

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E  
NATURALI

Corso di laurea magistrale in BIOLOGIA MARINA

**Relazione tra crescita, produzione di tossine e variazione dei  
principali componenti cellulari nella dinoflagellata**

*Ostreopsis cf. ovata*

Relatore:

Prof.ssa Rossella Pistocchi

Presentata da:

Francesca Fratangeli

Correlatore:

Dott.ssa Laura Pezolesi

(II sessione)

Anno Accademico 2011/2012



*A mia madre...la mia vita*  
*A mio padre...il mio sorriso*  
*A mio nonno...la mia forza*



# INDICE

INTRODUZIONE.....	7
<i>1. HABs: Harmful Algal Blooms</i> .....	9
1.1 SVILUPPO DI UN BLOOM.....	12
1.2 PRODUZIONE DI TOSSINE: EFFETTI E PREVENZIONE.....	14
<i>2. SPECIE OGGETTO DELLA RICERCA</i> .....	18
2.1 LE DINOFLAGELLATE.....	18
2.2 LA FAMIGLIA OSTREOPSIDACEAE.....	23
2.2.1 <i>Ostreopsis ovata</i> (Fukuyo, 1981).....	24
2.3 FATTORI CHE INFLUENZANO I BLOOM DI <i>Ostreopsis ovata</i> .....	29
<i>3. LA FAMIGLIA DELLE PALITOSSINE</i> .....	33
<i>4. COSTITUENTI CELLULARI</i> .....	38
SCOPO DELLA TESI.....	41
MATERIALI E METODI.....	45
<i>5. COLTURE ALGALI BATCH</i> .....	47
5.1 PREPARAZIONE DEL TERRENO E INOCULO.....	48
5.2 DESCRIZIONE E ALLESTIMENTO DELL'ESPERIMENTO.....	50
<i>6. VALUTAZIONE DELLA CRESCITA: CONTEGGI, CURVA DI CRESCITA E BIOVOLUMI</i> .....	52
6.1 CURVA DI CRESCITA.....	54
6.2 BIOVOLUMI.....	56
6.3 METODO DELLA DETERMINAZIONE DELLA CLOROFILLA.....	57
<i>7. NUTRIENTI</i> .....	59
7.1 ANALISI NITRATI.....	59
7.2 ANALISI FOSFATI.....	61
<i>8. DETERMINAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DELLE TOSSINE</i> .....	62
<i>9. DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE CON IL METODO DEL LOWRY</i> .....	63
<i>10. ESTRAZIONE DEI POLISACCARIDI</i> .....	65
<i>11. ESTRAZIONE DEI LIPIDI</i> .....	66

<i>12. ANALISI ELEMENTARE (CHN)</i> .....	67
<i>13. FOSFORO INTRACELLULARE</i> .....	67
RISULTATI.....	69
<i>14. CURVA DI CRESCITA</i> .....	71
<i>15. NUTRIENTI</i> .....	73
<i>16. BIOVOLUMI</i> .....	76
<i>17. CLOROFILLA a</i> .....	79
<i>18. PROTEINE</i> .....	81
<i>19. POLISACCARIDI</i> .....	83
<i>20. LIPIDI</i> .....	87
<i>21. ANALISI ELEMENTARE (CHN)</i> .....	88
<i>22. FOSFORO INTRACELLULARE</i> .....	90
<i>23. TOSSINE</i> .....	91
CONCLUSIONI.....	95
BIBLIOGRAFIA .....	99
RINGRAZIAMENTI.....	121

# **INTRODUZIONE**



## ***1. HABs: Harmful Algal Blooms***

Con il termine HABs (Harmful Algal Blooms) indichiamo fioriture di microalghe che direttamente o indirettamente sono pericolose per la salute umana e per l'ecologia di una regione (Anderson 1994; Hallegraeff 1995). Negli ultimi anni questo problema è diventato molto frequente e, per tale motivo, si è cercato di investigare sulle cause di questo fenomeno. Non è facile individuare la causa della nascita di una fioritura algale, in quanto dipende da diversi fattori sia biotici che abiotici. Delle 4000 specie di microalghe marine identificate, circa 200 causano eventi negativi e circa 80 (soprattutto dinoflagellate) sono produttrici di tossine (Zingone and Enevoldsen, 2000; Smayda and Reynolds, 2003). Tuttavia il numero delle specie dannose tende ad aumentare.

I sistemi costieri sono soggetti ad una varietà di problemi ambientali, inclusa la perdita di habitat a seagrasses, degradazione e distruzione delle barriere coralline (coral reef), perdita della qualità delle acque costiere ad uso ricreazionale, morte di mammiferi marini, cambiamenti della colorazione delle acque, morie di pesci e avvelenamento da molluschi. Le ultime cinque problematiche possono essere attribuite agli Harmful Algal Blooms (HABs). Questo termine è stato introdotto per la prima volta nel 1974 (1st International Conference of blooms of dinoflagellates) (Maso and Garcés, 2006). Il termine HABs viene usato per un ampio range di fenomeni differenti. In primo luogo perché le microalghe responsabili del fenomeno appartengono a diversi gruppi algali, in particolare diatomee, dinoflagellate, aptofite, rafidofite, cianofite e pelagofite, le quali differiscono per caratteristiche morfologiche, fisiologiche ed ecologiche (Zingone and Enevoldsen, 2000; Gracés et al., 2002). Un bloom fitoplanctonico (conosciuto anche come "red tide" per causare la discolorazione dell'acqua), viene considerato come un incremento repentino nella popolazione di microalghe che ha riscontrato condizioni idonee per la crescita e che, insieme alle loro strategie adattative (migrazioni, nuoto attivo nella colonna d'acqua) e ad appropriate condizioni fisiche, possono raggiungere una elevata concentrazione (e.g.  $10^4$ - $10^5$  cell mL<sup>-1</sup>), durante un certo periodo di tempo (solitamente 1-3 settimane) (Maso and Garcés, 2006). Una proliferazione di questo tipo può essere caratterizzata dalla dominanza di una particolare specie (bloom monospecifico) o da un gruppo di specie.

Le specie che causano bloom dannosi possono essere suddivisi in due principali gruppi: i produttori di tossine e i produttori di elevata biomassa. Alcune specie che causano HABs possono essere collegate ad entrambe le caratteristiche.

Le specie che producono tossine causano danni alla salute umana come biointossicazioni per consumo di molluschi o pesci tropicali, problemi respiratori (tramite l'aerosol) o irritazione alla pelle; alcune sindromi possono addirittura essere letali. Le specie che producono elevata biomassa invece, possono determinare danni all'ecosistema e alle attività ricreative. Per quanto riguarda i danni all'ecosistema marino possiamo parlare di anossia, danni meccanici, cambiamento della comunità presente e della rete trofica; per l'impatto sul turismo e sull'uso ricreazionale della costa invece, dobbiamo parlare di discolorazione delle acque, cattivi odori, accumulo di schiuma o di sostanza mucosa (Garcés et al., 1999). Gli eventi invece caratterizzati da elevata biomassa e produzione di tossine sono solitamente associati a impatto sulle risorse marine viventi ovvero a morie di pesci dovute a tossicità diretta o ad effetti emolitici.

Le cause scatenanti i bloom algali possono essere ricercate in fattori naturali, umani e nella loro interazione. Sono pertanto implicati elementi biologici, fisici e chimici.

Possiamo suddividere gli effetti negativi delle microalghe marine in quattro categorie:

- Rischi per la salute umana: alcune tossine prodotte da microalghe riescono a raggiungere l'uomo mediante organismi vettori che accumulano al loro interno le sostanze tossiche, ma anche tramite inalazione di aerosol e contatto. Alcune sindromi, come detto in precedenza, possono addirittura essere letali. Le specie algali con maggior tossicità sono state individuate tra le dinoflagellate ma anche un elevato numero di diatomee e cianobatteri producono sostanze neurotossiche che possono nuocere alla salute umana. Negli ultimi decenni, ogni anno sono stati riportati circa 2000 casi di intossicazioni umane (con un tasso di mortalità del 15%) a causa del consumo di molluschi o pesce tossico (anche se probabilmente tale valore è sottostimato per diagnosi errate) (Hallegraeff et al., 2003);

- Impatti sugli organismi marini: le microalghe che causano HABs colpiscono pesci e altri invertebrati marini non solo con la produzione di tossine, ma anche con la formazione di mucillagini e con particolari appendici spinose delle cellule che possono causare l'ostruzione e addirittura lesioni alle branchie. Sono inoltre responsabili di casi di anossia e ipossia che hanno portato ad un alto tasso di moria di specie economicamente importanti (Matthews and Pitcher, 1996);

- Impatti su turismo e sull'uso ricreazionale delle coste: le fioriture algali causano le cosiddette maree rosse (red tides) che, oltre ad abbassare la qualità delle acque, possono

anche causare problemi di salute ponendo quindi un limite all'uso ricreazionale delle zone costiere (Garcés et al., 1999);

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

I bloom algali sono fenomeni naturali che avvengono in varie parti del mondo sin da tempi antichi, tuttavia vi sono cause scatenanti che sembrano più frequenti in certe zone. L'aumento degli HABs nelle acque costiere di tutto il mondo è stato spesso associato a nutrienti derivanti da attività antropiche (Hallegraeff, 1993; Smayda, 1989). In laboratorio è facile dimostrare un aumento della crescita delle alghe con l'aumento della disponibilità di nutrienti. Tuttavia non è così semplice dimostrare la relazione diretta tra la diffusione di HABs e fenomeni di eutrofizzazione nel mare. Bloom ad elevata biomassa richiedono ovviamente elevati livelli di nutrienti, tuttavia un elevato apporto di nutrienti non favorisce necessariamente le specie dannose. L'abbondanza di nutrienti potrebbe stimolare lo sviluppo di fioriture di diatomee, flagellate o dinoflagellate opportunistiche non tossiche che potrebbero competere con specie tossiche. Anche comportamenti specializzati, come quelli di mixotrofi facoltativi o obbligati (Stoecker, 1999; Granéli and Carlsson, 1998), o la capacità di migrazioni verticali in strati d'acqua più ricchi di nutrienti (Hasle, 1950; Villarino et al., 1995) rappresentano strategie di grande successo per far fronte alla separazione verticale di luce e nutrienti nelle acque stratificate. Non solo un aumento di nutrienti può favorire alcune specie a discapito di altre, ma anche uno squilibrio degli stessi (Hodgkiss, 1997; Bulgakov and Levich, 1999). Poiché l'eutrofizzazione provoca un aumento di azoto e fosforo, il rapporto di questi nutrienti rispetto ai silicati diventa molto alto, favorendo la presenza di altre specie (non di diatomee), tra cui alcune nocive/tossiche (Smayda, 1989).

## 1.1 SVILUPPO DI UN BLOOM

E' molto difficile trovare meccanismi di sviluppo di un bloom algale che abbiano una validità generale, in quanto variano a seconda delle caratteristiche intrinseche della specie coinvolta. Inoltre alcune specie possiedono ecotipi o criptospecie che presentano meccanismi di crescita diversi da luogo a luogo. In molti casi due sono gli elementi principali associati con l'instaurarsi di un bloom:

1. Germinazione delle cisti sul fondo dovuta ad aumento di temperatura o all'instaurarsi di condizioni favorevoli;
2. Crescita dovuta a fattori nutrizionali uniti ad altre condizioni tipiche delle dinamiche di popolazione (competizione, predazione, decomposizione batterica).

A volte si può avere aggregazione della popolazione fitoplanctonica anche per cause oceanografiche o meteorologiche.

Indipendentemente dalla biomassa, una fioritura, passa solitamente attraverso degli stadi sequenziali di sviluppo: inizio, crescita e mantenimento, dispersione e terminazione (Steidinger and Garcés, 2006).

INIZIO: nella fase iniziale di sviluppo di un bloom è necessario un inoculo di cellule, altrimenti non si può avere un incremento della popolazione.

Smayda e Reynolds (2003) hanno diviso queste cellule in tre categorie:

- Oloplanctoniche: la popolazione di partenza esiste tutto l'anno a basse concentrazioni e tollera un ampio range di temperature;
- Meroplanctoniche: durante l'anno si alternano forme planctoniche e stadi di resistenza o di cisti bentoniche;
- Popolazioni trasportate: provengono da altre zone e rappresentano per lo più lo stadio finale di un bloom.

Inoltre entrano in gioco una complessità di fattori, che comprendono la natura della specie interessata, le variazioni di fattori quali temperatura e salinità, clima e disponibilità di nutrienti. Tale fenomeno è influenzato anche dalle attività antropiche, dall'eccessiva urbanizzazione, dal sovrasfruttamento delle risorse ittiche, dal trasferimento di specie da una zona all'altra.

CRESCITA E MANTENIMENTO: il ciclo vitale include strategie di crescita per sfruttare ambienti diversi in tempi diversi. Differenti gruppi di microalghe e le varie specie hanno adattamenti specifici. Tipicamente, durante la crescita la forma vegetativa asessuale aploide o diploide della microalga è la fase di risposta alle condizioni

ambientali e la crescita delle microalghe, insieme all'aumento della biomassa della popolazione, avviene proprio a carico di tali stadi (Steidinger and Garcés, 2006). Il mantenimento o accumulo di biomassa invece, è influenzato da fattori fisici o chimici che aumentano la velocità di crescita e/o ne limitano la dispersione.

Per l'aumento numerico di cellule sono necessari i nutrienti, mentre i fattori di perdita come grazing, sedimentazione, lisi cellulare, trasporto, devono essere minori della velocità di crescita.

**DISPERSIONE E TERMINAZIONE:** differenti stadi vitali e cicli vitali consentono alle specie di aumentare la loro tolleranza alle condizioni ambientali, la distribuzione e la sopravvivenza. In genere la terminazione di un bloom viene attribuita a fattori quali: limitazione da nutrienti, grazing, dispersione, transizione a stadi vitali diversi (formazione di cisti) e morte cellulare programmata (Steidinger and Garcés, 2006).

## 1.2 PRODUZIONE DI TOSSINE: EFFETTI E PREVENZIONE

Le tossine prodotte da specie algali nocive comprendono un ampio spettro di composti, che variano per dimensione, con pesi molecolari da alcune centinaia ad oltre 1.000 Da, e in solubilità, da idrosolubile a liposolubile. Queste determinano nell'uomo, in seguito al consumo di prodotti ittici e non solo, una serie di quadri clinici patologici noti con il termine di biointossicazioni. Tali molecole vengono prodotte principalmente da organismi fitoplanctonici e fitobentonici ma anche da batteri, che attualmente rappresentano uno degli aspetti più importanti e discussi in quanto coinvolti nella produzione e/o origine di queste molecole. Esse manifestano il loro effetto come tali o attraverso le trasformazioni metaboliche che si possono verificare nei vari passaggi della catena alimentare. I vettori più comuni delle biointossicazioni sono i molluschi bivalvi; questi sono organismi filtratori in grado di accumulare quantità elevate di tossine, risentendo solo di effetti marginali. Ci sono anche casi di intossicazione dovuti a pesci, che accumulano le tossine lungo la catena alimentare. Le biotossine non si trovano solo nelle specie algali che le producono, ma anche in una varietà di altri organismi acquatici o nelle reti alimentari marine come risultato dei processi di trasferimento trofico (Scholin et al., 2000). In quest'ultimo caso, una tossina può essere metabolizzata o biotrasformata in un composto strutturalmente diverso che può essere di tossicità superiore o inferiore rispetto alla molecola della tossina originale. Diversi studi hanno infatti evidenziato l'importanza dei processi di biotrasformazione delle tossine algali da parte dei molluschi e dei pesci; infatti è stato dimostrato che il metabolismo di questi animali può modificare la struttura chimica della tossina, determinando un cambiamento dell'effetto tossico, fino a renderla 40 volte più potente (Ade et al., 2003). Le tossine prodotte dalle dinoflagellate marine sono i più potenti composti non proteici conosciuti (Anderson and Lobel., 1987; Steidinger, 1983; Steidinger and Baden, 1984). Le biotossine marine, pur essendo un gruppo di composti strutturalmente diversi fra di loro, hanno alcune caratteristiche comuni. In genere sono stabili al calore e in ambiente acido, questo comporta che la cottura dei frutti di mare o del pesce non elimina il rischio di intossicazione e che i succhi gastrici dello stomaco non modificano e non eliminano la tossina, che viene in genere assorbita a livello intestinale.

Come detto in precedenza le biotossine marine variano in base alla loro solubilità e per tale motivo una prima suddivisione di questi composti può essere fatta in base a questa caratteristica: biotossine idrosolubili e biotossine liposolubili (Poletti et al., 2003). Ad

oggi la classificazione di queste molecole rimane piuttosto discussa. Per molto tempo sono state classificate sulla base dei sintomi clinici che provocavano in:

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

Tuttavia tale classificazione è piuttosto discussa, in quanto alcuni composti sono stati erroneamente inseriti in un gruppo solo per la loro presenza in concomitanza di altre tossine note, anche se i sintomi e la chimica delle molecole sono differenti. Per tale motivo sarebbe preferibile suddividere le biotossine in gruppi che si basano sulla loro struttura chimica. Nel 2006 venne proposta la seguente classificazione (Toyofuku, 2006; Tubaro et al., 2007):

- Saxitoxin group (STX)
- Okadaic acid group (OA)
- Pectenotoxin group (PTX)
- Yessotoxin group (YTX)
- Domoic acid group (DA)
- Brevetoxin group (BTX)
- Azaspiracid group (AZA)
- Ciguatera group
- Cyclic imine group

Le tossine sono metaboliti secondari, che differiscono per struttura, composizione atomica e attività funzionale (Granéli and Flynn, 2006). Il tasso di sintesi delle tossine dipende dal metabolismo dei metaboliti primari che sono loro precursori. A sua volta, la sintesi dei metaboliti primari varia con lo stress da nutrienti, con il ciclo cellulare e le fasi del ciclo vitale (Flynn and Flynn, 1995). In generale, cambiamenti nel contenuto di tossine sono associati con disturbi (squilibri) fisiologici o con l'entrata in fase stazionaria (Anderson 1994; Flynn et al., 1994, 1996; Johansson and Granéli 1999a,

1999b; Granéli et al., 1998; Edvardsen et al., 1990, cited in Granéli et al., 1998).

Lo stimolo alla produzione di tossine in molte specie è ancora sconosciuto (Katircioglu et al., 2004) e, per tale motivo, si cerca di simulare in laboratorio i parametri ambientali a cui sono sottoposte le microalghe e studiare gli effetti conseguenti che si hanno sulla produzione di tossine da parte delle stesse.

Da tutto ciò risulta evidente come l'unico mezzo che si possiede per proteggere l'uomo e l'ambiente dagli effetti dannosi delle tossine algali consiste nel monitoraggio costante e nell'applicazione di normative per regolare la vendita dei molluschi e del pesce pescati a livello globale. Il commercio dei frutti di mare è diffuso in tutto il mondo e soltanto in Europa risultano essere consumati circa 12 miliardi di pesce all'anno, che comprende il pescato europeo e le importazioni (Whittle et al., 2000). Il rischio di intossicazione viene ridotto grazie alla regolamentazione che stabilisce le norme sanitarie per la produzione e la commercializzazione dei molluschi. Inoltre è essenziale stabilire dei metodi di monitoraggio internazionali e formare personale competente che sappia identificare le specie algali tossiche (Toyofuku, 2006). I controlli vengono effettuati da Laboratori Nazionali incaricati e coordinati dal Centro Ricerche Marine di Cesenatico. Quest'ultimo svolge i propri compiti istituzionali assistendo il Ministero della Salute nell'organizzazione del sistema di controllo delle Biotossine Marine, organizzando e coordinando le attività di ricerca e di monitoraggio dei Laboratori Nazionali incaricati dell'analisi e del controllo delle Biotossine Marine, partecipando ad incontri internazionali coordinati dal Laboratorio Comunitario di Riferimento.

La normativa Italiana stabilisce che i molluschi destinati al consumo umano possono contenere biotossine algali in specifiche quantità:

- PSP in quantità non superiori a 800 µg/kg di sostanza edibile mollusco;
- DSP: 160 µg/kg;
- YTXs: 1 mg/kg;
- AZA: 160 µg/kg;
- Acido domoico: 20 mg/kg.

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

- LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level): è la più piccola dose di una sostanza che provoca un effetto dannoso alla salute della persona o di un animale;
- NOAEL (No Observed Adverse Effect Level): è la dose più elevate di una sostanza che non produce un effetto dannoso alla salute della persona o di un animale;
- acute RfD (acute reference dose): la dose acuta di riferimento è una stima

dell'ammontare di una sostanza, o tossina, nel cibo, normalmente espressa in peso corporeo, che può essere ingerita in 24 ore, o in minor tempo, senza un effetto apprezzabile nel consumatore. Per il calcolo di questi valori si considera un individuo di 60 kg;

- fattore di sicurezza: è un valore di sicurezza che viene usato come divisore del LOAEL e del NOAEL per calcolare l'acute RfD;

- il limite guida in relazione alla parte edibile assunta, è la quantità di tossina massima che può essere presente nella parte edibile del mollusco (Ade et al.2003).

Per quanto riguarda i metodi per l'analisi delle tossine algali in estratti riportiamo:

- Saggio biologico su mammiferi (topo o ratto) e altri saggi "in vivo";
- Metodi chimico-fisici (HPLC; LC-MS);
- Test in vitro (Metodi strutturali e Metodi funzionali).

Il saggio biologico su mammiferi (topo o ratto) è stato il metodo obbligatorio per legge fino al 2011, mentre ora viene eseguito solo in alcuni casi: da laboratori che si stanno adeguando alla nuova alternativa, in casi di contestazione e per evidenziare eventuali nuove tossine con controlli saltuari.

I saggi tossicologici permettono di indicare le concentrazioni di tossine alle quali si può manifestare un effetto, distinguendo fra breve e lungo termine. Per le tossine marine, di cui si sa ancora poco, i limiti di legge attuali sono stati determinati principalmente con il test biologico sul topo. Dove possibile, i risultati dei test sono stati integrati con i dati bibliografici riguardanti i casi di intossicazione (Toyofuku, 2006; Tubaro et al., 2007).

## **2. SPECIE OGGETTO DELLA RICERCA**

### **2.1 LE DINOFLAGELLATE**

Le dinoflagellate sono organismi per lo più di ambiente marino o di estuario (le specie costiere e di estuario hanno caratteristiche eurialine); delle circa 2000 specie note, solo 250-300 sono di acqua dolce. Sono produttori primari dominanti degli oceani tropicali e subtropicali e nelle zone temperate, e sono abbondanti in tarda primavera-estate. Per lo più prediligono il clima caldo ma vi sono specie che proliferano in primavera-autunno. Si adattano bene a bassa intensità luminosa aumentando la quantità delle unità fotosintetiche. Si ritenevano poco tolleranti invece alla turbolenza, ma studi recenti indicano che valori pari a quelli presenti in condizioni naturali non influenzano la crescita.

Le cellule delle dinoflagellate si muovono in risposta a stimoli chimici, gravità e luce; inoltre le migrazioni verticali sono regolate da ritmi circadiani. Questo permette alle specie fotosintetiche di spostarsi in acque basse durante il giorno e in quelle più profonde di notte, traendone vantaggio sia per la nutrizione che per l'assorbimento dei nutrienti.

Molte dinoflagellate hanno dimensioni più grandi degli altri organismi fitoplanctonici e questo implica un rapporto superficie/volume basso con una conseguente scarsa affinità per i nutrienti, da una parte, e una possibilità di costituire riserve ed avere una velocità di crescita lenta, dall'altra.

Si pensa che tutte le specie fotosintetiche siano in realtà mixotrofe. Le specie autotrofe sono comunque auxotrofe in quanto richiedono vitamine prodotte da altri organismi, mentre circa la metà delle specie sono eterotrofe obbligate (di acqua dolce e marine, fotosintetiche e senza pigmenti). Notevole è il fatto che all'interno delle dinoflagellate troviamo una piccola percentuale di specie dannose (~185) poiché producono potenti tossine (~60) e sostanze bioattive nei confronti di altri organismi. Inoltre sono predatori o parassiti di pesci in cui causano morte o malattia, determinano anossia, producono mucillagini, rilasciano grandi quantità di ammonio e producono danni meccanici alle branchie tramite le spine (estroflessioni della parete).

Le specie dannose sono per lo più planctoniche, mentre le specie bentoniche fino a poco tempo fa erano associate solo alla sindrome ciguatera.

Caratteristiche peculiari delle dinoflagellate consistono nella forma delle cellule e nel rivestimento detto amphiesma. Il rivestimento è formato da un singolo strato di vescicole appiattite poste sotto la membrana plasmatica. Nelle forme tecate dentro le vescicole ci sono placche di cellulosa e, se questa non è presente, si hanno le cellule atecate o nude. La presenza/assenza, il numero, la disposizione e la morfologia delle placche sono un carattere molto importante per la classificazione (Boni et al., 2005).

Le dinoflagellate (Fig. 1) sono caratterizzate dall'aver due flagelli, spesso organizzati in uno trasversale e in uno longitudinale. Il flagello trasversale è situato in un solco della cellula detto cingulum e, il corrispondente flagello longitudinale è situato invece in un solco conosciuto anche come sulcus. Il pattern tecale divide la cellula in due parti ben distinte: l'epicono o epiteca è la parte superiore, che in alcune specie può essere molto ridotta; l'ipocone o ipoteca è la parte inferiore. La relazione tra ipoteca e epiteca in termini di forma, dimensione, ornamentazione, e struttura della superficie è un'importante caratteristica nella morfologia tassonomica (Janson and Hayes, 2006).

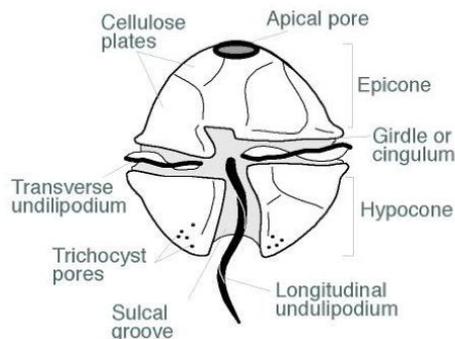


Fig. 1. Struttura di una dinoflagellata.

Generalmente per identificare le dinoflagellate ci si basa sulla forma della cellula e sulle caratteristiche del rivestimento. Possiamo distinguere 4 tipologie di cellula (Fig. 2): cellula desmoconte; cellula dinoconte; cellula peridinoide tecata; cellula gimnodinoide atecata.

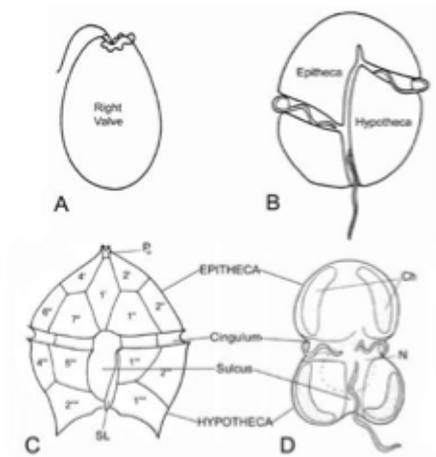


Fig. 2. A: cellula desmoconte; B: cellula dinoconte; C: cellula peridinoide tecata; D: cellula gimnodinoide atecata.

L'identificazione assume un ruolo molto importante, considerando che un vario numero di specie può produrre tossine, pericolose anche per l'uomo, causare colorazione delle acque (rosso, giallo, bruno) e mucillagini, determinando gravi problemi agli organismi marini.

Per quanto riguarda la composizione cellulare, solo il 50% delle dinoflagellate possiede cloroplasti e questi risultano acquisiti da endosimbionti diversi. Nella maggior parte dei casi sono presenti clorofilla a e c2 e una xantofilla caratteristica, la peridina. Altre dinoflagellate hanno pigmenti caratteristici delle alghe verdi, delle criptofite e eterocontofite e quindi assumono altri colori.

I nuclei, benché aploidi, contengono un'elevata quantità di DNA di cui molto è geneticamente inattivo. Per la sua organizzazione peculiare il nucleo viene detto mesocariote.

I cromosomi sono sempre condensati, mancano gli istoni e hanno una bassa quantità di proteine basiche. Inoltre hanno una struttura striata dovuta a filamenti paralleli di DNA che formano dischi impilati; alla periferia dei dischi ci sono anse di DNA meno compatte che rappresentano le regioni trascritte.

Per quanto riguarda la riproduzione, le dinoflagellate hanno un ciclo monogenetico aplonte, pertanto la meiosi avviene dopo la formazione dello zigote. Normalmente le cellule si dividono molte volte per mitosi. La mitosi inoltre presenta caratteristiche particolari:

- La membrana nucleare persiste per tutto il processo di divisione;
- Il fuso mitotico è extranucleare;
- Manca la tipica piastra metafasica degli eucarioti;

- I cromosomi si attaccano alla membrana nucleare durante la segregazione;
- Mancano il centriolo e la cromatina centromerica.

