ASI Ser Ser G 41:193–208

EFSA European Food Safety Authority. Gruppo CONTAM. 2009. Parere scientifico sulle biotossine marine nei molluschi e crostacei – Gruppo della palitossina. 15 dicembre 2009. www.europass.parma.it.

EFSA European Food Safety Authority. Gruppo CONTAM. 2010a. Parere scientifico sulle biotossine marine nei molluschi e crostacei – tossine emergenti: gruppo delle ciguatossine. 7 giugno 2010. www.europass.parma.it.

EFSA European Food Safety Authority (CONTAM). 2010b. Scientific Opinion on marine biotoxins in shellfish – Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA Journal*: **8**(6): 1628, pag. 12, Parma, Italy.

Faimali M., Giussani V., Piazza V., Garaventa F., Corrà C., Asnaghi V., Privitera D., Gallus L., Cattaneo-Vietti R., Mangialajo L., Chiantore M. 2011. Toxic effect of harmful benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata* on invertebrate and vertebrate marine organisms. *Marine Environmental Research* **30**: 1-11.

FAO. 2004. FAO Food and Nutrition Papers, 2004, pp. 295 (<http://www.fao.org/docrep/007/y5486e/y5486e0p.htm>).

Faust M.A. 1993a. Alternate asexual reproduction of *Prorocentrum lima* in culture. In: “Smayda T.J., Shimizu Y (eds). Toxic phytoplankton blooms in the sea”. Elsevier Scientific, New York, pp. 115-120.

Faust M.A. 1993b. Sexuality in a toxic dinoflagellate, *Prorocentrum lima*. In: “Smayda T.J., Shimizu Y (eds). Toxic phytoplankton blooms in the sea”. Elsevier Scientific, New York, pp. 121-126.

Faust M.A. 1994. Three new bentic species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) from Carrie Bow Cay, Belize: *P. sabulosum* sp. nov., *P. sculptile* sp. nov., and *P. arenarium* sp. nov. *J. Phycol.* **30**: 755-763.

Faust M.A., Gullendge R.A. 2002. In: Identifying harmful marine dinoflagellates”, Smithsonian Institution, NMNH National Museum of Natural History, Contribution from the United States National Herbarium, <http://botany.si.edu/references/dinoflaf/Taxa/Plima.htm>.

Faust M.A., Morton S.L., Quod J.P. 1996. Further study of marine dinoflagellates: the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae). *J. Phycol.* **32**: 1053-1065.

Fiocca A., Vadrucci M.R. 2009. Fitoplancton. In: “ISPRA Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale. Metodologie per la determinazione della struttura dimensionale di fitoplancton e macroinvertebrati bentonici”. Curatori A. Basset, F. Sangiorgio, L. Sabetta, Università del Salento, Lecce.

Fistarol G.O. 2004. The role of allelopathy in phytoplankton ecology. Akademisk Avhandling. PhD Thesis. Department of Biology and Environmental Science, Marine Science Division, University of Kalmar, Sweden.

- Fistatol G.O., Legrand C., Selander E., Hummert C., Stolte W., Granéli E. 2004. Allelopathy in *Alexandrium* spp.: effect on a natural plankton community and on algal monocultures. *Aquat. Microb. Ecol.* **33**: 43-56.
- Fistarol G.O., Legrand C., Granéli E. 2005. Allelopathic effect on a nutrient-limited phytoplankton species. *Aquatic Microbial Ecology* **41**: 153-161.
- Foy C.L., Inderjit. 2001. Understanding the role of allelopathy in weed interference and declining plant diversity. *Weed Technology* **15**: 873-878.
- Franks P.J.S. 1997a. Models of harmful algal blooms. *Limnology and. Oceanography* **42**(5, part 2): 1273-1282.
- Franks P.J.S. 1997b. Spatial patterns in dense algal blooms. *Limnology and. Oceanography* **42**(5, part 2): 1297-1305.
- Fukuyo Y. 2006. Threats to global food security. Harmful algal blooms, microbial and chemical agents. *Series on Sea and Human Security*, Workshop on Food Security, 1-6 October 2006, Hiroshima, Japan.
- Gallitelli M., Ungaro N., Addante L.M., Silver N.G., Sabbà C. 2005. Respiratory illness as reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. *Journal of the American Medical Association*, **293**: 2599-2600.
- Gentien P., Arzul G. 1990. Exotoxin production by *Gyrodinium* cf. *aureolum* (Dinophyceae). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* **70**: 571-581.
- Govindjee. 2004. Chlorophyll a fluorescence: a bit of basic and history. In: "Papageorgiou G.C., Govindjee (Eds.). Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis". Advance in Photosynthesis and Respiration, vol 2. Springer, Netherlands, pp. 1-42.
- Granéli E., Hansen P.J. 2006. 15. Allelopathy in harmful algae: a mechanism to compete for resources? In: "Ecology of harmful algae". Granéli E, Turner J.T. (Eds.). Ecological Studies, Vol 189. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp .189-201.
- Granéli E., Turner J. T. 2006. 1. An introduction to harmful algae. In: "Ecology of harmful algae". Granéli E., Turner J.T (Eds.). Ecological Studies, Vol 189. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp 3-7.
- Granéli E., Weberg M., Salomon P.S. 2008. Harmful algal blooms of allelopathic microalgal species: the role of eutrophication. *Harmful Algae* **8**: 94-102.
- Granéli E., Vidyarathna N.K., Funari E., Cumaranatunga P.R.T., Scenati R. 2011. Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic benthic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? *Harmful Algae* **10**: 165-172.
- Grauso L. 2008. Isolamento e caratterizzazione stereostrutturale di biotossine marine isolate dai mitili contaminati e da dinoflagellati del mar Adriatico. Tesi di Dottorato in