Il ciclo cellulare delle dinoflagellate è diviso nelle 4 fasi tipiche degli eucarioti (Fig. 3). Con il termine ciclo cellulare possiamo indicare la serie di eventi che avvengono a partire dal momento in cui una cellula si origina per divisione mitotica dalla cellula madre. Le 4 fasi (G1, S, G2 e M) procedono in sequenza controllata:

- fase G1 (gaps): crescita;
- fase S: duplicazione del DNA;
- fase G2: altri processi di crescita;
- fase M: mitosi.

L'entrata in stadi di quiescenza avviene durante la fase G1 (fase G0).

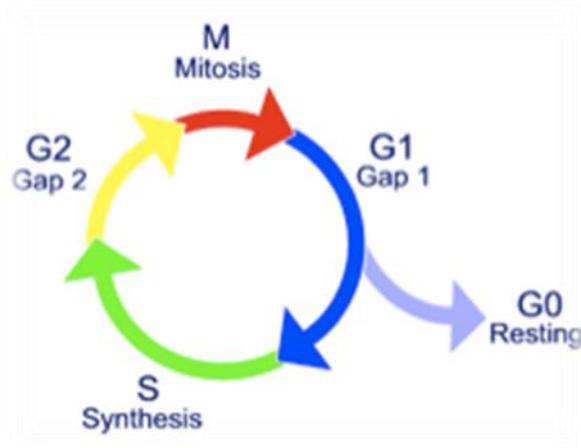


Fig. 3. Rappresentazione del ciclo cellulare: le fasi tipiche del ciclo (G1, S, G2, M, G0).

Inoltre il ciclo cellulare, è collegato al fotoperiodo per cui a volte le divisioni sono sincronizzate o programmate (<1 div/giorno) con il seguente andamento: all'inizio del giorno le cellule sono in G1; dopo almeno 6h inizia la fase S e continua per 12-14h. La mitosi inizia tra 18 e 22h dall'alba e il ciclo termina prima dell'inizio del giorno successivo. Molte cellule si dividono durante il periodo di buio, alcune alla luce, o in particolare nel passaggio buio-luce.

Per quanto riguarda la modalità di divisione della teca fra le cellule figlie, possiamo avere due modalità: in molte specie la teca viene ripartita tra le cellule figlie e poi ognuna rigenera successivamente la parte mancante; la teca può essere completamente persa (fenomeno che va sotto il nome di ECDISI), e ogni cellula figlia rigenera in seguito la teca.

Nella riproduzione sessuata invece, la formazione dei gameti può essere indotta dalle condizioni ambientali (bassa temperatura o carenza di azoto). I gameti sono più piccoli e hanno meno cloroplasti delle cellule vegetative e se non si fondono muoiono. Alla fine della fusione si forma una cellula simile a quella vegetativa con ancora due nuclei e tutti i flagelli. Abbiamo due tipologie di zigoti che seguono percorsi differenti: i planozigoti possono andare subito incontro a meiosi mentre altri si trasformano in ipnozigoti simili a cisti e, solo successivamente, si dividono per meiosi.

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, soprattutto per la terminazione di un bloom.

## 2.2 LA FAMIGLIA OSTREOPSIDACEAE

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

### 2.2.1 *Ostreopsis ovata* (Fukuyo, 1981)

Phylum: <b>Dinoflagellata</b>
Classe: <b>Dinophyceae</b>
Ordine: <b>Gonyaulacales</b> (Saldarriaga et al., 2004) o <b>Peridinales</b> (GenBank-Taxonomy)
Famiglia: <b>Ostreopsidaceae</b>
Genere: <b><i>Ostreopsis</i></b>
Specie: <b><i>ovata</i></b>

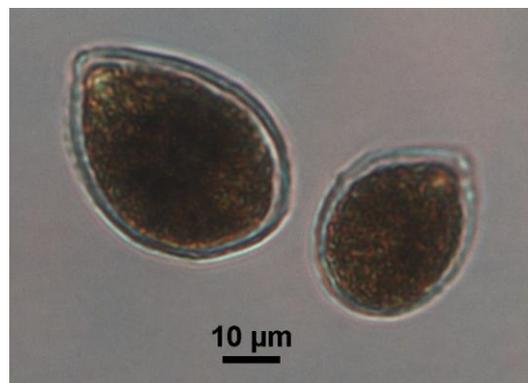


Fig. 4. *Ostreopsis ovata* osservata al microscopio ottico.

Il genere *Ostreopsis* (Dinophyceae, Ostreopsidaceae, Gonyaulacales) è stato descritto nel 1901 con la specie *O. siamensis* Schmidt (1901). Questo genere non ha ricevuto grande attenzione fino a quando gli studi tassonomici di Fukuyo (1981) hanno permesso di descrivere altre due specie: *O. ovata* Fukuyo (1981) and *O. lenticularis* Fukuyo (1981). Da allora altre sei nuove specie di *Ostreopsis* sono state aggiunte: *O. heptagona* Norris, Bomber and Balech (1985), *O. mascarenensis* Quod (1994), *O. labens* Faust and Morton (1995), *O. marinus* Faust (1999), *O. belizeanus* Faust (1999), e *O. caribbeanus* Faust (1999). La tassonomia delle specie di *Ostreopsis* è basata su caratteri morfologici, come il tipo di incisioni tecali, la forma e la dimensione (Penna et al., 2005). La tassonomia del genere *Ostreopsis* però ancora non risulta essere chiara (Rhodes et al. 2000, Vila et al. 2001). Nel Mar Mediterraneo sono state trovate solo due specie, *O. ovata* e *O. siamensis*, quasi tutte in coste rocciose, e *O. ovata* (Fig. 4) risulta essere la specie più comune e abbondante (Vila et al., 2011; Penna et al., 2005; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Turki et al., 2006; Battocchi et al., 2010; Totti et al., 2010; Accoroni

et al., 2011; Mangialajo et al., 2011). *O. ovata* e *O. siamensis* sono molto simili in forma, dimensioni e struttura delle piastre; il rapporto tra il diametro dorsoventrale/anteroposteriore (DV/AP) che è <2 e >4, rispettivamente (Penna et al., 2005; Aligizaki and Nikolaidis, 2006), è stato proposto come carattere distintivo. Quando si presentano in popolazioni miste è molto difficile se non impossibile distinguerle durante i conteggi e, per tale motivo, è necessario utilizzare anche metodi molecolari (Battocchi et al., 2010; Perini et al., 2011). E' stato dimostrato che le dimensioni delle cellule di *Ostreopsis* spp. possono variare nelle diverse fasi di crescita sia in condizioni naturali che in condizioni sperimentali (Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Guerrini et al., 2010). Tuttavia nonostante la presenza di diverse classi di dimensioni e morfologia appartenenti al genere *Ostreopsis* (Pin et al., 2001; Penna et al., 2005; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Rossi et al., 2010), fino ad ora sono state condotte raramente analisi morfologiche intraspecifiche.

Le specie appartenenti al genere *Ostreopsis* sono importanti nell'ambiente marino di coral reef sia subtropicale che tropicale, ma sono presenti anche nelle aree temperate, dove sono aumentate notevolmente negli ultimi dieci anni (Penna et al., 2012; Shears and Ross, 2012; Laza-Martinez et al., 2011; Mangialajo et al., 2011; Rhodes, 2011).

*Ostreopsis* cf. *ovata* è una dinoflagellata bentonica che vive associata ad una varietà di substrati bentonici abiotici e biotici (macroalghe, fanerogame marine, invertebrati bentonici, sabbia e rocce), ma può trovarsi anche libera nel plankton.

Le cellule di *O. ovata* hanno una forma paragonabile ad una goccia, ovali e assottigliate nella parte ventrale e appiattite in senso antero-posteriore. L'epiteca e l'ipoteca sono uguali in grandezza e la disposizione e la forma delle placche sono fondamentali nel riconoscimento (Fig. 5, 6). L'arrangiamento della teca è: **Po, 3', 7'', 6c, 6s, 5''''**, **1p, 2''''** (Faust and Gulladze, 2002).

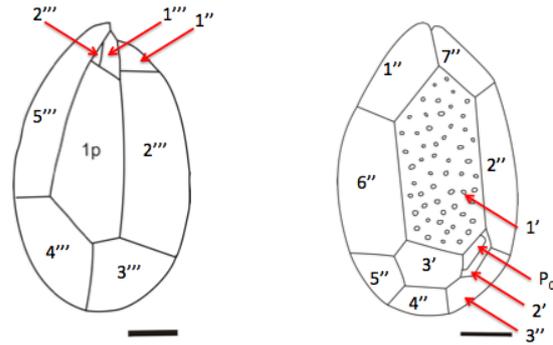


Fig. 5. Diagramma schematico di ipoteca e epiteca di *Ostreopsis ovata*. Scala barra = 10  $\mu\text{m}$  (Tomas et al., 1997) .

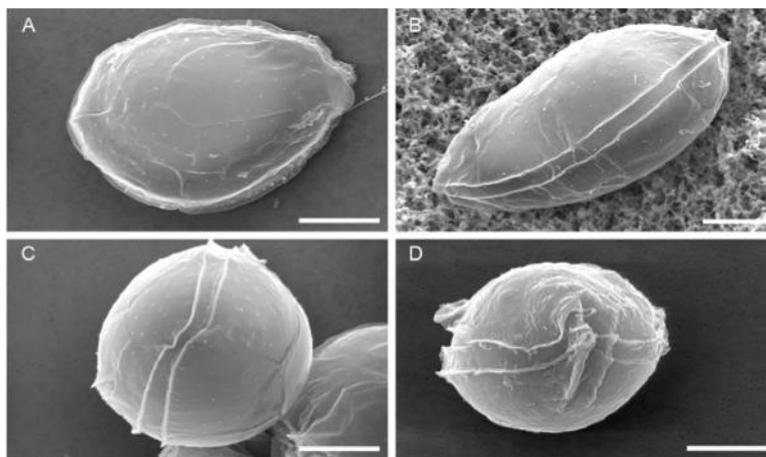


Fig. 6. *Ostreopsis* cf. *ovata* osservata al microscopio elettronico (SEM): in (a) ipoteca, (b) vista lato, (c) dorsale e (d) ventrale. Scala barra: 10  $\mu\text{m}$ . (Accoroni et al., 2012).

*O. ovata*, differisce dalle altre specie del genere *Ostreopsis* in quanto è la più piccola delle specie, la teca è liscia, sottile e delicata, facile alla degradazione e, sulla sua superficie, sono presenti uniformemente dei pori di 0.07  $\mu\text{m}$  di diametro, la placca del poro apicale è dritta e corta (Faust al., 1996). Le cellule (Fig. 7) sono identificabili per:

- Placca 1' dell'epiteca è visibile centrale, di forma esagonale;
- Placca del poro apicale (Po), include il poro apicale, che è situato sul lato dorsale a sinistra dell'epiteca. Po è associato con una stretta placca 2';
- Placca 1p dell'ipoteca lunga e stretta;
- Il cingolo è equatoriale e ventralmente presenta due strutture molto importanti: una placca ventrale (Vp), che delimita il poro ventrale (Vo) e, una placca a creste (Rp), che circonda Vp. Queste due determinano la distinzione delle specie di *Ostreopsis* da altri taxa di dinoflagellati;

- Il solco contiene otto placche.

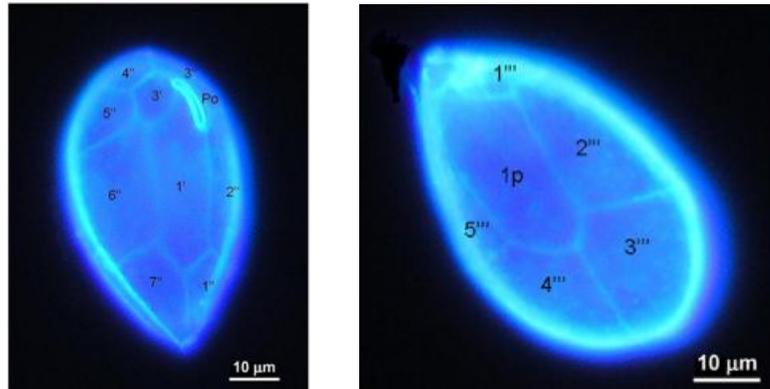


Fig. 7. Arrangiamento tecale dell'epiteca e dell'ipoteca di *O. ovata* osservata in fluorescenza (Monti et al., 2007).

*O. ovata* è una dinoflagellata mixotrofa in quanto presenta sia nutrizione autotrofa che eterotrofa (Faust et al., 1998). Si nutre di altre microalghe, cianobatteri e ciliati attraverso il poro ventrale che può allargarsi e contrarsi. A bassa turbolenza libera sostanze esopolimeriche dal poro ventrale formando cordoni mucillaginosi (reticoli) che servono come la tela di un ragno, a formare un biofilm che imprigiona piccoli invertebrati (Barone and Prisinzano, 2006). Grazie all'elevata elasticità della teca, *O. ovata* dopo l'ingestione può aumentare il suo volume cellulare del 50-70%. La maggior parte degli organismi appartenenti al genere *Ostreopsis* sono bentonici (tuttavia alcuni possono essere anche planctonici) ed epifiti di fanerogame marine (e-g. *Posidonia oceanica*, *Thalassia testudinum*), di talli di macroalghe rosse e brune, soprattutto Feoficee e Rodoficee, in misura minore di Cloroficee, inoltre di conchiglie di mitili e di invertebrati bentonici (Guerrini et al., 2009), anche se è possibile trovarle su substrati rocciosi, sabbie e pozze di marea (Monti et al., 2007). Predilige acque poco profonde, con basso idrodinamismo (Faust et al., 1995). *O. ovata* vive in biocenosi principalmente con altre dinoflagellate quali *Amphidinium sp.*, *Coolia monotis*, *Gambierdiscus toxicus*, *Prorocentrum lima* e con la diatomea centrica *Coscinodiscus sp.* Numerose osservazioni in campo hanno testimoniato come l'idrodinamismo sia uno tra i principali fattori nel 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 (Totti et al., 2010).

L'ecologia dei bloom di *O. ovata* nel mar Mediterraneo e la relazione con i parametri ambientali è stata analizzata da diversi autori (Villa et al., 2001; Penna et al., 2005;

Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Turki et al., 2006; Mangialajo et al., 2008; Totti et al., 2010; Accoroni et al., 2011).

Dalla fine degli anni '90 enormi bloom di *O. ovata* (Fukuyo, 1981) sono stati registrati in aree costiere di regioni temperate con un incremento in frequenza, intensità e distribuzione.

Lungo le coste italiane, l'elevata densità di *O. ovata*, è stata inizialmente registrata in Liguria (Abbate et al., 2007; Mangialajo et al., 2008), Sardegna (Lugliè, pers. comm.), Tirreno (Sansoni et al., 2003; Simoni et al., 2004; Barone and Prisinzano, 2006; Congestri et al., 2006; Bianco et al., 2007;) e nella parte meridionale del mar Adriatico (Bottalico et al., 2002; Di Turi et al., 2003; Ungaro et al., 2005). Solo dal 2006, la presenza di *O. ovata* è stata registrata lungo le coste rocciose della parte nord del Mar Adriatico (Monti et al., 2007; Totti et al., 2007a).

Eventi di fioritura sono associati nella maggior parte dei casi ad effetti sulla salute umana, come difficoltà respiratorie, congiuntiviti e irritazioni cutanee (Gallitelli et al., 2005; Vivaldi et al., 2007) e, inoltre, con la mortalità degli organismi bentonici (Di Turi et al., 2003; Sansoni et al., 2003; Simoni et al., 2003; Congestri et al., 2006; Shears and Ross, 2009). Negli ultimi anni sono stati registrati casi gravi di intossicazioni umane in concomitanza con i bloom di *Ostreopsis* spp. (Gallitelli et al., 2005; Kermarec et al., 2008; Tichadou et al., 2010; Honsell et al., 2011). I sintomi tipici da intossicazione (febbre, dispnea, broncocostrizioni, congiuntiviti e irritazioni cutanee), nonché la mortalità a volte osservata di organismi marini bentonici (Di Turi et al., 2003; Shears and Ross, 2009, 2010), sono associati con la presenza di composti simili alla palitossina (Ciminiello et al., 2011) che possono anche essere bioaccumulati in frutti di mare (Rhodes et al., 2006; Aligizaki et al., 2008, 2011; Gorbie et al., 2010; Louzao et al., 2010).

### 2.3 FATTORI CHE INFLUENZANO I BLOOM DI *Ostreopsis ovata*

In genere i fattori che influenzano un bloom possono essere divisi in parametri abiotici e parametri biotici. Tra i parametri abiotici o ambientali troviamo l'idrodinamismo, il substrato, la profondità, la salinità, i nutrienti e la temperatura, mentre tra i parametri biotici abbiamo le interazioni con gli altri organismi e i tassi di crescita intrinseci della specie.

La temperatura sembrava essere inizialmente un parametro chiave per la proliferazione di *Ostreopsis* spp. (Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Mangialajo et al., 2008; Granéli et al., 2011), ma in seguito è stato riconosciuto che il suo ruolo non è uguale in tutte le zone costiere del mondo (Selina and Orlova, 2010; Totti et al., 2012; Accoroni et al., 2011; Mangialajo et al., 2011; Selina and Levchenko, 2011). In un primo momento le specie appartenenti al genere *Ostreopsis* sono state segnalate nei mari tropicali e subtropicali, associate con altre dinoflagellate epifite come quelle appartenenti ai generi *Gambierdiscus*, *Coolia* e *Prorocentrum* (Besada et al., 1982). Negli ultimi anni, il numero di specie di *Ostreopsis* ha mostrato un'apparente espansione nelle regioni temperate, dove possono formare intense fioriture (Rhodes, 2010). Questo è il caso delle acque della Nuova Zelanda (Cesioie e Ross, 2009), del Mar del Giappone (Selina e Orlova, 2010), e del Mar Mediterraneo (Vila et al, 2001; Aligizaki e Nikolaidis, 2006; Monti et al, 2007; Mangialajo et al, 2008; Totti et al, 2010). Lungo le coste del Mediterraneo, *O. cf. ovata* è stata registrata da giugno a ottobre e, a volte, nel mese di novembre. I bloom si verificano in estate nella parte nord-occidentale del bacino del Mediterraneo, con un secondo aumento minore della biomassa a fine estate-autunno (Mangialajo et al, 2011). In Adriatico e nel Mar Egeo le fioriture sono invece registrate soltanto nella tarda estate, inizio autunno (Aligizaki e Nikolaidis, 2006; Totti et al, 2010). L'andamento generale mostra che le abbondanze maggiori di *Ostreopsis* spp. si registrano durante i periodi più caldi, caratterizzati da alte temperature, elevata salinità e stabilità della colonna d'acqua (Pistocchi et al., 2011). Inoltre è stato visto che le fioriture possono essere più intense in aree protette dopo periodi di mare calmo in quanto tali condizioni portano a stratificazione e riscaldamento delle acque superficiali (Shears and Ross, 2009). Cellule di *O. ovata* isolate in campioni del Mar Tirreno e fatte crescere a diverse temperature (tra i 16 e i 30°C), hanno mostrato un maggior aumento del tasso di crescita e accumulo di biomassa a temperature maggiori (26-30°C), mentre la produzione di tossine è maggiore a temperature più basse (20-22°C). Emerge che

temperatura ottimale di crescita e di tossicità sono inversamente correlate (Granéli et al., 2011). Cellule di *O. ovata* isolate invece in campioni del Mar Adriatico, hanno mostrato tassi di crescita più elevati alla temperatura di 20°C e ad una salinità compresa tra i 36 e i 40 psu. Questi dati suggeriscono che i ceppi di *O. ovata* di diverse aree possono esibire diverse caratteristiche ecofisiologiche, come suggerito da Guerrini et al., (2010). Inoltre in uno studio condotto da Simoni et al. (2004) durante un monitoraggio sul litorale toscano, emerge la capacità di *O. ovata* di produrre cisti di resistenza (forme immobili avvolte da una membrana ispessita), quando la temperatura diminuisce, difficilmente rilevabili nell'ambiente naturale, che poi schiudendosi in condizioni favorevoli causano improvvisi innalzamenti nel numero delle dinoflagellate o veri e propri bloom; comportamento confermato anche in laboratorio, in cui in seguito ad abbassamento di temperatura ed invecchiamento della coltura in vitro si può avere la produzione di forme sferiche avvolte da un involucro gelatinoso identiche a quelle osservate in *O. siamensis* (Pearce et al. 2001; Simoni et al., 2003).

Insieme alla temperatura dell'acqua una varietà di fattori (e.g. disponibilità di substrato, intensità luminosa, precipitazioni, idrodinamismo e nutrienti), sembrano essere importanti nel controllo e nel promuovere la formazione e l'intensità dei bloom di queste dinoflagellate bentoniche (Tindall and Morton, 1998). Ci sono una serie di segnalazioni che indicano l'effetto della salinità sulla crescita e tossicità delle dinoflagellate planctoniche (Gedaria et al., 2007; Guerrini et al., 2007; Lekan and Tomas, 2010; Lim and Ogata, 2005; Maier Brown et al., 2006; Paz et al., 2006). Per quanto riguarda le dinoflagellate bentoniche, la correlazione tra salinità e crescita è stata osservata in diversi studi effettuati sulle specie che causano bloom nelle aree tropicali. Ad esempio, la bassa abbondanza di dinoflagellate tossiche appartenenti al genere *Gambierdiscus*, *Ostreopsis*, *Prorocentrum* e *Coolia* riscontrata vicino alla foce di un fiume cubano, ha suggerito una correlazione positiva tra crescita e diminuzione della salinità (Delgado et al., 2006). Al contrario, nelle Isole Vergini, i massimi di popolazione bentonica erano correlati con il periodo di maggiori precipitazioni (Carlson and Tindall, 1985). La stessa correlazione negativa con la salinità è stata trovata per *O. ovata* lungo le coste Hawaiane (Parsons and Preskitt, 2007), mentre *O. heptagona* nel Golfo del Messico non ha mostrato nessuna correlazione significativa (Okolodkov et al., 2007). In uno studio di laboratorio *O. heptagona* e *O. siamensis* isolate dalla Florida hanno mostrato una crescita ottimale ad una salinità di 33, un valore più basso di quello tipicamente riscontrato nelle acque oceaniche (36); caratteristica condivisa da molte

delle specie di dinoflagellate bentoniche co-presenti (Morton et al., 1992). La salinità misurata nel Nord-Ovest Mediterraneo durante le fioriture di *Ostreopsis* spp. riportavano valori alti, attorno a 37-38 (Vila et al., 2001; Mangialajo et al., 2008), simili a quelli misurati nel Nord Adriatico, (Monti et al., 2007; Pistocchi et al., 2010) e nell'Adriatico meridionale, in accordo con il fatto che tuttora non vi sia stata riscontrata la sua presenza vicino al delta del Po (Pistocchi et al., 2010).

Tuttavia altri studi sull'effetto della salinità sulla crescita e sulla produzione di tossine (Gedaria et al., 2007; Lim and Ogata, 2005; Maier Brown et al., 2006), hanno ottenuto risultati discordanti, portando alla conclusione che questo fattore ambientale sembra ricoprire un ruolo di secondaria importanza nell'influenzare la crescita ed il contenuto di tossine. Un ceppo adriatico di *O. cf. ovata* è stato coltivato a salinità variabili da 26 a 40 (Pezzolesi et al., 2012). Dai risultati emerge che la crescita risultata essere correlata positivamente con l'aumento della salinità, mentre la tossicità negativamente con la stessa, risultando quest'ultima più bassa ad un valore corrispondente di salinità maggiore (Pezzolesi et al., 2012; Pistocchi et al., 2011).

Per quanto riguarda invece il ruolo della concentrazione dei nutrienti, è stato proposto che l'eutrofizzazione potrebbe aumentare il fenomeno degli HAB (Gilbert and Burkholder, 2006; Gilbert et al., 2010). Si è visto però che i nutrienti non sempre giocano un ruolo chiave nei bloom di *Ostreopsis*; i bloom si verificano infatti sia in aree eutrofiche che oligotrofiche (Vila et al., 2001; Shears and Ross, 2009; Accoroni et al., 2011). Per alcuni ceppi di *O. ovata* infatti, non si è osservata una relazione chiara tra concentrazione di nutrienti e andamento di un bloom (Accoroni et al., 2011). Risultati di dipendenza invece sono stati osservati per la tossicità cellulare. Limitazioni di azoto e fosforo sembrano infatti determinare una diminuzione della tossicità cellulare, comportamento non osservato in altre dinoflagellate tossiche (Pistocchi et al., 2011). In colture di *O. cf. ovata* la limitazione da azoto ha avuto ripercussioni maggiori sulla crescita cellulare rispetto alla carenza di fosforo, mentre il contenuto cellulare di tossine è diminuito del 53% e del 40% in limitazione di azoto e fosforo, rispettivamente (Vanucci et al., 2012).

L'idrodinamismo, al contrario, è risultato avere un effetto importante nella regolazione dell'abbondanza di *Ostreopsis* (nonché nel determinare la fine di un bloom algale), migliorando la risospensione delle cellule bentoniche nella colonna d'acqua (Totti et al., 2010; Shears and Ross, 2009), specialmente quando vengono raggiunte elevate abbondanze nei substrati bentonici; tale effetto non è stato osservato in tutte le aree,

particolarmente quando vengono osservate basse abbondanze (Vila et al., 2001; Richlen and Lobel, 2011). Ad esempio in uno studio effettuato lungo la Riviera del Conero, Nord Adriatico, durante l'estate del 2007, è stata riscontrata una concentrazione significativamente maggiore di cellule in siti protetti rispetto a zone esposte. Inoltre è emerso che la densità di *O. ovata* diminuisce fortemente in funzione della profondità, mostrando valori significativamente bassi al di sotto dei 3 metri (Totti et al., 2010). Studi precedenti indicano che la maggior parte delle dinoflagellate bentoniche epifittiche si trovano ad una profondità compresa tra i 0.5 e i 3 metri, probabilmente in conseguenza alla radiazione luminosa che penetra nella colonna d'acqua (Bomber, 1985; Carlson and Tyndall, 1985; Taylor, 1985; Mitchell, 1985; Bomber et al., 1988). Esistono però pochi studi in letteratura che correlano la profondità con la crescita di *Ostreopsis ovata*.

Per il fattore substrato è stato visto che *Ostreopsis* spp. possono crescere su una varietà di substrati bentonici, tra cui angiosperme marine (Turki, 2005; Aligizaki and Nikolaidis, 2006; Turki et al., 2006; Battocchi et al., 2008), invertebrati (Bianco et al., 2007; Totti et al., 2007a), rocce (Bottalico et al., 2002; Totti et al., 2007a) e sedimenti morbidi (Villa et al., 2001). Tuttavia ad oggi solo pochi studi (Lobel et al., 1988; Bomber et al., 1989) hanno focalizzato l'attenzione sugli effetti che il substrato ha nei confronti della crescita delle dinoflagellate bentoniche.

### 3. LA FAMIGLIA DELLE PALITOSSINE

Negli ultimi anni episodi di fioriture algali causate da specie potenzialmente tossiche (*Fibrocapsa japonica*, *Dinophysis* spp., *Pseudo-nitzschia* spp., etc..) sono state segnalate lungo le coste italiane. Tuttavia ad una specie in particolare sono stati associati i casi più gravi di contaminazione delle acque marine per i risvolti sanitari osservati: l'alga bentonica *Ostreopsis ovata*.

L'evento che ha portato ad una maggiore attenzione si è verificato nell'estate del 2005 lungo le coste liguri, quando centinaia di persone che avevano soggiornato in riva al mare o in zone adiacenti senza immergersi in acqua sono ricorse alle cure ospedaliere perché accusavano sintomi quali febbre, faringodinia, tosse, dispnea, cefalea, nausea, rinorrea, congiuntivite, vomito e dermatite (Icardi and Marensi, 2005). Le fioriture di *O. ovata*, osservate in quei giorni nel tratto di costa interessato, furono ritenute il possibile agente causale.

Attraverso l'analisi degli estratti algali ottenuti dai campioni raccolti durante la fioritura del 2005, è stato possibile identificare una palitossina putativa (pPLTX) nel plankton (Ciminiello et al., 2006). Per poterla determinare è stato sviluppato un nuovo metodo basato sulla combinazione della cromatografia liquida e della spettrometria di massa (LC-MS/MS). Nell'anno seguente, un'ulteriore epidemia tossica associata a *O. ovata* si è verificata lungo le coste liguri. Analisi effettuate sempre tramite LC-MS/MS del plankton hanno permesso di rivelare la presenza della pPLTX e di una nuova molecola simile alla palitossina, denominata ovatossina-a (OVTX-a), che presenta due atomi di ossigeno in meno della palitossina (Ciminiello et al., 2008). L'analisi di estratti cellulari di *O. ovata* coltivata in laboratorio, ha dimostrato che sia la PLTX che l'OVTX-a sono state prodotte dalla stessa dinoflagellata (Ciminiello et al., 2008; Guerrini et al. 2010). In seguito ulteriori studi hanno mostrato la presenza in estratti cellulari di *O. ovata* di altre nuove tossine con presunta struttura chimica simile alle palitossine precedentemente identificate, che sono state denominate ovatossine b, c, d, ed e, tuttavia presenti in concentrazioni inferiori rispetto alla ovatossina-a (Ciminiello et al., 2010).