“Scienza del Farmaco”, Università degli Studi di Napoli “Federico II”, Facoltà di Farmacia, XX Ciclo 2004-2007.

Grillo C., Melchiorre N. 2005. Il Caso Liguria: azione integrata per il riconoscimento del fenomeno- Aspetti Ambientali. Seminario Internazionale “*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.

Grzebyk D., Sako Y., Berland B. 1998. Phylogenetic analysis of nine species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequences, morphological comparison and description on *Prorocentrum panamensis*, sp. nov. *J. Phycol.* **34**: 1055-1068.

Guerrini F., Pezolesi L., Feller A., Riccardi M., Ciminiello P., Dell’Aversano C., Tartaglione L., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Forino M., Pistocchi R. 2010. Comparative growth and toxin profile of cultured *Ostreopsis ovate* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. *Toxicon* **55**: 211–220.

Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* **8**: 229-239.

Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. Pp. 26-60. In Smith W.L. and Chanley M.H. (Eds.). *Culture of Marine Invertebrate Animals*. Plenum Press. New York. USA.

Habermann E., Ahnert-Hilger G., Chhatwal G.S., Beress L. 1981. Delayed haemolytic action of palytoxin. General characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* **649**: 481–486.

Habermann E. 1989. Palytoxin acts through Na⁺/K⁺-ATPase. *Toxicon* **27**(11): 1171-1187.

Hallegraeff G.M. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* **32**(2): 79-99.

http://www.lagazzettadelmezzogiorno.it/GdM_dallapuglio_NOTIZIA_01.PHP? Molfetta, l'alga tossica torna a colpire. IDNotizia = 361891 & IDCategoria=1

http://archiviostorico.corriere.it/2005/luglio/19/Paura_per_alga_tossica_bagnanti_co_8_05_0719039.shtml. Paura per l'alga tossica, 80 bagnanti in ospedale.

http://archiviostorico.corriere.it/2006/Agosto/01/Alghe_tossiche_nel_Tirreno_accuse_co_9_060801041.shtml. Alghe tossiche nel Tirreno, accuse ai depuratori.

http://archiviostorico.corriere.it/2006/agosto/06/alghe_tossiche_sono_arrivate_nel_co_9_060806098.shtml. Le alghe tossiche sono arrivate nel mare di Palermo.

<http://corrieredelmezzogiorno.corriere.it/catania/notizie/cronaca/2011/16-luglio-2011/alga-tossica-arriva-anche-catania-1901102835894.shtml>. L'alga tossica arriva anche a Catania: ancora nessun malore tra i bagnanti.

<http://www.sapere.it/enciclopedia/tetrodotossina.html>.

Hu T., Marr J., De Freitas A.S.W., Quilliam M.A., Wright J.L.C., Pleasences S. 1992. New diol ester (of okadaic acid) isolated from cultures of dinoflagellates *Prorocentrum lima* and *Prorocentrum concavum*. *Journal of Natural Products* **55**: 1631-1637.

Hu T., Curtis J.M., Walter J.A., Wright J.L.C. 1995. Identification of DTX-4, a new water-soluble phosphatase inhibitor from the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* (5): 597-599.

Hu T., De Freitas A.S.W., Curtis J.M., Oshima Y., Walter J.A., Wright J.L.C. 1996. Isolation and structure of prorocentrolide B, a Fast-Acting Toxin from *Prorocentrum maculosum*. *Journal of Natural Products* **59**(11): 1010-1014.

Hua Y., Lu W., Henry M.S., Pierce R.H. Cole R.B. 1996. On-line liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for determination of the brevetoxin profile in natural "red tide" algal blooms. *J Chromatography A* **750**: 115-125.

Icardi G., Marensi L. 2005. Aspetti epidemiologici. Seminario Internazionale "Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?" Genova il 5 dicembre 2005.

ICRAM. 2001. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio. Servizio Difesa Mare. Programma di monitoraggio per il controllo dell'ambiente marino costiero (triennio 2001-2003). Metodologie analitiche di riferimento. Schede 4 (Ortofosfati), 5 (Nitriti) e 6 (Nitrati).

Ingarao C., Lanciani G., Verri C., Pagliani T. 2007. First record of *Prorocentrum lima* on Abruzzo Region coast, W Adriatic. *Harmful Algal News* **35**: 10-12.

Ishida H., Nozawa A., Totoribe K., Muramatsu N., Nukaya H., Tsuji K., Yamaguchi K., Yasumoto T., Kaspar H., Berkett N., Kosuge, T. 1995. Brevetoxin B₁, a new polyether marine toxin from the New Zealand shellfish, *Austrovenus stutchburyi*. *Tetrahedron Lett.* **36**(5): 725-728.

Jonsson P.R., Pavia H., Toth G. 2009. Formation of harmful algal blooms cannot be explained by allelopathic interactions. *PNAS* **106**(27): 11177-11182.

Juneau P., Harrison P.J. 2005. Comparison by PAM fluorimetry of photosynthetic activity of nine marine phytoplankton grown under identical conditions. *Photochemistry and Photobiology* **81**: 649-653.

Kajiwara T., Ochi S., Kodama K., Matsui K., Hatanaka A., Fujimara T., Ikeda T., 1992. Cell-destroying sesquiterpenoid from red tide of *Gymnodinium nagasakiense*. *Phytochemistry* **31**: 783-785.

Legrand C., Rengedors K., Fistarol G.O., Granéli E. 2003. Allelopathy in phytoplankton – biochemical, ecological and evolutionary aspects. *Phycologia* **42**(4): 406-419.

- LoCicero V.R. (Ed.). 1975. Proceedings of the first international conference on toxic dinoflagellates blooms. Boston, Massachusetts Science and Technology Foundation, p. 541.
- Louzao M.C., Espiña B., Cagide E., Ares I.R., Alfonso A., Vieytes M.R., Botana L.M. 2010. Cytotoxic effect of palytoxin on mussel. *Toxicon* **56**: 842–847.
- Maestrini S.Y., Granéli E. 1991. Environmental conditions and ecophysiological mechanisms which led to the 1988 *Chrysochromulina polylepis* bloom: an hypothesis. *Oceanologica Acta* **14**: 397-413.
- Malagoli D. 2007. A full-length protocol to test hemolytic activity of palytoxin on human erythrocytes. *Invertebrate Survival Journal* **4**: 92-94.
- Mangialajo L., Ganzin N., Accoroni S., Asnaghi V., Blanfuné A., Cabrini M., Cattaneo-Vietti R., Chavanon F., Chiantore M., Cohu S., Costa E., Fornasaro D., Grosseil H. Marco-Miralles F., Masó M., Reñé A., Rossi A.M., Sala M.M., Thibaut T., Totti C., Vila M., Lemée R. 2011. Trends in *Ostreopsis* proliferation along the Northern Mediterranean coasts. *Toxicon* **57**: 408–420.
- Marr J.C., Jackson A.E., McLachlan J.L. 1992. Occurrence of *Prorocentrum lima*, a DSP toxin-producing species from the Atlantic coast of Canada. *J. Appl. Phycol.* **4**: 17-25.
- Masi A. Uso della fluorescenza delle clorofille per studiare la fotosintesi. Università di Padova, Facoltà di Agraria, Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Corso di Biochimica delle piante agrarie e forestali.
- Masò M., Vila M., Alvare P. 2005. *Ostreopsis* along the Catalan coast (NE Spain): ecological aspects and epidemiologic study. Seminario Internazionale “*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.
- Masò M., Garcés E. 2006. Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions the induce them. *Marine Pollution Bulletin* **53**: 620-630.
- MINISTERO DELLA SALUTE. Dipartimento della Prevenzione e della Comunicazione Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria Ufficio IV. Linee guida “Gestione del rischio associato alle fioriture di *Ostreopsis ovata* nelle coste italiane”. Documento approvato dal Consiglio Superiore di Sanità nella seduta del 24 maggio 2007 (Relatore: Dr. Salvatore Squarcione).
- Mons M.N., Van Egmond H.P., Speijers G.J.A. 1998. Paralytic shellfish poisoning: A review. RIVM Report 388802 005. June 1998.
- Monti M., Minocci M., Beran A., Iveša L. 2007. First record of *Ostreopsis* cf. *ovata* on macroalgae in the Northern Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin* **54**: 598–601.
- Moon R.E., Martin D.F. 1981. The cytolytic substance Aponin on *Prymnesium parvum* and *Ptychodiscus brevis*. A comparative study. *Bot. Mar.* **24**: 591-593.