La PLTX è stata isolata per la prima volta dal corallo appartenente alla famiglia *Zoanthidae*, ordine *Zoantharia* e phylum *Coelenterata* (Moore and Scheuer, 1971), identificato successivamente come *Palythoa toxica* (Walsh and Bowers, 1971). La PLTX è stata isolata anche in altre specie come *Palythoa tuberculosa*, *Palythoa mammosa* e *Palythoa caribeaorum* (Kimura and Hashimoto, 1973; Attaway and

Ciereszko, 1974; Beress et al., 1983). La sua struttura chimica è stata tuttavia elucidata solo 10 anni dopo da due gruppi indipendenti, uno del Professor Hirata in Giappone (Uemura et al., 1985), l'altro del Professor Moore a Honolulu negli Stati Uniti (Moore, 1985). La molecola base della palitossina è costituita da una lunga catena alifatica parzialmente insatura contenente eteri ciclici, 64 centri chirali, 40-42 gruppi idrossilici e 2 gruppi ammidici (Moore et al., 1981). Ad oggi sono conosciuti differenti analoghi della PLTX tra i quali pPLTX, ostreocina-d, le ovatossine (OVTX-a,b,c,d,e), omopalitossina, bisomopalitossina, neopalitossina, deossipalitossina e 42-idrossipalitossina. La struttura chimica è stata caratterizzata solo per la PLTX (Cha et al., 1982), l'ostreocina-d (Ukena et al., 2001), per la 42-idrossipalitossina (Ciminiello et al., 2009) e recentemente anche per l'ovatossina-a (Ciminiello et al., 2012). La formula chimica della palitossina è  $C_{129}H_{233}N_3O_{54}$  e contiene una catena continua di 115 (dei 129 presenti) atomi di carbonio. La sua grandezza e la sua complessità la rende la più lunga catena di atomi di carbonio conosciuta che esiste in natura (Fig. 8A).

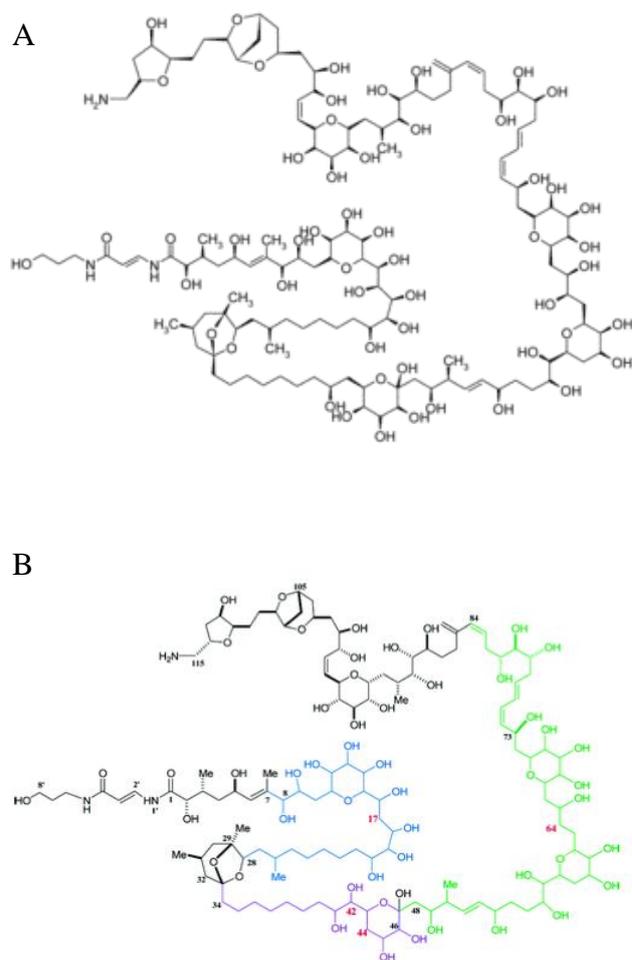


Fig. 8. Struttura chimica della palitossina (A) e ovatossina-a (Ciminiello et al., 2012) (B).

La palitossina è una delle più potenti e letali tossine marine non proteiche conosciute. La cromatografia liquida con ionizzazione ad elettrospray, accoppiata alla spettrometria di massa (LC-ESI-MS/MS) hanno un grande potenziale per analisi rapide, sensibili e univoche in grado di rilevare la presenza di palitossina in campioni contaminati. Infatti la capacità dell'ESI di produrre frammenti carichi di molecole in condizioni blande ha consentito la rilevazione e quantificazione di un composto ad alto peso molecolare come la palitossina. I campioni di plancton raccolti lungo le coste genovesi durante i bloom del 2005 e 2006, così come le colture in laboratorio di *O. ovata* sono state analizzate evidenziando la presenza delle 2 tossine: pPLTX ( $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$ ) e OVTX-a ( $C_{129}H_{223}N_3O_{52}$ ), che presenta quindi due atomi di ossigeno in meno della precedente (Fig. 8B). Sia nei campioni naturali che nelle colture la tossina di gran lunga più sintetizzata è l'OVTX-a, come confermato da Guerrini et al. (2010) in un ceppo tirrenico e in uno adriatico e recentemente in altri ceppi italiani (Pezzolesi et al., 2012; Ciminiello et al., 2012); inoltre, sorprendentemente, i due composti sono risultati essere prodotti dalle colture nello stesso rapporto che nei campioni naturali, con un contenuto di pPLTX e OVTX-a di 0.55 e 3.85 pg/cell, rispettivamente (Ciminiello et al., 2006, 2008). Nessun'altra tra le ficotossine più comuni in Mediterraneo, come acido okadaico, spirolidi, azaspiracidi, yessotossine, tossine PSP e acido domoico (Ciminiello et al., 2004, 2006), e nemmeno tra gli analoghi della palitossina prodotti da altre specie di *Ostreopsis*, come ostreocina-d (Usami et al., 1995; Ukena et al., 2002) e mascarenotossine (Lenoir et al., 2004) sono state riscontrate in *O. ovata*. Ulteriori indagini effettuate tramite LC-MS ad alta risoluzione (HR), oltre a confermare la presenza di piccole quantità di PLTX putativa e OVTX-a come maggiore componente, hanno rivelato la presenza di quattro nuovi composti simili alla palitossina: ovatossina-b (OVTX-b), ovatossina-c (OVTX-c), ovatossina-d (OVTX-d) ed ovatossina-e (OVTX-e) (Ciminiello et al., 2010). Rispetto all'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.

Tuttavia non può essere esclusa la sua sintesi anche da parte di altri organismi, compresi i batteri simbiotici.

La caratteristica principale che riguarda il meccanismo di azione della PLTX è l'attività di emolisi ritardata, che può essere neutralizzata dalla ouabaina (Riobò et al., 2006). Studi recenti di citotossicità hanno messo in evidenza che la palitossina ha come sito di azione la pompa sodio/potassio ATP-dipendente ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi). Il meccanismo molecolare attraverso cui agisce sulle cellule di mammifero è un legame diretto con l'enzima di membrana  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi, che determina un aumento della permeabilità ionica; a concentrazioni maggiori agisce anche sulle pompe ioniche della membrana cellulare, con influsso di  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$  ed efflusso di  $\text{K}^+$  e conseguente depolarizzazione (Habermann, 1989; Wu, 2009; Munday, 2011). La pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  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 agendo su tale pompa, darebbe il via ad una morte cellulare a cascata tipica del sovraccarico di  $\text{Ca}^{++}$  (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). Gli effetti tossici prodotti sono una potente vasocostrizione, depressione della funzione cardiaca, ischemia e danno al miocardio, fibrillazione ventricolare e blocco cardiaco. Gli effetti di depolarizzazione di membrana sono evidenti anche negli eritrociti e nelle cellule degli altri tessuti eccitabili (muscoli scheletrici e lisci e tessuto nervoso). Da questi esperimenti, come detto in precedenza, è emerso che l'ouabaina, in dovuta concentrazione, sia in grado di legarsi alla subunità catalitica della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi, determinando l'inibizione dell'attività della tossina.

La palitossina e i suoi analoghi sono implicati come detto in precedenza in eventi tossici per gli esseri umani dopo ingestione o inalazione. Per tale motivo diversi sono gli studi effettuati sulla tossicità di queste sostanze tramite varie vie di somministrazione negli animali. I primi studi hanno dimostrato che la PLTX è molto tossica per gli animali quando viene iniettata (Wiles et al., 1974), anche se risulta molto tossica per l'uomo per via orale. In considerazione dell'elevata tossicità la "European Food Safety Authority Panel on Contaminants in the Food Chain" ha recentemente emanato delle regolamentazioni per la PLTX, con un limite massimo di presenza nei molluschi di 30 mg/Kg (EFSA, 2009).

La tossicità della PLTX nei mammiferi è fortemente dipendente dalla via di somministrazione. La tossicità maggiore si osserva per endovena e si è visto che, una volta iniettata, provoca la morte in pochi minuti. Per iniezione intraperitoneale invece la

tossicità è minore rispetto alla precedente modalità, con valori di LD50 di 0,31-1,3 mg/kg. Tossicità minori sono state osservate per somministrazione orale; infatti studi effettuati sul topo, con somministrazione della PLTX tramite sonda gastrica hanno evidenziato un LD50 superiore a 40 mg/kg.

Da non sottovalutare è anche l'aspetto di promotore tumorale della PLTX. E' stato osservato che nel topo può provocare un cancro alla pelle. Sarebbe interessante approfondire tale argomento per quanto riguarda l'uomo, ma i bassi livelli di esposizione a cui sono sottoposti gli esseri umani potrebbero da una parte aumentare il rischio di sviluppo del cancro ma dall'altra è difficile dirlo in quanto l'uomo è sottoposto sempre più ad altri promotori. Quindi tale attività è ancora messa in discussione (Munday, 2008).

Permangono ancora molte lacune sulla PLTX. Studi futuri dovrebbero concentrarsi sulla tossicità della palitossina e dei suoi analoghi in modo da consentire una valutazione più precisa dei rischi per la salute umana e per avere una maggior informazione sui limiti di esposizione a queste sostanze e utilizzarle per dare vita a nuove normative.

Ad oggi non ci sono regolamenti relativi alle tossine appartenenti al gruppo della palitossina nei pesci, sia nell'EU che in altre regioni del mondo. Durante il primo meeting del gruppo di lavoro sulla tossicologia del National Reference Laboratories (NRLs) per le biointossicazioni marine (Cesenatico, Italia, 24-25 Ottobre 2005), è stato proposto dalla "Community Reference Laboratory for Marine Biotoxins" un limite provvisorio di 250 µg/Kg per quanto riguarda i frutti di mare. Si conosce poco sulle reali conseguenze che queste tossine possono avere sulle comunità costiere nonostante gli intensi ed evidenti impatti biologici della palitossina (Riobò and Franco, 2011).

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, ritrovandosi in organismi marini (e.g. microalghe) in piccole quantità e spesso assieme a miscele di analoghi, subiscono grandi perdite in termine di concentrazione durante la loro purificazione. Nonostante ciò, 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). La disponibilità di OVTX-a pura, ad esempio, potrà consentire di studiarne 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).

#### **4. COSTITUENTI CELLULARI**

Ad oggi solo alcuni studi hanno rivolto l'attenzione alla variazione dei principali costituenti cellulari (e.g. polisaccaridi, lipidi, proteine) durante la crescita delle dinoflagellate e in particolare pochi riguardano nello specifico *Ostreopsis ovata*.

In generale la formazione di bloom algali è stata associata alla disponibilità dei nutrienti, in particolare azoto e fosforo, e al rapporto N/P che intercorre nell'ambiente e che può favorire una specie algale al discapito delle altre. Per tale motivo diversi studi sono stati effettuati facendo crescere cellule algali in carenza di nutrienti per valutare le dinamiche di crescita e la variazione dei costituenti cellulari in microalghe soggette a particolari condizioni.

In uno studio di Vanucci et al. (2012), ad esempio, vengono riportati gli effetti in condizioni limitanti di azoto (N) e fosforo (P) su crescita, dimensione delle cellule, biovolumi e produzione di tossine per un ceppo Adriatico di *O. cf. ovata*. Da questo studio è emerso come la limitazione di N si riflette sulla dimensione delle cellule, con una predominanza di organismi di dimensioni minori; mentre la carenza di P induce ad un aumento del volume cellulare per tutte le fasi della crescita. Inoltre in questo caso la limitazione di nutrienti ha inciso in modo negativo sul tasso di crescita. Questa relazione negativa la ritroviamo anche per la produzione di tossine, specialmente in carenza di N: un decremento nel contenuto cellulare di tossine del 53% e del 40% è stato infatti osservato rispettivamente in carenza di N e P.

Cambiamenti nella produzione di alcuni costituenti cellulari sono stati osservati in *O. ovata* in risposta a variazioni di temperatura. In uno studio di Vidyaratna and Granèli (2012) è stato riportato come la tossicità delle cellule e la produzione di carboidrati da parte di *O. ovata* sia maggiore a livelli di temperatura ottimali per la crescita delle cellule. Infatti la coltura di *O. ovata* non accumula carboidrati ad ogni temperatura e, quando avviene, l'accumulo è più evidente nella fase stazionaria e di declino. Gli alti valori trovati per *O. ovata* (1.0 per 1.9 ng cell<sup>-1</sup>) a basse temperature (24-26 °C) sono confrontabili con quelli trovati per la dinoflagellata bentonica *Prorocentrum lima* (1.34 ng cell<sup>-1</sup>) cresciuta a 20 °C (Vanucci et al., 2010). L'aumento nella produzione e l'accumulo di carboidrati come anche i tassi crescita ridotti potrebbero essere dovuti a un incremento nel rilascio di carboidrati extracellulari piuttosto che ad un incremento nelle riserve stesse (Liu and Buskey, 2000). Un pattern simile di elevato accumulo di carboidrati durante le fasi stazionaria e di declino è stato trovato in molte diatomee e

flagellate marine (Guillard and Wangersky, 1958; Guerrini et al., 1998; Liu and Buskey, 2000; Wolfstein and Stal, 2002). Colture di *Prymnesium parvum*, ad esempio, accumulano carboidrati dieci volte di più durante la fase stazionaria rispetto a quella esponenziale (Guillard and Wangersky, 1958). Si è notato inoltre che il fitoplancton produce più polisaccaridi non quando ci sono meno nitrati e fosfati, ma quando c'è ancora carbonio presente per la fotosintesi (Myklestad, 1995). L'accumulo di materiale extracellulare rinvenuto nella coltura in fase stazionaria è dovuto al fatto che le cellule continuano a produrlo anche una volta cessata la crescita (Myklestad, 1977).

I cambiamenti nel rapporto N:P hanno un notevole effetto anche per quanto riguarda la produzione di tossine da parte di *Alexandrium fundyense* (John and Flynn, 2010). L'effetto della limitazione di azoto e fosforo sulla crescita e sul contenuto della tossina PSP di *A. fundyense* è stata studiata in una serie di colture. Un aumento iniziale del rapporto N:P, mantenendo costante la concentrazione di N, porta a una diminuzione della densità cellulare massima e a un aumento nella dimensione delle cellule. Questo aumento di dimensioni in limitazione di P è comune nel fitoplancton (e.g. Latasa and Berdalet, 1994) ed è probabilmente dovuto al blocco del ciclo cellulare in G1 (Vaulot et al., 1996) poiché il fosforo è essenziale per la sintesi di DNA e RNA. L'optimum cellulare N:P però è probabilmente specie-specifico e sembra regolare la composizione del fitoplancton e la successione delle specie in mare. Il profilo della produzione di tossine rimane invece relativamente costante con nessuna differenza osservata durante la crescita o con differente rapporto N:P. In genere in condizioni bilanciate di nutrienti la produzione di tossine è spesso bassa, mentre una limitazione da P porta a bassi rapporti C/N e ad un aumento della dimensione cellulare, che sono condizioni favorevoli per la sintesi di metaboliti secondari ricchi in N (e.g. tossine PSP) con conseguente aumento delle tossine cellulari. In questo studio la più bassa concentrazione delle tossine viene osservata in fase esponenziale in condizioni di P limitante, ma in presenza di N, e un aumento della loro concentrazione in fase stazionaria quando le colture sono limitate sia da P che da N. In un altro studio (Flynn et al., 2011) viene riportata la relazione tra il cambiamento nel contenuto di tossine, biomassa e pigmenti nella dinoflagellata *Alexandrium minutum* sottoposta a condizione di stress da nutrienti, in particolare N e P. Durante la carenza di azoto le cellule di *A. minutum* hanno mostrato un declino significativo nel contenuto di tossine, suggerendo non solo l'arresto della sintesi ma anche un turnover attivo. Tuttavia sia Boyer et al. (1987) che Anderson et al. (1990) hanno riportato una maggior sintesi di tossine per

*Alexandrium* spp. in risposta a limitazione di fosforo, mentre non è stato trovato nessun riscontro di questo tipo per *A. minutum*.

## **SCOPO DELLA TESI**



La proliferazione di microalghe in acque costiere fino al raggiungimento di densità cellulari molto elevate (e.g.  $10^4$ - $10^5$  cell  $\text{mL}^{-1}$ ) è nota da molto tempo, ed inizialmente è stata descritta riferendosi alla colorazione assunta dalle acque stesse, dovuta al pigmento dominante nella microalga responsabile dell'evento. Tale fenomeno sembra essersi intensificato negli ultimi decenni, sia per la maggiore frequenza temporale, sia per la maggiore diffusione geografica, non più limitata alle sole zone tropicali (Anderson, 1989; Smayda, 1989; Hallagraeff, 1993, 1995), ma anche per la maggiore attenzione al problema, che ha portato a una più attenta e frequente attività di monitoraggio. L'aumento del fenomeno è probabilmente legato ad una maggiore pressione antropica: infatti, la proliferazione si verifica prevalentemente nelle zone costiere, dove è sviluppata l'attività antropica legata sia al turismo che all'acquacoltura. Per tale motivo, vari Paesi industrializzati hanno dedicato al problema un'attenzione crescente, attraverso monitoraggi e controlli sistematici per verificare lo stato di salute dell'ambiente marino-costiero.

La proliferazione delle microalghe marine, condizionata anche dalle caratteristiche chimico-fisiche e idrodinamiche del corpo idrico, dalla temperatura e dalla luce, può indurre alterazioni ambientali con danni anche gravi all'ecosistema. Inoltre, le condizioni ipossiche e lo sviluppo di idrogeno solforato e ammoniaca, che spesso accompagnano la necrosi delle cellule a fine fioritura, possono essere responsabili di morie di fauna marina (pesci, molluschi bivalvi e crostacei). Dal punto di vista sanitario la rilevanza del fenomeno risiede nella capacità di alcune microalghe di produrre tossine (responsabili ad esempio di sindromi quali PSP, DSP, NSP, ASP), che possono accumularsi in molluschi e altri prodotti ittici abitualmente consumati dall'uomo. Il potenziale rischio per la salute umana associato alla presenza nella dieta di prodotti ittici contaminati merita un'attenta valutazione da parte delle autorità sanitarie.

Per quanto riguarda l'uso ricreazionale delle acque marine, sono stati riportati disturbi respiratori dovuti ad inalazione di aerosol contenente frammenti di cellule di alghe marine e/o tossine: l'esempio più studiato è quello delle "red tides" nel Golfo del Messico, associate alla proliferazione di *Karenia brevis*, produttrice di brevitossine, ma dobbiamo ricordare anche il caso di intossicazione avvenuto nel 2005 nel bacino del Mediterraneo lungo le coste liguri a causa di una fioritura di *Ostreopsis ovata*.

L'intensificazione del fenomeno e il risvolto sanitario hanno indotto anche l'Organizzazione Mondiale della Sanità (Oms) ad occuparsi della problematica nell'ambito delle "Guidelines for Safe Recreational Water Environments" del 2003,

nella quale vengono presi in considerazione gli agenti che potrebbero avere un ruolo nella trasmissione di patologie all'uomo. Nonostante ciò al problema delle microalghe bentoniche ancora oggi viene riservata una scarsa attenzione.

Negli ultimi 10 anni, episodi di fioriture algali causate da specie potenzialmente tossiche sono state segnalate ripetutamente lungo le coste italiane. Tuttavia ad una specie in particolare sono stati associati i casi più gravi di contaminazione delle acque marine per i risvolti sanitari osservati: l'alga bentonica *O. ovata*.

Lo scopo di questo lavoro di tesi è perciò quello di valutare attraverso colture allestite in laboratorio la crescita di *O. ovata*, una delle microalghe tossiche che negli ultimi anni è stata maggiormente responsabile degli effetti nocivi nei confronti dell'uomo e dell'ecosistema in diverse aree costiere tropicali e temperate. Su questa microalga sono stati condotti ancora pochi studi per chiarire le dinamiche di formazione dei bloom e la variabilità nella loro tossicità e/o nelle caratteristiche ambientali in cui avviene la proliferazione. In particolare in questo lavoro si è cercato di analizzare un aspetto non ancora studiato per questa microalga, cioè come varia la produzione dei componenti cellulari durante la crescita e in quale proporzione, e se intercorre una relazione con la produzione di tossine e con l'assorbimento dei nutrienti nelle diverse fasi di crescita. Le tossine prodotte, che appartengono alla famiglia delle palitossine, sono infatti polichetidi molto complessi con un alto peso molecolare (~2700 Da), e richiedono perciò un dispendio energetico elevato da parte della cellula per la loro biosintesi. Risulta perciò interessante valutare le relazioni che intercorrono durante la crescita tra le varie componenti biochimiche cellulari.

E' stata utilizzata una coltura di un ceppo di *Ostreopsis cf. ovata* (00AB0801), isolata da una popolazione proveniente dal Mare Adriatico, nello specifico dalla zona di Bari. Sono state preparate tre repliche della stessa coltura, mantenute alle stesse condizioni, per avere un maggior confronto tra i dati ottenuti. E' stato utilizzato il metodo delle colture "batch", che prevede l'inoculo delle cellule algali in una determinata quantità di terreno di coltura, senza più aggiungere nutrienti fino alla fase stazionaria e/o di declino. Il controllo delle varie fasi di crescita viene effettuato tramite prelievi periodici (con frequenza di 1-3 giorni) ed esecuzione di prove volte a verificare la relazione che intercorre tra crescita, produzione di tossine e variazione dei principali componenti cellulari. Le colture sono state portate avanti per un periodo della durata di circa cinque settimane e, al termine dell'esperimento, si è proceduto con l'analisi dei campioni conservati.

## **MATERIALI E METODI**



## 5. COLTURE ALGALI BATCH

Per preparare le colture vengono presi piccoli volumi di un campione contenente l'alga d'interesse e vengono fatti degli inoculi in beute contenenti il terreno di coltura adatto per quella specie considerata. In queste colture, anche dette colture "batch", è possibile seguire l'andamento della crescita dell'alga dal giorno dell'inoculo, indicato come "giorno 0", fino alla fase di declino, osservando tutte le fasi di accrescimento.

Il lavoro condotto nel corso della tesi è stato effettuato su un ceppo di *Ostreopsis* cf. *ovata* (codice 00AB0801) proveniente dalla zona di Bari (Puglia, Italia) e isolato nel 2008.

Le cellule erano state isolate precedentemente con il metodo della micropipetta (Hoshaw and Rosowski, 1973). La cellula algale d'interesse viene prelevata da una goccia di campione d'acqua di mare con una pipetta pasteur in vetro, con punta assottigliata e trasferita all'interno di un pozzetto di una piastra multiwell sterile contenente acqua di mare sterile, arricchita con una parte di terreno di coltura. In seguito la piastra viene messa in camera di coltura a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , sottoposta ad un ciclo luce:buio 16:8 h e ad un'intensità di circa  $90\text{-}100 \mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Una volta che l'alga si è divisa e il campione ha raggiunto densità cellulari adeguate, viene trasferito in contenitori più grandi, viene aggiunto il mezzo di coltura e viene posto nelle medesime condizioni di crescita (Fig. 9).



Fig. 9. Colture algali batch.

## 5.1 PREPARAZIONE DEL TERRENO E INOCULO

Il mezzo di coltura utilizzato si prepara partendo da acqua di mare oligotrofica, gentilmente fornita dal Centro Ricerche Marine di Cesenatico, prelevata in superficie, 10 miglia marine al largo di Cesenatico (Forlì-Cesena, Italia), che viene fatta invecchiare per alcuni mesi al buio. L'acqua viene poi opportunamente filtrata con un sistema di filtrazione a vuoto, utilizzando filtri in microfibra di vetro GF/C WHATMAN (diametro 90 mm, porosità 1.2  $\mu\text{m}$ ). Utilizzando un rifrattometro, viene misurata la salinità, che nel caso delle nostre colture deve corrispondere ad un valore 35 psu (se non corrisponde va portato a questo valore con opportuna diluizione con acqua distillata), ovvero un valore prossimo a quello misurato in mare al momento del prelievo del campione naturale, dal quale sono state poi isolate le nostre cellule algali.

La formula che viene utilizzata per effettuare la correzione della salinità è la seguente:

$$\mathbf{V_i \text{ (acqua di mare)} * S_i = V_f \text{ (terreno di coltura)} * S_f}$$

Dove:

- **Vi**: volume di acqua di partenza;
- **Vf**: volume finale di terreno che si vuole ottenere;
- **Si**: salinità iniziale;
- **Sf**: salinità finale.

La quantità di acqua di mare viene quindi portata ad un volume di 2 litri con acqua distillata e poi, deve essere sterilizzata in autoclave con un ciclo a 120°C per 20 minuti, alla pressione di 1 atm. Infine per preparare i mezzi di coltura occorre aggiungere all'acqua sterilizzata i nutrienti necessari in determinati quantitativi, prelevandoli da soluzioni stock sterili. Per evitare di contaminare il mezzo di coltura, tutte le operazioni vengono eseguite sotto cappa sterile.

Il terreno solitamente utilizzato per studi condotti su *Ostreopsis cf. ovata* è denominato f(N/10, P/10)+Se, il quale si ottiene diluendo di 5 volte i quantitativi di nutrienti (nitrati e fosfati) del terreno f/2 e aggiungendo selenio ( $[\text{Se}] = 1 * 10^{-8} \text{ M}$ ).

Di seguito sono riportate in tabella le concentrazioni di nutrienti impiegate per la preparazione del terreno f/2 (Guillard and Ryther, 1962) (Tab. 1, 2)

<b>COMPONENTI</b>	<b>TERRENO F(N<sub>10</sub>P<sub>10</sub>)</b>
ELEMENTI IN TRACCIA + EDTA (stock 1)	1000 µL/litro
HEPES (23g/100mL)	1000 µL/litro
NaNO <sub>3</sub> (15g/200mL)	200 µL/litro
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1g/200mL)	200 µL/litro
VITAMINE (stock 2)	500 µL/litro

Tab. 1. Composizione del terreno di coltura F (N/10, P/10)+Se.

<b>MICRONUTRIENTI</b>	<b>SOLUZIONI MADRI (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>AGGIUNTA IN 1 L</b>	<b>CONCENTRAZIONE FINALE (M)</b>
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O		3.15 g	1.17 x 10 <sup>-5</sup>
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O		4.36 g	1.17 x 10 <sup>-5</sup>
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	180.0	1 mL	9.10 x 10 <sup>-7</sup>
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	22.0	1 mL	7.65 x 10 <sup>-8</sup>
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	10.0	1 mL	4.20 x 10 <sup>-8</sup>
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	9.8	1 mL	3.93 x 10 <sup>-8</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	6.3	1 mL	2.6 x 10 <sup>-8</sup>

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

<b>VITAMINE</b>	<b>SOLUZIONI MADRI (g L<sup>-1</sup>)</b>	<b>AGGIUNTA IN 1 L</b>	<b>CONCENTRAZIONE FINALE (M)</b>
TIAMINA	-	200 mg	2.96 x 10 <sup>-7</sup>
BIOTINA	1.0	1 mL	2.05 x 10 <sup>-9</sup>
B12	1.0	1 mL	3.69 x 10 <sup>-10</sup>

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

Per terminare questa fase il terreno viene suddiviso all'interno di beute in determinate aliquote (a seconda del disegno sperimentale) e si procede effettuando l'inoculo di cellule algali in modo tale che la quantità iniziale di cellule nella coltura sia di circa 300 cell/mL.