- Morohashi A., Satake M., Murata K., Naoki H., Kaspar H.F., Yasumoto, T. 1995. Brevetoxin B3, a new brevetoxin analog isolated from the greenshell mussel *Perna canaliculus* involved in neurotoxic shellfish poisoning in New Zealand. *Tetrahedron Lett.* **36**(49): 8995-8998.
- Morohashi A., Satake M., Murata K., Naoki H., Kaspar H.F., Oshima Y., Yasumoto, T. 1999. Brevetoxin B4 Isolated from Greenshell mussels *Perna canaliculus*, the major Toxin Involved in Neurotoxic Shellfish Poisoning in New Zealand. *Nat. Toxins* **7**: 45-48.
- 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.
- Munday R. 2011. Palytoxin toxicology: animal studies. *Toxicon* **57**: 470-477.
- Murakami Y., Oshima Y., Yasumoto T. 1982. Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Bull, Jpn. Soc. Sci. Fish.* **48**: 69-72.
- Murata K., Satake M., Naoki H., Kaspar H.F., Yasumoto, T. 1998. Isolation and structure of a new brevetoxin analog, Brevetoxin B2, from greenshell mussels from New Zealand. *Tetrahedron* **54**: 734-742.
- Nagahama Y., Murray S., Tomaru A., Fukuyo Y. 2011. Species boundaries in the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima* (Dinophyceae, Prorocentrales), based on morphological and phylogenetic characters. *J. Phycol.* **47**: 178-189.
- Nardello I., Marcelli M., Lazzara L. 2003. Stime di biomassa e produzione primaria nel Canale di Sicilia, attraverso misure di fluorescenza in vivo della clorofilla a. Atti del XIII Congresso Nazionale della Società Italiana di Ecologia, SIte, Como, 8-10 settembre 2003, pp. 50-55.
- Ohsawa N., Ogata Y., Okada N., Itoh N. 2001. Physiological function of bromoperoxidase in the red marine alga, *Corallina pilulifera*: production of bromoform as an allelochemical and the simultaneous elimination of hydrogen peroxide. *Phytochemistry* **58**(5): 683-692.
- Penna A., Vila M., Fraga S., Giacobbe M.G., Andreoni F., Riobò P., Vernesi C, 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the Western Mediterranean Sea based of morphology, toxicity and internal transcribed spacer 5.8S rDNA sequences. *J. Phycol.* **41**, 212–225.
- Pennings S.C., Weiss A.M., Paul V.J. 1996. Secondary metabolites of the cyanobacterium *Microcoleus lyngbyaceus* and the sea hare *Stylocheilus longicauda*: palatability and toxicity. *Mar. Biol.* **126**: 735-743.
- Perl T.M., Bédard L., Kosatsky T., Hockin J.C., Todd E.C.D., Remis R.S. 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. *New England Journal of Medicine* **322**: 1775-1780.

- Pezzolesi L., Guerrini F., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Forino M., Tartaglione L., Pistocchi R. 2012. Influence of temperature and salinity on *Ostreopsis cf. ovata* growth and evaluation of toxin content through HR LC-MS and biological assays. *Water Research* **46**: 82-92.
- Pistocchi R., Pezzolesi L., Guerrini F., Vanucci S., Dell'Aversano C., Fattorusso E. 2011. A review on the effects of environmental conditions on growth and toxin production of *Ostreopsis ovata*. *Toxicon* **57**: 421-428.
- Poletti R. 2007. "Il rischio associato alle alghe tossiche marine". "Lo stato delle conoscenze di alcune biotossine marine prodotte da microalghe bentoniche lungo le coste italiane". Corso ARPA-APAT. Centro Ricerche Marine Cesenatico, 15-17 maggio 2007.
- Poletti R. 2011. Problematiche da biotossine acquatiche. In: "Malattie trasmesse da alimenti di origine animale: pericoli e rischi chimici". Casalecchio d Reno, Bologna, 20 maggio 2011.
- Pompei M., Cangini M. 2006. In: "Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani". Vol. 1. Fitoplancton. A cura di Avancini M., Cicero A.M., Di Girolamo I., Innamorati M., Magaletti E., Sertorio Zunini T. Ministero dell'Ambiente della Tutela del Territorio e del Mare e ICRAM. Arti Grafiche Agostini, Roma, p. 385.
- Pratt D.M. 1966. Competition between *Skeletonema costatum* and *Olisthodiscus luteus* in Narragansett Bay and in culture. *Limnol. Oceanogr.* **11**(4): 447-455.
- Prince E.K., Myers T.L., Kubanek J. (2008). Effects of harmful algal blooms on competitors: allelopathic mechanisms of the red tide dinoflagellate *Karenia brevis*. *Limnol. Oceanogr.* **53**: 531-541.
- Quilliam M., Eaglesham, G., Hallegraeff G., Quaine J., Curtis J., Richard D., Nunez P. 2000. Detection and identification of toxins associated with a shellfish poisoning incident in New South Wales, Australia. International Conference on Harmful Algal Blooms (Tasmania), Abstract, p.48. In Aune, T. 2001.
- Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. Capitolo V: Norme sanitarie per i molluschi bivalvi vivi. Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, 30 aprile 2004, L139/55.
- Rengefors K., Legrand C. 2001. Toxicity in *Peridinium aciculiferum* – an adaptive strategy to outcompete other winter phytoplankton? *Limnol. Oceanogr.* **46**(8):1990-1997.
- Rice E.L. 1984. Allelopathy. 2° ed. Academic Press, New York. 424 pp.
- Sangiorgi V., Bianco I. 2005. Il caso Lazio: *Ostreopsis* spp. lungo il litorale laziale. Seminario Internazionale "Ostreopsis: problema per il Mediterraneo?" Genova il 5 dicembre 2005.

- Sansoni G., Borghini B., Camici G., *et al.* 2000. Fioriture algali marine di *Ostreopsis ovata* e malesseri da inalazione di aerosoli marini. *Genova* **22**: 25-27.
- Sansoni G., Borghini B., Camici G., Casotti M., Righini P., Fustighi L. 2003. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales. Dinophyceae): un problema emergente. *Biologia Ambientale* **17**(1): 17:23.
- Satake M., Ofuji K., Naoki H., James K.J., Furey A., McMahon T., Silke J., Yasumoto T. 1998. Azaspiracid, a new marine toxin having unique Spiro Ring assemblies, isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *Journal of the American Chemical Society* **120**: 9967-9968.
- Schilling W.P., Snyder D., Sinkins W.G., Estacion M., 2006. Palytoxin-induced cell death cascade in bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **291**: C657–C667.
- Schmidt L.E., Hansen P.J. 2001. Allelopathy in the prymnesiophyte *Chrysocromulina polilepis*: effect of cell concentration, growth phase and pH. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **216**: 67-81.
- Sellner K.G., Doucette G.J., Kirkpatrick G.J. 2003. Harmful algal blooms: causes, impacts and detection. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 383-406.
- 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.
- Simonini R., Orlandi M., Abbate M. 2011. Is the toxic dinoflagellate *Ostreopsis cf. ovata* harmful to Mediterranean benthic invertebrates? Evidences from ecotoxicological tests with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Marine Environmental Research* **72**: 230-233.
- Smayda T.J. 1990. Novel and nuisance phytoplankton blooms in the sea: Evidence for a global epidemic. In: “Granéli E., Sundström B., Edler L., Anderson D.M. (eds). Toxic marine phytoplankton.” Elsevier, New York, pp. 29-40.
- Smayda T.J. 1997. Harmful algal blooms. Their ecophysiology and general relevance to phytoplankton blooms in the sea. *Limnol. Oceanogr.* **42**(5, part 2): 1137-1153.
- Sosa S., Del Favero G., De Bortoli M., Vita F., Soranzo M.R., Beltramo D., Ardizzone M., Tubaro A. 2009. Palytoxin toxicity after acute oral administration in mice. *Toxicology Letters* **191**: 253–259.
- Srivastava A., Jüttner F., Strasser R.J. 1998. Action of the allelochemical, fischerellin A, on photosystem II. *Biochim Biophys Acta.* **1364**(3):326-336.
- Steidinger K.A., Garcés E. 2006. Importance of life cycles in the ecology of harmful microalgae. In: “Ecology of harmful algae”. Granéli E., Turner J.T (Eds.). Ecological Studies, Vol 189. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, pp 37-52.