## 5.2 DESCRIZIONE E ALLESTIMENTO DELL'ESPERIMENTO

Lo scopo di questo lavoro è valutare la relazione tra la crescita, la produzione di tossine e le variazioni dei principali componenti cellulari in *O. cf. ovata*. Prima di stabilire i volumi di coltura da analizzare e le metodiche da utilizzare sono state effettuate prove preliminari sullo stesso ceppo algale, che hanno permesso di ottimizzare i metodi di analisi. Per l'esperimento finale, sono state preparate 6 beute da 3 L contenenti 2.5 L di coltura, utilizzando un inoculo da una coltura madre di circa 7 giorni, cresciuta alle stesse condizioni di luce, temperature e nutrienti. Per ogni beuta è stato aggiunto un volume di coltura pari a 345 mL e 2155 mL di terreno da una bottiglia di 10 L, in modo da effettuare l'inoculo dallo stesso contenitore per tutte le 6 beute. Le beute sono state posizionate nella camera algale ad una temperatura di 20°C, e i valori di luce a cui le stesse sono state esposte, misurati in momenti diversi in prossimità delle beute per tutto il periodo di studio, avevano un range compreso tra 100-140  $\mu\text{mol fotoni m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . La salinità all'interno delle beute, come detto in precedenza, aveva un valore corrispondente a 35 psu. I prelievi sono stati effettuati in giorni prestabiliti così come le aliquote di coltura da prelevare per le diverse analisi (Tab.3)

**GIORNO**

	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>21</b>	<b>27</b>	<b>35</b>
<b>TOSSINE</b>		100	100	100	100	100	100	100	100	100	200
<b>NUTRIENTI</b>		50	50	50	50	100	100	150	150	150	
<b>PROTEINE E POLISACCARIDI EXTRA</b>		25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
<b>FOSFATI INTRACELLUARI</b>				25	25	25	25	25	25	25	25
<b>PAM</b>		15	15	5	5	5	5	5	5	5	
<b>CHN</b>				50	50	50	50	50	50	50	50
<b>CONTEGGI E BIOVOLUMI</b>	10	10	10	10	50	50	50	50	50	50	50
<b>POLISACCARIDI</b>		25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
<b>LIPIDI</b>		100			100		100		100		100
<b>CLOROFILLA</b>		10		10	10		10	10	10	10	10
<b>BATTERI</b>	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Tab. 3. Tabella riassuntiva delle analisi e dei prelievi effettuati per singolo giorno (unità del prelievo espressa in mL).

## **6. VALUTAZIONE DELLA CRESCITA: CONTEGGI, CURVA DI CRESCITA E BIOVOLUMI**

Da ogni beuta è stata prelevata un'aliquota tra i 10 e i 50 mL di coltura in giorni prestabiliti, in modo da coprire l'intera fase di crescita della nostra microalga. In seguito sono state aggiunte alcune gocce di un particolare fissativo a base di iodio-ioduro, il LUGOL, in alcuni casi acidificato tramite HCl (concentrazione finale 4 mM) per poter limitare le aggregazioni cellulari tipiche di *O. cf. ovata* e, consentire un conteggio corretto delle cellule.

La conta delle microalghie è stata effettuata prelevando 1 mL del campione algale trattato come precedentemente descritto ed è stato posto in un pozzetto circolare per la sedimentazione. Dopo circa 5-10 minuti (tempo adeguato per consentire la sedimentazione ma evitare l'aggregazione delle cellule al centro del pozzetto), è stato effettuato il conteggio. Per poter osservare e quantificare il campione è stato utilizzato il microscopio rovesciato (modello Axiovert 100 ZEISS) con ingrandimento 320x.

Nelle prove preliminari i conteggi sono stati eseguiti sia con il metodo della strisciata che con quello per campi. Nel primo metodo si contano le cellule algali sedimentate che si trovano comprese in un rettangolo che ha come dimensioni:

- il diametro del campo inquadrato dall'oculare (a);
- il diametro del pozzetto o della camera di sedimentazione (b).

Nei nostri esperimenti abbiamo contato le cellule algali almeno lungo quattro diametri del pozzetto; per avere una maggior precisione sono state fatte 3 repliche ognuna di 4 strisciate. Dopo aver fatto ciò, si è calcolata la media delle alghe contate nei diversi diametri, moltiplicata per un fattore di correzione (F) (e.g. valore di 30.4 o 32.5 a seconda del microscopio), ottenendo così il numero di cellule algali presenti in un millilitro di coltura. Il fattore F è calcolato in base al rapporto tra l'area della camera di sedimentazione/pozzetto e l'area del rettangolo (a x b) calcolato nel seguente modo: il diametro della camera di sedimentazione misura 24 mm, quindi l'area di tale camera misura 452.16 mm<sup>2</sup>; utilizzando l'ingrandimento 320x il rettangolo ha le seguenti dimensioni:

- lato b = diametro della camera (24 mm);
  - lato a = 0.62 mm;
- perciò l'area risulta 14.88 mm<sup>2</sup>.

Il fattore di moltiplicazione è dato dal rapporto tra le due aree:  $F = 452.16/14.88 = 30.4$ . Nel secondo caso, in cui si effettua il conteggio per campi, ci si muove invece in maniera random all'interno del pozzetto, contando le cellule che sono presenti nell'area scelta e cercando di selezionare i campi all'interno di tutto il pozzetto. I confronti fatti a posteriori sui dati ottenuti da entrambe i metodi, non hanno mostrato differenze significative e per tale motivo si è potuto scegliere tra una delle due metodologie, privilegiando per comodità il metodo della strisciata, ma adottando alcune accortezze (e.g. controllo della mancata aggregazione di cellule) per evitare errori.

## 6.1 CURVA DI CRESCITA

L'andamento tipico della crescita del fitoplancton presenta un andamento sigmoideale, che comporta quattro fasi (Fig. 10):

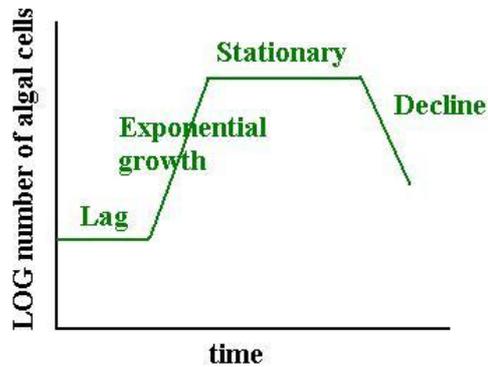


Fig. 10. Esempio di curva di crescita.

- Fase lag: l'alga si adatta al nuovo ambiente che la circonda, per cui non vi è aumento del numero di cellule. La sua durata è variabile, a seconda delle dimensioni dell'inoculo, delle condizioni fisiologiche della cellula algale e delle condizioni di coltura.
- Fase esponenziale: si ha una rapida crescita cellulare con andamento logaritmico ed è rappresentata dal tratto di curva con pendenza maggiore.
- Fase stazionaria: diminuisce il tasso di crescita della coltura, in conseguenza all'esaurimento dei nutrienti. Il numero di cellule rimane pressoché costante e la fase può avere durata variabile.
- Fase di declino o di morte della coltura: i nutrienti si esauriscono sempre di più, e le cellule cominciano a morire, si lisano ed il loro numero totale diminuisce progressivamente.

E' possibile calcolare la velocità di crescita specifica prendendo due punti della curva di crescita durante la fase esponenziale (quando la curva mostra la massima pendenza). Durante la crescita esponenziale la velocità di aumento delle cellule è proporzionale al numero di cellule presente nella coltura all'inizio di ogni unità di tempo:

$$dN/dt = rN$$

dove  $r$  (chiamato anche  $\mu$ ) rappresenta l'unità di incremento ed è la velocità di crescita

intrinseca o specifica o anche detta parametro di Malthus (growth rate). L'unità di misura è il  $\text{day}^{-1}$ .

Una popolazione che cresce secondo la precedente equazione, aumenta in maniera esponenziale senza un limite superiore. Risolvendo l'equazione si ottiene:

$$N_t = N_0 e^{rt}$$

da cui:

$$\ln N^t = rt + \ln N_0$$

In questo modo otteniamo l'equazione di una linea retta ( $y = ax + b$ ) la cui pendenza è data dalla velocità di crescita. A questo punto possiamo calcolare  $r$  utilizzando i logaritmi naturali del numero di individui. Risolvendo per  $r$  si ottiene:

$$r = \ln (N_t/N_0)/\Delta_t$$

## 6.2 BIOVOLUMI

Le misure per il calcolo dei volumi cellulari sono state eseguite tramite software per analisi di immagine (Nis Elements BR 2.20) e fotocamera digitale collegata al microscopio rovesciato.

Per valutare la forma delle cellule, quest'ultime sono state approssimate a forme geometriche, in particolare per *O. ovata* viene utilizzata quella di un ellissoide (Sun and Liu, 2003). Questo solido geometrico è caratterizzato tra tre assi di diversa lunghezza (a, b, c), il cui volume viene calcolato secondo la seguente formula:

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

Per ogni giorno e per ogni singola replica sono state registrate una serie di misure (Fig. 11) (solitamente venivano analizzate circa 50 cellule per campione):

- (a) Diametro dorso-ventrale DV;
- (b) Larghezza W;
- (c) Diametro antero-posteriore AP.

Per ogni parametro si è poi calcolata la media e la rispettiva deviazione standard. Questo ci ha permesso di calcolare i biovolumi medi e di rapportarli alle abbondanze cellulari per avere un'analisi più precisa dello stato della nostra coltura.

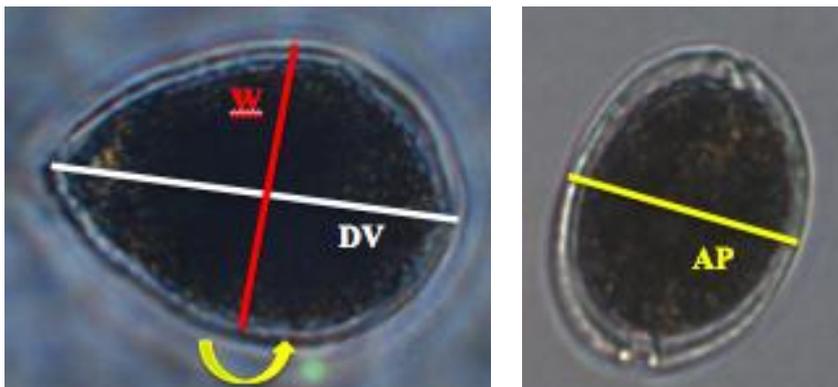


Fig. 11. Esempio di cellula di *O. cf. ovata* utilizzata per il calcolo dei biovolumi. DV: diametro dorso-ventrale; W: larghezza; AP: diametro antero-posteriore.

### 6.3 METODO DELLA DETERMINAZIONE DELLA CLOROFILLA

In ambienti acquatici la misura della clorofilla a (Chl-a) è utilizzata come indicatore di biomassa autotrofa in quanto rappresenta il pigmento indispensabile per il processo di fotosintesi per tutti gli organismi autotrofi. La clorofilla costituisce in media l'1-2% del peso secco della sostanza organica delle alghe. Dalla misura della clorofilla è così possibile risalire al contenuto di sostanza organica utilizzando appositi fattori di conversione. Tuttavia è da considerare che il rapporto tra carbonio organico e la clorofilla varia tra le specie, in funzione delle diverse condizioni fisiologiche ed ambientali.

Il metodo spettrofotometrico permette di determinare le concentrazioni della clorofilla a e si basa sulla proprietà della clorofilla di assorbire la luce nella zona del rosso dello spettro visibile (Manuale ISPRA, Metodologie di studio del plankton marino). Per effettuare le analisi, è stato centrifugato un volume di coltura di 10 mL a 5000 rpm, a 4°C per 15 min. Una volta rimosso il soprannatante, sono stati aggiunti 3 mL di acetone al 90% (conservato a 4°C), omogeneizzato il campione e poi agitato tramite vortex per pochi secondi. La provetta con la sospensione ottenuta è stata tappata e posta a 4°C al buio per 20-24 ore per completare l'estrazione del pigmento. Passato il tempo necessario le provette sono state centrifugate per 10 minuti a 3000 rpm. Dopo la centrifugazione finale dell'estratto il soprannatante è stato prelevato tramite pipetta e messo nelle celle dello spettrofotometro per procedere con le letture a 665 e 750 nm.

Per determinare l'assorbanza netta dell'estratto si è utilizzata la formula seguente:

$$\text{Abs (665a)} = (\text{Abs 665c} - \text{Abs 665b}) - (\text{Abs 750c} - \text{Abs 750b})$$

dove: Abs 665c: densità ottica del campione a 665 nm;

Abs 665b: densità ottica del bianco a 665 nm;

Abs 750c: densità ottica del campione a 750 nm;

Abs 750b: assorbanza del bianco a 750 nm.

Successivamente le concentrazioni di clorofilla a (Chl-a) sono state calcolate applicando la seguente formula:

$$\text{Chl-a } (\mu\text{g L}^{-1}) = 26,73 * (\text{Abs } 665\text{c}) * v * 10^3 / (\text{co} * V)$$

dove: A (665c): densità ottica netta del campione a 665 nm;

co: cammino ottico della celletta (cm);

v: volume dell'estratto (mL);

V: volume del campione estratto (mL).

## 7. NUTRIENTI

Per effettuare le analisi dei nutrienti (fosfati e nitrati) sono stati prelevati dai 50 ai 150 mL di coltura che sono stati filtrati con filtri GF/F (diametro 47 mm, porosità 0.7  $\mu\text{m}$ ) per gravità o con poco vuoto (per non portare le cellule alla rottura) e raccolti in tubi o bottiglie di plastica, (precedentemente lavati con acido cloridrico), e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino all'analisi. Le analisi sono state effettuate con metodiche tradizionali (Strickland & Parsons, 1968).

### 7.1 ANALISI NITRATI

Prima di procedere all'analisi dei nitrati, sono state riattivate le colonnine di cadmio metallico ramato che permettono di far avvenire la reazione di riduzione dei nitrati a nitriti, i quali si determinano poi usando una metodica colorimetrica. (Fig. 12).



Fig. 12. Colonnine per la determinazione dei nitrati.

Per l'analisi dei nitrati, i campione prelevati e filtrati sono stati diluiti con acqua di mare sintetica fino ad un volume di 100 ml. Oltre ai campioni è stato preparato anche un bianco costituito esclusivamente da acqua di mare sintetica e uno standard, costituito da 100  $\mu\text{L}$  di soluzione standard di nitrato ( $\text{N-NO}_3$  140 mg/L) portato a un volume di 100 mL con acqua di mare sintetica. A questo punto vengono aggiunti ai campioni, allo standard e al bianco 2 mL di cloruro di ammonio concentrato ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) al 25% (m/V). Successivamente i campioni vengono fatti passare all'interno della colonnina (dove

precedentemente sono stati fatti passare ~200 mL di cloruro di ammonio diluito allo 0,625% (m/V) e ~200 mL di acqua distillata per il lavaggio della stessa).

Nel passaggio attraverso la colonna di riduzione i primi 45 mL vengono scartati, mentre i successivi 50 mL vengono raccolti in matracci di vetro da 50 mL di capacità. A questi ultimi vengono aggiunti 2 mL di soluzione SA (solfanilammide all'1%) e dopo 3 minuti, 1 mL di soluzione NEDA (naftiletildiammina allo 0,1%). Si attende un tempo di 15 minuti, necessario per far avvenire la reazione colorimetrica (Fig. 13), dopo di che si misura l'assorbanza della soluzione allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda corrispondente a 543 nm, contro acqua distillata. Per la determinazione dei nitrati, occorre sottrarre al valore di assorbanza ottenuto per lo standard il rispettivo valore del bianco e procedere alla determinazione del fattore F:

$$F = \text{conc st (N-NO}_3 \text{ 0,14 mg/L)} / (\text{abs(st)} - \text{abs(bianco)})$$

Calcolo del fattore F per la determinazione dell'efficienza della colonnina (può disattivarsi dopo varie analisi o se resta inoperosa per molto tempo).

F dovrebbe avere un valore compreso tra 0.31 (che rappresenta un'efficienza del 100%) e 0.37 (efficienza dell'84%). Dopo il calcolo del fattore F la concentrazione dei nitrati si ottiene nel seguente modo:

$$\text{N-NO}_3 \text{ (mg/L)} = F \cdot [\text{abs(c)} - \text{abs(bianco)}] \cdot 100/V$$

F = fattore, abs (c) = assorbanza del campione abs (bianco) = assorbanza del bianco, V = è il volume in ml di acqua in esame prelevata per l'analisi.



Fig. 13. Reazione colorimetrica per l'analisi dei nitrati.

## 7.2 ANALISI FOSFATI

Per la determinazione del fosforo reattivo, vengono usati 50 mL di acqua distillata per il bianco, e 50 mL di campione (precedentemente filtrato) in cilindri graduati della capacità di 50 mL. Il metodo si basa sulla formazione di un complesso fosfomolibdico di colore blu la cui concentrazione viene misurata per via colorimetrica. Viene preparato un reattivo misto contenente una miscela di soluzioni rispettivamente in un rapporto 2:5:2:1, ossia: una soluzione di molibdato ammonico ( $(\text{NH}_4)_4\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (0.03 g/mL in acqua distillata), una soluzione di acido solforico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (140 mL di acido al 96% in 1 L di  $\text{H}_2\text{O}$  distillata), una soluzione di acido ascorbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ) (0.054 g/mL in  $\text{H}_2\text{O}$  distillata) e una di tartrato di potassio e antimonile ( $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) (1.36 mg/mL in  $\text{H}_2\text{O}$  distillata). I campioni vengono fatti reagire con il reattivo misto, aggiungendo 5 mL di quest'ultimo in ogni cilindro, che viene infine sigillato con parafilm e agitato. Dopo 10 minuti la reazione tra il campione e il reattivo misto fa sì che il campione assuma una colorazione blu (Fig.14), la cui intensità varia in maniera direttamente proporzionale alla concentrazione di fosfati presenti. Si procede con l'analisi facendo le letture allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 885 nm. Per fare le letture si effettua l'autozero con acqua distillata, si procede poi alla lettura dei campioni partendo prima con il bianco e poi con i campioni ed effettuando la lettura a 885 nm. La quantificazione viene fatta utilizzando una curva di calibrazione ottenuta con concentrazioni diverse di uno standard ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) in un range da 0-0.456  $\mu\text{g}/\text{mL}$  di  $\text{P-PO}_4$ .



Fig. 14. Reazione colorimetrica per l'analisi dei fosfati.

## **8. DETERMINAZIONE QUALI-QUANTITATIVA DELLE TOSSINE**

Sono stati prelevati nei diversi giorni 100-200 mL di coltura. Questi sono stati filtrati utilizzando filtri GF/F (diametro 47 mm, porosità 0.7 µm) per gravità o con poco vuoto (per non rompere le cellule). Il filtrato è stato raccolto in bottiglie che sono state conservate a -20°C, mentre il filtro è stato piegato a metà, avvolto con alluminio e conservato a -80°C. Questo procedimento è stato ripetuto per tutte e tre le repliche nelle varie giornate.

I filtri, conservati a -80°C per un determinato periodo di tempo, sono stati in seguito estratti andando a spezzettarli e ponendoli all'interno di un tubo da centrifuga, a cui sono stati aggiunti 1-1.5 ml, a seconda del campione e della corrispettiva concentrazione cellulare, di una soluzione metanolo/acqua (CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O) 1:1. Il tutto è stato sonicato per 3 min (sonicatore Sonicator, modello XL), in seguito centrifugato a 12000 rpm per 15 min a 4°C (centrifuga Beckman, modello J2-HS); il soprannatante è stato quindi raccolto in un vial di vetro. La procedura descritta è stata ripetuta altre due volte aggiungendo ad ogni ciclo 0.5-1.5 ml della soluzione metanolo/acqua 1:1. Per terminare la procedura, il soprannatante è stato portato con la stessa soluzione ad un volume finale variabile da 1.2 a 5 ml, sempre in base alla densità cellulare nel campione, e conservato a 4°C.

La determinazione quali-quantitativa delle tossine negli estratti algali è stata eseguita presso il Dipartimento di Chimica delle sostanze naturali dell'Università Federico II di Napoli tramite cromatografia liquida associata alla spettrometria di massa (LC-MS/MS) (Ciminiello et al. 2010).

## ***9. DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE CON IL METODO DEL LOWRY***

Questo metodo è basato su una reazione colorimetrica data dal reattivo di Folin (fosfomolibdato, fosfotungstato, sali rameici) con gli aminoacidi che contengono anelli aromatici. La determinazione quantitativa viene effettuata attraverso la lettura del composto colorato allo spettrofotometro a 750 nm, facendo riferimento ad una curva di taratura costituita utilizzando quantità note di albumina bovina (BSA) come standard. Nelle prove preliminari sono state effettuate letture anche a 660 nm (lunghezza d'onda suggerita in alcuni lavori in letteratura), ma non ci sono state differenze significative nei risultati.

Una volta prelevati i campioni, sono stati centrifugati 25 mL di coltura a 5000 rpm, a 4°C per 15 minuti. Dopo la centrifugazione sono stati rimossi 16-20 mL di sovrantante e conservati a -20°C (utilizzati successivamente per l'analisi dei polisaccaridi extracellulari); la restante coltura concentrata è stata travasata in tubi da 10 mL i quali sono stati nuovamente centrifugati a 5000 rpm, a 4°C per 15 minuti. A questo punto è stato rimosso il sovrantante e i campioni sono stati conservati a -80°C. Quando i campioni sono stati ripresi per effettuare l'analisi, il pellet è stato risospeso aggiungendo 1 mL NaOH 0.1 M. A questo punto il campione è stato omogenizzato con il sonicatore tramite cicli da 15-20 secondi in ghiaccio per un totale di 1 minuto.

Le soluzioni utilizzate per la determinazione delle proteine sono:

1. 5 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  in 50 mL di NaOH 0.5 M
2. 0,5 g Na,K tartrato in 50 mL di  $\text{H}_2\text{O}$
3. 50 mg di  $\text{CuSO}_4$  in 10 mL della precedente soluzione (2).

Inoltre sono state preparate al momento delle analisi altre due soluzioni:

- Soluzione A: composta dalla soluzione 1 e dalla soluzione 3 in rapporto 10:1;
- Soluzione B: composta da Folin Ciocalteu e  $\text{H}_2\text{O}$  in rapporto 1:9.

Per la curva di taratura è stata preparata una soluzione stock di albumina bovina 2 mg/ml. Questa è stata diluita in serie (con NaOH 0,1 M), testando un range che va da 0 a 0.9 mg/ml.

In ogni campione/standard è stato aggiunto 1 mL di soluzione A, è stato agitato con il vortex e fatto riposare per 10 minuti; in seguito sono stati aggiunti 3 mL di soluzione B,

è stato agitato e fatto riposare per 30 min, per poi procedere alle letture a una lunghezza d'onda di 750 nm (Fig.15).



Fig. 15. Reazione colorimetrica per l'analisi delle proteine.

## ***10. ESTRAZIONE DEI POLISACCARIDI***

Per l'estrazione dei polisaccaridi è stato utilizzato il metodo di Myklestad. Sono stati prelevati 15 mL di coltura (nel caso dei polisaccaridi totali) e di sovrnatante ottenuto dalla centrifugazione effettuata per l'analisi delle proteine (nel caso dei polisaccaridi extracellulari) e sono stati messi in tubi da centrifuga (precedentemente lavati con etanolo). A sono stati aggiunti 2 volumi di etanolo assoluto per poi conservarli a -20°C per 24 ore. Passate le 24 ore e ripresi i tubi sono stati messi in centrifuga a 4°C a 6000 rpm per 25 minuti. Terminata la centrifugazione è stato eliminato il sovrnatante, asciugato il pellet ottenuto e si è aggiunto 1 mL di acido solforico all'80%. I campioni così preparati sono stati lasciati per 20 ore a 20°C. Il campione è stato in seguito diluito aggiungendo 4-5 mL di acqua distillata.

A questo punto siamo passati alla determinazione dei polisaccaridi seguendo il metodo stabilito da Dubois. Questo metodo è basato sul fatto che gli zuccheri in presenza di acidi concentrati formano dei composti ciclici detti furfurali. I furfurali condensano con i fenoli dando prodotti colorati.

Vengono utilizzati come reagenti il fenolo all'80% e l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrato. Per le quantificazioni è stata fatta una curva di taratura con concentrazioni di glucosio in un range da 0-62.5  $\mu\text{g/mL}$ .

La misura viene effettuata su un campione di 2 mL, pertanto vengono prelevati 2 mL dal campione precedentemente estratto e diluito, successivamente sotto cappa, vengono aggiunti 50  $\mu\text{l}$  di fenolo e subito dopo 5 mL di l' $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrato. I campioni vengono agitati e lasciati riposare per 30 minuti a temperatura ambiente. Passato questo tempo vengono effettuate le letture allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 485 nm.

## ***11. ESTRAZIONE DEI LIPIDI***

L'estrazione dei lipidi è stata eseguita utilizzando una modificazione del metodo di riferimento proposto da Bligh and Dyer (1959).

Sono stati prelevati in diversi giorni 100 mL di coltura per ogni beuta (A, B, C) e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Tab. 3). Al momento dell'analisi le tre repliche sono state unite per avere un quantitativo di materiale sufficiente per l'analisi. I campioni sono stati inizialmente liofilizzati in palloni di vetro, precedentemente lavati con solvente, in modo da non avere interferenze con i risultati. Dopo questo passaggio sono stati aggiunti nei palloni 60 mL di  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1) e sono stati messi 5 minuti nel bagno ad ultrasuoni per facilitare la rottura delle cellule. L'estrazione seguente dei lipidi è stata eseguita a caldo, tenendo il reflusso a  $55\text{-}60^{\circ}\text{C}$  con cicli di circa 2 ore (Fig. 16). A questo punto si è proceduto alla raccolta dell'estratto tramite appositi imbuti di separazione che hanno permesso di separare al meglio la parte cloroformica della soluzione, contenente i lipidi, da quella metanolica. Tale procedura è stata ripetuta per un totale di tre volte, utilizzando per gli ultimi due cicli 45 mL di  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (2:1). Tra un ciclo e l'altro abbiamo atteso un tempo di circa 10 minuti per far separare al meglio le due fasi e la procedura è stata complicata dalla presenza di molto materiale polisaccaridico e mucoso (Fig. 16). Al termine dell'estrazione è stato filtrato l'estratto totale con filtri GF/F, ed è stato fatto evaporare il solvente sotto cappa chimica. In seguito è stato possibile pesare i lipidi totali.



Fig. 16. Varie fasi per l'estrazione dei lipidi.

## ***12. ANALISI ELEMENTARE (CHN)***

L'analizzatore elementare (Thermo Scientific, Flash 2000 Series CHNS/O) permette di determinare la concentrazione di carbonio, idrogeno e azoto contenuta nei campioni. Il principio di funzionamento di questo strumento prevede una combustione rapida e completa del campione all'interno di una fornace, alla temperatura di 950 °C in eccesso di ossigeno. La reazione dell'ossigeno con la capsula contenente il campione genera energia che provoca un innalzamento della temperatura anche fino a 1800°C per qualche secondo, permettendo la conversione di tutte le sostanze organiche (ed eventualmente inorganiche) in gas elementari. In seguito a successive riduzioni, i gas sono separati in una colonna cromatografica e infine inviate ad un rivelatore a termoconducibilità che è usato per determinare il contenuto di carbonio, idrogeno e azoto.

Per preparare i nostri campioni, sono stati inizialmente centrifugati 50 mL di coltura a 5000 rpm, a 4°C per 15 min. E' stato rimosso quasi interamente il sovrantante ed è stata travasata la restante coltura concentrata in tubi da 10 mL. A questo punto i tubi sono stati di nuovo centrifugati sempre a 5000 rpm, a 4°C per 10-15 min, è stato rimosso il sovrantante e i campioni sono stati conservati a -20°C. I campioni sono stati in seguito liofilizzati e piccole quantità comprese tra i 2-3 mg sono state pesate utilizzando una bilancia analitica e inserite dentro capsule di stagno che vengono opportunamente piegate per effettuare l'analisi. Una volta preparati tutte le capsule i campioni sono stati analizzati e quantificati utilizzando una stessa retta di calibrazione ottenuta con lo standard BBOT (2.5-Bis (5-tert-butyl-2-benzo-oxazol-2-yl) thiophene).

## ***13. FOSFORO INTRACELLULARE***

Il fosforo intracellulare è stato analizzato secondo il metodo di Menzel and Corwin (1965), che prevede una digestione delle cellule algali (raccolte su filtri GF/F) con persolfato di potassio e in seguito l'analisi colorimetrica dei fosfati rilasciati nel mezzo (vedi Analisi fosfati par. 7.2).



## **RISULTATI**



## 14. CURVA DI CRESCITA

*Ostreopsis cf. ovata* è nota per la caratteristica formazione di aggregati cellulari come microfilm o patine mucillaginose e pertanto non è così semplice effettuare un prelievo omogeneo per il conteggio di queste specie, il che si potrebbe riflettere in un andamento non corretto delle curve con conseguenti errori nella descrizione della crescita. Per ovviare a questo problema in campioni prelevati in fasi avanzate di crescita, è stata fatta un'aggiunta di HCl che permette di allentare i legami tra i polisaccaridi e facilitare il conteggio delle cellule al microscopio (metodo sperimentato con colture di diatomee (Pistocchi et al., 1997) e utilizzato in precedenza per *O. cf. ovata*, (Guerrini et al., 2010). Nonostante i precedenti problemi, le nostre curve mostrano un chiaro andamento che ci permette di descrivere la crescita della microalga (Fig.17).

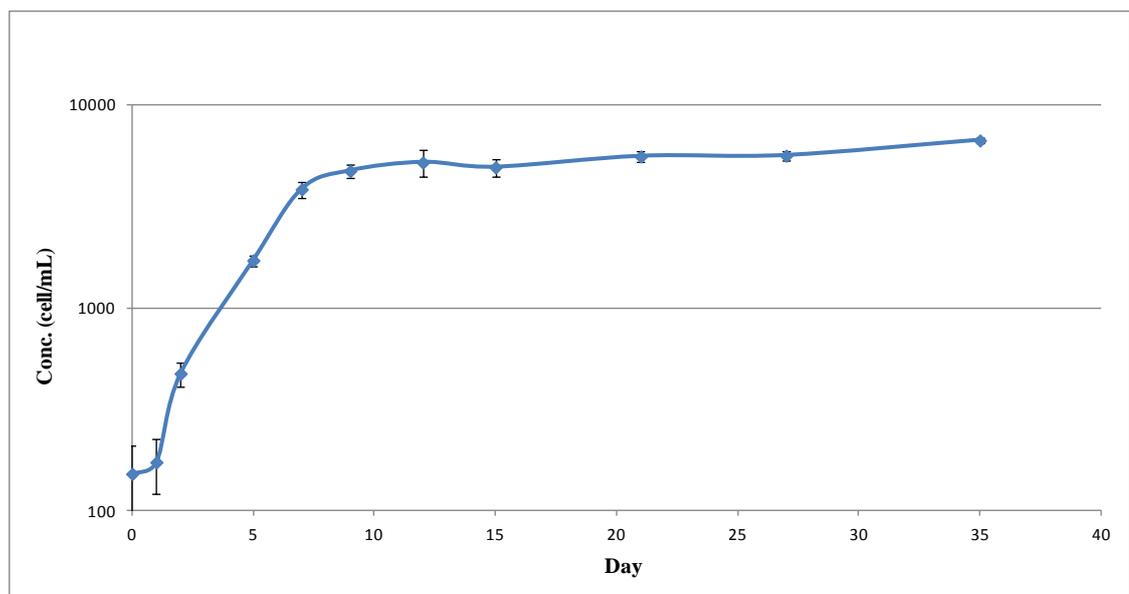


Fig. 17. Curva di crescita di *O. cf. ovata* (ceppo OOAB0801) ottenuta in questo studio.

Sono visibili dal precedente grafico le tre fasi tipiche della curva di crescita: lag, esponenziale e stazionaria. In particolare possiamo notare come le cellule entrino in fase stazionaria dal 9° giorno di coltura per poi mostrare una densità cellulare praticamente costante. Nella fase esponenziale è stata calcolata la velocità di crescita istantanea tramite il modello malthusiano  $dN/dt = rN$ , dal quale integrando ( $N_t = N_0 e^{rt}$ ) e passando ai logaritmi naturali si ricava  $r$  come coefficiente angolare dell'equazione lineare  $\ln N_t =$

$rt + \ln N_0$ ; tale parametro viene indicato con  $\mu$  per indicare il tasso di riproduzione delle microalghe.

<b>Tasso di crescita <math>\mu</math> (<math>\text{day}^{-1}</math>)</b>	<b>Intervallo di tempo (Day)</b>
1,01	1-2
0,43	2-5
0,40	5-7

Tab. 5. Tasso di crescita nei relativi giorni della fase esponenziale.

<b>Tasso di crescita medio <math>\mu</math> (<math>\text{day}^{-1}</math>)</b>	<b>Intervallo di tempo (Day)</b>
0,52	1-7

Tab. 6. Tasso di crescita medio durante la fase esponenziale.

In uno studio di Guerrini et al., (2010) sono stati calcolati i tassi di crescita per colture di *O. cf. ovata* provenienti da campioni prelevati nel Tirreno e nell'Adriatico. Questi risultano essere leggermente minori ( $0,37$  e  $0,32 \text{ day}^{-1}$  per l'Adriatico e il Tirreno rispettivamente) rispetto a quelli calcolati in questo studio (Tab. 5, 6). Tuttavia in altri studi (Pezzolesi et al., 2012) sono stati ritrovati valori confrontabili a quello ottenuto durante questo lavoro ed è stato riportato come le caratteristiche di crescita varino molto a seconda del ceppo utilizzato e delle condizioni di crescita.

## 15. NUTRIENTI

Nei grafici seguenti (Fig. 18, 19) è possibile osservare l'andamento del consumo dei nutrienti (nitrati e fosfati) per la coltura di *O. cf. ovata*.

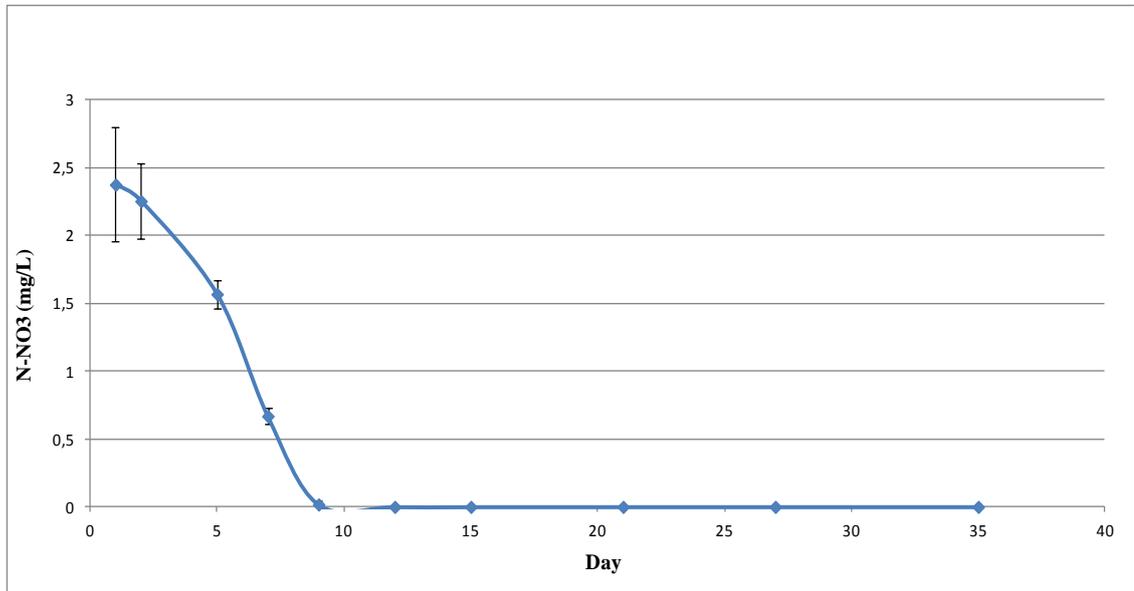


Fig. 18. Andamento dei nitrati durante la crescita analizzati nel terreno di coltura.

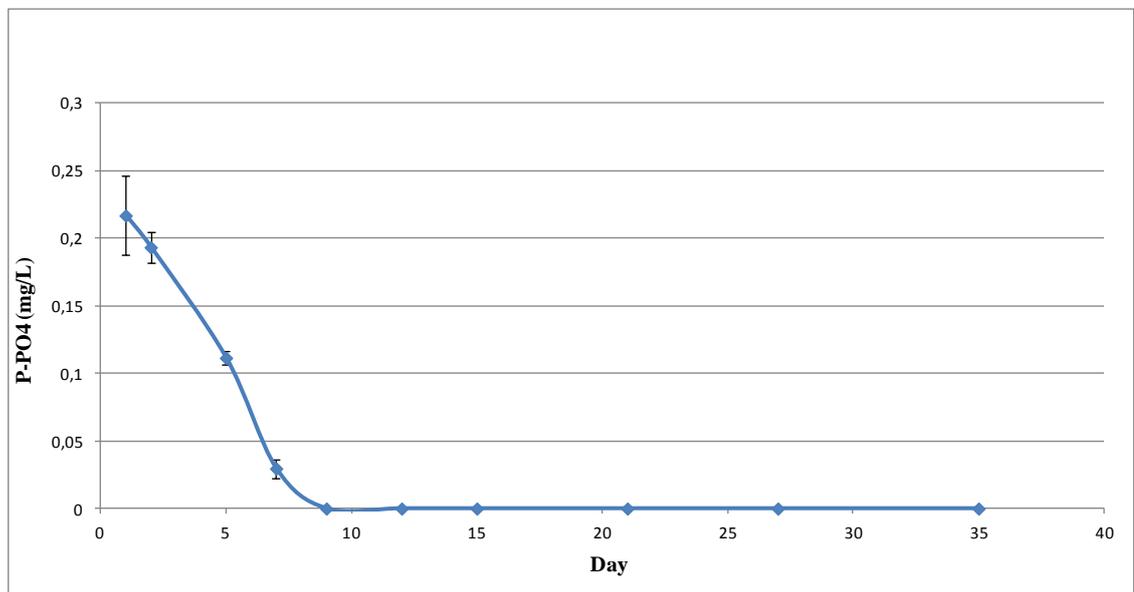


Fig. 19. Andamento dei fosfati durante la crescita analizzati nel terreno di coltura.

La velocità di consumo di entrambi i nutrienti risulta elevata e perdura fino al giorno 9 (inizio della fase stazionaria) in cui si osserva l'esaurimento di tutti e due i nutrienti.

Sono stati calcolati anche il tasso di uptake dei nutrienti e il rapporto Azoto/Fosforo (N/P).

Per quanto riguarda il grafico (Fig. 20) che rappresenta il rapporto N/P possiamo osservare come si parta da un valore pari a 24, che è tipico di questo terreno di coltura, per poi arrivare ad un picco attorno a 50 coincidente con il 7° giorno, prima dell'ingresso in fase stazionaria, per poi diminuire bruscamente fino al 9° giorno dove tale rapporto arriva a zero poiché entrambi i nutrienti nel mezzo di coltura sono esauriti. L'aumento del rapporto N/P rispecchia un consumo più veloce dei fosfati rispetto ai nitrati e riflette una presunta maggiore affinità di *O. cf. ovata* per questo nutriente.

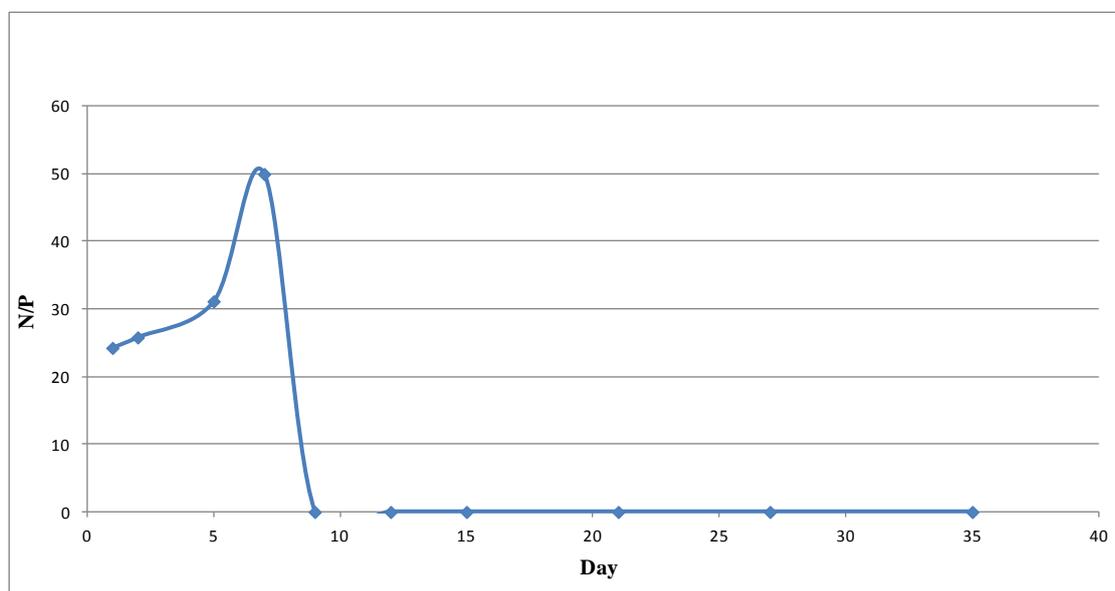


Fig. 20. Rapporto azoto/fosforo calcolato sulla base delle concentrazioni molari di N e P nel terreno di coltura.

Il tasso di uptake (U) dei nutrienti è stato calcolato utilizzando le formule riportate da uno studio di Lim et al., (2006). Sia per i nitrati ( $\text{pmol N-NO}_3^- \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) che per i fosfati ( $\text{pmol P-PO}_4 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) è stata utilizzata la concentrazione dei nutrienti residui nel medium (C) e il cambiamento di densità cellulare ( $\gamma$ ) per un intervallo di tempo ( $\Delta t = t_1 - t_0$ ) in cui la carenza di nutrienti è lineare (Tab. 7).

$$U = -(C_1 - C_0 / \gamma \Delta t)$$

$$\gamma = N_1 - N_0 / \ln N_1 - \ln N_0$$

dove  $C_0$  e  $C_1$  rappresentano la concentrazione di nutrienti ( $\mu\text{M}$ ) al tempo  $t_0$  e  $t_1$ ;  $N_0$  e  $N_1$  rappresentano i valori di densità cellulare ( $\text{cell mL}^{-1}$ ) negli stessi giorni.

<b>Tasso di uptake (U) N-NO<sub>3</sub> (<math>\mu\text{mol day}^{-1}\text{cell}^{-1}</math>)</b>	<b>Tasso di uptake (U) P-PO<sub>4</sub> (<math>\mu\text{mol day}^{-1}\text{cell}^{-1}</math>)</b>	<b>Day</b>
29,0	2,5	1-2
16,9	0,9	2-5
12,2	0,5	5-7
5,4	0,1	7-9

Tab. 7. Tasso di uptake nitrati e fosfati rapportato con i relativi giorni di crescita.

Il tasso di uptake (U) per i nitrati mostra valori iniziali alti, con un picco di assorbimento tra il 1° e il 2° giorno (29,0), per poi raggiungere valori più bassi; anche per i fosfati l'andamento è decrescente con valori massimi tra il giorno 1 e il giorno 2 (2,5). Le cellule quindi assorbono nutrienti per tutta la fase esponenziale, nel periodo in cui avviene la divisione cellulare e, una volta terminati, entrano in fase stazionaria. Le cellule iniziano così ad accrescersi e alcune, seppur poche, continuano a dividersi e ad aver bisogno di riserve da utilizzare durante la fase stazionaria.

## 16. BIOVOLUMI

Il grafico sottostante (Fig. 21) mostra l'andamento medio dei biovolumi cellulari. Da questo grafico possiamo vedere come il valore diminuisca gradualmente nel periodo che va dal giorno 2 al giorno 7 in quanto si tratta della fase esponenziale in cui avviene la divisione cellulare, quindi i volumi cellulari tendono quasi a dimezzarsi per la divisione in cellule figlie (Fig. 22). In seguito si osserva un aumento del biovolume corrispondente all'ingresso delle cellule nella fase stazionaria in cui le cellule si accrescono raggiungendo le dimensioni maggiori, come osservato anche in precedenti studi che riguardano *O. cf. ovata* (Guerrini et al., 2010; Pezolesi et al., 2012) e anche in osservazioni ambientali (Accoroni et al., 2012).

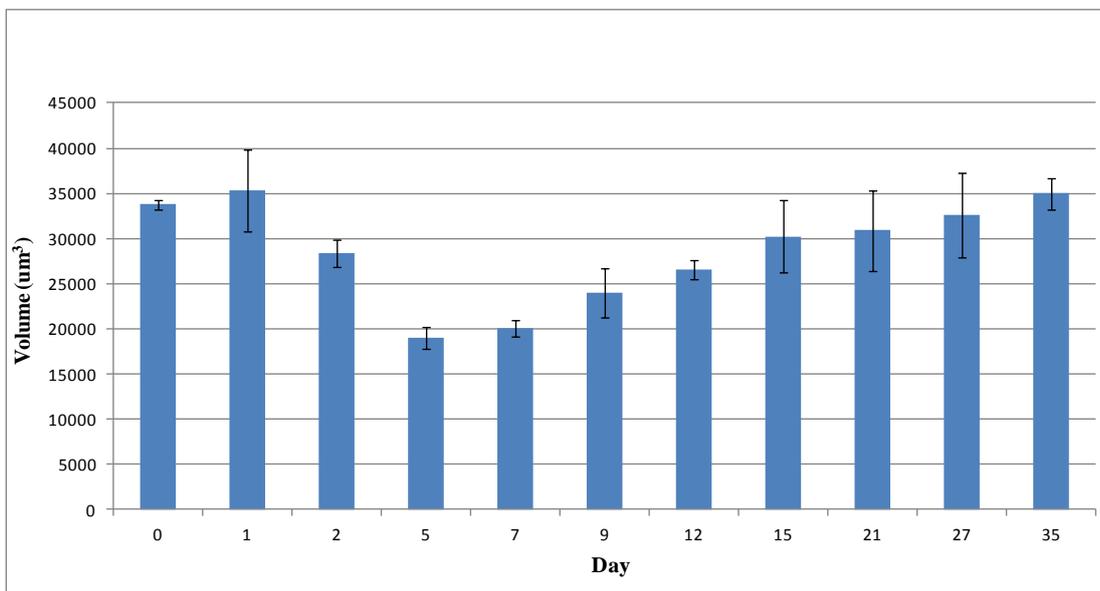


Fig. 21. Biovolumi medi della coltura nei diversi giorni.

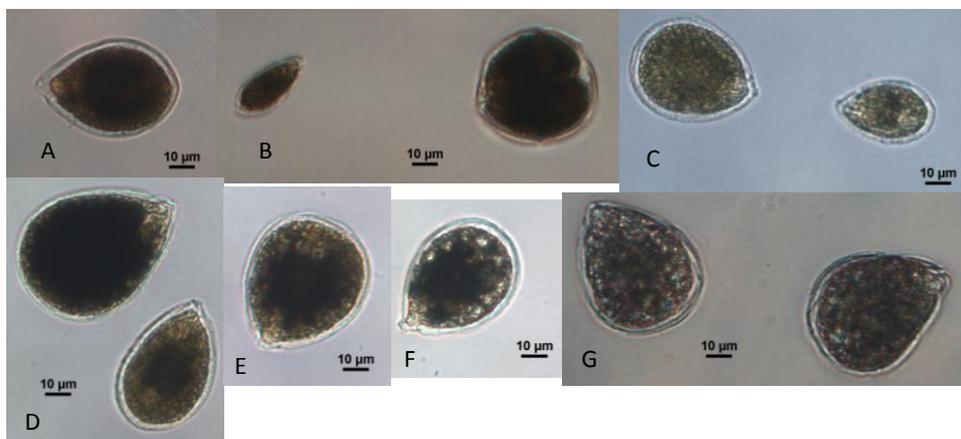


Fig. 22. Cellule di *O. cf. ovata* osservate al microscopio in giorni diversi della crescita: A giorno 2; B giorno 5; C giorno 7; D giorno 12; E giorno 15; F giorno 27; G giorno 35.

Il rapporto dei diametri dorsoventrale e anteroposteriore ( $Dv/Ap$ ) delle singole (Fig. 23) cellule non mostra un andamento costante durante la crescita e i valori maggiori si ritrovano nei giorni intermedi (intervallo giorni 7-12) con un range che va da 1,92 (giorno7) a 2,11 (giorno 12).

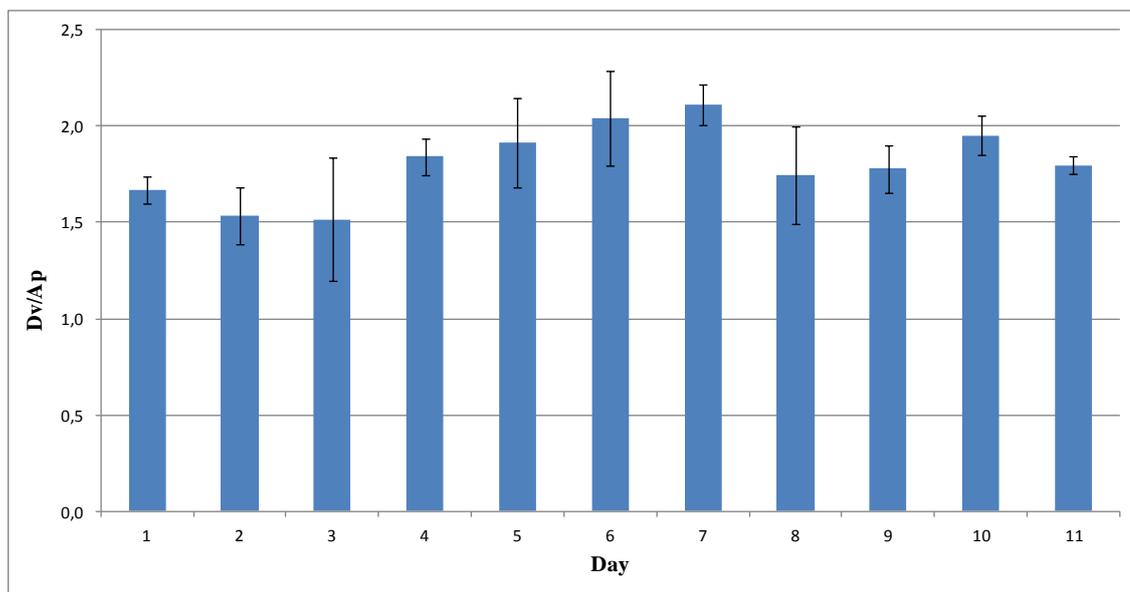


Fig. 23. Rapporto diametri  $Dv/Ap$  ( $Dv$ : dorsoventrale;  $Ap$ : anteroposteriore).

Il rapporto del diametro dorsoventrale e della larghezza ( $Dv/W$ ) invece, mostra valori abbastanza costanti, corrispondenti a un range che va da 1,3 a 1,4 (Fig. 24). Il rapporto  $Dv/Ap$  sembra dipendere anche dal ceppo algale oltre che dalla fase di crescita della coltura; infatti i valori osservati in uno studio di Guerrini et al., (2010) per un ceppo di *O. cf. ovata* dell'Adriatico e per uno del Tirreno sono rispettivamente 2,3 e 1,8 per il rapporto  $Dv/Ap$  in fase stazionaria. Il rapporto  $Dv/W$  invece risulta avere valori più costanti, essendo 1,5 quello riportato per il ceppo Adriatico e 1,4 quello del ceppo del Tirreno, entrambi vicini ai valori da noi ottenuti. Possiamo quindi dedurre che, durante la crescita, la lunghezza ( $Dv$ ) e la larghezza ( $W$ ) delle cellule nei giorni analizzati aumentino proporzionalmente a discapito dello spessore ( $Ap$ ). I valori da noi ottenuti sono concordanti con un altro studio di Accoroni et al., (2012) dove è stato analizzata una coltura di *O. cf. ovata* proveniente da campioni prelevati lungo la riviera del Conero (Mar Adriatico) ed è stato calcolato un rapporto  $Dv/W$  di 1,5. Inoltre il rapporto tra il diametro dorsoventrale e anteroposteriore ( $Dv/Ap$ ) è stato proposto come carattere distintivo per distinguere *O. ovata* e *O. siamensis* in quanto queste specie sono molto simili per forma e dimensione. Tale rapporto si è visto essere maggiore ( $Dv/Ap > 4$ ) per *O. siamensis* rispetto ad *O. ovata* ( $Dv/Ap < 2$ ) (Penna et al., 2005; Aligizaki and

Nikolaidis, 2006) e i risultati ottenuti con il nostro ceppo confermerebbero così la sua identificazione come specie *O. ovata*.

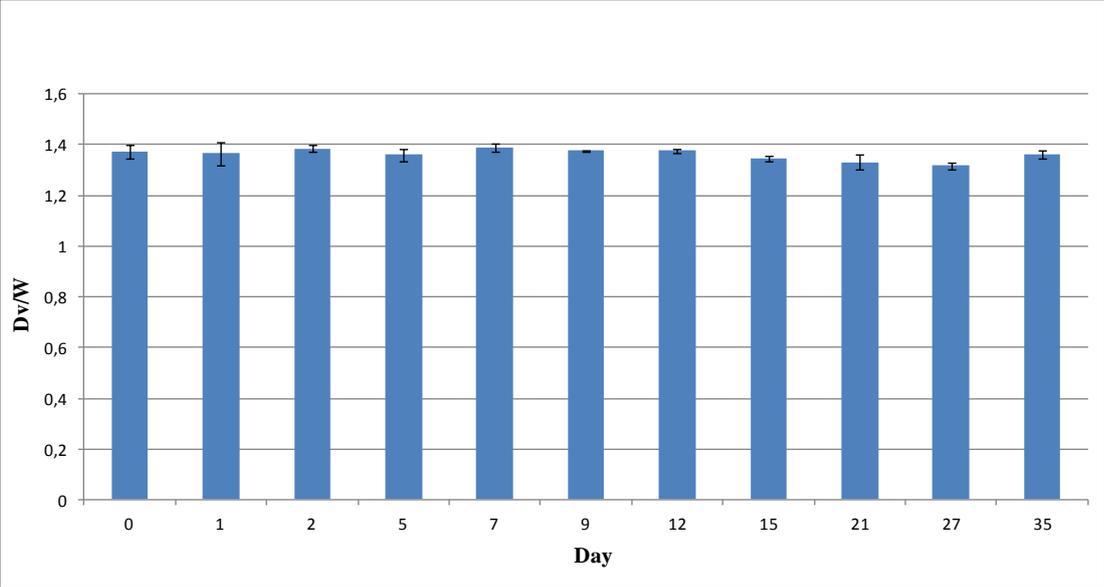


Fig. 24. Rapporto diametri Dv/W (Dv: dorsoventrale; W: larghezza).

## 17. CLOROFILLA a

Dai grafici seguenti possiamo osservare l'andamento della clorofilla a (Chl-a) espresso sia per il volume di coltura che per singola cellula. Nel primo grafico (Fig. 25) si può notare come la concentrazione della Chl-a aumenti fino a che non si raggiunge il giorno 9, corrispondente all'inizio della fase stazionaria, per poi diminuire e mantenere negli ultimi giorni (20-35) un andamento pressochè costante. Questo aumento, parallelo a quello della biomassa, e il successivo calo possono essere dovuti al fatto che dal 9° giorno non sono più presenti nutrienti nel mezzo di coltura e come è stato visto per altre dinoflagellate (e.g. *Alexandrium minutum*, Flynn et al., 1994) la concentrazione di chl-a cala quando le cellule si trovano in carenza di nutrienti e in particolare di nitrati, portando alla conclusione che il contenuto in clorofilla non può essere usato come stima di biomassa. In uno studio di Vidyaratna and Granéli (2012) dove è stato utilizzato un ceppo giapponese di *O. ovata*, il valore più alto di Chl-a è stato registrato invece tra i giorni 19-27.

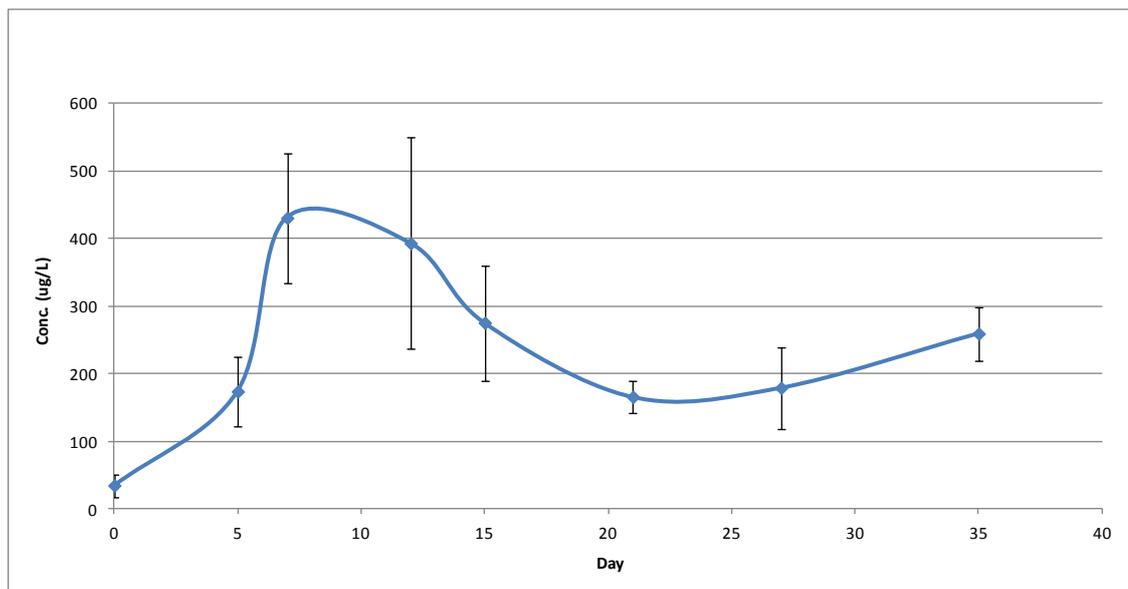


Fig. 25. Andamento della Chl-a ( $\mu\text{g/L}$ ) per la durata della crescita.