- Stolte W., Karlsson C., Carlsson P., Granéli E. 2002. Modeling the increase of nodularin content in Baltic Sea *Nodularia spumigena* during stationary phase in phosphorus-limited batch cultures. *FEMS Microbiology Ecology* **41** (2002) 211-220.
- Sugg L.M., VanDolah 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 effects of the Baltic cyanobacteria *Nodularia spumigena*, *Aphanizomenon flos-aquae* and *Anabaena lemnermanii* on algal monocultures. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **308**: 85-101.
- Sun J., Liu D. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *J. Plankton Res.* **25**: 1331-1346.
- Tang Y. 1995. The allometry of algal growth rates. *J. Plankton Res.* **17**: 1325-1335.
- Tang Y.Z., Gobler C.J. 2010. Allelopathic effects of *Cochlodinium polykrikoides* isolates and blooms from the estuaries of Long Island, New York, on co-occurring phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* **406**: 19-31.
- Thronsen J. 1978. Preservation and storage. In: "Sournia, A. (Ed.), *Phytoplankton Manual*". UNESCO, Paris, pp. 69-74.
- 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., John U., Krock B., Cembella A. (2008). Allelopathic effects of bioactive compounds produced by harmful algae. In: Moestrup Ø *et al.* (eds) *Proceedings of the 12th international conference on harmful algae*. International society for the study of harmful algae and intergovernmental oceanographic commission of UNESCO, Copenhagen, p 12-18.
- Tindall D.R., Miller D.M., Bomber J.W. 1989. Culture and toxicity of dinoflagellates from ciguatera endemic regions of the world. *Toxicon* **27**: 83.
- Tognetto L., Bellato S., Moro I., Andreoli C. 1995. Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. *Botanica Marina* **38**: 291-295.
- Torigoe K., Murata M., Yasumoto T. 1988. Proocentrolide, a toxic nitrogenous macrocycle from a marine dinoflagellate. *Journal of the American Chemical Society* **110**: 7876-7877.
- 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**: 233-239.

Toyofuku H. 2006. Joint FAO/WHO/IOC activities to provide scientific advice on marine biotoxins (research report). *Marine Pollution Bulletin* **52**: 1735-1745.

Tredici M.R. 2006. Colture massive di microalghe: calamità o risorsa? Dipartimento di Biotecnologie Agrarie - Università degli Studi di Firenze, P.le delle Cascine, 24 (da una lettura tenuta in occasione della giornata di studio dedicata a: “Coltura massiva delle microalghe: il contributo della scuola fiorentina” - Accademia dei Georgofili, Firenze, 30.11.2006).

Unesco (1985). The International System of Units (SI) in Oceanography. *Tech. Pap. Mar. Sci.*, **45**: 124 pp.

Ungaro N. 2005. Il caso Puglia: fioriture di Dinoflagellate del genere *Ostreopsis* nelle acque costiere dell'Adriatico Pugliese. Seminario Internazionale “*Ostreopsis*: problema per il Mediterraneo?” Genova il 5 dicembre 2005.

UNI EN 15204 – Water quality – Guidance standard on the enumeration of phytoplankton using inverted microscopy (Utermöhl technique). Agosto 2006.

Vanucci S., Pezzolesi L., Pistocchi R., Ciminiello P., Dell'Aversano C., Dello Iacovo E., Fattorusso E., Tartaglione L., Guerrini F. 2012. Nitrogen and phosphorus limitation effects on cell growth, biovolume, and toxin production in *Ostreopsis* cf. *ovata*. *Harmful Algae* **15**: 78-90.

Vila M., Garcés E., Masò M. 2001. Potentially toxic epiphytic dinoflagellate assemblages on macroalgae in NW Mediterranean. *Aquat. Microbiol. Ecol.* **26**: 51-60.

Walker D. 1987. Fluorescence. In: “Walker D. (Ed) The Use of Oxygen Electrode and Fluorescence Probes in Simple Measurements of Photosynthesis”. University of Sheffield Print Unit, Sheffield, U.K., 145 pp.

White S., Anandraj A., Bux F. 2011. PAM fluorometry as a tool to assess microalgal nutrient stress and monitor cellular neutral lipids. *Bioresource Technology* **102**: 1675-1682.

Willis R.J. 2007. The history of allelopathy. Springer, The Netherlands, pp. 273-275.

Woch M. 2006. Suivi au Phyto-PAM d'expériences mixtes d'enrichissements et d'opacifications des communautés phytoplanctoniques du réservoir de Loumbila (Burkina Faso). Stage Professionnel, Licence Génie de l'Environnement, 2005-2006, Institut Universitaire Professionnalisé, Université Paris 7.

Wolfe G.V. 2000. The chemical defense ecology of marine unicellular plankton: constraints, mechanisms, and impacts. *Biol. Bull.* **198**: 225-244.

Wu C.H. 2009. Palytoxin: Membrane mechanisms of action. *Toxicon* **54**: 1183–1189.

Yasumoto T., Underdahl B., Aune T., Hormazabal V., Skulberg O.M., Oshima Y. 1990. Screening for haemolytic and ichthyotoxic components of *Chrysocromulina polylepis* and *Gymnodium aureolum* from Norwegian coastal waters. In: Granéli E., Sundström. Elder L.,

Anderson D.M. (Eds.). Toxic Marine Phytoplankton. Elsevier, New York, USA, pp. 436-440.

Yasumoto T., Igarashi T., Satake M. 2001. Chemistry of phycotoxins-Structural elucidation. In: "De Koe W.J., Samson R.A., Van Egmond H.P., Gilbert J., M. Sabino, eds. Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium". *Proceedings of the X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* (May 2000, Guarujá, Brazil), pp. 465-474. Wageningen, the Netherlands, Ponsen and Looyen.

Zingone A., Oksfeldt Enevoldsen H. 2000. The diversity of harmful algal blooms: a challenge for science and management. *Ocean & Coastal Management* **43**: 725-748.

Zingone A., Percopo I. 2006. In: "Guida al riconoscimento del plancton dei mari italiani". Vol. 1. Fitoplancton. A cura di Avancini M., Cicero A.M., Di Girolamo I., Innamorati M., Magaletti E., Sertorio Zunini T. Ministero dell'Ambiente della Tutela del Territorio e del Mare e ICRAM. Arti Grafiche Agostini, Roma, pp. 259-263.

RINGRAZIAMENTI

I miei più sinceri ringraziamenti:

- alla relatrice, Prof.ssa Rossella Pistocchi, e alla correlatrice, Dott.ssa Franca Guerrini;
- alle dott.sse Laura Pezzolesi, Giulia Samorì, ad Annalisa e a tutto lo staff della sezione di Algologia del CIRSA;
- a tutti i docenti del corso di laurea magistrale in Biologia Marina e al personale tecnico e amministrativo della sede di Ravenna;
- al controrelatore, Prof. Giorgio Sartor;
- ai compagni di corso, cui auguro un futuro sereno e colmo di soddisfazioni;
- al Prof. Roberto Rosmini, responsabile del Servizio di Igiene e Tecnologia Alimentare del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie e a tutti i colleghi di Ozzano, in particolare la Dott.ssa Augusta Zannoni, la Prof.ssa Marcella Spinaci e le colleghe della Sezione di Fisiologia Veterinaria per la parte di microscopia, al Dott. Gian Marco Baranzoni per la statistica;
- alla mia famiglia: a mio padre e a mia madre che mi hanno sostenuto, a mio figlio che mi ha aiutato nello studio, a mio marito che mi ha accompagnata negli spostamenti;
- a tutti coloro che mi hanno aiutato a completare questa avventura;
- al piccolo pianeta che supporta la nostra ormai ingombrante presenza e alla stella che fornisce energia alla sua straordinaria biodiversità.