Il grafico sottostante (Fig. 26) invece, mostra l'andamento del rapporto Chl-a e biovolume. Si può notare la presenza di una relazione tra aumento dei biovolumi e diminuzione di Chl-a prodotta.

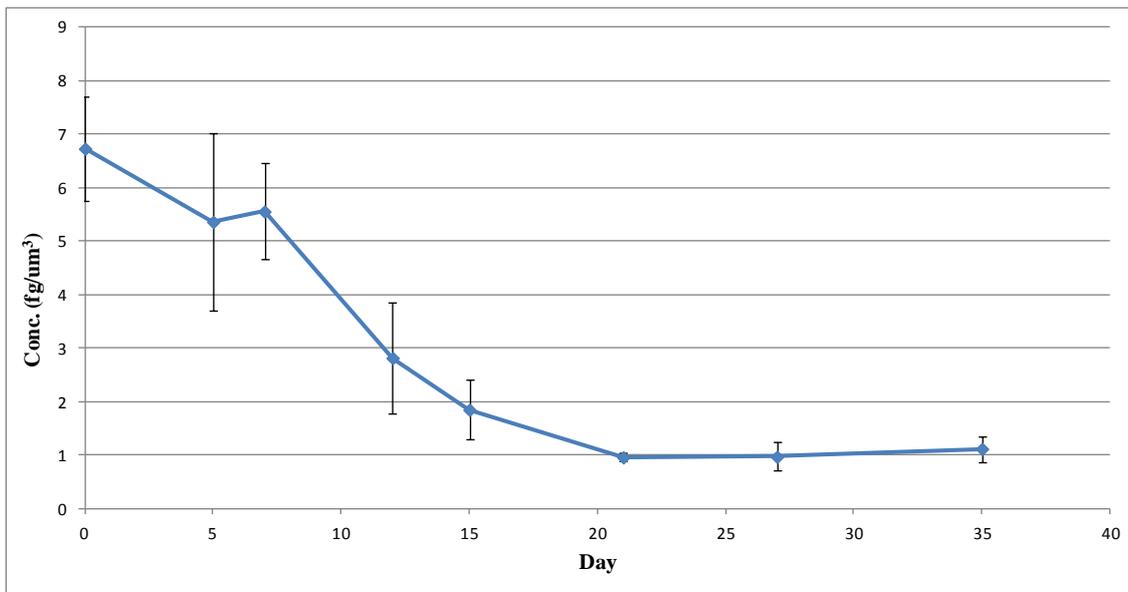


Fig. 26. Andamento del rapporto Chl-a/Biovolume cellulare nelle cellule di *O. cf. ovata* durante la crescita.

## 18. PROTEINE

Le proteine espresse in mg/mL di coltura, sembrano riflettere l'andamento osservato nel grafico della curva di crescita ed essere perciò proporzionali alla biomassa algale durante la crescita. In figura 27 si ha infatti un aumento della concentrazione di proteine nei primi giorni, fino al giorno di ingresso nella fase stazionaria, per poi mantenere un andamento costante in tutta la fase stazionaria e fino al termine dell'esperimento.

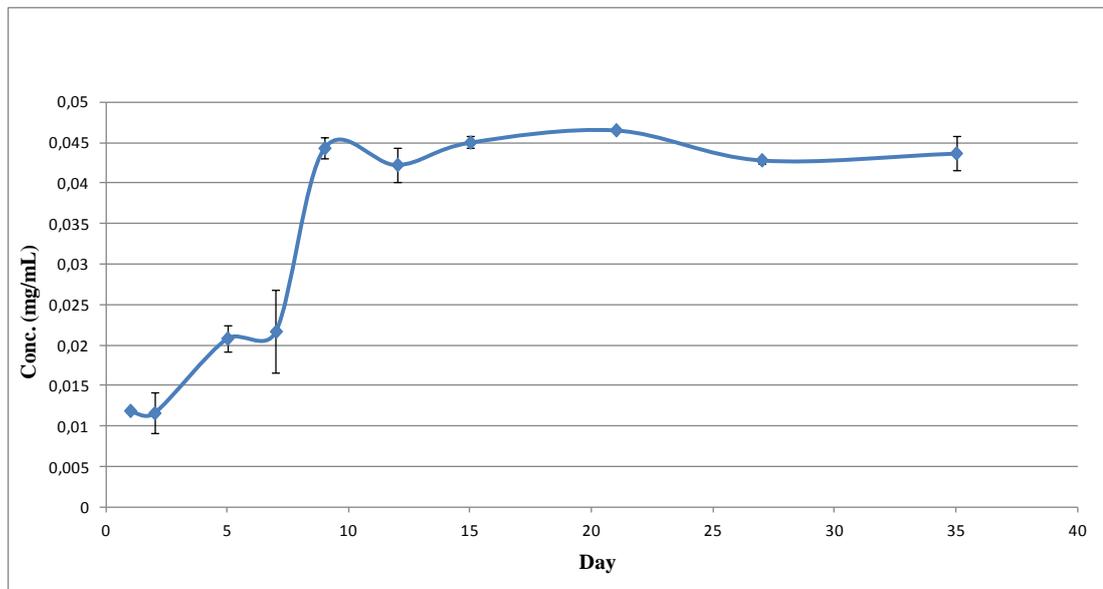


Fig. 27. Concentrazione delle proteine espressa su mL di coltura.

L'aumento osservato nei primi giorni può essere relazionato al consumo dei nutrienti. Infatti si può vedere come una volta terminati i nutrienti (giorno 9, in cui si ha anche l'ingresso in fase stazionaria) la produzione di proteine assuma un andamento quasi costante. La correlazione con i nutrienti è stata messa in evidenza anche in uno studio di Vanucci et al., (2012) dove viene presa in esame una coltura di *Prorocentrum lima*. La produzione di proteine in questo caso sembra risentire maggiormente la carenza di N piuttosto che di P (in cui si osserva un lieve aumento di proteine).

Il grafico che rappresenta la concentrazione di proteine espressa su biovolume cellulare (Fig. 28) invece ci fa vedere come nonostante l'aumento in biovolume delle cellule, il contenuto in proteine rimanga quasi costante a partire dalla fase stazionaria in poi, e che perciò altri composti siano responsabili dell'accrescimento cellulare.

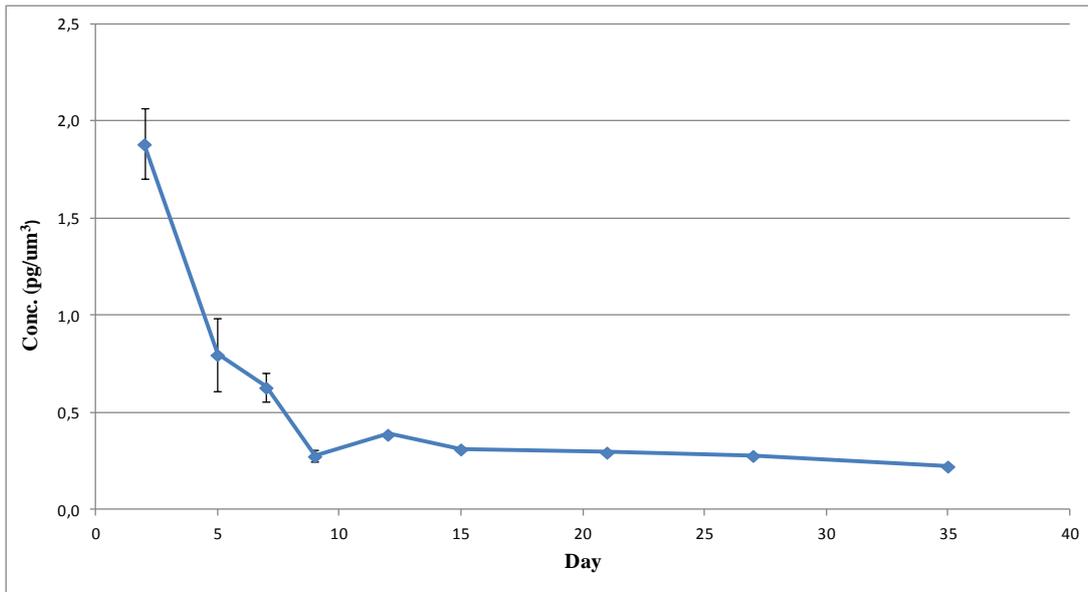


Fig. 28. Concentrazione delle proteine nelle cellule di *O. cf. ovata*, espressa su biovolume.

## 19. POLISACCARIDI

Nei grafici seguenti si può osservare l'andamento dei polisaccaridi: in particolare dei polisaccaridi totali (Fig. 29) e dei polisaccaridi extracellulari (Fig. 30) espressi su mL di coltura. L'andamento dei polisaccaridi totali è caratterizzato da una quantitativo scarso e costante nei primi giorni della crescita, per poi aumentare in maniera evidente e pressochè lineare dall'ingresso in fase stazionaria (giorno 9) e diventare di nuovo costante verso gli ultimi giorni della fase stazionaria. L'andamento dei polisaccaridi extracellulari evidenzia invece un rilascio graduale e costante fin dai primi giorni, per poi arrestarsi in tarda fase stazionaria (giorno 27). Questo andamento è stato osservato anche in altre alghe come la dinoflagellata *Gonyaulax fragilis* (Pistocchi, comunicazione personale), e la diatomea *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) (Guerrini et al., 2000). L'andamento potrebbe essere collegato a quello dei nutrienti, infatti nello studio di Vanucci et al., (2012) precedentemente menzionato effettuato su una coltura di un'altra dinoflagellata bentonica, *P. lima*, emerge come la produzione di polisaccaridi aumenti in caso di cellule con limitazione da nutrienti.

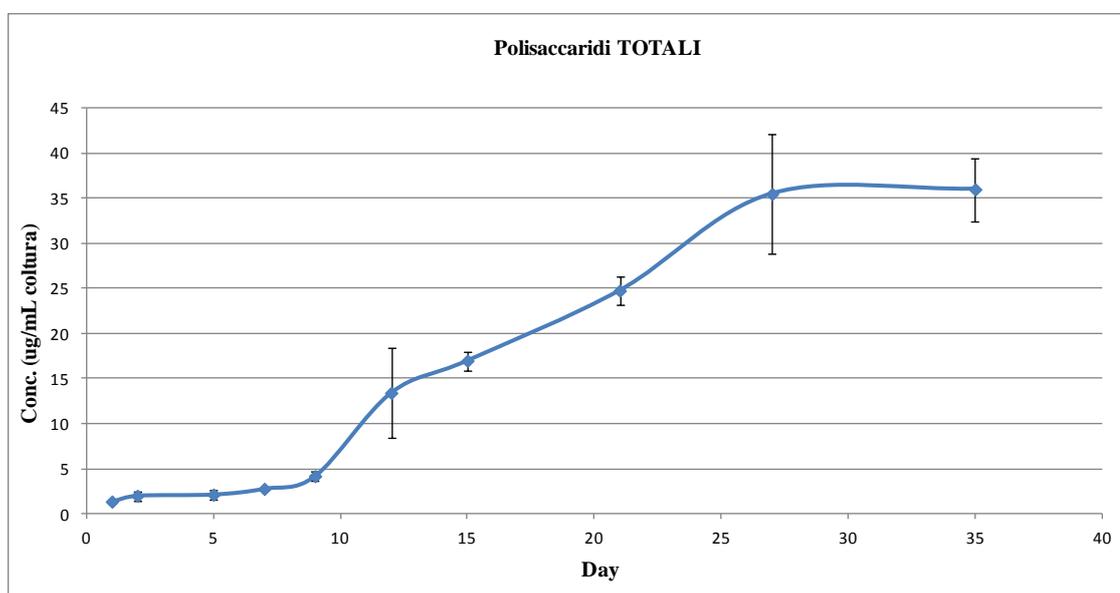


Fig. 29. Polisaccaridi TOTALI prodotti da *O. cf. ovata* durante la crescita, espressi su mL di coltura.

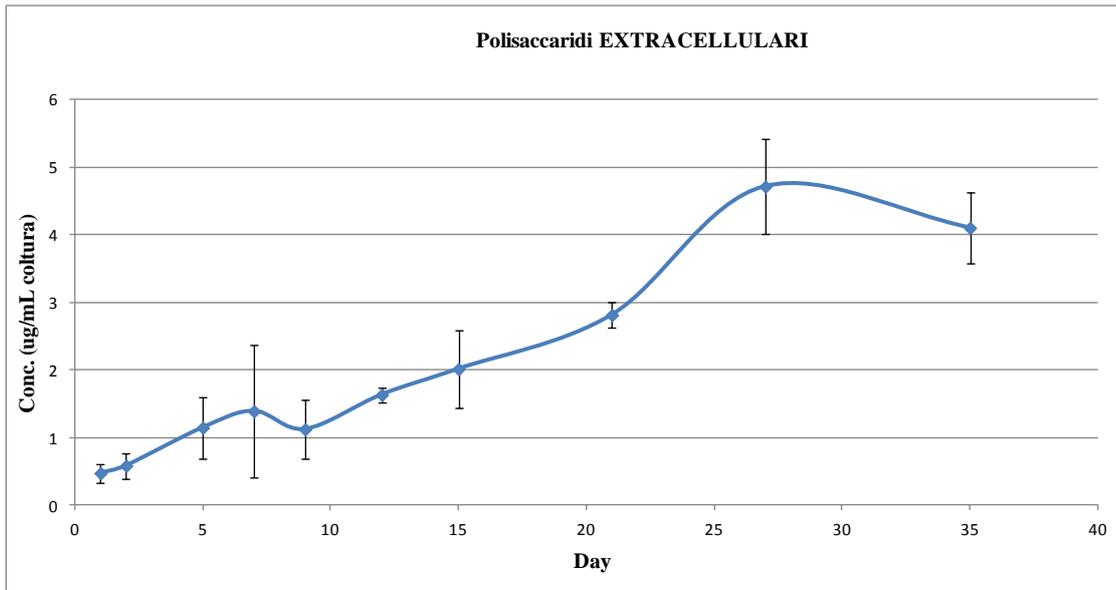


Fig. 30. Polisaccaridi rilasciati extracellularmente da *O. cf. ovata*, espressi su mL di coltura.

In figura 31 e 32 invece, viene mostrato l'andamento dei polisaccaridi totali ed extracellulari espressi su cellula. Nei primi giorni abbiamo valori simili a quelli rilevati poi in fase stazionaria che sono dovuti al fatto che l'inoculo utilizzato per l'esperimento conteneva cellule cresciute fino a raggiungere l'inizio della fase stazionaria; i valori diminuiscono poi fino al giorno 9, rispecchiando la divisione cellulare che avviene in fase esponenziale, e aumentano dopo che le cellule entrano in fase stazionaria per poi raggiungere valori costanti negli ultimi giorni, quando le cellule probabilmente non sono più metabolicamente attive. Tale andamento è simile a quello osservato nel grafico rappresentante i biovolumi cellulari. I polisaccaridi extracellulari espressi su base cellulare riportano invece un andamento più costante in fase stazionaria, riflettendo probabilmente un continuo ma costante rilascio di questi composti nel mezzo extracellulare, che potrebbe facilitare l'aggregazione cellulare e la formazione della comunità bentonica formata da queste microalghe in ambiente.

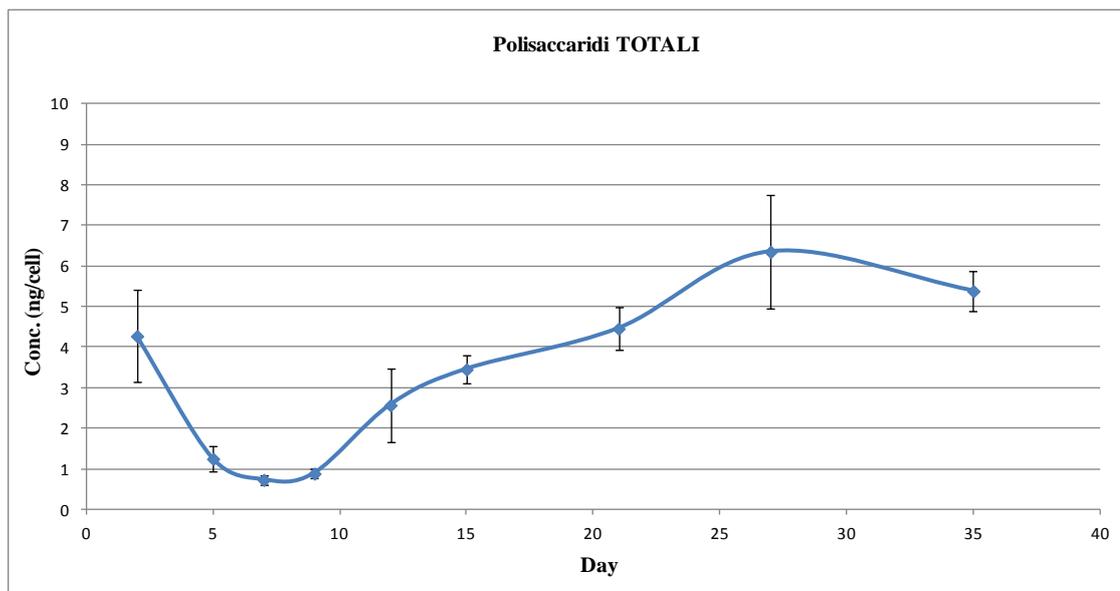


Fig. 31. Polisaccaridi TOTALI prodotti da *O. cf. ovata* durante la crescita, espressi su singola cellula.

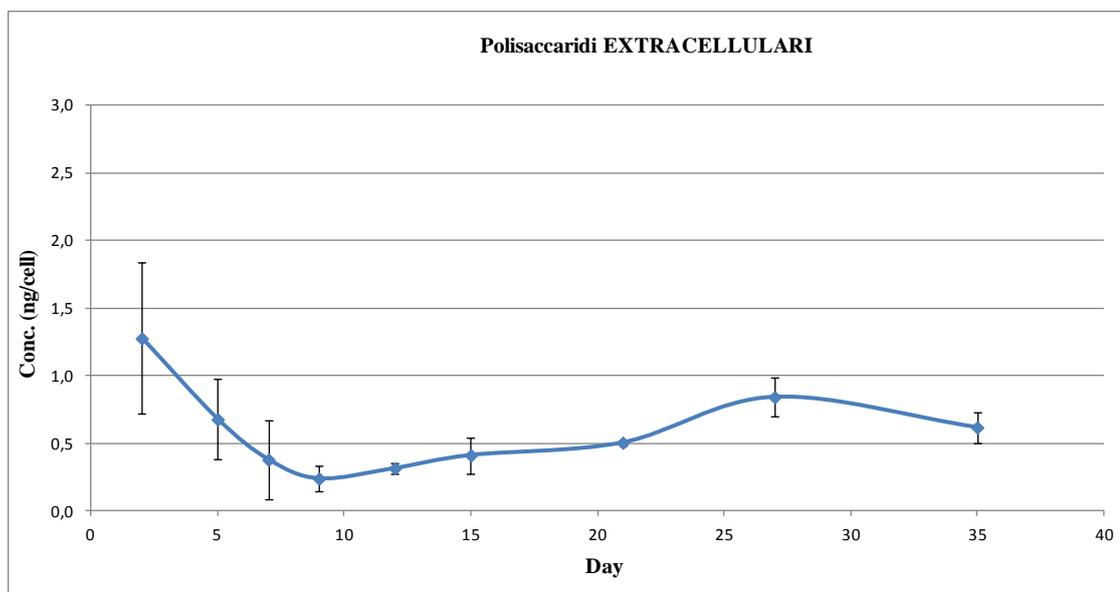


Fig. 32. Polisaccaridi rilasciati EXTRAcellularmente da *O. cf. ovata*, espressi su singola cellula.

Per quanto riguarda il grafico che mostra il rapporto percentuale tra polisaccaridi extracellulari e totali (Fig. 33), possiamo vedere come questo assuma inizialmente valori crescenti, che rispecchiano la produzione di polisaccaridi extracellulari fin dall'inizio della crescita, ma anche come dall'entrata in fase stazionaria i valori mostrino subito un andamento decrescente fino a diventare costante per tutta la restante fase stazionaria (giorni 12-35).

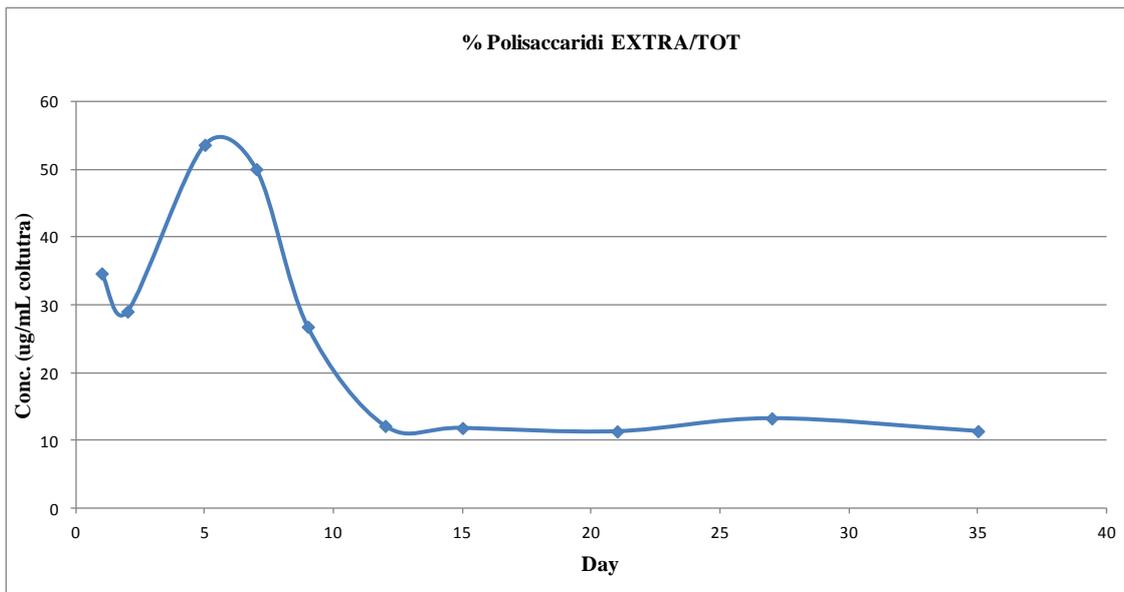


Fig.33. Abbondanza relativa (%) dei polisaccaridi extracellulari rispetto ai totali.

L'andamento visto nei precedenti grafici può far quindi pensare che la microalga produca tali quantitativi di polisaccaridi durante la crescita come strategia ecologica di difesa e di accrescimento (e.g. adesione al substrato, competizione per la luce).

## 20. LIPIDI

Il seguente grafico (Fig. 34) mostra l'andamento dei lipidi totali nei diversi giorni della coltura. Si osserva come la concentrazione di questi composti tende ad aumentare dal 1° al 35° giorno, dove raggiunge un valore di 31,03 µg/mL di coltura. Questo andamento è diverso da quello ottenuto se il quantitativo di lipidi viene espresso su cellula, in cui risultano valori più o meno costanti durante le varie fasi di crescita con un range di concentrazione che varia da 0,002 nei primi giorni (1-7), 0,004 durante la fase stazionaria (12-21), a 0,005 negli ultimi giorni (21-35).

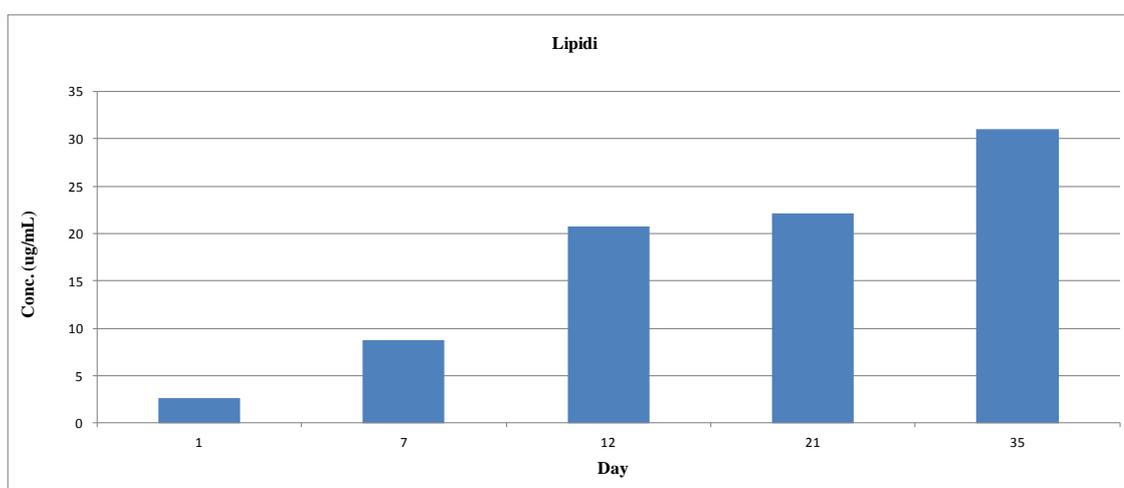


Fig. 34. Lipidi totali (µg/mL di coltura).

La tabella 8 riporta il tasso di produzione dei lipidi per singola cellula nei vari periodi della crescita ed emerge che la produzione è alta fino al giorno 12, per poi diminuire in tarda fase stazionaria.

Tasso di produzione (U) dei lipidi (ng cell <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	Intervallo di tempo (Day)
0,86	1-7
0,53	7-12
0,03	12-21
0,10	21-35

Tab.8.Tasso di produzione dei lipidi.

## 21. ANALISI ELEMENTARE (CHN)

I grafici sottostanti mostrano l'andamento del rapporto cellulare carbonio/azoto (C/N) (Fig. 35) e delle percentuali dei singoli elementi (% C e % N, Fig. 36) durante la crescita.

Il rapporto C/N mostra valori crescenti con l'avanzare dei giorni, concordanti con l'andamento ritrovato nella curva di crescita e con la dimensione delle cellule, che anche negli ultimi giorni di coltura presentavano elevate dimensioni e poche cellule rotte.

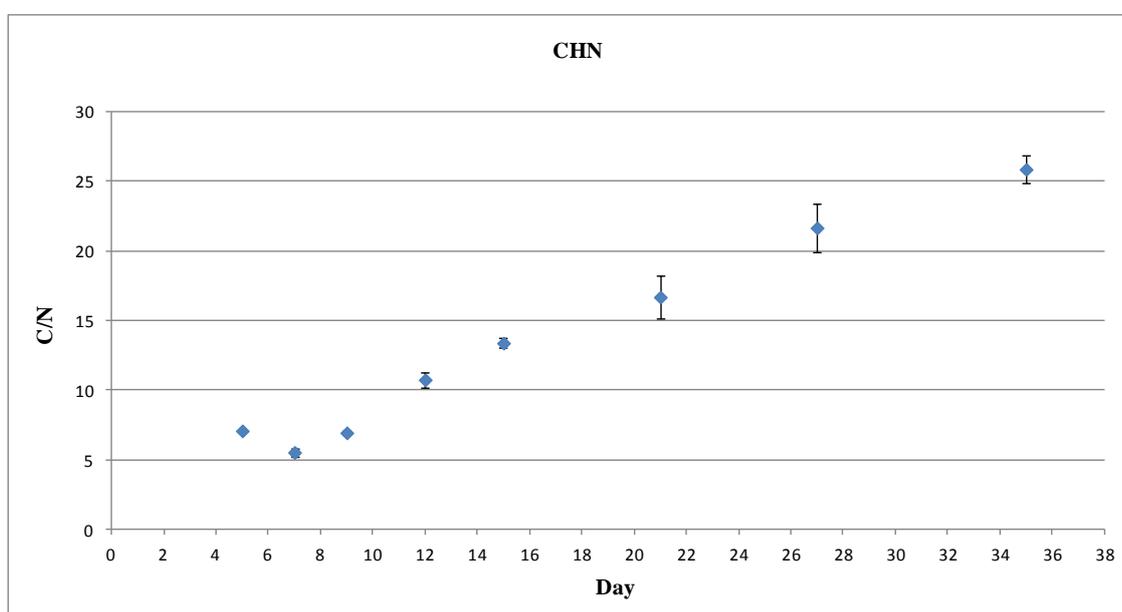


Fig.35. Andamento del rapporto cellulare C/N.

La figura 36 paragona gli andamenti osservati per la % C e per la % N nei vari giorni di crescita. I due elementi non seguono lo stesso andamento, infatti il C ha un andamento molto simile a quello osservato nel grafico precedente e tende ad aumentare con l'avanzare dei giorni di coltura per poi mantenere un andamento quasi costante (giorni 27-35), mentre l'azoto cellulare aumenta finché questo nutriente è presente nel terreno di coltura poi tende a diminuire leggermente pur rimanendo disponibile all'interno della cellula come riserva.

Solitamente la concentrazione di azoto cellulare rispecchia la quantità di aminoacidi quindi di sintesi proteica che avviene all'interno della cellula, così come il carbonio cellulare è assimilabile all'andamento di carboidrati e lipidi. L'aumento del rapporto C/N osservato durante la crescita di *O. cf. ovata* riflette chiaramente ciò che avviene a

livello cellulare in questa dinoflagellata e conferma come lo stabilizzarsi della concentrazione di proteine durante la fase stazionaria di crescita sia invece affiancato dall'aumentare dei polisaccaridi e dei lipidi.

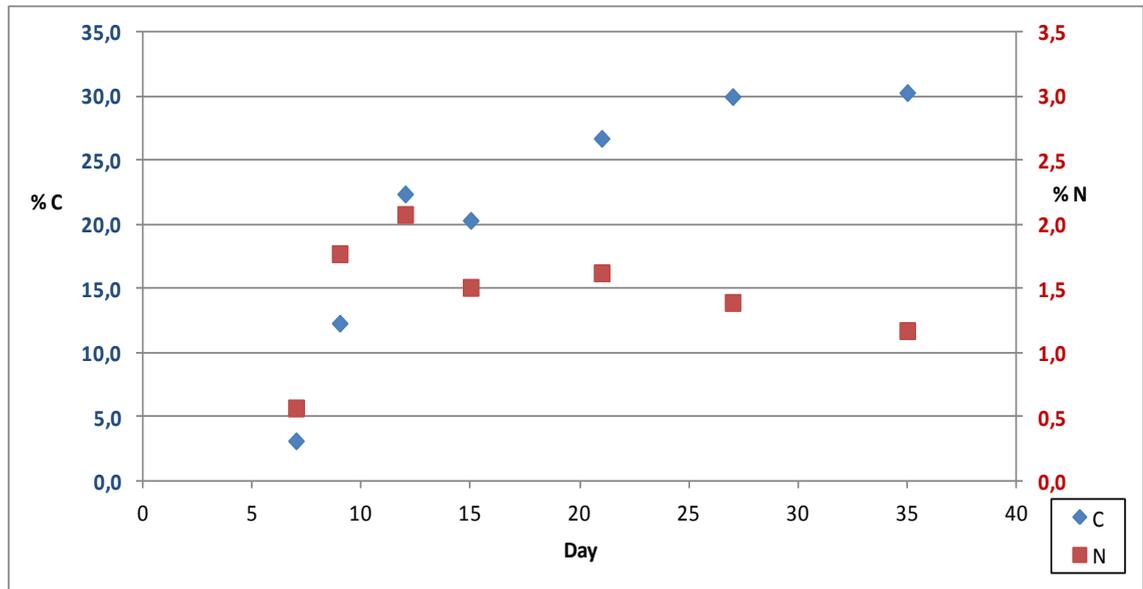


Fig. 36. Andamento percentuale del contenuto cellulare di C e N.

## 22. FOSFORO INTRACELLULARE

Il grafico (Fig. 37) che raffigura la distribuzione del fosforo intracellulare mostra dei valori inizialmente crescenti (giorno 5 - giorno 15) e successivamente un'inversione dell'andamento, con valori decrescenti per gli ultimi giorni di coltura (giorno 15 - giorno 35). Questo andamento è da ricondurre probabilmente al fatto che in questa ultima fase la crescita è avanzata, le cellule tendono ad invecchiare e consumano la riserva energetica accumulata all'interno della cellula, portando a un contenuto minore di fosforo intracellulare. L'andamento mostrato è inverso rispetto a quello dei fosfati analizzati nel mezzo di coltura visti in precedenza (Fig. 19), che mostra una presenza degli stessi fino al giorno 9. Il fatto che il P intracellulare raggiunga valori massimi in tempi più lunghi (giorno 15) rispetto alla rimozione totale dei fosfati dal terreno di coltura (giorno 9) e che le sue concentrazioni calino lentamente rispecchia il fatto che queste cellule prediligano un accumulo e un consumo lento delle riserve energetiche presenti al loro interno.

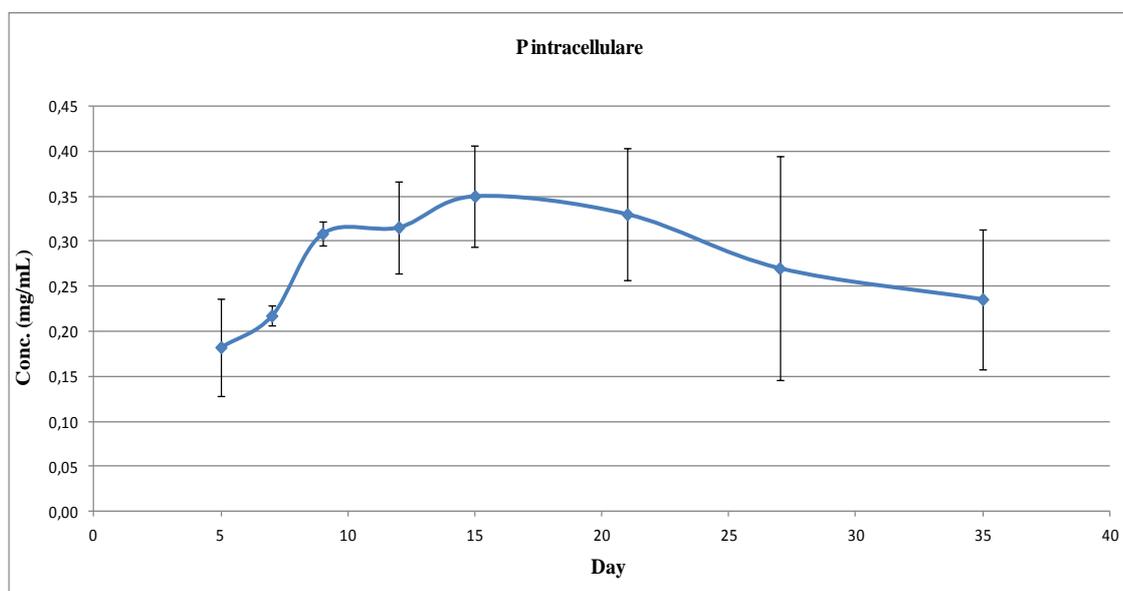


Fig. 37. Fosforo intracellulare espresso come P-PO<sub>4</sub> su mL di coltura.

### 23. TOSSINE

In seguito alle analisi condotte presso l'Università Federico II di Napoli, è stato possibile determinare il quantitativo di tossine per cellula e per volume di coltura, al fine di studiare se c'è una relazione tra la crescita, il consumo di nutrienti e la produzione di tossine e altri composti all'interno della cellula di *O. cf. ovata*.

Nei grafici seguenti vengono illustrate le quantità delle tossine in rapporto alle cellule presenti in un mL di coltura e in rapporto al biovolume. Dai risultati delle analisi circa il contenuto di tossine cellulare, si osserva come il ceppo di *O. cf. ovata* utilizzato sia in grado di produrre tutte le ovatossine finora conosciute, contrariamente a quanto evidenziato in altri ceppi in precedenza (Ciminiello et al., 2012), dove non vi era produzione di ovatossina-b e -c. Tra le tossine prodotte, l'ovatossina-a è la componente maggiore (52-55%), seguita dalle ovatossine b (25-29%), d+e (11-16%), c (4-7%) e infine da una piccola produzione (1-2%) di palitossina putativa (Fig. 38). Nonostante i valori diversi delle singole tossine analizzate, la loro produzione è costante nel tempo, con valori iniziali di 8,4 pg/cell (giorno 1) che diminuiscono raggiungendo valori attorno a 4,5 pg/cell al giorno 7 (andamento riconducibile al fatto che in quei giorni avviene la divisione cellulare), per poi aumentare raggiungendo valori intorno ai 20 pg/cell una volta raggiunta la fase stazionaria (dal giorno 9). Inoltre la presenza costante di tutte le tossine per tutti i giorni analizzati ci permette di dire che nessuna tossina funge da precursore per le altre.

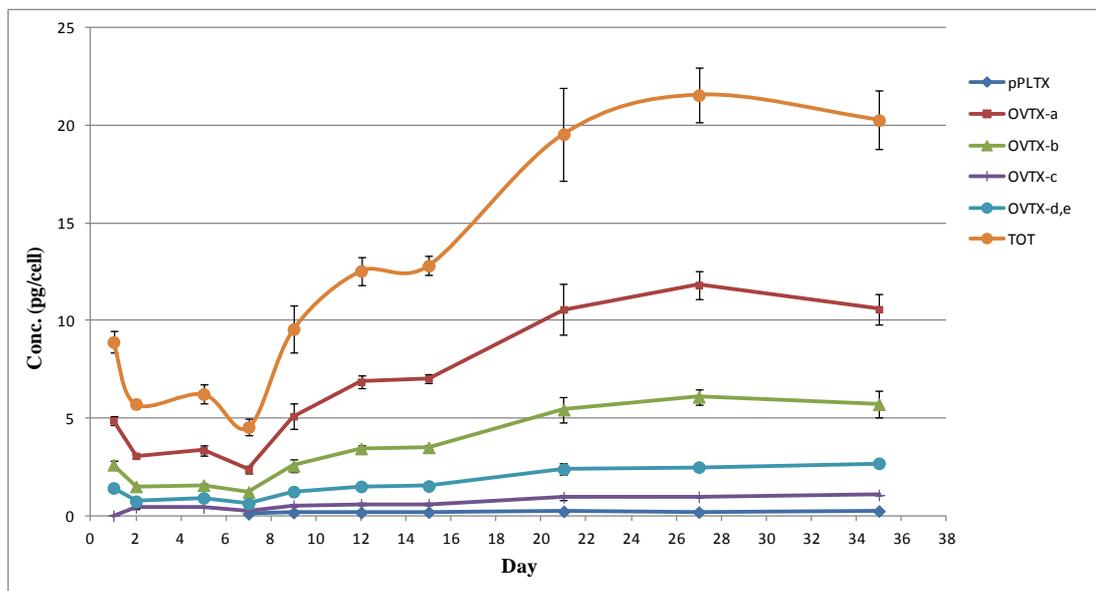


Fig. 38. PLTXs prodotte da *O. cf. ovata* durante la crescita.

Per quanto riguarda la concentrazione delle tossine totali/volume di coltura si può osservare come la concentrazione cellulare delle tossine parte da valori intorno a 1,5 ng/mL (giorno 1), fino ad arrivare a valori intorno a 17,3 ng/mL (giorno 7), per poi aumentare in fase stazionaria raggiungendo valori finali di 134,1 ng/mL (giorni 21-35).

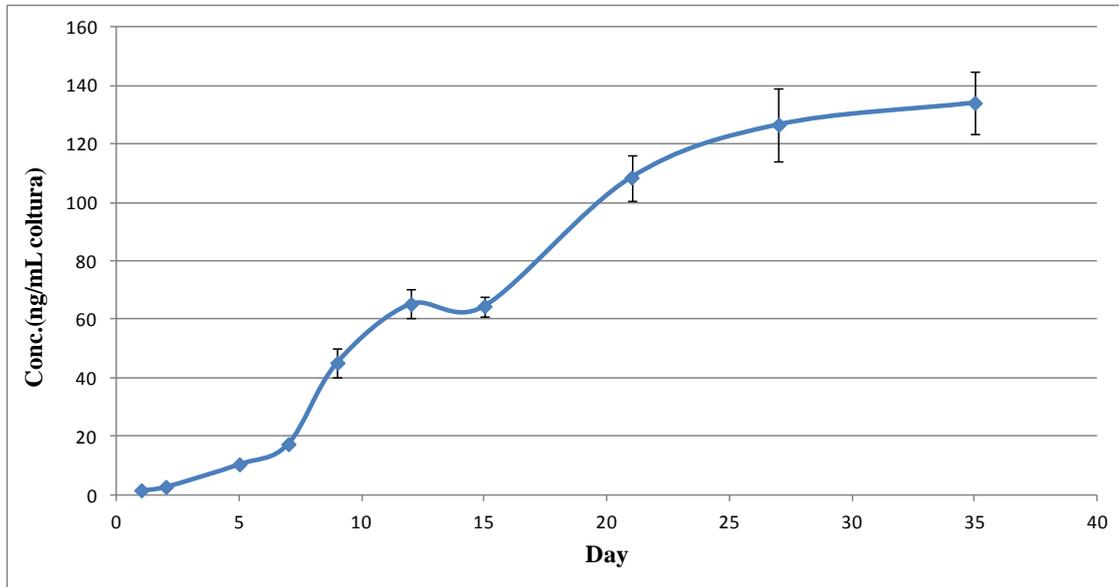


Fig. 39. Produzione totale di PLTXs nei giorni di coltura.

Sono stati analizzati anche i tassi di produzione delle tossine e la concentrazione delle tossine espressa su biovolume. Il tasso di produzione ci fa vedere come i valori più alti si ritrovino nel punto di ingresso della fase stazionaria, per poi mantenere valori leggermente più bassi ma costanti fino alla fine della stessa.

Tasso di produzione (U) Tossine (pg cell <sup>-1</sup> day <sup>-1</sup> )	Day
3,92	1-2
2,67	2-5
1,31	5-7
3,26	7-9
1,03	9-21

Tab. 9. Tasso di produzione delle tossine.

Per quanto riguarda il grafico sottostante (Fig. 40) possiamo osservare come in una prima fase sembra che ci sia una relazione tra la produzione di tossine e i biovolumi, mostrando un rapporto tra i due parametri quasi costante, ma questo è probabilmente da ricondurre al fatto che le cellule sono in piena divisione cellulare. Successivamente si può vedere come, anche quando i biovolumi tendono ad aumentare (fase stazionaria), le tossine espresse sulla base del volume cellulare abbiamo un andamento in crescita che denota come la loro produzione sia in continuo aumento in maniera indipendente dalle dimensioni cellulari.

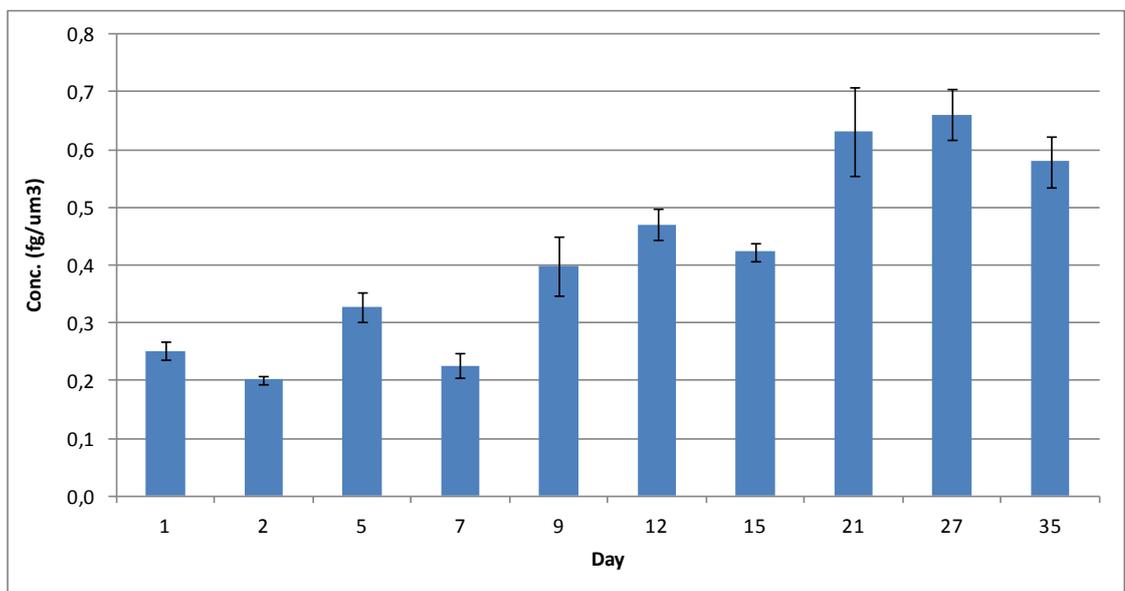


Fig. 40. Contenuto totale di tossine espresso sulla base del biovolume cellulare.

I seguenti grafici (Fig. 41) riassumono l'abbondanza relativa (%) dei principali componenti cellulari all'interno delle cellule di *O. cf. ovata* analizzate nei diversi giorni (7-12-21-35). I valori iniziali (giorno 7) maggiori si hanno per le proteine (67,77%), mentre i polisaccaridi tendono ad aumentare con l'avanzamento della coltura, partendo da un 4,29% (giorno 7) fino ad un 29,78% (giorno 35) e i lipidi a rimanere circa costanti (attorno al 27%) a differenza delle proteine, che al giorno 35 sono diminuite fino al 41,12% del totale. Le tossine rappresentano una piccola porzione rispetto al totale, ma presente in modo costante e in leggero aumento (da 0,06% a 0,13%) in tutti i giorni analizzati.

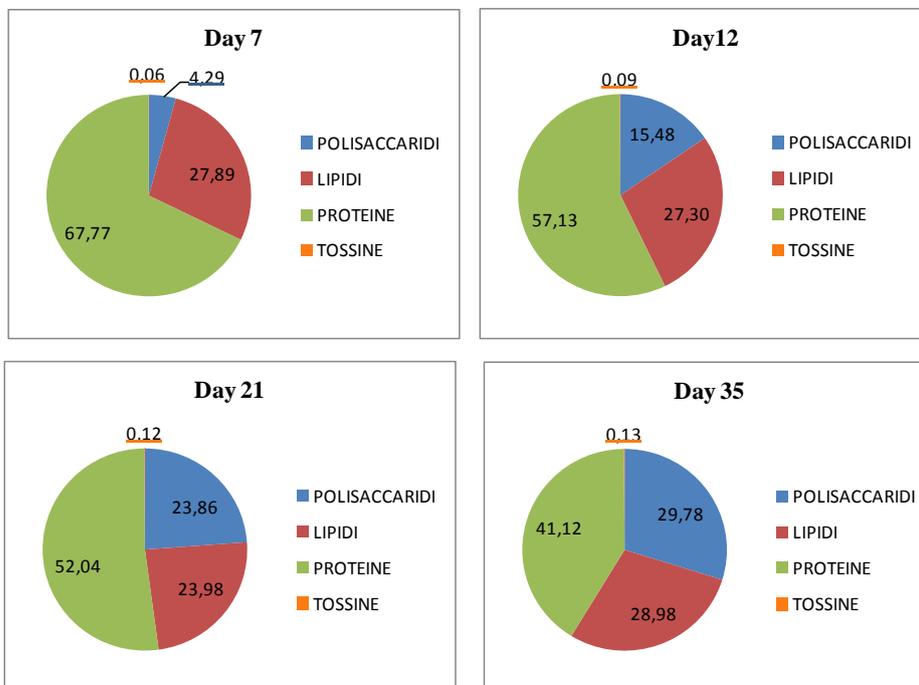


Fig.41. Andamento percentuale dei costituenti principali e delle tossine durante la crescita.

## **CONCLUSIONI**



Molte specie fitoplanctoniche producono tossine e si pensa che questa caratteristica conferisca all'organismo produttore un vantaggio evolutivo (e.g. difesa contro il grazing), tuttavia il vero ruolo delle tossine non è sempre evidente. In particolare la sintesi di tale molecole rappresenta un costo energetico elevato per la cellula, soprattutto quando contengono elementi importanti come l'azoto; trattandosi però di composti secondari, non perfettamente integrati nell'omeostasi cellulare, è possibile che la sintesi delle singole tossine subisca diversamente le variazioni nel metabolismo. Ad esempio le saxitossine vengono prodotte dalle varie specie di *Alexandrium* durante la fase esponenziale di crescita, quando cioè la disponibilità di azoto è elevata; tuttavia le tossine vengono ripartite tra le cellule figlie non portando così ad un aumento di tossicità della popolazione. Altre tossine, sempre contenenti azoto, come l'acido domoico vengono invece prodotte quando le cellule smettono di dividersi, producendo una popolazione sempre più tossica.

In questo lavoro si è voluto studiare come variano i costituenti cellulari principali durante la crescita di *Ostreopsis cf. ovata* e in quale proporzione, valutando se esiste una relazione tra l'assorbimento dei nutrienti principali, la produzione dei costituenti cellulari e delle tossine e, se questa relazione possa essere paragonata a ciò che realmente avviene in ambiente naturale.

Il ceppo di *O. cf. ovata* utilizzato per lo studio (OOAB0801), ha mostrato un andamento della curva di crescita tipico di questa specie, con l'entrata in fase stazionaria dal 9° giorno analizzato. I tassi di crescita osservati coprono un range di valori che va da 0,40 - 0,43 day<sup>-1</sup> fino a raggiungere un valore medio di 0,52 day<sup>-1</sup> nella fase esponenziale, concordante con quanto riscontrato in un lavoro di Pezolesi et al., 2012 ( $\mu = 0,34 - 0,49 \text{ day}^{-1}$ ).

Per l'analisi dei biovolumi si osserva un andamento correlato con la crescita della coltura, con valori massimi registrati in fase stazionaria. I valori dei rapporti calcolati per i diametri dorsoventrale /anteroposteriore (Dv/Ap) e per il diametro dorsoventrale/larghezza (Dv/W) sono rispettivamente 1,92 - 2,11 e 1,3 - 1,4, concordanti con i valori osservati in uno studio di Guerrini et al., (2010) per un ceppo di *O. cf. ovata* dell'Adriatico e per uno del Tirreno (2,3 e 1,8 per il rapporto Dv/Ap e, 1,5 (Adriatico) e 1,4 (Tirreno) per il rapporto Dv/W) e, con un studio di Accoroni et al., (2012) dove è stato analizzata una coltura di *O. cf. ovata* proveniente da campioni prelevati lungo la riviera del Conero (Mar Adriatico) in cui è stato visto un rapporto Dv/W di 1,5. Possiamo inoltre osservare che nel nostro campione lunghezza (Dv) e

larghezza (W) delle cellule nei giorni analizzati aumentano a discapito dello spessore (Ap).

L'analisi dei costituenti principali durante la crescita ha mostrato valori crescenti per i polisaccaridi e lipidi, mentre decrescenti per le proteine. Questo è ricollegabile all'analisi effettuata per il rapporto carbonio/azoto (C/N), dove si vede un aumento di tale rapporto a favore del C e di conseguenza dei composti contenenti tale elemento (e.g. lipidi, polisaccaridi). Per quanto riguarda i polisaccaridi si osserva un aumento nel loro contenuto totale durante la crescita, come già riportato da Vidyarthna and Granéli, (2012), accompagnato dal rilascio di quelli extracellulari come osservato in uno studio di Liu and Buskey, (2000); ciò è riconducibile a una possibile strategia ecologica, in particolare per la produzione di muco utile per lo sviluppo della comunità.

L'analisi chimica delle tossine mostra che nel nostro ceppo sono presenti tutte le tossine principali prodotte da questa specie: pPLTX, ovatossina-a, -b, -c, -d, -e. La determinazione quantitativa per cellula ha mostrato che la tossina maggiormente prodotta è l'ovatossina-a, ma tutte le tossine aumentano parallelamente, evidenziando che nessuna possa fungere da precursore per le altre. Studi precedenti avevano mostrato che le cellule contenevano una maggiore quantità di tossine in fase stazionaria e questo lavoro ha messo in luce per la prima volta come il tasso di produzione sia maggiore quando la divisione delle cellule comincia a rallentare.

Possiamo inoltre affermare che il nostro ceppo mostra un assorbimento veloce dei nutrienti principali (azoto e fosforo) che può essere collegato al fatto di creare delle riserve che poi possono essere utilizzate per la crescita e per la produzione di tossine.

In conclusione gli andamenti riscontrati possono essere applicati al fine di una strategia ecologica/adattativa che va dalla protezione della microalga stessa a una competizione con le altre specie fino ad una struttura ottimale della comunità. *O. cf. ovata* infatti è una microalga bentonica opportunista per quanto riguarda il substrato, vi aderisce realizzando una matrice mucillaginosa, intrappolando piccoli organismi e generando un'elevata concentrazione di biotossine con funzione di difesa utile quando le cellule non sono più in grado di crescere attivamente. La mucillagine prodotta è successivamente colonizzata da batteri e funghi che contribuiscono alla formazione di un complesso microfilm (Barone and Prisinzano, 2006).

## **BIBLIOGRAFIA**



Abbate, M., Bordone, A., Cerrati, G., Lisca, A., Peirano, A., 2007. Variabilità della distribuzione e densità di *Ostreopsis ovata* nel golfo della Spezia. Biol. Mar. Mediterr. 14 (2): 286-287.

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.

Accoroni S., Romagnoli T., Pichierri S., Colombo F., Totti C., 2012. Morphometric analysis of *Ostreopsis* cf. *ovata* cells in relation to environmental conditions and bloom phases. Harmful Algae 19: 15-22.

Ade P., Funari E., Poletti R., 2003. Il rischio sanitario associato alle tossine di alghe marine. Ann. Ist. Super. Sanità. 39(1): 53-68.

Aligizaki, K., Nikolaidis, G., 2006. The presence of the potentially toxic genera *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) in the North Aegean Sea, Greece. Harmful Algae 5: 717-730.

Aligizaki, K., Katikou P., Nikolaidis, G., Panou A., 2008. First episode of shellfish contamination by palitoxin-like compounds from *Ostreopsis* species (Aegean Sea, Greece). Toxicon 51: 418-427.

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.

Anderson, D.M., Lobel, P.S., 1987. The continuing enigma of ciguatera. Biol. Bull. 172: 89- 107.

Anderson D.M., Kulis D.M., Sullivan J.J., Hall S., Lee C., 1990. Dynamics and physiology of saxitoxin production by the dinoflagellates *Alexandrium* spp. Mar. Biol. 104: 511-524.

Anderson DM., 1994. Le maree rosse. Le scienze; 314 (10): 74-81.

Anderson D.M., 1994. Red tides. Sci Am 271: 52-58.

Attaway D.H., Ciereszko L.S., 1974. Isolation and partial characterization of Caribbean palytoxin. Proceedings of Secon International Coral Reef Symposium I, Great Barrier Reef Community, Brisbane.

Barone, R., Prisinzano A., 2006. Peculiarità comportamentale del dinoflagellato *Ostreopsis ovata* Fukuyo (Dinophyceae): la strategia del ragno. Naturalista sicil. 30: 401-418.

Battocchi, C., Carubbi, M., Cappellacci, S., Totti, C., Penna, A., 2008. Applicazione di tecniche molecolari per l'identificazione di microalghe bentoniche tossiche (Ostreopsidaceae) in aree costiere dell'Adriatico settentrionale. Biol. Mar. Mediterr. 15 (1): 252-253.

Battocchi C., Totti C., Vila M., Masó M., Capellacci S., Accoroni S., Reñé A., Scardi M., Penna A., 2010. Monitoring toxic microalgae *Ostreopsis* (dinoflagellate) species in coastal waters of the Mediterranean Sea using molecular PCR-based assay combined with light microscopi. Marine Pollution Bulletin 60 (7): 1074-1084.

Beress L., Zwick J., Kolkenbrock H.J., Kaul P.N., Wassermann O., 1983. A method for the isolation of the Caribbean palytoxin (C-PTX) from the coelenterate (zoanthid) *Palythoa caribaeorum*. Toxicon 21: 285-290.

Besada E.G., Loeblich L.A., Loeblich A.R., 1982. Observations on tropical, benthic dinoflagellates from ciguatera-endemic areas – *Coolia*, *Gambierdiscus*, and *Ostreopsis*. Bulletin of Marine Science 32 (3): 723-735.

Bianco, I., Sangiorgi, V.C., Penna A., Guerrini, F., Pistocchi, R., Zaottini, E., Congestri, R., 2007. *Ostreopsis ovata* in benthic aggregates along the Latium coast. (middle Tyrrhenian sea). In: International Symposium on Algal Toxins, Trieste, May 27-29, 2007.

Bomber, J.W., 1985. Ecological studies of benthic dinoflagellates associated with ciguatera from the Florida Keys. M. Sc. Thesis, Florida Institute of Technology, 104 pp.

Bomber, J.W., Morton, S.L., Babinchak, J.A., Norris, D.R., Morton, J.G., 1988. Epiphytic dinoflagellate of drift algae – another toxigenic community in the ciguatera food chain. *Bull. Mar. Sci.*, 43: 204-214.

Bomber J.W., Rubio M.G., Norris D.R., 1989. Epiphytism of dinoflagellates associated with the disease ciguatera: substrate specificità and nutrition. *Phycologia* 28: 360-368.

Boni L., Guerrini F., Pistocchi R., Cangini M., Pompei M., Cucchiari E., Romagnoli T., Totti C., 2005. Microalghe tossiche del Medio e Alto Adriatico. Guida per acquacoltori e operatori sanitari. Casa editrice Fernandel - Ravenna.

Bottalico, A., Micella, P., Feliciti, G.P., 2002. Fioritura di *Ostreopsis* sp. (Dinophyta) nel porto di Otranto. In: Gruppo di Lavoro per l'Algologia – Società Botanica Italiana, Chioggia, 8–9 Novembre 2002.

Boyer G.L., Sullivan J.J., Andersen R.J., Harrison P.J., Taylor F.J.R., 1997. Effects of nutrient limitation on toxic production and composition in the marine dinoflagellate *Protogonyaulax tamarens*. *Mar. Biol.* 96: 123-128.

Bravo I., Vila M., Casabianca S., Rodriguez F., Rial P., Riobò P., Penna A., 2012. Life cycle stages of the benthic palytoxin-producing dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* (Dinophyceae). *Harmful Algae* 18: 24-34.

Bulgakov N.G., Levich A.P., 1999. The nitrogen: phosphorus ratio as a factor regulating phytoplankton community structure. *Archiv für Hydrobiologie*, 146: 3-22.

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

Cha J.K., Christ W.J., Finan J.M., Fujioka H., Kishi Y., Klein L.L., Ko S.S., Leder J., McWhorter W.W., Pfaff P., Yonaga M., Uemura D., Hirata Y., 1982. Stereochemistry of palytoxin. 4. Complete structure. Journal of the American Chemical Society 104: 7369-7371.

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

Ciminiello P., Dell'Aversano C., Fattorusso E., Forino M., 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., Florio C., Lorenzon P., De Bortoli M., Tubaro A., Poli M., Bignami G., 2009. Stereostructure and biological activity of 42-Hydroxy-palytoxin: a new palytoxin analogue from Hawaiian *Palythoa* subspecies. Chemical Research in Toxicology 22: 1851-1859.

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.

Congestri, R., Bianco, I., Sangiorgi, V., Penna, A., Zaottini, E., Albertano, P., 2006. *Ostreopsis Ovata* in aggregati bentonici lungo il litorale pontino. In: 101° congresso della società botanica italiana, Caserta, 27-29 settembre 2006.

Delgado, G., Lechuga-Deveze, C.H., Popowski, G., Troccoli, L., Salinas, C.A., 2006. Epiphytic dinoflagellates associated with ciguatera in the northwestern coast of Cuba. *Rev. Biol. Trop* 54: 299-310.

Di Turi, L., Lo Caputo, S., Marzano, M.C., Pastorelli, A.M., Pompei, M., Rositani, L., Ungano, N., 2003. Sulla presenza di *Ostreopsidaceae* (Dinophyceae) lungo il litorale barese. *Biol. Mar. Medit.* 10 (2): 675–678.

Edvardsen, B., Moy, F., Paasche, E., 1990. Hemolytic activity in extracts of *Chrysocromulina polylepis* grown at different levels of selenite and phosphate. In: Toxic marine phytoplankton, E. Granéli, B. Sundstom, L. Edler, and D.M. Anderson, eds., Elsevier, New York, pp. 284-289.

EFSA, 2009. Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish – palytoxin group. *EFSA J.* 1393: 1-38.

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

Faust, M. A., 1998. Mixotrophy in tropical benthic dinoflagellates. In Harmful Algae. (eds.) Reguera B., Blanco J., Fernandez M. L., Watt T. Xunta de Galicia and IOC Commission of UNESCO, Paris, France. pp 390-393.

Faust M.A., Gullendge R.A., 2002. In: Identifying harmful marine dinoflagellates, Smithsonian Institution, NMNH National Museum of National History, Contribution from the United States National Herbarium, 42: 1-444.

Flynn K., Francop J.M., Fernández P., Reguera B., Zapata M., Wood G., Flynn K.J., 1994. Changes in toxin content, biomass and pigments of the dinoflagellate *Alexandrium minutum* during nitrogen refeeding and growth into nitrogen and phosphorus stress. Mar. Ecol. Prog. Ser. 111: 99-109.

Flynn K.J., Flynn K., 1995. Dinoflagellate physiology, nutrient stress and toxicity. In: Lassus P., Arzul G., Le Denn E.E., Gentien P., Marcaillou C. (eds) Harmful marine algal blooms. Lavoisier Intercept, Paris, pp 541-550.

Flynn K.J., Flynn K., John E.H., Reguera B., Reyero M.I., Franco J.M., 1996. Changes in toxins intracellular and dissolved free amino acids of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* in response to changes in inorganic nutrients and salinity. J. Plankton Res. 18: 2093-2111.

Gallitelli M., Ungano N., Addante L.M., Gentiloni N., Sabbà C., 2005. Respiratory illness as a reaction to tropical algal blooms occurring in a temperate climate. JAMA 293 (21): 2599–2600.

Garcés E., Maso' M., Camp J., 1999. A recurrent and localized dinoflagellate bloom in Mediterranean beach. Journal of Plankton Research 21: 2373-2391.

Garcés E., Zingone A., Montresor M., Reguera B., Dale B. (Eds.), 2002. LIFEHAB: life histories of microalgal species causing harmful blooms. Office for the Official Publications of the European Communities, Luxembourg.

Gedaria, A.I., Luckas, B., Reinhardt, K., Azanza, R.V., 2007. Growth response and toxin concentrations of cultured *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* to varying salinity and temperature conditions. *Toxicon* 50: 518-529.

Geraci J.R., Anderson D.M., Timperi R.J., St. Aubin D.J., Early G.A., Prescott J.H., Mayo C.A., (1989). Humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) fatally poisoned by dinoflagellate toxin. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 46:1895–1898.

Gilbert P.M., Burkholder J.M., 2006. The complex relationship between increases in fertilization of the Earth, coastal eutrophication and proliferation of harmful algal blooms. In: Granéli E., Turner J.T. (Eds), *Ecology of Harmful Algae*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 341-354.

Gilbert P.M., Allen J.I., Bouwman A.F., Brown C.W., Flynn K.J., Lewitus A.J., Madden C.J., 2010. Modeling of HABs and eutrophication status, avances, challenges. *J. Mar. Syst.* 83: 262-275.

Gorbi S., Bocchetti R., Binelli A., Totti C., Cucchiari E., Accoroni S., Rafafelli F., Nanetti L., Vignini A., Mazzanti L., Regoli F., Ciminiello P., Fattorusso E., Bacchiocchi S., Graziosi T., Orletti R., 2010. Biological effects of palytoxin-like compounds from benthic microalga *Ostreopsis ovata*: A multibiomarkers approach with the mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, Vol. 157, Supplement 1, Pages S21.

Granéli E., Johansson N., Panosso R., 1998. Cellular toxin contents in relation to nutrient conditions for different groups of phycotoxins. In: Reguera B., Blanco J., Fernandez M.L., Wyatt T. (eds) *Harmful algae*. Xunta de Galicia and IOC-UNESCO, Grafisant, Santiago de Compostela, Spain, pp 321-324.

Granéli E., Carlsson P., 1998. The ecological significance of phagotrophy in photosynthetic flagellates. In: Anderson D.M, Cembella A.D., Hallegraeff G.M., editors. *Physiological ecology of harmful algal blooms*, vol. 41. Berlin: Springer, 1998. pp 539-557.

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

Granéli E., Vidyarathna N.K., Cumaratunga P.R.T., Scenati R., 2011. Can increases in temperature stimulate blooms of the toxic dinoflagellate *Ostreopsis ovata*? Harmful Algae 10: 165-172.

Guerrini F., Mazzotti A., Boni L., Pistocchi R., 1998. Bacterial-algal interactions in polysaccharide production. Aquat. Microb. Ecol. 15: 247-253.

Guerrini F., Cangini M., Boni L., Trost P., Pistocchi R., 2000. Metabolic responses of the diatom *Achnanthes brevipes* (Bacillariophyceae) to nutrient limitation. J. Phycol. 36: 882-890.

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

Guerrini F., 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 ovata* from the Tyrrhenian and Adriatic Seas. Toxicon 55: 211–220.

Guillard R.R.L., Wangersky P.J., 1958. The production of extracellular carbohydrates by some marine flagellates. Limnol. Oceanogr. 3: 449-454.

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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Toxicon 27: 1171-1187.

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

Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D. (Eds), 1995. Manual on Harmful Marine Microalgae, vol. 33. UNESCO.

Hallegraeff G.M., Anderson D.M., Cembella A.D., (Eds.), 2003. Manual on Harmful Marine Microalgae, vol. 33. UNESCO.

Hasle G.R., 1950. Phototactic vertical migration in marine dinoflagellates. *Oikos* 1950; 2: 162-75.

Hodgkiss I.J., Ho K.C., 1997. Are changes in N:P ratios in coastal waters the key to increase red tide blooms? *Hydrobiologia*, 352: 141-7.

Honsell G., De Bortoli M., Boscolo S., Dell'Aversano C., Batocchi C., Fontanile G., Penna A., Berti F., Sosa S., Yasumoto T., Ciminiello P., Poli M., Tubaro A., 2011. Harmful dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* Fukuyo: detection of ovatoxins in field samples and cell immunolocalization using antipalytoxin antibodies. *Environmental Science and Technology*, 46 (16): 7051–7059.

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

Janson S., Hayes P.K., 2006. Molecular Taxonomy of Harmful Algae. In: Ecology of Harmful Algae, Ecological Studies Vol. 189, Granéli 2006, pp. 9-21.

Johansson N., Granéli E., 1999a. Influence of different nutrient conditions on cell density, chemical composition and toxicity of *Primnesium parvum* (Haptophyta) in semicontinuous cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 239: 243-258.

Johansson N., Granéli E., 1999b. Cell density, chemical composition and toxicity of *Chrysochromulina polylepis* (Haptophyta) in relation to different N:P supply ratios. *Mar. Biol.* 135: 209-217.

John E.H., Flynn K., 2000. Growth dynamics and toxicity of *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae): the effect of changing N:P supply ratios on internal toxin and nutrient levels. *European Journal of Phycology*, 35: 1, 11-23.

Katircioglu H., Akin B.S., Atici T., 2004. Microalgal toxin(s): characteristics and importance. *African Journal of Biotechnology*, 3 (12): 667-674.

Kimura S., Hashimoto K., 1973. Purification of the toxin in a zoanthid *Palithoa tuberculosa*. *Publication of the Seto Marine Biological Laboratory* 20: 713-718.

Kermarec F., Dor F., Armengaud A., Charlet F., Kantin R., Sauzade D., De Haro L., 2008. Health risks related to *Ostreopsis ovata* in recreational waters. *Environ. Risque Sante*. 7: 357-363.

Latasa M., Berdalet E., 1994. Effect of nitrogen and phosphorus starvation on pigment composition of cultured *Heterocapsa* sp. *J. Plankton Res.*, 16: 83-94.

Laza-Martinez A., Orive E., Miguel I., 2011. Morphological and genetic characterization of benthic dinoflagellates of the genera *Coolia*, *Ostreopsis* and *Prorocentrum* from the south-eastern Bay of Biscay. *European Journal of Phycology* 46 (1): 45-65.

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

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

Lenoir S., Ten-Hage L., Turquet J., Quod J.P., Bernard C., Hennion M.C., 2004. First evidence of palytoxin analogs from an *Ostreopsis mascarenensis* (Dinophyceae) natural bloom in southwestern Indian Ocean. *J. Phycol*, 40: 1042-1051.

Lim, P.T., Ogata T., 2005. Salinity effect on growth and toxin production of four

tropical *Alexandrium* species (Dinophyceae). *Toxicon*, 45: 699-710.

Liu H., Buskey E.J., 2000. Hypersalinity enhanced the production of extracellular polymeric substance (EPS) in the Texas brown tide alga, *Aureoumbra lagunensis* (Pelagophyceae). *J Phycol* 36: 71-77.

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

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 (5): 842-847.

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

Malagoli D. 2007. A full-length protocol to test hemolytic activity of palytoxin on human erythrocytes. *Invertebrate Survival Journal* 4: 92-94.

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

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.

Socal G., Buttini I., Cabrini M., Mangoni O., Penna A., Totti C., 2010. Manuale ISPRA, Metodologie di studio del plankton marino, p 372.

Maso M., Garcés E., 2006. Harmful microalgae blooms (HAB): problematic and conditions that induce them. *Marine Pollution Bulletin*; 53: 620-630.

Matthews S.G., Pitcher G.C., 1996. Worst recorded marine mortality on the South African coast. *Harmful and Toxic Algal Blooms*. pp. 89-92.

Menzel D.W., Corwin N., 1965. The measurement of total phosphorus in sea water based on the liberation of organically bound fraction by persulfate oxidation. *Limnol. Oceanogr.* 10: 280-282.

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

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

Moore R.E., Scheuer P.J., 1971. Palytoxin: a new marine toxin from a Coelenterate. *Sci. (Washington, D.C.)* 172: 495-498.

Moore R.E., Bartolini G., 1981. Structure of palytoxin. *J. Am. Chem. Soc.* 103: 2491-2494.

Moore R.E., 1985. Structure of palytoxin. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturst* 48: 81-202.

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., 2008. Occurrence and Toxicology of Palytoxins. In: Botana, L.M. (Ed.), *Seafood and Freshwater Toxins*. CRC Press, Boca Raton, pp 693-713.

Munday R. 2011. Palytoxin toxicology: animal studies. *Toxicon* 57: 470-477.

Myklestad S., 1977. Production of carbohydrates by marine planktonic diatoms. II. Influence of the N/P ratio in the growth medium on the assimilation ratio, growth rate, and production of cellular and extracellular carbohydrates by *Chaetocerus affinis* var. *willei* (Gran) Hustedt and *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 29: 161-179.

Myklestad S.M., 1995. Release of extracellular products by phytoplankton with the special emphasis on polysaccharides. Sci. Total. Environ. 165: 155-164.

Okolodkov, Y., Campos-Bautista, G., Garate-Lizarraga, I., Gonzalez-Gonzalez, J.A.G., Hoppenrath, M., Arenas, V., 2007. Seasonal changes of benthic and epiphytic dinoflagellates in Veracruz reef zone, Gulf of Mexico. Aquat. Microb. Ecol. 47: 223-237.

Parsons, M.L., Preskitt, L.B., 2007. A survey of epiphytic dinoflagellates from the coastal waters of the island of Hawai'i. Harmful Algae 6: 658-669.

Paz, B., Vazquez, J.A., Riobò, P., Franco, J.M., 2006. Study of the effect of temperature, irradiance, and salinity on growth and yessotoxin production by the dinoflagellate *Protoceratium reticulatum* in culture by using a kinetic and factorial approach. Mar. Environ. Res. 62: 286-300.

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

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.

Perini F., Casabianca A., Battocchi C., Accoroni S., Totti C., Penna A., 2011. New approach using the real time PCR method for estimation of the toxic marine dinoflagellate *Ostreopsis* cf. *ovata* in marine environment. PLoS ONE 6 (3).

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 assay. *Water research* 46: 82-92.

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

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

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

Rhodes L.L., Munday R., Briggs L.R., Holland P.T., Miles C.O., Loader J., Jensen D., Cooney J., 2006. *Ostreopsis siamensis* and palytoxin-related compounds in New Zealand: a risk to human health? In: Moestrup et al., (Eds.), *Proceedings of the 12th International Conference on Harmful Algae*, 2008. ISSHA and International Oceanographic Commission of UNESCO, Copenhagen, pp 326-329.

Rhodes L., Smith K., Munday R., Briggs L., Selwood A., 2010. *Ostreopsis ovata* isolated from Rarotonga, Cook Islands, 14th International Conference of Harmful Algae, Hersonissos-Crete (Greece), 1-5 November. Conference abstract book, p 229.

Rhodes L., 2011. World-wide occurrence of the toxic dinoflagellate genus *Ostreopsis* Schmidt. *Toxicon* 57 (3): 400-407.

Richlen M.L., Lobel P.S., 2011. Effects of depth, habitat, and water motion on the abundance and distribution of ciguatera dinoflagellates at Johnston Atoll, Pacific Ocean. *Marine Ecology – Progress Series* 421: 51-66.

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

Riobò P., Franco J.M., 2011. Palytoxin: Biological and chemical determination. *Toxicon* 57: 368-375.

Rossi R., Castellano V., Scalco E., Serpe L., Zingone A., Soprano V., 2010. New palytoxin-like molecule in Mediterranean *Ostreopsis* cf. *ovata* (dinoflagellates) and in *Palythoa tuberculosa* detected by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Toxicon* 56 (8): 1381-1387.

Saldarriaga JF, Taylor FJR, Cavalier-Smith T et al (2004) Molecular data and the evolutionary history of dinoflagellates. *Eur J Protistol* 40: 85-111.

Sansoni G., Borghini B., Camici G., Casotti M., Righini P., Rustighi C., 2003. Fioriture algali di *Ostreopsis ovata* (Gonyaulacales, Dinophyceae): un problema emergente. *Biol. Amb.* 17 (1): 17-23.

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.

Scholin C.A., Gulland F., Doucette G.J., Benson S., Busman M., Chavez F.P., Cordaro J., De Long R., De Vogelaere A., Harvey J., Haulena M., Lefebvre K., Lipscomb T., Loscutoff S., Lowenstine L.J., Marin R. III, Miller P.E., Mc Lellan W.A., Moeller P.D.R., Powell C.L., Rowles T., Silvagni P., Silver M., Spraker T., Trainer V., Van Dolah F.M., 2000. Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature* 403: 80-84.

Selina M.S., Orlova T.Y., 2010. First occurrence of the genus *Ostreopsis* (Dinophyceae) in the Sea of Japan. *Botanica Marina* 53 (3): 243-249.

Selina M.S., Levchenko E.V., 2011. Species composition and morphology of dinoflagellates (Dinophyta) of epibenthic assemblages of Peter the Great Bay in the Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology* 37 (1): 23-32.

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.

Simoni, F., Gaddi A., Di Paolo, C., Lepri, L., 2003. Harmful epiphytic dinoflagellate on Tyrrhenian Sea reefs. *Harmful Algae News* 24: 13-14.

Simoni, F., Di Paolo, C., Gori, L., Lepri, L., 2004. Further investigations on blooms of *Ostreopsis ovata*, *Coolia monotis*, *Prorocentrum lima*, on the macroalgae of artificial and natural reefs in the Northern Tyrrhenian Sea. *Harmful Algae News* 26: 5-7.

Smayda T.J., Reynolds C.S., 2003. Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *Journal of Sea Research* 49: 95-106.

Smayda T.J., 1989. Primary production and the global epidemic of phytoplankton blooms in the sea: a linkare? In: Cosper E.M., Bricelj V.M., Carpenter E.J., editors. *Novel phytoplankton blooms*, vol. 35. Berlin: Springer, pp 449-83.

Steidinger, K. A., 1983. A re-evaluation of toxic dinoflagellate biology and ecology. In F.E. Round and D.J. Chapman (ed.), *Progress in phycological research*, vol. 2. Elsevier Science Publishing, Inc., New York, pp 147- 188.

Steidinger, K. A., and D. G. Baden, 1984. Toxic marine dinoflagellates. In D.L. Spector (Ed.), *Dinoflagellates*. Academic Press, Inc., New York, pp 201-261.

Steidinger K., Garcés E., 2006. Ecology of Harmful Algae, Edna Granéli and Jefferson T. Turner (Eds.), Ecological Studies, Vol. 189. Importance of Life Cycles in the Ecology of Harmful Microalgae 4: 37-49

Stoecker D.K., 1999. Mixotrophy among dinoflagellates. Journal of Eukaryotic Microbiology, 46: 397-401

Taylor, F.J.R., 1979. A description of the benthic dinoflagellate associated with maitotoxin and ciguatoxin, including observations on Hawaiian material. In: Taylor, D.L., Seliger, H.H. (Eds.), Toxic Dinoflagellate Blooms. Elsevier North Holland, New York, pp 71-76.

Taylor, F.J.R., 1985. The distribution of the dinoflagellate *Gambierdiscus toxicus* in the Eastern Caribbean. Proc. 5th Int. Coral Reef Symp., No. 4, pp. 423-428.

Tichadou L., Glaizal M., Armengaud A., Grosseil H., Lemée R., Kantin R., Lasalle J.L., Drouet G., Rambaud L., Malfait P., de Haro L., 2010. Health impact of unicellular algae of *Ostreopsis* genus blooms in the Mediterranean Sea: experience of the French Mediterranean Coast Surveillance Network from 2006 to 2009. Clin. Toxicol. 48: 839-844.

Tindall, D.R., Morton, S.L., 1998. Community dynamics and physiology of epiphytic/benthic dinoflagellates associated with ciguatera. In: Anderson, D., Cembella, A., Hallegraeff, G. (Eds.). Physiological ecology of Harmful Algal Blooms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 293-313.

Tognetto, L., Bellato, S., Moro I., Andreoli, C., 1995. Occurrence of *Ostreopsis ovata* (Dinophyceae) in the Tyrrhenian Sea during summer 1994. Bot. Mar. 38: 291-295.

Totti, C., Cucchiari, E., Romagnoli, T., Penna, A., 2007a. Bloom of *Ostreopsis ovata* in the Conero Riviera (NW Adriatic Sea). Harmful Algae News 33: 12–13.

Totti, C., Accoroni S., Cerino F., Cucchiari E. Romagnoli T., 2010. *Ostreopsis ovata* bloom along the Conero Riviera (northern Adriatic sea): Relationships with environmental conditions and substrata. *Harmful Algae*, 9: 233-239.

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

Tubaro, A., Hungerford, J., 2007. Toxicology of marine toxins. *Veterinary Toxicology*. chap 60: 725-752.

Turki, S., 2005. Distribution of toxic dinoflagellates along the leaves of seagrass *Posidonia oceanica* and *Cymodocea nodosa* from the gulf of Tunis. *Cah. Biol. Mar.* 46: 29-34.

Turki, S., Harzallah, A., Sammari, C., 2006. Occurrence of harmful dinoflagellates in two different Tunisian ecosystems: the lake of Bizerte and the gulf of Gabès. *Cah. Biol. Mar.*, 47: 253-259.

Uemura, D., Hirata, Y., Iwashita, T., Naoki, H., 1985. Studies on Palytoxins. *Tetrahedron* 41: 1007-1017.

Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Fujita, T., Naoki, H., Kan, Y., Yasumoto, T., 2001. Structure elucidation of Ostreocin-d, a Palytoxin Analog Isolated from the Dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2585-2588.

Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Fujita, T., Naoki, H., Yasumoto, T., 2002. Structural Confirmation of Ostreocin-D by Application of Negative-Ion Fast-Atom Bombardment Collision-Induced Dissociation Tandem Mass Spectrometric methods. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16: 2387-2393.

Ungaro, N., Marano, G., Pastorelli, A.M., Marzano, M.C., Pompei, M., 2005. Presenza di *Ostreopsidaceae* nel basso Adriatico. *Rapp. ISTISAN* 05/29.

Usami, M., Satake, M., Ishida, S., Inoue, A., Kan, Y., Yasumoto, T., 1995. Palytoxin analogs from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. J. Am. Chem. Soc. 117: 5389-5390.

Vanucci S., Guerrini F., Milandri A., Pistocchi R., 2010. Effects of different levels of N- and P-deficiency on cell yield, okadaic acid, DTX-1, protein and carbohydrate dynamics in the benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. Harmful Algae 9: 590-599.

Vanucci S., Guerrini F., Pezzolesi L., Dell'Aversano C., Ciminiello P., Pistocchi R., 2012. Cell growth and toxins' content of *Ostreopsis cf. ovata* in presence and absence of associated bacteria. Cryptogamie, Algologie, 33 (2): 105-112.

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.

Vaulot D., Lebot N., Marie D., Fukai E., 1996. Effect of phosphorus on the *Synechococcus* cell cycle in surface Mediterranean waters during summer. Appl. Environ. Microbiol., 62: 2527-2533.

Vidyarthna N.k., Granéli E., 2012. Influence of temperature on growth toxicity and carbohydrate production of Japanese *Ostreopsis ovata* strain, a toxic-bloom-forming dinoflagellate. Aquat. Microb. Ecol., 65: 261-270.

Villarino M.L., Figueiras F.G., Jones K.J., Alvarez-Salgado X.A., Richard J., Edwards A., 1995. Evidence of in situ diel vertical migration of a red tide microplankton species in Ria de Vigo (NW Spain). Marine Biology, 123: 607-17.

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

Vivaldi, B., Masiello, L., Ottonello, G., Bertolotto, R. M., Moretto P., Prearo M., Ferrari, A., 2007. Monitoring toxic products of *Ostreopsis ovata* in marine organisms In: International Symposium on Algal Toxins, Trieste, May 27-29.

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

Walsh G.E., Bowers R.E., 1971. A review of Hawaiian zoanthids with description of three new species. *Zool. J. Linn. Soc.* 50: 161-180.

Whittle K., Gallacher S. (2000) – Marine toxins. *British Medical Bulletin.* 56(1): 236-253.

Wiles J.S., Vick J.A., Christensen M.K., 1974. Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. *Toxicon*, 12: 427-433.

Wolfstein K., Stal L.J., 2002. Production of extracellular polymeric substances (EPS) by benthic diatoms: effects of irradiance and temperature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 236: 13-22.

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

## **RINGRAZIAMENTI**



Al termine di questo percorso di studi è necessario ringraziare chi in un modo o nell'altro ha lasciato un segno nella mia vita.

Un ringraziamento importante va alla Prof.ssa Rossella Pistocchi, che durante le sue lezioni mi ha trasmesso un interesse inaspettato per il mondo delle microalghe tossiche e, per la possibilità che mi ha offerto di approfondire tale argomento tramite un elaborato finale. Un grazie speciale va alla mia correlatrice Laura, che mi ha seguito e supportato durante questo percorso, chiarendo i miei dubbi, incoraggiandomi fino alla fine! Lo stesso vale per tutto lo staff del laboratorio di algologia, Franca, Flavio, Giulia, Matilde e Silvana che hanno reso questa esperienza ancora più piacevole.

Ringrazio anche l'Università Federico II di Napoli, che ha permesso l'analisi delle tanto aspettate tossine, moltiplicando la mia ansia durante l'attesa dei risultati!!!

Un grazie va agli amici incontrati in questo lungo percorso, ai colleghi della biblioteca di scienze ambientali e, ai vecchi amici che hanno reso la distanza un pò meno distante!! Il GRAZIE più grande va a alla mia famiglia, che mi ha permesso di diventare la persona che sono oggi; alla mia mamma che mi ha fatto inseguire il mio sogno fino alla fine, nonostante i mille ripensamenti e i grandi ostacoli incontrati; al mio papà e alle sue parole mai dimenticate che mi hanno rialzato dopo ogni caduta. GRAZIE perchè avete sempre creduto in me!

Per ultimo, ma non ultimo per importanza, voglio ringraziare Nicolò, che mi ha sopportato durante le mie crisi isteriche e mi ha saputo regalare una delle cose più belle della vita: il sorriso.

Infine ringrazio il mare che mi ha cullato tra le sue onde e nonostante il mal di mare mi ha fatto raggiungere la terra ferma, arricchendo di tesori la mia vita.

"Perchè nessuno possa dimenticare di quanto sarebbe bello se, per ogni mare che ci aspetta, ci fosse un fiume per noi. E qualcuno, un padre, un amore, qualcuno, capace di prenderci per mano e di trovare quel fiume, immaginarlo, inventarlo e, sulla sua corrente posarci, con la leggerezza di una sola parola, addio. Questo, davvero, sarebbe meraviglioso. Sarebbe dolce, la vita, qualunque vita. E le cose non farebbero male, ma si avvicinerebbero portate dalla corrente, si potrebbe prima sfiorarle, poi toccarle e solo alla fine farsi toccare. Farsi ferire, anche. Morirne. Non importa. Ma tutto sarebbe finalmente umano. Basterebbe la fantasia di qualcuno, un padre, un amore, qualcuno. Lui saprebbe inventarla una strada, qui, in mezzo a questo silenzio, in questa terra che non vuole parlare. Strada clemente e, bella. Una strada da qui al mare". (A.B.)

